



**Escuela de Posgrado**  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Córdoba



Universidad  
Nacional  
de Córdoba

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ALUMINIO  
POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON PLASMA ACOPLADO INDUCTIVAMENTE (ICP-MS)  
EN SOLUCIONES DE ALBÚMINA SÉRICA HUMANA**

**TRABAJO FINAL INTEGRADOR**

**NORA VALENTINA CAÑETE VILLARREAL**

**Instructora: Dra. Patricia Lucero**

Laboratorio de la Unidad Espectroscopia - CEPROCOR

Córdoba, 28 de Abril 2022

## RESUMEN

La Solución de Albúmina Humana (SAH) es un medicamento inyectable endovenoso, pasteurizado, estéril y apirógeno, que contiene una solución acuosa proteica de albúmina humana al 20%. Durante la toma de las muestras de sangre total, plasmaféresis, procesamiento del plasma y almacenamiento del producto terminado ocurre la incorporación de aluminio (Al) como contaminante. El Al es el tercer elemento más abundante en la corteza terrestre, las personas se encuentran expuestas a través de partículas presentes en el aire, alimentos, agua potable, medicamentos, coadyuvantes de vacunas, entre otros. Diversos estudios evidencian que los compuestos de Al tienen potencial efecto principalmente en el sistema óseo y a nivel cognitivo, lo que hace necesario su monitoreo; la Farmacopea Argentina especifica que la concentración de Al no debe ser mayor a los  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  para asegurar que no se superará el límite diario admisible de exposición diaria. La determinación de metales en algunos fluidos biológicos por ICP-MS puede realizarse por dilución directa aunque, matrices complejas como la SAH provocan fluctuación en las señales de respuesta en la jornada de análisis. Se evaluaron diferentes condiciones de trabajo para la digestión de muestras de SAH y determinación de Al. El pretratamiento evaluado permitió obtener: niveles de blancos adecuados para Al, límite de detección instrumental y metodológico (LDM), valores de precisión y recuperación acordes al propósito del análisis. El uso de patrones multielementales en condiciones específicas de trabajo permite la cuantificación de otros elementos traza tales como Cu, Zn, Se, etc., presentes naturalmente en el tipo de matriz y evaluar la inocuidad del producto.

## INTRODUCCIÓN

La Solución de Albúmina Humana (SAH) es una solución acuosa de proteínas obtenidas a partir de plasma proveniente de unidades de sangre total y/o de plasmaféresis que han sido sometidas a controles serológicos establecidos para Bancos de Sangre (ANMAT .Disp1682, 2012). Pertenece a la categoría de agente expansor plasmático, código del Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica, Química (ATC): B05AA01 "Sustituto de la sangre y fracciones proteicas plasmáticas". La separación de la albúmina se lleva a cabo a través del Método 6 de Cohn en condiciones estrictamente controladas de pH, fuerza iónica y temperatura, de manera tal que en el producto final el contenido de albúmina sea mayor que el 95 % de las proteínas totales (Cohn, E. J., 1942; Farmacopea Argentina 7ª Ed., 2010). La SAH se indica para el restablecimiento y mantenimiento del volumen circulatorio, por hipovolemia, en casos de hemodiálisis, quemaduras severas, síndrome nefrótico, fallas agudas del hígado, hiperbilirrubinemia neonatal, entre otras (UNC-Hemoderivados).

Durante la toma de las muestras de sangre total, plasmaféresis, procesamiento del plasma y almacenamiento del producto terminado ocurre la incorporación de aluminio (Al) como contaminante. Las fuentes de mayor aporte son: el anticoagulante citrato de sodio, la tierra de diatomeas utilizadas durante la filtración y el vidrio de los frascos empleados para el almacenamiento (Zandieh and Banazadeh, 2005).

El Al es el tercer elemento más abundante en la corteza terrestre después del oxígeno y el silicio, no se encuentra en estado libre sino formando parte de compuestos químicos principalmente en estado trivalente ( $Al^{3+}$ ). Por lo general en casi todas sus formas es inocuo para los humanos y la mayoría de las especies. Sin embargo, en condiciones ácidas como por ejemplo la lluvia ácida, ocasiona un aumento drástico en su forma iónica lo que puede afectar los ecosistemas en general (Curtis D. Klaassen - Casarett & Doulls, 2019). Las personas se encuentran expuestas al Al a través de partículas presentes en el aire y en alimentos (de forma natural o por el uso de aditivos) (FAO/WHO, 2007; Hardisson, 2017). El agua potable contiene Al residual por el uso de sulfato de Al como floculante en los tratamientos; el Código Alimentario Argentino (CAA) especifica un máximo permitido de  $200 \mu g L^{-1}$ . Los utensilios de cocina de este metal y envoltorios pueden aumentar los niveles de exposición. Los productos cosméticos, ciertos medicamentos, coadyuvantes de vacunas también contienen Al (Fawell, 1998; Exley, 2013).

En el año 2006 el comité de expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y de la Organización mundial de la Salud (OMS) establecieron reducir la ingesta semanal tolerable provisional (PTWI por sus siglas en inglés) de Al de 7 a 1 mg/Kg de peso corporal que se aplica a todos los compuestos de Al presentes en los alimentos, incluyendo los aditivos. Evaluaron diversos estudios en los que se demuestra que los compuestos de Al tienen potencial efecto en el sistema reproductivo y en el sistema nervioso en desarrollo en dosis más bajas que las utilizadas para establecer la PTWI anterior, además de la posibilidad de su bioacumulación. El Comité estableció un LOEL de 50 mg/kg peso corporal por día por un factor de seguridad de 100. Estas medidas fueron contempladas en la resolución N° 35/10 del Reglamento Técnico Mercosur en el 2010 e incorporadas en el CAA en 2011 (resolución 176/2011 y 589/2011).

La absorción del Al ocurre principalmente a nivel respiratorio y gastrointestinal, no así a nivel dérmico, en circulación se une en un 80 a 90 % a transferrina debido a su estado de oxidación similar al hierro sérico, alcanzando distintos tejidos incluso puede atravesar barrera hematoencefálica. La excreción es principalmente por vía renal, la eliminación es de 15-55  $\mu g/día$  a través de orina y heces (Aschner, M. Anand, S. Bloom, 2008; Hardisson, 2017). Los mecanismos implicados en la toxicidad del

Al no se conocen claramente, se sabe que mimetiza al magnesio, calcio y hierro en sus funciones biológicas alterando la homeostasis de los mismos. Puede acumularse en huesos en ciertas patologías por ejemplo en insuficiencia renal, impidiendo la calcificación, y dando lugar al desarrollo de osteomalacia (Klein, 2019; Hasan, 2020). Además, a nivel neuronal el aluminio puede acumularse a lo largo del tiempo, el ion libre  $\text{Al}^{3+}$  es un agente prooxidante, interacciona con el anión superóxido generando cambios en el sistema redox que puede producir estrés oxidativo con la consecuente apoptosis y muerte celular; también el  $\text{Al}^{3+}$  induce aumento sostenido del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular favoreciendo al compromiso energético de las células. (Exley, 2014). Estudios anteriores, algunos que emplean modelos animales, han asociado este mecanismo a enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), enfermedad de Parkinson y demencias (Wu et al., 2012; Bondy, S. 2016; Mirza, A. 2017). Otros sugieren que el Al estaría implicado en cambios en los niveles de glutamato y de ácido gamma-aminobutírico (GABA) en cerebro que inducirían la neurotoxicidad, con la formación de agregados neurofilamentosos intraneuronales, similares a los presentes en enfermedad de Alzheimer (Abd El-Rahman, 2003; Vasudevaraju et al., 2008). También se ha demostrado que  $\text{Al}^{3+}$  provoca la degeneración de neuronas dopaminérgicas (Fulgenzi, Vietti and Ferrero, 2014).

