



Evaluación de calidad e inocuidad de cortes de carne vacuna de consumo masivo en Uruguay mediante el estudio de los niveles de elementos esenciales y potencialmente tóxicos

Tesis Doctoral de la MSc. Fiorella Iaquina

Facultad de Química-Universidad de la República

Directores de tesis: Dr. Ignacio Machado y Dra. Mariela Pistón

Directora académica: Dra. Mariela Pistón

CARRERA DE POSGRADO	Doctorado en Química		
ESTUDIANTE	NOMBRE: FIORELLA IAQUINTA MENDEZ	C.I. 4682944-8	
DEFENSA:	LUGAR Facultad de Química	FECHA 19/03/21	HORA 15:00
TÍTULO DE TESIS:	Evaluación de calidad e inocuidad de cortes de carne vacuna de consumo masivo en Uruguay mediante el estudio de los niveles de elementos esenciales y potencialmente tóxicos		
DICTAMEN ¹	JUICIO EXCELENTE	NOTA 12	

FUNDAMENTACIÓN:

Que se trata de un trabajo escrito bien presentado, que contiene publicaciones en revistas arbitradas e indexadas. La presentación oral fue excelente, con muy buena organización y claridad. La defensa mostró la solidez de la doctoranda, un conocimiento profundo de tema, respondiendo las preguntas del tribunal en forma adecuada.

DIRECTORES DE TESIS
 (nombres y firmas)



Mariela Pistón



Ignacio Machado

TRIBUNAL
 (nombres y firmas)



Cecilia Cajarville



Marcia. F. Mesko



Alexandra Sixto

¹ La Tesis podrá resultar a) Aprobada con dictamen fundado: satisfactoria (6), muy satisfactoria (9) o excelente (12)
 b) Rechazada con dictamen fundado.



PEDECIBA
MEC-UDELAR

PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS
Ministerio de Educación y Cultura - Universidad de la República

Área Química

ACTA. En Montevideo a los diecinueve días del mes de marzo de 2021, se reúne en Facultad de Química el Tribunal que entendió en la defensa de tesis de Doctorado en Química que postula la MSc. Fiorella Iaquina Méndez, cuyo título es “Evaluación de calidad e inocuidad de cortes de carne vacuna de consumo masivo en Uruguay mediante el estudio de los niveles de elementos esenciales y potencialmente tóxicos”.

Asisten todos sus integrantes: Dras. Cecilia Cajarville, Marcia F. Mesko y Alexandra Sixto, y Mariela Pistón e Ignacio Machado (Directores de tesis).

El Tribunal habiendo analizado la tesis en profundidad considera:

Que se trata de un trabajo escrito bien presentado, que contiene publicaciones en revistas arbitradas e indexadas. La presentación oral fue excelente, con muy buena organización y claridad. La defensa mostró la solidez de la doctoranda, un conocimiento profundo de tema, respondiendo las preguntas del tribunal en forma adecuada.

Por lo anterior, el tribunal le otorga la calificación de

Excelente

Dra. Cecilia Cajarville

Dra. Marcia F. Mesko

Dra. Alexandra Sixto

Dra. Mariela Pistón

Dr. Ignacio Machado

ÁREA QUÍMICA

Facultad de Química. Av. General Flores 2124, Montevideo 11800, URUGUAY

Teléfonos: (+598) 29242338. Fax: (+598) 29241906.

Página web: www.pedeciba.edu.uy/quimica

Correo electrónico: lsegredo@fq.edu.uy – gabig@fq.edu.uy

Agradecimientos

A mis orientadores la Dra. Mariela Pistón y Dr. Ignacio Machado, por darme la oportunidad para orientarme, enseñarme y por confiar en mí. Por cultivar mi confianza y desarrollo en la investigación y la vida académica.

A Mariela, por haberme dado la oportunidad de comenzar en la academia, insistiendo más de una vez para que me presentara a los llamados, sin esa oportunidad, ésta tesis sin dudas no existiría.

A Nacho por ser, además de orientador, una almohada, un confidente, un amigo. Por escuchar mis ideas por más locas que sean y valorarlas.

Al tribunal Dras. Cecilia Cajarville, Alexandra Sixto y Marcia Mesko, por aceptar evaluar el trabajo de forma grata, y por estimular mi desarrollo profesional al hacerlo.

A mis compañeros de trabajo, por apoyarme y aguantarme. Especialmente gracias a la Ing. Analía Suárez, porque sin su trabajo esta tesis estaría incompleta.

Al Grupo de Análise Instrumental Aplicada, de la Universidad Federal de San Carlos, en particular al Prof. Dr. Joaquim A. Nóbrega y la Dra. Lucimar Lopes Fialho, por recibirme en su lugar de trabajo dedicando su tiempo a compartir sus conocimientos conmigo.

A la Comisión Académica de Posgrado de la Udelar, por la beca otorgada para fomentar el desarrollo de ésta tesis.

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas por su colaboración en la realización de las actividades pertenecientes a la tesis.

A la Dra. Analía Rodríguez, por los comentarios y aportes para la mejora del trabajo.

A mis amigos, por su apoyo y fe incondicional. Por admirar lo que hago y hacerlo especial. En particular agradecer a las chicas: Lucía, Paulina y Jessica, quienes hacen que el trabajo sea más disfrutable, con quienes se puede contar.

A mi familia, por ser lo mejor que tengo, quienes apoyan todas mis decisiones, admiran mi trabajo y me impulsan a mejorarlo.

A mi hermano y cuñada, por siempre tener un oído y un café.

A mis padres, por siempre estar presentes, apoyar mis decisiones y ser sostén constante. Sin ellos no hubiera tomado la mitad de las decisiones para llegar hasta aquí.

Muchas gracias!

Índice de tablas

Tabla 1.1: Cuadro comparativo de algunas dietas con y sin carne vacuna.....	19
Tabla 1.2: Exportaciones nacionales de diversos productos alimenticios durante el año 2019 y su aporte porcentual a las exportaciones totales.....	20
Tabla 1.3: Principales cortes de consumo doméstico.....	21
Tabla 1.4: Niveles de nutrientes en carne bovina cada 100 g (base fresca).....	23
Tabla 1.5: Alimentos considerados como buena fuente de Mo, Se, Cu y Zn y su ingesta mínima requerida/día para adultos.....	24
Tabla 1.6: Niveles de los minerales de interés en esta tesis, en carne bovina uruguaya cruda.....	25
Tabla 1.7: Límites máximos permitidos de Cd y Pb en carne bovina (base fresca).....	26
Tabla 1.8: Fracción bioaccesible de minerales reportada en carne bovina en la región.....	29
Tabla 1.9: Principios de la Química Analítica Verde.....	42
Tabla 1.10: Penalización según Eco-escala.....	43
Tabla 4.1: Resumen del trabajo experimental y número de muestras analizadas.....	53
Tabla 4.2: Diseño experimental central compuesto.....	54
Tabla 4.3: Condiciones del segundo diseño experimental.....	55
Tabla 4.4: Condiciones para la determinación mediante ETAAS.....	57
Tabla 4.5: Condiciones de calibración.....	59
Tabla 4.6: Programa de digestión utilizado.....	60
Tabla 4.7: Condiciones de determinación de Cd y Mo mediante ETAAS.....	61
Tabla 4.8: Temperaturas alcanzadas en los procesos de cocción.....	63
Tabla 5.1: Recuperaciones del primer diseño experimental.....	67
Tabla 5.2: Resultados obtenidos para el segundo diseño experimental.....	68
Tabla 5.3: Comparación entre extracciones alcalinas.....	73
Tabla 5.4: Recuperaciones obtenidas de la primera extracción alcalina (n=2).....	75
Tabla 5.5: Recuperaciones promedio de la segunda extracción.....	76
Tabla 5.6: Comparación de resultados con y sin ajuste de pH.....	76

Tabla 5.7: Resultados de Cu y Zn obtenidos mediante ICP-OES.....	78
Tabla 5.8: Resultados de carne obtenidos mediante ICP-OES y extracción alcalina.....	78
Tabla 5.9: Resultados obtenidos en las muestras de carne bovina con extracción alcalina mediante ICP-OES en menos de 24 h.....	78
Tabla 5.10: Parámetros de desempeño para Zn y Cu por FAAS y Mo y Cd mediante ETAAS.	84
Tabla 5.11: Valores obtenidos de los materiales de referencia y comparación estadística.....	85
Tabla 5.12: Prueba <i>t</i> - Student para evaluar selectividad.....	86
Tabla 5.13: Parámetros de desempeño obtenidos para la determinación de Pb mediante ETAAS.....	86
Tabla 5.14: Rangos lineales evaluados mediante ICP-OES.....	89
Tabla 5.15: Límites de detección y cuantificación para ICP-OES.....	89
Tabla 5.16: Veracidad y precisión para ICP-OES.....	90
Tabla 5.17: Niveles mínimos y máximos (mg kg ⁻¹) de Cu, Zn, Mo y Cd en las muestras analizadas.....	91
Tabla 5.18: Niveles mínimo y máximos (mg kg ⁻¹) de Cu, Zn, Cd y Mo en las muestras analizadas.....	91
Tabla 5.19: Parámetros de desempeño mediante digestión ácida y determinación por ETAAS	94
Tabla 5.20: Resultados obtenidos para materiales de referencia y comparación estadística...	95
Tabla 5.21: Parámetros de desempeño en la determinación de Se mediante HG-AAS.....	96
Tabla 5.22: Isótopos evaluados para la determinación de Pb, Se, Mo y Cd.....	98
Tabla 5.23: Parámetros de desempeño obtenidos mediante el tratamiento ácido.....	99
Tabla 5.24: Valores obtenidos de los materiales de referencia y comparación estadística.....	100
Tabla 5.25: Concentración de Mo en muestras de carne bovina en base seca mediante ETAAS	101
Tabla 5.26: Niveles de Cd, Pb, Se y Mo en muestras de asado determinados por ICP-MS...	102
Tabla 5.27: Comparación estadística de resultados entre digestión asistida con microondas y extracción alcalina.....	104
Tabla 5.28: Eco-escala de la preparación de muestras con extracción alcalina.....	106

Tabla 5.29: Eco-escala de la preparación de muestras con digestión ácida.....	107
Tabla 5.30: Fracción bioaccesible y balance de masas utilizando 0,5 g de muestra.....	109
Tabla 5.31: Fracción bioaccesible y balance de masas.....	110
Tabla 5.32: Parámetros de desempeño para la determinación de Cu y Zn.....	111
Tabla 5.33: Resultados obtenidos de los ensayos de bioaccesibilidad <i>in vitro</i>	113
Tabla 5.34: Contribución de Cu y Zn en el consumo de carne bovina.....	114

Índice de figuras

Figura 1.1: Carne bovina. Extraído de: magazine.medlineplus.gov	18
Figura 1.2: Destinos de las exportaciones de carne bovina. Extraído de: INAC, 2020.....	21
Figura 1.3: Cortes bovinos. Extraído de: www.inac.uy	22
Figura 1.4: Esquema de simulación del sistema gastrointestinal para los ensayos de bioaccesibilidad. Adaptado de: INFOGEST, 2019.....	28
Figura 1.5: Esquema del proceso analítico.....	30
Figura 1.6: Espectrómetro de absorción atómica de llama típico de simple haz. Extraído de: Skoog et al., 2008.....	31
Figura 1.7: Mechero de flujo laminar. Extraído de: Skoog, 2008.....	32
Figura 1.8: Corte transversal del sistema ETAAS. Extraído de: <i>D. Harvey en https://LibreTexts.org</i>	33
Figura 1.9: Esquema de un sistema HG-AAS. Extraído de: Skoog et al., 2008.....	34
Figura 1.10: Esquema de un espectrómetro de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). Extraído de: Skoog et al., 2008.....	35
Figura 1.11: Fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo. Extraído de: Skoog et al., 2008.....	35
Figura 1.12: Equipo de espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (Agilent 4210). Extraído de: GATPREM.....	37
Figura 1.13: Esquema de un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente. Extraído de: Skoog et al, 2008.....	38
Figura 1.14: Comparación de las técnicas en función del rango dinámico de trabajo. <i>Adaptado de: Thomas, 2004</i>	38

Figura 1.15: Comparación de las técnicas en función de los límites de detección. Extraído de: Thomas, 2004.....	38
Figura 4.1: Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), Agilent Technologies 7800.....	50
Figura 4.2: Espectrómetro de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) Thermo Scientific iCAP 7000 series	50
Figura 4.3: Espectrómetro de absorción atómica con <i>módulo de horno grafito</i> (Perkin Elmer).	51
Figura 4.4: Sistema de digestión asistida con microondas Ultrawave Milestone.....	51
Figura 4.5: Muestra tratada con molino de cuchillas.....	52
Figura 4.6: Muestra procesada.....	52
Figura 4.7: Tratamiento alcalino de las muestras en baño térmico.....	54
Figura 4.8: Tratamiento alcalino asistido por calentamiento en bloque térmico.....	55
Figura 5.1: Superficie de respuesta del segundo diseño experimental (obtenida mediante software Statistica®).....	68
Figura 5.2: Muestras tratadas con TMAH.....	69
Figura 5.3: Muestras luego del tratamiento alcalino asistido con ultrasonido.....	71
Figura 5.4: Aspecto de los residuos luego de la centrifugación, con ajuste de pH (residuo blanco) y sin ajuste de pH (residuo negro).....	76
Figura 5.5: Formación de espuma durante la determinación de Se mediante HG-MIP OES... ..	86
Figura 5.6: Muestras luego de una digestión ácida.....	96
Figura 5.7: Diagrama en bloque del sistema HMI. Extraído de: Agilent Technologies, 2008....	97
Figura 5.8: Diagrama de preparación de muestras con tratamiento alcalino.....	105
Figura 5.9: Diagrama de preparación de muestras por el método clásico.....	106

Figura 5.10: Sistema de agitación utilizado para los ensayos de bioaccesibilidad.....	108
Figura 5.11: Muestra luego de la extracción de la FB.....	111
Figura 5.12: <i>Muestra luego del tratamiento de residuos</i>	111

Abreviaturas

AOAC – Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (del inglés *Association of Official Analytical Chemists*)

BM – Balance de masas

Cd – Cadmio

CRM – Material de referencia certificados (del inglés *Certified Reference Material*)

Cu – Cobre

Cr – Cromo

ETAAS – Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica (del inglés *Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*)

FAAS – Espectrometría de absorción atómica de llama (del inglés *Flame Atomic Absorption Spectrometry*)

FB – Fracción bioaccesible

HG-AAS – Espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (del inglés *Hidhydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*)

HG-MIP OES – Espectrometría de emisión óptica con inducido por microondas acoplado a la generación de hidruros (del inglés *Hidhydride Generation coupled with Microwave Induced Optical Emission Spectrometry*)

ICP-MS – Espectrometría de masas con de acoplamiento inductivo (del inglés *Inductive Coupled Mass Spectrometry*)

ICP-OES – Espectrometría de emisión óptica con de acoplamiento inductivo (del inglés *Inductive Coupled Optical Emission Spectrometry*)

IDR – Ingesta Diaria Recomendada

LC – Límite de cuantificación

LD - Límite de detección

MC – Muy cocido

MIP OES – Espectrometría de emisión óptica con inducido por microondas (del inglés *Microwave Induced Optical Emission Spectrometry*)

Mo – Molibdeno

Pb – Plomo

PC – Poco cocido

Pd – Paladio

RM – Material de referencia (del inglés *Reference Material*)

Se – Selenio

TMAH – Hidróxido de tetrametil amonio (del inglés *Tetramethylammonium hydroxide*)

Zn – Zinc

Resumen

La calidad de la carne vacuna está definida por la cantidad de nutrientes que aporta al consumirla, entre otros aspectos. En este sentido, la determinación de elementos esenciales como zinc (Zn), cobre (Cu), molibdeno (Mo) y selenio (Se), entre otros, proporciona información relevante para dar un valor agregado al alimento. Por otro lado, es necesario garantizar su inocuidad, ya que contaminantes inorgánicos como cadmio (Cd) y plomo (Pb), entre otros, pueden estar presentes y provocar daños a la salud humana. Por lo general, la determinación de metales y semimetales en matrices complejas consiste en mineralizaciones utilizando ácidos minerales concentrados en caliente o mediante calcinación. Ambos procesos son tediosos y además poco amigables con el ambiente. En esta tesis se exploró una nueva estrategia de preparación de muestras de carne vacuna, para dos cortes de gran consumo en el país, como son el asado y el cuadril, bajo la hipótesis de que el uso de hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) sería eficiente para la extracción cuantitativa de los elementos en estudio en una sola etapa. La optimización del método propuesto se realizó mediante un diseño experimental multivariado de tipo central compuesto, de dos variables a cinco niveles, utilizando un material de referencia certificado de músculo bovino. Las variables estudiadas consideradas críticas la metodología fueron: la concentración de TMAH y la temperatura de extracción. Las determinaciones de Zn y Cu se realizaron mediante espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS). Por su parte, las determinaciones de Cd, Pb y Mo se realizaron mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS).

Por otra parte, si bien el consumo de carne vacuna puede constituir una fuente importante de los elementos estudiados, es importante lograr establecer la cantidad de nutrientes que se encuentran potencialmente accesibles para ser absorbidos luego del proceso digestivo. Por este motivo, también se estudió la bioaccesibilidad de Cu y Zn en asado y cuadril, dado que dentro de los elementos seleccionados estos son los que se encuentran en mayor proporción, mediante el desarrollo de un ensayo *in vitro*, simulando los procesos que ocurren típicamente en el sistema digestivo humano: en el estómago y el intestino delgado. Estos ensayos se realizaron sobre una serie de muestras de carne cocida, en dos puntos de cocción diferentes, con el fin de estudiar su aporte a la ingesta diaria recomendada (IDR) de dichos elementos en la forma en que puede ser consumido el alimento. Se optimizaron las condiciones gastrointestinales simuladas y se evaluó la veracidad del método mediante la realización de los balances de masa correspondientes. Las determinaciones de Zn se realizaron mediante FAAS, mientras que las de Cu se realizaron mediante ETAAS.

En cuanto al desarrollo del método propuesto, éste consistió en el agregado de 0,25 g de muestra seca, 1,50 mL de TMAH 25% m/v en metanol y 5,00 mL de agua ultrapura, y posterior calentamiento en baño termostatzado a 85 °C durante 60 min. Los parámetros de desempeño obtenidos resultaron adecuados para los fines propuestos. Los límite de detección (LD)/límites de cuantificación (LC) expresados en mg kg⁻¹ (base seca) fueron: 0,016/0,052 – 0,013/0,044 – 0,015/0,048 – 0,008/0,027 – 0,06/0,2 para Zn, Cu, Mo, Cd y Pb, respectivamente. La veracidad expresada como porcentaje de recuperación R(%) se encontró entre 81 y 106%. La precisión expresada como desviación estándar relativa RSD(%) fue menor al 10% en todos los casos. Luego de la validación, se analizaron muestras de carne vacuna cruda. Las muestras de asado y cuadril fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Carnes (INAC), gracias a un proyecto de trabajo en conjunto con el sector productivo (CISC - VUSP). Con el método aquí desarrollada, se obtuvieron resultados estadísticamente equivalentes a los obtenidos mediante un método de digestión clásico asistido por microondas, para Zn, Cu y Mo. Ninguna de las muestras estudiadas presentó niveles cuantificables de Cd y Pb, por lo que se pudo garantizar la inocuidad de estas desde el punto de vista de estos contaminantes, encontrándose muy por debajo de los límites máximos establecidos por la normativa nacional.

El método desarrollado resultó adecuado para los fines propuestos y puede proponerse como una alternativa a los métodos estándar, siendo además simple y con la generación de muy baja cantidad de residuos peligrosos, alineándose de esta forma con los principios de la Química Analítica Verde. Sin embargo, no fue posible la determinación de Se utilizando este tratamiento alcalino. En este caso, se realizó una digestión ácida asistida por microondas y la posterior determinación mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

En lo que refiere a las fracciones bioaccesibles de Cu y Zn, no se encontraron diferencias significativas entre ambos cortes, ni entre los puntos de cocción evaluados. En el caso de Zn, para asado y cuadril, poco y muy cocido, la fracción bioaccesible fue del 83%. En el caso de Cu, el asado presentó una fracción del 20% , mientras que el cuadril presentó una fracción del 38%.

A modo de ejemplo, considerando una porción de 200 g de carne cocida, se aportaría el total de la IDR de Zn requerida para un adulto, mientras que se aportaría un 33% de la IDR de Cu para un adulto. Estos datos constituyen información que aporta al conocimiento de la calidad nutricional de la carne uruguaya como alimento en forma cocida.

Abstract

The quality of beef is defined by the amount of nutrients it provides when consumed among other aspects. In this sense, the determination of essential elements such as zinc (Zn), copper (Cu), molybdenum (Mo) and selenium (Se), among others, provides relevant information to give added value to this food. On the other hand, it is necessary to guarantee its safety, since inorganic contaminants such as cadmium (Cd) and lead (Pb), among others, may be present and cause damage to human health. In general, the determination of metals in complex matrices consists of mineralization using hot concentrated mineral acids or by dry ashing. Both processes are tedious and not friendly to the environment. In this thesis we explored a new strategy of sample preparation for beef samples, in two cuts of mass consumption in the country such as rib plate and top sirloin, under the hypothesis that the use of tetramethylammonium hydroxide (TMAH) would be efficient for the quantitative extraction of the studied trace elements in a single stage. Optimization of the proposed method was carried out through a multivariate experimental design central composite, (two variables and five levels), using a certified reference material of bovine muscle. The studied variables, considered critical, were: TMAH concentration and the temperature of the extraction. Zn and Cu determinations were performed by flame atomic absorption spectrometry (FAAS) while, the determinations of Cd, Pb and Mo were carried out by means of atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization (ETAAS).

Although the consumption of beef can be an important source of the elements studied, it is important to establish the amount of nutrients that are potentially accessible to be absorbed after the digestive process. For this reason, bioaccessibility of Cu and Zn was studied in rib plate and top sirloin through the development of an *in vitro* assay, simulating the processes that typically occurs in the human digestive system: in the stomach and small intestine. These tests were carried out on beef samples cooked to two degrees of doneness (medium and well done), in order to establish the contribution to the recommended daily intake (RDI) of these elements in the way in which the food can be consumed. Simulated gastrointestinal conditions were optimized and the trueness of the methodology was evaluated by performing the corresponding mass balances. Zinc determinations were carried out by FAAS, while those of Cu were made by ETAAS.

Regarding the development of the proposed method, it consisted of adding 0.25 g of sample, 1.50 mL of 25% w/v TMAH in methanol and 5.00 mL of ultrapure water, and subsequent heating in a thermostatic bath at 85°C for 60 min. The obtained figures of merit were adequate for analytical purposes. The limits of detection (LOD)/limits of quantification (LOQ) expressed in mg kg⁻¹ (dry basis) were: 0.016/0.052, 0.013/0.044, 0.015/0.048, 0.008/0.027, 0.06/0.2, for Zn, Cu, Mo, Cd

and Pb, respectively. Trueness expressed as per cent recovery R(%) was between 81 and 106%. Precision expressed as relative standard deviation RSD(%) was less than 10% in all cases. Raw beef samples were analyzed after validation. Rib plate and top sirloin samples were provided by INAC, in the framework of a research project with the productive sector (CSIC - VUSP). By the methodology developed here, obtaining statistically equivalent results to those obtained by a classic microwave-assisted digestion method, for Zn, Cu and Mo. None of the samples studied presented quantifiable levels of Cd and Pb, so it was possible to guarantee their safety from the point of view of these contaminants, being well below the maximum limits established by national regulations.

The developed method was suitable for the proposed purposes and can be postulated as an alternative to standard methods, being also simple and with the generation of a very low amount of hazardous waste, thus aligning with the principles of Green Analytical Chemistry. However, the determination of Se was not possible using this alkaline treatment. In this case, microwave-assisted acid digestion was performed and subsequent determination by inductively coupled mass spectrometry (ICP-MS).

Regarding the bioaccessible Cu and Zn fractions, no significant differences were found between both cuts, or between the cooking points evaluated. In the case of Zn, for rib plate and top sirloin, medium and well done, the bioaccessible fraction was 83%. In the case of Cu, the rib plate presented a fraction of 20%, while the top sirloin presented a fraction of 38%. However, the differences found between cuts and between the cooking points were not statistically significant.

Considering the bioaccessible fractions obtained for Cu and Zn, the contributions of these elements to the RDI of adult men and women were calculated to exemplify. Considering a 200 g portion of cooked meat, the total of the RDI of Zn would be provided for adults, that is, the intake would be completely covered, while 33% of the RDI of Cu would be provided. These data constitute a contribution of information to assess the nutritional quality of Uruguayan beef.

Tabla de contenidos

Introducción.....	17
1) Antecedentes y marco teórico.....	18
1.1 La carne como alimento y su relevancia a nivel nacional.....	18
1.1.1) Actividad ganadera en Uruguay.....	20
1.1.2) Calidad.....	22
1.1.3) Inocuidad.....	25
1.1.4) Bioaccesibilidad.....	27
1.2 Métodos analíticos de análisis.....	29
1.2.1) Preparación de las muestras.....	30
1.2.2) Espectrometría de absorción atómica.....	31
1.2.3) Espectrometría de emisión atómica óptica.....	34
1.2.4) Espectrometría de masas con a plasma acoplado inductivamente.....	37
1.2.5) Validación.....	39
1.2.6) Química Analítica Verde.....	41
2) Hipótesis y justificación.....	44
3) Objetivos.....	47
3.1 Generales.....	47
3.2 Específicos.....	47
4) Parte experimental.....	48
4.1 Materiales, reactivos e insumos.....	48
4.2 Equipos.....	49
4.3 Muestreo y operaciones preliminares.....	51
4.4 Extracción alcalina.....	53
4.4.1) Optimización del proceso de extracción alcalina utilizando baño térmico.....	53
4.4.2) Extracción alcalina asistida con ondas de ultrasonido.....	54
4.4.3) Extracción alcalina utilizando bloque térmico.....	55
4.4.4) Condiciones instrumentales y validación.....	56

4.4.5) Aplicación al análisis de muestras de carne bovina.....	58
4.5 Digestiones ácidas.....	58
4.5.1) Digestión asistida con microondas.....	59
4.5.2) Condiciones instrumentales y validación.....	59
4.6 Bioaccesibilidad.....	61
4.6.1) Cocción.....	61
4.6.2) Optimización y validación.....	62
4.6.3) Digestión ácida de los residuos.....	63
4.6.4) Condiciones instrumentales.....	63
4.6.5) Aplicación del método validado.....	64
5) Resultados y discusión.....	65
5.1 Extracción alcalina.....	65
5.1.1) Optimización de la extracción alcalina con calentamiento.....	65
5.1.2) Optimización de las condiciones instrumentales y validación.....	78
5.1.3) Aplicación en muestras de carne bovina.....	89
5.2 Digestión ácida.....	92
5.2.1) Optimización y validación.....	92
5.2.2) Aplicación en el análisis de muestras.....	100
5.3 Comparación entre métodos.....	103
5.3.1) Comparación estadística.....	103
5.3.2) Comparación desde el punto de vista de la Química Analítica Verde.....	104
5.4 Estudios de Bioaccesibilidad.....	106
5.4.1) Optimización y validación.....	107
5.4.2) Aplicación sobre muestras de carne en diferentes puntos de cocción.....	110
6) Conclusiones.....	114
7) Perspectivas.....	116
8) Bibliografía.....	117
ANEXO I.....	127
ANEXO II.....	128

ANEXO III.....	129
ANEXO IV.....	130
Apéndice 1: Publicaciones y presentaciones en congresos.....	131
Trabajos presentados en eventos científicos.....	131
Publicaciones científicas.....	131
Manuscritos en evaluación.....	132

Introducción

Estructura

Esta tesis de Doctorado en Química está dividida en ocho capítulos, finalizando con anexos y apéndices. En el primer capítulo se presentan los antecedentes y marco teórico de la temática en estudio. En dicho capítulo, se pretende explicar la relevancia del tema de estudio a nivel nutricional y nacional. En el segundo capítulo se plantea la hipótesis y justificación del trabajo. Aquí, se busca mostrar dónde radica la importancia e innovación de la presente tesis. Siguiendo con el tercer capítulo, se presentan los objetivos generales y específicos.

El cuarto capítulo corresponde a la parte experimental, donde se detallan los materiales, los reactivos, los equipos y los procedimientos realizados. Allí se encuentran también los métodos, descripción del muestreo, operaciones preliminares y parámetros instrumentales utilizados para el desarrollo de la tesis. El capítulo quinto muestra los resultados y pretende presentar una discusión profunda, certera y actualizada de los resultados obtenidos, así como la interpretación y relevancia de los mismos. Ya en el capítulo seis, se presentan las conclusiones derivadas del proyecto de tesis, así como las respuestas a los objetivos planteados.

Las perspectivas de este trabajo, se encuentran en el séptimo capítulo. Aquí se muestran algunas formas en que la tesista plantea seguir trabajando y profundizando en el tema de estudio. Finalmente, se culmina con la bibliografía consultada, en el capítulo ocho. Los trabajos presentados y publicaciones científicas derivadas de esta tesis se anexan al final del manuscrito.

Cabe mencionar que la tesis se desarrolló en el marco de un proyecto CSIC, vinculación con el sector productivo (VUSP), en conjunto con el Instituto Nacional de Carnes (INAC), ejecutado entre 2017 y 2019.

Es importante mencionar también, que dentro del marco de esta tesis, se realizó una pasantía de intercambio (CSIC – Programa de movilidad MIA) de un mes de duración, en la Universidad Federal de San Carlos, en el marco del Grupo de Análisis Instrumental Aplicada, bajo la orientación del Dr. Prof. Titular de Química Analítica Joaquim A. Nóbrega.

Los objetivos de trabajo planteados en esta tesis, se encuadran dentro de las líneas de dos grupos de investigación del área Química Analítica de la Facultad de Química: Grupo de Análisis de Elementos Traza y Desarrollo de Estrategias Simples para Preparación de Muestras (GATPREM) y Grupo de Bioanalítica y Especiación (BIOESP).

1) Antecedentes y marco teórico

El siguiente capítulo pretende mostrar la relevancia del tema de estudio. En el mismo se explica la importancia de la carne como alimento a nivel nutricional y su rol a nivel nacional. También, se presenta el estado del arte de la Química Analítica en relación al tópico de preparación de muestras complejas y los fundamentos generales de las técnicas utilizadas.

Además, se presentan algunas formas para evaluar la calidad nutricional y la inocuidad de la carne, en lo que respecta al consumo humano, haciendo hincapié en los análisis de estudio de esta tesis doctoral. Asimismo, se hace referencia a los niveles de estos elementos reportados a nivel regional y nacional. Cabe mencionar que, si bien los estudios de bioaccesibilidad se pueden considerar como parte de la evaluación de la calidad, esta sección se presentará por separado, ya que la mayoría de la bibliografía consultada hace referencia a la calidad del alimento considerando la concentración total de cada elemento.

1.1 La carne como alimento y su relevancia a nivel nacional

La carne está definida como la parte blanda entre la piel y los huesos. Es decir, los músculos y vísceras (como ser hígado y riñones) de distintos animales. Particularmente, la carne conocida como roja, corresponde a la proveniente de bovinos, caprinos, ovinos y porcinos (Figura 1.1). Por otra parte, la blanca hace alusión a las aves. El consumo de carne en la dieta, depende de factores culturales y económicos (Latham, 2002).



Figura 1.1: Carne bovina. Extraído de: magazine.medlineplus.gov

No obstante, éste consumo se ha elevado en las últimas décadas y concomitantemente ha aumentado el número de reportes destinados a tratar los beneficios y/o riesgos asociados (De Smet & Vossen, 2016; Klurfeld, 2015; de Castro Cardoso Pereira & dos Reis Baltazar Vicente, 2013). Este alimento constituye una importante fuente de proteínas de alto valor biológico, proporcionando todos los aminoácidos indispensables, fundamentales para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de las funciones vitales que permiten un adecuado bienestar y salud.

Las proteínas de origen animal contienen los aminoácidos indispensables requeridos por el organismo humano, ya que no pueden ser sintetizados por éste y, por lo tanto, deben estar disponibles a través de la dieta. La carne es también una excelente fuente de micronutrientes (vitaminas, minerales y oligoelementos), que a menudo son limitantes en la dieta, como la vitamina A, hierro (Fe), zinc (Zn) y otros compuestos bioactivos (Alfaia et al., 2013; Wood, 2017; de Castro Cardoso Pereira & dos Reis Baltazar Vicente, 2013).

Asimismo, existen algunas publicaciones que relacionan su consumo con el desarrollo de cáncer colorrectal (Superior Health Council, 2013; De Smet & Vossen, 2016; Klurfeld, 2015). A modo de ejemplo, el centro *Superior Health Council*, puente entre las autoridades belgas y el mundo científico en cuestiones relacionadas con la salud pública, ha sugerido una ingesta máxima de 100 g por día de carne (Superior Health Council, 2013).

Hoy en día se pueden encontrar varios tipos de dietas, que no incluyen la carne vacuna. En Tabla 1.1, se puede observar una comparación entre las dietas que contienen el alimento frente a aquellas que no. Dadas las ventajas reportadas que tiene la carne vacuna como alimento por su alto nivel nutricional, y por otra parte aspectos que podrían ser perjudiciales, es que se recomienda su consumo de forma equilibrada (Castro Cardoso Pereira & Dos Reis Baltazar Vicente, 2013).

Tabla 1.1: Cuadro comparativo de algunas dietas con y sin carne vacuna

VENTAJAS	
Dietas vegetarianas	Dietas con carne vacuna
Alto contenido de fibra Menor contenido energético Mayor ingesta de antioxidantes Mayor contenido de agua Menor consumo de grasas saturadas	Alto contenido energético Elevada cantidad de nutrientes Mejor fuente de: hierro, zinc, y complejos B vitamínicos, en particular vitamina B12
DESVENTAJAS	
Dietas vegetarianas	Dietas con carne vacuna
Baja biodisponibilidad de hierro Deficiencia en zinc y B12	Alto contenido en grasas según los cortes

Adaptado de: Castro Cardoso Pereira & dos Reis Baltazar Vicente, 2013.

Si bien la carne vacuna puede no ser esencial para la dieta, es un complemento importante para la mayoría de ellas. En particular, es necesaria para complementar dietas ricas en carbohidratos, ya que aportan proteína de alto valor biológico, además de otros nutrientes de relevancia biológica como Fe (Latham, 2002).

1.1.1) Actividad ganadera en Uruguay

El sistema agro-industrial de Uruguay, caracterizado por estrictas regulaciones, se encuentra focalizado en la exportación. De tal forma, que hoy en día la carne y sus derivados constituyen el producto principal de exportación a nivel nacional, el cuál ha aumentado en más de un 30% en los últimos diez años (INAC, 2019). En la Tabla 1.2 se presentan algunos de los principales productos en términos económicos y los respectivos porcentajes de exportación de nuestro país durante el año 2019. En ella se puede observar como la carne y sus derivados, incluidos lácteos y subproductos cárnicos, se encuentran en la primera posición (Uruguay XXI, 2019).

Tabla 1.2: Exportaciones nacionales de diversos productos alimenticios durante el año 2019 y su aporte porcentual a las exportaciones totales

Producto	Mil US\$	Porcentaje (%)
Carne y derivados	2749	30
Celulosa	1527	17
Soja	1002	11
Conc. de bebidas	524	6
Arroz	372	4
Madera	359	4
Otros	2566	28

Adaptado de: *Uruguay XXI, 2019.*

Según las últimas estadísticas publicadas por INAC, el 82% de las exportaciones de carne de nuestro país corresponden a carne bovina. China, es el principal comprador y socio cárnico de Uruguay. En el 2020, el 55% del volumen de carne bovina fue exportada a ese país, lo que conllevó al ingreso del 48% en términos económicos. Lo sigue NAFTA (Tratado de límite de comercio de América del Norte: México, Estados Unidos y Canadá), con el 21% de las exportaciones en dólares. En la Figura 1.2 se presentan los principales destinos de la exportación de carne bovina producida en nuestro país, presentados en forma de porcentaje según la cantidad de dólares (INAC, 2020).

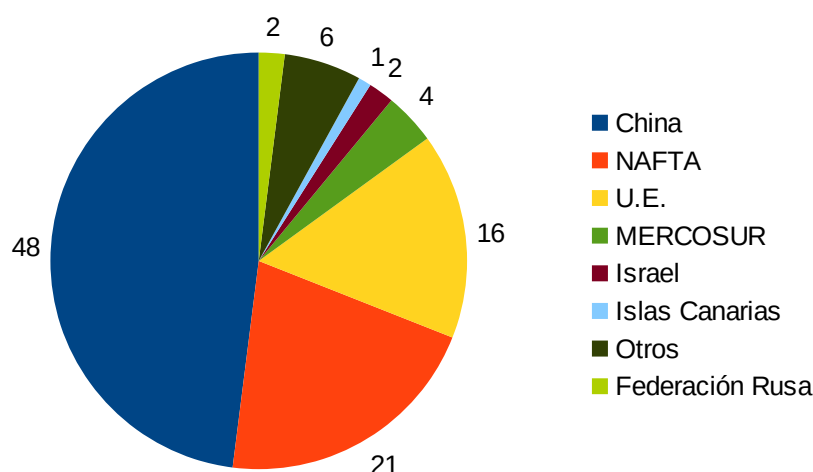


Figura 1.2: Destinos de las exportaciones de carne bovina. Extraído de: INAC, 2020.

Además, Uruguay es uno de los países que más carne consumen en el mundo, con un promedio de 97,7 kg/habitante/año considerando las especies bovina, ovina, aviar y porcina, en particular destacándose la carne bovina con 56,9 kg PC/habitante/año (INAC, 2018). Dentro de los cortes más consumidos a nivel doméstico, se encuentran el asado y el cuadril sin hueso. La Tabla 1.3 presenta la frecuencia relativa (cociente entre la frecuencia absoluta y el tamaño de la muestra, siendo la frecuencia absoluta el número de veces que aparece un determinado corte dentro de la canasta país) de los cortes más consumidos a nivel nacional (INAC, 2010). En la Figura 1.3 se muestra de dónde provienen esos cortes de mayor consumo.

Tabla 1.3: Principales cortes de consumo doméstico

Corte	Frecuencia relativa (%)
Carne picada	90,0
Asado	80,0
Aguja con hueso	75,6
Falda	61,3
Nalga sin hueso	61,3
Paleta con hueso	58,0
Costillas	47,8
Cuadril sin hueso	42,8
Cuadrada	37,7
Bola de lomo	34,5

Extraído de: INAC, 2010

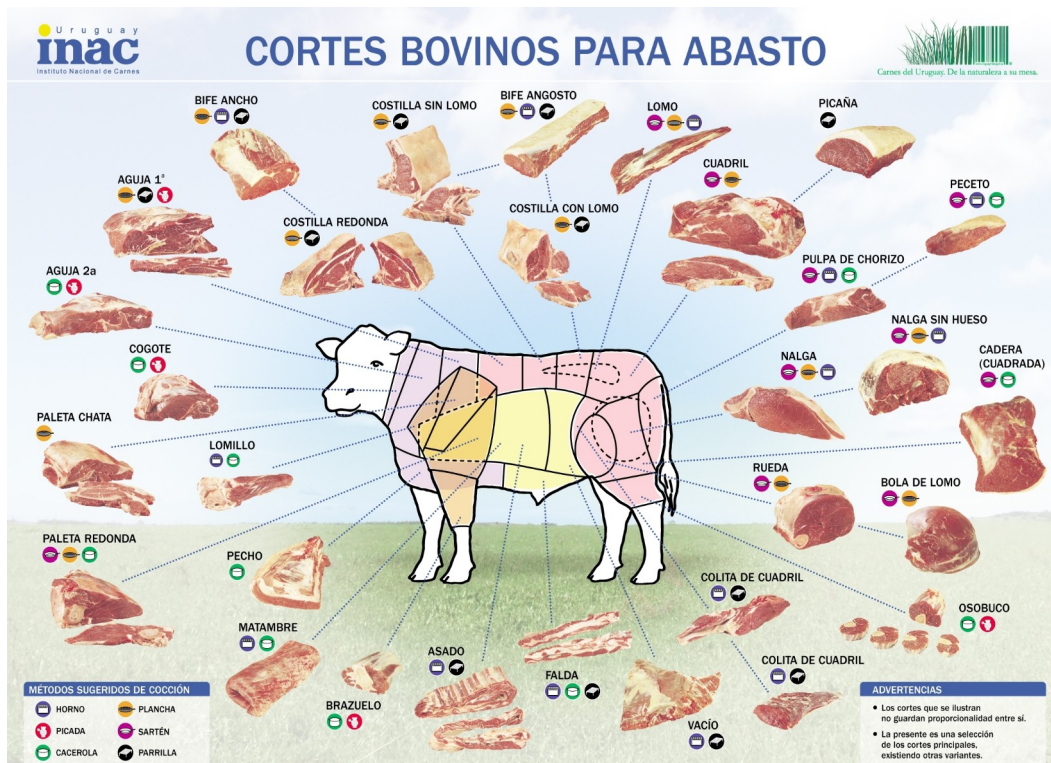


Figura 1.3: Cortes bovinos. Extraído de: www.inac.uy

Dada la relevancia de este producto para el país, por su elevado consumo interno y por su rol en la economía nacional, resulta interesante estudiar el alimento desde el punto de vista de la calidad y la inocuidad alimentaria. El primero hace referencia a la cantidad de nutrientes que aporta el consumo de carne, mientras que el segundo, a los controles que se establecen para garantizar la ausencia de posibles tóxicos que dañen la salud humana.

1.1.2) Calidad

La calidad de los alimentos es un concepto vasto que está relacionado con las necesidades y las expectativas de los consumidores. Esta puede ser evaluada de diferentes formas, como ser la calidad nutricional, la calidad relacionada con la conservación del medio ambiente, la cultura y la religión, la calidad vinculada al origen y las tradiciones locales, entre otras (FAO, 2021). En el marco de esta tesis, se hablará de calidad nutricional referida estrictamente al consumo humano y desde el punto de vista de su aporte como fuente de minerales.

La calidad nutricional de la carne bovina se encuentra relacionada con su composición, entre otros aspectos. Para ello, se tiene en cuenta la cantidad de proteínas, energía, grasas, ácidos grasos, minerales y vitaminas que puede aportar (Wood, 2017). En la Tabla 1.4 se presentan algunos rangos de los principales nutrientes de la carne bovina (Saadoun & Cabrera, 2010; de Castro Cardoso Pereira & dos Reis Baltazar Vicente, 2013).

Tabla 1.4: Niveles de nutrientes en carne bovina cada 100 g (base fresca)

Energía (kcal)	Proteína (g)	Lípidos (g)	Vitamina B12 (µg)	Hierro (mg)	Zinc (mg)
112 - 166	17 -23	2,5 – 16,8	0,9 – 2,0	0,9 – 4,1	2,3 – 7,3

A comienzos del siglo XX, se comenzaron a realizar y publicar ensayos sobre la presencia y relevancia en los sistemas biológicos, de ciertos elementos, tales como cobre (Cu), zinc (Zn), molibdeno (Mo) y selenio (Se), entre otros. Los diferentes minerales pueden ser requeridos en mayor cantidad (elementos mayoritarios) o en cantidades menores (traza) (Suttle, 2010).

Los minerales tienen roles variados en los sistemas biológicos. Pueden tener un rol estructural, ya sea formando parte de macromoléculas, como es el caso de Zn, o ser parte de la estructura muscular como es el caso del fósforo (P). Pueden formar parte de los fluidos biológicos como electrolitos, y de esta forma mantener el balance osmótico, rol fisiológico que tienen elementos como sodio (Na), potasio (K) y cloro (Cl). También pueden tener un importante rol catalítico, formando parte del sitio activo de enzimas, como es el caso de Mo y Cu. Otra de sus funciones es la de regulación, por ejemplo, en la síntesis de proteínas, como es el caso de Se (Suttle, 2010).

En particular, el Mo es un elemento esencial, que se encuentra como cofactor enzimático en la sulfito oxidasa o la xantina oxidasa. La actividad bioquímica de este elemento está relacionada con su capacidad de óxido-reducción y se vincula directamente con sistemas electrón aceptores (Suttle, 2010; WHO, 1996). La deficiencia del mismo en el ser humano causa desórdenes neurológicos y encefalopatías, y está estrechamente vinculada a la enfermedad de Crohn, pudiendo llevar incluso a la muerte (National Research Council, 2005; WHO, 1996; NHI, 2020a). Los alimentos de origen animal y vegetal contienen las cantidades de Mo requeridas para un buen funcionamiento de los sistemas biológicos. De todas formas, también es posible suplementar la dieta con este mineral (NHI, 2020a).

El Se forma parte de las selenoproteínas, como la glutatión peroxidasa celular, enzima que participa en la transformación de especies reactivas de oxígeno. También, tiene un rol importante en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) y en la reproducción, entre otros. La deficiencia de Se en los sistemas biológicos se puede presentar como la enfermedad de Keshan, que causa cardiopatías, y también está estrechamente vinculada con el desarrollo de un tipo de artritis conocida como Kashin-Beck (WHO, 1996; Chen, 2012; NIH, 2020b; Gac et al., 2020). Este mineral se puede encontrar en los alimentos de origen vegetal y animal, donde los derivados de este último son los que presentan mayor cantidad. También existen suplementos de Se que se pueden incorporar a las dietas (NIH, 2020b).

En el caso del Cu, éste es un metal que forma parte de varias enzimas. Se encuentra distribuido en muchos de los sistemas enzimáticos, como la respiración celular, protección de oxidantes, transporte de Fe, entre otras. Por este motivo, su deficiencia puede causar un amplio espectro de efectos desde despigmentación de la piel o anemia, hasta aumentar la susceptibilidad a las infecciones. Además, si bien no hay estudios que puedan asegurar su relación directa, hay fuerte evidencia de que su presencia podría estar relacionada con el desarrollo de Alzheimer y enfermedades cardiovasculares. De todas formas, los estudios hasta ahora realizados aún no son concluyentes (WHO, 1996; Suttle, 2010; NIH, 2020c). Los alimentos de origen animal son los que contienen mayor cantidad de Cu, en particular la carne bovina. No obstante, los vegetales también lo contienen. Asimismo, existen suplementos dietarios para complementar la ingesta en caso de ser necesario (NIH, 2020c).

El Zn es un elemento relacionado con varios sistemas biológicos. Principalmente, tiene rol estructural, como por ejemplo en la replicación del ADN, pero además forma parte de la síntesis y degradación de las macromoléculas. La falta del mismo puede causar retardo del crecimiento, alopecia, retardo en el desarrollo del sistema reproductor y muscular, entre otros (WHO, 1996; National Research Council, 2005; Suttle, 2010; NIH, 2020d). Al igual que en los minerales anteriormente mencionados, los alimentos con mayor cantidad de Zn son los de origen animal, pudiéndose suplementar en las dietas u obtener también mediante la ingesta de alimentos de origen vegetal (NIH, 2020d).

En la Tabla 1.5 se presentan los alimentos considerados como mayor fuente de estos minerales. También se presentan el valor de la Ingesta Diaria Recomendada (IDR) en adultos, hombres y mujeres mayores de 19 años (NIH, 2020a, 2020b, 2020c, 2020d). Como se puede observar, la carne bovina expresada como carne cocida la plancha suele ser una de las principales fuentes de los cuatro minerales a analizar.