Debido al potencial tóxico del aluminio y su presencia como impureza en los productos de SAH es necesario su monitoreo, la Farmacopea Argentina especifica que la concentración de Al no debe ser mayor a los  $200 \mu\text{g L}^{-1}$  para asegurar que no se superará el límite diario admisible de exposición. Para la determinación de Al en SAH se indica el empleo del Método I por Espectrometría de absorción o emisión atómica con horno de grafito. El empleo del horno de grafito como sistema de atomización tiene la ventaja de utilizar un pequeño volumen de muestra y proveer de una alta sensibilidad analítica haciendo posible la cuantificación al nivel de trazas. Algunas desventajas de esta metodología son: permite solo la determinación de un analito a la vez, la medición también se realiza de a una muestra, las altas temperaturas que se alcanzan para atomizar el Al son condiciones agresivas de trabajo que van deteriorando la integridad de los tubos de grafito; además la posibilidad de volatilización de Al en presencia de cloruros lleva a la necesidad de adicionar un modificador de matriz de alta pureza para la estabilización del analito. Para la cuantificación específica de impurezas elementales individuales en los productos e ingredientes farmacéuticos la Farmacopea de Estados Unidos (USP) <232>/<233> y La Conferencia Internacional sobre armonización (ICH) Q3D sugieren técnicas analíticas por Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) o Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (USP, 2014; ICH, 2016). Esta metodología tiene como ventaja el análisis de una batería de muestras en un mismo procesamiento, lo que garantiza un menor tiempo en la jornada de trabajo aumentando así la productividad, además permite un análisis multielemental de manera simultánea y tiene la capacidad de discriminar entre los diferentes isótopos de cada elemento. También provee de una alta sensibilidad analítica, en el orden de las partes por billón (ppb) y por trillón (ppt). Una desventaja del empleo de ICP es la presencia de interferencias provenientes de la matriz que puede llevar a la deposición de residuos de carbono y obstrucción de los orificios, bloqueo de conos y consiguiente deriva en la señal, esto limita las mediciones en muestras sin un tratamiento previo sobre todo para matrices complejas. Es por ello que al analizar matrices con altas concentraciones de sales y proteínas mediante ICP-MS, la preparación de la muestra juega un papel fundamental. A menudo, las muestras de sangre se digieren por completo en soluciones ácidas o alcalinas. Los procedimientos que consumen menos tiempo y dinero para el análisis de alto rendimiento implican la dilución con soluciones ácidas o alcalinas (p. ej., hidróxido de amonio, hidróxido de tetrametilamonio).

Como se mencionó anteriormente la ubicuidad del Al y su abundancia en el medio ambiente contribuye a que no se cuente con muestras blanco, debido a que todas las SAH contienen Al como impureza, por lo cual se emplean blancos de reactivos durante el análisis. Otra limitación es la carencia de material de referencia de SAH. Se utiliza como material de referencia de Al por laboratorios de referencia, si bien el contenido de proteínas totales es menor que la SAH, durante el procesamiento se realizan diluciones que asemejan estas matrices, y se logra considerar este material como apto para control.

Los medicamentos hemoderivados se comercializan y se emplean principalmente en los centros asistenciales de salud, ante la exigencia de la Farmacopea Argentina es necesaria la medición de la concentración total de Al en el producto final, por lo cual se desarrolló un método para la determinación de Al en SAH empleando como metodología la técnica ICP-MS lo que garantiza la detección a niveles de traza y una rápida respuesta ante la necesidad de monitoreo sobre lotes completos de producción.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Muestras***

Para el desarrollo y validación del método analítico se emplearon soluciones de albúmina humana (SAHs) al 20 %. Se utilizaron SAHs de distintos lotes y dentro del periodo de vigencia. Se conservaron en los envases cerrados a una temperatura no mayor que 25 °C y una vez fraccionadas a temperaturas entre 4-8 °C.

Debido a que no se comercializan materiales de referencia de ASH se emplearon materiales de control para metales (muestras de plasma) de la ronda 68/2021 del German External Quality Assessment Scheme (G-EQUAS).

### ***Patrones y reactivos***

Los patrones multielementales fueron provistos por *Inorganic Ventures*: Multi Analyte Custom Grade Solution - IV-60407 que contiene 30 elementos en concentración de 100 mg L<sup>-1</sup>, solución monoelemento de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Sc y Trace Elements in Fresh Water -IV-STOCK-1643 (Material de referencia acuoso). Se utilizó como diluyente de patrones y muestras una solución acuosa de HNO<sub>3</sub> al 2 %. La solución patrón multielemento se diluyó para preparar una solución intermedia de concentración 1 mg L<sup>-1</sup> para cada elemento. A partir de esta solución intermedia se prepararon soluciones de trabajo en el rango 1 - 40 µg L<sup>-1</sup> Al. Para la corrección de fluctuaciones por el método de patrón interno se utilizó una solución patrón de Sc de concentración 50 µg L<sup>-1</sup>.

Se seleccionó este elemento ya que cumple con los requisitos de estar ausente en la matriz y poseer masa cercana al analito y potencial de ionización similar. Las soluciones patrón se conservaron en recipientes de polipropileno (PP), a temperatura ambiente al abrigo de la luz y fueron preparadas con agua grado reactivo Tipo I según ASTM (Milli-Q) obtenida en el momento mediante el sistema Millipore Integral 10®.

La vigencia de estas soluciones se estableció en función de las concentraciones y de la respuesta esperada durante la medición instrumental; en el caso de las soluciones de trabajo solo se emplearon hasta dos veces y se renovaron en cada jornada.

Se emplearon HNO<sub>3</sub> 65% pro-análisis marca Cicarelli y HCl 36,5- 38,0 % pro-análisis (ACS) marca

Cicarelli. Los ácidos fueron purificados utilizando destilación *sub-boiling* en sistema de cuarzo (Milestone Duopure). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 % Suprapur® fue provisto por MERCK.

### ***Equipamiento***

Se empleó un espectrómetro ICP-MS marca Agilent modelo 7800 con celda de colisión/reacción que fue operado a 1550 W de potencia RF, con conos de Níquel. El software utilizado para la adquisición de los datos fue Mass Hunter.

Para el tratamiento de muestras se emplearon: Sonicator Cole Parmer, plancha de calentamiento cerámica Cole Parmer, Campana plástica de extracción de vapores ácidos J. S. Cartmay y cabina de seguridad biológica Telstar modelo Bio IIA.

Se utilizaron balanzas analíticas Shimadzu-Modelo AUW220D-Legibilidad 0,01 mg y Shimadzu Libror AEG-220-Legibilidad 10 mg.

### ***Lavado de material***

Todo el material utilizado (matraces, tubos PP, puntas de pipetas, etc.) fue sometido a un lavado exhaustivo según el protocolo establecido en el laboratorio para análisis de trazas por ICP-MS:

1. Se enjuaga con agua Milli-Q y se sumerge en detergente no iónico al 10 % durante 24 h.
2. Se enjuaga con agua Milli-Q hasta que no queden restos de detergente, luego se sumerge en HNO<sub>3</sub> 20 % durante 24 h.
3. Se enjuaga 5 veces con agua Milli-Q y se deja secar en cabina de flujo laminar.
4. Una vez seco se puede almacenar en contenedores herméticos o en bolsas plásticas.

## **VALIDACIÓN**

Se evaluó especificidad, intervalo de trabajo, linealidad, precisión, veracidad, límite de detección, límite de cuantificación e incertidumbre; según los lineamientos generales de la guía EURACHEM (2nd ed. 2014) y la Farmacopea Argentina 7<sup>a</sup> Ed.

### **Especificidad**

La especificidad es la capacidad de un método para evaluar inequívocamente el analito en presencia de los componentes que pueden estar presentes, tales como impurezas, productos de degradación, componentes de la matriz, etc. (Farmacopea, 2003). Dado que el método es por espectrometría de masas y cada elemento se determina en función de relación masa/carga, la interferencia de elementos dentro del método y otros elementos presentes en el blanco de reactivo, se determinó monitoreando en blancos de reactivo las masas que puedan tener isótopos del mismo peso atómico (interferencia isobárica) y especies poliatómicas que se puedan formar (óxidos por ejemplo) con masa total igual a la masa del Al.

Criterio de aceptación: la respuesta de la interferencia en el blanco de reactivos no debe ser mayor que el 20 % de la respuesta (cuentas por segundo) de la solución de patrón de calibración de menor concentración (1 µg L<sup>-1</sup>) (Chawla, 2021)

### ***Intervalo de trabajo y Linealidad***

El intervalo de trabajo es el rango de concentraciones en el que el método proporciona resultados con una aceptable incertidumbre. El extremo inferior del rango de trabajo está acotado por el LCM. El extremo superior está definido por concentraciones a las que se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica. La técnica ICP-MS se caracteriza por permitir trabajar en un rango dinámico de varios órdenes de magnitud si el detector está bien calibrado para sus dos modos de operación

(conteo de pulso y analógico) pero como se busca asegurar un valor bajo se decide trabajar en una zona de concentraciones reducidas y acotadas.

Para evaluar el rango de trabajo, se consideraron tanto la linealidad del método como el procedimiento de calibración propuesto en el método. Para evaluar el rango de trabajo instrumental se emplearon 5 soluciones de aluminio (patrones de calibración) con concentraciones en el rango:  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  -  $40 \mu\text{g L}^{-1}$ . Cada nivel de concentración se analizó por duplicado. La curva de calibración se construyó graficando la respuesta (cuentas por segundo) en función de la concentración nominal del analito. La evaluación inicial del rango de trabajo instrumental fue mediante una inspección visual de la curva. Para confirmar la relación entre la concentración de Al y la respuesta del instrumento se realizó un análisis de regresión lineal de los datos que proporcionó una pendiente y una ordenada al origen. Para evaluar el rango de trabajo del método se procede del mismo modo que para la evaluación del rango de trabajo instrumental pero empleando muestras de SAH enriquecidas con alícuotas de soluciones de trabajo de Al (EURACHEM 2014).

La linealidad se evaluó empleando las propuestas de la ISO 8466-1 (International Standard Organization, 1990): (1) la representación gráfica de los datos con la recta de regresión lineal calculada y (2) test estadístico: se calcula el valor PG requerido para la prueba F. Si  $PG \leq F$  la función de calibración no lineal no da lugar a una mejora significativa del ajuste y por lo tanto la función de calibración es lineal

### ***Precisión***

La precisión de un método analítico es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo individual cuando el método se aplica repetidamente a varias alícuotas de una muestra homogénea. Se evaluó la precisión del método en términos de repetibilidad (precisión intradiaria) y precisión intermedia (precisión interdiaria) y fue expresada como porcentaje de la Desviación Estándar Relativa (RSD %). Se utilizaron muestras de SAH enriquecidas a tres niveles de concentración:  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $15 \mu\text{g L}^{-1}$ . El RSD% no debe exceder el 15%, excepto en el LC en el que es aceptable un RSD% de hasta 20% (EMA 2011)

### ***Veracidad – Sesgo***

La “veracidad” de la medición es una expresión de qué tan cerca está la media de un número infinito de resultados (producido por el método) a un valor de referencia. Como no es posible hacer un número infinito de mediciones, la veracidad no se puede medir. Sin embargo, podemos hacer una evaluación práctica de la veracidad. Esta evaluación es normalmente expresada cuantitativamente en términos de “sesgo”. Una determinación práctica del sesgo se basa en comparación de la media de los resultados ( $\bar{x}$ ) del método con un valor de referencia adecuado (ref  $x$ ). El sesgo del método se evaluó mediante el análisis de material biológico con valor asignado, provisto por G-EQUAS y un ensayo de adición/recuperación. Las recuperaciones se calcularon a partir de los datos obtenidos durante la evaluación de la precisión. Las muestras de SAH enriquecidas se cuantificaron con curva de calibración y las concentraciones obtenidas se compararon con el valor nominal. Los valores de recuperación aceptables se encuentran dentro del rango 80 - 120%.

### ***Límite de detección***

Límite de detección (LD) es la concentración más baja que se puede medir (detectar) con significancia estadística por medio de un procedimiento analítico dado. Es un valor de cantidad medido, obtenido mediante un procedimiento de medición dado, para el cual la probabilidad de afirmar falsamente la ausencia de un componente en un material es  $\beta$ , dada una probabilidad  $\alpha$  de afirmar falsamente su presencia (Pawliszyn,2012). Como no se dispone de muestras blanco se utilizaron blancos de

reactivos, que se sometieron al procedimiento completo de preparación de la muestra. La determinación del LD se realizó a partir de la medición de 10 réplicas de blancos de reactivo. El LD se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$LD = \bar{x} + 3s$$

donde,  $\bar{x}$  es la media de las respuestas y  $s$  es la desviación estándar.

### ***Límite de cuantificación***

El límite de cuantificación (LC) es la menor concentración de un analito que puede determinarse con una precisión y una exactitud aceptables bajo las condiciones experimentales establecidas (Farmacopea, 2003). Se utilizaron los datos obtenidos para determinar el LD; el LC se calculó según la siguiente ecuación:

$$LC = \bar{x} + 10s$$

donde,  $\bar{x}$  es la media de las respuestas y  $s$  es la desviación estándar.