Tabla 1.5: Alimentos considerados como buena fuente de Mo, Se, Cu y Zn y su ingesta mínima requerida/día para adultos

Elemento	IDR	Alimentos
Mo	45 µg	Porotos y carne bovina
Se	55 µg	Peces y carne bovina
Cu	900 µg	Mariscos y carne bovina
Zn	11 mg (hombres) / 8 mg (mujeres)	Mariscos y carne bovina

A nivel nacional existen reportes sobre el contenido de los elementos antes mencionados en carne bovina (Cabrera et al., 2010; Saadoun & Cabrera, 2012; Ramos et al., 2012; Cabrera & Saadoun 2014; Pistón et al., 2020a; Pistón et al., 2020b; Machado & Tissot, 2020). Sin embargo, en lo que

respecta a Mo, no existe información disponible sobre los niveles de este elemento en los cortes estudiados en este trabajo. De hecho, hay muy pocas publicaciones en el mundo sobre los niveles de Mo en carne bovina (Vázquez-González et al., 1989; Machado & Tissot, 2020). En la Tabla 1.6 se presentan los niveles de los minerales de interés hasta ahora reportados de nuestro país en base fresca, considerando que el promedio de humedad de las mismas es del 74% (Pistón et al., 2020b)

Tabla 1.6: Niveles de los minerales de interés en esta tesis, en carne bovina uruguaya cruda

Elemento	Molibdeno	Selenio	Cobre	Zinc
Niveles (mg kg ⁻¹)	0,03 – 0,22 ^a	0,10 – 0,11 ^b 0,42 – 1,2 ^c	0,2 – 1,1 ^c 0,7 – 0,9 ^d	23 – 37 ^c 25 – 58 ^d

^aMachado & Tissot, 2020 ; ^bPistón et al., 2020a ; ^cCabrera & Saadoun, 2014 ; ^dPistón et al., 2020b.

1.1.3) Inocuidad

La Organización de las Naciones Unidas de la Alimentación y la Agricultura (FAO) define a la inocuidad como los riesgos que se encuentran asociados a la alimentación y que de alguna manera pueden afectar la salud de las personas, ya sea generando una enfermedad o aumentando el riesgo de enfermedades crónicas preexistentes. Los riesgos pueden ser de origen natural, generados por una contaminación o por la presencia de patógenos. Es necesaria su evaluación para garantizar la seguridad alimentaria (FAO, 2021).

Garantizar la inocuidad del alimento respecto a metales potencialmente tóxicos es primordial, ya que el ser humano se puede ver perjudicado al consumir un alimento que supere determinados niveles de concentración. La presencia de elementos como cadmio (Cd) o plomo (Pb) en la carne, pueden significar un riesgo para la salud, afectando así la calidad del producto (Rovira, 2007).

Según el registro internacional de la Agencia para Sustancias Tóxicas y Enfermedades (ATSDR), el Pb se encuentra en el segundo lugar del ranking de compuestos que representan una amenaza potencial para la salud humana, siendo el Arsénico (As) el elemento que ocupa el primer lugar (ATSDR, 2011). Este metal causa alteraciones al sistema nervioso central, daño renal, e inclusive puede causar la muerte. Si bien no es considerado como carcinogénico, hay evidencia científica de que posiblemente lo sea, aunque no se han obtenido resultados epidemiológicos concluyentes (ATSDR, 2020).

El agua con la que se abastece al ganado suele ser la principal fuente de exposición del animal al Pb. No obstante, también puede ser a causa de sitios contaminados por el metal. Asimismo, la exposición al Pb puede deberse a la presencia de contaminantes ambientales. Éstos pueden

interferir en la cadena alimenticia del ganado, cuando se consumen pasturas de zonas contaminadas, como las que se pueden encontrar en las inmediaciones de ciertos tipos de industrias (Bavera, 2006; Suttle, 2010; Chirinos-Peinado & Castro-Bedrinana, 2020). Recientemente Schild et al., han documentado casos de estudio de exposición a Pb en Uruguay vinculados a la exposición a plaguicidas (Schild et al., 2019). Asimismo, se han presentado algunos casos regionales de exposición a Pb relacionados al incorrecto almacenamiento de pinturas y baterías (Traverso et al., 2004; Barbosa et al., 2014).

Por su parte, el Cd se encuentra en el séptimo lugar del ranking de compuestos que representan una amenaza potencial para la salud humana, siendo uno de sus efectos adversos, el reemplazo del Zn en sitios activos enzimáticos. Además, la exposición a pequeñas cantidades, pero en períodos largos de tiempo, causan daño al sistema renal (ATSDR, 2011, 2012). El Cd se puede acumular en el músculo bovino y llegar al consumidor en diversos cortes de carne. Algunas de las posibles fuentes de contaminación de este elemento están relacionadas con el agua con la que se abastece al ganado y con el uso de fertilizantes fosfatados. De esta forma, el elemento se puede acumular en los suelos y contaminar las pasturas en esos terrenos hasta concentraciones de 10 mg kg⁻¹ (Bavera, 2006). No se han encontrado hasta el momento publicaciones que informen acerca de la determinación o presencia de Cd en carnes bovinas nacionales. No obstante, algunos investigadores nacionales advierten que los animales alimentados con suplementos, pueden estar expuestos a metales potencialmente tóxicos debido a las impurezas propias del suplemento (FAGRO, 2015).

El Reglamento Técnico MERCOSUR ha establecido los límites máximos de ciertos contaminantes inorgánicos con los objetivos de armonizar los reglamentos técnicos que generalmente son dependientes de cada país, y de esta forma proteger la seguridad alimentaria. En la Tabla 1.7 se presentan los límites máximos admitidos para Cd y Pb en carne bovina.

Tabla 1.7: Límites máximos permitidos de Cd y Pb en carne bovina (base fresca)

Plomo	Cadmio
0,10 mg kg ⁻¹	0,05 mg kg ⁻¹

Extraído de: Reglamento técnico del MERCOSUR, 2013.

Por otra parte, el Se es un elemento esencial para el organismo como se mencionó anteriormente (Sección 1.1.2). Por su importante rol biológico, suele suplementarse en las dietas del ganado. No obstante, su consumo en exceso puede llevar a presentar problemas en los animales (Bavera, 2006). La selenosis es una enfermedad causada por la elevada exposición a Se y varios son los casos estudiados a nivel mundial (Yonghua et al., 2007; NCBI, 2000). La exposición a Se puede causar efectos en los sistemas gastrointestinal, cardiovascular y respiratorio. Asimismo, la

exposición del animal durante largos períodos de tiempo, puede causar alopecia, cojera, eritema e incluso la muerte (Nuttall, 2010; Raisbeck, 2020). Además, está demostrado que la exposición a elevados niveles del mismo afecta los sistemas acuáticos (Davis et al., 1988; Gobi et al., 2018), y afecta al metabolismo de las plantas (El Mehdawi & Pilon-Smits, 2011; Gojkovic et al., 2015). Por este motivo, resulta interesante la evaluación de los niveles de Se dada su recomendación en la suplementación dietaria y su rol ambiguo en los sistemas biológicos.

1.1.4) Bioaccesibilidad

La bioaccesibilidad ha sido definida como la fracción de un compuesto que es liberada de la matriz en la cual se encuentra hacia el tracto gastrointestinal y que se vuelve disponible para ser absorbida por el intestino, pasando al torrente sanguíneo (Hurrell & Egli, 2010). En este sentido, varios enfoques *in vitro* han sido desarrollados para tratar de imitar el proceso de digestión humano. Mediante la extracción *in vitro* se evalúa la bioaccesibilidad imitando típicamente los procesos que ocurren en tres áreas vinculadas al proceso digestivo. Es así que se toma en cuenta el trayecto del alimento, comenzado en la boca, siguiendo en el estómago y finalizando en el intestino delgado (Intawongse & Dean, 2006; Moreda-Piñero et al., 2011; INFOGEST, 2019).

La primer etapa corresponde al proceso que tiene lugar en la boca, durante la masticación del alimento. En esta fase, el bolo alimenticio sufre una trituración mecánica en presencia de saliva, que contiene enzimas como la amilasa, a pH 6,5. La principal función de esta etapa es la disminución del tamaño del bolo, aumentando el área de superficie de contacto con la cual podrán interaccionar las enzimas. Además, el proceso lubrica el bolo, facilitando su transporte a través del esófago hacia al estómago (Intawongse & Dean, 2006; INFOGEST, 2019).

En muchos ensayos *in vitro*, esta etapa no es simulada, ya que el medio en el que se desarrolla es casi neutro, y por lo tanto no es esperable que facilite de forma significativa la extracción de los analitos metálicos. Además, la trituración mecánica, rol principal en este compartimiento, se puede simular de otras formas. Por este motivo, en la mayoría de los ensayos *in vitro*, se simulan únicamente los procesos que se dan a nivel gastrointestinal (Oomen et al., 2002; Intawongse & Dean, 2006).

Una vez en el estómago, el bolo es sometido a un medio fuertemente ácido, gracias a la presencia del ácido clorhídrico (HCl), que permite la extracción de metales. En el sistema gástrico se encuentra presente la pepsina, una enzima proteasa capaz de descomponer las proteínas de la matriz. Ésta presenta mayor actividad enzimática en medio ácido, lo que facilita la descomposición del bolo alimenticio en el estómago. Este proceso puede demorar desde unos minutos, hasta tres horas. En los ensayos *in vitro*, se suele estandarizar este tiempo a dos horas, manteniendo una

temperatura constante de 37 °C, como en las condiciones fisiológicas normales (INFOGEST, 2019; Intawongse & Dean, 2006; Machado et al., 2017).

Finalmente, la última etapa consiste en la simulación de la digestión en el intestino delgado. Aquí, la pancreatina junto con las sales biliares, terminan de descomponer los polisacáridos, las proteínas y las grasas de forma de facilitar la absorción. En esta etapa el pH del medio es neutro y se suele estandarizar el tiempo en dos horas, trabajando siempre a una temperatura constante de 37 °C (INFOGEST, 2019; Intawongse & Dean, 2006; Machado et al., 2017).

Con el objetivo de realizar procedimientos *in vitro* lo más fielmente posible, es que se estandarizan ciertos parámetros, no obstante, pueden existir algunas diferencias entre los distintos ensayos reportados. Los parámetros que se deben cumplir son: temperatura constante de 37 °C durante todas las extracciones, jugo gástrico simulado a pH 1 – 4 usando HCl y pepsina durante mínimo dos horas y jugo intestinal simulado a pH neutro en presencia de pancreatina y sales biliares durante aproximadamente dos horas. La etapa que simula el bolo en la boca puede no realizarse, por lo ya mencionado anteriormente, sumado a que el tiempo de permanencia del bolo en esa cavidad es muy corto (INFOGEST, 2019; Intawongse & Dean, 2006; Machado et al., 2017; Oomen et al., 2002). En la Figura 1.4 se presenta el esquema de la digestión *in vitro* según la Red Internacional de Excelencia sobre el Destino de los Alimentos en el Tracto Gastrointestinal (INFOGEST).

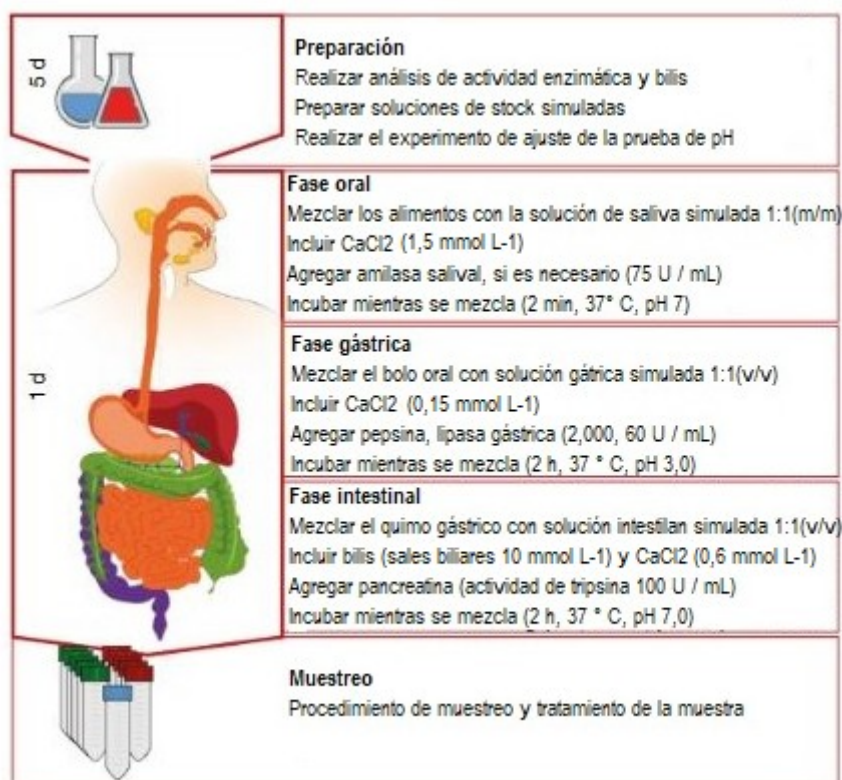


Figura 1.4: Esquema de simulación del sistema gastrointestinal para los ensayos de bioaccesibilidad. Adaptado de: INFOGEST, 2019.

En este tipo de ensayos, es muy importante tener en cuenta la forma en la cual el alimento es consumido, es decir, las preparaciones culinarias y tipos de cocción. En general, mucha de la información relacionada a los niveles de los nutrientes en estudio, se encuentra relacionada con carne cruda. Sin embargo, ésta no suele ser la forma habitual de consumo, al menos en nuestro país. Además, el proceso de cocción puede influir en la cantidad de nutrientes presentes, fundamentalmente, debido a la pérdida de agua al momento de cocinarlos (Pistón et al., 2020b).

Ya que el consumo normal de carne puede constituir una fuente importante de elementos esenciales (Sección 1.1.2), requeridos para el correcto funcionamiento de la actividad metabólica, resulta interesante lograr establecer la cantidad de dichos elementos que se encuentra potencialmente disponible para ser absorbida luego del proceso digestivo, teniendo en cuenta las formas de cocción más comunes de este alimento en nuestra sociedad. De esta forma, se puede complementar la evaluación de calidad nutricional de la carne, mediante la evaluación de las respectivas fracciones bioaccesibles de los nutrientes en estudio.

Para establecer relaciones y comparaciones se puede realizar el cálculo de la fracción bioaccesible (FB) definida como (Machado et al., 2017):

$$FB (\%) = [\text{fracción del analito en la digestión gastrointestinal simulada (mg kg}^{-1}\text{)} / \text{concentración total del analito en la muestra (mg kg}^{-1}\text{)}] \times 100 .$$

A nivel nacional y regional existen algunas publicaciones relacionadas con ensayos de bioaccesibilidad de nutrientes minerales en carne bovina (Menezes et al., 2018; Ramos et al., 2012). En la Tabla 1.8 se presentan algunos de los datos reportados.

Tabla 1.8: Fracción bioaccesible de minerales reportada en carne bovina en la región

Elemento	Cu	Zn	Fe	Referencia
FB (%)	12-43	12-20	19-28	Menezes et al., 2018*
	<40	40-50	>60	Ramos et al., 2012#

* alimento cocido; # alimento crudo

1.2 Métodos analíticos de análisis

En esta sección se presenta el estado del arte de los tratamientos de muestras y métodos estándar utilizados para el análisis y determinación de los elementos en estudio. Además, se presenta la relevancia de la validación de los métodos analíticos, y se introducen aspectos relacionados con las nuevas tendencias relacionadas con la Química Analítica Verde.

1.2.1) Preparación de las muestras

Una de las etapas fundamentales del proceso analítico, además del muestreo, es el tratamiento o preparación de las muestras (Figura 1.5). En esta etapa, la muestra debe ser sometida a ciertos tratamientos, debido a que la mayoría de las técnicas utilizadas para las determinaciones analíticas de metales y semimetales requieren que el analito se encuentre en una disolución. Este proceso, consiste en la realización de operaciones físicas y/o químicas, que permitan la introducción de la muestra al instrumento de medida y de esta forma lograr una correcta determinación de los analitos de interés. Uno de los principales problemas es contar con un método que logre liberar cuantitativamente los analitos cuando se encuentran unidos a moléculas orgánicas (Krug & Piovezani Rocha, 2016).

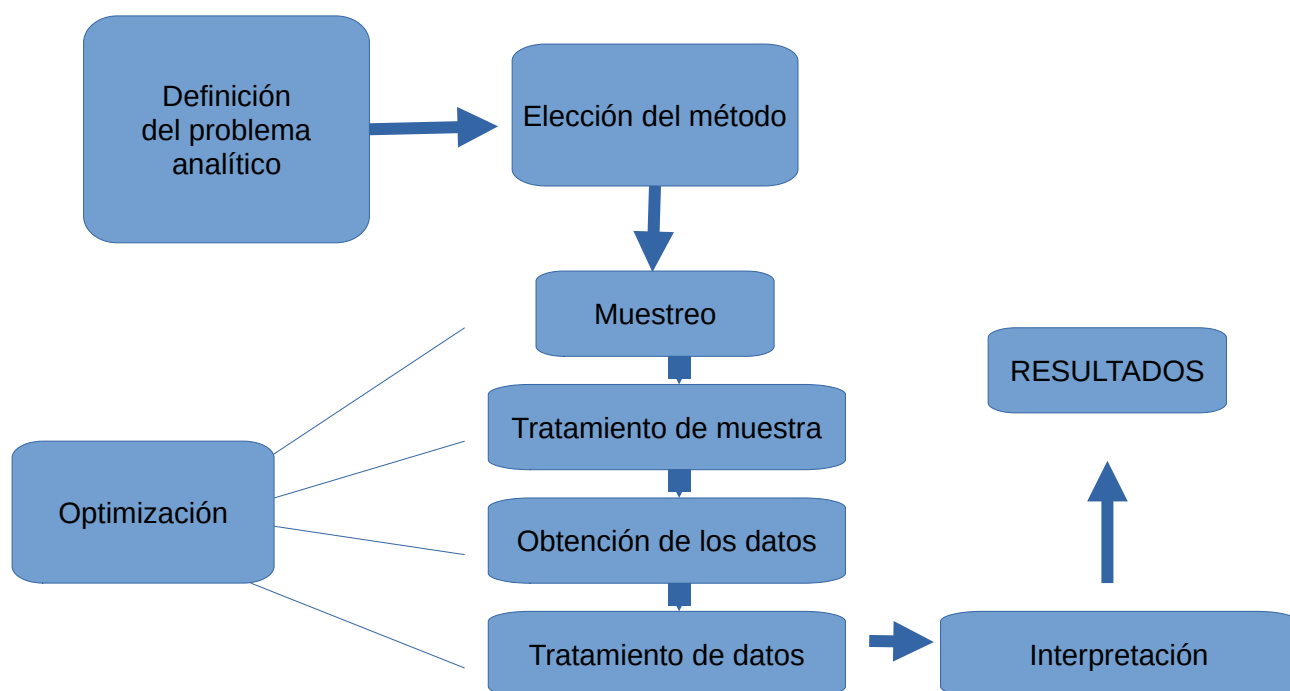


Figura 1.5: Esquema del proceso analítico.

Generalmente, se utilizan para este fin tratamientos drásticos con ácidos concentrados y calentamiento, para lograr la oxidación total de la materia orgánica. El uso de las ondas de microondas para asistir la digestión de muestras es muy frecuente. Actualmente, las digestiones asistidas por microondas son de las más utilizadas, con amplias aplicaciones. En esta digestión el calentamiento que se produce dentro de los vasos de reacción se debe a dos fenómenos: la migración iónica y la rotación de dipolos. Estos dos procesos son estimulados por la frecuencia de las microondas, donde el calentamiento del medio que contiene la muestra y un disolvente apropiado, favorece la descomposición de la matriz donde se encuentra el analito (Krug & Piovezani Rocha, 2016; Skoog et al., 2005).

Una de las ventajas de la digestión asistida por microondas radica en la posibilidad que poseen algunos equipos, de controlar las condiciones de temperatura y presión en todas las muestras por igual, ya que se trabaja con sistemas cerrados. Esto permite una mejor reproducibilidad del tratamiento y de los resultados. La rapidez, sencillez y seguridad de los equipos digestores de microondas, hace que sean de los más utilizados y preferidos a la hora de realizar el tratamiento de muestras complejas para la posterior determinación de minerales (Krug & Piovezani Rocha, 2016; Skoog et al., 2005).

Otra estrategia de preparación de muestras es la extracción de los elementos mediante extracciones con disolventes adecuados, con o sin aporte de energía externa. Aquí no se produce una destrucción total de la materia orgánica, sino parcial, pero el tratamiento es lo suficientemente drástico como para liberar a los analitos de la matriz de forma cuantitativa (Skoog et al., 2005). En este sentido, la realización de tratamientos asistidos con ondas de ultrasonido son muy utilizadas para favorecer la extracción de distintos analitos mediante el proceso denominado cavitación. Varios son los trabajos publicados que demuestran la eficiencia de esta tecnología para la preparación de las muestras (Machado et al., 2015; Machado et al., 2016; Pereira et al., 2021).

1.2.2) Espectrometría de absorción atómica

La absorción atómica es una técnica espectroscópica de análisis elemental que requiere la atomización del elemento de interés. Para la determinación cualitativa y cuantitativa de uno o varios elementos presentes en una muestra, es necesario volatilizar los analitos en cuestión y transformarlos en átomos gaseosos. De esta forma, cuando la radiación atraviesa la zona donde se encuentran los átomos en estado gaseoso, se produce la absorción en frecuencias definidas. Estas frecuencias están relacionadas con el tipo de átomo, y la absorción de la radiación se corresponde mediante un modelo matemático, con la cantidad del elemento presente. En la Figura 1.6 se muestra, a modo de ejemplo, un esquema de un espectrómetro de absorción atómica de llama típico. A. Walsh, científico australiano, paralelamente con C. Alkemade y J. Milatz, científicos

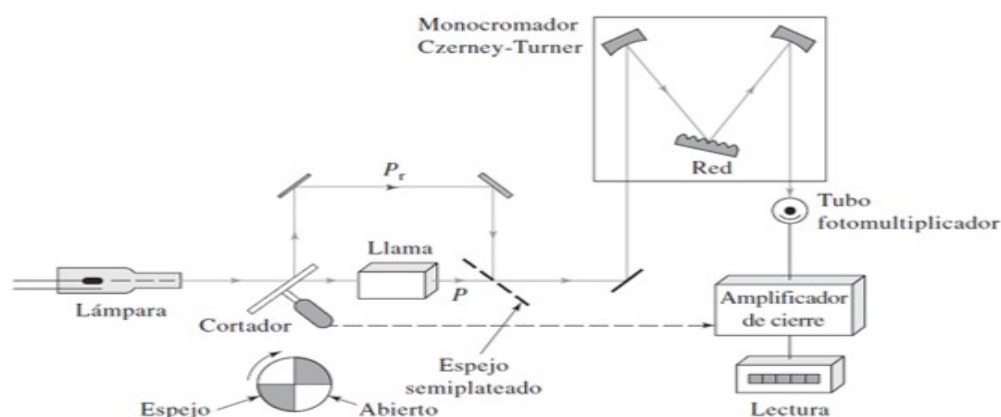


Figura 1.6: Espectrómetro de absorción atómica de llama típico de simple haz. Extraído de: Skoog et al., 2008.

holandeses, fueron los primeros en utilizar esta técnica para la determinación cuantitativa en 1955 (Welz & Sperling, 1999; Skoog et al., 2008).

Una de las etapas más críticas de esta técnica es la atomización, por lo cual se desarrollaron distintas formas a lo largo de los años con el fin de mejorarla. La forma más sencilla, y por lo tanto la primera en ser utilizada, fue la atomización por llama (FAAS). Aquí la muestra es nebulizada por el flujo de un gas oxidante y la mezcla con un gas combustible, para ser transportada hasta la llama. En la Figura 1.7 se muestra, a modo de ejemplo, un mechero típico de flujo laminar utilizado para estas determinaciones (Welz & Sperling, 1999; Skoog et al., 2008).

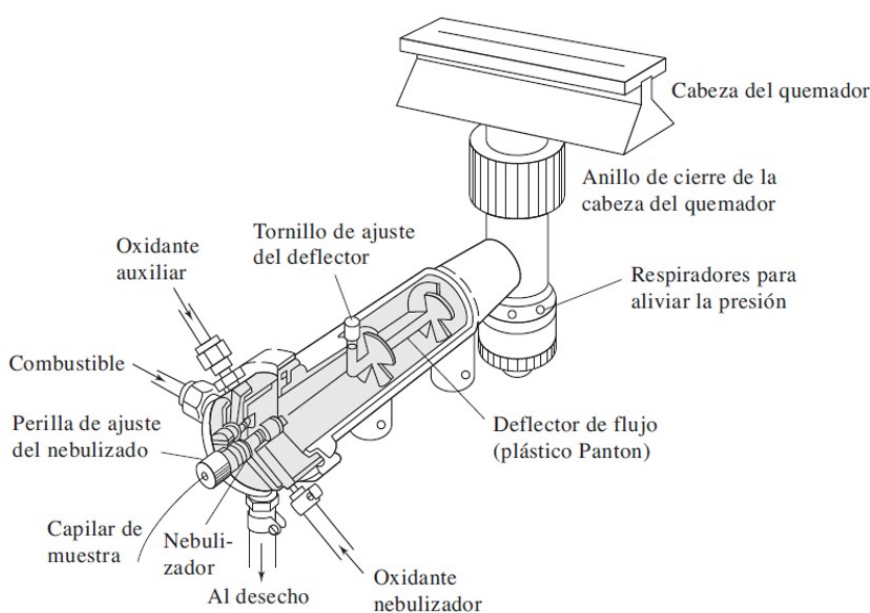


Figura 1.7: Mechero de flujo laminar. Extraído de: Skoog, 2008.

La llama debe ser lo suficientemente energética para poder volatilizar y atomizar la muestra. Por este motivo, su composición es de suma importancia. Se deben optimizar flujo, proporción y tipo de gases a utilizar en las determinaciones. Las llamas más utilizadas contienen una mezcla de aire-acetileno, pero existen otras mezclas. La técnica FAAS posee límites de detección y cuantificación en el orden de mg kg^{-1} . Por su sencillez y bajo costo, suele ser la técnica más utilizada, siempre que se trabaje con elementos que se encuentran en ese nivel de concentración, lo cual dependerá de la muestra en cuestión (Welz & Sperling, 1999; Skoog et al., 2008).

Otra forma ampliamente utilizada es la atomización electrotérmica (ETAAS). Esta consiste en colocar un volumen pequeño de muestra en un tubo de grafito, que se calienta eléctricamente, y someterla a un programa de temperaturas que depende del analito y de la matriz a analizar. Los programas de temperatura consisten en varias etapas en las que esta va en aumento. Primeramente, se efectúa el secado de la muestra, pasando luego por la pirólisis o calcinación,

etapa donde se elimina la materia orgánica que se encuentra presente en la matriz, terminando con la atomización, etapa de mayor temperatura en la cual el analito es atomizado. Este tipo de atomización se destaca por su alta sensibilidad, debida a la capacidad de confinamiento de los átomos gaseosos en el tubo de grafito, el cual se encuentra perfectamente alineado con el haz de luz (Figura 1.8) (Skoog et al., 2008; Welz & Sperling, 1999).

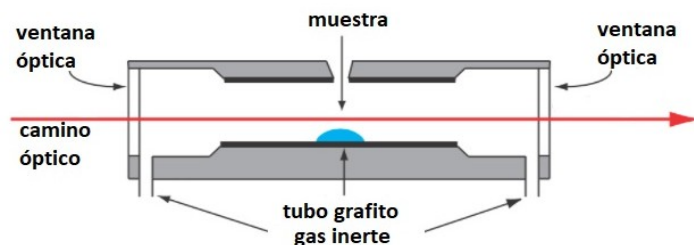


Figura 1.8: Corte transversal del sistema ETAAS. Extraído de: D. Harvey en <https://LibreTexts.org>

Al trabajar con ETAAS se deben tener en cuenta varias condiciones. Aquí, es crítico el volumen de inyección de la muestra, la optimización de los programas de temperatura, los tiempos de mantenimiento de cada etapa del programa, el gas portador utilizado y su flujo. Todas estas variables deben ser optimizadas, para lograr una correcta determinación de los elementos en estudio (Skoog et al., 2008; Welz & Sperling, 1999).

En el proceso de atomización electrotermica, muchas veces es necesaria la incorporación de modificadores químicos. Estos son sustancias químicas que no afectan la determinación de la concentración del analito, y que permiten utilizar mayores temperaturas de pirólisis y/o de atomización, o la estabilización térmica de los analitos volátiles. La adición de los mismos, cuáles utilizar y en qué concentración, también forman parte de la optimización del método (Tsalev & Slaveykova, 1992).

A modo de ejemplo, un modificador puede ser el nitrato de paladio ($\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$), que actúa en la estabilización térmica de los elementos y permite el aumento de la temperatura y/o del tiempo de volatilización (Voth-Beach & Shrader, 1987). Por su parte, el dihidrógeno fosfato de amonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), es otro modificador ampliamente utilizado para incrementar la volatilidad de especies concomitantes, es decir, componentes individuales de la matriz distintos del analito, lo cual disminuye las interferencias que pueden provenir de la matriz (Dobrowolski et al., 2010). La combinación entre ambos reactivos para constituir un modificador mixto, ha resultado una óptima estrategia para reducir los efectos causados por matrices biológicas complejas, como puede ser la

carne bovina. Ambos modificadores potencian la eficiencia de la determinación, ya que combinan el efecto de aumento de temperatura y la desestabilización de los posibles interferentes.

Por otra parte, existen otras técnicas de introducción de la muestra directamente en forma gaseosa, para la determinación de elementos volátiles. Una de ellas es conocida como generación de hidruros (HG-AAS). Aquí, se generan hidruros volátiles a partir de algunos elementos por la acción de un agente reductor, generalmente tetrahidroborato de sodio (NaBH_4), en medio ácido. Una vez generado el hidruro, este es transportado hasta la cámara de atomización mediante un gas inerte. Esta cámara suele ser un tubo de cuarzo que se coloca encima de la llama, donde se atomizan los analitos de interés mediante una reacción radicalaria. Este método suele ser muy utilizada para elementos volátiles como arsénico (As), bismuto (Bi), Se y Pb, entre otros. La Figura 1.9 muestra, a modo de ejemplo, un esquema de un sistema HG-AAS. Cabe mencionar que al generarse las especies volátiles de los analitos, éstos se separan del medio, disminuyendo de esta forma la probabilidad de interferencias debidas a la matriz, al momento de realizar las determinaciones. Además, al encontrarse los analitos confinados en un tubo concéntrico, la sensibilidad de la técnica es alta, llegando a determinaciones de niveles de concentración del orden de los $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Skoog et al., 2008; Welz & Sperling, 1999).

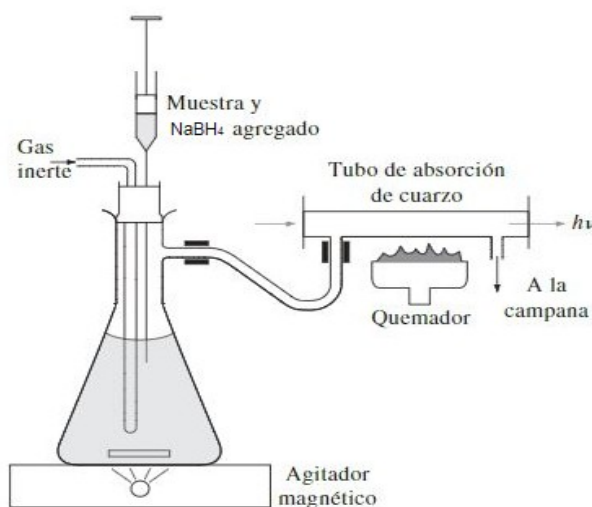


Figura 1.9: Esquema de un sistema HG-AAS. Extraído de: Skoog et al., 2008.

1.2.3) Espectrometría de emisión atómica óptica

En la técnica de espectrometría de emisión atómica óptica (OES), se relaciona la energía emitida por el analito, al volver a su estado fundamental los electrones que previamente fueron excitados. La excitación puede ser térmica, eléctrica o inclusive mediante una reacción química. Finalmente, la energía emitida a una determinada longitud de onda característica del elemento medido, brinda información sobre la identidad y cantidad del analito presente en la muestra.

La técnica OES presenta algunas ventajas respecto a las técnicas de absorción atómica mencionadas previamente, si se cuenta con una fuente de atomización como puede ser un plasma de acoplamiento inductivo (ICP). Un plasma es una mezcla compuesta por iones gaseosos, capaz de conducir la electricidad. En la Figura 1.10 se presenta, a modo de ejemplo, un esquema de un espectrómetro de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (Skoog et al., 2008).

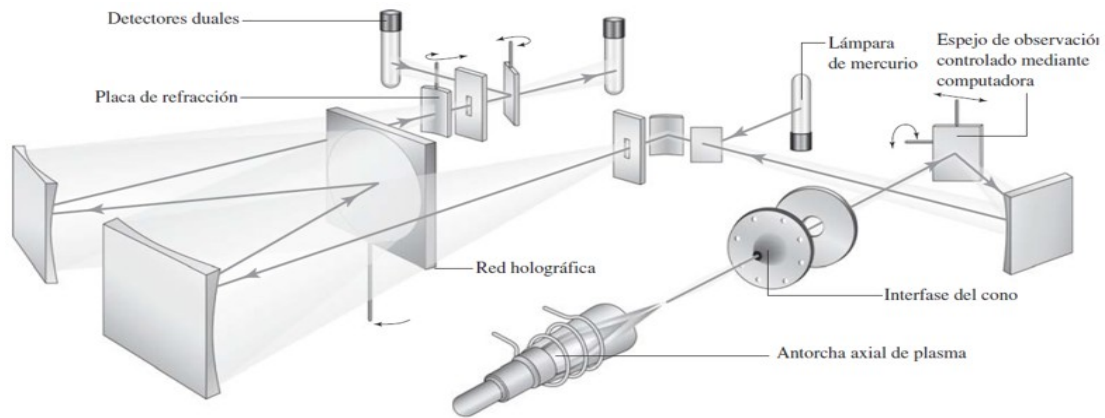


Figura 1.10: Esquema de un espectrómetro de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). Extraído de: Skoog et al., 2008.

En la espectrometría atómica de emisión, se suele utilizar el plasma de argón, un ejemplo es el ICP, cuyo atomizador consiste en una antorcha (Figura 1.11). La misma está constituida por tres tubos concéntricos de cuarzo, por donde fluye argón y se encuentra rodeada por un generador de radiofrecuencias. La muestra se transporta por el tubo central hacia donde se encuentra el plasma. Éste es iniciado por una chispa de una bobina de Tesla, y luego la corriente de radiofrecuencia alterna crea un campo magnético que provoca que los iones argón y los electrones se muevan de forma circular. La resistencia provocada por el flujo de iones, causa el calentamiento óhmico del plasma, pudiendo alcanzar temperaturas de hasta 10000 K en la base del mismo, y entre 6000 y

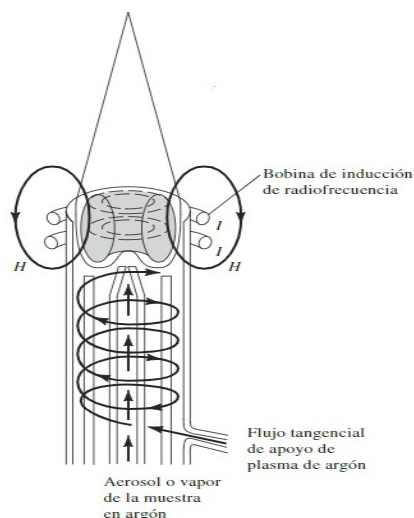


Figura 1.11: Fuente de ionización de plasma de acoplamiento inductivo. Extraído de: Skoog et al., 2008.

8000 K por encima de la bobina de radiofrecuencias, donde se realiza la lectura analítica. Debido a las altas temperaturas alcanzadas, el tubo exterior de cuarzo debe aislarse térmicamente del plasma, lo cual se logra mediante un flujo tangencial de argón.

Al utilizar un plasma de este tipo como atomizador, se presentan menor cantidad de interferencias químicas, a causa de las elevadas temperaturas alcanzadas. Además, tiene la ventaja de ser una técnica multielemental, ya que los elementos de la muestra se excitan simultáneamente. Asimismo, es posible realizar la determinación de concentraciones bajas de elementos que son resistentes a la descomposición térmica, así como de varios elementos no metálicos.

Por último, al producirse la atomización en un medio inerte desde el punto de vista químico, aumenta el tiempo residencia de los analitos, evitándose la formación de óxidos (Skoog et al., 2008). Además, debido a que la temperatura del plasma es más uniforme que en una llama, fenómenos como la autoinversión y la autoabsorción no son frecuentes. Esto aumenta los rangos lineales de trabajo de los métodos de emisión por plasma, que alcanzan varios órdenes de magnitud, y se pueden lograr bajos límites de detección y cuantificación. Por otra parte, los espectros obtenidos utilizando ICP son complejos, ya que se presentan no solamente las líneas de emisión atómica, sino que presenta mayoritariamente las líneas de ionización.

Por su parte, una llama como fuente de excitación es menos eficiente, dado que alcanza menores temperaturas de trabajo, lo cual condiciona la energía que puede proporcionar para la excitación. No obstante, para elementos mayoritarios, es decir en concentraciones elevadas, es muy utilizada (Skoog et al., 2008).

Otra alternativa como fuente de excitación es un plasma inducido por microondas (Figura 1.12). Este plasma se genera debido a la interacción con un campo magnético y eléctrico utilizando nitrógeno para constituir el plasma. La antorcha es igual a la que utiliza un ICP, pero la inducción del plasma está dada por un magnetrón. Las temperaturas que alcanza un plasma de nitrógeno son menores a las de las fuentes de ICP, unos 5000 K en la zona de medición. Dado que las temperaturas alcanzadas son menores, los espectros suelen ser menos complejos, ya que contienen muy pocas líneas iónicas, aunque a veces esto puede ser una desventaja durante la determinación de elementos con un elevado potencial de ionización. Sin embargo, en general, la sensibilidad obtenida suele ser mejor a la de FAAS o a la de espectrometría de emisión atómica por llama (FAES) para un mismo elemento, por ejemplo para elementos como Cu, Mn y Zn, entre otros, pudiendo compararse en algunos casos con la sensibilidad de ICP-OES (Pozebon et al., 2020). Asimismo, se trata de una técnica multielemental con la cual se pueden obtener amplios rangos lineales.



Figura 1.12: Equipo de espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (Agilent 4210). Extraído de: GATPREM

1.2.4) Espectrometría de masas con a plasma acoplado inductivamente

Un espectrómetro de masas es un instrumento capaz de producir iones y luego separarlos según su relación masa/carga. Particularmente la espectrometría de masas atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas y desarrolladas para el análisis elemental en los últimos tiempos. Esta técnica cuenta con ciertas ventajas respecto a las mencionadas anteriormente. Presenta menores límites de detección, del orden de los ng kg^{-1} . Además, los rangos de trabajo obtenidos son amplios y es posible la determinación de los analitos en forma multielemental. Al igual que el resto de las técnicas mencionadas, ICP-MS, puede verse afectada por interferencias químicas (Thomas, 2004; Skoog et al., 2008).

Por otra parte, se trata de un equipamiento de alto costo operativo y de mantenimiento no siempre accesible para muchos laboratorios (Thomas, 2004; Skoog et al., 2008).

En la Figura 1.13 se presenta, a modo de ejemplo, un esquema de un equipo acoplado de ICP-MS. En la Sección 1.2.3, se mencionó cómo opera la antorcha de ICP, la cual trabaja a presión atmosférica. Por ese motivo, una de las partes críticas, es la interfase de acoplamiento entre la antorcha y el espectrómetro de masas, ya que éste último trabaja a alto vacío (presiones menores a 10^4 torr). Esto se realiza utilizando un acoplador de interfase de vacío diferencial. Éste consta de un cono de níquel que es enfriado por agua y por donde pasa el plasma hacia a una región de una presión de aproximadamente 1 torr, utilizando una bomba de vacío mecánica. En esta zona, se da una expansión del gas el cual se enfría, y una fracción del mismo pasa a través de otro cono separador hacia una cámara que se mantiene a la presión necesaria para el correcto

funcionamiento del espectrómetro de masas. Una vez en el espectrómetro, los iones positivos se separan del resto de las especies y son guiados a través de lentes magnéticas hacia el analizador de masas. El analizador de masas más frecuentemente utilizado en los acoples de ICP-MS, es el cuadrupolar (Thomas, 2004; Skoog et al., 2008).

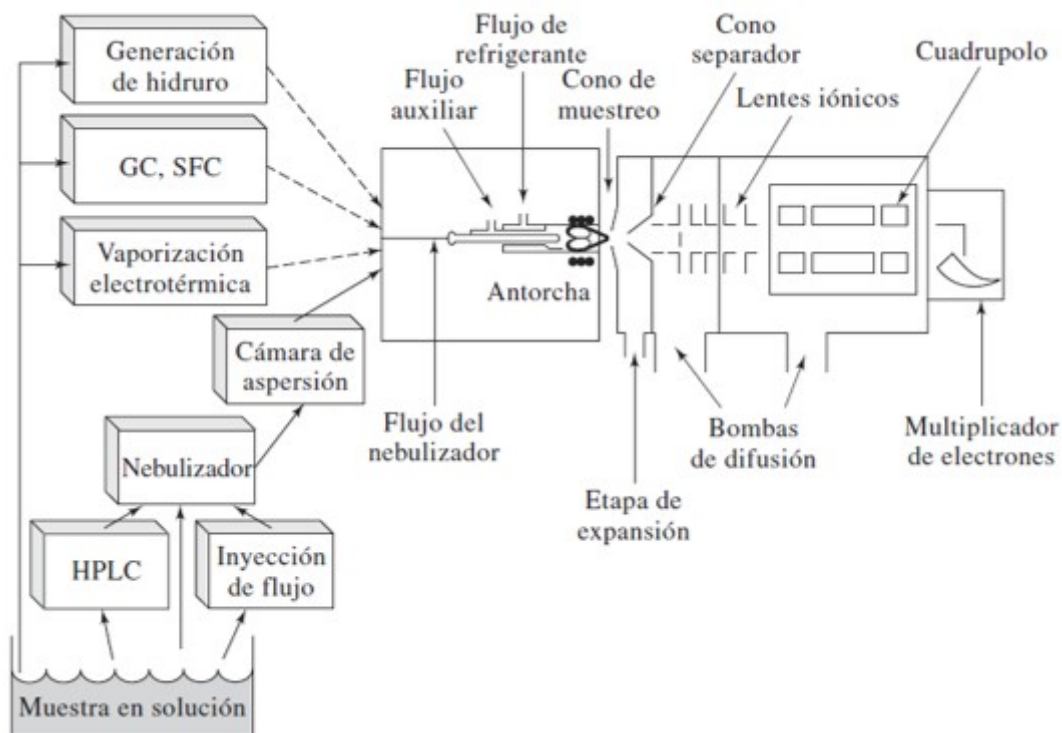


Figura 1.13: Esquema de un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente. Extraído de: Skoog et al, 2008.

En las siguientes figuras se comparan las técnicas mencionadas en éste capítulo, en función del rango dinámico de trabajo (Figura 1.14) y en función de los límites de detección (Figura 1.15). Es parte de rol analítico evaluar en función de costo-beneficio el uso de cada una de ellas.

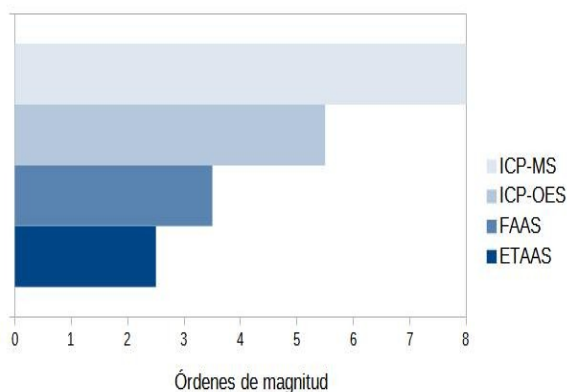


Figura 1.14: Comparación de las técnicas en función del rango dinámico de trabajo. Adaptado de: Thomas, 2004

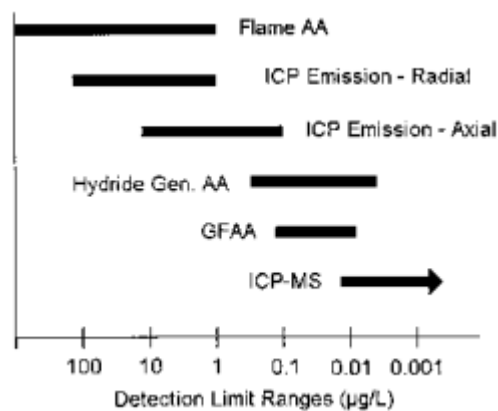


Figura 1.15: Comparación de las técnicas en función de los límites de detección. Extraído de: Thomas, 2004

1.2.5) Validación

La Eurachem, es una red de organizaciones en Europa que tiene como objetivo establecer un sistema para la trazabilidad internacional de las mediciones químicas y la promoción de buenas prácticas de calidad. Esta red publica guías para validación y evaluación de incertidumbre de los métodos analíticos. La guía específica de validación, define este proceso como un requerimiento importante en la medición analítica. El valor de un resultados analítico va mas allá de una cantidad medida, ya que detrás de ésta se encuentran fines comerciales, de apoyo a la población y bienes públicos. Se podría decir que casi todos los aspectos de la sociedad están respaldados de una u otra forma por el trabajo analítico. En este sentido, la validación del método analítico es el proceso de demostrar que un determinado procedimiento es adecuado para su propósito. Para ello se evalúan una serie de parámetros, conocidos como parámetros de desempeño, mediante los cuales se definen las características de rendimiento del método (Eurachem, 2020).

Los parámetros de desempeño habitualmente evaluados durante la validación de un método analítica son: intervalo o rango de trabajo, límites de detección y de cuantificación, robustez, precisión, veracidad, selectividad e incertidumbre. A continuación se describen estos parámetros (Magnusson & Örnemark, 2014).

El intervalo de trabajo es el intervalo en el cual el método presenta valores con una incertidumbre aceptable. De ser posible, se busca encontrar un rango de trabajo que se comporte de forma lineal, pero pueden existir casos en que no sea así. Para la determinación del modelo de mejor ajuste, existen varios criterios: inspección visual, coeficiente de determinación, cálculo de residuales, análisis de prueba de falta de ajuste (LOF), entre otros.

El límite de detección (LD) corresponde a la mínima concentración o masa que puede ser detectada a un nivel de confianza especificado. La guía Eurachem, plantean la estimación del mismo, basándose en el criterio 3s de la siguiente forma:

$LD = 3s / m$ (siendo s la desviación estándar de un blanco adecuado y m la pendiente de la curva de calibración).

Límite de cuantificación (LC) corresponde a la mínima concentración o masa que puede ser cuantificada a un nivel de confianza especificado. A partir de éste se puede informar un resultado con su incertidumbre asociada. Se calcula en forma análoga al LD, pero utilizando el criterio 10s / m.

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para permanecer no afectado por pequeñas variaciones premeditadas de los parámetros del método. Ésta proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal. En todo método existen ciertas

etapas que, si no se realizan con suficientemente cuidado, pueden tener un efecto significativo en el desempeño del mismo. Estas etapas deben ser identificadas, y si es posible, su influencia en el desempeño del método evaluada mediante una prueba de robustez.

La precisión se refiere al grado de dispersión de los resultados obtenidos por un método analítico. Ésta se puede evaluar a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad consiste en la dispersión de los resultados obtenidos en una corta medida de tiempo, con los mismos analistas, equipos y reactivos. La precisión intermedia nos da una estimación de la variación de los resultados, pero en períodos de tiempo más largos e incluso realizando alguna modificación, como los reactivos o el analista. La reproducibilidad corresponde a la variabilidad entre laboratorios, incluso en distintos países con condiciones ambientales diferentes.