### ***Estimación de la incertidumbre de la medición***

Para el cálculo de la incertidumbre expandida (U) se contempló la incertidumbre de reproducibilidad dentro del laboratorio ( $\% \mu_{Rw}$ ) y la incertidumbre estándar del sesgo ( $\% \mu_b$ ) según la Guía para la evaluación de la incertidumbre analítica (COFILAB, 2012). Para  $\% \mu_{Rw}$  se empleó la carta de control del Material de referencia acuoso IV-STOCK-1643 Inorganic Ventures y los valores de las albúminas medidas como muestras de rutina. Y para  $\% \mu_b$  se utilizaron los resultados de adición de estándar del punto de  $5 \mu\text{g L}^{-1}\text{Al}$ .

### ***Análisis estadístico***

Se empleó para el análisis estadístico de los datos el software InfoStat versión 2020.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El desarrollo de un método para la determinación de Al ha demostrado, debido a las características de este elemento, como su ubicuidad y su abundancia en la naturaleza, ser un desafío a la hora de conseguir condiciones de trabajo óptimas que aseguren evitar la contaminación durante el tratamiento de la muestra. El Al como se mencionó anteriormente es tóxico, determinarlo en SAH es un requerimiento de la Farmacopea Argentina para asegurar la inocuidad del empleo de este medicamento.

### **1- DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO**

#### ***Tratamiento de la muestra***

Como se mencionó en la Introducción la determinación de metales en algunos fluidos biológicos por ICP-MS puede realizarse por dilución directa aunque, matrices complejas como la SAH provocan fluctuación en las señales de respuesta durante la jornada de análisis debido a que la alta concentración de proteínas genera depósitos de residuos de carbono en los conos de muestreo y skimmer. Con el fin de minimizar este efecto se evalúa una alternativa simple de digestión previa en medio oxidante. Este pretratamiento debe realizarse en condiciones controladas para lograr blancos de tratamiento adecuados, debido a la naturaleza ubicua del Al.



Varios factores afectan la eficiencia de la digestión de la muestra: cantidad de muestra, tipo y cantidad de reactivo oxidante, temperatura y tiempo de tratamiento. Estos factores fueron evaluados con el objetivo de obtener una óptima digestión de las muestras de SAH:

1- Cantidad de muestra: Se evaluaron 3 volúmenes de SAH: 0,5, 1,0 y 2,0 mL. La muestra contiene proteínas que en contacto con el agente oxidante se desnaturalizan y precipitan. Se observó la reacción y se optó por emplear la menor cantidad de muestra ya que evidenciaba una digestión completa (Figura 1).

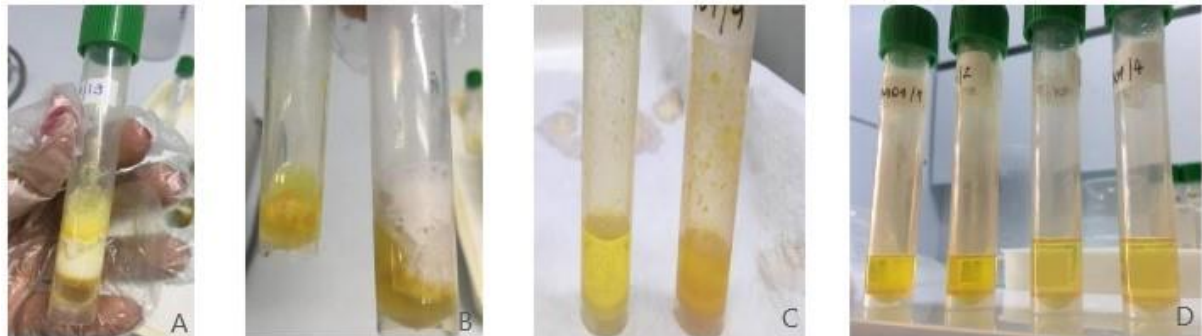


Figura 1. A) y B) Combinación SAH y oxidantes, se observa la desnaturalización de las proteínas; C) Digestión incompleta, se observan restos sin reaccionar; D) Digestión completa, digestato límpido.

2- Reactivos oxidantes solos y combinados en distintas proporciones:  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{HCl}$ . La cantidad de ácido que se puede emplear está limitada debido a que no se puede superar el 10 % del volumen final. Concentraciones mayores que el 10 % pueden dañar el equipo de medición. Durante la prueba se evaluó la generación de calor a temperatura ambiente debido a que la reacción es exotérmica. Por observación directa se evaluó la formación de gas y como indicativo de la magnitud de la digestión, el aclaramiento de la muestra. Se observó que la combinación  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$  produce un mejor resultado. Con esta mezcla oxidante se debe tener en cuenta el orden de adición de los reactivos, en primer lugar se debe añadir el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y luego el  $\text{HNO}_3$ . Así se consigue una mayor eficacia de la mezcla oxidante (Tabla 1).

Tabla 1. Cantidad de muestra y de agentes oxidantes evaluados para la digestión de SAH.

Muestra (mL)	$\text{HNO}_3$ (mL)	$\text{HCl}$ (mL)	$\text{H}_2\text{O}_2$ (mL)	
0,5	1	-	-	X
0,5	-	1	-	X
<b>0,5</b>	<b>1</b>	-	<b>0,5</b>	<b>V</b>
0,5	2	1	-	X
1	1	-	-	X
1	-	1	-	X
1	1	-	0,5	X
2	1	-	-	X
2	-	1	-	X
2	1	-	0,5	X

Nota: las x indican tratamientos que no tuvieron buenos resultados.

3- Se evaluó el empleo del sonicador de ultrasonido para favorecer la descomposición de la estructura de las proteínas de la muestra. Se determinó que 15 min de sonicado inmediatamente después del agregado de los oxidantes contribuye al proceso de digestión de la SAH.

4- Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la eficacia de la digestión se colocaron los tubos con las muestras en un beaker a baño maría. Se observó que a temperaturas en el rango 80-90 °C se producía una reacción con generación de gases constante y controlada. El uso de estas temperaturas

relativamente bajas permitiría el análisis de elementos con punto de ebullición bajos como el Hg.

5- Se evaluó el tiempo mínimo necesario para una digestión completa, el criterio fue el cese de la generación de gases y el total aclaramiento del digestato, esto se obtuvo a los 120 min del calentamiento en plancha.

A partir de las pruebas realizadas que permitieron obtener las condiciones óptimas para digerir las muestras de SAH en nuestro laboratorio el procedimiento quedó definido de la siguiente manera: (1) en tubos de PP previamente pesados colocar 0,5 mL de la muestra; (2) pesar y registrar la masa del tubo + la muestra; (3) sonicar durante 15 min; (4) colocar los tubos en un beaker a baño maria en plancha de calentamiento a 80-90 °C durante 120 min (durante esta etapa los tubos deben permanecer tapados pero no de forma hermética para facilitar la salida de vapores); (5) dejar enfriar a temperatura ambiente; (6) llevar a volumen final (VF) de 10 mL con Agua milli-Q; (6) pesar y registrar la masa y (7) pesar 1 mL de la solución final para calcular la densidad y (7) calcular la dilución real de la muestra a partir de todos los datos de masas (Figura 2). El empleo de la digestión ácida como pretratamiento de muestras complejas es muy utilizado, otros estudios establecieron condiciones similares para muestras que contienen altas concentraciones de proteínas (Nawi., 2020; Taravati Javad, M., 2018).

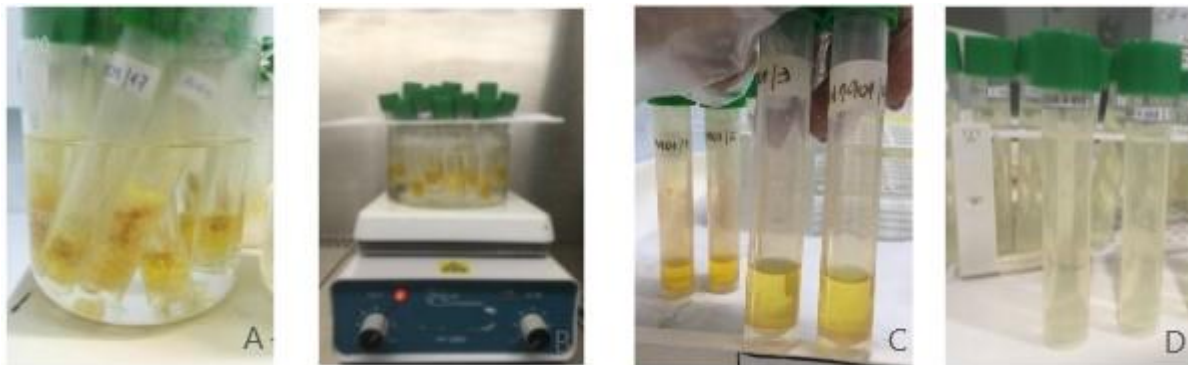


Figura 2. Procedimiento optimizado de tratamiento de la muestra. A) Los tubos se colocan en baño maria para el sonicado; B) Digestión en plancha de calentamiento; C) Resultado de la digestión completa D) El digestato se lleva a volumen final de 10 mL.

Una vez optimizadas las condiciones de la digestión de la muestra se evaluó (a) el uso/no uso de gas He de colisión, (b) el método de calibración, (c) blanco de reactivos y blancos de tratamiento y (d) adición de patrón a muestras pre y post digestión.

a.

Se realizaron curvas de calibración con muestras enriquecidas con soluciones de patrón de Al en las dos condiciones: con y sin uso del modo gas, con empleo de helio como gas de colisión, las señales fueron corregidas con Sc como patrón interno. Aunque los resultados obtenidos fueron aceptables en las dos condiciones se observó mayor precisión en los resultados de réplicas con el uso de gas helio. Por otro lado, como se observa en la Figura 3 B, la curva obtenida con el uso de helio es similar a la obtenida a partir de soluciones de Al en solución acuosa de HNO<sub>3</sub> al 2 %. Se optó por el empleo de gas de colisión ya que permite minimizar las interferencias por especies poliatómicas presentes en la muestra. Esta estrategia ha sido empleada por otros autores. Tanvir y col. emplearon helio como gas de colisión en la determinación de múltiples elementos traza en pequeños volúmenes de sangre total y plasma (Tanvir, 2020).

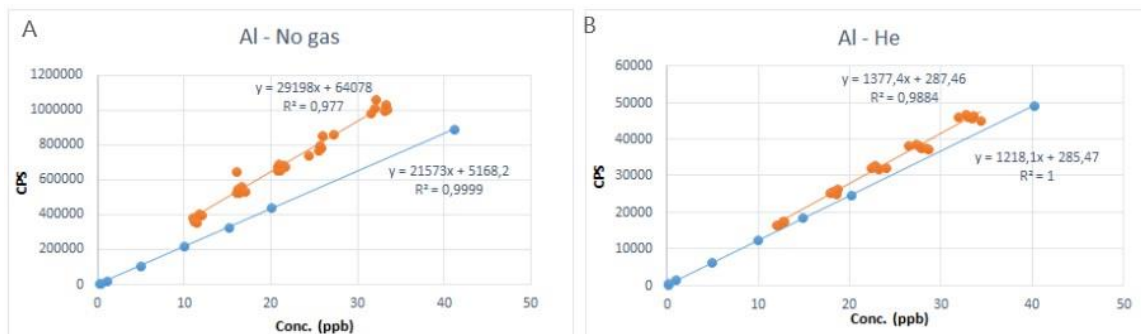


Figura 3. Curvas de calibración en HNO<sub>3</sub> al 2 % y en muestras enriquecidas de SAH. (A) Curvas obtenidas sin uso de gas de colisión, (B) curvas obtenidas con empleo de gas de colisión.

b.

Con el objetivo de seleccionar la mejor estrategia de calibración se evaluaron dos métodos: calibración con estándar externo (CEE) y adición de estándar (CAE).

Las muestras de SAH es una matriz líquida compleja en su composición. Además de proteínas y lípidos las SAH contienen elementos mayoritarios tales como Cl, Na, Ca, K, Mg, S y minoritarios como Cu, Zn y Mn.

En química analítica, la calibración implica la determinación de una función matemática que describe la relación entre la concentración del analito y respuesta del instrumento. Una serie de patrones de calibración se utiliza para determinar esta función, que luego se aplica para determinar la cantidad desconocida de analito en una muestra. Por lo general, la calibración se realiza en tres pasos: preparación de la solución estándar, medición de la señal analítica y cálculo matemático. La CEE asume que los efectos de matriz están ausentes o tienen un impacto insignificante en la señal analítica. En el método de adición de estándares, las soluciones de calibración se preparan agregando cantidades crecientes de concentraciones del analito a la muestra, y la propia solución de muestra se usa como solvente para minimizar los efectos de la matriz. La concentración de analito añadida a las soluciones de muestra (o el volumen de la solución estándar añadida a la muestra) se representa como variable independiente en el eje x, con la respuesta del instrumento como variable dependiente en el eje y (Carter y col. 2018).

La evaluación del efecto matriz se realizó a partir de la comparación de las pendientes de curvas de patrones en HNO<sub>3</sub> 2% y de adición de estándar. No se obtuvieron diferencias significativas entre pendientes de calibrado para las alternativas, lo cual indica que el efecto matriz es mínimo y es válido realizar la cuantificación con la curva de patrones en HNO<sub>3</sub> 2% (Figura 4). Cabe aclarar que todas las respuestas fueron corregidas por el estándar interno (Sc) para minimizar los efectos de las fluctuaciones debido a la nebulización, la intensidad de la fuente de radiación, la posición de la muestra u otros parámetros instrumentales que influyen en la precisión (Carter y col. 2018).