La veracidad es una expresión que corresponde a la cercanía de los resultados obtenidos con el método, realizada infinitas veces, con respecto a un valor de referencia. La forma de estimar la veracidad de un método es mediante el cálculo del sesgo, o mediante el porcentaje de recuperación.

$$R(\%) = (\text{valor promedio obtenido} / \text{valor de referencia}) * 100$$

El valor de referencia puede estar dado por un material de referencia certificado o un material de referencia. En caso de no contar con los anteriores, se pueden utilizar muestras artificiales, el método de adiciones estándar o fortificaciones sobre la muestra, entre otros.

El Vocabulario Internacional de Metrología (VIM), define al material de referencia (RM) como *"material, suficientemente homogéneo y estable con referencia a propiedades especificadas, que se ha establecido para ser apto para su uso previsto en la medición o en el examen de propiedades nominales"*. Mientras que un material de referencia certificado (CRM), es un *"material de referencia acompañado de documentación emitida por un organismo autorizado y que proporcione uno o más valores de propiedad especificados con las incertidumbres y trazabilidades asociadas, utilizando procedimientos válidos"* (VIM, 2020).

En caso de no contar con un CRM o un RM, se pueden realizar fortificaciones (ensayos *"spike-recovery"*) para evaluar la veracidad. Estas consisten en adicionar una cantidad conocida de analito, en la misma especie que se encuentra en una muestra, y con las concentraciones obtenidas, con y sin la adición, calcular el R(%), en donde el valor de referencia será la cantidad exactamente conocida adicionada. Este tipo de estrategia puede ser cuestionada ya que no siempre el agregado de analito se realiza en la misma forma química en la que el mismo se encuentra en la matriz.

La selectividad esta relacionada con el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices, sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar. En general, se puede decir que los métodos analíticos consisten de una etapa de medición, en la que normalmente no se mide la concentración de un analito directamente, sino una propiedad específica (ej.: la intensidad de la luz). Por lo tanto, es crucial establecer que la propiedad medida solo se debe al analito y no a algo química o físicamente similar, causando así un sesgo en el resultado de medición. La selectividad de un método puede ser investigada estudiando su habilidad de medir el analito comparado con otros métodos independientes, de forma de confirmar la identidad. Con este fin se puede utilizar un RM o un CRM, que posea una matriz representativa de la muestra a analizar.

La incertidumbre no es estrictamente un parámetro de desempeño de un método, pero sí de los resultados obtenidos mediante éste. Con la estimación de la incertidumbre es posible expresar los resultados como un intervalo de valores con un nivel de confianza aceptado.

Aunque el método elegido haya sido previamente descrito, se debe cerciorar de que el mismo cumpla con los parámetros requeridos según las condiciones del laboratorio en cuestión. Es decir, que se debe realizar la validación correspondiente.

Si se trabaja con elementos a niveles de concentración de traza, se debe tener especial cuidado con la contaminación. Sus fuentes pueden ser del ambiente, del material de trabajo, de los reactivos y/o las sustancias a utilizar. Al trabajar con elementos traza se recomienda la utilización de material de vidrio previamente descontaminado con ácido nítrico (HNO_3) 10% v/v, la utilización de reactivos puros para análisis y la utilización de agua ultrapura como disolvente.

Según la American Society for Testing and Materials (ASTM), la calidad de agua como reactivo se puede dividir en cuatro categorías, en nuestro caso la ultrapura se encuentra en la categoría tipo I. Esta categoría presenta el grado de pureza máximo y se utiliza en los procedimientos que requieren máxima veracidad y precisión (análisis de trazas, preparación de disoluciones patrón, entre otros). Alguna de las características fisicoquímicas de ella debe ser una resistividad mínima a 25 °C de 18 M Ω .cm, máximo de 50 mg L⁻¹ de carbono total orgánico, valor máximo de cloruro de 1 mg L⁻¹, valor máximo de sodio de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$, entre otras (ASTM, 2018).

1.2.6) Química Analítica Verde

En la actualidad, el conocimiento de aspectos ecológicos ha llevado a muchos químicos analíticos a revisar mejor determinados parámetros críticos en el desarrollo de nuevos métodos, como por ejemplo, el tiempo de operación, la seguridad, la relación volumen/concentración de disolventes y el consumo de energía, entre otros. En este sentido, la Química Analítica Verde es un concepto de

desarrollo sostenible que intenta eliminar o minimizar el impacto ambiental causado por la ejecución de los procesos analíticos (Bendicho et al., 2012).

Los 12 principios de la Química Analítica Verde fueron establecidos por Gałuszka et al. (2013), como una modificación adaptada a la disciplina de los 12 principios originales de la Química Verde establecidos en el año 1998 por Anastas & Warner. Estos se encuentran descriptos en la Tabla 1.9.

Tabla 1.9: Principios de la Química Analítica Verde

1. Aplicación de técnicas analíticas directas de forma de evitar el tratamiento de muestra.
2. Utilización de tamaño reducido y número mínimo de muestras.
3. Realización de mediciones *in situ*, de ser posible.
4. Integración de operaciones y procesos analíticos para la reducción de uso de reactivos y ahorro de energía.
5. Selección de métodos automatizados y miniaturizados.
6. No utilización de la derivatización.
7. Realización de una correcta gestión de residuos generados, en lo posible disminuirlos.
8. Realización de análisis multielemental o multiparamétrico.
9. Reducción del uso de energía.
10. Selección de reactivos obtenidos de fuentes renovables, de ser posible.
11. Eliminación o remplazo de reactivos tóxicos.
12. Minimización del potencial de accidentes químicos, garantizando la seguridad del analista.

Extraído de: Gałuszka et al., 2013.

El número de publicaciones en esta temática ha ascendido notoriamente a lo largo de la última década. A nivel latinoamericano, Brasil, México y Argentina son los países más involucrados, concentrando más del 90% de las publicaciones conteniendo "Química Analítica Verde" o palabras similares como claves (Zuin et al., 2020).

A nivel internacional, en los últimos dos años se han publicado cerca de 200 artículos relacionados, encontrándose el 10% de las publicaciones en la categoría de extracción y preparación de muestras, mayormente dedicadas a materiales y sustancias inorgánicas. Brasil es el país que más publicaciones posee sobre química analítica verde, ubicándose el 80% de los artículos dentro de la categoría extracción y preparación de muestras (Zuin et al., 2020).

No obstante, más allá de desarrollar nuevos métodos alineados con los principios de la Química Analítica Verde, es necesario evaluar si estas alternativas se adecuan en mayor o menor grado respecto a las previamente reportadas o estandarizadas. En ese sentido, Gałuszka et al. (2012), propusieron un mecanismo de evaluación denominado *Analytical Eco-Scale*. El mismo se basa en

seguir los pasos del método desarrollada penalizar con cierta cantidad de puntos, los puntos críticos, en caso de que corresponda. La penalización depende de varios factores: peligrosidad y cantidad de reactivo, cantidad de muestra, como se realizó la toma de la misma, qué técnica se usará, entre otros. El puntaje máximo de la escala es 100 puntos, es decir que al comparar dos métodos, la de mayor puntaje, es la que más se ajusta a los lineamientos de la Química Analítica Verde (Gałuszka et al., 2012). En la Tabla 1.10 se presenta la penalización de puntos según los reactivos, cantidad e instrumentos utilizados.

Tabla 1.10: Penalización según Eco-escala

	Reactivos	Sub-total PP	Total PP
	<10 mL (g)	1	
Cantidad	10 – 100 mL (g)	2	
	>100 mL	3	
	Ninguno	0	Cantidad PP x Peligro PP
Peligro (físico, medioambiental, para la salud)	Peligro poco severo	1	
	Peligro más severo	2	
Instrumentos			
	≤0,1 kWh por muestra		0
Energía	≤1,5 kWh por muestra		1
	>1,5 kWh por muestra		2
Peligro ocupacional	Hermetización del proceso analítico		0
	Emisión de vapores y gases al aire		3
	Ninguno		0
	<1 mL (g)		1
	1 – 10 mL (g)		3
Residuos	> 10 mL (g)		5
	Reciclaje		0
	Degradación		1
	Pasivación		2
	Sin tratamiento		3

Los PP se asignan a cada una de las categorías de peligro que plantea un reactivo. Cada reactivo puede tener más de una categoría de peligro, por lo que el valor subtotal de PP de un solo reactivo puede ser superior a 2. Adaptado de: Gałuszka et al., 2012.

En base a este criterio, se encuentra en esta tesis una sección dedicada al tema para evaluar los métodos utilizados.

2) Hipótesis y justificación

Esta tesis plantea un nuevo desafío en lo que respecta a la preparación de muestras complejas, etapa fundamental del proceso analítico, en este caso aplicado al análisis de carne bovina. Este proceso posee varios grados de complejidad a ser tenidos en cuenta como ser: obtener porciones homogéneas para el análisis (contenido de grasa y fibra de los distintos cortes), realizar un pretratamiento adecuado (en particular el secado, ya que se trata de una muestra con un contenido de agua de aproximadamente 70%), lograr un ataque eficiente que permita la solubilización del tejido biológico, evaluar las escalas de trabajo para la adecuada determinación instrumental, entre otros problemas a resolver. La alternativa aquí estudiada tiene que ver con el uso de las extracciones alcalinas utilizando el compuesto hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) o aminas terciarias, como alternativa a las preparaciones de muestras convencionales basadas generalmente en digestiones ácidas asistidas por microondas.

Se propuso entonces explorar esta alternativa bajo la hipótesis de que la utilización de un reconocido agente "solubilizador de tejidos" como el TMAH sería eficiente para la extracción cuantitativa de todos los elementos traza a estudiar. Este reactivo ha presentado resultados satisfactorios en la extracción cuantitativa de varios elementos en matrices complejas (Aranha et al., 2016; Nunes et al., 2013; Nóbrega et al., 2006; Torres et al., 2016). El uso de TMAH ha sido descrito previamente para la disolución de tejidos animales para la determinación de iones metálicos por espectrometría atómica. Fue informado por primera vez por Murthy et al. para la digestión de muestras de hígado, riñón y pelo de rata (Murthy et al., 1973). Posteriormente, fue informado por Julshamn y Andersen como una alternativa para digerir biopsias de músculos humanos para la determinación de varios metales de transición por espectrometría de absorción atómica electrotrémica (ETAAS) (Julshamn & Andersen, 1979). La solubilización de muestras biológicas con alto contenido de grasa puede realizarse mediante el uso de TMAH, previo a la determinación de diferentes analitos por FAAS, ETAAS, ICP-OES o ICP-MS (Nóbrega et al., 2006). En este contexto, el TMAH se ha aplicado con éxito para realizar extracciones simultáneas de elementos principales, secundarios y traza de muestras de carne (Aranha et al., 2016; Nunes et al., 2011; Nunes et al., 2013).

Asimismo, el TMAH ha sido reportado como un buen disolvente extractor en la determinación de halógenos, en particular de yodo (Jerše et al., 2018; Lehner et al., 2021, Nóbrega et al., 2006). También presentó buenos resultados en la especiación de algunos elementos, principalmente mercurio (Hg) (Krishna & Karunasagar, 2015; Nóbrega et al., 2006).

Sin embargo, en la mayoría de las publicaciones las determinaciones de los analitos se llevaron a cabo en materiales de referencia, pero no en el alimento en sí. Estos materiales se comercializan junto con un certificado de análisis en el que se garantiza, entre otras cosas, la homogeneidad de la muestra y un tamaño de partícula adecuado para el análisis.

El mecanismo de extracción del TMAH está relacionado con la termoquimiólisis (lisis química asistida por calor). De esta forma, cuando se trabaja con el disolvente en forma concentrada, donde el medio de extracción es fuertemente básico, éste es capaz de romper y/o metilar los enlaces éster, amida y algunos éteres a relativamente bajas temperaturas. En estas condiciones, es capaz de romper en forma específica los enlaces C-O de las biomoléculas (De Leeuw & Baas, 1993; Lehtonen et al., 2000; Mckinney et al., 1996).

Los procedimientos de extracción que implican el uso de TMAH suelen ser con calentamiento, donde la temperatura es un factor crítico para tener resultados precisos y se utilizan planchas o baños térmicos. Lo que resulta crítico es que se trabaje siempre con el mismo dispositivo, en condiciones controladas, ya que a diferentes temperaturas se pueden obtener distintos productos de reacción (Batista et al., 2009; Lehtonen et al., 2000; Nunes et al., 2011).

También se encuentran reportados procedimientos donde la extracción con TMAH es asistida con ondas de ultrasonido o microondas (Jerše et al., 2018; Manjusha et al., 2019; Matusiewicz & Golik, 2004). Sin embargo, al igual que con los casos anteriores, estos estudios se realizaron en materiales homogéneos y con tamaños de partícula específicos. En particular, en este trabajo de tesis se estudió la factibilidad de realizar las extracciones con TMAH asistidas por ultrasonido.

En este trabajo de tesis se buscó desarrollar un método que fuera eficiente para la extracción cuantitativa de los seis elementos en estudio en un único procedimiento, en muestras de alimento. En este sentido, el trabajo se enmarcó en las líneas de investigación del Grupo de Análisis de Elementos Traza y Desarrollo de Estrategias Simples para Preparación de Muestras (GATPREM: <https://sites.google.com/site/elemtrazayprepmuestras/>). Este grupo cuenta con vasta experiencia en el tema de preparación de muestras complejas y determinación de elementos traza, minoritarios y mayoritarios, sin embargo, esta experiencia se ha generado básicamente con tratamientos sobre muestras vegetales y leche, por lo que comenzar a trabajar con muestras de carne bovina implicó un nuevo desafío. Dentro del grupo se busca desarrollar tratamientos de muestras que se ajusten lo más posible a los lineamientos de la Química Analítica Verde. Mediante esta propuesta de preparación de muestras, se buscó desarrollar un método que se alineara con los mencionados principios, a la vez que se incursionaba en los denominados "tratamientos alcalinos de muestras complejas".

Dentro de los elementos a determinar, se plantea el estudio de cuatro elementos esenciales y dos potencialmente tóxicos, de forma de evaluar la calidad e inocuidad del alimento. De esta forma se busca aportar información para el sector ganadero sobre los cortes en estudio.

Por otra parte, se plantea realizar un estudio del aporte nutricional de la carne mediante estudios de bioaccesibilidad *in vitro* de Cu y Zn. Si bien existen algunos estudios realizados en carne bovina, en este caso se realizaron sobre cortes de cuadril y asado, que no han sido reportados aún. Esta parte de la tesis se realizó en el marco del Grupo de Bioanalítica y Especiación (BioEsp).

Asimismo, los ensayos de bioaccesibilidad previamente reportados en carnes nacionales fueron realizados en carne cruda, y en este trabajo se agregan estudios sobre muestras de carne cocida (Ramos et al., 2012). Este hecho no es menor, ya que es muy importante realizar estos estudios de la forma mas representativa, es decir, teniendo en cuenta la forma bajo la cual el alimento en cuestión es consumido habitualmente. Considerando la relevancia de éste alimento en nuestro país a nivel no solo económico, sino también cultural, nos planteamos realizar los ensayos utilizando diferentes puntos de cocción, tratando de abarcar las distintas posibilidades de consumo.

Si bien a nivel regional existen estudios previos de bioaccesibilidad de Cu y Zn en carne bovina que evalúan algunas formas de cocción, cabe mencionar que en esta tesis se plantea un estudio diferente, en cuanto a los cortes y puntos de cocción seleccionados respecta (Menezes et al., 2018). El número de muestras fue seleccionado de acuerdo a la disponibilidad de las mismas. De esta forma, los resultados obtenidos sirven para proporcionar una visión general, a modo de ejemplo, desde el punto de vista nutricional y desde el punto de vista de la calidad de la carne bovina como alimento.

3) Objetivos

3.1 Generales

Desarrollar y validar un método analítico para la determinación de elementos esenciales (Cu, Mo y Zn) y potencialmente tóxicos (Cd y Pb) en carne bovina y así evaluar la calidad e inocuidad del alimento.

Realizar un estudio de bioaccesibilidad simulada *in vitro* de los elementos esenciales Cu y Zn, en los distintos cortes evaluados en dos puntos de cocción diferentes, como insumo para evaluar su calidad nutricional.

3.2 Específicos

- ✓ Desarrollar y validar nuevos métodos de preparación de muestras para la determinación de Mo, Cu, Zn, Se, Cd y Pb utilizando hidróxido de tetrametilamonio (TMAH), en dos cortes de carne bovina de consumo popular, mediante la técnica de Espectrometría Atómica.
- ✓ Determinar Mo, Cu, Zn, Se, Cd y Pb en muestras de asado y cuadril (materia prima cruda) cuya trazabilidad al animal y al sitio de cría esté garantizada. Evaluar si existen diferencias significativas en el contenido de estos metales en los diferentes cortes.
- ✓ Comparar el método propuesto con un método de digestión total, tanto desde el punto de vista estadístico de los resultados obtenidos, como desde el punto de vista de la Química Verde.
- ✓ Evaluar los niveles de micronutrientes esenciales y valores basales, así como la inocuidad del alimento desde el punto de vista del contenido de contaminantes inorgánicos Cd y Pb.
- ✓ Realizar estudios de bioaccesibilidad simulada *in vitro* de Cu y Zn en las muestras de asado y cuadril, a dos puntos de cocción diferentes, y comparar con los respectivos valores de Ingesta Dietaria de Referencia.

4) Parte experimental

En este capítulo se listan los materiales, reactivos, equipos e insumos utilizados en este trabajo de tesis. Se describen también los métodos de muestreo, las operaciones preliminares y los tratamientos de muestra evaluados y desarrollados, así como las condiciones instrumentales y procedimientos de validación de los métodos estudiadas.

4.1 Materiales, reactivos e insumos

- ✓ Hidróxido de tetrametilamonio 25% m/v en metanol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- ✓ Agua ultrapura de resistividad 18,2 MΩ.cm (ASTM Tipo I) obtenida de un sistema de purificación de agua Millipore™ DirectQ3 UV (Milli-Q®, Millipore, Bedford, MA, EUA).
- ✓ Material de referencia certificado de Músculo bovino ERM-BB184 (Humedad: 0,814 ± 0,021 %) (LGC Standards, Geel, Bélgica).
- ✓ Material de referencia certificado de Hígado bovino NIST 1577c (Gaithersburg, MD, EUA).
- ✓ Material de referencia de Hígado Bovino RM-Agro E3001a (Humedad: 7,523 ± 0,031 %) (donación de Embrapa, Brasil).
- ✓ Material de referencia de Hepatopancreas de langosta NRC TORT-2 (Research Council, Ottawa, Canadá)
- ✓ Disoluciones patrón para absorción atómica de 1000 mg L⁻¹ de Cd (Merck, Darmstadt, Alemania; Ultra Scientific, North Kingstown, RI, EUA), Zn (Fluka, NY, EUA), Cu (Fluka, NY, EUA), Pb (LGC Standards, Teddington, England; Merck, Darmstadt, Alemania), Se (SCP Science, Quebec, Canadá), Mo (Carlo Erba, MI, Italia), Ga, Ge, Y y Pd (Spectrosol, Leicestershire, England).

Todos los reactivos listados a continuación fueron de calidad analítica o superior.

- ✓ Nitrato de paladio (Pd(NO₃)₂) (Merck, Darmstadt, Alemania).
- ✓ Nitrato de magnesio (MgNO₃) (Merck, Darmstadt, Alemania).
- ✓ Ácido nítrico (HNO₃) 65% (Merck, Darmstadt, Alemania).
- ✓ Ácido nítrico (HNO₃) ultrapuro obtenido de un sistema de destilación de cuarzo subboiling Milestone duoPUR (Milestone, Sorisole, Italia).
- ✓ Ácido clorhídrico (HCl) 37% (Merck, Darmstadt, Alemania).

- ✓ Hidróxido de sodio (NaOH) (J.T. Baker, Fisher Scientific, MA, EUA).
- ✓ Ácido sulfámico (H_3NSO_3) (Biopack, Buenos Aires, Argentina).
- ✓ Tetrahidroborato de sodio (NaBH_4) 99,2% (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- ✓ Molibdato de amonio ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Carlos Erba, MI, Italia).
- ✓ Dihidrógeno fosfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- ✓ Enzimas digestivas: Pepsina, Pancreatina y Sales biliares (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).
- ✓ Tubos de polipropileno de 15 mL Falcon® (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).
- ✓ Tubos de vidrio de 15 mL tipo Pyrex®.
- ✓ Lámparas de cátodo hueco marca Lumina® de Cu y Zn (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA).
- ✓ Lámpara de cátodo hueco de Mo y Pb (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).
- ✓ Lámparas de descarga sin electrodos de Cd y Se (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA).
- ✓ Tubos de grafito recubierto pirolíticamente (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).
- ✓ Tubos de grafito recubierto pirolíticamente con plataforma L'Vov (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA).
- ✓ Argón de alta pureza 99,998% (Praxair, Montevideo, Uruguay).
- ✓ Filtros tamaño de poro de 0,45 μm (Merck, Darmstadt, Alemania).
- ✓ Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) 30% (Biopack, Buenos Aires, Argentina).
- ✓ Argón de alta pureza 99,999% (White Martins-Praxair, Sao Paulo, Brasil).
- ✓ Nitrógeno de alta pureza 99,99% (Praxair, Montevideo, Uruguay).

4.2 Equipos

- ✓ Módulo de generación de hidruros en batch modelo MH15 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA).
- ✓ Espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito Thermo Scientific iCE 3500 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).
- ✓ Digestor de microondas CEM Mars 6 provisto con vasos de reacción de 100 mL Easy Prep Plus® (CEM, Matthews, NC, EUA).
- ✓ Baño de ultrasonido Cole-Parmer 8893 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EUA).

- ✓ Centrifuga Luiguimac LC-15 (Luiguimac, Buenos Aires, Argentina).
- ✓ Vórtex Qilinbeier-5 (Qilinbeier, Hangzhou, China).
- ✓ Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente, Agilent Technologies 7800 (Agilent Technologies, Tokyo, Japón) (Figura 4.1).
- ✓ Espectrómetro de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente Thermo Scientific iCAP 7000 series (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) (Figura 4.2).
- ✓ Espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 200 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA) (Figura 4.3).
- ✓ Sistema de digestión asistida con microondas Ultrawave Milestone (Milestone, Sorisole, Italia).
- ✓ Módulo de horno grafito HGA 900 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA) (Figura 4.4).
- ✓ Electrodo de vidrio (pH – metro) Orion Versastar (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).
- ✓ Motor vibrador electrónico IKA-VIBRAX-VXR (Janke y Kunkel, Breisgau, Alemania).
- ✓ Agitador magnético con plancha calefactora Thermolyne Nuova (Merck, Darmstadt, Alemania).
- ✓ Balanza analítica Shimadzu modelo AUX 220 (Shimadzu, Kyoto, Japón).
- ✓ Baño de agua termostatzado Daihan Scientific WB-11 (Seúl, Corea del Sur).



Figura 4.1: Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), Agilent Technologies 7800.



Figura 4.2: Espectrómetro de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) Thermo Scientific iCAP 7000 series .



Figura 4.3: Espectrómetro de absorción atómica con módulo de horno grafito (Perkin Elmer).



Figura 4.4: Sistema de digestión asistida con microondas Ultrawave Milestone.

4.3 Muestreo y operaciones preliminares

El proceso de muestreo en frigorífico fue realizado bajo la supervisión de personal de INAC por parte los operadores del mismo frigorífico (Pando). Las muestras que fueron proporcionadas por INAC, están registradas bajo un Sistema Electrónico de Información de la Industria Cárnica (SEIIC). A su vez, éste se encuentra ligado al Sistema Nacional de Identificación Ganadera (SNIG) garantizando así la trazabilidad de todo el proceso de muestreo. La edad media de los animales fue de 25 meses con un peso promedio de 139 kg, procedentes de los departamentos de Soriano, Lavalleja y Florida, principalmente. La raza analizada correspondió a la Hereford. La selección de muestras fue realizada por parte de INAC (Pistón et al., 2020a).

Se nos informó que durante el desosado se bajaron los cortes y se retiraron de la línea de producción junto a la etiqueta de trazabilidad. Se les extrajo una porción de aproximadamente 500 g de asado (centro de la parrilla costal) y cuadril (bíceps femoral), que se etiquetaron, se envasaron al vacío y se transportaron en conservadoras refrigeradas a la Facultad de Química. Las muestras de asado se prepararon a partir de la placa costal limitada dorsalmente por *M. longissimus dorsi* y ventralmente por los cartílagos costoesternal y costocondral, mientras que las muestras de cuadril consistieron en un corte de la grupa basado en el cóccix y las hemivértebras sacras (porción superior de los glúteos medio, accesorio y profundo) (ver Figura 1.3). En el laboratorio de Química Analítica se realizó el deshuesado y desgrasado, utilizando cuchillos de acero inoxidable. Se dividió cada corte en 3 porciones de aproximadamente 100 g. Una de las porciones se analizó cruda, y las otras dos se sometieron a diferentes puntos de cocción previo a ser analizadas para evaluación de bioaccesibilidad de algunos elementos (ver Sección 4.6.1). Finalmente, las muestras se homogenizaron y trituraron con una procesadora de cuchillas de acero inoxidable 440C y fueron almacenadas en tubos de polipropileno a -18 °C (Figuras 4.5 y 4.6).



Figura 4.5: Muestra tratada con molino de cuchillas.



Figura 4.6: Muestra procesada.

Posteriormente, se realizó el secado de las muestras según el método AOAC 950.46 (AOAC, 2019) utilizando estufa a 105 °C durante 15 horas para obtener el producto seco y el contenido de humedad. Las muestras secas fueron molidas hasta obtener un polvo fino con molino de cuchillas y se almacenaron en tubos de polipropileno a temperatura ambiente (Pistón et al., 2020a). Los análisis de la determinación del contenido total de los analitos se realizaron sobre las muestras secas crudas, mientras que en los ensayos de bioaccesibilidad se utilizaron las muestras en base fresca cocidas (ver Sección 4.6). Cabe mencionar que no hubo evidencia alguna de contaminación debido al uso de cuchillo y cuchillas del molino de acero inoxidable según se verifica en la sección de resultados y discusión en base a las cifras de mérito obtenidas. En la Tabla 4.1 se presentan la cantidad de muestras utilizadas en esta tesis, según su análisis.

Tabla 4.1: Resumen del trabajo experimental y número de muestras analizadas

Elemento	Técnica analítica utilizada	Corte de carne en estudio	Muestra	Número de porciones de muestras	Animales
Cu y Zn	FAAS	Asado Cuadril	Cruda	20 20	20
Mo y Cd	ETAAS	Asado Cuadril	Cruda	5 5	5
Mo y Se	ICP-MS	Asado	Cruda	12	12
Cu y Zn (en el estudio de fracción bioaccesible)	FAAS (Zn) ETAAS (Cu)	Asado Cuadril	Poco Cocida	14 14	14
		Asado Cuadril	Muy cocida	14 14	14

4.4 Extracción alcalina

Esta sección presenta los procedimientos realizados para el desarrollo de un método distinta a las tradicionales de preparación de muestras: la extracción de los analitos de interés mediante el uso del reactivo alcalino TMAH. Se desarrollan varias alternativas ya que se evaluaron diferentes formas de realizar dicha extracción. Además, se describen ajustes de la extracción realizada durante una pasantía en Brasil, que también contribuyeron al conocimiento y a evaluar el desempeño del método bajo diferentes condiciones, para su adecuación a las facilidades de ese laboratorio.

4.4.1) Optimización del proceso de extracción alcalina utilizando baño térmico

En primer lugar se realizó la optimización de la extracción asistida por calentamiento en baño de agua termostatzado. Para obtener las condiciones adecuadas de extracción, se procedió a realizar un diseño experimental multivariado de tipo central compuesto de tres variables a cinco niveles (Massart et al., 1997). Las variables evaluadas fueron: la concentración de TMAH, la temperatura del agua del baño y el tiempo de extracción. En la Tabla 4.2 se presentan las condiciones ensayadas para el diseño experimental. En todos los casos se realizó la agitación con vórtex durante un minuto antes de colocar las muestras en el baño de agua y nuevamente cuando se cumplía la mitad del tiempo de calentamiento, según el experimento. La evaluación de la eficiencia de la extracción se realizó mediante un estudio de veracidad, es decir, la comparación entre la concentración obtenida con el método propuesto y el valor certificado en el CRM de músculo bovino. Este material tiene un tamaño de partícula de menor a 150 μm . Esta evaluación se realizó tomando como respuesta el R(%).

Tabla 4.2: Diseño experimental central compuesto

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volumen TMAH (mL)	0,25	0,75	0,25	0,75	0,5	0,5	0,25	0,75	0,25	0,75
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	50	50	50	50	60	60	70	70	70	70
Tiempo (min)	45	45	75	75	60	60	45	45	75	75

No obstante, fue necesaria la realización de un segundo diseño experimental, ya que los resultados obtenidos del primero no resultaron adecuados para los fines propuestos (ver Sección 5.1.1). El segundo diseño experimental también fue de tipo central compuesto con 2 variables a tres niveles: concentración de TMAH y temperatura de extracción, mientras que la variable tiempo se mantuvo en 60 minutos. En todos los casos, las muestras de carne seca se pulverizaron hasta llegar a un material homogéneo, el cual fue tamizado con tamiz de tamaño de poro de 250 μm .

Posteriormente se realizó la agitación con vórtex antes de colocar las muestras en el baño de agua y luego de transcurrido la mitad del tiempo de calentamiento se vuelve a agitar. En la Tabla 4.3 se presentan las condiciones de este segundo experimento.

Tabla 4.3: Condiciones del segundo diseño experimental

Experimento	1	2	3	4	5	6
Volumen de TMAH (mL)	0,75	1,5	1	1	0,75	1,5
Temperatura (°C)	75	75	80	80	85	85

En la Figura 4.7 se presenta el sistema que se utilizó para el tratamiento alcalino en la etapa de optimización y luego en las muestras.



Figura 4.7: Tratamiento alcalino de las muestras en baño térmico.

4.4.2) Extracción alcalina asistida con ondas de ultrasonido

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de extracción con TMAH en baño térmico, se propuso una nueva estrategia de preparación de las muestras, que previamente había mostrado resultados satisfactorios con otras matrices (Matusiewicz & Golik, 2004). Dicha preparación también utilizó TMAH, pero en este caso la extracción fue asistida por ondas de ultrasonido. En esta oportunidad, se utilizaron dos RM de hígado bovino, un CRM de músculo bovino y muestras de cuadril. Estas pruebas fueron realizadas de la siguiente manera: 0,25 g de muestra seca y pulverizada, a la que se le agregó 1,50 mL de TMAH 25% m/v junto con 5,00 mL de agua ultrapura. Luego, se sometieron a 60, 30 y 15 minutos de sonicado en baño de ultrasonido a una frecuencia de 47 kHz. La eficiencia de la extracción se evaluó utilizando el mismo parámetro ya explicado R(%). En el caso del CRM y RM se comparó con los valores certificados y de referencia respectivamente, mientras que en el caso de las muestras de cuadril se comparó con los valores obtenidos a partir del método considerado como de referencia ya que conduce a una digestión total (digestión ácida asistida por microondas).

4.4.3) Extracción alcalina utilizando bloque térmico

Esta extracción fue realizada en el marco de una pasantía, donde fue necesario realizar adecuaciones dadas las instalaciones del laboratorio. La misma se llevó a cabo en la Universidad Federal de San Carlos, en el Grupo Análisis Intrínseca Aplicada (GAIA) bajo la orientación del Dr. Prof. Joaquim A. Nóbrega. Se realizó en esta instancia el procedimiento que fuera optimizado durante la extracción asistida por calor con baño térmico, pero adaptada a las condiciones del laboratorio. Se evaluó la extracción utilizando un RM de hígado bovino y los respectivos R(%). Para ello se pesaron 0,25 g de muestra seca y pulverizada, y se colocaron en los tubos del bloque digestor con adición de 5,00 mL de agua y se homogenizó con vórtex durante 30 segundos. Se adicionó 1,50 mL de TMAH 25% m/v en metanol y se homogenizó nuevamente durante otros 30 segundos. Las muestras fueron colocadas en el bloque digestor con sus respectivas tapas, para favorecer el reflujó y evitar posibles contaminaciones desde al ambiente. Las mismas permanecieron durante 30 minutos a 85 °C, transcurrido el tiempo fueron homogenizadas por segunda vez con vórtex en caliente y se colocaron nuevamente en bloque digestor hasta completar los 60 minutos de calentamiento total. Se dejó enfriar la disolución y se trasvasó completando con agua ultrapura a 10,00 mL. Luego se centrifugó a 28000g durante 30 minutos y se filtró utilizando filtros de 0,45 µm en bomba de vacío. Al igual que con el resto de las extracciones, se analizó directamente el sobrenadante obtenido en cada caso. En la Figura 4.8 se puede visualizar esta extracción. El dispositivo cuenta con 18 posiciones, con lo cual se pueden analizar hasta seis muestras por triplicado en una misma extracción.



Figura 4.8: Tratamiento alcalino asistido por calentamiento en bloque térmico.

4.4.4) Condiciones instrumentales y validación

Las determinaciones de Cu y Zn se realizaron mediante espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS). Se trabajó con un espectrómetro Perkin Elmer AAnalyst 200, operando a las longitudes de onda de 213,86 nm (Zn) y 324,75 nm (Cu) respectivamente. Las lámparas de cátodo hueco fueron utilizadas según lo recomendado por el fabricante. Se utilizó un quemador de 10 cm. La composición de la llama fue acetileno ($2,5 \text{ L min}^{-1}$) – aire ($10,0 \text{ L min}^{-1}$) (Iaquinta et al., 2021).

Las determinaciones de Mo, Cd y Pb fueron realizadas mediante ETAAS utilizando un espectrómetro de absorción atómica Thermo Scientific iCE 3500. Para la determinación de Mo se empleó la longitud de onda de 313,3 nm. La señal analítica utilizada para este elemento fue la absorbancia (altura de pico), ya que al trabajar con elementos refractarios la señal analítica puede no alcanzar la línea de base. Esto puede observarse debido a que al emplear esta técnica, se obtiene un perfil de temperatura a lo largo del tubo de grafito, lo cual lleva a que los analitos y los concomitantes puedan condensar sobre los extremos más fríos. Esto conduce al conocido efecto *tailing* o efecto cola, de la señal analítica y al efecto memoria observado para elementos refractarios y formadores de carburos (Welz & Sperling, 1999).

Para Cd se utilizó una longitud de onda de 226,5 nm y para Pb de 283,4 nm, en ambos casos se utilizó la absorbancia integrada (área de pico) como señal analítica para su cuantificación. En las tres determinaciones, el argón se utilizó como gas de purga y protección a un caudal de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, excepto durante la etapa de atomización y corrector Zeeman. Las temperaturas de pirólisis y atomización debieron ser optimizadas para los tres analitos. Finalmente, se presentan en la Tabla 4.4 las que se utilizaron para la validación y análisis de las muestras, así como los modificadores de matriz (Iaquinta et al., 2021).

Tabla 4.4: Condiciones para la determinación mediante ETAAS

Elemento	T pirólisis (°C)	T atomización (°C)	Modificador químico
Mo	1800	2750	5µg de Pd(NO ₃) ₂
Cd	700	1800	20µg de Pd(NO ₃) ₂ + 30µg de (NH ₄)H ₂ PO ₄
Pb	750	1050	15µg de Mg(NO ₃) ₂ + 50µg de (NH ₄)H ₂ PO ₄

También, se realizaron las determinaciones de Cu, Zn y Mo mediante ICP-OES, con el objetivo de comparar los resultados obtenidos, una vez realizada la extracción alcalina, en el marco de la pasantía en San Carlos. Esto fue una posibilidad muy valiosa de acceder a equipamiento no

disponible en nuestro laboratorio en Uruguay y capacitación en el marco de la tesis en tópicos de espectrometría atómica. Las líneas utilizadas fueron la correspondientes a 213,856 nm (Zn), 324,754 nm (Cu) y 204,598 nm (Mo).

Luego de optimizadas las condiciones de medida para las determinaciones por ETAAS, FAAS e ICP-OES, se llevaron a cabo las validaciones correspondientes. Los parámetros de desempeño o cifras de mérito evaluadas, consideradas de relevancia en esta etapa, fueron: linealidad, LD, LC, robustez, precisión (repetibilidad), veracidad, selectividad e incertidumbre. Se utilizó como referencia la guía Eurachem (Magnusson & Örnemark, 2014).

La linealidad se evaluó mediante inspección visual y coeficiente de determinación (R^2). Los límites de detección se evaluaron mediante la medida de 10 blancos y calculando la desviación estándar de los mismos. En el caso de LD el criterio fue $3s_b/m$ y para el LC $10s_b/m$, donde s_b es la desviación estándar y m la pendiente de la curva de calibración correspondiente. La robustez fue evaluada mediante un diseño experimental multivariado de tipo central compuesto, de dos variables a cinco niveles. La precisión fue evaluada como desviación estándar relativa: $RSD(\%) = (\text{desviación estándar de 6 muestras}/\text{valor promedio}) * 100$. La veracidad fue evaluada mediante los porcentajes de recuperación obtenidos para cada elemento, luego del análisis de los respectivos materiales de referencia: $R(\%) = (\text{valor obtenido}/\text{valor de referencia}) * 100$. Para Mo, Cd y Pb se utilizó el RM de hígado bovino y muestras adicionadas a dos niveles de concentración, uno en el tercio inferior de la curva de calibración y otro en el tercio superior, mientras que para Cu y Zn se utilizó el CRM de músculo bovino. La selectividad fue estudiada mediante la comparación de los valores obtenidos para los materiales de referencia mediante dos métodos independientes. La incertidumbre fue evaluada como incertidumbre estándar, expresada como desviación estándar.

El blanco y los patrones de las curvas de calibración se realizaron en medio básico, utilizando las mismas condiciones que las muestras. Una vez verificado un rango lineal adecuado para los fines propuestos, se continuó trabajando con dos patrones, uno que correspondía a la concentración máxima y otro a la mitad del rango. En la Tabla 4.5 se presentan las condiciones de las curvas de calibración para cada elemento. En todos los casos, se partió de una disolución patrón de 1000 mg L^{-1} .

Tabla 4.5: Condiciones de calibración

Elemento	Cu	Zn	Mo	Cd	Pb
Medio alcalino	3,75 % m/v de TMAH	1,25 % m/v de TMAH	3,75 % m/v de TMAH	2,5 % m/v de TMAH	3,75 % m/v de TMAH
Patrón más concentrado	1,0 mg L ⁻¹	1,2 mg L ⁻¹	60,00 µg L ⁻¹	4,00 µg L ⁻¹	10,00 µg L ⁻¹
Técnica	FAAS	FAAS	ETAAS	ETAAS	ETAAS

Concentración patrón de TMAH: 25% m/v en metanol, el medio alcalino se obtiene por diluciones adecuadas del reactivo patrón.

4.4.5) Aplicación al análisis de muestras de carne bovina

Una vez concluida la optimización y validación, se procedió a la determinación de los analitos en las muestras de carne disponibles a partir del proyecto de investigación con INAC, en base seca. El procedimiento final consistió en 0,25 g de muestra, 5,00 mL de agua ultrapura, 1,50 mL de TMAH 25% (m/v) en metanol y 60 minutos en baño de agua a 85 °C.

Las determinaciones de los analitos en las muestras se realizaron por duplicado en todos los casos, junto con los correspondientes blancos para cada procedimiento. Se analizaron un total de 20 muestras de asado crudo y 20 de cuadril crudo, para las determinaciones de Cu y Zn. Cada muestra provino de un animal diferente. Para las determinaciones de Mo y Cd mediante ETAAS, se analizaron 5 muestras de cada corte.

Con el objetivo de evaluar la veracidad del método propuesto, se realizó también un estudio estadístico. De esta forma, se evaluó si los resultados de las medias poblacionales obtenidas mediante digestión total asistida por microondas y el método propuesto, eran estadísticamente iguales. Para ello se realizó una prueba *t* de Student, para Cu, Zn y Mo que fueron los elementos que se logró determinar de forma adecuada con este método (Miller & Miller, 2010).

4.5 Digestiones ácidas

En esta sección se presentan los métodos de digestión ácida asistida por microondas utilizados para la preparación de las muestras durante el trabajo de tesis. Estos fueron considerados como métodos de referencia a la hora de realizar las comparaciones estadísticas. Se trata de una digestión total de la muestra con reconocida eficiencia para la determinación de elementos traza en alimentos. Se muestran dos digestiones diferentes, ya que una de ellas corresponde a la realizada en el marco de la pasantía. Ambas igualmente eficientes, solo que se realizaron en laboratorios diferentes y se trabajó por ello con diferentes equipos.

4.5.1) Digestión asistida con microondas

La digestión realizada en Uruguay, consistió en 0,5 g de muestra en base seca, a los que se le agregaron 10,00 mL de HNO_3 4,5 mol L^{-1} . El programa de digestión utilizado fue: 15 minutos de calentamiento hasta 200 °C, con mantenimiento a 200 °C durante 15 minutos y posterior enfriamiento hasta temperatura ambiente. La potencia del programa varió entre 400 y 1800 W (Pistón et al, 2020b).

Las digestiones realizadas en Brasil, se llevaron a cabo utilizando un sistema de microondas UltraWAVE® basado en el diseño de cámara de reacción única (SRC). Este sistema tiene una fuente de energía de microondas de 1500 W que distribuye la energía de microondas a una cámara de 1 L. El control directo de presión y temperatura de la cámara proporciona un control directo de cada muestra. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando una rejilla con 15 recipientes de TFM™ (marca registrada de politetrafluoroetileno, PTFE) de 15 mL de capacidad. En la cámara se introdujeron 150,00 mL de agua ultrapura y 5,00 mL de HNO_3 14 mol L^{-1} , luego se presurizó a 40 bar con nitrógeno (Barros et al, 2018).

La secuencia de digestión consistió en pesar exactamente 0,1 g de muestra en base seca, y adicionar 4,00 mL de HNO_3 2 mol L^{-1} junto con 1,50 mL de H_2O_2 en los vasos correspondientes al sistema de digestión. El programa utilizado se encuentra en la Tabla 4.6. Todos los pasos se realizaron a 1500 W y la presión máxima se fijó en 120 bar. Después de enfriar hasta 60 °C, se despresurizó la cámara y se llevó a un volumen de 10,00 mL con agua ultrapura.

Tabla 4.6: Programa de digestión utilizado

Temperatura (°C)	Presión (bar)	Rampa (min)	Holding (min)	Potencia (kW)
150	110	10	2	1,5
230	110	15	10	1,5

4.5.2) Condiciones instrumentales y validación

Las determinaciones de los analitos Cu, Zn y Se fueron realizadas luego de la digestión clásica con un digestor de microondas como ya fue explicado anteriormente. En el caso de Cu y Zn las determinaciones se realizaron mediante MIP OES, mientras que el Se se determinó mediante HG-MIP OES. Los valores de concentración obtenidos, mediante estas técnicas, fueron utilizados para comparaciones con los datos obtenidos mediante el método desarrollado en la tesis. En el Anexo I se presentan las condiciones de trabajo y parámetros de desempeño de los métodos utilizando MIP OES y HG-MIP OES que no formaron parte del trabajo de la tesis, solo el uso de los resultados para las comparaciones como fuera explicado (Pistón et al., 2020a; Pistón et al., 2020b).

La optimización y posterior validación de los métodos correspondientes a la determinación de Mo y Cd mediante ETAAS, sí fueron realizadas completamente en este trabajo de tesis, de forma de poder comparar los resultados con el método propuesto. Se optimizaron las temperaturas de pirólisis y atomización, y se evaluó el uso de modificadores. Finalmente, en la Tabla 4.7, se presentan las condiciones en las cuales se realizó la validación y el análisis de las muestras. La señal analítica utilizada para el Mo fue la absorbancia (altura de pico), mientras que para el Cd fue la absorbancia integrada (área de pico). En ambos casos se utilizó el corrector de fondo Zeeman. Una vez verificada la linealidad se realizaron las curvas de calibración utilizando HNO₃ 0,1% v/v como disolvente. A partir de la disolución patrón de Cd de 1000 mg L⁻¹, se preparó una disolución intermedia de 100 µg L⁻¹ y luego el patrón más concentrado de la curva de 4,0 µg L⁻¹. En el caso de Mo se preparó una disolución patrón de aproximadamente 1000 mg L⁻¹ utilizando la sal (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, a partir del cual se realizó una disolución intermedia de 10 mg L⁻¹, y luego el patrón más concentrado de la curva de 60,0 µg L⁻¹. En ambos casos el patrón de mitad de curva fue preparado automáticamente por el equipo y el blanco fue el propio diluyente (HNO₃ 1%v/v).

Tabla 4.7: Condiciones de determinación de Cd y Mo mediante ETAAS

Elemento	λ (nm)	T pirólisis (°C)	T atomización (°C)	Modificador químico
Mo	204,6	1800	2750	5 µg de Pd(NO ₃) ₂
Cd	226,5	500	1400	5 µg de Pd(NO ₃) ₂

Por otra parte, las determinaciones de los elementos utilizando la digestión con el digestor Ultrawave[®] se realizaron mediante ICP-MS en Brasil. En esta oportunidad los elementos analizados fueron Se, Mo, Cd y Pb. Se trabajó en el modo *high matrix introduction* (HMI) que implica que el aerosol se diluyó con argón a la velocidad de flujo de gas HMI optimizada de 0,62 L min⁻¹ y caudal de gas portador de 0,40 L min⁻¹, siendo 1,02 L min⁻¹ el caudal total (Barros et al., 2018). Las condiciones de funcionamiento del plasma utilizadas se muestran en el Anexo II. Los isótopos monitoreados como patrones internos fueron ⁶⁹Ga⁺, ⁷⁰Ge⁺, ⁸⁹Y⁺ y ¹⁰⁴Pd⁺. Finalmente, el patrón interno utilizado fue ⁸⁹Y⁺ y los isótopos de los analitos ⁸²Se, ⁹⁶Mo, ¹¹²Cd, ²⁰⁹Pb. Si bien se evaluó el uso de He en la celda de colisión, los mejores resultados fueron sin el uso del gas.

Luego de optimizadas las condiciones de medida para las determinaciones mediante ETAAS e ICP-MS, se realizaron las validaciones correspondientes. El procedimiento de validación se realizó utilizando como referencia la guía Eurachem (Magnusson & Örnemark, 2014). Los parámetros de desempeño evaluados fueron: linealidad, LD y LC, precisión (repetibilidad), veracidad, selectividad e incertidumbre. Los mismos se evaluaron de igual forma que en la Sección 4.4.4. No se evaluó la

robustez en esta etapa, puesto que ya había sido estudiada exhaustivamente durante la etapa de optimización de la extracción.

Se analizaron un total de 10 muestras (5 de cuadril y 5 de asado) en las determinaciones de Cd y Mo mediante ETAAS y un total de 12 en la determinación de Se, Mo, Pb y Cd mediante ICP-MS. Todas las muestras se realizaron por triplicado en todos los casos, acompañadas de sus respectivos blancos de digestión, según el procedimiento realizado.

4.6 Bioaccesibilidad

En esta sección se describen los procedimientos realizados para la determinación de bioaccesibilidad *in vitro* de Cu y Zn en las muestras de carne disponibles. Estos ensayos fueron realizados en los cortes de carne estudiados (asado y cuadril) de las muestras disponibles a partir del proyecto con INAC, pero en este caso se estudió la bioaccesibilidad con el alimento cocido en dos puntos distintos. Se analizaron un total de 14 muestras de asado muy cocidas y 14 del mismo corte poco cocidas, 14 muestras de cuadril muy cocidas y del mismo corte 14 poco cocidas.