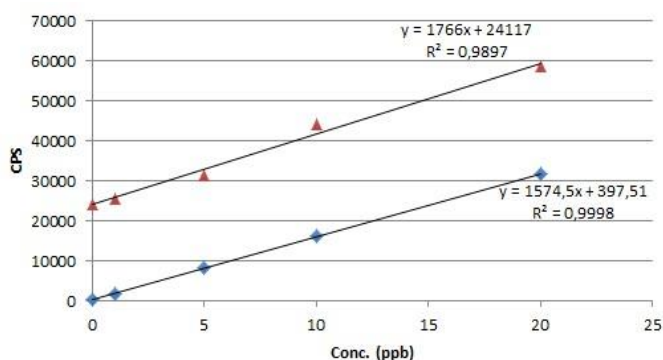


Figura 4. Evaluación del efecto matriz. Curva de calibración en HNO<sub>3</sub> al 2 % y en muestra enriquecida de SAH.

c.

Debido al carácter ubicuo del Al, se realizaron blancos de reactivos y blancos de tratamiento, para evaluar el aporte de Al de cada uno individualmente y en combinación. El desafío fue minimizar la contribución de los materiales, de los reactivos y del ambiente durante el procedimiento para conseguir el menor valor de blanco posible. Además de la calidad de los reactivos, la rigurosidad del lavado del material y la limpieza del área de trabajo (para evitar el aporte por partículas) fueron importantes la experiencia/cuidados del analista y el uso de cabinas de flujo laminar con aire filtrado. Los blancos de tratamiento se midieron diariamente y el promedio de las réplicas (n=3) se restó de la respuesta de las muestras.

El blanco debe tener en cuenta las señales provenientes de los reactivos y solventes utilizados en el ensayo, así como también cualquier sesgo que resulte de las interacciones entre el analito y la matriz de la muestra. El blanco de reactivo compensa las señales de los reactivos y solventes, pero no puede corregir un sesgo resultante de una interacción entre el analito y la matriz de la muestra. El blanco adecuado debe incluir tanto la matriz de la muestra como el analito, por lo que debe determinarse utilizando la propia muestra. El blanco muestral real se puede estimar a partir de la gráfica muestral de Youden, que se define como la "curva de respuesta muestral". Así, aplicando el método analítico seleccionado a diferentes porciones de prueba, a saber,  $m$  (una masa diferente tomada de la muestra de prueba), se obtienen diferentes respuestas analíticas  $Y$ . La gráfica de  $Y$  versus  $m$  es la gráfica de muestra de Youden, y la intersección de la línea de regresión correspondiente es el llamado blanco total de Youden, que es el verdadero blanco de muestra (Gonzalez A.G. 2017).

Con el objetivo de evaluar el blanco de Youden se prepararon diluciones de una muestra de SAH post digestión que contenía  $19,8 \mu\text{g L}^{-1}$  Al. El punto de dilución mayor (1/100) arrojó un valor de  $0,18 \mu\text{g L}^{-1}$  Al. A partir de los datos obtenidos, se graficó la respuesta en cps vs la inversa de la dilución. Se observó un comportamiento lineal de la respuesta, lo que nos indica que a estas diluciones tendremos una respuesta fiable del Al (Figura 5).

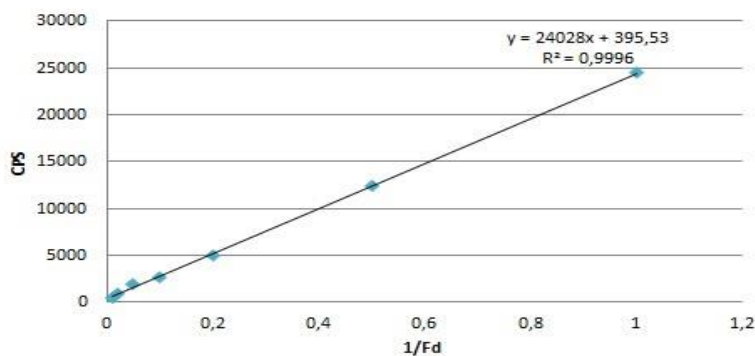


Figura 5. Gráfico de muestra de Youden para SAH.

d. Durante el proceso de optimización del método analítico se hizo una evaluación preliminar del sesgo. Para ello se fortificaron muestras de SAH previo a la digestión a dos niveles:  $10$  y  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  Al. El porcentaje de recuperación obtenido fue de  $80,6$  y  $83,2$ , respectivamente. La adición post digestión se realizó a los niveles de  $5$  y  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  Al. El porcentaje de recuperación obtenido fue de  $90,0$  y  $93,8$ , respectivamente.

### **Análisis instrumental**

Se optimizaron los parámetros instrumentales que aseguran la detección y la cuantificación de aluminio en SAH. Las condiciones de ajuste se establecen diariamente al inicio de la jornada de trabajo para asegurar el buen rendimiento durante el análisis y correcto desempeño instrumental con

menor porcentaje de óxidos y especies con doble carga (Tabla 2).

Tabla 2. Condiciones de ajuste instrumental.

PARÁMETERS	VALUE
Plasma conditions	Forward power 1550 W
Sample Depth	7.0 mm
Plasma gas	15.0 L/min
Auxiliary gas	0.9 L/min
Nebulizer gas	1.10 L/min
Nebulizer pump	0.10 rps
He gas	4.0 ml/min
QP bias	-15.1V
Oct bias	-18V
Cell extrance	-30V
Cell exit	-60V
Deflect	0.9V
Plate bias	-60V
Nebulizer type	microMist

## 2- VALIDACION

### *Especificidad*

El empleo de He como gas de colisión permitió minimizar las interferencias por especies poliatómicas presentes en la muestra y lograr señales en los blancos menores al 20 % de la respuesta para el patrón de calibración más bajo.

### *Rango de trabajo y Linealidad*

El rango de trabajo instrumental se estableció entre 1 - 40  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Figura 6). La técnica se caracteriza por permitir trabajar en un rango dinámico de varios órdenes de magnitud si el detector está bien calibrado para sus dos modos de operación (conteo de pulso y analógico). Sin embargo como se busca asegurar un valor bajo de concentración de Al, se decide trabajar en una zona de concentraciones reducidas y acotadas.

No se observaron desviaciones de la linealidad en la representación gráfica de los datos de la calibración (Figura 6). La función de calibración lineal obtenida fue:  $y = 1218,2 + 283,96x$ . Comparando el valor calculado de  $PG = 0,95$  con el valor tabulado de la distribución de Fisher-Snedecor,  $F(9,9; 0,99) = 5.35$  (9 grados de libertad, nivel de confianza 0,99), resulta que  $PG < F$  y por lo tanto la función de calibración no lineal no mejoró significativamente el ajuste. Por lo cual, la función de calibración fue lineal en el intervalo (1 – 40)  $\mu\text{g L}^{-1}$

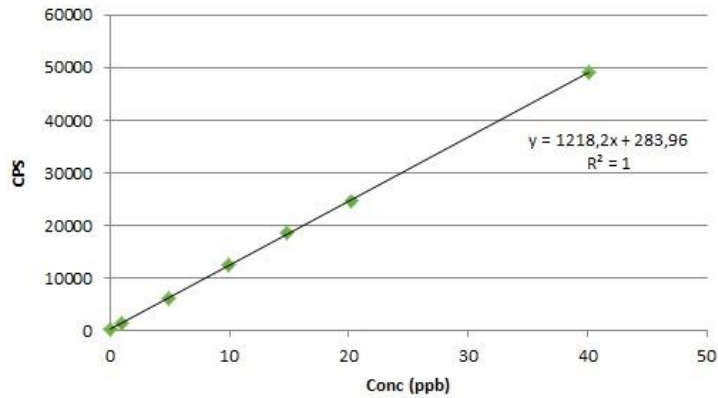


Figura 6. Rango de trabajo instrumental.