4.6.1) Cocción

El estudio se realizó en muestras cocidas de asado y cuadril en dos puntos de cocción diferentes, de forma de evaluar si la cocción del alimento pudiera afectar la bioaccesibilidad de los nutrientes estudiados. El proceso de cocción fue llevado adelante por un chef que colaboró en el proyecto general y fue quien sistematizó el mismo (Pistón et al, 2020a, 2020b). Para esta tesis se contó con las muestras ya cocidas. Este proceso consistió primeramente en un sellado del corte en una plancha de cocina hasta alcanzar una determinada temperatura en el centro del corte (monitoreado con una termocupla) y luego se terminaba la cocción en horno eléctrico. En la Tabla 4.8 se presentan las temperaturas alcanzadas en estos procesos. Las diferentes temperaturas definen dos puntos de cocción que fueron clasificados como "poco cocido" y "muy cocido" (Pistón, et al., 2020). Existen varios otros puntos definidos de cocción, pero se tomaron estos dos bien diferentes entre sí para este trabajo en particular.

Tabla 4.8: Temperaturas alcanzadas en los procesos de cocción

Corte	Punto de cocción	Tiempo en plancha (min)	Tiempo en el horno (min)	Temperatura al sacar del horno (°C)	Tiempo total de cocción (min)
Asado	PC	4	5	60	9
	MC	8	14	98	22
Cuadril	PC	8	12	65	20
	MC	12	28	83	40

PC: poco cocido (jugoso); MC: muy cocido.

4.6.2) Optimización y validación

En este tipo de ensayos es importante utilizar procedimientos que simulen de forma fiel lo que ocurre a nivel biológico. Por este motivo, se realizaron ajustes al protocolo de INFOGEST, con el objetivo de obtener resultados reproducibles y confiables. Este procedimiento *in vitro* ha sido obtenido por consenso internacional por la red COST INFOGEST (INFOGEST, 2019).

El procedimiento optimizado consistió en una primera extracción de los elementos de interés de la muestra durante 2 horas, utilizando una disolución gástrica simulada conteniendo pepsina y HCl. Esta disolución se preparó a partir de 0,3 g de pepsina disuelta en 1,00 mL de HCl 12 mol L⁻¹ y llevando a 100,00 mL con agua ultrapura se realizó el ajuste de pH con NaHCO₃ 3 % m/v hasta llegar a pH 1,3 (Machado et al., 2017 INFOGEST, 2019).

Luego, se realizó una segunda extracción durante 2 horas más en presencia de disolución intestinal simulada, conteniendo pancreatina, sales biliares y NaOH. Esta disolución se preparó colocando 0,2 g de sales biliares y 0,5 g de pancreatina junto con 8,00 mL de NaOH 0,2 mol L⁻¹. Luego se completó hasta 100,00 mL con agua ultrapura y se le realizó el ajuste de pH con HCl 0,1 mol L⁻¹ hasta llegar a pH 6,8.

Ambas extracciones se realizaron a una temperatura constante de 37 °C con agitación continua, simulando las condiciones fisiológicas humanas (Ramos et al., 2012; Machado et al., 2017). Luego se realizó una centrifugación a 28000g durante 30 minutos y se separó la fracción bioaccesible (sobrenadante) del precipitado (residuo).

Para evaluar la veracidad del estudio, los residuos obtenidos luego del proceso de simulación de la digestión gastrointestinal fueron tratados mediante digestión ácida asistida por microondas, de forma de establecer el balance de masa (BM) correspondiente (Machado et al., 2017 INFOGEST, 2019).

$BM(\%) = \{[\text{Fracción del analito en la digestión gastrointestinal simulada (mg kg}^{-1}) + \text{fracción del analito en el residuo (mg kg}^{-1})] / \text{Concentración total del analito en la muestra (mg kg}^{-1})\} \times 100.$

La concentración total de ambos analitos en las muestras previamente cocidas, se determinaron por el grupo de investigación en paralelo a esta tesis. La digestión utilizada corresponde a la realizada en la Sección 4.5.1 y su determinación fue realizada mediante MIP OES. En el Anexo I se presentan las condiciones de medida (Pistón et al., 2020b).

4.6.3) Digestión ácida de los residuos

Considerando que fundamentalmente el Zn se encuentra de forma ubicua en los ambientes de trabajo a niveles elevados, y que la validación de estos ensayos está dada por la suma de las fracciones bioaccesibles y sus residuos, es necesario garantizar una adecuada descontaminación del material de laboratorio. Por este motivo, antes de realizar la digestión de los residuos, se sometió a los vasos de reacción a un programa de limpieza. En este caso particular, se agregaron 10,00 mL de HNO₃ y se aplicó una rampa de 15 minutos hasta alcanzar 180 °C, se mantuvo dicha temperatura durante 15 minutos, dejando luego enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente.

Finalmente, la digestión de los residuos consistió en agregar 10,00 mL de HNO₃ 4,2 mol L⁻¹ al precipitado remanente luego de la centrifugación. Se utilizó el siguiente programa de digestión: 15 minutos de calentamiento hasta 200 °C, mantenimiento a 200 °C durante 15 minutos y posterior enfriamiento hasta alcanzar temperatura ambiente. La potencia del programa varió entre 400 y 1800 W.

4.6.4) Condiciones instrumentales

Las determinaciones de Zn en las fracciones bioaccesibles y en los residuos, se realizaron mediante FAAS, tal como se describe en la Sección 4.4.4.

Las determinaciones de Cu en las fracciones bioaccesibles y en los residuos, se realizaron mediante ETAAS. Se utilizó el espectrómetro Perkin Elmer AAnalyst 200, con el módulo de horno grafito HGA 900 trabajando a 324,75 nm. En este caso se trabajó con tubos calentados de forma transversal, recubiertos pirolíticamente y con plataforma L'vov incluida. Se utilizó corrector de fondo de deuterio y no hubo necesidad de utilizar modificador químico. Las temperaturas de pirólisis y atomización fueron 1100 °C/2300 °C respectivamente. La señal utilizada para la cuantificación fue la absorbancia integrada (área de pico). A partir de una disolución patrón de 1000 mg L⁻¹ se preparó el patrón de calibración más concentrado de 50,0 µg L⁻¹. El diluyente utilizado fue agua ultrapura. Una vez confirmada la linealidad dentro del rango de estudio, el

equipo realizó automáticamente la curva de calibración con los puntos de 0,0; 10,0; 25,0 y 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.6.5) Aplicación del método validado

Una vez optimizadas las condiciones de digestión simulada, se procedió a realizar los ensayos *in vitro* en los cortes estudiados. Se partió de 1,0 g de muestra en base fresca a la que se le agregó 5,00 mL de la disolución gástrica simulada durante 2 horas. Luego, se agregaron 5,00 mL de la disolución intestinal simulada, durante 2 horas más. Ambas extracciones se realizaron a una temperatura constante de 37 °C con agitación continua, simulando las condiciones fisiológicas humanas. Luego se centrifugaron a 28000g durante 30 min y se procedió a la determinación analítica de Cu y Zn.

Cada digestión se realizó por triplicado, y en cada proceso también se realizaron tres blancos de digestión. Los mismos contenían los reactivos utilizados en el ensayo, sin el agregado de muestra. La evaluación de los blancos es muy importante en estos estudios, ya que las enzimas utilizadas contienen a los analitos de interés formando parte de sus sitios activos. La FB fue calculada según lo descrito en la Sección 1.1.4.

5) Resultados y discusión

El presente capítulo presenta los resultados obtenidos, junto con los comentarios y discusiones pertinentes para lograr los objetivos propuestos. En primer lugar, se muestran los resultados obtenidos mediante el método alternativo desarrollado en el trabajo de tesis y luego los resultados obtenidos mediante un método clásico de preparación de muestras, de forma de poder realizar una comparación entre ambos. Concomitantemente, se realiza una evaluación crítica del trabajo realizado. Finalmente, se discuten los resultados obtenidos en cuanto a la bioaccesibilidad y se realiza el ejercicio, con los datos obtenidos, de como se podría evaluar la contribución del alimento a la ingesta diaria de Cu y Zn.

5.1 Extracción alcalina

Tal como se describió en la Sección 4.4, se probaron dos formas de extracción alcalina con TMAH, una asistida con calentamiento y la otra asistida con ondas de ultrasonido. Finalmente, en base a los desempeños observados, se llevó a cabo la validación del método que involucraba el tratamiento asistido con calentamiento. Además, se debió ajustar un tercer método que se adecuara a las condiciones del laboratorio donde se realizó la pasantía, lo cual se puede considerar también una transferencia de tecnología, que resultó exitosa. En esta sección se presentan los resultados obtenidos en lo que respecta a los distintos métodos evaluados para la extracción alcalina como método de preparación de las muestras, junto con las reflexiones pertinentes a las que condujeron el trabajo. Asimismo, se presentan algunas conclusiones parciales en lo que respecta al desempeño del método propuesto. Cabe destacar que los resultados de esta parte de la tesis han sido publicados en una revista internacional referada (Iaquinta et. al., 2021).

5.1.1) Optimización de la extracción alcalina con calentamiento

Tal como se mencionó previamente en el Capítulo 2, el TMAH está reportado como un reconocido y eficiente reactivo solubilizador de tejidos biológicos, aplicable al análisis de analitos inorgánicos. Los tratamientos de muestras que involucran este reactivo son económicos, lo cual constituye una gran ventaja, ya que solo se necesita un baño de agua y un equipo de centrifugación, dispositivos comúnmente disponibles en los laboratorios. Por lo tanto, puede ser considerado como una alternativa a los procedimientos convencionales de digestión ácida, eliminando el uso de ácidos minerales concentrados, que siempre representan un riesgo para los operadores (Matusiewicz & Golik, 2004). En este contexto, se realizó la optimización de la extracción alcalina, que utiliza un reactivo que si bien es peligroso, se utiliza un volumen muy pequeño comparado con otros métodos, buscando así desarrollar un método más amigable con el ambiente.

Se han reportado varias formas de extracción con TMAH, como ser asistido con calentamiento en baño térmico, asistido por microondas y asistido por ondas de ultrasonido (Jerše et al., 2018; Lehtonen et al., 2000; Matusiewicz & Golik, 2004; Nunes et al., 2013).

Tratamiento alcalino con baño térmico

Se comenzó con este tipo de tratamiento, ya que dentro de los lineamientos de la Química Analítica Verde, el calentamiento con baño térmico es considerado más amigable que otros tipos de calentamiento como ser con plancha calefactora, puesto que solamente implica el calentamiento de agua. Además, el baño térmico suele encontrarse frecuentemente en los laboratorios.

Las condiciones ensayadas en un primer diseño experimental, se presentaron en la Tabla 4.2. Las condiciones óptimas para la preparación de muestras en medio alcalino, se seleccionaron luego de evaluar el porcentaje de recuperación de cada analito. Este fue estimado como $R(\%) = [\text{concentración obtenida (mg kg}^{-1})/\text{concentración certificada (mg kg}^{-1})] \times 100$, para cada experimento, expresado en base seca. En este caso, la concentración certificada de Cu y Zn corresponde a la reportada por el certificado del CRM de músculo bovino.

En la Tabla 5.1 se muestran los resultados obtenidos luego del primer diseño experimental realizado. De aquí, se deduce que la variable tiempo si bien es crítica, no presentaría mayor diferencia entre los 60 (experimento 6: 0,50 mL de reactivo, 60°C) y 75 minutos (experimento 10: 0,75 mL de reactivo, 70°C). Si embargo, el volumen de reactivo y la temperatura de extracción si parecen tener un rol más importante en la extracción. Además, considerando que se espera obtener resultados cercanos al 100%, estos sugieren continuar con la optimización de la extracción, ya que no se lograron los resultados esperados para el caso de Zn. Cabe mencionar que el rango de aceptación fue de 75 – 120%, dados los niveles de los analitos en estudio, y considerando en este caso lo estipulado en otra guía de validación europea, como lo es la DG-SANTE (EU DG-SANTE, 2017). La guía Eurachem no cuenta con valores guía para establecer especificaciones, por ello se tomaron valores de la DG-SANTE, cuya dirección se encarga de proteger y mejorar la salud pública, y allí hay criterios para métodos analíticos para análisis de alimentos que se pueden utilizar como referencia.

Tabla 5.1: Recuperaciones del primer diseño experimental

Experimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
R(%) - Zn	43	52	39	65	55	60	44	74	52	71
R(%) - Cu	83	82	76	80	85	87	86	89	87	89

Continuando con la optimización, se planteó un segundo diseño experimental. Al no encontrarse diferencias significativas en los tiempos de 60 (experimento 6) y 75 minutos (experimento 10) en el primer diseño experimental, se optó por continuar trabajando con 60 minutos y de esta forma lograr una extracción más rápida. Sin embargo, se profundizó en las variables que se consideraron más críticas: la cantidad de reactivo y la temperatura.

En esta segunda instancia se utilizaron muestras de asado y de cuadril. Como valores de referencia del contenido de los elementos en estas muestras, se utilizaron los obtenidos a partir de la digestiones asistidas por microondas. Se optó por realizar estos experimentos sobre las propias muestras, puesto que si bien las mismas se encontraban secas, no eran igualmente homogéneas que el CRM. Además, las muestras de carne presentaban a simple a vista un mayor tenor grasa que el CRM, por lo que se presumió que la extracción podría verse afectada. Por este motivo, se consideró que sería la forma más confiable el evaluar la eficiencia de extracción del TMAH sobre muestras "reales" en este caso. Asimismo, la comparación estadística para evaluar si había diferencias entre los resultados obtenidos por el método propuesto y el tratamiento de digestión total asistido por microondas, se realizó utilizando muestras de carne cruda y seca, lo que sustenta aún más el hecho de utilizar las muestras "reales" para la optimización. En la Tabla 5.2 se presentan las condiciones de este segundo diseño experimental y las recuperaciones R(%) obtenidas para Cu y Zn.

Tabla 5.2: Resultados obtenidos para el segundo diseño experimental

Experimento	1	2	3	4	5	6	
Volumen de TMAH (mL)	0,75	1,5	1	1	0,75	1,5	
Temperatura (°C)	75	75	80	80	85	85	
Asado	R(%) - Zn	89 ± 11	77 ± 14	75 ± 1	69 ± 2	70 ± 8	96 ± 5
	R(%) - Cu	100 ± 13	83 ± 1	74 ± 4	65 ± 2	62 ± 4	71 ± 7
Cuadril	R(%) - Zn	87 ± 15	90 ± 4	128 ± 8	80 ± 7	77 ± 9	91 ± 4
	R(%) - Cu	121 ± 2	119 ± 4	155 ± 6	94 ± 6	93 ± 7	107 ± 3

Promedio ± desviación estándar, (n=2).

Los resultados con recuperaciones más cercanas a 100% en un compromiso para lograr un solo tratamiento que permitiera la determinación adecuada para los analitos evaluados, correspondieron a los experimentos 1 y 6, tal como se puede observar en la tabla anterior. Sin embargo, se optó por continuar con las condiciones del experimento 6, ya que presentaron una menor dispersión de los los resultados (mayor precisión).

La Figura 5.1 presenta una de superficie de respuesta de este último diseño experimental, como forma de visualizar la optimización de otra forma. Las zonas de color rojo intenso son las que presentan las mejores condiciones de extracción. Finalmente, luego de estas evaluaciones y consideraciones las condiciones óptimas del tratamiento alcalino fueron: 0,25 g de carne seca previamente pulverizada utilizando molino de cuchillas (tamaño de partícula menor a 250 μm), se colocan en un tubo de vidrio de capacidad de 10 mL y se adicionan 5,00 mL de agua ultrapura, 1,50 mL de TMAH 25% (m/v) en metanol, se agitan durante 30 segundos en vórtex y se calienta durante 60 minutos en baño de agua a 85 $^{\circ}\text{C}$. El volumen de agua agregado durante la extracción fue necesario para humectar el tejido animal y favorecer la penetración de TMAH, tal como advierte Nóbrega et al. este paso es importante (Nóbrega et al., 2006). La hidratación previa, permite que el reactivo extractante penetre más fácilmente en la matriz proteica y libere los analitos hacia la disolución. Se trata de un paso importante que afecta la eficiencia de la extracción, por lo que se repitió esta agitación al comienzo y mitad (30 minutos) del experimento (Aranha et al., 2016). Luego de transcurridos los 60 minutos, se dejó enfriar a temperatura ambiente y la suspensión se llevó a un volumen final de 10,00 mL con agua ultrapura. La mezcla se centrifugó durante 30 minutos a 28000g y se filtró mediante membrana de 0,45 μm . La disolución filtrada obtenida se utilizó para efectuar las medidas instrumentales correspondientes.

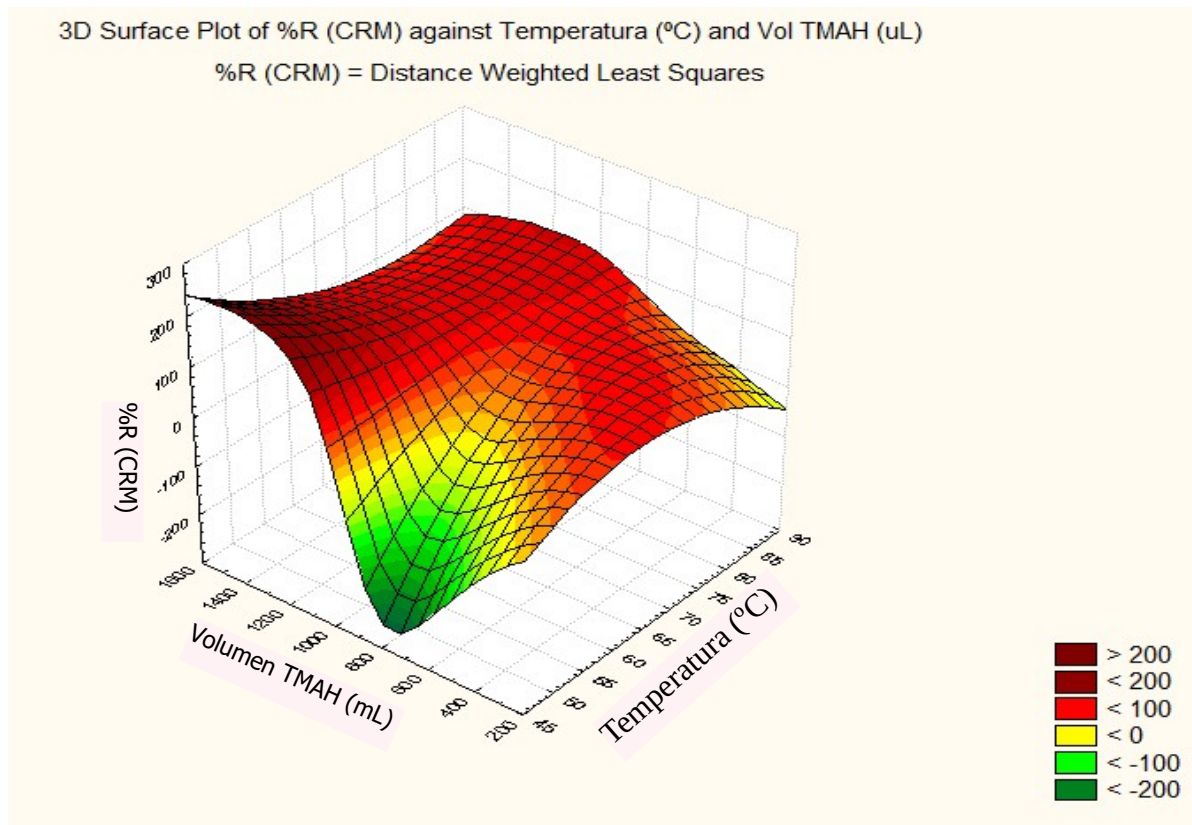


Figura 5.1: Superficie de respuesta del segundo diseño experimental (obtenida mediante software Statistica®)

Este tipo de preparación de muestras resultó atractivo debido a que en este trabajo presentó baja susceptibilidad a la contaminación. Esto fue a causa de una menor manipulación de la muestra y de un menor número de reactivos y utilizados en cantidades más pequeñas. Además, se procesaron seis muestras por triplicado al mismo tiempo en un mismo baño de agua. No obstante, se deben considerar también, factores como la homogeneidad de la muestra de estudio, la sedimentación y el tamaño de las partículas (Nunes et al., 2013). En este sentido, las muestras de carne bovina sometidas previamente a un procedimiento de secado, según los resultados obtenidos, presentaron un buen comportamiento para ser tratadas por este procedimiento.

En la Figura 5.2 se puede observar el aspecto de las muestras luego del tratamiento propuesto, después de ser centrifugadas. Las más claras corresponden al corte asado, mientras que las otras corresponden al corte cuadril. La diferencia de coloración, puede deberse a la composición de cada corte, por ejemplo a su tenor graso, el cual depende de la función anatómica en el animal (Pistón et al, 2020b).

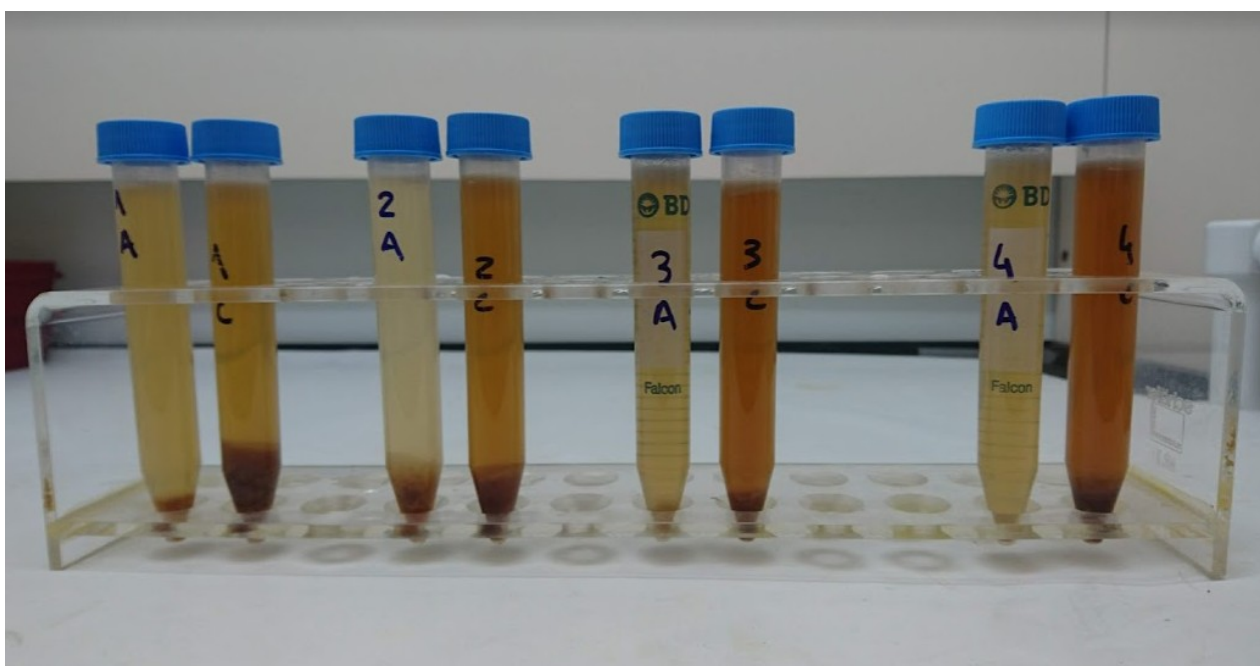


Figura 5.2: Muestras tratadas con TMAH.

Finalmente, las condiciones óptimas fueron: a 0,25 g de muestra de carne cruda seca y pulverizada, se le agregó 1,50 mL de TMAH 25% m/v en metanol y 5,00 mL de agua ultrapura. Luego se homogeneizó utilizando un vórtex durante 30 segundos. La disolución se colocó en baño de agua termostático a 85 °C durante 60 minutos. Una vez concluido el tiempo de calentamiento, se dejó enfriar la muestra y se centrifugó durante 30 minutos a 28000g. Finalmente, se filtró el sobrenadante utilizando una membrana de poro de 0,45 µm y la disolución resultante fue utilizada para las determinaciones analíticas directamente sin dilución previa.

Tratamiento alcalino asistido con ondas de ultrasonido

Algunas publicaciones presentan buenos resultados con la extracción con TMAH asistida con ondas de ultrasonido en muestras de tejido animal (Matusiewicz y Golik, 2004; Nunes et al, 2011). En este sentido, como parte del trabajo de tesis, se evaluó la eficiencia de extracción de este tratamiento, con el objetivo de decidir cual de las dos alternativas desarrolladas arrojaba los mejores resultados.

Considerando los buenos resultados obtenidos luego del segundo diseño experimental utilizando la extracción con calentamiento en baño térmico, se tomaron las mismas condiciones experimentales como punto de partida. Por lo tanto, el tratamiento de las muestras se llevó a cabo utilizando 0,25 g de muestra, 5,00 mL agua ultrapura y 1,50 mL de TMAH 25% (m/v) en metanol. Lo que se varió en este caso fue el tiempo de sonicación. Para ello, se estudió la eficiencia de extracción a 15, 30 y 60 minutos en baño de ultrasonido, trabajando a una frecuencia de 47 kHz. Una vez finalizado el tiempo de extracción, la mezcla se llevó a un volumen de 10,00 mL con agua ultrapura, se centrifugó durante 30 minutos a 28000g y se filtró mediante membrana de 0,45 μm . La disolución obtenida se utilizó para las determinaciones analíticas. Los ensayos se realizaron por duplicado (n=2) junto con los blancos correspondientes.

En este caso, las muestras evaluadas en el ensayo fueron CRM de músculo e hígado bovino, RM de hígado bovino y una muestra de cuadril (cuadril 4202 con trazabilidad dada en el marco del proyecto con INAC). Se seleccionó cuadril porque se estimó que un menor tenor graso en comparación con el asado, beneficiaría la extracción (Figura 5.3). Se evaluó la eficiencia calculando los respectivos R(%). Asimismo, en paralelo, se realizó una extracción alcalina con calentamiento en baño térmico utilizando el método previamente optimizado, con el objetivo de luego comparar la eficiencia entre ambos métodos para las mismas muestras. Los elementos determinados fueron Cu y Zn, ya que para todas estas etapas de desarrollos, sus determinaciones se tomaron como modelo para luego ensayar con las determinaciones de Mo y Se. Debido a las técnicas analíticas involucradas en la determinación de estos dos últimos, en las que los costos asociados son altos, se prefirió primero encontrar óptimas condiciones para Cu y Zn, cuyas determinaciones mediante FAAS son mas económicas. Luego, con este camino de análisis multivariado ya recorrido, se probaron condiciones concretas para Mo y Se.

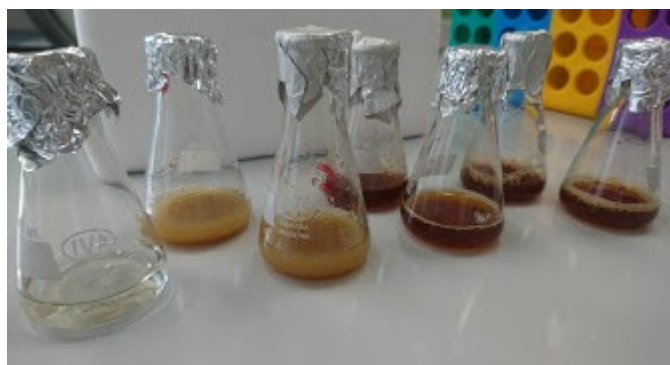


Figura 5.3: Muestras luego del tratamiento alcalino asistido con ultrasonido.

En la Tabla 5.3 se presentan los R(%) obtenidos al realizar los distintos procedimientos de extracción alcalina, asistida por ultrasonido y con calentamiento en baño térmico. A partir de ésta se pueden observar varios datos interesantes.

En primer lugar, se descartó la extracción asistida por ultrasonido durante 15 minutos, ya que no presentó resultados eficientes. Siguiendo con el análisis de los resultados, resulta interesante observar que para el caso de la extracción de los analitos en las muestras de CRM de hígado bovino resultaron similares los tiempos de 60 y 30 minutos, es decir, que se podría reducir el tiempo de análisis. Además, los resultados mostraron que para estas muestras eran más eficientes las extracciones con ultrasonido, fundamentalmente en lo que respecta a la extracción de Cu.

Sin embargo, en la extracción de Cu y Zn en el CRM de músculo bovino y en la muestra de cuadril, fue más eficiente el método propuesto con calentamiento en baño térmico, obteniéndose recuperaciones en el rango 71 – 100%. De hecho, aunque se utilice las ondas de ultrasonido para la extracción alcalina, es necesario un calentamiento posterior, ya que se forma una suspensión opaca, tal como describe Nunes et al. (Nunes et al., 2011).

Tabla 5.3: Comparación entre extracciones alcalinas

Tratamiento	Tiempo	Muestras	R(%) - Cu	R(%) - Zn
Baño térmico	60 min a 85°C	CRM NIST 1577c - Hígado Bovino	17 ± 1	71 ± 1
		Embrapa-RM-Agro-E3001a – Hígado Bovino	11 ± 1	67 ± 1
		ERM-BB184 – Musculo Bovino	100 ± 7	76 ± 1
		Muestra de cuadril 4202	88 ± 9	71 ± 1
Baño de ultrasonido	60 min	CRM NIST 1577c - Hígado Bovino	87 ± 5	82 ± 5
		Embrapa-RM-Agro-E3001a – Hígado Bovino	72 ± 8	75 ± 7
		ERM-BB184 – Musculo Bovino	33 ± 4	76 ± 1
		Muestra de cuadril 4202	28 ± 10	13 ± 4
Baño de ultrasonido	30 min	CRM NIST 1577c - Hígado Bovino	84 ± 10	75 ± 10
		Embrapa-RM-Agro-E3001a – Hígado Bovino	81 ± 4	75 ± 2
		ERM-BB184 – Musculo Bovino	58 ± 4	22 ± 2
		Muestra de cuadril 4202	58 ± 10	14 ± 2
Baño de ultrasonido	15 min	CRM NIST 1577c - Hígado Bovino	47 ± 4	46 ± 4
		Embrapa-RM-Agro-E3001a – Hígado Bovino	72 ± 12	54 ± 8
		Muestra de cuadril 4202	5 ± 3	17 ± 7

n=2; promedio ± desviación estándar

Finalmente, a raíz de lo explicado y de los resultados observados en la tabla anterior, se evidencia que la extracción en músculo bovino fue más eficiente utilizando el calentamiento con baño térmico. Por lo tanto, teniendo en cuenta que las muestras analizadas correspondían a músculo, y considerando que la extracción con calentamiento con baño térmico se alinea aún más con los principios de la Química Analítica Verde, es que se seleccionó como tratamiento de muestras alternativo (Gałuszka et al., 2012).

Tratamiento de extracción alcalina con calentamiento en bloque térmico

Durante la pasantía con el grupo GAIA, se debió adecuar el tratamiento de muestras en base al equipamiento disponible en el laboratorio, el cual no disponía de un baño térmico, pero sí de bloque térmico. De esta forma, dados los óptimos resultados obtenidos con el método de extracción alcalina asistido con calentamiento en baño térmico, realizado en el laboratorio del GATPREM, se procedió con la misma secuencia. Para ello se colocaron 0,25 g de muestra en tubos de digestión, se agregaron 1,50 mL de TMAH 25% m/v en metanol y 5,00 mL de agua ultrapura, y se homogenizó durante 30 segundos en vórtex. A continuación, las muestras fueron colocadas en el bloque digestor con sus respectivas tapas, de forma de favorecer el reflujo y evitar la posible

contaminación del ambiente, durante 30 minutos a 85 °C. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron nuevamente homogeneizadas en vórtex y colocadas en el bloque hasta completar los 60 minutos. Una vez completado el tiempo de tratamiento, se dejaron enfriar las suspensiones y se trasvasaron a tubos limpios completando con agua ultrapura a un volumen final de 10,00 mL, se centrifugaron a 28000g durante 30 min y se filtraron utilizando filtros de 0,45 µm de tamaño de poro y con bomba de vacío.

Para evaluar la eficiencia de esta extracción alcalina, se utilizó en este caso el RM de hígado bovino y se calcularon los respectivos R(%), como fuera descrito previamente en esta tesis. En este caso, dado que las determinaciones se realizaron mediante ICP-OES, la cual es una técnica multielemental, se determinaron simultáneamente Se, Mo, Cu y Zn.

En este punto es importante establecer las diferencias de trabajar con un RM o un CRM, tal como se definieran en la Sección 1.2.5, así como destacar el valor del R(%) obtenido en cada uno de los casos. Para determinar el sesgo utilizando un RM, se determina la media de una serie de mediciones repetidas y se comparan los resultados contra el valor de referencia correspondiente. Sin embargo, lo ideal es trabajar con un CRM, donde requisitos como homogeneidad y estabilidad son probados, se proporciona la caracterización de los valores de la propiedad mediante métodos adecuados, bien descritos y validados, siempre que sea posible, que presente valores certificados de las propiedades a estudiar próximos a los de las muestras de ensayo. Esto se debe a que los CRM proporcionan valores trazables a un organismo competente autorizado. Teniendo en cuenta la amplia variedad de posibles muestras y analitos a determinar, la disponibilidad de CRM es limitada, pero es importante que el material seleccionado sea apropiado para su uso. Para trabajos normativos, se debe utilizar un CRM adecuado, idealmente de la misma matriz en estudio siempre que se encuentre disponible. Sin embargo, para métodos utilizados en trabajos internos a largo plazo, es adecuado utilizar un RM para monitorear el sesgo, si bien se recomienda utilizar un CRM en la evaluación inicial.

Para las determinaciones mediante ICP-OES, fue necesario ajustar el pH de las muestras utilizando HNO₃ concentrado, hasta obtener un pH menor a 9. Esto se debe a que las disoluciones altamente básicas, pueden afectar el desempeño del equipo a lo largo del tiempo, dado que los depósitos de cristales de hidróxidos u óxidos puedan afectar el sistema. El ajuste de pH consistió en el agregado gota a gota de ácido, hasta la primer gota con la cual se alcanzara un valor de pH menor a 9. En el caso de las muestras el agregado de cuatro gotas era suficiente para lograr el pH necesario, mientras que en el caso de los patrones se alcanzaba el pH con el agregado de tan solo una gota.

Una vez alcanzado un valor de pH compatible con el sistema ICP-OES, las muestras fueron diluidas al medio para disminuir la cantidad de sólidos disueltos, otro factor importante a tener en cuenta a la hora de trabajar con esta técnica. Se trabajó a dos longitudes de onda diferentes para cada analito, con el objetivo de identificar posibles interferencias espectrales. Sin embargo, según los resultados obtenidos, no hubo evidencia de interferencias en ninguna de las líneas utilizadas. Los resultados obtenidos para este primer ensayo se presentan en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4: Recuperaciones obtenidas de la primera extracción alcalina (n=2)

Elemento	Se		Zn		Cu		Mo	
λ (nm)	196,090	203,985	213,856	202,548	324,754	327,396	202,030	204,598
R(%)	22	525	71	71	4	4	203	177

Como se puede observar, los resultados obtenidos se encontraron por fuera del rango aceptable de recuperaciones, previamente establecido en 75 – 120%, a todas las longitudes de onda de trabajo. Si bien la cantidad de muestras analizadas no es suficientemente representativa, se podría pensar que las bajas recuperaciones de Cu (4%) se deben a la precipitación de las proteínas que lo contienen, formando un precipitado blanco. Por su parte, las altas recuperaciones de Se (525%) pueden deberse a una posible interferencia a la longitud de onda de medida. En cualquier caso, para probar estas hipótesis, sería necesario realizar más ensayos.

Dados los resultados obtenidos, se decidió realizar una segunda extracción, la cual se llevó a cabo siguiendo la secuencia anterior, pero una vez terminado el tiempo de extracción y posterior enfriamiento de la disolución, se trasvasó a tubos de 15 mL y se adicionó HNO_3 3 mol L^{-1} hasta alcanzar un pH menor a 9, completando luego a un volumen final de 15,00 mL con agua ultrapura. En las muestras este agregado se realizó mediante pipeta Pasteur y fue de 11 gotas y en los patrones de 4 gotas. Este cambio resultó crítico, ya que la adición de la primer gota de HNO_3 concentrado conducía a un pH de 3 – 4. Sin embargo, utilizando HNO_3 diluido, se llegó a un pH de 8 y en medios muy ácidos las proteínas pueden llegar a precipitar junto con los analitos unidos a ellas. Luego de completar a volumen, se procedió a la centrifugación y posterior filtrado de las muestras y se analizó la disolución resultante. En la Tabla 5.5 se presentan los resultados de esta extracción expresados como R(%). En esta oportunidad además de utilizar el RM de hígado (n=2) se utilizó el CRM de músculo bovino (n=2). Estos resultados presentaron mejores recuperaciones que el experimento anterior en lo que respecta a los niveles de Zn, Cu y Mo. En el caso de Se, se debió continuar con la optimización.

Tabla 5.5: Recuperaciones promedio de la segunda extracción

Elemento	Se	Zn	Cu	Mo				
λ (nm)	196,090	203,985	213,856	202,548	324,754	327,396	202,030	204,598
R(%) RM	-	-	75 \pm 3	76 \pm 5	93 \pm 1	80 \pm 1	95 \pm 4	100 \pm 5
Hígado								
R(%) CRM	-	-	81 \pm 3	80 \pm 4	126 \pm 1	118 \pm 1	-	-
Músculo								

n=2; promedio \pm desviación estándar

Sin embargo, al realizar el análisis en las muestras de carne, como se mencionará a continuación, no se obtuvieron resultados satisfactorios. Por este motivo, se optó por realizar algunas pruebas sin realizar el ajuste de pH, trabajando con el CRM de músculo bovino y el RM de hígado bovino (n=2). El objetivo fue evaluar si el agregado de HNO₃ era el motivo de los resultados observados. Para ello, se siguió la secuencia realizada en el segundo experimento, colocando dos muestras sin ajuste de pH. En la Tabla 5.6 se presentan los resultados obtenidos, en la cual se puede observar que el ajuste de pH podría estar afectando las recuperaciones de Zn, Cu y Mo en el caso del RM de hígado bovino. Las bajas recuperaciones de Cu en el RM coinciden con los resultados presentados anteriormente (Tabla 5.3), donde se presenta que para el RM de hígado bovino, la extracción de Cu no es cuantitativa. En la determinación de Cu y Zn en el CRM de músculo también se observa que las recuperaciones obtenidas podrían estar afectadas por el ajuste de pH. La tabla también permite observar que la extracción realizada sin ajuste de pH, es cuantitativa para el CRM, el cual se corresponde con la matriz en estudio.

Resulta interesante observar los resultados de Cu obtenidos en la extracción alcalina, en relación a los materiales utilizados. Esta diferencia de recuperación, se puede deber a que los tejidos implicados son diferentes, porque en el caso del CRM de músculo bovino la extracción de Cu si resultó cuantitativa, de esta forma, se evidencia la necesidad de contar con CRM o RM representativo de la matriz de estudio.

Tabla 5.6: Comparación de resultados con y sin ajuste de pH

Elemento	R(%) sin ajuste de pH	R(%) con ajuste de pH	
RM Hígado bovino	Cu (324,754 nm)	9 \pm 1	70 \pm 2
	Zn (213,856 nm)	75 \pm 2	53 \pm 7
	Mo (202,030 nm)	91 \pm 2	67 \pm 8
CRM Músculo bovino	Cu (324,754 nm)	101 \pm 6	67 \pm 4
	Zn (213,856 nm)	84 \pm 3	64 \pm 1

Promedio \pm desviación estándar (n=2).

Este fenómeno, que muestra la diferencia de resultados con y sin agregado de HNO_3 , también se evidenció a simple vista, tal como se puede observar en la Figura 5.4, donde las muestras con y sin ajuste de pH, presentaron residuos con aspectos muy diferentes. El residuo negro corresponde a tratamiento de las muestras sin ajuste de pH, mientras que el blanco corresponde a las muestras tratadas con ajuste de pH.

A modo de confirmar y estudiar con mayor profundidad este fenómeno, se evaluó la estabilidad a lo largo del tiempo de las muestras con y sin ajuste de pH. Se realizaron medidas de las extracciones a lo largo del día y transcurridos 6 días. Los resultados mostraron que las muestras a las cuales no se les agregó HNO_3 para el ajuste, eran más estables, ya que el RSD (%) de los analitos evaluados en el CRM varió en el tiempo entre un 3 y un 3.9%. Por su parte, en el caso del CRM, las muestras a las cuales se les realizó ajuste de pH, el RSD (%) varió entre el 4 y el 20% (Anexo III). De esta forma, las muestras a las cuales no se les realizó ajuste de pH resultaron ser más estables en el tiempo.

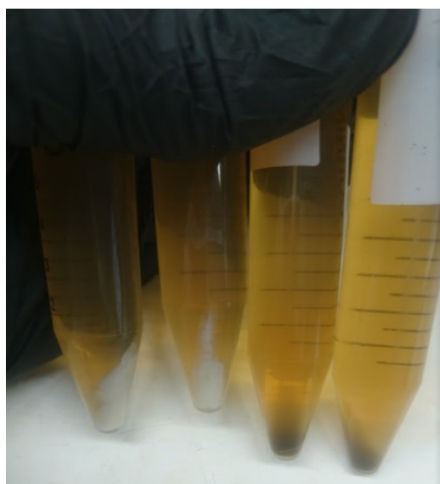


Figura 5.4: Aspecto de los residuos luego de la centrifugación, con ajuste de pH (residuo blanco) y sin ajuste de pH (residuo negro).

Asimismo, se analizaron muestras de asado y cuadril. En la Tabla 5.7 se presentan los rangos de concentración obtenidos para cinco muestras de carne, dos de asado y tres de cuadril ($n=2$). En dicha tabla, también se observan los $R(\%)$ obtenidos mediante la extracción alcalina, utilizando como referencia los valores obtenidos por digestión ácida determinados por MIP OES. Se utilizaron las líneas analíticas con las que se obtuvieron mejores $R(\%)$ para el CRM de músculo bovino y el RM de hígado bovino, con el objetivo de utilizar este parámetro como aseguramiento de la calidad del método.

Tabla 5.7: Resultados de Cu y Zn obtenidos mediante ICP-OES

Elemento	Rango (mg kg ⁻¹) base seca	R(%)		
		muestras de carne bovina	R(%) RM	R (%) CRM
Cu	1,66 – 5,99	69 - 81	81 ± 1	87 ± 3
Zn	79 – 135	60 - 102	101 ± 6	89 ± 4

Promedio ± desviación estándar (n=2).

Como se puede observar, estos resultados resultaron en principio prometedores, por lo que se continuó con el análisis de otras 15 muestras, obteniéndose los resultados de la Tabla 5.8.

Tabla 5.8: Resultados de carne obtenidos mediante ICP-OES y extracción alcalina

Elemento	Rango (mg kg ⁻¹) base seca	R(%)
Cu	0,13 – 2,64	4 – 77
Zn	60 – 208	40 – 94

En esta segunda instancia, los valores de R(%) se encontraron fuera del rango de aceptación, con evidencia de sesgo. Además, con el correr de los días se observó un precipitado en los tubos de extracción, que no se presentaba en las muestras a las cuales se les había realizado el ajuste de pH y que se habían medido en el mismo día. Por este motivo, se planteó la posibilidad de realizar las medidas dentro de las 24 horas luego del ajuste de pH, ya que la primera serie de resultados habían sido prometedores (Tabla 5.7).

Los resultados de los análisis obtenidos dentro de las 24 horas, se presentan en la Tabla 5.9. Como se puede observar, los mismos no fueron coherentes con los obtenidos mediante digestión ácida, obteniéndose bajos R(%). Estas dificultades coinciden con algunas observaciones reportadas en la literatura (Gromboni, 2012). Para confirmar que el ajuste de pH era el responsable de este problema, se llevó a cabo un ensayo utilizando el CRM de músculo y el RM de hígado, con y sin ajuste de pH, de forma de evaluar si existían diferencias en los resultados (ANEXO III).

Tabla 5.9: Resultados obtenidos en las muestras de carne bovina con extracción alcalina mediante ICP-OES en menos de 24 h

Elemento	Rango (mg kg ⁻¹) base seca	R(%)
Cu	0,85 – 3,15	37 - 85
Zn	70 - 149	33 - 76

Considerando que los resultados obtenidos, no fueron los esperados, se decidió continuar con el trabajo en las mismas condiciones que en el grupo GATPREM, en las cuales no había necesidad de

ajustar el pH, debido a las características de la instrumentación utilizada para las determinaciones analíticas (FAAS y ETAAS), en el caso del Zn y el Cu.

En el caso de Mo y Se, tampoco fue posible la determinación mediante ICP-OES. Por este motivo, se decidió realizar su determinación mediante ICP-MS, luego de la extracción alcalina, pensando que el problema podría deberse a los bajos niveles de estos analitos en las muestras de carne. En este caso también fue necesario realizar la neutralización para ajustar el pH. Finalmente, las determinaciones obtenidas mediante ICP-MS no fueron satisfactorias, obteniéndose recuperaciones entre 20 y 80% para el CRM y el RM analizados. Sin embargo, cabe resaltar que existen reportes en la literatura que describen el tratamiento alcalino con posterior determinación mediante ICP-MS como método de rutina (Batista et al., 2009).

Dada la necesidad del ajuste del pH para el uso de estos instrumentos y dada la forma en que ésta influye en la determinación de los elementos en estudio, se planteó continuar el trabajo realizando las determinaciones de Cd, Mo, Pb y Se mediante ICP-MS, utilizando digestiones ácidas asistidas por microondas, en el marco de la pasantía.

5.1.2) Optimización de las condiciones instrumentales y validación

Dados los resultados obtenidos a partir de la optimización, se continuó con la extracción con baño térmico para realizar las validaciones correspondientes y para la determinación en las muestras de estudio. En lo que corresponde al trabajo en el laboratorio GATPREM, los análisis fueron llevados a cabo utilizando técnicas monoelementales, por este motivo, se debió optimizar y validar cada elemento en forma individual. Sin embargo, en todos los análisis desarrollados durante la pasantía, las técnicas empleadas fueron de tipo multielemental, como se comentara previamente.

Optimización de Cu y Zn mediante FAAS

Los niveles reportados en carne bovina de Cu ($0,2 - 1,1 \text{ mg kg}^{-1}$) y Zn ($2,3 - 3,7 \text{ mg kg}^{-1}$) hacen de FAAS una técnica idónea para su determinación analítica (Cabrera et al., 2010; Saadoun & Cabrera, 2012; Ramos et al., 2014; Pistón et al., 2020b). En la determinación mediante FAAS, es importante la composición de la llama, ya que de ésta depende la atomización de los analitos. La mezcla de aire como oxidante y acetileno como combustible, permite llegar a temperaturas entre $2100 - 2400 \text{ }^\circ\text{C}$ (Skoog et al., 2008). La composición de esta llama es lo suficientemente energética como para atomizar en forma eficiente estos elementos, y permitir su determinación cuantitativa en las muestras de carne.

Para la optimización de las condiciones instrumentales se evaluó el R(%) luego de analizar el CRM de músculo bovino, según las condiciones descritas en la Sección 4.4.4. En lo que refiere a la curva de calibración, en primer lugar se probó trabajar con las mismas condiciones que las muestras, es decir, preparando las disoluciones patrón en el mismo medio alcalino en que se encuentran las muestras. Para el Cu, la concentración esperada en la muestra no requería que la misma fuera diluida, por lo que el disolvente para los patrones y las muestras fue TMAH 3,75% m/v en metanol. En el caso de Zn, el rango reportado en las muestras superaban el rango lineal de la técnica. Por este motivo, se realizó una dilución al tercio de las muestras, obteniéndose como disolvente TMAH 1,25 % m/v en metanol. Para ambas analitos, se planteó la posibilidad de utilizar estándares acuosos, teniendo en cuenta un posible efecto matriz ocasionado por la presencia de TMAH en el medio. Cabe mencionar, que se determinó la densidad para los patrones con TMAH y la misma fue de $0,99978 \pm 0,00024 \text{ g mL}^{-1}$ (n=3). Considerando que 1 g mL^{-1} se encuentra dentro de la incertidumbre, las concentraciones de patrones y muestras de realizaron y expresaron en masa/volumen.

Cuando se habla de "efecto matriz" se refiere la influencia de uno o más componentes de la muestra detectados durante la medición de la masa o concentración del analito. La respuesta de ciertos analitos en algunos sistemas de detección puede verse afectada por la presencia de compuestos de la propia matriz. Estos efectos derivan de procesos físicos y químicos, que se observan como un aumento o disminución de la respuesta del detector, en comparación con la producida por disoluciones estándar del analito en disolvente. La presencia o ausencia de tales efectos puede ser demostrada por comparación de la respuesta producida por el compuesto analizado en disolvente con la respuesta que se obtiene de la misma cantidad de analito en un extracto de la muestra.

En la práctica, el efecto matriz se evalúa mediante la comparación de la pendiente de la curva de calibración de un analito en disolvente y en matriz. En este caso, no se evaluó la matriz propiamente dicha, pero si el efecto producido por el medio alcalino frente al medio acuoso, mediante la comparación de las pendientes de las respectivas curvas de calibración en TMAH y en agua, de la siguiente manera (EU DG-SANTE, 2017):

$$\text{EM}(\%) = [(\text{Pendiente en TMAH}/\text{Pendiente en agua})-1] \times 100$$

El EM(%) se encontró en el rango 10 – 15% lo cual se consideró como significativo, ya que era mayor que la propia repetibilidad del método, la cuál fue menor al 10% expresada como RSD(%) para ambos analitos. Siguiendo este criterio estipulado también en la guía de validación DG-

SANTE, se decidió trabajar con los patrones igualando el medio con TMAH. Este hecho llevó a que la limpieza del equipamiento fuera más frecuente, de forma de evitar cristalizaciones que estropearan los sistemas de medida.

Optimización de las determinaciones de Mo, Cd y Pb mediante ETAAS

Como era de esperarse que los contenidos de Mo, Cd y Pb en las muestras de carne bovina fueran bajos o incluso no detectables, teniendo en cuenta reportes previos del grupo de investigación y de grupos de la región, la técnica ETAAS emergía como una técnica adecuada para su determinación. Debido a que el CRM de músculo bovino no contaba con valores certificados para los analitos de interés, la optimización de las condiciones instrumentales se realizó utilizando el RM de hígado de bovino.

Como se mencionó anteriormente en la Sección 1.2.2, la necesidad de utilizar modificadores químicos en ETAAS está bien establecida, ya sea para disminuir o para eliminar la volatilización de los analitos y las interferencias de fase gaseosa. Dichos reactivos, permiten la estabilización térmica de analitos volátiles, de modo que se puedan aplicar temperaturas de pirólisis más altas, y/o la conversión de especies concomitantes en formas más volátiles. Ambos efectos, permiten una separación más eficiente del analito y sus posibles derivados durante el paso de pirólisis (Welz & Sperling, 1999). Si bien se encuentra ampliamente descrito en la bibliografía que los modificadores se aplican a las determinaciones de los mencionados elementos, cuando se utiliza TMAH como reactivo de extracción durante la preparación de la muestra, se debe seleccionar un modificador compatible con el medio alcalino resultante.

Es importante tener en cuenta que el reactivo TMAH funciona fraccionando la muestra y extrayendo los analitos de interés, pero sin lograr una digestión completa de la matriz, dejando así un mayor contenido de materia orgánica en la disolución resultante (Lehtonen et al., 2004). Esto conduce al uso de modificadores químicos, cuando se trabaja con muestras biológicas ricas en materia orgánica, como es el caso de la carne bovina.

En el caso de Mo, trabajos anteriores han presentado el uso de paladio (Pd), vanadio (V) o la mezcla de Pd+V como modificadores químicos para la determinación de varios elementos en tejidos biológicos, pertenecientes al Grupo VIB, al igual que el Mo. Sin embargo, la determinación de Mo, no está ampliamente reportada (Tsalev & Dimitrov, 1990). Por otra parte, Silva et al., evaluaron la extracción de cromo (Cr) (Grupo VIB) con TMAH en tejidos animales y su posterior determinación mediante ETAAS utilizando la mezcla Pd-Mg(NO₃)₂ como modificador químico (Silva

et al., 1999). Esta última mezcla ha sido reportada para determinaciones de Mo en matrices biológicas luego de la aplicación de diferentes tratamientos de muestras (Tsalev, 1995). Por este motivo, la primer combinación de modificadores evaluada fue la mezcla Pd-Mg(NO₃)₂, pero los resultados obtenidos no fueron cuantitativos.

Se exploró también la posibilidad de no utilizar modificadores químicos, ya que se ha descrito previamente este modo de trabajo para las determinaciones Mo en carne bovina (Vázquez-González et al., 1989). Asimismo, se han reportado en la literatura las determinaciones de Mo sin utilizar modificadores químicos, en muestras de cabello y uñas de seres humanos, luego de la extracción con TMAH (Tsalev et al. 1993). Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron cuantitativos una vez realizada la verificación correspondiente luego del análisis del RM de hígado bovino.

Finalmente, el modificador químico de matriz utilizado fue 5 µg de Pd, con lo que se lograron resultados cuantitativos. El uso de Pd como modificador químico ha sido reportado previamente en determinaciones de Mo en muestras de hígado humano, luego de la extracción con TMAH (Shimizu et al., 1988; Iaquinta et al., 2021).

En el caso de Cd, se encuentra reportado el uso el Ru como modificador químico, presentando buenos resultados al trabajar con matrices biológicas (Da Silva, 2003). De igual forma, el uso de Pd y de la mezcla Pd-Mg(NO₃)₂, han presentado buenos desempeños como modificadores químicos en las determinaciones de Cd en muestras biológicas, luego de extracciones alcalinas (Kamogawa et al., 2001; Aranha et al., 2015). Asimismo, se ha evaluado el no uso de modificadores químicos, ya que algunos autores han reportado resultados óptimos durante la determinación de Cd en muestras biológicas realizando extracciones con TMAH (Julshman & Andersen, 1978).

Sin embargo, los modificadores químicos reportados en la literatura para la determinación de Cd en músculo bovino luego de la extracción con TMAH, no mostraron buenos desempeño en este caso. Por su parte, la combinación de Pd + NH₄H₂(PO)₄, se presentó como una buena estrategia. El primero actúa en la estabilización térmica de los elementos, y permite el aumento de la temperatura y/o tiempo de volatilización (Voth-Beach & Shrader, 1987), mientras que el segundo es ampliamente utilizado para la determinación de Cd, dado que incrementa la volatilidad de las especies concomitantes, lo cual disminuye las interferencias que pueden provenir de la matriz (Dobrowolski et al., 2010). La combinación de ambos modificadores resultó ser la más eficiente para reducir los efectos causados por la matriz biológica en estudio. Ambos potencian la eficiencia de la determinación, ya que combinan el efecto de aumento de la temperatura y desestabilización de los posibles interferentes. Finalmente, luego de explorar esta combinación, se obtuvo un muy

buen desempeño utilizando 20µg de Pd y 30µg de (NH₄)H₂PO₄. Esta combinación ha reportado buenos resultados en la determinación de Cd en muestras biológicas, luego de la extracción con TMAH (Ribeiro et al., 2000; Martins et al., 2002).

En cuanto a las determinaciones de Pb en muestras biológicas luego de extracciones alcalinas, esta reportado que el uso de Pd como modificador químico, presenta un mejor desempeño frente a el rodio (Rh) y el iridio (Ir) (Martins et al., 2002). Además, se han reportado buenos resultados utilizando la combinación de Pd+(NH₄)H₂PO₄ (Ribeiro et al., 2000).

Sin embargo, si bien se realizaron pruebas con Pd y con la mezcla Pd+(NH₄)H₂PO₄ variando las cantidades desde 5µg hasta 30µg, se obtuvieron mejores resultados con la mezcla 15µg de Mg(NO₃)₂ + 50µg de (NH₄)H₂PO₄. Esta última, también ha demostrado buenos desempeños en las determinaciones de Pb en muestras biológicas luego de tratamientos con TMAH (Silva et al., 1999).

La correcta elección de las temperaturas de pirólisis y atomización, es también un parámetro crítico a tener cuenta durante la optimización de métodos analíticos basados en ETAAS, ya que en la primera etapa la materia orgánica se separa de la matriz, mientras que en la segunda etapa se produce la atomización del analito en estudio (Welz & Sperling 1999). Una vez definidos los modificadores químicos, la optimización de estas temperaturas se llevó a cabo de forma exhaustiva, realizando las correspondientes curvas de pirólisis / atomización, desde 1000 hasta 3000 °C a intervalos de 200 °C. Una vez que se encontraron los rangos de temperatura óptimos, el ajuste se realizó utilizando intervalos de 50 °C. La selección de la temperatura estuvo dada por la mejor relación señal/ruido obtenida. De esta forma, se obtuvo que las temperaturas de pirólisis y atomización para Mo fueron 1800/2750 °C, para Cd 700/1800°C y para Pb 750/1050 °C.

Considerando la experiencia adquirida con las determinaciones de Cu y Zn mediante FAAS, en las determinaciones mediante ETAAS también se realizaron los patrones de las curvas de calibración en un medio alcalino igualando las condiciones de las muestras. Por lo tanto, para el caso de Mo y Pb, el medio consistió en TMAH 3,75 %m/v en metanol. Sin embargo, para Cd se debió realizar una dilución 1/10 dados los niveles presentes en el RM, siendo el medio final TMAH 2,5% en metanol.

Validación de los métodos de determinación de Cu, Zn, Mo, Cd y Pb

Una vez concluida la optimización mediante FAAS para Zn y Cu, y en ETAAS para Mo, Cd y Pb, se procedió a su validación. En la Tabla 5.10 se muestran los parámetros de desempeño del método analítico desarrollado para Zn, Cu, Mo y Cd. Los parámetros de desempeño del Pb se presentan

más adelante, ya que los límites obtenidos para este método no hicieron posible un estudio de veracidad evaluada con RM, por lo que se debió evaluar este parámetro utilizando otra estrategia.

Tabla 5.10: Parámetros de desempeño para Zn y Cu por FAAS y Mo y Cd mediante ETAAS.

Parámetro	Zn	Cu	Mo	Cd
Rango lineal	0,05-1,20 mg L ⁻¹	0,04-1,00 mg L ⁻¹	1,2-50,00 µg L ⁻¹	0,70-4,00 µg L ⁻¹
LD (mg kg ⁻¹)/(mg L ⁻¹)	0,016/0,63	0,013/0,53	0,0004/0,015	0,008/0,021
LC (mg kg ⁻¹)/(mg L ⁻¹)	0,052/2,11	0,044/1,77	0,0012/0,048	0,027/0,069
Precisión (n=6)	3,4% ^a	3,9% ^a	7,4% ^b	9,5 ^b
Veracidad (%R) (n=6)	81 ± 3 ^a	104 ± 6 ^a	106 ± 8 ^b 81 ± 7 ^c	101 ± 6 ^b 98 ± 8 ^c
Medio alcalino ^d	1,25% m/v	3,75% m/v	3,75% m/v	2,5% m/v

LD: Límite de Detección, LC: Límite de cuantificación

^a Utilizando CRM Músculo Bovino (ERM-BB184), ^b Utilizando RM Hígado Bovino (Embrapaba-RM-Agro-E3001a), ^c Muestras fortificadas, ^d A partir de una disolución de TMAH 25% m/v en metanol.

Veracidad expresada como: Promedio ± desviación estándar.

La linealidad fue evaluada para cada elemento mediante la construcción de curvas de calibración de seis puntos, cada nivel por triplicado. Se observó buena linealidad con coeficientes de determinación (R^2) mayores que 0,999 lo cual se consideró adecuado para el propósito. Para el Cu la linealidad fue hasta 5,00 mg L⁻¹, pero para esta aplicación la curva de calibración hasta 1,00 mg L⁻¹ era suficiente. Los LD y LC se calcularon para cada elemento como $3s_b/m$ y $10 s_b/m$, respectivamente, donde s_b era la desviación estándar de 10 réplicas del blanco y m la pendiente de la curva de calibración. Las señales blanco (Abs) promedio del Cu fueron 0,001, mientras que las de Zn 0,002, en ambos casos, esta señal corresponde a menos del 5% de la señal del primer patrón de la curva de calibración. Los valores de LD obtenidos, expresados en base seca, fueron 0,53 mg kg⁻¹ y 0,63 mg kg⁻¹ para Cu y Zn respectivamente (base seca), siendo incluso mejores que los reportados usando un tratamiento de muestra alcalino y posterior determinación mediante MIP OES en varios materiales biológicos, incluida la carne vacuna (Matusiewicz & Golik 2004).

Los valores de LD obtenidos también fueron comparables con los reportados previamente para muestras de carne vacuna tratada con TMAH y posterior determinación mediante FAAS e ICP-OES (Nunes et al., 2011; Nunes et al., 2013). En el caso de Mo, el LD expresado en base seca fue 0,015 mg kg⁻¹, un orden de magnitud mejor respecto a los límites anteriormente reportado en la literatura para determinaciones de Mo en muestras de hígado humano luego de la extracción con TMAH (Shimizu et al., 1988). Esta situación también se repitió para Cd, donde el LD fue mejorado con respecto a publicaciones anteriores en músculo bovino (Aranha et al., 2016).

La precisión (repetibilidad) expresada como RSD(%) luego del análisis de 6 réplicas de cada CRM y RM, fue menor al 10% para todos los analitos estudiados. Esto se consideró adecuado para esta aplicación. Horwitz demostró que la RSD de un método varía con la concentración de acuerdo a una ecuación empírica y aproximada, la cual corresponde a una curva con forma de trompeta que se puede utilizar para derivar valores objetivos de σ para cualquier análisis (Miller & Miller, 2010). A partir de ésta se desprende, que para concentraciones del orden de 1 mg kg^{-1} , se pueden esperar valores de RSD de hasta 30%.

Por su parte la evaluación de la robustez, fue realizada mediante el diseño experimental anteriormente discutido. Si bien la robustez apunta a realizar variaciones pequeñas en torno a las condiciones óptimas, cuando se realiza un diseño experimental se obtiene conocimiento sobre el desempeño del método que puede también aportar a este parámetro. Es así que se identificaron como variables críticas el volumen de TMAH y la temperatura del baño. De la Figura 5.1, podemos observar que no hay mayores variaciones en el agregado de 1,40 o 1,50 mL de reactivo, y que las temperaturas alcanzadas pueden ser entre 80-85°C, para obtener extracciones cuantitativas.

Para la evaluación de la veracidad, se realizó la prueba t de Student para comparar los valores obtenidos con los certificados (Miller & Miller, 2010). Los resultados se presentan en la Tabla 5.11. Los valores de $t_{\text{experimental}}$ estuvieron por debajo del respectivo valor $t_{\text{teórico}}$ (0,05, 5)=2,57, lo cual indica que a un nivel de confianza del 95% las concentraciones no difieren significativamente de las reportadas en dichos materiales. Estas cifras de mérito demuestran que el método desarrollado fue preciso y veraz para las determinaciones de estos elementos.

Tabla 5.11: Valores obtenidos de los materiales de referencia y comparación estadística.

Elemento	Valores certificados e informado (mg kg^{-1})	Concentración obtenida (mg kg^{-1})	$t_{\text{experimental}}$	$T(0,05;5)$
Zn	146 ± 7^a	127 ± 19	2,52	2,57
Cu	$2,31 \pm 0,09^a$	$2,40 \pm 0,17$	1,67	2,57
Mo	$4,07 \pm 0,21^b$	$4,27 \pm 0,62$	0,84	2,57
Cd	$0,1047 \pm 0,0079^b$	$0,106 \pm 0,023$	0,11	2,57

^aCRM Músculo bovino, ^bRM Hígado bovino. Resultados expresados en base seca.

La selectividad del método quedó demostrada estadísticamente, mediante la comparación de los valores obtenidos para el CRM y el RM, a través dos métodos independientes: el método propuesto utilizando FAAS o ETAAS y el método de digestión asistida con microondas utilizando

ICP-MS (Mo y Cd) o la extracción alcalina utilizando ICP-OES (Cu y Zn). Se realizó una prueba *t* Student para comparar dos medias poblacionales (Tabla 5.12). La selectividad en el caso de Se y Pb no fue evaluada por los resultados que se discuten a continuación.

Tabla 5.12: Prueba *t* - Student para evaluar selectividad.

Analito	Método 1 (mg kg ⁻¹)	Método 2 (mg kg ⁻¹)	<i>t</i> _{experimental}	<i>T</i> (0,05;3)
Cu*	127 ± 19 ^a	118 ± 2 ^c	0,07	2,78
Zn*	2,40 ± 0,17 ^a	2,35 ± 0,07 ^c	0,01	2,78
Mo [#]	4,27 ± 0,62 ^b	3,86 ± 0,16 ^d	1,97	2,78
Cd [#]	0,106 ± 0,023 ^b	0,106 ± 0,015 ^d	0,34	2,78

Promedio ± desviación estándar (n=3)

*CRM músculo bovino; [#]RM hígado bovino; ^aFAAS; ^bETAAS; ^cICP-OES; ^dICP-MS.

Por otra parte, en la Tabla 5.13 se presentan los parámetros de desempeño obtenidos para la determinación de Pb mediante ETAAS. El límite de cuantificación obtenido es adecuado para la determinación del analito, ya que en base fresca (0,05 mg kg⁻¹, humedad 74%) se encuentra un orden por debajo de los máximos permitidos por la normativa del MERCOSUR vigente (0,10 mg kg⁻¹). Sin embargo, en este caso la evaluación de la veracidad solamente pudo ser realizada mediante fortificaciones (muestras adicionadas), ya que el RM disponible contenía concentraciones informadas del analito que la técnica no permitía detectar y dichas fortificaciones se realizaron a dos niveles. Sin la posibilidad de contar con un RM o CRM para evaluar la eficiencia de la extracción de Pb utilizando TMAH, se decidió llevar adelante la determinación de este analito mediante otra técnica (ver Sección 5.2).

Tabla 5.13: Parámetros de desempeño obtenidos para la determinación de Pb mediante ETAAS

Parámetro	Pb
Rango lineal (µg L ⁻¹)	4,97 – 10,00
LD (mg kg ⁻¹) / LD (µg L ⁻¹)	0,060 / 1,490
LC (mg kg ⁻¹) / LC (µg L ⁻¹)	0,199 / 4,967
Precisión (n=6)	5,2 %
Veracidad (n=6)*	90 ± 5 % ^a
Medio alcalino	3,75 % m /v TMAH en metanol

^a Muestras fortificadas; *promedio ± desviación estándar

Optimización de las determinaciones de Se

Desafortunadamente, las determinaciones de Se presentaron incompatibilidades con el medio alcalino. Se probaron diferentes técnicas para su determinación como ser HG-AAS, HG-MIP OES y ETAAS, para evaluar si las mismas eran adecuadas para cumplir los objetivos del trabajo.

Si bien al trabajar con HG-AAS se logró realizar una curva de calibración con ajuste lineal hasta $10 \mu\text{g L}^{-1}$, las muestras no presentaron señal alguna. Al trabajar con HG-MIP OES, se logró realizar una curva de calibración que cumplió con los criterios de R^2 e inspección visual, pero las muestras tampoco presentaron señal alguna. En la Figura 5.5 se puede visualizar lo que sucedía durante el proceso en la cámara de separación gas líquido al intentar medir las muestras en el sistema, esto fue similar a lo que ocurría en el sistema HG-AAS, donde probablemente la formación de esta espuma no permitía la correcta llegada del hidruro correspondiente al sistema de detección.



Figura 5.5: Formación de espuma durante la determinación de Se mediante HG-MIP OES

Por su parte, en la determinación mediante ETAAS, no se encontraron condiciones óptimas para la determinación de este analito. Se probó trabajar con modificadores de matriz como Pd o la combinación de Pd+Mg(NO)₃, que en otras publicaciones ha presentado buenos resultados en tejidos animales luego de la extracción con TMAH (Oss Giacomelli et al., 2002). Sin embargo, no se logró un buen desempeño durante la optimización de la temperatura de atomización al utilizar el CRM de músculo bovino, llegando a probar temperaturas tan extremas de hasta 3000 °C. Otros autores han obtenido buenos resultados utilizando la mezcla Pd+ácido cítrico (Chen & Marshall, 1999). No se llegó a evaluar el desempeño de este último, quedando como una posible perspectiva de trabajo a futuro, ya que existen pocas publicaciones que presenten la determinación de Se luego de una extracción alcalina. De todas formas, destacar que las

publicaciones aquí mencionadas hacen referencia a la determinación de Se en CRM o RM, no se han encontrado hasta el momento trabajos que describan la determinación del elemento en muestras reales luego de una extracción alcalina. También se probaron hornos de grafito con recubrimiento pirolítico y sin recubrimiento, con el objetivo de evaluar si existía una diferencia entre ambos, pero no se logró ningún resultado concluyente.

Por otro lado, también se trabajó con la técnica ICP-OES, la cual ha presentado buenos resultados en la determinación de Se en alimentos luego de la extracción alcalina con TMAH (Ribeiro et al., 2003). Estos ensayos, se llevaron a cabo durante la pasantía en la Universidad Federal de San Carlos para la determinación de Cu, Zn, Mo y Se, luego de la extracción alcalina asistida con bloque térmico previamente descripta, sin obtener resultados satisfactorios para la determinación del Se.

Determinación de Zn, Cu, Mo y Se mediante ICP-OES

Esta determinación se realizó en el marco de la pasantía en Brasil, es así que en este caso el tratamiento de muestras se realizó utilizando un bloque térmico según la sección 4.4.3.

Al igual que con las muestras todos los patrones utilizados contenían el medio 3,75% m/v de TMAH y debieron ser ajustados a $\text{pH} < 9$ con HNO_3 . Como se mencionó anteriormente, la necesidad del ajuste estaba dada por la instrumentación, pues no se recomienda trabajar con pH mayores a 9 en el sistema de medición utilizado, ya que puede dañar los componentes del equipo. Aquí es interesante destacar, que dada la poca capacidad de amortiguación de los patrones con respecto a las muestras, el hecho de utilizar ácido concentrado o diluido, no permitió que el pH final de los patrones ($\text{pH}=2$) fuera igual al de las muestras ($\text{pH}=8$) luego del ajuste

Se observó "efecto memoria" entre los patrones y los blancos de muestra, por este motivo, se decidió realizar un lavado con HNO_3 1% v/v para evitar dicho efecto. Este tipo de efecto se produce cuando la limpieza entre los patrones o entre las muestras no es suficiente, pudiendo de esta forma quedar restos de analito de la muestra anterior y generar señales en las medidas siguientes. Por lo tanto, luego de realizada la curva de calibración se realizó una limpieza con HNO_3 1% v/v, la cuál se llevó a cabo mediante el enjuague con agua ultrapura. Esto se debe a que durante el contacto del ácido con las muestras podía ocurrir la precipitación de proteínas, generando así obstrucciones en el sistema y no permitiendo determinaciones cuantitativas de los analitos en estudio. Hay que tener en cuenta que los elementos en estudio se encuentran en su mayoría unidos a proteínas, y la precipitación de éstas puede llevar a la precipitación de éstos.

Validación del método mediante ICP-OES

El rango lineal evaluado para cada uno de los elementos en todas las líneas, se presenta en la Tabla 5.14. Para todos los casos, se presentó un valor de $R^2 < 0,99$. En el caso del Se no se evaluó la linealidad más allá de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, debido a las bajas concentraciones esperadas en la muestra.

Tabla 5.14: Rangos lineales evaluados mediante ICP-OES

Elemento	Rango (mg L^{-1})
Zn	1,0 – 10,0
Cu	1,0 – 10,0
Mo	0,05 – 0,5
Se	0,01 – 0,05

También, se calcularon los LD y LC siguiendo el criterio $3s_b/m$ y $10 s_b/m$, donde s era la desviación estándar de 10 señales de blanco analizadas de forma independiente y m la pendiente de la curva de calibración. Las señales blanco (cuentas) promedio del Cu fueron 29, 171 las de Zn, 6 en Se y 4 las del Mo. En todos los casos, esta señal corresponde a menos del 5% de la señal del primer patrón de la curva de calibración. En la Tabla 5.15 se presentan los resultados obtenidos para cada analito a cada longitud de onda evaluada mediante ICP-OES.

Tabla 5.15: Límites de detección y cuantificación para ICP-OES

Elemento	λ (nm)	LD (mg L^{-1})	LC (mg L^{-1})	LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Cu	324,750	0,003	0,010	0,12	0,40
	327,396	0,003	0,011	0,13	0,44
Zn	213,856	0,016	0,054	0,64	2,15
	202,548	0,017	0,057	0,68	2,27
Mo	202,030	0,002	0,008	0,097	0,33
	204,598	0,005	0,016	0,19	0,63
Se	203,985	0,050	0,017	0,21	0,68

En el caso de la línea 196.090 nm del Se, se obtuvieron señales negativas, por lo que no fue posible calcular los límites.

Por otra parte, la veracidad del método se evaluó utilizando el CRM de músculo bovino y el RM de hígado bovino, de igual forma que en los casos anteriores, utilizando los R(%). En la Tabla 5.16 se presenta el rango de resultados obtenidos. Como se puede observar, los resultados fueron muy variables ya que se evaluó para el hígado bovino ($n=12$) y para el músculo ($n=7$). Estas variaciones en la precisión y la veracidad no fueron aceptables. De todas formas, se evaluó la

precisión con el RM de hígado bovino (n=6) expresada como RSD(%). Para cada elemento se utilizó la línea que presentó mayor veracidad expresada como R(%).

Tabla 5.16: Veracidad y precisión para ICP-OES

	Elemento	R (%)	RSD (%)
RM Hígado Bovino	Cu	0,1 – 94	80
	Zn	31 – 79	19
	Mo	21 – 100	40
CRM Músculo Bovino	Cu	45 – 101	-
	Zn	42 – 81	-

En el caso de Se, no se obtuvieron buenas recuperaciones. Esto pudo deberse a la baja concentración del analito en el CRM o a la baja sensibilidad obtenida (Tabla 5.14). Por lo cuál se concluyó que no era posible su determinación mediante ICP-OES. Esto se evidenció aún más al realizar los cálculos de LD y LC, presentados en la Tabla 5.15. No obstante, no se descarta que la extracción alcalina no fuera cuantitativa para este elemento.

Dado que los parámetros de desempeño no cumplieron con los criterios establecidos, y teniendo en cuenta que los métodos previamente validados no requirieron ajuste de pH, es que se concluyó que éste paso podría estar generando alguna interferencia en la determinación analítica y no se continuó en esta tesis profundizando en este aspecto.

5.1.3) Aplicación en muestras de carne bovina

Una vez concluidas las optimizaciones y validaciones correspondientes, se analizaron muestras de carne bovina. La cantidad de muestras analizadas, dependió de la técnica empleada para la determinación de los analitos en cuestión.

La preparación de la muestra consistió en 0,25 g de la misma previamente pulverizada con el agregado de 1,50 mL de TMAH al 25% en metanol, y 5,00 mL de agua ultrapura, que se colocaron en tubos de vidrio tipo pirex, se agitaron durante 30 segundos en vórtex y se dispusieron en un baño termostatzado durante 60 minutos a 85°C. Se realizaron en todos los casos triplicados de las muestras y de los blancos de extracción. Luego de pasados los 60 minutos, se centrifugaron a 28000 *g* y se filtraron por membrana de 0,45 μ m. Las determinaciones de Cu y Zn se realizaron mediante FAAS, mientras que las de Mo y Cd mediante ETAAS.

En la Tabla 5.17 se presentan los rangos de los elementos evaluados que se obtuvieron para cada corte. La diferencia entre la cantidad de muestras tiene que ver con los costos y tiempos de determinación de cada elemento. En todos los casos, las muestras se analizaron por triplicado.

Cabe mencionar que en todos los casos, los valores de blanco obtenidos resultaron no detectables (menor a 0,63 mg L⁻¹ de Zn; 0,53 mg L⁻¹ de Cu; 0,015 mg L⁻¹ de Mo; 0,021 mg L⁻¹ de Cd).

Tabla 5.17: Niveles mínimos y máximos (mg kg⁻¹) de Cu, Zn, Mo y Cd en las muestras analizadas

	Cu (n=40)	Zn (n=40)	Cd (n=10)	Mo (n=10)
Asado	1,39 ± 0,02 / 2,9 ± 0,3	105 ± 10 / 222 ± 6	ND	0,0595 ± 0,0042 / 0,1161 ± 0,0079
Cuadril	1,7 ± 0,1 / 4,1 ± 0,5	49 ± 10 / 144 ± 10	ND	0,0494 ± 0,0029 / 0,0590 ± 0,040

Promedio ± desviación estándar (n=3) (base seca).

Considerando que el valor promedio de la humedad de la carne cruda es 74% (Pistón et al, 2020b), en la Tabla 5.18 se presentan los resultados de los analitos evaluados en base fresca.

Tabla 5.18: Niveles mínimo y máximos (mg kg⁻¹) de Cu, Zn, Cd y Mo en las muestras analizadas

	Cu (n=40)	Zn (n=40)	Cd (n=10)	Mo (n=10)
Asado	0,361 ± 0,001 / 0,7 ± 0,1	27 ± 3 / 58 ± 2	ND	0,015 ± 0,001 / 0,030 ± 0,002
Cuadril	0,44 ± 0,03 / 1,1 ± 0,1	13 ± 3 / 37 ± 3	ND	0,013 ± 0,001 / 0,02 ± 0,01

Promedio ± desviación estándar (n=3) (base fresca).

Los valores de Cu y Zn obtenidos, se encuentran en el orden de lo reportado por Cabrera & Saadoun, quienes analizaron muestras de carne bovina de nuestro país 0,2 – 1,1 mg kg⁻¹ y 23 – 37 mg kg⁻¹ en base fresca, respectivamente (Cabrera et al., 2010; Cabrera et al., 2014). Además, en un estudio reciente, Pistón et al. presentaron los resultados de los cortes aquí evaluados mediante digestión ácida asistida con microondas y posterior determinación mediante MIP OES, los cuales sí son del orden de los valores aquí obtenidos 0,7 – 0,9 mg kg⁻¹ de Cu y 28 – 58 mg kg⁻¹ de Zn en base fresca (Pistón et al., 2020). Vale mencionar que estos niveles son del orden de los reportados no solo a nivel nacional, sino también a nivel internacional, para ambos analitos. El servicio *Agricultural Marketing Service* (AMS) perteneciente al *U.S. Department of Agriculture* (USDA), reporta niveles de Zn de 42 mg kg⁻¹ y niveles de Cu de 0,6 mg kg⁻¹ en carne vacuna cruda en base fresca (USDA, 2020). Asimismo, el portal *The Norwegian Food Composition Table* (FCT), presenta valores entre 22 – 49 mg kg⁻¹ de Zn y entre 0,2 – 0,6 mg kg⁻¹ de Cu, para la carne vacuna cruda en base fresca (FCT, 2006).

Resulta muy interesante observar el contenido de Zn en ambos cortes. Se puede ver que en el asado, los niveles del metal son más elevados. Esto puede deberse al rol que cumple este

elemento en los sistemas biológicos y procesos metabólicos. Según la literatura consultada, la cantidad de Zn presente en la carne podría estar relacionada con la cantidad de tejido conectivo presente en el corte, observándose menores niveles del elemento en aquellos cortes con menos cantidad de tejido conectivo (Seideman et al., 1989; Rhee et al., 2004). Si bien son pocas las muestras analizadas en esta tesis, cuyos objetivos apuntan al desarrollo de métodos analíticos novedosos, en el trabajo global del proyecto se confirmó esta tendencia de menores niveles de Zn en el corte de cuadril frente al asado, habiendo analizado un número mayor de muestras (Pistón, et al., 2020b).

Todas las muestras analizadas presentaron valores de concentración de Cd menores al respectivo LD, encontrándose los niveles muy por debajo del límite máximo establecido por la normativa nacional de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ base fresca, garantizando de esta forma la inocuidad de los cortes analizados, desde el punto de vista de este contaminante inorgánico (MERCOSUR, 2013).

En el caso de Mo, los resultados obtenidos son novedosos, ya que no se encuentran reportes de este analito en carnes nacionales, y de hecho, aunque es un elemento esencial, muy pocas publicaciones hacen mención a sus niveles en alimentos de origen animal (Vázquez-Gonzalez et al., 1989). Recientemente, en paralelo a este trabajo de tesis, se reportaron valores de Mo en carne bovina nacional por parte del equipo de investigación, utilizando otra técnica de extracción, y los valores obtenidos fueron del orden de los aquí reportados ($0,11 - 0,85 \text{ mg kg}^{-1}$ en base seca) (Machado & Tissot, 2020).

En cuanto a la determinación de Pb, se entendió que dados los valores de LC obtenidos, no correspondía realizar un estudio de las muestras de carne bovina, ya que el mismo límite es mayor que el valor máximo permitido por el MERCOSUR. Por este motivo, se optó por realizar la determinación de este contaminante inorgánico mediante ICP-MS luego de una digestión asistida por microondas, durante la pasantía con el grupo GAIA (Sección 5.2.2).

La misma decisión se tomó con respecto a Se. Considerando que no se pudieron encontrar las condiciones óptimas de extracción y determinación del analito, se determinaron los niveles del mismo mediante ICP-MS, luego de la digestión ácida asistida por microondas descrita en la Sección 5.2.

Esto refuerza la importancia de estas instancias de intercambio, ya que sin esta posibilidad varios de los objetivos propuestos en la tesis no se hubieran podido concretar.

5.2 Digestión ácida

En esta sección se presentan los resultados obtenidos con el método que fue considerado como referencia. En la misma se encuentran los datos obtenidos en nuestro laboratorio, así como aquellos realizados en el marco de la pasantía con el Grupo GAIA. Esta parte del trabajo realizado tuvo por objeto contar con valores de comparación para el método de extracción alcalino desarrollado analizando las mismas muestras. Esto contribuye establecer la confiabilidad de los resultados que arroja el nuevo método frente a otros ampliamente utilizados.

5.2.1) Optimización y validación

Determinación de Cu y Zn

Debido a que la tesis se enmarcó en un proyecto investigación, como se explicó previamente, las determinaciones de algunos analitos mediante digestión ácida fueron realizadas por el grupo de trabajo. De esta forma, los valores de Zn y Cu considerados como valores de referencia para cada muestra, fueron obtenidos mediante digestión ácida asistida por microondas y posterior determinación por MIP OES. El programa de digestión de las muestras utilizado está descrito en la Sección 4.5.2, mientras que las condiciones de medida instrumental, así como los parámetros de desempeño de dicho método, se encuentran en el ANEXO I.

Optimización y validación de la determinación de Cd y Mo mediante ETAAS

Se debió sí, realizar la optimización y validación para la determinación de Cd y de Mo. Se desarrolló un método para la determinación de estos analitos, en el cual se realizó una preparación de las muestras clásica (ácida asistida por microondas, según Sección 4.5.2), y posterior análisis mediante ETAAS. Como se mencionó en las anteriores optimizaciones de ETAAS, la evaluación de diferentes modificadores de matriz es fundamental para garantizar la correcta determinación de los analitos, además de realizar la optimización de las temperaturas de pirólisis y atomización (Welz & Sperling, 1999).

Para realizar la optimización de estos dos analitos, se utilizó el RM de hígado bovino ya que no estaban presentes en el CRM de músculo. Las condiciones óptimas de análisis, así como de los modificadores, se seleccionaron según el desempeño evaluado en forma de R(%), al igual que en secciones anteriores.

Finalmente, en lo que respecta al uso de modificadores químicos, en el caso de Mo se observó el mejor desempeño con el uso de 5 µg de Pd, si bien se probaron combinaciones con Pd-Mg(NO₃)₂, cambiando las proporciones. Además, según la literatura consultada, están reportadas

determinaciones que prescinden del uso de modificadores (Vazquez-Gonzalez et al., 1999; Machado & Tissot, 2020), condición que fue evaluada pero que no proporcionó buenas recuperaciones en este caso. Para el caso de Cd, también fue necesario el uso de 5 µg de Pd como modificador de matriz, si bien se probó con el modificador universal Pd-Mg(NO₃)₂ en distintas proporciones (Schlemmer & Welz, 1986).

En lo que respecta a la optimización de las temperaturas de pirólisis y atomización, se comenzó su búsqueda en intervalos de 200 °C entre 300 – 2000 °C para la primera y entre 1200 – 2800 °C para la segunda. Una vez visualizadas las zonas donde se encontraban las mejores condiciones, se continuó una evaluación más exhaustiva de a 50 °C, donde finalmente se llegó a que las temperaturas de pirólisis y atomización óptimas fueron 1800 °C/2750 °C para Mo y 500 °C/1400 °C para Cd, respectivamente.

Una vez optimizadas las condiciones de medida se procedió a la validación de los métodos desarrollados. En la tabla 5.19 se presenta los parámetros de desempeño evaluados.

Tabla 5.19: Parámetros de desempeño mediante digestión ácida y determinación por ETAAS

Elemento	Mo	Cd
Rango lineal	0,80 – 60,0 µg L ⁻¹	0,05 – 4,00 µg L ⁻¹
LD (mg kg ⁻¹)/(µg L ⁻¹)	0,016 / 0,80	0,0010 / 0,051
LC (mg kg ⁻¹)/(µg L ⁻¹)	0,054 / 2,68	0,0034 / 0,17
Precisión RSD (n=6)	3,4%	3,2%
	95 ± 6 ^a	91 ± 4 ^a
Veracidad (R%) (n=6)	106 ± 9 ^b (n=4)	118 ^c ± 9 (I nivel)
	81 ± 4 ^c	111 ^c ± 3 (II Nivel)

^aRM hígado bovino, ^bCRM hígado de bagre, ^cFortificaciones, I nivel: primer tercio de la curva de calibración, II nivel: último tercio de la curva de calibración.
Veracidad: Promedio ± desviación estándar.

La linealidad fue evaluada para cada elemento mediante la construcción de curvas de calibración de seis puntos, incluyendo el blanco. En ambos casos, se observó una buena linealidad con coeficientes de determinación (R²) mayor que 0,999. En el caso de Mo, la linealidad fue hasta 60,0 µg L⁻¹, mientras que para Cd fue hasta 4,00 µg L⁻¹. Una vez establecidas las condiciones de trabajo, se probó realizar las determinaciones con un medio menos ácido en los patrones. Al realizar la curva utilizando HNO₃ 0,1% v/v, no se observaron inconvenientes en el desempeño de los análisis evaluado como EM (ver Sección 5.1.2), por lo que se continuó trabajando de esta forma, ya que los medios menos ácidos aumentan la vida útil de los hornos de grafito.

Los LD y LC se calcularon para cada elemento como $3s_b/m$ y $10 s_b/m$, respectivamente, donde s era la desviación estándar de 10 réplicas ($n=10$) del blanco y m era la pendiente de la curva de calibración. Los valores de LD obtenidos, expresados en base seca, fueron $0,0010 \text{ mg kg}^{-1}$ (Cd) y $0,016 \text{ mg kg}^{-1}$ (Mo). Estos límites, en particular el de Cd, son adecuados para el análisis de estos elementos en muestras de carne bovina.

La precisión expresada como RSD(%) luego del análisis de 6 réplicas del RM de hígado bovino fue menor al 4% en ambos casos. Para la evaluación de la veracidad, se utilizó RM de hígado bovino que contenía ambos analitos y CRM de hígado de bagre que contenía solamente Mo. Se realizaron también fortificaciones, a un nivel para Mo y a dos niveles para Cd. Además de los R(%) ($n=6$), se llevó a cabo una prueba t de Student para comparar los valores obtenidos con los valores certificados (Miller & Miller, 2010). Los resultados de la prueba estadística se presentan en la Tabla 5.20. Los valores de $t_{\text{experimental}}$ fueron menores al valor $t_{\text{teórico}}(0,05, 3) = 3,182$ lo cual indicaba que a un nivel de confianza del 95% las concentraciones no diferían significativamente de las certificadas. En este caso no realizó ensayo de robustez, ya que las variables críticas en este método, se encuentran en la etapa de digestión de la muestra, la cual no compete a esta tesis, sino que la misma ya era proporcionada como disolución. Por su parte, la selectividad tampoco fue evaluada, ya que este método era la de referencia para comprar el alternativo, objeto de esta tesis, por lo que esta cifra en particular no fue evaluada. No obstante, los parámetros de desempeño obtenidos demuestran que los métodos desarrollados son adecuados la determinación de estos elementos en carne bovina.

Tabla 5.20: Resultados obtenidos para materiales de referencia y comparación estadística

Elemento	Mo	Cd
Valor informado (mg kg^{-1})	$4,07 \pm 0,21^a / 0,95 \pm 0,10^b$	$0,1047 \pm 0,0079^a$
Concentración promedio obtenida \pm desviación estándar (mg kg^{-1}) ($n=4$)	$3,86 \pm 0,16^a / 1,04 \pm 0,11^b$	$0,106 \pm 0,015$
$t_{\text{teórico}}(0,05; 3)$	3,18	3,18
$t_{\text{experimental}}$	$3,10^a / 1,57^b$	0,25

^aRM de hígado bovino, ^bCRM de hígado de bagre.

Determinación de Se

Se evaluaron varias técnicas para la determinación de Se, considerando los niveles previamente reportados en muestras nacionales entre $0,42 - 1,3 \text{ mg kg}^{-1}$ en base fresca (Cabrera & Saadoun, 2014; Ramos et al., 2012; Saadoun & Cabrera, 2012). La primera técnica en evaluarse fue ETAAS, luego de realizada la digestión según sección 4.5.2, ya que era de los métodos más utilizados para

la determinación según la literatura. Como en las anteriores optimizaciones, se evaluó el R(%) del CRM de músculo bovino, utilizando diferentes modificadores como Pd, Pd-Mg(NO₃)₂, Pd-(NH₄)H₂PO₄ y Mg(NO₃)₂-(NH₄)H₂PO₄, en distintas porporciones, sin la obtención de señal analítica alguna.

Por este motivo, se decidió explorar la realización de las determinaciones mediante HG-AAS. Para ello, se llevó a cabo una pre-reducción abierta con ácido sulfámico y HCl concentrado, sobre el digesto obtenido luego del tratamiento con microondas tal como se describe a continuación: a 10,00mL de muestra se le agregó de 10,00 mL de ácido sulfámico 10% m/v y 10,00 mL de HCl 12 mol L⁻¹ en matraces Erlenmeyer. La mezcla se sometió a una hora de calentamiento en plancha calefactora, controlando que la evaporación ocurriera sin proyecciones y sin llegar a sequedad, con pequeños agregados de agua ultrapura de ser necesario. Una vez reducido el volumen a aproximadamente 10 mL, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se realizó el trasvase cuantitativo, y se completó con agua ultrapura a 10,00 mL. El sistema utilizado para la formación del hidruro fue en batch, adicionando NaBH₄ 1,5 %m/v preparado en NaOH 0,5 %m/v. El gas portador utilizado en este caso fue N₂ de alta pureza. Las medidas se realizaron a 196,0 nm, utilizando corrector de fondo de deuterio. La señal utilizada fue la absorbancia (altura de pico). Se realizó el mismo procedimiento para los patrones de la curva de calibración. A partir de una disolución patrón de Se de 1000 mg L⁻¹, se preparó una disolución intermedia de 100 µg L⁻¹, y luego disoluciones de 2,5; 5,0; 7,5 y 10,0 µg L⁻¹, además del blanco correspondiente. Se realizaron por duplicado los patrones de la curva y los blancos. Este método mostró ser eficiente para la determinación de Se en carne bovina, por lo cual se procedió con su validación. Cabe mencionar, que el agregado de ácido sulfámico permite disminuir las interferencias debidas al uso del HNO₃, en la preparación de la muestra (Lopes Nunes et al., 2005; Pistón et al., 2009).

La linealidad fue evaluada mediante la construcción curvas de calibración de seis puntos. Los valores de LD y LC fueron calculados utilizando el criterio 3s_b/m y 10 s_b/m. La veracidad fue expresada como R(%), mediante el análisis del CRM de músculo bovino (n=3) en base seca. En la Tabla 5.21 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 5.21: Parámetros de desempeño en la determinación de Se mediante HG-AAS

Parámetro	Se
Rango lineal (µg L ⁻¹)	0,40 – 10,00
LD (mg kg ⁻¹) / (µg L ⁻¹)	0,028 / 0,40
LC (mg kg ⁻¹) / (µg L ⁻¹)	0,095 / 1,3
Veracidad, R(%) (n=3)	95 ± 4

Promedio ± desviación estándar (n=3).

Sin embargo, por más que estas condiciones fueron óptimas, la precisión evaluada como RSD(%) presentaba variaciones mayores al 20%. Por este motivo, se planteó la posibilidad de mejorar las condiciones de pre-reducción o de generación del hidruro.

Considerando que el Se era uno de los analitos de interés en el marco del proyecto, se comenzó en forma paralela, por parte del grupo de investigación, su determinación mediante HG-MIP OES. Finalmente, se decidió continuar con este método, por lo que su optimización y validación no competen a este trabajo de tesis, pero se pueden encontrar dichas condiciones y parámetros en el ANEXO I.

Optimización y validación de la determinación de Se, Mo, Cd y Pb mediante ICP-MS

Por lo general, cuando se hacen digestiones ácidas asistidas por microondas, como en éste caso, siendo ya bien conocidos los métodos de digestión, se pueden aplicar programas del propio equipamiento y conseguir una destrucción total de la materia orgánica. De todas formas, se puede evaluar el desempeño de las mismas, por ejemplo, mediante el análisis del contenido de carbono residual. En este caso no se realizó dicha evaluación, ya que se consideró que con las disoluciones límpidas y sin partículas en suspensión obtenidas, se habían liberado en forma cuantitativa los elementos de interés de la matriz compleja (Figura 5.6). La digestión realizada se encuentra descrita en la sección 4.5.1.

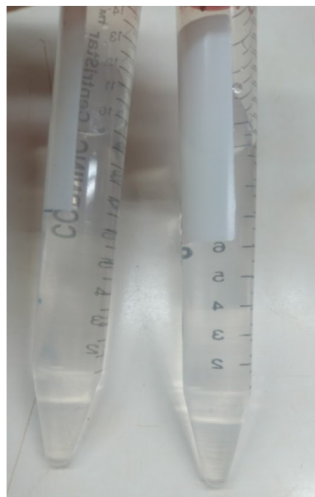


Figura 5.6: Muestras luego de una digestión ácida

Debido a que se esperaba que los niveles de Mo, Cd y Pb fueran muy bajos o no detectables en las muestras de carne, se procedió a realizar las determinaciones de los mismos mediante ICP-MS, teniendo en cuenta que se trata de una técnica muy poderosa en lo que respecta a los valores de LD y LC alcanzados. Asimismo, se decidió utilizar este método para la determinación de Se, dado los problemas presentados previamente durante el desarrollo de los métodos analíticos. Para el caso de Pb, ésta fue la técnica considerada como referencia.

Las determinaciones mediante ICP-MS se realizaron utilizando el sistema HMI que consiste en la introducción de un flujo de gas argón entre la cámara de pulverización y el soplete para promover una dilución del aerosol. Esto permite el análisis directo de muestras que contienen gran cantidad de sólidos disueltos y acidez residual elevadas, lo que reduce la densidad de aerosoles y el vapor de agua cargado en el plasma. El sistema finalmente, permite introducir muestras de hasta un 3% de sólidos disueltos (Agilent Technologies, 2008; Barros et al., 2018). Esto resultó beneficioso, ya que no hubo necesidad de dilución de la muestra. En la Figura 5.7 se presenta el esquema de éste sistema. Mientras que en el Anexo II se presentan las condiciones instrumentales utilizadas en las mediciones.