La Figura 7 muestra el intervalo de trabajo del método. La curva obtenida se obtuvo graficando la concentración medida en función de las concentraciones conocidas de la muestra de ensayo. La concentración medida es el resultado obtenido aplicando el procedimiento de medición (incluido el método de calibración).

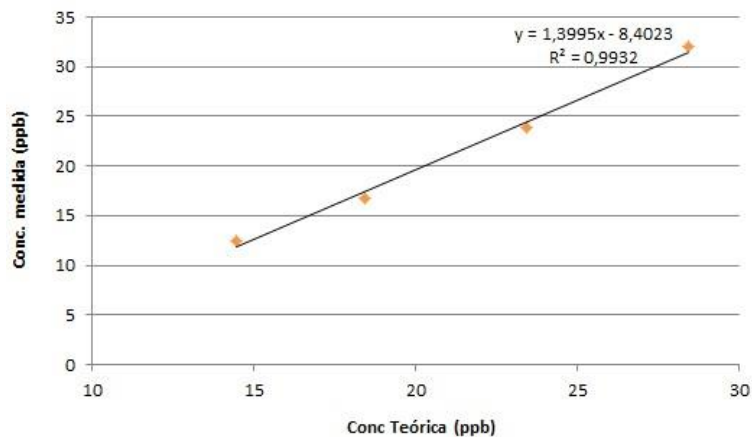


Figura 7. Rango de trabajo del método.

### **Veracidad/Sesgo**

Para calcular la recuperación se fortificaron muestras de SAH a cuatro niveles de concentración: 5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  Al. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron 84, 89, 90 y 95 respectivamente. Estos resultados están dentro de lo especificado como aceptable para el método, y concuerdan con recuperaciones realizadas en plasma para un análisis multielemental con un tratamiento de digestión similar y empleo de ICP-MS (Nawi, 2020) si bien no se trata de la misma matriz, la SAH al estar diluida, se asemeja al plasma haciendo posible esta comparación. Otro estudio realizado en leche materna, matriz que debe tratarse de manera similar al SAH debido a su alto contenido proteico y complejidad, se obtuvo resultados similares de recuperaciones mayores al 90 % (Taravati, 2018).

El análisis del material biológico con valor asignado arrojó resultados dentro de lo especificado. Para el material de control identificado como G-EQUAS 42 - 11A con rango asignado 122,3 - 171,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  Al, se halló el valor de 141,6  $\mu\text{g L}^{-1}$  Al. Para el material de control identificado G-EQUAS 42 - 11B con rango asignado 51,1 - 76,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  Al, se halló el valor de 66,2  $\mu\text{g L}^{-1}$  Al.

## Precisión

La precisión intra e interdiaria se evaluó a 4 niveles y se obtuvieron RSD % menores que el 15 % en todo los casos. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de precisión intradiaria (RSDr) y precisión interdiaria (RSDint)

	Concentración ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSDr (%)	RSDint (%)
SAH/A	11,3	1	6
SAH/A +Std 2	15,7	5	6
SAH/A +Std 3	19,6	7	8
SAH/A +Std 4	23,5	4	9

Los resultados de precisión obtenidos son similares a los informados por Luna y col. (2019) para un método de análisis multielemento de suero bovino por ICPMS.

## Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Se obtuvieron los siguientes valores para el LD y el LC expresados en  $\mu\text{g}$  de Al por litro de SAH:

$$\text{LD} = 10 \mu\text{g L}^{-1} \text{ y } \text{LC} = 30 \mu\text{g L}^{-1}$$

Estos valores son adecuados para el control de la concentración de Al en muestras de SAH que no debe superar los  $200 \mu\text{g L}^{-1}$

## Incertidumbre

A partir de la estimación de la incertidumbre de reproducibilidad dentro del laboratorio (%  $\mu\text{Rw}$ ) y de la incertidumbre estándar del sesgo (%  $\mu\text{b}$ ) se obtuvo como resultado una incertidumbre expandida de %U=13.149

## CONCLUSIÓN

Se desarrolló un método para la determinación de aluminio en albúmina sérica humana, extensivo a otros elementos. El pretratamiento evaluado permitió obtener niveles de blancos adecuados para Al, inferiores a los  $2\text{-}3 \mu\text{g L}^{-1}$ , límite de detección instrumental y metodológico, valores de precisión y recuperación acordes al propósito del análisis. El valor de LDM obtenido, del orden de los  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  es semejante al que puede alcanzarse por el método ETAAS pero el uso de ICP-MS y patrones multielementales en condiciones específicas de trabajo permite de manera confiable la cuantificación de otros elementos traza tales como Cu, Zn, Se, etc., presentes naturalmente en el tipo de matriz y evaluar la inocuidad del producto.

Si consideramos que los individuos no solo estarán expuestos al Al durante un tratamiento con SAH sino también a través del empleo de otros medicamentos que lo contienen, coadyuvantes de

vacunas, alimentos, agua, etc. Podría considerarse la necesidad de realizar un monitoreo de Al en plasma, sobre todo en la población pediátrica, teniendo en cuenta que son individuos en etapas de desarrollo y las evidencias sobre la toxicidad del Al asociado a compromisos del sistema óseo y cognitivo. Sería de gran importancia poder medirlo en estos pacientes para evaluar el riesgo, poder minimizar y en lo posible evitar los efectos a largo plazo.

## BIBLIOGRAFÍA

Abd El-Rahman, S. S. (2003) 'Neuropathology of aluminum toxicity in rats (glutamate and GABA impairment) ', *Pharmacological Research*, 47(3), pp. 189–194. doi: 10.1016/S1043-6618(02)00336-5.

ANMAT. Disposición 1682-12 'Requisitos de sistemas de aseguramiento de la calidad y buenas prácticas de fabricación aplicables a Bancos de Sangre proveedores de plasma como material de partida para la producción y fraccionamiento de hemoderivados'. [http://www.anmat.gov.ar/boletin\\_anmat/marzo\\_2012/Dispo\\_1682-12.pdf](http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/marzo_2012/Dispo_1682-12.pdf)

Aschner, M. Anand, S. Bloom, J. et. al (2008) *Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons*, Toxicology. doi: 10.1036/0071470514.