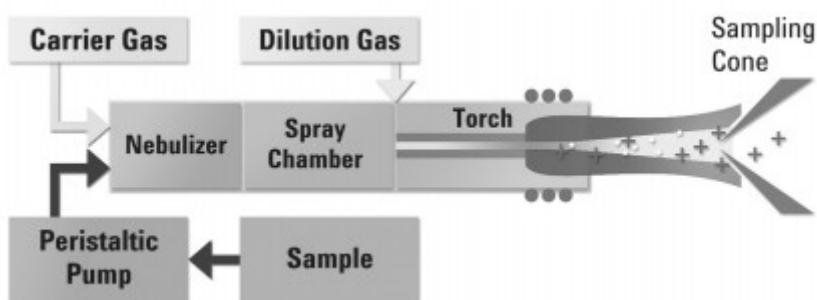


Figura 5.7: Diagrama en bloque del sistema HMI. Extraído de: Agilent Technologies, 2008

Se evaluó el desempeño de cuatro patrones internos: Ga, Ge, Pd e Y. Los patrones internos son sustancias que se añaden a las muestras y patrones en una concentración conocida, con el objetivo de facilitar la determinación cuantitativa de los componentes de la muestra. Los patrones internos, se suelen utilizar para corregir posibles variaciones en la cuantificación del analito, dadas por las posibles interferencias causadas por las interacciones entre éste y los componentes de la muestra (IUPAC, 2021; Thomas, 2004).

Se evaluaron varios isótopos de los elementos de interés tal como se presentan en la Tabla 5.22. Además, se estudió la necesidad de utilizar una celda de colisión con He, para eliminar las posibles interferencias poliatómicas.

Tabla 5.22: Isótopos evaluados para la determinación de Pb, Se, Mo y Cd

Analito	Se	Mo	Cd	Pb
	78	95	111	206
Isótopos	82	96	112	207
	-	98	114	208

La selección de los isótopos se realizó mediante la evaluación de los respectivos R(%) utilizando el CRM de músculo bovino para el caso del Se y del RM de hígado bovino para el caso de Mo, Cd y

Pb. Finalmente, los mejores resultados se obtuvieron sin el uso de la celda de colisión de He y utilizando Y⁸⁹ como patrón interno ya con éste se obtuvo una mejor reproducibilidad.

Una vez seleccionados los isótopos, patrón interno y el no uso de celda de colisión, se procedió a la validación del método. Los parámetros de desempeño estudiados fueron linealidad, LD, LC, precisión (repetibilidad) y veracidad. La precisión y la veracidad se evaluaron utilizando el CRM de músculo bovino para Se y el RM de hígado bovino para Cd, Pb y Mo. Los resultados se presentan en la Tabla 5.23.

La linealidad se evaluó para cada elemento mediante la construcción de curvas de calibración de seis puntos, cada nivel por triplicado. Se observó buena linealidad hasta 10,0 µg L⁻¹ para Cd y Pb, y 25,0 µg L⁻¹ para Se y Mo, con coeficientes de determinación (R²) mayores a 0,999, en todos los casos. Los límites LD y LC se estimaron para cada elemento como 3 s_b/m y 10 s_b/m respectivamente, donde s_b era la desviación estándar de 10 réplicas (n = 10) del blanco y m la pendiente de la curva de calibración. Los LD obtenidos para la carne bovina fueron de 0,003; 0,007; 0,024 y 0,011 mg kg⁻¹ para Cd, Pb, Se y Mo, respectivamente.

Tabla 5.23: Parámetros de desempeño obtenidos mediante el tratamiento ácido

Parámetro	Se 82	Mo 96	Cd 112	Pb 206
Rango (ug L ⁻¹)	0,235-24,3	0,11-24,7	0,026-9,5	0,066-9,2
LD (mg kg ⁻¹)/(µg L ⁻¹)	0,024/0,24	0,011/0,11	0,0026/0,026	0,0066/0,066
LC (mg kg ⁻¹)/(µg L ⁻¹)	0,078/0,78	0,038/0,38	0,0088/0,088	0,022/0,22
Precisión, RSD(%)	8,1	6,1	8	3,8
Veracidad, R(%)	82 ± 8 ^a	83 ± 1 ^b	92 ± 9 ^b	96 ± 10 ^b
		107 ± 9 ^c	124 ± 1 ^c	114 ± 1 ^c

^aCRM Músculo Bovino, ^bRM Hígado Bovino, ^c Fortificaciones.
Veracidad: Promedio ± desviación estándar (n=6).

Por su parte, la precisión expresada como RSD(%) luego del análisis de 6 réplicas de cada material de referencia fue menor al 9% para todos los analitos estudiados, lo cual se consideró adecuado para esta aplicación. Para la evaluación de la veracidad, además de los R(%), se realizó una prueba *t* de Student para comparar los valores obtenidos con los valores certificados. Los resultados se presentan en la Tabla 5.24. Los valores t_{experimental} fueron menores al valor t_{teórico} (0,05, 5) = 2,57, lo que indica que a un nivel de confianza del 95%, las concentraciones no difirieron significativamente del valor certificado o informado. Además, para el caso del Mo, Cd y Pb se realizaron fortificaciones en las muestras de músculo bovino. Por adecuación al uso del tiempo, durante la pasantía no se realizó ensayo de robustez. No obstante, la evaluación de la selectividad para el Cd y Mo, se presentó en la Tabla 5.12. La evaluación de éste parámetro no fue posible en

el caso del Pb y Se, por no lograr la determinación de éstos, utilizando otros métodos. Finalmente, las cifras de mérito obtenidas demuestran que el método desarrollado es preciso y veraz para la determinación de estos elementos, lo cuales se esperan encontrar en niveles de concentración muy bajos.

Como se puede observar, los parámetros de desempeño del método desarrollado cumplieron con los criterios de validación adecuados para su aplicación en muestras de carne, siendo las mismas confiables para la determinación de estos elementos a bajos niveles de concentración en carne bovina. Esto era de esperarse, dadas las ventajas de la técnica empleada, siendo ésta una de las más utilizadas para el análisis de alimentos (Thomas, 2004). Una de las mayores ventajas, esta dada por los bajos valores de LD y LC alcanzados durante la determinación de contaminantes traza (Forte & Bocca, 2007; Gerber et al., 2008; Kim et al., 2015). Utilizando ICP-OES, se han reportado límites entre $0,3 - 1 \mu\text{g kg}^{-1}$ y $0,3 - 3 \mu\text{g kg}^{-1}$ para Cd y Pb respectivamente, en la determinación muestras de carne. Éstos se encuentran entre 10 y 30 % aproximadamente por encima de los resultados aquí reportados (Rodríguez-Marín, 2019; Zeinali et al., 2019).

Tabla 5.24: Valores obtenidos de los materiales de referencia y comparación estadística

Analito	Valor certificado (mg kg^{-1})	Concentración obtenida (mg kg^{-1})	t experimental	$t(0,05;5)$
Se	$0,45 \pm 0,04^a$	$0,41 \pm 0,03$	2,40	2,57
Pb	$0,0806 \pm 0,0078^b$	$0,0774 \pm 0,003$	2,45	2,57
Cd	$0,1047 \pm 0,0079^b$	$0,0963 \pm 0,007$	2,43	2,57
Mo	$4,07 \pm 0,21^b$	$4,27 \pm 0,62$	0,84	2,57

^aCRM de músculo bovino, ^bRM de hígado bovino. Promedio \pm desviación estándar ($n=6$).

Una alternativa puede ser la determinación mediante ETAAS que permite obtener valores de LD y LC comparables a los obtenidos mediante ICP-MS. Sin embargo, la ventaja de esta última está dada por la posibilidad de determinar los analitos en forma multi-elemental. ETAAS es una técnica monoelemental, que conlleva un largo tiempo de análisis cuando se trata de la determinación de varios elementos (Skoog et al., 2008; Thomas, 2004). La técnica ICP-OES también presenta la ventaja de ser multielemental, como se mencionó anteriormente (Sección 1.2.3), pero los límites alcanzados no son siempre óptimos para el análisis de elementos traza. Sin embargo, a pesar de ser ICP-MS una poderosa técnica para la determinación de contaminantes inorgánicos, son escasas las publicaciones relacionadas con carne bovina (Gerber et al., 2008; Kim et al., 2015). Esto puede deberse al alto costo asociado al equipamiento y a su mantenimiento (Thomas, 2004).

5.2.2) Aplicación en el análisis de muestras

Se realizó la digestión de las muestras según la sección 4.5.1 y la determinaciones de Mo mediante ETAAS se realizaron en 10 muestras, es decir, 5 animales, 2 cortes por animal (cuadril y asado). Por su parte, la determinación de Cd se realizó en 6 muestras, 3 animales, pero debido a que no se obtuvieron resultados detectables no se continuo con el análisis de nuevas muestras. En todos los casos el análisis de las muestras se hizo por triplicado y se incluyeron medidas del RM de hígado bovino y fortificaciones como parte del aseguramiento de la calidad. Los R(%) obtenidos estuvieron entre 81 – 120% para ambos analitos, considerándose apto para la aplicación. En la Tabla 5.25 se presentan los resultados de Mo, ya que para todos los casos el Cd fue no detectable al igual que los blancos analizados en ambos analitos.

Tabla 5.25: Concentración de Mo en muestras de carne bovina en base seca mediante ETAAS

Muestra	Asado (mg kg ⁻¹)	Cuadril (mg kg ⁻¹)
1	0,116 ± 0,014	0,0600 ± 0,0058
2	0,0454 ± 0,0048	0,0482 ± 0,0020
3	0,104 ± 0,010	0,0313 ± 0,0031
4	0,059 ± 0,024	0,0351 ± 0,0090
5	ND	0,0232 ± 0,0019

Promedio ± desviación estándar (n=3).

En la Tabla 5.26 se presentan los resultados obtenidos para las muestras de asado en base seca, luego de las determinaciones de Cd, Mo, Pb y Se mediante ICP-MS realizadas durante la pasantía con el Grupo GAIA (digestión ácida descrita en la Sección 4.5.1). Cada muestra se analizó por triplicado al igual que los blancos. Vale mencionar que en todos los casos los blancos presentaron valores no detectables para todos los analitos.

Tabla 5.26: Niveles de Cd, Pb, Se y Mo en muestras de asado determinados por ICP-MS

Muestra	Cd (mg kg ⁻¹)	Pb (mg kg ⁻¹)	Se (mg kg ⁻¹)	Mo (mg kg ⁻¹)
1	ND	ND	0,212 ± 0,009	0,0616 ± 0,0029
2	ND	ND	0,157 ± 0,003	0,07446 ± 0,00066
3	ND	ND	0,186 ± 0,008	0,0396 ± 0,0090
4	ND	ND	0,151 ± 0,007	0,0689 ± 0,0035
5	<LOQ	ND	0,275 ± 0,012	0,0714 ± 0,0024
6	0,0109 ± 0,0002	ND	0,426 ± 0,013	0,0837 ± 0,0081
7	0,1000 ± 0,0001	ND	0,276 ± 0,011	0,0502 ± 0,0036
8	<LOQ	ND	0,180 ± 0,008	0,0756 ± 0,0045
9	ND	ND	0,146 ± 0,006	0,07218 ± 0,00024
10	ND	ND	0,120 ± 0,003	0,0690 ± 0,0043
11	ND	ND	0,870 ± 0,022	0,0677 ± 0,0024
12	ND	ND	0,785 ± 0,021	0,06934 ± 0,00069

Promedio ± desviación estándar (base seca) (n=3).

Como se puede observar, los datos de Mo obtenidos por ambos métodos, son del mismo orden. Las diferencias pueden deberse a que las muestras analizadas no corresponden a los mismos animales, lo que no permite hacer una comparación estadística entre las distintas técnicas empleadas para su determinación. Esto es relevante, no solamente porque los dos métodos arrojan resultados comparables, sino que además, constituyen los primeros datos de este elemento en carne bovina uruguaya. Asimismo, los valores están en concordancia con los valores recientemente publicados por el grupo de investigación (Machado & Tissot, 2020).

Considerando que los resultados refieren a carne cruda y que son pocas muestras, se presenta a continuación un ejemplo de como esta información podría ser útil para la estimación de un valor nutricional del producto. Este tipo de estudios requieren un número de muestras mayor para tener un valor estadístico adecuado y también debe tenerse en cuenta que este alimento no se consume crudo (no es lo habitual en nuestro país). Por ejemplo, asumiendo una ingesta de 200 g de carne diaria, y transformando los resultados a base fresca (tomando en cuenta la humedad de la muestra según datos del Anexo IV), la contribución del alimento en cuanto a la IDR del metal sería

entre 5 y 11% para un adulto. Considerando que la IDR del Mo es 45 μg según el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH, 2020a).

En cuanto a las determinaciones de Se, los valores obtenidos son similares a los encontrados en carne vacuna de nuestro país por Pistón et al. en el rango 0,1 – 0,11 mg kg^{-1} en base fresca, y bastante por debajo de lo anteriormente reportado por Cabrera et al. y Saadoun & Cabrera en el rango 0,42 – 1,2 mg kg^{-1} en base fresca, quienes evaluaron otros cortes (Cabrera et al., 2009; Pistón et al., 2020a; Saadoun & Cabrera, 2010). También difieren respecto a algunos reportes de la región (Cabrera & Saadoun, 2014; Dos Santos et al., 2017). Sin embargo, a nivel internacional, los valores hallados en esta tesis son acordes a los reportados en carne vacuna por la USDA y el FCT de 0,1 mg kg^{-1} en base fresca (FCT, 2006; USDA, 2020).

Los resultados sugieren que su consumo no presenta un riesgo para la salud. De hecho, si se consumen en la dieta unos 200 g de carne y transformando los resultados a base fresca (según datos del Anexo IV), ésta porción representaría entre 10 – 76% de la IDR de Se de un adulto establecida en 55 μg (NHI, 2020b).

Este tipo de estudios también aportan información sobre otros aspectos, como ser el estado del animal cuando se analizan individualmente, y podrían sugerir la necesidad o no de suplementación del ganado, que además en caso de hacerlo podría ayudar a disminuir la absorción de Cd, en caso de que ocurriera una intoxicación con este elemento (Bavera, 2006).

Asimismo, se puede observar que los niveles de Pb fueron no detectables en todas las muestras, y que solamente en dos de las muestras analizadas, tomando en cuenta la humedad del 74%, se encontraron niveles cuantificables de Cd, encontrándose muy por debajo del límite de 0,05 mg kg^{-1} establecido por la normativa del MERSOCUR. De esta forma, quedó garantizada la inocuidad de las muestras analizadas desde el punto de vista de estos contaminantes inorgánicos.

Recientemente Schild et al. reportaron un caso de exposición a Pb en Uruguay vinculado a la exposición del plaguicida arsenato de plomo (PbHAsO_4). Además en la región también se han reportado casos de intoxicación del ganado por este metal en establecimientos ganaderos (Schild et al., 2019; Traverso et al., 2004; Barbosa et al., 2014). Además de las mencionadas, otras de las posibles fuentes de contaminación de estos elementos, se relacionan con el agua con la que se abastecen los bebederos del ganado. En el caso del Cd, también el uso de los fertilizantes fosfatados pueden acumular el elemento en los suelos y contaminar las pasturas (Bavera, 2006). Por su parte, la exposición a Pb puede estar dada también por contaminantes ambientales. Éstos pueden interferir en la cadena alimenticia del ganado, cuando se consumen pasturas de zonas

contaminadas, como las que se pueden encontrar adyacentes a ciertos tipos de industrias (Bavera, 2006; Suttle, 2010; Chirinos-Peinado & Castro-Bedrinana, 2020). Por lo tanto, es importante realizar un monitoreo de estos potenciales contaminantes para detectar este tipo de casos.

5.3 Comparación entre métodos

Esta sección presenta la comparación entre los métodos desarrollados a lo largo del trabajo de tesis y las clásicas consideradas de referencia. Las comparaciones se realizaron desde el punto de vista estadístico, de forma de evaluar si ambas arrojaban resultados semejantes. Además, se compararon desde el punto de vista de la Química Analítica Verde.

5.3.1) Comparación estadística

El desempeño del método alcalino desarrollado para la preparación de las muestras, fue evaluado comparando los resultados obtenidos del análisis de las muestras de carne bovina utilizando el método de extracción alcalina, con los resultados obtenidos luego del análisis de las mismas muestras utilizando digestión ácida asistida por microondas. Para ello, se empleó la prueba t de Student de comparación de medias (Miller y Miller, 2010). En el caso de Cu y Zn, la comparación se realizó mediante digestión asistida por microondas seguida de la determinación por FAAS, dato proporcionado por el grupo de investigación. Mientras que en el caso de Mo, las determinaciones se realizaron mediante ICP-MS. El experimento se realizó para seis muestras de asado y cuadril. En el caso de Mo las determinaciones se realizaron solamente sobre muestras de asado, dado que no se contaba con las muestras de cuadril necesarias durante la pasantía. En la Tabla 5.27 se muestran los resultados de la comparación estadística para cada elemento. Todos los valores $t_{\text{experimental}}$ fueron menores al respectivo valor $t_{\text{teórico}} (0,05, 5)=2,57$. Por lo tanto, se pudo concluir que a un nivel de significancia del 95%, los resultados obtenidos utilizando el método propuesto y la digestión ácida asistida por microondas eran estadísticamente equivalentes.

Tabla 5.27: Comparación estadística de resultados entre digestión asistida con microondas y extracción alcalina

Corte	Zn (mg kg ⁻¹)				Cu (mg kg ⁻¹)				Mo (mg kg ⁻¹)	
	Asado		Cuadril		Asado		Cuadril		Asado	
Medio	Alcalino ^a	Ácido ^a	Alcalino ^a	Ácido ^a	Alcalino ^a	Ácido ^a	Alcalino ^a	Ácido ^a	Alcalino ^b	Ácido ^c
Promedio	137,37	158,25	120,3	138,32	1,76	2,5	2,64	2,85	0,07	0,07
n=10										
t calculado	1,19		0,79		1,37		0,21		2,16	
$t (0,05;5)$	2,57		2,23		2,57		2,23		2,57	

Resultados expresados en base seca. Las determinaciones fueron mediante: ^a FAAS, ^b ETAAS, ^c ICP-MS.

Como se puede observar, los valores obtenidos mediante la extracción alcalina son ligeramente más bajos, esto era de esperarse, ya que se están comparando contra una digestión total. Sin embargo, los resultados de ambos métodos son estadísticamente equivalentes, sin presentar diferencias significativas.

Por otra parte, si bien no se pudo realizar una prueba estadística con los resultados obtenidos para Cd, debido a que éstos eran en su mayoría no cuantificables, se puede considerar que el método desarrollado para la determinación de este elemento también fue eficiente, ya que se obtuvieron resultados semejantes a los observados con el método de referencia.

Lamentablemente, si bien se buscaron diferentes alternativas para la determinación de Se y Pb mediante extracción alcalina, no se obtuvieron los resultados esperados. Por ese motivo, se logró realizar su determinación únicamente mediante digestión ácida asistida por microondas.

5.3.2) Comparación desde el punto de vista de la Química Analítica Verde

Para comparar cuál de los métodos se acercaba más a los lineamientos de la Química Analítica Verde, se utilizó el criterio de la evaluación publicado por Gałuszka et al. (2012). En la Sección 1.2.6 se hizo mención a cómo se realiza esta evaluación. De esta forma, se llevó a cabo entonces la comparación del método alcalino desarrollado durante el trabajo de tesis y el método clásico presentada en la Sección 4.5.1, para concluir cual se acercaba más a los lineamientos de la Química Analítica Verde.

Evaluación del tratamiento alcalino

Se muestra en la Figura 5.8 un diagrama del desarrollo del método de extracción alcalino. Siguiendo los criterios Gałuszka et al. (Figura 1.16), se realiza la sumatoria de los puntos de penalización y luego se le restan al valor 100. En la tabla 5.28 se presenta esta evaluación.

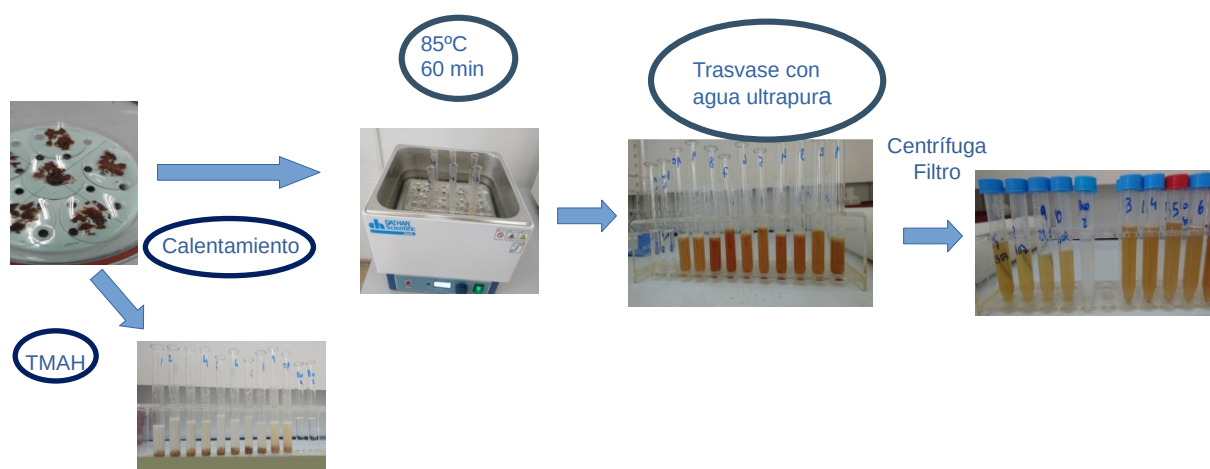


Figura 5.8: Diagrama de preparación de muestras con tratamiento alcalino

Reactivos	Puntos de penalización
TMAH: 1,5 mL	1 (cantidad) x 6 (peligrosidad)
Instrumentos	
Energía (baño termostatzado)	0
Desechos	3 (cantidad) + 3 (tratamiento)
Peligro ocupacional (vapores)	3
SUMATORIA	15

Digestión ácida asistida por microondas

En la Figura 5.9 se presenta el diagrama del método AOAC 984.27. Por su parte la evaluación de la Eco-escala se presenta en la Tabla 5.29. Los métodos de preparación de muestras de alimentos utilizan en forma habitual tratamientos asistidos con microondas y ácidos concentrados para lograr una digestión total. Aquí se evalúa con la herramienta Eco escala un tratamiento típicamente utilizado para este fin.



Figura 5.9: Diagrama de preparación de muestras por el método clásico

Tabla 5.29: Eco-escala de la preparación de muestras con digestión ácida

Reactivos	Puntos de penalización
HNO ₃ 14 mol L ⁻¹ : 10 mL	2 (cantidad) x 4 (peligrosidad)
Instrumentos	
Digestor de microondas	1
Desechos	5 (cantidad) + 3 (tratamiento)
Peligro ocupacional (vapores)	3
SUMATORIA	20

Por lo tanto, utilizando esta forma de evaluación, se pudo concluir que el tratamiento de muestras desarrollado en este trabajo de tesis se ajusta mejor a los lineamientos de la Química Analítica Verde que el método oficial de la AOAC 984.27 (AOAC, 2019). Aún así, se podría continuar trabajando de forma de encontrar estrategias que sean aún más verdes.

5.4 Estudios de Bioaccesibilidad

En esta sección se presentan los resultados obtenidos luego del desarrollo de un ensayo de bioaccesibilidad *in vitro*. Además, se muestran los contenidos de FB obtenidos y la comparación con las cantidades de IDR de forma de ejemplificar como se podría evaluar el valor nutricional del alimento. Se estudió también y comparó las diferencias de aporte nutricional en base a la cocción de la carne, tomando las muestras analizadas de ejemplo.

5.4.1) Optimización y validación

En primer lugar, durante la etapa de optimización, se llevó a cabo un primer ensayo similar al descrito en la Sección 4.6.2, donde se variaban tres condiciones: la masa de muestra de partida era de 0,5 g, el ajuste de pH de la disolución de jugo gástrico simulado era de 1,2 y la agitación se realizaba de forma manual e intermitente. Los resultados obtenidos en este primer ensayo, se presentan en la Tabla 5.28. Para la evaluación de la veracidad del método, se realizó la digestión de los residuos según la Sección 4.6.3 y se calcularon los BM correspondientes.

La FB (%) fue calculada como:

$$FB (\%) = \left[\frac{\text{fracción del elemento extraída durante el proceso de digestión gastrointestinal simulado (mg kg}^{-1}\text{)}}{\text{concentración total del analito en las muestras previamente cocidas (mg kg}^{-1}\text{)}} \right] \times 100.$$

El BM (%) fue calculado como:

$$\text{BM (\%)} = \{[\text{fracción del elemento extraída durante el proceso de digestión gastrointestinal simulado (mg kg}^{-1}\text{)} + \text{fracción del elemento en los residuos (mg kg}^{-1}\text{)}] / [\text{concentración total del analito en las muestras previamente cocidas (mg kg}^{-1}\text{)}]\} \times 100.$$

La concentración total de Cu y Zn en los distintos cortes y puntos de cocción fue un dato proporcionado por el grupo de investigación, no se encuentra su determinación analítica dentro del alcance de esta tesis. El análisis en este caso se realizó siguiendo la digestión mencionada en la Sección 4.5.1 y posterior determinación mediante MIP OES. En el ANEXO I se presentan las condiciones instrumentales y cifras de mérito de este método.

Como se puede observar en la Tabla 5.30, los valores de FB(%) obtenidos para Cu y Zn concuerdan con los reportados en la literatura en carne uruguaya (40 y 60% respectivamente), que si bien no corresponden exactamente a los mismos cortes, constituyen una referencia para los desarrollos analíticos (Ramos et al., 2012). De todas formas, se optó por realizar una siguiente etapa de optimización de la digestión enzimática, partiendo de una masa de 1,0 g de muestra, realizando el ajuste de la disolución de jugo gástrico simulado a pH 1,3 y utilizando una fuente de agitación mecánica continua, tal como recomienda el protocolo INFOGEST, obtenido por consenso internacional (INFOGEST, 2019).

En la Figura 5.10 se muestra una imagen del sistema utilizado para realizar los ensayos de bioaccesibilidad *in vitro*. Para la agitación mecánica continua se utilizó un agitador tipo vórtex.

Tabla 5.30: Fracción bioaccesible y balance de masas utilizando 0,5 g de muestra

Elemento	Corte	Cocción	FB (%)	BM (%)
Cu	Asado	Poco cocido	30 ± 2	106
		Muy cocido	33 ± 1	109
	Cuadril	Poco cocido	51 ± 7	118
		Muy cocido	45 ± 1	111
Zn	Asado	Poco cocido	65 ± 1	101
		Muy cocido	66 ± 3	95
	Cuadril	Poco cocido	76 ± 3	103
		Muy cocido	72 ± 2	100

FB: Promedio ± desviación estándar (n = 3).



Figura 5.10: Sistema de agitación utilizado para los ensayos de bioaccesibilidad

En este segundo ensayo, los valores de FB(%) para Zn aumentaron, tal como se puede apreciar en la Tabla 5.31. Por su parte, los valores de FB (%) para Cu se mantuvieron en el mismo orden que en el ensayo anterior. Asimismo, este ensayo también presentó buenos resultados respecto al balance de masa, por lo cual quedó demostrada su eficiencia. Los valores para Cu en este segundo ensayo estuvieron de acuerdo con los datos de literatura, mientras que los valores para Zn fueron más elevados. Esta diferencia puede estar relacionada a que los datos reportados por Ramos *et al.* corresponden a otro tipo de músculo y que además su trabajo refiere a carne cruda (Ramos et al., 2012).

Se decidió entonces continuar trabajando con las condiciones de este segundo ensayo, dado los buenos resultados obtenidos. De esta forma, se partía de una masa de muestra mayor, lo cual era ventajoso de ocurrir problemas de homogeneidad con las muestras, disminuyendo los errores en las mediciones. Además, al utilizar una agitación mecánica continua, se estaba llevando a cabo un ensayo más reproducible y representativo de los procesos fisiológicos involucrados.

La etapa oral de la digestión, donde el bolo alimenticio sufre la trituración en la boca, no fue realizada, ya que se trata de un alimento con alto contenido proteico. Como se mencionó anteriormente, algunas simulaciones *in vitro* no tienen en cuenta esta primera etapa, debido a que la digestión enzimática a cargo de la amilasa que ocurre a pH neutro, no suele aportar en gran medida a la fracción bioaccesible. La función más importante en esta cavidad es la disminución del tamaño de partícula (Intawogse & Dean, 2006). En este caso, las muestras ya se encontraban trituradas, tal como se describe en la Sección 4.3. Para favorecer el contacto inicial de las muestras con la disolución de jugo gástrico simulado, se utilizó una varilla de vidrio, realizando movimientos suaves en forma rotatoria.

Tabla 5.31: Fracción bioaccesible y balance de masas

Elemento	Corte	Cocción	FB (%)	BM (%)
Cu	Asado	Poco cocido	37 ± 2	113
		Muy cocido	35 ± 1	125
	Cuadril	Poco cocido	40 ± 3	109
		Muy cocido	28 ± 1	120
Zn	Asado	Poco cocido	80 ± 2	108
		Muy cocido	87 ± 2	87
	Cuadril	Poco cocido	77 ± 1	85
		Muy cocido	80 ± 1	88

FB: Promedio ± desviación estándar (n = 3) (utilizando 1,0 g de muestra).

Dentro de los parámetros evaluados, también se estudió la necesidad del ajuste del segundo pH a 6.8. Según el protocolo normalizado INFOGEST, se sugiere que el pH se ajuste entre 6,5 y 7 (INFOGEST, 2019). En este caso, cabe mencionar que el ajuste debió ser realizado a 6,8 puesto que se observó que a pH mayores ocurría la precipitación de proteínas y la determinación de Cu no era posible. Por otro lado, a pH menores a 6,8 no se lograba una digestión enzimática completa del alimento, aumentando la dispersión de los resultados obtenidos. De esta forma, el ajuste de pH en la disolución de jugo intestinal simulado fue uno de los pasos más críticos del ensayo.

En lo que respecta a las determinaciones de Cu y Zn en los residuos, se utilizó las mismas condiciones de digestión asistida por microondas utilizadas para la determinación de las concentraciones totales, tal como se presenta en la Sección 4.6.3. Los resultados obtenidos al realizar el BM(%) fueron considerados adecuados para el procedimiento.

La llama acetileno (2,5 L min⁻¹) - aire (10,0 L min⁻¹) resultó adecuada para las determinaciones de Zn en los residuos mediante FAAS. La curva de calibración presentó una linealidad hasta 1,2 mg L⁻¹. Debido a la complejidad para recrear en los patrones de calibración un medio igual al de las muestras, se decidió utilizar agua ultrapura como diluyente, dado que para medir las muestras se realizaba una dilución 1/10 con este disolvente. Al obtenerse valores de BM (%) aceptables, en el entorno de 100 %, se continuó trabajando con éstas condiciones.

Debido a que las concentraciones de Cu esperadas en las FB y en los residuos eran más bajas que las cuantificables por FAAS, se realizó la determinación de este elemento mediante ETAAS. En este caso también se realizó la curva de calibración utilizando agua ultrapura como diluyente, siendo la dilución de las muestras 1/3. La optimización de las temperaturas de pirólisis y atomización, se realizaron de la misma forma que fuera descrita para los métodos previamente desarrollados. Para la evaluación de la veracidad se utilizó también el CRM de músculo bovino.

En las determinaciones de Cu mediante ETAAS, se observó un mejor desempeño sin el uso de modificadores químicos. Para la optimización se utilizó una muestra de FB, ya que estas poseen mayor contenido de materia orgánica que los residuos, previendo que esta pudiera generar algún tipo de interferencia durante la determinación analítica. Con esa premisa, se llevó a cabo la búsqueda de las temperaturas óptimas, comenzando en tramos de 100 °C. Una vez encontradas las zonas de trabajo, se continuó con una búsqueda mas exhaustiva en tramos de 50 °C. De esta forma, se analizaron las muestras con las condiciones previamente descritas en la Sección 4.6.4.

En la Tabla 5.32 se presentan los parámetros de desempeño evaluados en la determinación de Zn y Cu.

Tabla 5.32: Parámetros de desempeño para la determinación de Cu y Zn

	Zn	Cu
Linealidad	0,006 – 1,2 mg L ⁻¹	1,34 – 50 µg L ⁻¹
LD	0,006 mg L ⁻¹ / 0,06 mg kg ⁻¹	1,34 µg L ⁻¹ / 0,013 mg kg ⁻¹
LQ	0,019 mg L ⁻¹ / 0,19 mg kg ⁻¹	4,49 µg L ⁻¹ / 0,045 mg kg ⁻¹
Veracidad, R(%) (n=6)	117 ± 1	115 ± 1
Precisión, RSD(%) (n=6)	1,1	1
Técnica	FAAS	ETAAS

Veracidad: promedio ± desviación estándar

5.4.2) Aplicación sobre muestras de carne en diferentes puntos de cocción

Una vez optimizadas y validadas las condiciones de digestión gástrica simulada *in vitro*, así como las condiciones instrumentales de medida, se procedió con el análisis de las muestras de carne bovina. En la Figura 5.11 se puede observar cómo quedan las muestras luego de la extracción gastrointestinal *in vitro*. La disolución que se muestra es la conocida como FB, mientras que el precipitado corresponde a el residual. Estos últimos, una vez digeridos, se muestran como en la Figura 5.12.

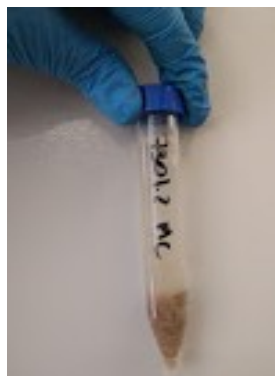


Figura 5.11: Muestra luego de la extracción de la FB.



Figura 5.12: Muestra luego del tratamiento de residuos.

Las muestras utilizadas fueron previamente cocidas como se describiera en la Sección 4.6.1. Se analizaron 14 muestras de carne cocidas y 14 muy cocidas de asado y cuadril (n=56) con el objetivo de evaluar si existían diferencias en los niveles de Cu y Zn entre cortes y entre los distintos puntos de cocción. Una vez realizado el ensayo de bioaccesibilidad descrito en la Sección 4.6.5 en las muestras y la digestión de los residuos descrito en la Sección 4.6.3, se procedió a la determinación de los analitos. Para la determinación de Zn mediante FAAS, las muestras fueron diluidas 1/10, mientras que para las determinaciones de Cu mediante ETAAS, fueron diluidas 1/3. Cada muestra se analizó por triplicado, y en cada ensayo se agregaron tres blancos que contenían las enzimas y reactivos utilizados. Es de esperar que los blancos presentaran niveles cuantificables de los analitos, ya que estos forman parte de los sitios activos de varias enzimas. Los valores promedio de los blancos, obtenidos para las fracciones bioaccesibles, fueron de $0,011 \pm 0,003 \text{ mg L}^{-1}$ para Cu y de $0,36 \pm 0,07 \text{ mg L}^{-1}$ para Zn (n=33). En cuanto a los blancos de los residuales se obtuvieron un promedio de $0,004 \pm ,0001 \text{ mg L}^{-1}$ para Cu y $0,064 \pm 0,009 \text{ mg L}^{-1}$ para Zn (n=33). En la Tabla 5.33 se presentan los resultados obtenidos. El rango de aceptabilidad para el BM(%) fue de 80 – 120 %.

Tabla 5.33: Resultados obtenidos de los ensayos de bioaccesibilidad *in vitro*

Analito	Zn				Cu			
	Asado		Cuadril		Asado		Cuadril	
Corte	Muy	Poco	Muy	Poco	Muy	Poco	Muy	Poco
Cocción								
FB (%)	84 ± 7	84 ± 6	83 ± 5	86 ± 8	19 ± 7	22 ± 7	34 ± 7	38 ± 8
Rango FB	66 – 94	65 – 93	72 – 89	75 – 92	15 – 30	10 – 37	28 – 41	28 – 50
BM (%)	97 ± 11	112 ± 13	96 ± 9	97 ± 11	115 ± 7	115 ± 23	118 ± 9	109 ± 15

FB: Promedio \pm desviación estándar; BM: Balance de masas (n=14 para cada corte y en cada punto) .

Como se puede observar en la Tabla 5.33, los valores de FB(%) promedio obtenidos para Zn, no varían entre los cortes asado y cuadril, ni tampoco entre los distintos tipos de cocción. Los

resultados obtenidos, difieren en un 50% de los reportados por Ramos et al. y Menezes et al, quienes informaron como FB 60 y 30%, respectivamente. En ambos casos las condiciones de estudio son diferentes, a modo de ejemplo, en el estudio de Ramos et al. el análisis no fue realizado en muestras cocidas, mientras que en el trabajo de Menezes et al. no se establece cuál fue el corte evaluado. Incluso se pueden observar diferencias entre los resultados obtenidos por ambos autores, en lo que respecta a los valores de FB (Ramos et al., 2012; Menezes et al., 2018).

Esta información resulta interesante desde el punto de vista nutricional, dada la elevada bioaccesibilidad que presenta el Zn. La carne bovina, en particular los cortes estudiados, serían una fuente muy importante de este elemento para la dieta.

Nuevamente a modo de ejemplo, tomando los resultados obtenidos para este conjunto de muestras, considerando una ingesta de 200 g de asado y la bioaccesibilidad del nutriente, se estarían aportando entre 18 – 37 mg cubriendo ampliamente el IDR de 11 mg/día de adultos para este elemento (NIH, 2020d).

En cambio con el cuadril, que es el corte que posee menor cantidad de Zn de los dos estudiados, si se considera una ingesta de 200 g de carne, se estaría realizando un aporte entre 8 – 24 mg. Cubriendo también la IDR de este nutriente.

En cuanto a las FB obtenidas para el Cu, si bien se observaron diferencias entre los cortes asado y cuadril, no se observaron diferencias significativas entre los distintos puntos de cocción. Para evaluar si las diferencias entre ambos cortes eran significativas, se realizó una prueba t de Student de comparación de medias. Sin embargo, para una confianza del 95% la medias resultaron ser estadísticamente equivalentes. Los valores $t_{experimental} = 0,73$ para los cortes de asado y de cuadril poco cocidos y $t_{experimental} = 0,73$ para los cortes muy cocidos, fueron en ambos casos menores al valor $t_{teórico} (0,05; 14) = 2,05$.

Finalmente, en lo que tiene que ver con el aporte de Cu a la dieta, la ingesta de 200 g de asado aportaría entre 57 – 119 μg , teniendo en cuenta el promedio de la FB entre poco y muy cocido. Esto correspondería al 6 – 13% de la IDR para hombres y mujeres adultos (NIH, 2020c).

En lo que respecta al consumo de cuadril, la ingesta de 200 g aportaría entre 119 – 296 μg . Teniendo en cuenta el promedio de la FB, esto correspondería a un 13 – 33% de la IDR para hombres y mujeres adultos, siendo este último corte una mejor fuente de Cu. Esto se debe a que el corte posee una mayor cantidad de este nutriente, además de un mayor FB, si bien la misma no es estadísticamente diferente a la del asado.

En la Tabla 5.34 se presentan los resultados descritos anteriormente, con respecto al aporte de Cu y Zn en el IDR. Se puede observar el rango de los valores obtenidos, discriminando el punto de cocción. Estos hallazgos son de gran importancia para la evaluación de la carne bovina desde el punto de vista de sus propiedades nutricionales y del papel que puede jugar en el desarrollo de una dieta saludable y balanceada, aportando al organismo los nutrientes esenciales para su correcto funcionamiento. Como se ha aclarado, para un estudio más completo deben analizarse un mayor número de muestras.

Tabla 5.34: Contribución de Cu y Zn en el consumo de carne bovina

Elemento	IDR (mg/día)	Aporte del asado (mg/200 g)		Aporte del cuadril (mg/200 g)	
		MC	PC	MC	PC
Cu	0,9	0,06 – 0,11	0,07 – 0,12	0,12 – 0,27	0,13 – 0,27
Zn	11 (H)/ 8 (M)	21 – 35	18 – 37	8 – 21	10 – 24

H) Hombre, M) Mujer; PC: poco cocido; MC: muy cocido

Los métodos de simulación de la digestión gastrointestinal, como el presentado en este trabajo de tesis, fueron realizados de forma estática, es decir considerando cada etapa en forma compartimentada, no pudiéndose imitar la dinámica compleja del proceso digestivo o las interacciones fisiológicas con el huésped. A modo de ejemplo, para la fase gástrica, el pH se mantiene constante y hay una falta de adición gradual de jugo gástrico y una ausencia de vaciado gástrico gradual. Además, la actividad enzimática en cada fase digestiva se mantiene constante, independientemente del tipo de alimento y de si el mismo contiene cantidades altas o bajas de proteínas, lípidos y carbohidratos. La fase intestinal se trata como una fase en lugar de las fases secuenciales duodenal, yeyunal e ileal, que exhiben diferentes diluciones, contenido mineral, pH, actividades enzimáticas y contenido microbiano. A pesar de todo esto, la comparación con métodos *in vivo* ha demostrado una buena correlación con el método INFOGEST en los puntos finales de cada fase de la digestión (INFOGEST, 2019).

6) Conclusiones

Se desarrollo un nuevo método de preparación de muestras, basado en una extracción alcalina con TMAH asistida con calentamiento en baño térmico, que resultó ser eficiente para la extracción cuantitativa de Cd, Cu, Mo y Zn en muestras de carne bovina, proporcionando disoluciones homogéneas que pudieron ser analizadas exitosamente mediante espectrometría de absorción atómica. El método propuesto resultó sencillo, preciso y veraz, proporcionando resultados confiables. Además, se requirieron pequeñas cantidades de muestra y reactivos, lo que generó bajas cantidades de residuos, alineándose de esta forma en cierta medida con los principios de la Química Analítica Verde. Por lo tanto, el método puede postularse como una alternativa a los tratamientos clásicos que conllevan digestiones con ácidos minerales concentrados.

Si bien no fue posible la determinación cuantitativa de Pb y Se utilizando este método de extracción, estos elementos fueron determinados utilizando una digestión ácida asistida por microondas y posterior determinación por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente. Esta parte del trabajo se desarrolló en el marco de una pasantía en Brasil en la que se pudo acceder a técnicas de primer nivel, no disponibles para investigación universitaria en nuestro país, y donde se adquirieron nuevos conocimientos. Esto remarcó la importancia de las instancias de intercambio con otros grupos de investigación.

De esta forma, se cumplió con el objetivo principal de la tesis, el cual estaba centrado en el desarrollo de métodos analíticos que involucraran tratamientos alcalinos para la preparación de muestras de carne bovina, que permitieran la determinación de elementos esenciales y potencialmente tóxicos.

Se debe destacar la importancia de los desarrollos realizados a lo largo de este trabajo de tesis, los cuales nos dejan como legado la disponibilidad de métodos analíticos validados y confiables, para la evaluación de la calidad e inocuidad alimentaria de este preciado alimento, tan importante para la industria nacional.

Los datos obtenidos tanto con el método propuesto como con el método clásico, son muy importantes en lo que respecta a la evaluación de la seguridad alimentaria del alimento, relacionada con el contenido de elementos esenciales y elementos potencialmente tóxicos.

En cuanto a la evaluación de inocuidad del producto, los niveles de Cd y Pb en las muestras crudas analizadas cumplieron con los límites máximos establecidos por la normativa del MERCOSUR vigente. De esta forma, se garantizó la inocuidad alimentaria de las muestras analizadas con respecto a estos contaminantes inorgánicos.

En relación a la evaluación de calidad del producto, los valores de Cu y Zn obtenidos en las muestras de carne cruda analizadas, fueron acordes a los reportados en la literatura existente sobre carne bovina uruguaya, y constituyen una actualización de la información sobre este producto de gran relevancia para el sector productivo. Los niveles de Se fueron acordes a los obtenidos previamente por el grupo de investigación, no así como de otros grupos a nivel nacional. Por su parte, los valores de Mo obtenidos constituyen los primeros reportados en estos cortes, siendo acordes a los niveles reportados previamente en otros cortes por parte del grupo de investigación. Asimismo, se realizó a modo de ejemplo una evaluación del valor nutricional con los valores obtenidos en las muestras crudas. Considerando una ingesta de 200 g de carne diaria se estaría aportando entre 10 – 76% de la IDR de Se y entre 5 – 11% de la IDR de Mo.

En cuanto a los estudios de bioaccesibilidad simulada *in vitro*, los mismos resultaron ser exitosos, obteniéndose valores de FB para Cu en acuerdo con la literatura. Por su parte, los valores de Zn resultaron ser más elevados a los reportados en la literatura. Sin embargo, esta diferencia pudo deberse a que se trataban de distintos cortes, cocidos a distintos puntos de cocción y a que fueron pocas muestras las analizadas durante la tesis. Teniendo en cuenta los respectivos valores de FB obtenidos, la ingesta de 200 g de carne aportaría una cantidad que cumpliría ampliamente con la IDR de Zn, reafirmando que la carne vacuna es una fuente de Zn excelente, mientras que aportaría hasta un 33% de la IDR de Cu para adultos. Además, los resultados aquí obtenidos, no presentaron diferencias significativas en cuanto al aporte nutricional de Cu y Zn al variar entre los corte asado y cuadril, ni al variar entre el tipo de cocción poco y muy cocido.

7) Perspectivas

Como se comentara previamente, existen reportes relacionados con la determinación de Se mediante ETAAS, luego de la aplicación de tratamientos alcalinos con TMAH, que utilizan modificadores químicos diferentes a los probados a lo largo de este trabajo de tesis. En este sentido, surge como una de las perspectivas, la posibilidad de explorar un poco más sobre el funcionamiento de estos modificadores químicos, con el objetivo de verificar si la extracción alcalina es eficiente para la extracción cuantitativa de este nutriente.

En lo que respecta a las extracciones alcalinas en general, sería interesante poder continuar con estos estudios en el marco del Grupo GATPREM, por ejemplo, en lo que respecta a el uso de ondas de ultrasonido, tanto con baños como con una sonda, proponiendo nuevos diseños experimentales y otras matrices de trabajo.

Otra perspectiva esta relacionada con la evaluación de la bioaccesibilidad de Se en muestras de alimentos. Esta línea sería interesante, ya que por ejemplo, los reportes encontrados a nivel nacional de Se en carne fueron evaluados en otras condiciones a las aquí presentadas, como ser los cortes y las formas de cocción y los resultados reportados ya tienen varios años y varían mucho.

Recientemente, el grupo de investigación publicó un artículo en el cual se realiza la determinación de Mo en muestras de carne, utilizando una estrategia de extracción líquido-líquido. En este sentido, otra perspectiva podría relacionarse con la evaluación de la bioaccesibilidad de Mo, u otros elementos traza, utilizando por ejemplo esta forma de pre-concentración.

8) Bibliografía

- ✓ Agency for Toxic Substances & Disease Register (ATSDR). (2011). ATSDR's Substance Priority List. Recuperado de: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>
- ✓ Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2012). Toxicological profile for Cadmium. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Recuperado de: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>
- ✓ Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2020). Toxicological profile for Lead. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Recuperado de: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13-p.pdf>
- ✓ Agilent Technologies. (2008). Performance characteristics of the Agilent High Matrix Sample Introduction (HMI). Accessory for the 7500 Series ICP MS. Recuperado de: <https://www.agilent.com/cs/library/technicaloverviews/Public/5989-7737EN.pdf>
- ✓ AOAC, Official Methods of Analysis of AOAC International, 21st edn. (2019). Association of Analytical Communities, Gaithersburg.
- ✓ Aranha, T., Oliveira, A., Queiroz, H.M., Cadore, S. (2016). A fast alkaline treatment for cadmium determination in meat samples. *Food Control*, 59, 447-453.
- ✓ ASTM, American Society for Testing and Materials. (2018). Standard Specification for Reagent Water.
- ✓ Barbosa J.D., Bomjardim H.A., Campos K.F., Duarte M.D., Bezerra Júnior P.S., Gava A., Salvarani F.M. & Oliveira C.M.C. (2014). Lead poisoning in cattle and chickens in the state of Pará, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 34(11), 1077-1080.
- ✓ Barros, A.I., Pinheiro, F.C., Amaral, C.D.B., Lorençatto, R., Nóbrega, J.A. (2018). Aerosol dilution as a simple strategy for analysis of complex samples by ICP-MS. *Talanta*, 178, 805–810.
- ✓ Batista, B.L., Grotto, D., Rodrigues, J.L., Souza, V.C., Barbosa. F.Jr. (2009). Determination of trace elements in biological samples by inductively coupled plasma mass spectrometry with tetramethylammonium hydroxide solubilization at room temperature. *Analytica Chimica Acta*, 646 (1-2), 23-9.
- ✓ Bavera, G.A. (2006). *Suplementación mineral y con nitrógeno no proteico del bovino a pastoreo*. Río Cuarto, Argentina: Guillermo A. Bavera.
- ✓ Bendicho, C., De La Calle, I., Pena, F., Costas, M., Cabaleiro, N., Lavilla, I. (2012). Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry.

Trends in Analytical Chemistry, 31, 50-60.

- ✓ Cabrera, M.C., Saadoun, A. (2014). An overview of the nutritional value of beef and lamb meat from South America. *Meat Science*, 98, 435–444.
- ✓ Cabrera, M., Ramos, A., Saadoun, A., Brito, G. (2010). Selenium, copper, zinc, iron and manganese content of seven meat cuts from Hereford and Braford steers fed pasture in Uruguay, *Meat Science*, 84(3), 518–528.
- ✓ Chen, J. (2012) An original discovery: selenium deficiency and Keshan disease (an endemic heart disease). *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 21(3), 320-326.
- ✓ Chen, X. & Marshall, W.D. (1999). Enzymatic Digestion-High-Pressure Homogenization Prior to Slurry Introduction Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry for Selenium Determination in Plant and Animal Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3727–3732.
- ✓ Chirinos-Peinado, D.M. & Castro-Bedrinana, J.I. (2020). Lead and cadmium blood levels and transfer to milk in cattle reared in a mining area. *Heliyon* 6, e03579.
- ✓ Davis, E.A., Maier, K.J., Knight, A.W. (1988). The biological consequences of selenium in aquatic ecosystems. *California Agriculture*, 42(1), 18 – 29.
- ✓ de Castro Cardoso Pereira, P.M.; dos Reis Baltazar Vicente, A.F. (2013) Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science*, 93, 586-592.
- ✓ de Leeuw J. W. & Baas J. (1993). The behavior of esters in the presence of tetramethylammonium salts at elevated temperatures; flash pyrolysis or flash chemolysis?. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 26, 175-184.
- ✓ De Smet, S. & Vossen, E. (2016). Meat: The balance between nutrition and health. A review. *Meat Science*, 120, 145-156.
- ✓ Dobrowolski, R., Adamczyk, A., Otto, M. (2010). Comparison of action of mixed permanent chemical modifiers for cadmium and lead determination in sediments and soils by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 82, 1325-1331.
- ✓ dos Santos, M., Rodrigues da Silva Junior, F.M., Muccillo-Baisch, A.L. (2017). Selenium content of Brazilian foods: A review of the literature values. *Journal of Food composition and Analysis*, 58, 10-15.
- ✓ El Mehdawi, A.F. & Pilon-Smits E.A.H. (2011). Ecological aspects of plant selenium hyperaccumulation. *Plant Biology*, 14(1), 1–10.
- ✓ Eurachem. (2020). Method Validation. Recuperado de: www.eurachem.org

- ✓ EU DG-SANTE. (2017). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed. Recuperado de: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf
- ✓ FAGRO. (2015, 14 de setiembre). Minerales buenos y malos: alerta por aportes de cadmio y plomo. *Facultad de Agronomía, Universidad de la República*. Recuperado de: <http://www.fagro.edu.uy/index.php/noticias-principales/2130-minerales-buenos-y-malos-alerta-por-aportes-de-cadmio-y-plomo>
- ✓ FAO. Food Agriculture Organization. (2021). Programa Especial para la Seguridad Alimentaria (PESA) Centroamérica. Conceptos básicos. Recuperado de: <http://www.fao.org/in-action/pesa-centroamerica/temas/conceptos-basicos/es/#:~:text=Inocuidad%3A%20La%20inocuidad%20se%20refiere,enfermedades%20cr%C3%B3nicas%20como%20c%C3%A1ncer%2C%20enfermedades>
- ✓ Gac, P, Czerwinska, K., Macek, P., Jaremków, A., Mazur, G., Pawlas, K., Poreba, R. (2020) The importance of selenium and zinc deficiency in cardiovascular disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 82, 103553
- ✓ Gobi, N., Vaseeharan, B., Rekha, R., Vijayakumar, S., Faggio, C. (2018). Bioaccumulation, cytotoxicity and oxidative stress of the acute exposure selenium in *Oreochromis mossambicus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 147–159.
- ✓ Gałuszka, A., Konieczka, P., Migaszewski, Z.M., Namiesnik, J. (2012). Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends in Analytical Chemistry*, 37, 61-72.
- ✓ Gałuszka, A., Migaszewski, Z.M., Namiesnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78–84.
- ✓ Gojkovic, Z., Garbayo, I., Gómez Ariza, J.L., Márová, I., Vílchez, C. (2015). Selenium bioaccumulation and toxicity in cultures of green microalgae. *Algal Research*, 7, 106-116.
- ✓ Gromboni, C.F. (2012). *Teores dos Elementos Químicos Essenciais e Tóxicos na rastreabilidade da Carne Bovina* (Tesis doctoral). Universidad Federal de San Carlos, San Pablo, Brasil.
- ✓ Hurrell, R & Egli, I. (2010). Iron bioavailability and dietary reference values. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91 (5), 1461S–1467S.
- ✓ Iaquinta, F., Tissot, F., Lopes Fialho, L., Nóbrega, J.A., Pistón, M., Machado, I. (2021). Development of an Alkaline Method for the Determination of Cu, Mo, and Zn in Beef Samples.

Food Analytical Methods, 14, 159-164.

INFOGEST. (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols*, 14, 991-1014

- ✓ Instituto Nacional de Carnes (INAC). (2010). Conociendo las preferencias de consumo de carnes en Uruguay. Recuperado de: http://www.inac.uy/innovaportal/file/7365/1/conociendo_las_preferencias_de_consumo.pdf
- ✓ Instituto Nacional de Carnes (INAC). (2018). Reporte mercado doméstico. Principales indicadores y determinantes del consumo de carnes – Año 2018. Recuperado de: <https://www.inac.uy/innovaportal/file/17653/1/informe-consumo-mercado-domestico-2018.pdf>
- ✓ Instituto Nacional de Carnes (INAC). (2019). Anuario estadístico 2019. Recuperado de: http://www.inac.uy/innovaportal/file/18355/1/inac_anuario2019.pdf
- ✓ Instituto Nacional de Carnes (INAC). (2020). Exportaciones carne bovina. Recuperado de: <https://www.inac.uy/innovaportal/v/16962/10/innova.front/exportaciones>
- ✓ Intawongse, M., Dean, J.R. (2006). In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(9), 876-886.
- ✓ Jerše, A., Jaćimovića, R., Kacjan Maršić, N., Germ, M., Šircelj, H., Stibilj, V. (2018). Determination of iodine in plants by ICP-MS after alkaline microwave extraction. *Microchemical Journal*, 137, 355–362.
- ✓ Julshamn, K., Andersen, K.J. (1979). A study on the digestion of human muscle biopsies for trace metal analysis using an organic tissue solubilizer. *Analytical Biochemistry*, 98, 315–318.
- ✓ Klurfeld, D.M. (2015) Research gaps in evaluating the relationship of meat and health. *Meat Science*, 109, 86-95.
- ✓ Krishna, M.V.B, Karunasagar, D. (2015). Robust ultrasound assisted extraction approach using dilute TMAH solutions for the speciation of mercury in fish and plant materials by cold vapour atomic absorption spectrometry (CVAAS). *Analytical Methods*, 7.
- ✓ Krug, F.J., Piovezani Rocha, F.R. (2016). *Métodos de Preparo de Amostras Para Análise Elemental*. San Pablo, Brasil: Sociedade Brasileira de Quimical.
- ✓ Latham, M. C. (2002). Nutrición humana en el mundo en desarrollo. En Colección FAO: Alimentación y nutrición N° 29. Recuperado en: <http://www.fao.org/3/w0073s/w0073s00.htm>
- ✓ Lehner, A.F., Zyskowski, J., Johnson, M., Buchweitz, J.P. (2021). Improved accuracy in measurement of iodine in animal feeds by ICP/MS with alkaline dissolution. *Animal Feed Science and Technology*, 272, 114781
- ✓ Lehtonen, T., Peuravuori, J., Pihlaja, K. (2004). Degradative analysis of aquatic fulvic acid: CuO oxidation versus pyrolysis after tetramethylammonium hydroxide treatments in air and helium

atmospheres. *Analytica Chimica Acta*, 511, 349–356.

- ✓ Lehtonen, T., Peuravuori, J., Pihlaja, K. (2000). Degradation of TMAH treated aquatic humic matter at different temperatures. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 55, 151–160.
- ✓ Lopes Nunes, D., Pereirados Santos, E., Smanioto Barin, J., Mortari, S.R., Dressler, V.L., de Moraes Flores, E.M. (2005). Interference of nitrite and nitrogen dioxide on mercury and selenium determination by chemical vapor generation atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60(5), 731-736.
- ✓ Machado, I., Tissot, F. (2020). Dispersive liquid-liquid microextraction as a preconcentration alternative to increase ETAAS sensitivity in the analysis of molybdenum in bovine meat and pasture samples. *Talanta*, 212, 120783.
- ✓ Machado, I., Cesio, M.V., Pistón, M. (2017). In vitro bioaccessibility study of As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb and Zn from raw edible artichoke heads (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*). *Microchemical Journal*, 133, 663–668.
- ✓ Machado, I., Bergmann, G., Pistón, M. (2016) A simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for Fe and Zn determination in milk-based infant formulas using flame atomic absorption spectrometry (FAAS). *Food Chemistry*, 194, 373-376.
- ✓ Machado, I., Rodríguez-Arce, E., Cesio, M.V., Pistón, M. (2016) "Evaluation of ultrasound-assisted methods for sample preparation for the determination of total arsenic in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*)". En: *Arsenic Research and Global Sustainability. Proceedings of the Sixth International Congress on Arsenic in the Environment (As2016)* (243-244). Estocolmo, Suecia: Prosun Bhattacharya, Marie Vahter, Jerker Jarsjö, Jurate Kumpiene, Arslan Ahmad, Charlotte Sparrenbom, Gunnar Jacks, Marinus Eric Donselaar, Jochen Bundschuh, and Ravi Naidu.
- ✓ Magnusson, B., Örnemark, U. (2014). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods— A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, second ed. (ISBN 978-91-87461-59-0) www.eurachem.org
- ✓ Manjusha, R., Shekhar, R., Jai Kumar, S. (2019), Ultrasound-assisted extraction of Pb, Cd, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn from edible oils with tetramethylammonium hydroxide and EDTA followed by determination using graphite furnace atomic absorption spectrometer. *Food Chemistry*, 294, 384-389.
- ✓ Martins, P., Pozebon, D., Dressler, V.L., Kemiciki, G.A. (2002). Determination of trace elements in biological materials using tetramethylammonium hydroxide for sample preparation.

Analytica Chimica Acta, 470, 195–204.

- ✓ Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Data Handling in Science and Technology, 20A*. Amsterdam, Holanda: Elsevier Science.
- ✓ Matusiewicz, H., Golik, B. (2004). Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES) following tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solubilization. *Microchemical Journal*, 76, 23–29.
- ✓ Menezes, E.A., Oliveira, A.F., França, C.J., Souza, G.B., Nogueira, A.R.A. (2018). Bioaccessibility of Ca, Cu, Fe, Mg, Zn, and crude protein in beef, pork and chicken after thermal processing. *Food Chemistry*, 240, 75-83.
- ✓ Miller, J.N., Miller, J.C. (2010). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry, 6th edn*. Harlow, Inglaterra: Prentice Hall, Pearson Education Limited.
- ✓ Murthy, L., Menden E.E., Eller, P.M., Petering H.G. (1973). Atomic absorption determination of zinc, copper, cadmium, and lead in tissues solubilized by aqueous tetramethylammonium hydroxide. *Analytical Biochemistry*, 53, 365–372.
- ✓ National Research Council. (2005). Mineral tolerance of animals. Second Revised Edition. The national academy press, Washington D.C, United States.
- ✓ NHI, National Institutes of Health. (2020a). Molybdenum. Fact Sheet for Health Professionals. Recuperado de: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Molybdenum-HealthProfessional/>
- ✓ NHI, National Institutes of Health. (2020b). Selenium. Fact Sheet for Health Professionals. Recuperado de: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/#en1>
- ✓ NHI, National Institutes of Health. (2020c). Copper. Fact Sheet for Health Professionals. Recuperado de: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Copper-HealthProfessional/>
- ✓ NHI, National Institutes of Health. (2020d). Zinc. Fact Sheet for Health Professionals. Recuperado de: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional/>
- ✓ Nóbrega, J. A., Santos, M.C., de Souza, R.A., Cadore, S., Barnes, R.M., Tatro, M. (2006). Sample preparation in alkaline media. *Spectrochimica Acta Part B*, 61, 465-495.
- ✓ Nunes, A.M., Acunha, T.S., Oreste, E.Q., Lepri, F.G., Vieira, M.A., Curtius, A.J., Ribeiro, A.S. (2011). Determination of Ca, Cu, Fe and Mg in fresh and processed meat treated with tetramethylammonium hydroxide by atomic absorption spectrometry. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 22(10), 1850–1857.

- ✓ Nunes, A.M., Arromba de Souza, R., Santos da Silva, C., Alves Peixoto, R.R., Vieira, M.A., Ribeiro, A.S., Cadore, S. (2013). Fast determination of Fe, Mg, Mn, P and Zn in meat samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after alkaline solubilization. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32, 1–5.
- ✓ Oomen, A.F., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Wragg, J., Rempelberg, C., Sips, A., Wijnen, J. (2002). Comparison of Five In Vitro Digestion Models To Study the Bioaccessibility of Soil Contaminants. *Environmental Science & Technology*, 36, 3326-3334.
- ✓ Oss Giacomelli, M.B., Carminati Lima, M., Stupp, V., de Carvalho Junior, R.M., Borba da Silva, J.B., Bermejo Barrera, P. (2002). Determination of As, Cd, Pb and Se in DORM-1 dogfish muscle reference material using alkaline solubilization and electrothermal atomic absorption spectrometry with IrqRh as permanent modifiers or PdqMg in solution. *Spectrochimica Acta Part B*, 57, 2151–2157.
- ✓ Pereira, M., Tissot, F., Faccio, R., Ibáñez, F., Pistón, M. (2021). A simple and economical ultrasound-assisted method for Cd and Pb extraction from fruits and vegetables for food safety assurance. *Results in Chemistry*, 3, 100089
- ✓ Pistón, M., Silva, J., Pérez-Zambra, R., Knochen, M. (2009). Determination of total selenium by multicommutated-flow hydride generation atomic absorption spectrometry. Application to cow's milk and infant formulae. *Analytical Methods*, 1, 139-143.
- ✓ Pistón, M., Silva, J., Belluzzi, M., Suárez, A., Iaquina, F., Méndez, C., Cerminara, M., Panizzolo, L. (2020a). Estudio del contenido de selenio en carne vacuna luego del proceso de cocción. *INNOTEC*, 19, 37-51.
- ✓ Pistón, M., Suárez, A., Bühl, V., Tissot, F., Silva, J., Panizzolo, L. (2020b). Influence of cooking processes on Cu, Fe, Mn, Ni, and Zn levels in beef cuts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 94, 103624
- ✓ Pozebon, D.; Müller, A.; Dressler, V.L. (2020). Advances of nitrogen microwave plasma for optical emission spectrometry and applications in elemental analysis: a review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 35, 2113-2131.
- ✓ Raisbeck, M. F. (2020). Selenosis in Ruminants. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 36, 775–789.
- ✓ Ramos, A., Cabrera, M.C., Saadoun, A. (2012). Bioaccessibility of Se, Cu, Zn, Mn and Fe, and heme iron content in unaged and aged meat of Hereford and Braford steers fed pasture. *Meat*

Science, 91, 116-124.

- ✓ Reglamento Técnico MERCOSUR (DEROGACIÓN DE LAS RES GMC Nº 102/94 y Nº 35/96) MERCOSUR/GMC/RES. Nº 12/11 <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-internacional/14-2013/1>
- ✓ Rhee, M.S., Wheeler, M.S., Shackelford, S.D., Koohmaraie, M. (2004). Variation in palatability and biochemical traits within and among eleven beef muscles. *Journal of Animal Science*, 82, 534–550.
- ✓ Ribeiro, A.S., Curtius, A.J., Pozebon, D. (2000). Determination of As, Cd, Ni and Pb in human hair by electrothermal atomic absorption spectrometry after sample treatment with tetramethylammonium hydroxide. *Microchemical Journal*, 64, 105-110
- ✓ Ribeiro, A.S., Moretto, A.L., Arruda, M.A.Z., Cadore, S. (2003). Analysis of Powdered Coffee and Milk by ICP OES after Sample Treatment with Tetramethylammonium Hydroxide. *Microchimica Acta*, 141, 149–155.
- ✓ Rovira, P. (2007). Residuos en carne, una visión desde el sector agropecuario. *Bienestar y salud animal*. Recuperado de: https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R127/R_127_38.pdf
- ✓ Saadoun, A., Cabrera, M.C. (2012). Calidad nutricional de la carne bovina producida en Uruguay. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 21(2), 119-130.
- ✓ Schild, C.O., Giannitti, F., Medeiros, R.M.T., da Silva Silveira, C., Caffarena, R.D., Poppenga, R.H., Riet-Correa, F. (2019). Acute lead arsenate poisoning in beef cattle in Uruguay. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31(2), 307–310.
- ✓ Seideman, S.C., Cross, H.R., Crouse, J.D. (1988). Carcass characteristics, sensory properties and mineral content of meat from bulls and steers. *Journal of Food Quality*, 11, 497-507
- ✓ Shimizu, S., Cho, T., Murakami, Y. (1988). Molybdenum. En: Trace element analytical chemistry in medicine and biology. Bratter, P., Schramel, P. Berlín, Alemania: Walter de Gruyter
- ✓ Silva, R.G.L., Willie, S.N., Sturgeon, R.E., Santelli, R.E., Sella, S.M. (1999). Alkaline solubilization of biological materials for trace element analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst*, 124, 1843–1846.
- ✓ Skoog, D. A., Leary, F. J., Crouch, S.R. (2008). *Principios de Análisis Instrumental*. México D.F., México: Cengage Learning,
- ✓ Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2005). *Fundamentos de química analítica*. México D.F., México: International Thomson

- ✓ Superior Health Council. (2013). Red meat, processed red meats and the prevention of colorectal cancer. Recuperado de: <https://www.health.belgium.be/en/red-meat-processed-red-meats-and-prevention-colorectal-cancer-december-2013-shc-8858#anchor-20796>
- ✓ Suttle, N.F. (2010). *Mineral Nutrition of Livestock*. Recuperado de: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_agronomia/Produccion_Animal/Minerals_in_Animal_Nutrition.pdf
- ✓ The Norwegian Food Composition Table. (2006). The Norwegian Food Composition Table. Recuperado de: https://www.matportalen.no/verktoy/the_norwegian_food_composition_table/
- ✓ Thomas, R. (2004). *Practical Guide to ICP-MS*. Nueva York, Estados Unidos: Marcel Dekker.
- ✓ Traverso, S.D., Loretto, A.P., Donini, M.A., Driemeier, D. (2004). Lead poisoning in cattle in southern Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 56(3), 418-421.
- ✓ Tsalev, D.L., Dimitrov, T.A., Mandjukov, P.B. (1990). Study of vanadium (V) as a chemical modifier in electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 5, 189–194.
- ✓ Tsalev, D.L. & Slaveykova, V.I. (1992). Chemical Modification in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. Organization and Classification of Data by Multivariate Methods” Invited Lecture. *Journal of analytical atomic spectrometry*, 7, 147-153.
- ✓ Tsalev, D.L., Tserovski, E.I., Raitcheva, A.G., Barzev, A.I., Georgieva, R.G., Zaprianov, Z.K. (1993). Analytical scheme for the direct graphite-atomizer/flame atomic absorption spectrometric determination of fifteen trace elements in toenails for biological monitoring. *Spectroscopy Letters*, 26(2), 331–346. doi: <https://doi.org/10.1080/00387019308011535>
- ✓ Tsalev, D.L. (1995). *Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice*, volume III, 1st edn. CRC Press, Boca Raton
- ✓ Uruguay XXI. (2019). Informe Anual de Comercio Exterior. Recuperado de: https://www.uruguayxxi.gub.uy/uploads/informacion/0267d1fb12c53eaa4b94ade9125f4bb34f599b_cf.pdf
- ✓ USDA, U.S. Department of Agriculture. (2020). Food data: ground beef, raw. Recuperado de: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/1098212/nutrients>
- ✓ Vázquez-González J, Bermejo-Barrera P, Bermejo-Martínez F (1989) Determination of traces of molybdenum in foods by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 219, 79–87.
- ✓ VIM, Vocabulario Internacional de Metrología. (2020). Recuperado de:

<https://jcgmbipm.org/vim/en/5.14.html>

- ✓ Voth-Beach, L.M. & Shrader, D.E. (1987). Investigations of a Reduced Palladium Chemical Modifier for Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2, 45-50.
- ✓ Welz, B. & Sperling, M. (1999). *Atomic absorption spectrometry*. Weinheim, Alemania: WILEY-VCH Verlag GmbH.
- ✓ WHO, World Health Organization. (1996). Trace elements in human nutrition and health. Recuperado de: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/37931/2/9241561734_eng.pdf?ua=1
- ✓ Wood, J.D. (2017). Meat Composition and Nutritional Value. En: *Lawrie's Meat Science* (Eight Edition): Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition.
- ✓ Yonghua, L., Wuyi, W., Kunli, L., Hairong, L. (2007). Environmental behaviors of selenium in soil of typical selenosis area, China. *Journal of Environmental Sciences*, 20, 859–864.
- ✓ Zeinali, T., Salmani, F., Naseri, K. (2019). Dietary Intake of Cadmium, Chromium, Copper, Nickel, and Lead through the Consumption of Meat, Liver, and Kidney and Assessment of Human Health Risk in Birjand, Southeast of Iran. *Biological Trace Element Research*, 191, 338-347. doi: 10.1007/s12011-019-1637-6
- ✓ Zuin, V.G., Stahl, A.M., Zanotti, K., Segatto, M.L. (2020). Green and sustainable chemistry in Latin America: Which type of research is going on? And for what? Current Opinion in *Green and Sustainable Chemistry*, 25, 100379.

ANEXO I

Condiciones experimentales (MIP OES) para la determinación de Cu y Zn

Elemento	Longitud de onda (nm)	Posición de lectura	Flujo de nebulizador (L min ⁻¹)
Cu	324.75	0	1
Zn	213.86	0	0,45

Parámetros de validación para determinaciones mediante MIP OES.

Parámetro	Cu	Zn
Rango lineal mg L ⁻¹	0,009-2,0	0,27 – 2,0
LD (mg kg ⁻¹)	0,17	0,46
LC (mg kg ⁻¹)	0,51	1,54
Veracidad (n=10)	97,9	93,2
<i>t</i> _{experimental}	-0,79	-2,2
Precisión (RSD%, n=6)	3,3	2

*t*_{experimental}: Prueba *t* de Student, *t* (0,05, 10) = 2,26. LD y LC calculados a partir de señales de blanco y utilizando criterio 3 y 10s. Veracidad evaluada con CRM de músculo bovino.

Condiciones experimentales (HG-MIP OES) para la determinación de Se por el método de referencia.

Elemento	Longitud de onda (nm)	Posición de lectura	Flujo de nebulizador (L min ⁻¹)
Se	196,03	-70	0,45

Uso de cámara comercial MSIS (Agilent)

Parámetros de validación del método de referencia mediante HG-MIP OES.

Parámetro	Linealidad	LD	LC	Precisión (n=6)	Veracidad*
Resultado	5,0 – 50,0 µg L ⁻¹	0,032 mg kg ⁻¹	0,098 mg kg ⁻¹	10%	76-93%

*R(%) comparado con el valor certificado del CRM.

ANEXO II

Parámetros operativos utilizados en Agilent 7800 Quadrupole ICP-MS.

Parámetro	Condición
RF aplicada (kW)	1.55
Flujo de gas Plasma (L min ⁻¹)	15
Flujo de gas auxiliar (L min ⁻¹)	1.00
Flujo de gas carrier (L min ⁻¹)	1.02
Flujo de carrier gas en <i>modo HMI</i> (L min ⁻¹)	0.40 gas
Flujo de gas HMI (L min ⁻¹)	0.62
Profundidad de muestreo (mm)	8.0
Flujo de gas He en celda de colisión (mL min ⁻¹)	4.5
Tiempo de integración (s)	3.0
Nebulizador	Mira-Mist
Spray chamber	Scott type – double pass
Número de replicas	3

ANEXO III

Estudio de la variación de la concentración de los elementos en el tiempo.

	Muestra	Elemento	Día 1 mg kg ⁻¹	Día 2 mg kg ⁻¹	Día 6 mg kg ⁻¹	RSD%
Medio básico	CRM (M)	Cu (324.754 nm)	2,3	-	2,4	3
		Zn (213.856 nm)	122,3	-	115,7	3,9
		Cu (324.754 nm)	22,2	-	17	18,8
	RM (H)	Zn (213.856 nm)	131,5	-	114,1	10
		Mo (202.030 nm)	3,7	-	3,8	1,9
Medio ácido	CRM (M)	Cu (324.754 nm)	1,64	1,28	-	17,4
		Zn (213.856 nm)	89	87	94	4
		Cu (324.754 nm)	162	154	151	3,7
	RM (H)	Zn (213.856 nm)	97	88	128	20,1
		Mo (202.030 nm)	3,6	2,62	3,18	15,7
		Cu (324.754 nm)	1,34	1,26	-	4,4
	6301	Zn (213.856 nm)	118	127	116	4,9
		Mo (202.030 nm)	1,2	0,29	1,22	58,8
		Cu (324.754 nm)	1,86	1,74	-	4,7
	7401	Zn (213.856 nm)	117	113	122	3,8
		Mo (202.030 nm)	0,13	0,27	1,09	104,4
		Cu (324.754 nm)	2,2	-	-	-
	7301	Zn (213.856 nm)	107	-	126	11,5
		Mo (202.030 nm)	0,46	-	1,15	60,6

CRM (M): Material de referencia certificado de músculo bovino; RM (H): material de referencia de hígado bovino .

Hay muestras que no fueron evaluadas al segundo día de ser tratadas con el TMAH. Los resultados muestran que hay un cambio aleatorio en la concentración de los analitos, pero que es más crítico si la solución es neutralizada. Es decir que la solución básica es más estable en el tiempo.

ANEXO IV

Muestra	Humedad (%)	Mo (mg kg ⁻¹) base seca	Mo (mg kg ⁻¹) base fresca	Se (mg kg ⁻¹) base seca	Se (mg kg ⁻¹) base fresca
1	76,1	0,0616 ± 0,0029	0,01472 ± 0,00069	0,212 ± 0,009	0,0507 ± 0,0021
2	76,0	0,07446 ± 0,00066	0,01787 ± 0,00016	0,157 ± 0,003	0,03768 ± 0,00072
3	71,2	0,0396 ± 0,0090	0,0114 ± 0,0026	0,186 ± 0,008	0,0536 ± 0,0023
4	78,0	0,0689 ± 0,0035	0,01516 ± 0,00077	0,151 ± 0,007	0,0332 ± 0,0015
5	75,5	0,0714 ± 0,0024	0,01749 ± 0,00059	0,275 ± 0,012	0,0674 ± 0,0029
6	70,1	0,0837 ± 0,0081	0,0250 ± 0,0024	0,426 ± 0,013	0,1274 ± 0,0039
7	74,7	0,0502 ± 0,0036	0,01270 ± 0,00091	0,276 ± 0,011	0,0699 ± 0,0028
8	77,8	0,0756 ± 0,0045	0,0168 ± 0,0010	0,180 ± 0,008	0,0400 ± 0,0018
9	76,5	0,07218 ± 0,00024	0,016962 ± 0,000056	0,146 ± 0,006	0,0343 ± 0,0014
10	78,2	0,0690 ± 0,0043	0,01504 ± 0,00094	0,120 ± 0,003	0,02616 ± ,00065
11	75,8	0,0677 ± 0,0024	0,01638 ± 0,00058	0,870 ± 0,022	0,2105 ± 0,0053
12	74,6	0,06934 ± 0,00069	0,01761 ± 0,00017	0,785 ± 0,021	0,1994 ± 0,0053

n=3; promedio± desviación estándar

Apéndice 1: Publicaciones y presentaciones en congresos

Trabajos presentados en eventos científicos

2019- Presentación Oral en el "6º Encuentro Nacional de Química - ENAQUI6", realizado del 16 al 18 de octubre en Montevideo, Uruguay.

- ✓ "Desarrollo de métodos analíticos de extracción de metales en medio alcalino para la determinación de Cu, Zn, Cd y Mo en carne vacuna". F. Iaquina, I. Machado, M. Pistón.

2019- Presentación de e-póster en el "15th Rio Symposium on Atomic Spectrometry", realizado del 6 al 11 de octubre en Mendoza, Argentina.

- ✓ "Comparison of alkaline methods for the extraction of Cu and Zn in beef samples" F. Iaquina, I. Machado, A. Suárez, M. Pistón.

2018- Presentación tipo *shot-gun* en la "3rd International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment", realizada del 3 al 6 de diciembre en Caparica, Portugal.

- ✓ "A simple alkaline treatment for trace elements determination in Uruguayan beef samples". F. Iaquina, F. Tissot, I. Machado, M. Pistón.

2018- Presentación Oral en el "5to Congreso Uruguayo de Química Analítica", realizado del 24 al 26 de octubre de 2018 en Montevideo, Uruguay.

- ✓ "Desarrollo de un método analítico para la determinación de cobre y zinc en carne bovina con preparación de las muestras en medio alcalino". F. Iaquina, F. Tissot, A. Suárez, I. Machado, M. Pistón.

Publicaciones científicas

2020- Pistón, M., Silva, J., Belluzzi, M., Suárez, A., Iaquina, F., Méndez, C., Cerminara, M., Panizzolo, L. "Estudio del contenido de selenio en carne vacuna luego del proceso de cocción". INNOTECH (Revista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay), 19,37 -51 (2019). Disponible en: <https://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTECH/article/view/505> DOI: <https://doi.org/10.12461/19.05>

2021- Iaquina, F., Tissot, F., Fialho, L.L., Nóbrega, J.A., Pistón, M., Machado, I. Development of an alkaline method for the determination of Cu, Mo, and Zn in beef samples. *Food Anal. Methods* 14, 156-164 (2021). DOI: <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01861-w>

Manuscritos en evaluación

2021- Iaquinta, Fiorella; Lopes Fialho, Lucimar; A. Nóbrega, Joaquim; Machado, Ignacio; Pistón, Mariela. "Determination of Cd, Pb and Se in beef samples using aerosol dilution by ICP-MS" *Journal of Food Measurement and Characterization*.

2021- Iaquinta, Fiorella; Pistón, Mariela; Machado, Ignacio. "In vitro bioaccessibility of Cu and Zn in cooked beef cuts" *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*.

Estudio del contenido de selenio en carne vacuna luego del proceso de cocción

Study of the selenium content in beef after the cooking process

Estudo do teor de selênio na carne bovina após o processo de cozimento

RECIBIDO: 1/9/2019 → APROBADO: 4/12/2019 ✉ mpiston@fq.edu.uy

✉ PISTÓN, MARIELA (1); SILVA, JAVIER (1); SUÁREZ, ANALÍA (1); BELLUZZI, MARCELO (1); IAQUINTA, FIORELLA (1); PANIZZOLO, LUIS (2); MÉNDEZ, CARLOS (3); CERMINARA, MARCELO (4)

- (1) GRUPO DE ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA Y DESARROLLO DE ESTRATEGIAS SIMPLES PARA PREPARACIÓN DE MUESTRAS (GATPREM). ÁREA QUÍMICA ANALÍTICA, DEC, FACULTAD DE QUÍMICA. UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.
- (2) ÁREA DE QUÍMICA DE ALIMENTOS, CYTAL, FACULTAD DE QUÍMICA. UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.
- (3) INSTITUTO NACIONAL DE CARNES (INAC), GERENCIA DE CONTRALOR, ÁREA DE INOCUIDAD, MONTEVIDEO, URUGUAY.
- (4) IMERL, FACULTAD DE INGENIERÍA; DMMCC, FACULTAD DE CIENCIAS ECONÓMICAS. UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.
-

RESUMEN

Se determinó el contenido de selenio (Se) antes y después del proceso de cocción en tres cortes de carne vacuna (asado, cuadril y bola de lomo) provenientes de 20 animales. Los distintos cortes fueron sometidos a dos puntos de cocción. Cada corte fue dividido en varias porciones y se realizó la cocción en plancha y horno. El tratamiento de las muestras consistió en una digestión asistida con microondas y posterior determinación de Se mediante espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas acoplado a generación de hidruros (HG-MIP OES). El método analítico propuesto fue validado, resultó adecuado para el fin definido y presentó ventajas respecto a los métodos habitualmente utilizados en los laboratorios de análisis.

Los puntos de cocción se establecieron evaluando la pérdida de peso (desde 8 hasta 35%). Los resultados indican que la carne vacuna aporta entre 20 y 26% del

requerimiento diario de Se de un adulto. Este porcentaje se mantiene sin cambios significativos aun luego de una pérdida de peso de hasta un 35%, por lo que se concluye que la cocción no influye en el aporte de selenio a la dieta.

PALABRAS CLAVE: Selenio, valor nutricional, carne vacuna, cocción.

ABSTRACT

Selenium (Se) content was determined, before and after the cooking process, in three cuts of beef (rib plate, rump and knuckle) from 20 animals. Each cut was divided into several portions and cooked in a cooking plate and oven. Sample preparation consisted of a microwave assisted digestion and subsequent determination of Se by means of atomic emission spectrometry with microwave induced plasma coupled with hydride generation (HG-MIP OES). The proposed analytical method was validated and resulted suitable for the purpose presenting advantages compared to the standard methods commonly used in food analysis.

The cooking points were established by evaluating the weight loss (from 8 to 35%). The results indicate that beef provides between 20 and 26% of the daily intake requirement of Se of an adult. It was observed that this percentage remains without significant changes even after a weight loss of up to 35%, thus concluding that cooking does not influence the contribution to the diet of this trace element.

KEYWORDS: Selenium, nutritional value, beef, cooking.

RESUMO

O teor de selênio (Se) foi determinado antes e após o processo de cozimento em três cortes de carne bovina (placa de costela, quadril e lombo) de 20 animais. Os diferentes cortes foram submetidos a dois pontos de cozimento. Cada corte foi dividido em várias porções e o cozimento foi feito em chapa e forno. O tratamento da amostra consistiu em digestão assistida por microondas e subsequente determinação de Se por espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por microondas acoplado à geração de hidreto (HG-MIP OES). O método analítico proposto foi validado e adequado para a finalidade proposta, apresentando vantagens sobre os métodos comumente utilizados nos laboratórios de análise.

Os pontos de cozimento foram estabelecidos avaliando-se a perda de peso (de 8 a 35%). Os resultados indicam que a carne bovina fornece entre 20 e 26% da necessidade diária de Se de um adulto. Essa porcentagem permanece sem alterações significativas, mesmo após uma perda de peso de até 35%, portanto, conclui-se que o cozimento não influencia a contribuição do selênio na dieta.

PALAVRAS-CHAVE: Selênio, valor nutricional, carne bovina, cozimento.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha desarrollado en forma creciente el conocimiento acerca del papel que tienen en la nutrición humana diversos minerales traza (micronutrientes). Existe actualmente considerable investigación acerca del rol que juega el selenio (Se) en relación con la salud humana. El Se forma parte de metaloenzimas involucradas en diversos procesos metabólicos, tanto en animales como en vegetales (Hefnway, et al., 2008). Existen estudios que demuestran la asociación entre la deficiencia de Se y la aparición de ciertas enfermedades, entre ellas la enfermedad de Keshan (una afección cardíaca), la Enfermedad de Kashin-Beck (una osteoartropatía) y el cretinismo mixedematoso endémico, que causa retardo mental (Thomson, 2004; National Institute of Health, NIH, 2019). El RDA (Recommended Dietary Allowance) aceptado en Estados Unidos va desde 20 $\mu\text{g}/\text{día}$ para niños de hasta 3 años hasta 55 $\mu\text{g}/\text{día}$ para adultos. Estos valores se ven incrementados en el caso de la mujer embarazada o en el período de lactancia (Food and Nutrition Board, 2011).

La carne constituye una importante fuente de proteínas de alto valor biológico que proporciona todos los aminoácidos indispensables, fundamentales para el crecimiento, desarrollo y mantenimiento de las funciones vitales que permitirían un adecuado bienestar y salud. Es también una excelente fuente de micronutrientes (vitaminas, minerales y oligoelementos), que a menudo son limitantes en la dieta, como la vitamina A, hierro, zinc, cobre, selenio y otros compuestos bioactivos (Alfaia, et al., 2013).

Según las últimas estadísticas publicadas por el Instituto Nacional de Carnes (INAC), el 85% de las exportaciones de carne uruguaya corresponden a carne bovina (Instituto Nacional de Carnes, 2018). Además, Uruguay es uno de los países que más carne consume en el mundo, 100,9 kg/hab./año de las especies bovina, ovina, aviar y porcina, y se destaca en particular la carne bovina, con 59,2 kg/hab./año (Instituto Nacional de Carnes, 2018).

Los tratamientos térmicos pueden mejorar el valor nutricional de la carne, haciendo que aumente la bioaccesibilidad de los nutrientes o se generen pérdidas de estos por procesos de lixiviación (Lombardi Boccia, et al., 2005; Lopes, et al., 2015; Goran, et al., 2016). Existen dos estrategias generales de cocción por transferencia de calor que incluyen cocinar con calor seco o calor húmedo. Las cocciones en seco utilizan aire caliente para conducir el calor y los alimentos se cuecen en su propio jugo. Tales métodos de cocción incluyen horneado, asado y asado a la parrilla, métodos de cocción tradicionales que causan cambios inevitables en la cantidad de nutrientes disponibles (Alfaia, et al., 2013; Campo, et al., 2013; Domínguez, et al., 2015). Lombardi-Boccia et al. (2005) reportaron los porcentajes de retención para Fe, Cu y Zn de algunas carnes de Italia según el método de cocción y hallaron que para estos elementos el contenido total variaba luego de determinadas cocciones (Lombardi-Boccia, et al., 2005).

Se ha estudiado la distribución geográfica de los niveles de selenio en los suelos y se ha encontrado que algunos países, de forma notable China, presentan bajos niveles, asociados con la aparición de las enfermedades mencionadas anteriormente (Saadoun, et al., 2019). Investigadores uruguayos reportaron niveles de Se en cortes de carne vacuna de la raza Hereford y Bradford y encontraron valores de Se en

carne cruda que podrían aportar hasta el 100% del requerimiento diario para un adulto si se consumen 100 g (Cabrera, et al., 2010; Ramos, et al., 2012; Cabrera y Saadoun, 2014). No obstante, no se han encontrado reportes que aporten información sobre el contenido de este nutriente en el alimento luego de algún tipo de cocción.

Con el objetivo de evaluar cómo afecta la cocción aplicada a algunos cortes de carne vacuna de consumo popular en Uruguay, se estudió el porcentaje de retención del micronutriente luego de este proceso. Para ello se utilizó la ecuación descrita por Bognár y Piekarski (2000), en la que se relaciona la pérdida de peso que sufre el corte luego de la cocción y la concentración de selenio determinada (Bognár y Piekarski, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Las muestras de carne vacuna fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Carnes (INAC). La correspondencia entre la carne y sistema de alimentación fue corroborada mediante la conexión del Sistema Electrónico de Información de la Industria Cárnica (SEIIC) y el Sistema Nacional de Identificación Ganadera (SNIG), que garantizan la trazabilidad de todo el proceso. De allí también se obtuvo que la edad media de los animales fue de 25 meses (novillos y vaquillonas), con un peso en el rango de 109-153 kg (promedio de 139 kg) y procedentes principalmente de los departamentos de Soriano, Lavalleja y Florida.

Se muestrearon 20 medias canales con 36 horas de maduración sanitaria. El 50% de las medias canales provenían de animales con sistemas de alimentación terminados en pasturas, mientras que el otro 50% fue terminado a grano (feedlot). En el cuarteo se obtuvieron el asado, la herradura y el corte pistola. En las Figuras 1 y 2 se muestran los cortes de uno de los muestreos. El asado y el corte pistola fueron identificados mediante etiquetado para obtener correspondencia entre los cortes a bajar en el desosado (cuadril y bola de lomo) y los asados previamente separados. La etiqueta de trazabilidad (SEIIC) acompañó los cortes en todo el proceso (Figura 3).



Figura 1. Medias canales previo al cuarteo.



Figura 2. Pistolas en cuarteo.



Figura 3. Cortes identificados con etiqueta de trazabilidad (SEIIC).

En el desosado se bajaron los cortes y se retiraron de la línea de producción junto con la etiqueta de trazabilidad. Se extrajo una porción de aproximadamente 500 g de cada corte asado (centro de la parrilla costal), cuadril (Bíceps Femoral) y bola lomo (músculo Vastus Intermedius). Las porciones se etiquetaron, se envasaron al vacío y se llevaron a Facultad de Química en conservadoras refrigeradas.

En el laboratorio se realizó el deshuesado y desgrasado utilizando cuchillos de acero inoxidable (440C), y posteriormente se dividió cada corte en tres porciones de aproximadamente 100 g. Una de las porciones se analizó cruda y las otras dos se sometieron a cocción para luego ser analizadas. Tanto la porción cruda como las cocidas se homogenizaron y trituraron con picadora de cuchillas y fueron conservadas en tubo tipo Falcon® en freezer (-18 °C) hasta el momento del análisis.

Una vez trituradas las muestras se secaron en estufa a 103 °C según método AOAC 950.46 para obtener el producto seco y el contenido de humedad. Las muestras secas fueron molidas hasta obtener un polvo fino con molino de cuchillas (AOAC International, 2005).

Cocciones

Las cocciones se realizaron en plancha de aluminio con recubrimiento antiadherente Teflón® (Ufesa, modelo GR7451) y en horno eléctrico (Delne, modelo Te-5604 i). Se

pesaron las muestras de cada corte (asado, cuadril y bola de lomo) antes y después de la cocción para establecer la pérdida de peso en todos los casos. El proceso general consistió en sellar el corte en una plancha, como primera etapa, hasta alcanzar una determinada temperatura en el centro (Tabla 1) y posteriormente terminar la cocción en horno. La temperatura se controló en el centro de los cortes mediante una sonda de temperatura (ThermaQ): la temperatura de la plancha fue 300 °C y la del horno fue en promedio 250 °C.

Se buscó obtener dos puntos de cocción: poco cocido y muy cocido. En la Tabla 1 se resumen las condiciones de temperaturas de cocción según el corte para ambos puntos y en las Figuras 4 a 6 se muestra el aspecto del corte luego de la cocción.

TABLA 1. Condiciones de cocción. PC: poco cocido; MC: muy cocido.

Corte	Punto de cocción	Tiempo en plancha (min)	Temperatura al finalizar sellado (°C)	Tiempo en el horno (min)	Temperatura al sacar del horno (°C)	Tiempo total de cocción (min)
Asado	PC	4	50	5	75	9
Asado	MC	8	74	14	98	22
Cuadril	PC	8	24	12	53	20
Cuadril	MC	12	26	28	83	40
Bola de lomo	PC	7	34	11	64	18
Bola de lomo	MC	12	38	32	82	44



Figura 4. Cortes de asado poco cocido (izquierda) y muy cocido (derecha).



Figura 5. Cortes de cuadril poco cocido (izquierda) y muy cocido (derecha).



Figura 6. Cortes de bola de lomo poco cocidos (izquierda) y muy cocido (derecha).

Reactivos e instrumentación

El material utilizado fue previamente descontaminado utilizando una disolución de HNO_3 (Merck pa) 10% v/v. Los patrones de calibración de selenio se prepararon a partir de una disolución comercial de concentración 1000 mg L^{-1} (Carlo Erba). Se utilizó agua calidad I según norma ASTM (resistividad no menor a $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtenida de un sistema de purificación de agua Millipore®. La digestión de las muestras se realizó con HNO_3 ($4,5 \text{ mol L}^{-1}$). El ácido se obtuvo mediante un proceso de destilación *sub-boiling* (Milestone, subClean) a partir de ácido comercial. Todos los demás reactivos utilizados fueron de calidad para análisis o superior.

Para la evaluación de la veracidad de las determinaciones analíticas se utilizaron dos materiales de referencia certificados: uno de músculo bovino ERM-BB184 (provisto por el Institute for Reference Materials and Measurements, Comisión Europea) y otro de hígado bovino (SRM 1577c provisto por The National Institute of Standards and Technology, NIST).

Para las digestiones se utilizó un digestor de microondas (CEM, Mars 6) provisto con 12 vasos del tipo Easy Prep Plus®. Las determinaciones analíticas fueron realizadas en un espectrómetro de emisión atómica con plasma inducido por microondas (Agilent 4210 MIP OES) equipado con una antorcha estándar, y cámara de nebulización multimodo (MSIS®, Agilent) para generación de hidruros.

Tratamiento de las muestras

El tratamiento de las muestras desarrollado consistió en una digestión asistida por microondas: 0,5 g de muestra (seca y molida) se trataron con 10 mL de HNO_3 diluido $4,5 \text{ mol L}^{-1}$; el uso de ácidos diluidos para digestiones de muestras complejas ha sido validado por nuestro grupo en trabajos previos (Machado, et al., 2016). El programa de digestión fue: 15 minutos de calentamiento hasta $200 \text{ }^\circ\text{C}$, mantenimiento en $200 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos y enfriamiento posterior hasta temperatura ambiente (potencia 400-1800 W).

Una vez concluida la digestión se realizó una etapa de prerreducción para convertir cuantitativamente todo el analito al estado de oxidación IV para la posterior formación del hidruro correspondiente. Para esta etapa se tomaron 5 mL del digerido y se agregó HCl 37% (m/v) (relación muestra/ácido 1:1) en Erlenmeyer. La mezcla

se colocó en plancha calefactora (a ebullición controlada) durante 1 hora, posteriormente se dejó enfriar y se completó el volumen con agua ultrapura. La reducción en línea para la generación del hidruro correspondiente (H_2Se) fue realizada con $NaBH_4$ 2% (m/v) en $NaOH$ 0,5% (m/v).