Bondy, S. C. (2016). Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration. In *NeuroToxicology* (Vol. 52, pp. 222–229). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2015.12.002>

Carter JA, Barros AI, Nóbrega JA and Donati GL (2018) Traditional Calibration Methods in Atomic Spectrometry and New Calibration Strategies for Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Front. Chem.* 6:504. doi: 10.3389/fchem.2018.00504

Chawla, R. K. Gudhanti, S. N. K. R. Kulandaivelu, U. Panda S. P. and Alavala R. R. (2021). 'Development and Validation of an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Method for Estimation of Elemental Impurities in Calcium Acetate Active Pharmaceutical Ingredient' *Indian J Pharm Sci* 2021;83(4):830-837. DOI: 10.36468/pharmaceutical-sciences.834

Código Alimentario Argentino - Artículo 982 - Resolución Conjunta SCS y SAByDR N° 22/2021 CAPITULO XII ([argentina.gob.ar](http://argentina.gob.ar))

Código Alimentario Argentino Resolución Conjunta 176/2011 y 589/2011 <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-176-2011-187257/texto>

Curtis D. Klaassen - Casarett & Doulls (2019) *Toxicology The Basic Science of Poisons 9\_E* (Casarett & Doull's Toxicology)

COFILAB, 2012 'Guía para la evaluación de la incertidumbre analítica', Comité de Ensayos de Aptitud de la Fundación Química Argentina, Edición: 3.

Cohn, E. J. (1942). Preparation and Properties of Serum and Plasma Proteins. IV. A System for the Separation into Fractions of the Protein and Lipoprotein Components of Biological Tissues and Fluids. *DEPARTMENT OF PHYSICAL CHEMISTRY, HARVARD MEDICAL SCHOOL*, 64(3), 561–564. <https://doi.org/10.1021/ja01255a028>

Crisponi, G. et al. (2013) 'The meaning of aluminium exposure on human health and aluminium-



related diseases', 4(1), pp. 77–87. doi: 10.1515/bmc-2012-0045.

Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>

Elemental Impurities—Limits, Pharm. Forum, 2016, 42(2), Revision to Chapter <232>

Elemental Impurities—Procedures, Pharm. Forum, 40(2), 2014, Revision to Chapter <233>

Eurachem B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).

European Medicines Agency. (2011). 2\*\* Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) Guideline on bioanalytical method validation. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf)

Exley, C. (2013) 'Environmental Science', 15(10). doi: 10.1039/c3em00374d.

Exley, C. (2014) 'What is the risk of aluminium as a neurotoxin?', 14(6), pp. 589–591. doi: 10.1586/14737175.2014.915745.

Farmacopea Argentina. (2003). Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ministerio de Salud de Nación. Vol I [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip\\_pages/Farmacopea\\_Vol\\_I/files/assets/basic.html/page441.html](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_I/files/assets/basic.html/page441.html)

Fawell, M. J. K. (1998) 'Aluminium in drinking-water, Background document for development of WHO', Journal of Guidelines for Drinking-Water Quality (GDWQ), pp. 8–23.

Food and Agriculture Organization World Health of the United Nations Organization JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES Sixty-seventh meeting. (2006). [http://www.fao.org/ag/agn/jecfa/index\\_en.stm](http://www.fao.org/ag/agn/jecfa/index_en.stm)

Fulgenzi, A., Vietti, D. and Ferrero, M. E. (2014) 'Aluminium Involvement in Neurotoxicity', BioMed Research International, 2014. doi: 10.1155/2014/758323.

González, A. G. , 2017, 'Practical Considerations on Indirect Calibration in Analytical Chemistry', in J. P. Hessling (ed.), Uncertainty Quantification and Model Calibration, IntechOpen, London. 10.5772/intechopen.68806.

Hardisson, A, (2017). Aluminium Exposure Through the Diet Metal content in wild-harvested seaweed from the Macaronesia-Canary Islands View project Consuelo Revert Universidad de La Laguna. <https://doi.org/10.24966/FSN-0176/100019>

Hasan, Z., Rolle-McFarland, D., Liu, Y., Zhou, J., Mostafaei, F., Li, Y., Fan, Q., Zhou, Y., Zheng, W., Nie, L. H., & Wells, E. M. (2020). Characterization of bone aluminum, a potential biomarker of cumulative exposure, within an occupational population from Zunyi, China. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 59. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126469>

ICH Guideline Q3D on Elemental Impurities, EMA/CHMP/ ICH/353369/2013, July 2016.

Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2007) WHO Food Additive Series: 58. Safety

evaluation of certain food additives and contaminants, *International Journal of Food Microbiology*. doi: 10.1016/S0168-1605(00)00409-8.

Klein, G. L. (2019) 'Osteoporosis and Sarcopenia Aluminum toxicity to bone : A multisystem effect ?', *Osteoporosis and Sarcopenia*. Elsevier Ltd, (xxxx), pp. 1–4. doi: 10.1016/j.afos.2019.01.001.

MERCOSUR/GMC/RES. n° 35/10 Reglamento Técnico Mercosur sobre límites máximos para aditivos excluidos de la lista de "aditivos alimentarios autorizados para ser utilizados según las Buenas Prácticas de Fabricación." [http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r\\_gmc\\_35-10.pdf](http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_35-10.pdf)

Ministerio de Salud de la Nación et al. (2010) *Farmacopea Argentina 7° Ed, Vol III-ANMAT*, p. 534. Available at: [http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip\\_pages/Farmacopea\\_Vol\\_III/files/assets/basic-html/page534.html](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/fna/flip_pages/Farmacopea_Vol_III/files/assets/basic-html/page534.html).

Mirza, A., King, A., Troakes, C., & Exley, C. (2017). Aluminium in brain tissue in familial Alzheimer's disease. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 40, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2016.12.001>

Nawi, A. M., Chin, S., & Jamal, R. (2020). Simultaneous analysis of 25 trace elements in micro volume of human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Practical Laboratory Medicine*, 18(August 2019), e00142. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2019.e00142>

Pawliszyn, Janusz., Bayona, J. M., Lord, H. L., Le, X. Chris., & Mondello, Luigi. (2012). *Comprehensive sampling and sample preparation : analytical techniques for scientists*. Elsevier.

Vasudevaraju, B. P. et al. (2008) 'Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration', *Indian Journal of Medical Research*, 128(4), pp. 545–556.

Tanvir, E., Whitfield, K. M., Ng, J. C., & Nicholas Shaw, P. (2020). Development and Validation of an ICP-MS Method and its Application to Determine Multiple Trace Elements in Small Volumes of Whole Blood and Plasma. <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa033/5813765>

Taravati Javad, M., Vahidinia, A., Samiee, F., Elaridi, J., Leili, M., Faradmal, J., & Rahmani, A. (2018). Analysis of aluminum, minerals and trace elements in the milk samples from lactating mothers in Hamadan, Iran. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 50, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.05.016>

UNC-Hemoderivados - <http://unc-hemoderivados.com.ar/prodHemoderivados.php>

Wu, Z. et al. (2012) 'Aluminum induces neurodegeneration and its toxicity arises from increased iron accumulation and reactive oxygen species (ROS) production', *Neurobiology of Aging*, 33(1), pp. 199.e1-199.e12. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2010.06.018.

Zandieh, T. and Banazadeh, S. (2005) 'Evaluation of Aluminum Concentration in Albumin Products Prepared by Blood Fractionation', 4(1), pp. 40–42.