Determinación de selenio

Las determinaciones se realizaron con la técnica de espectrometría de emisión atómica con generación de hidruros (HG MIP OES), a la longitud de onda de 196,026 nm. Las condiciones operativas fueron: caudal de nitrógeno $0,45 L min^{-1}$ (obtenido a partir de un generador Agilent 4107); velocidad de la bomba peristáltica 30 rpm; posición de observación de la antorcha -70, y tiempo de lectura 10 s.

Los patrones, las muestras y los blancos fueron sometidos al proceso de prerreducción descrito antes de la medición. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

Dado que se trata de una técnica que no se utiliza como método estándar para esta determinación se realizó la correspondiente validación. Se evaluaron los principales parámetros de desempeño (linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y veracidad), siguiendo las recomendaciones de la Guía Europea de validación Eurachem (Magnusson y Örnemark, 2014).

Los porcentajes de retención de selenio luego de las cocciones fueron calculados utilizando la guía de Bognár y Piekarski publicada en el año 2000. Se trata de una guía informativa muy completa sobre la evaluación y cálculo de los porcentajes de retención de minerales (y otros nutrientes) en platos preparados luego de algún tipo de cocción, tomando como referencia una porción de 100 g y contemplando en el cálculo la pérdida de peso de la pieza durante el proceso de cocción (Bognár y Piekarski, 2000). La ecuación utilizada fue:

$$\%R = \frac{\text{Contenido del nutriente}/100 \text{ g de carne cocida} \times \text{peso (g) de la carne cocida}}{\text{Contenido del nutriente}/100 \text{ g de carne cruda} \times \text{peso (g) de la carne cruda}} \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Validación del método analítico

El uso de la técnica HG-MIP OES para la determinación de Se en muestras complejas es novedoso y se requiere la validación completa del método analítico antes de utilizarlo para cualquier aplicación. Se trata de una técnica alternativa a las utilizadas en los métodos citados en el compendio de normas AOAC Internacional (AOAC 986.15; AOAC International, 2016) que evita el uso de gases inflamables y costosos en el laboratorio. En la Tabla 2 se resumen los parámetros de desempeño obtenidos.

TABLA 2. Parámetros de desempeño de la validación analítica (Magnusson y Örnemark, 2014).

Parámetro	Resultado
Linealidad (rango estudiado)	5,0 - 50 $\mu\text{g L}^{-1}$
Límite de detección	0,032 mg kg^{-1} (1,6 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Límite de cuantificación	0,098 mg kg^{-1} (4,9 $\mu\text{g L}^{-1}$)
Precisión (RSD %, n = 6)	10%
Veracidad (% de recuperación comparado con el valor certificado de los materiales de referencia certificados)	76 - 93%

Cuando se trabajó con determinaciones del orden de las partes por billón (ppb), de acuerdo con la relación de Horwitz, la precisión y la veracidad obtenidas fueron buenas (Rivera y Rodríguez, 2010). El límite de cuantificación obtenido fue apropiado para la determinación de Se en muestras de carne, y se pudo determinar niveles muy bajos de este elemento, lo cual no había sido reportado antes en la literatura con esta técnica. Los resultados obtenidos fueron adecuados para los fines propuestos porque demuestran que el método es exacto (preciso y veraz) para la determinación de Se a nivel de trazas y que se puede utilizar como alternativa a los métodos estándar.

Contenido de selenio en carnes antes y después de la cocción

Se realizaron las determinaciones de Se en 180 muestras (tres cortes, crudos, poco cocidos y cocidos de 20 animales) y se obtuvieron los resultados que se resumen en la Tabla 3.

TABLA 3. Contenido de Se en diferentes cortes de carne vacuna (n = 20 para cada corte). Los resultados se expresan como el promedio de todos los animales \pm desviación estándar (base seca).

Corte	Crudo ($\text{mg}/100 \text{ g}$)	Poco cocido ($\text{mg}/100 \text{ g}$)	Muy cocido ($\text{mg}/100 \text{ g}$)
Asado	0,038 \pm 0,004	0,038 \pm 0,004	0,044 \pm 0,004
Cuadril	0,041 \pm 0,004	0,043 \pm 0,004	0,047 \pm 0,005
Bola de lomo	0,044 \pm 0,005	0,041 \pm 0,005	0,044 \pm 0,005

Los resultados se expresan en base seca a los efectos de que puedan compararse entre los tres cortes, y puede observarse que el contenido de Se es bastante similar

en todos ellos. Estadísticamente se verificó que los valores, comparando los promedios entre cortes y según el punto de cocción, no difieren significativamente entre sí mediante test $t(0,05;20)$ ($t_{\text{tabla}} = 2,023$; $t_{\text{calculado}} = -0,118$).

El contenido en los cortes crudos es significativamente menor a los reportados por varios autores en publicaciones anteriores en carnes crudas uruguayas (Cabrera, et al., 2010; Ramos, et al., 2012; Cabrera y Saadoun, 2014). Estos autores reportaron niveles de selenio en el rango de 0,049 a 0,130 mg/100 g en base fresca (aproximadamente 0,20 a 0,52 mg/100 g base seca), sin embargo, se debe tener en cuenta que la variabilidad en el contenido de Se es muy grande según la edad de los animales y la zona donde fueron alimentados con pasturas. Como ejemplo se puede mencionar que durante los muestreos se recibieron cortes de dos animales de mayor edad (53 y 56 meses) y se notó un aumento en el contenido de Se (estos no fueron considerados en los resultados presentados). Por otra parte, los trabajos mencionados no se refieren a los mismos cortes, ni se describe claramente la edad de los animales. Los resultados obtenidos sí son concordantes con los reportados a nivel internacional (0,021-0,033 mg/100 g) en las tablas de alimentos noruegas NORFOODS (Norwegian Food Safety Authority, 2018) y con niveles reportados en Europa (Demirezen y Uruc, 2006).

No se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos de los animales cuya terminación fue con pastura o con grano (verificado mediante test t-Student, nivel de confianza 95%, $n = 10$ animales de cada sistema de alimentación).

A los efectos de evaluar la retención de Se en los diferentes cortes se tomaron como valores de partida aquellos obtenidos para los cortes crudos y se comparó con los obtenidos en los cortes cocidos. La ecuación de Bognár y Piekarski se aplicó para cada una de las muestras analizadas según la pérdida de peso de cada muestra durante la cocción. Los resultados obtenidos (porcentaje de retención, %R) según el corte y el punto de cocción se presentan en la Tabla 4. Cabe mencionar que resulta muy difícil alcanzar en todas las muestras el mismo porcentaje de pérdida de peso en cada punto, por lo cual se fue registrando y sistematizando el proceso para obtener siempre dos puntos bien definidos, tanto por el aspecto como por la temperatura, al final del proceso en el centro del corte (Tabla 1). Los resultados de %R obtenidos para cada corte y para cada punto de cocción se promediaron y se expresan en la Tabla 4. El procesamiento de las carnes se realizó tomando en consideración cómo lo haría un consumidor en su domicilio o en un restaurante. No se agregaron sal ni otros condimentos.

TABLA 4. Porcentaje de retención promedio de Se en cortes de carne vacuna según dos puntos de cocción (Bognár y Piekarski, 2000).

Corte	Poco cocido (pérdida de peso entre 8 y 12%)	Muy cocido (pérdida de peso entre 20 y 33%)
Asado	101 ± 8	104 ± 8
Cuadril	91 ± 7	83 ± 7
Bola de lomo	86 ± 7	90 ± 7

Considerando los resultados obtenidos y su correspondiente incertidumbre asociada, se puede observar que en general no existen pérdidas significativas del nutriente, aun cuando se alcanza un porcentaje de pérdida de masa de 33% (lo cual se corresponde con un punto bien cocido).

Información nutricional

Existen guías que reportan valores de ingestas dietéticas de referencia (IDR) y que contienen tablas con los niveles de ingesta recomendada de los oligoelementos, entre otras informaciones relevantes para la nutrición. El valor de IDR es el nivel promedio diario de ingesta suficiente por medio de la dieta necesario para satisfacer los requerimientos de nutrientes de casi todas las personas sanas (97-98%) en un grupo (National Institute of Health, NIH, 2011).

En la Tabla 5 se muestran los valores de IDR para Se según la etapa de la vida.

TABLA 5. IDR de Selenio en la dieta según las edades, expresadas en microgramos por día. Los grupos por edades se refieren a hombres y mujeres.

Grupos según edades	IDR $\mu\text{g}/\text{día}$
1 a 3 años	20
4 a 8 años	30
9 a 13 años	40
14 hasta más de 70 años	55
Embarazadas	60
Mujeres en etapa de lactancia	70

Los estudios sobre valor nutricional de un alimento deben evaluar las concentraciones de los nutrientes en la forma en que el alimento puede ser consumido, en el caso de la carne vacuna se consume cocida (el punto de cocción es a gusto del consumidor). Al analizar los resultados obtenidos, según el contenido de Se en cada corte y la cocción y la IDR por edades, es posible tener una idea del porcentaje de la necesidad diaria que este alimento puede cubrir. Para esto se consideró una porción de 100 g de carne en todos los casos. En la Tabla 6 se presentan los resultados.

TABLA 6. Porcentaje de la IDR cubierta según franja etaria por porción de 100 g del alimento cocido. PC: poco cocido, MC: muy cocido.

Cortes	Edades				
	4 a 8 años	9 a 13 años	14 hasta más de 70 años	Embarazadas	Mujeres en etapa de lactancia
Asado PC	37	27	20	18	16
Asado MC	44	33	24	22	19
Cuadril PC	41	31	22	20	18
Cuadril MC	48	36	26	24	20
Bola de lomo PC	39	29	21	19	17
Bola de lomo MC	44	33	24	22	19

Con base en estos resultados se demuestra que la carne vacuna es una buena fuente de Se en la dieta. Esto se reafirma considerando que la bioaccesibilidad del elemento en carne es entre el 75 y 91% (Ramos, et al., 2012). En un país como Uruguay es frecuente que se consuman más de 100 g en una comida por parte de un adulto y que esto ocurra con frecuencia en la semana. Si se considera que los niños de entre 4 y 8 años ya consumen este alimento en diversas formas, el aporte es aún mayor.

El consumir la carne menos cocida, lo que generalmente se denomina “bien jugosa”, con el centro de color rojo, o hacerlo en forma más cocida, “bien cocida” o “pasada”, no afecta significativamente el contenido del elemento en el alimento.

Este tipo de estudios se podrá extender a un mayor número de muestras, pero por las tendencias que se muestran en este trabajo es de esperar que se mantengan. Si bien el trabajo abarca pocas muestras, estas se han obtenido a lo largo de un período de casi dos años, y dado que el selenio es un elemento muy variable en los suelos y pasturas según la estación y región geográfica, es importante que se realicen en períodos cortos de tiempo y a largo plazo para hacer un seguimiento a la situación e informar al sector productivo de los resultados.

CONCLUSIONES

Se pudo concluir que la concentración de selenio en los cortes luego de la cocción no se vio significativamente afectada, por lo cual el valor nutricional se mantuvo. Se confirmó que la carne vacuna es una buena fuente de selenio en la dieta.

Adicionalmente se desarrolló y validó un método analítico simple y económico para la determinación de selenio en muestras de carne vacuna.

Este tipo de estudios se consideran de importancia para el sector productivo y para la población en general debido a que el valor nutricional de los alimentos debe evaluarse en las formas en las que estos habitualmente se consumen.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-Proyecto Vinculación con el Sector Productivo-1608).

Al Programa de Ciencias Básicas (PEDECIBA).

Al Frigorífico Pando – Ontilcor S.A por proporcionar las muestras.

Al Dr. Juan Burghi (INAC) y la Ing. Paz Xavier (INAC) por su colaboración en la obtención de las muestras.

A los estudiantes Valentina Meléndrez y Fabián Bermúdez.

REFERENCIAS

- Alfaia, C.M., Lopes, A.F. y Prates, J.A.M., 2013. *Diet quality*. New York: Human Press. ISBN: 978-1-4614-7338-1.
- AOAC International, 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 18ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 950.46, First Action 1950.
- AOAC International, 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20va ed. Maryland: AOAC. Official Method 986.15, first action 1986-final action 1988.
- Bognár, A. y Piekarski, J., 2000. Guidelines for Recipe Information and Calculation of Nutrient Composition of Prepared Foods (Dishes). En: *Journal of food composition and analysis*, 13(4), pp.391-410. <https://doi.org/10.1006/jfca.2000.0922>.
- Cabrera, M., Ramos, A., Saadoun, A. y Brito, G., 2010. Selenium, copper, zinc, iron and manganese content of seven meat cuts from Hereford and Braford steers fed pasture in Uruguay. En: *Meat Science*, 84(3), pp.518–52. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.10.007>.
- Cabrera, M.C. y Saadoun, A., 2014. An overview of the nutritional value of beef and lamb meat from South America. En: *Meat Science*, 98(3), pp.435-444. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.033>.
- Campo, M., Muela, E., Olleta, E., Moreno, L., Santaliestra-Pasías, A., Mesana, M. y Sañudo, C., 2013. Influence of cooking method on the nutrient composition of Spanish light lamb. En: *Journal of Food Composition and Analysis*, 31(2), pp.185–190. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.05.010>.
- Demirezen, D. y Uruc, K., 2006. Comparative study of trace elements in certain fish, meat and meat products. En: *Meat Science*, 74(2), pp.255-260. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2006.03.012>.
- Domínguez, R., Borrajo, P. y Lorenzo, J., 2015. The effect of cooking methods on nutritional value of foal meat. En: *Journal of Food Composition and Analysis*, (43), pp.61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2015.04.007>.
- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine, National Academies, 2011. Dietary reference intakes (DRIs): recommended dietary allowances and adequate intakes, elements [En línea]. En: Institute of Medicine, Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium, Ross A.C., Taylor C.L., Yaktine A.L., et al., (eds.). *Dietary reference intakes for Calcium and*

- Vitamin D*. Washington: National Academic Press. [Consulta: 27 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56068/table/summarytables.t3/?report=objectonly>.
- Goran, G.V., Tudoreanu, L., Rotaru, E. y Crivineanu, V., 2016. Comparative study of mineral composition of beefsteak and pork chops depending on the thermal preparation method. En: *Meat Science*, (118), pp.117-121. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2016.03.031>.
- Hefnway, A.E. y Pérez, J.T., 2008. Selenio y salud animal. Importancia, deficiencia, suplementación y toxicidad. En: *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar*, (11), pp.153-165. <https://doi.org/10.25110/arqvet.v11i2.2008.2571>.
- Instituto Nacional de Carnes (INAC), 2006. *Handbook of uruguayan meat* [En línea]. Montevideo: Instituto Nacional de Carnes [Consulta: 18 de agosto de 2019]. Disponible en: http://www.inac.gub.uy/innovaportal/file/2043/1/manual_corregido_2a_edicion.pdf.
- Instituto Nacional de Carnes (INAC), 2018. *Reporte mercado doméstico* [En línea]. Montevideo: Instituto Nacional de Carnes [Consulta: 18 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://www.inac.uy/innovaportal/file/16190/1/informe-consumo-de-carnes-mercado-domestico--cierre-2017-vf.pdf>.
- Lombardi-Boccia, G., Lanzi, S. y Aguzzi, A., 2005. Aspects of meat quality: trace elements and B vitamins in raw and cooked meats. En: *Journal of Food Composition and Analysis*, 18(1), pp.39-46. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.007>.
- Lopes, A., Alfaia, C., Partidário, A., Lemos, J. y Prates J., 2015. Influence of household cooking methods on amino acids and minerals of Barrosã-PDO veal. En: *Meat Science*, (99), pp.38-43. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.08.012>.
- Machado, I., Dol, I., Rodríguez-Arce, E., Cecio, V. y Pistón, M., 2016. Comparison of different sample treatments for the determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*). En: *Microchemical Journal*, (128), pp.128-133. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.04.016>.
- Magnusson, B. y Örnemark, U., 2014. *Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods – A laboratory guide to method validation and related topics*. 2a ed. Torino: Eurachem. ISBN: 978-91-87461-59-0.
- National Institute of Health (NIH), 2011. *Dietary reference intakes (DRIs): recommended dietary allowances and adequate intakes, elements* [En línea]. Bethesda: National Institute of Health, [Consulta: 27 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK56068/table/summarytables.t3/?report=objectonly>.
- National Institute of Health (NIH), 2019. *Selenium, fact sheet for health professionals* [En línea]. Bethesda: National Institute of Health. [Consulta: 27 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Selenium-HealthProfessional/>.
- Norwegian Food Safety Authority, 2018. *The Norwegian food composition table* [En línea]. Oslo: Norwegian Food Safety Authority, [Consulta: 23 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.norwegianfoodcomp.no/poultry-and-meat-g3>.

- Ramos, A., Cabrera, M.C. y Saadoun, A., 2012. Bioaccessibility of Se, Cu, Zn, Mn and Fe, and heme iron content in unaged and aged meat of Hereford and Braford steers fed pasture. En: *Meat Science*, 91(2), pp.116-124. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.01.001>.
- Rivera, C.A. y Rodríguez, M.R., 2010. Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayo NMX-EC-17025-IMNC-2006. En: CENAM. *Simposio de Metrología 2010*. Santiago de Querétaro, México (27-29 de octubre de 2010) [En línea]. Santiago de Querétaro: CENAM. [Consulta: 6 de setiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp03c.pdf>.
- Saadoun, A., Cabrera, M.C., Terevino, A., Del Puerto, M. y Zaccari, F., 2019. Nutritional value of bovine meat produced on pasture. En: *Encyclopedia of Food Security and Sustainability*, (2), pp.189-196.
- Thomson, C.D., 2004. Assessment of requirements for selenium and adequacy of selenium status: a review. En: *European Journal of Clinical Nutrition*, 58(3), pp.391-402. <https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1601800>.



Development of an Alkaline Method for the Determination of Cu, Mo, and Zn in Beef Samples

Fiorella Iaquinta¹ · Florencia Tissot¹ · Lucimar Lopes Fialho² · Joaquim A. Nóbrega² · Mariela Pistón¹ · Ignacio Machado¹

Received: 6 June 2020 / Accepted: 22 September 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

An alkaline sample treatment using tetramethylammonium hydroxide was optimized and validated for the determination of Cu, Mo, and Zn in beef samples from Uruguay, aiming to contribute to the food quality evaluation of this product. The optimization of the developed method was performed by means of multivariate experiments. Copper and Zn were determined by flame atomic absorption spectrometry and Mo was determined by electrothermal atomic absorption spectrometry. The proposed method consisted of adding 5.0 mL of ultrapure water to 0.25 g of the sample, followed by 1.5 mL of tetramethylammonium hydroxide 25% w w⁻¹ and 60 min at 85 °C in a water bath. After centrifuging, the obtained solution can be used for the analytical determinations of the three elements. Certified reference materials were analyzed and a comparison with microwave-assisted acid digestion was performed to guarantee reliability. At the 95% significance level, the obtained results were statistically equivalent to the certified values and to those obtained by total acid digestion for all the studied elements. Analytical precision expressed as relative standard deviation was less than 8% in all cases. Copper, Mo, and Zn were determined in Uruguayan beef samples using the proposed alkaline method. Besides, novel information concerning Mo levels was presented in this work.

Keywords Beef · Micronutrients · Alkaline sample treatment · Atomic absorption spectrometry

Introduction

Beef is an important source of proteins with high biological value. It provides all the essential amino acids required for the proper development and maintenance of vital functions. Since the human organism is not able to synthesize these essential amino acids, they must be available through the diet. Beef is also a good source of micronutrients such as vitamins, minerals, and trace elements, which are often limiting in the diet (Alfaia et al. 2013).

From an economic point of view, according to the latest statistics published by the National Meat Institute (INAC),

about 81% of Uruguay's meat exports correspond to beef (INAC 2020). Besides, Uruguay is one of the higher meat consumers in the world, with 97.7 kg/inhabitant per year considering bovine, ovine, avian, and porcine species. Beef consumption is about 56.9 kg/inhabitants per year. Among the most consumed cuts are the top sirloin and the rib plate (INAC 2018, 2020).

To evaluate beef quality, it is necessary to determine the content of nutrients associated with highly consumed cuts. Copper and Zn are essential elements present in beef. These elements are part of metalloenzymes involved in various metabolic processes (National Research Council 2005). Molybdenum is essential as well, as it is a cofactor of enzymes such as sulfite oxidase, xanthine oxidase, and aldehyde oxidase, while its role is strongly associated with the levels of Cu and Zn (Machado and Tissot 2020). Previous studies have reported Cu and Zn content in Uruguayan beef cuts (Cabrera et al. 2010; Ramos et al. 2012; Cabrera and Saadoun 2014; Pistón et al. 2020); however, there is no information about Mo levels. In general, there are few publications about Mo in beef worldwide (Vázquez-González et al. 1989).

Since different varieties of meat can be a good source of Cu and especially Zn (Alfaia et al. 2013), it is interesting to

✉ Mariela Pistón
mpiston@fq.edu.uy

✉ Ignacio Machado
imachado@fq.edu.uy

¹ Grupo de Análisis de Elementos Traza y Desarrollo de Estrategias Simples para Preparación de Muestras (GATPREM). Graduate Program in Chemistry. Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

² Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA), Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil

develop rapid and straightforward analytical methods for their efficient evaluation. Considering that elemental food composition data is important for consumers, as well as for health professionals, the development of analytical procedures to easily determine micronutrients in this product is of utmost importance.

Currently, ecological aspects have led analytical chemists to better review certain critical parameters in the development of new methods, such as operating time, safety, the volume/concentration ratio of solvents, and energy consumption, among others. Green analytical chemistry is a concept of sustainable development that attempts to eliminate or minimize the environmental impact caused by the execution of analytical processes (Bendicho et al. 2012; Machado et al. 2016). Special attention has been given to sample preparation methods involving procedures with minimal handling and time consumption, thus reducing analyte loss and potential contamination.

In this regard, an alternative to classic sample preparation methods, such as microwave-assisted acid digestion or dry mineralization, for the preparation of beef samples, was developed. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) was used as the extraction solvent, since it has been reported as a good animal tissue solubilizer agent, capable of achieving quantitative extractions of several elements from complex matrixes (Nunes et al. 2013; Torres et al. 2016; Nóbrega et al. 2006; Aranha et al. 2016).

The use of TMAH has been previously described for the dissolution of animal tissues for the determination of metallic ions by atomic spectrometry. It was firstly reported by Murthy et al. for the digestion of rat liver, kidney, and hair samples (Murthy et al. 1973). It was later reported by Julshamn and Andersen as an alternative for digesting human muscle biopsies for the determination of several transition metals by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) (Julshamn and Andersen 1979). The solubilization of biological samples that contain fats may be carried out using TMAH, prior to the determination of different analytes by flame atomic absorption spectrometry (FAAS), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), or ETAAS (Nóbrega et al. 2006). In this context, TMAH has been successfully applied to perform simultaneous extractions of major, minor, and trace elements from meat samples (Nunes et al. 2011, 2013).

In this work, an alkaline extraction method for the determination of Cu, Mo, and Zn using TMAH was developed. This method was optimized using a multivariate design and validated for the determination of these elements in beef samples.

The obtained results were compared with those obtained using microwave-assisted acid digestion being statistically comparable. Thus, this method can be considered as an alternative to traditional acid sample preparation procedures. In

addition, a very low volume of TMAH per sample is used generating less dangerous residues and the extraction can be carried out with low-cost laboratory materials and equipment. The determination of essential elements such as Cu, Mo, and Zn constitutes a valuable input to assess food quality of different beef cuts. Furthermore, the obtained results will provide novel information about Mo levels in beef. To the best of our knowledge, this is the first report describing an alkaline Mo extraction method using TMAH for different beef cuts.

Materials and Methods

Reagents

Standard solutions for calibration curves were prepared by serial dilution of a commercial atomic absorption solution (1000 mg L^{-1}) of Cu and Zn (Fluka, NY, USA). In the case of Mo, a 1000 mg kg^{-1} stock solution was prepared from ammonium molybdate $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba, MI, Italy).

For the alkaline extraction procedure, TMAH 25% w w⁻¹ in methanol (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) and $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ultrapure resistivity water (ASTM Type I) obtained from a Millipore™ DirectQ3 UV water purification system (and Milli-Q®, Millipore, Bedford, MA, USA) were used. Standard solutions for calibration curves were prepared using the same final TMAH concentration as the samples.

A commercial solution of palladium nitrate $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ (Merck, Darmstadt, Germany) containing 10 g L^{-1} and a commercial solution of magnesium nitrate MgNO_3 (Merck, Darmstadt, Germany) containing 20 g L^{-1} were used to prepare the corresponding matrix modifiers for ETAAS determinations.

Ultrapure HNO_3 used for ICP-MS and FAAS determinations was obtained from a Milestone duoPUR quartz sub-boiling distillation system (Milestone, Sorisole, Italy).

Analytical Determinations

Zinc and Cu determinations were performed by FAAS using a Perkin Elmer AAnalyst 200 spectrometer (Perkin Elmer, USA), operated at 213.86 nm (Zn) and 324.75 nm (Cu), respectively. Hollow cathode lamps (Perkin Elmer, USA) were operated as recommended by the manufacturer. A 10-cm burner was used. The flame composition was acetylene (2.5 L min^{-1}) and air (10.0 L min^{-1}).

Molybdenum determinations were performed by ETAAS using a Thermo Scientific iCE 3500 spectrometer (Thermo Scientific, MA, USA). A transversely heated graphite tube furnace module (Thermo Scientific, MA, USA) was used. The analytical line at 313.3 nm was employed, and integrated absorbance was used for quantitation. Pyrolytically coated

graphite tubes (Thermo Scientific, MA, USA) were employed. Argon 99.998% (Praxair, Montevideo, Uruguay) was used as the purge and protective gas at a flow rate of 0.2 mL min⁻¹, except during atomization step. Pyrolysis and atomization temperatures were set at 1800 °C and 2750 °C, respectively. The matrix modifier employed for analytical determination was 5 µg of Pd.

Molybdenum determinations by ICP-MS were performed using an Agilent 7800 Quadrupole ICP-MS (Agilent Technologies, Japan) operated in *No gas-HMI* and *He-HMI* acquisition mode. *No gas* mode means not using the collision cell, and *He* mode means the collision cell is pressurized with He (99.999%, White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brazil). *HMI* mode implies that aerosol was diluted with argon at the optimized *HMI* gas flow rate of 0.62 L min⁻¹ and carrier gas flow rate of 0.40 L min⁻¹, thus 1.02 L min⁻¹ of total flow rate (Barros et al. 2018). Argon (99.999%, White Martins-Praxair, Brazil) was used in this equipment. Plasma operating conditions used are shown in Table 1. The isotopes monitored as internal standards were ⁶⁹Ga⁺, ⁷⁰Ge⁺, ⁸⁹Y⁺, and ¹⁰⁴Pd⁺.

Samples

Rib plate and top sirloin samples were provided by the National Institute of Meat of Uruguay (INAC) that has an Electronic Information System of the Meat Industry (SEIIC) linked in turn to the National Livestock Identification System (SNIG), thus assuring the traceability of the entire sampling process. The average age of the animals was 25 months with an average weight of 139 kg.

Table 1 Operating parameters used in Agilent 7800 Quadrupole ICP-MS

Instrument parameter	Operating condition
RF applied power (kW)	1.55
Plasma gas flow rate (L min ⁻¹)	15
Auxiliary gas flow rate (L min ⁻¹)	1.0
Carrier gas flow rate (L min ⁻¹)	1.02
Carrier gas flow rate in <i>HMI mode</i> (L min ⁻¹)	0.40
<i>HMI</i> gas flow rate (L min ⁻¹)	0.62
Sampling depth (mm)	8.0
He flow rate in collision cell (mL min ⁻¹)	4.5
Integration time (s)	3.0
Nebulizer	Mira - Mist
Spray chamber	Scott type - double pass
Number of replicates	3
Isotopes monitored	⁹⁵ Mo ⁺ , ⁹⁶ Mo ⁺ , ⁹⁸ Mo ⁺

Portions of approximately 500 g of rib plate and top sirloin were extracted, labeled, and vacuum-packed in a slaughterhouse, and then transported in refrigerated preservatives to the Faculty of Chemistry, Universidad de la República.

In the laboratory, the deboning and degreasing were performed, using stainless steel knives. Each raw cut was divided into portions of approximately 100 g. The samples were then homogenized and crushed with a stainless steel knife chopper and stored in polypropylene tubes at -18 °C.

Subsequently, the samples were dried according to the AOAC 950.46 method to obtain the dry product and moisture content (AOAC 2019). The dried samples were ground to a fine powder with a stainless steel knife mill and stored in polypropylene tubes at room temperature. Analyses were performed on the dried samples.

For the extraction optimization and method validation, Bovine Muscle (ERM-BB184 provided by LGC Standards, Belgium) and Bovine Liver (RM-Agro E3001a provided by Embrapa, Brazil) were used.

Sample Preparation

Alkaline Extraction

The optimized procedure was as follows: 0.25 g of raw dried meat was accurately weighted in a glass tube and then, 5.0 mL of ultrapure water and 1.5 mL of TMAH 25% (w w⁻¹) in methanol were added. The glass tubes were then put inside a water bath for 60 min at 85 °C. The mixture was brought to a final volume of 10.0 mL with ultrapure water, centrifuged for 30 min at 3500 rpm, and filtered through a 0.45-µm pore membrane. The filtered solution was used for the corresponding instrumental measurement. Each sample was analyzed in triplicate. Reagent blanks were also run.

Microwave-Assisted Acid Digestion for Cu and Zn Determinations by FAAS

For microwave-assisted acid digestion, an analytical microwave oven (CEMTM, Mars 6, NC, USA) was used. Samples were prepared as follows: 0.5 g of raw dried meat was accurately weighted in the Easy Prep PlusTM vessels and 10.0 mL of concentrated HNO₃ was added. For digestion, the power was varied between 400 and 1800 W and the program consisted of a 15-min ramp to 200 °C and held for 15 min, while the maximum pressure equaled 500 psi. The solutions obtained after digestion were used for analytical determinations, which were carried out in triplicate. Reagent blanks were also run.

Microwave-Assisted Acid Digestion for Mo Determinations by ICP-MS

The digestions were carried out using an ultraWAVE™ microwave system based on the single reaction chamber (SRC) design (Milestone, Sorisole, Italy). It has a 1500-W microwave power source that distributes microwave energy to a 1-L chamber that can hold racks with vessels that can vary the volume. Direct pressure and temperature control of the chamber provide direct control of every sample. The experiments were carried out using a rack with 15 TFM vessels of 15 mL capacity each. Volumes of 150 mL of water and 5 mL of concentrated HNO₃ were inserted into the SRC and the chamber was pressurized to 40 bar with nitrogen (99.9%, White Martins-Praxair, Brazil).

Masses of 0.1 g of raw dried meat were accurately weighed and transferred to TFM vessels and 4.0 mL of concentrated HNO₃ plus 1.5 mL of H₂O₂ were added to each vessel. The following heating program was applied: 1st step: 10 min to 150 °C, 2nd step: hold at 150 °C for 2 min, 3rd step: 15 min to 230 °C, and 4th step: hold at 230 °C for 10 min. All steps were performed at 1500 W of applied power. Maximum pressure was set at 120 bar. After cooling down to 60 °C, the chamber was depressurized, and digests were diluted with deionized water up to 10.0 mL.

Optimization of Alkaline Extraction Conditions

Optimization was performed using multivariate experiments, namely, central composite designs (three variables and at three levels), for Cu and Zn, to obtain the best extraction conditions (Massart et al. 1997). Two different central composite designs were performed to study the influence of the following variables: TMAH concentration, temperature, and time. For both designs, the evaluated response was the mean recovery (R%), comparing in the first case with the corresponding certified values of the CRM (bovine muscle) (Table 2), and in the second case analyzing real beef samples considering the values obtained using a total acid digestion as the 100% (Table 3).

Table 2 Experimental conditions and results of the first multivariate experimental design, using the bovine muscle CRM

Experiment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume of TMAH (mL)	0.25	0.75	0.25	0.75	0.50	0.75	0.25	0.75	0.25	0.75
Temperature (°C)	50	50	50	50	60	60	70	70	70	70
Time (min)	45	45	75	75	60	60	45	45	75	75
Zn recovery (%)	43	52	39	65	55	60	44	74	52	71
Cu recovery (%)	83	82	76	80	85	87	86	89	87	89

Table 3 Experimental conditions and results of the second multivariate experimental design maintaining an extraction time of 60 min, using beef samples

Sample	Experiment	1	2	3	4	5
Rip plate	Volume of TMAH (mL)	1.50	1.00	0.75	0.75	1.50
	Temperature (°C)	75	75	80	85	85
	Zn recovery (%)	89	77	69	70	96
Top sirloin	Cu recovery (%)	100	83	65	62	99
	Zn recovery (%)	87	90	80	77	97
	Cu recovery (%)	111	109	94	93	107

Method Validation

Once the critical variables were optimized, the validation was performed according to the recommendations of the Eurachem Guide (Magnusson and Örnemark 2014). The following figures of merit were studied: linear range, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, and trueness. Precision and trueness were evaluated using the CRM of bovine muscle for Cu and Zn and the CRM of bovine liver for Mo.

Results and Discussion

Optimization of Alkaline Extraction Conditions

As previously stated, TMAH is a well-known and efficient reagent for solubilizing biological tissues for inorganic element analysis, being the economical sample treatment a distinct advantage since only a water bath and a centrifuge, commonly available in laboratories, are needed. Therefore, it may be considered as an alternative to the conventional acid digestion procedures, eliminating the use of mineral acids, which always represent a risk to operators (Matusiewicz and Golik 2004). In this context, the optimization of the alkaline extraction was performed, seeking to develop an environmentally friendly method by reducing the volume of hazardous reagents.

The optimal conditions for alkaline sample preparation described in the “[Alkaline Extraction](#)” section were selected after evaluating the recovery percentage estimated as $R\% = [\text{obtained concentration (mg kg}^{-1})/\text{certified concentration (mg kg}^{-1})] \times 100$, for each experiment (dry basis). The simplest and fastest conditions with an $R\%$ statistically equal to 100% were selected for subsequent validation. Molybdenum was studied and evaluated once the method was completely optimized for Cu and Zn.

Table 2 shows the results obtained after the first experimental design; it can be observed that the extraction time was not critical between 60 and 75 min. However, TMAH volume and extraction temperature turned out to be quite critical variables. Taking a closer look by pairs at experiments 3–4, 5–6, and 9–10, where extraction times and temperatures were kept constant, the effect of TMAH volume on recovery factors was remarkable, especially for Zn. These results suggested a deeper optimization of the extraction procedure, emphasizing on TMAH volume and the extraction temperature.

Then, a second multivariate experimental design was carried out with rib plate and sirloin samples. Since no significant differences were found between an extraction time of 60 and 75 min in the previous experimental design, 60 min was selected for subsequent experiments, allowing a faster extraction procedure. Total concentrations of Cu and Zn in the analyzed samples were obtained by a microwave-assisted acid digestion and these results were adopted as reference values. Table 3 shows the experimental conditions of the new design and the recovery values obtained for Cu and Zn. As it can be observed, the best results for both elements were those obtained under conditions of experiment 5.

Finally, the optimal selected conditions for the proposed alkaline method were as follows: 0.25 g of sample, 5.0 mL of ultrapure water, 1.5 mL of TMAH 25% (w w⁻¹) in methanol, all placed in a glass tube, and then 60 min in a water bath at 85 °C. The volume of water added during the extraction was necessary to moisturize the animal tissue and promote the penetration of TMAH (Nóbrega et al. 2006). The hydration step is essential before adding TMAH solution on the sample, particularly for dried samples. This previous hydration step allows the reagent to easily penetrate the protein matrix and dissolve the sample, releasing the analytes to the soluble phase. It is a critical parameter that affects the extraction efficiency (Aranha et al. 2016). After cooling at room temperature, the resulting mixture was completed up to a final volume of 10.0 mL with ultrapure water, centrifuged for 30 min at 3500 rpm, and filtered through a 0.45- μm pore membrane. The filtered solutions were used for the analytical determinations.

This type of sample preparation is a particularly attractive technique, since it presents low susceptibility to contamination, due to less sample manipulation and use of fewer and smaller amounts of reagents. Besides, many samples can be

treated at the same time in a common water bath with a tube rack inside. However, factors such as homogeneity, sedimentation, and particle size must be considered (Nunes et al. 2013). In this regard, beef samples previously dried and ground exhibited an exceptional behavior to be treated by this procedure.

Once the optimal conditions for an efficient quantitative extraction of Cu and Zn, the same procedure was applied for the extraction of Mo since a simultaneous extraction of the three analytes was aimed. The application for the quantitative extraction of Mo was successfully achieved, after the optimization of ETAAS conditions, as described in the next section.

Optimization of Mo Analytical Determination by ETAAS

Since Mo content in biological tissues was expected to be extremely low, ETAAS seemed to be an adequate technique for its determination. The optimization was carried out using a CRM of bovine liver. For this technique, the need of chemical modifiers is well established, to decrease or eliminate volatilization and gas-phase interferences. These reagents allow the thermal stabilization of volatile analytes, so that higher pyrolysis temperatures can be applied, and/or the conversion of concomitants into more volatile forms. Both effects bring more effective separation of the analyte from concomitants during the pyrolysis step (Welz and Sperling 1999). Many modifiers have been described to be applied for Mo determinations in the literature. However, when TMAH is used as the extraction reagent during sample preparation, a modifier compatible with the resulting alkaline medium should be selected. Previous work reported the use of Pd, V, or the mixture of Pd+V as chemical modifiers for the determination of several elements in biological tissues, including Cr, which is a member of Group VIB alongside Mo, both exhibiting similar behaviors. However, concerning Mo determination, no results were included (Tsalev and Dimitrov 1990). On the other hand, Silva et al. described TMAH extraction of Cr from animal tissues and its subsequent determination by ETAAS using the mixture Pd-Mg(NO₃)₂ as chemical modifier (Silva et al. 1999). This last mixture has been generally reported for Mo determinations in biological matrices after different sample treatments (Tsalev 1995). Owing to the volatility of MoO₃, one of the main oxides formed during pyrolysis, analyte losses can occur during this step at temperatures above 800 °C. However, if the range 800–1500 °C is covered rapidly, pyrolysis temperatures of around 1800 °C can be applied. The use of Mg(NO₃)₂ as modifier aids in avoiding these losses (Welz and Sperling 1999). Herein, the mixture Pd-Mg(NO₃)₂ was evaluated, using 5 μg of Pd and 3 μg of Mg(NO₃)₂ (Tsalev 1995), but the obtained results were not quantitative.

Furthermore, the non-use of chemical modifiers was explored since it has been previously described for Mo

Table 4 Performance parameters obtained for the developed alkaline method

Parameter	Zn	Cu	Mo
Liner range	0.05–1.00 mg kg ⁻¹	0.04–1.00 mg kg ⁻¹	1.2–50.00 µg kg ⁻¹
LOD (mg kg ⁻¹)	0.016 ^a /0.63 ^b	0.013 ^a /0.53 ^b	0.0004 ^a /0.015 ^b
LOQ (mg kg ⁻¹)	0.052 ^a /2.11 ^b	0.044 ^a /1.77 ^b	0.0012 ^a /0.048 ^b
Precision (RSD%, <i>n</i> = 6)	3.4%*	3.9%*	7.4%**
Trueness (<i>R</i> %, <i>n</i> = 6)	87%*	104%*	106%**
Alkaline media (considering final dilution)	TMAH 1.25% m w ⁻¹	TMAH 3.75% m w ⁻¹	TMAH 3.75% m w ⁻¹

^a Instrumental LOD and LOQ; ^b LOD and LOQ expressed in beef, dry basis. *Certified reference material ERM-BB184; **Reference Material Embrapa-RM-Agro-E3001a

determinations in beef (Vázquez-González et al. 1989). Also, effective Mo determinations were achieved by Tsalev et al. in human hair and nail samples, after extraction with TMAH, without using chemical modifiers (Tsalev et al. 1993). However, once again, the obtained results were not quantitative, as it was verified after the analysis of the corresponding CRM. The main difference was that, in this previous work, the sample preparation protocols were based on total digestion procedures, either by dry mineralization or acid digestions. However, TMAH reagent works by fractionating the sample and extracting the analytes of interest, but without achieving a complete digestion of the matrix, thus leaving a higher content of organic matter in the resulting solution (Lehtonen et al. 2004). This leads to the use of chemical modifiers, when working with biological samples rich in organic matter, such as beef.

Finally, the chemical matrix modifier used was 5 µg of Pd, with which quantitative results were achieved. The use of Pd as modifier was previously reported for Mo determinations in human liver samples, after extraction with TMAH (Shimizu et al. 1988).

Pyrolysis and atomization temperatures are critical parameters in ETAAS, since in the first stage the organic matter from the matrix is removed, while in the second stage the atomization of the studied analyte occurs (Welz and Sperling 1999). The optimization of these temperatures was carried out exhaustively, by performing the corresponding pyrolysis-atomization curves, from 1000 to 3000 °C at 200 °C intervals. Once the optimum temperature ranges were found, the fine

adjustment was made by using 50 °C intervals, obtaining the conditions described in “Analytical Determinations.”

Method Validation

Once the optimization was concluded, the validation of the proposed methodology was performed. Figures of merit are shown in Table 4.

Linearity was evaluated for each element by constructing six-point calibration curves, each level in triplicate. Good linearity was observed with determination coefficients (*R*²) greater than 0.999. For Cu, linearity is up to 5.0 mg L⁻¹, but for this application, calibration curve up to 1.0 mg L⁻¹ is enough. Individual residuals were also studied, and their random distribution was verified.

The LOD and LOQ were calculated for each element as 3 *s*_b/*b* and 10 *s*_b/*b*, respectively, where *s*_b was the standard deviation of 10 replicates (*n* = 10) of the blank and *b* was the slope of the calibration curve. The obtained LOD values expressed in beef, dry basis, were 0.53 mg kg⁻¹ and 0.63 mg kg⁻¹ for Cu and Zn, respectively, being even better than results previously reported for meat samples. In fact, the LOD values obtained in this work after FAAS determination were better than those reported using an alkaline sample treatment and subsequent determination by microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) in several biological materials, including beef (Matusiewicz and Golik 2004). The obtained LOD values were also comparable with those previously reported after TMAH extraction from beef

Table 5 Element contents found in Reference Materials (ERM-BB184 and Embrapa-RM-Agro-E3001a) and comparison with certified or informed values, by Student's *t* test

Element	Certified/informed value (mg kg ⁻¹)	Determined concentration (mg kg ⁻¹)	<i>t</i> experimental	<i>t</i> (0.05, 5)
Zn	146 ± 7*	127 ± 19	2.52	2.57
Cu	2.31 ± 0.09*	2.40 ± 0.17	1.67	2.57
Mo	4.07 ± 0.21**	4.27 ± 0.62	0.84	2.57

All results are expressed in dry weight. *Certified reference material ERM-BB184; **Reference Material Embrapa-RM-Agro-E3001a

Table 6 Comparison between the developed alkaline extraction method and the corresponding microwave-assisted acid digestion method, by Student's *t* test

Sample	Zn (mg kg ⁻¹)		Cu (mg kg ⁻¹)		Mo (mg kg ⁻¹)	
	Alkaline ^a	Acid ^a	Alkaline ^a	Acid ^a	Alkaline ^b	Acid ^c
Media	137.37	158.25	1.76	2.50	0.0695	0.0683
Average	137.37	158.25	1.76	2.50	0.0695	0.0683
<i>t</i>	1.19		1.37		2.16	
experimental						
<i>t</i> (0.05, 5)	2.57		2.57		2.57	

All results are expressed in dry weight. Determination by ^aFAAS, ^bETAAS, and ^cICP-MS

samples and subsequent determination by FAAS and ICP-OES (Nunes et al. 2011, 2013). For Mo, the LOD expressed in beef, dry basis, was 0.015 mg kg⁻¹, which was enhanced by an order of magnitude, when compared with limits previously reported in the literature for Mo determinations in human liver samples after extraction with TMAH (Shimizu et al. 1988).

Precision expressed as relative standard deviation (RSD%) after the analysis of 6 replicates (*n* = 6) of each CRM was less than 8% for all the studied analytes; this was considered suitable for this application.

For trueness evaluation, Student's *t* test was performed to compare the obtained values with the certified ones (Miller and Miller 2010). Results are presented in Table 5. Experimental *t* values were below the theoretical *t* (0.05, 5) = 2.57 indicating that, at the 95% confidence level, the concentrations did not differ significantly from the certified values. These figures of merit demonstrate that the developed method was accurate for the determination of these micronutrients.

The performance of this method was also evaluated by comparing the results obtained after the analysis of several beef samples with the results obtained after the analysis of the same samples using acid digestion. Student's *t* test was employed for this task. In the case of Cu and Zn, the comparison was made by means of a microwave-assisted digestion followed by determination by FAAS, while in the case of Mo, the determinations were performed by ICP-MS. Table 6 shows the results of the statistical comparison for each element. All the experimental *t* values were below the respective

theoretical *t* (0.05, 5) = 2.57. Thus, it may be concluded that, at the 95% significance level, the results obtained using either the proposed method or the acid digestion were statistically equivalent.

Application to Uruguayan Beef Samples

A total of 20 samples from different animals were analyzed for Cu and Zn, while 10 samples were analyzed for Mo. Table 7 shows the concentration ranges determined for each element.

The contents for Cu and Zn were in good agreement with those previously reported in other type of cuts of beef samples from Uruguay (Cabrera et al. 2010; Saadoun and Cabrera 2012). In the case of Mo, no previous information was found, and limited information is available worldwide. Furthermore, it constitutes novel data on Uruguayan beef. The determined Mo ranges agreed with those recently reported by our research group in another beef cut (Machado and Tissot 2020).

The presented information is relevant, not only in terms of knowledge for the evaluation of the nutritional value of this food but also because these elements are key to the enzymatic systems that counteract the free radicals in the organism, while its deficiency is related to the development of certain types of diseases. The consumption of beef, many times controversial, cannot be denied as an effective way to respond to the requirements of the human diet, contributing to the overall intake of minerals (Cabrera and Saadoun 2014). For this reason, it is important to valorize beef, by increasing the available information concerning its composition and its quality.

Conclusions

An alkaline extraction method for sample preparation and subsequent determination of Cu, Mo, and Zn in beef samples was optimized and validated. TMAH resulted to be an efficient reagent for the quantitative extraction of these micronutrients in this kind of samples, providing homogeneous solutions that could be successfully analyzed by atomic absorption spectrometry. The proposed method is simple and provides reliable results. In addition, small amounts of sample and reagents were required, generating low amounts of residues, thus being in line with the principles of green chemistry.

Table 7 Results obtained after the analysis of different cuts of beef samples

Sample	Cu (mg kg ⁻¹) (<i>n</i> = 20)	Zn (mg kg ⁻¹) (<i>n</i> = 20)	Mo (mg kg ⁻¹) (<i>n</i> = 10)
Rib plate	1.387 ± 0.020/2.91 ± 0.27	105 ± 10/222.1 ± 6.2	0.0595 ± 0.0042/0.1161 ± 0.0079
Top sirloin	1.65 ± 0.11/4.10 ± 0.51	49.0 ± 9.5/144.2 ± 9.7	0.0494 ± 0.0029/0.0590 ± 0.040

Range of concentrations expressed as lowest concentration (mean value ± standard deviation, *n* = 3)/highest concentration (mean value ± standard deviation, *n* = 3). All results are expressed in dry weight

Therefore, it can be postulated as an alternative to the classic methods that use acid digestions.

The information about the contents of Cu and Zn in the analyzed samples contributes to an update for the characterization of this food. On the other hand, the obtained Mo concentrations constitute the first report about this micronutrient in Uruguayan beef.

Acknowledgments Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC VUSP 1608), Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Instituto Nacional de Carnes (INAC), PEDECIBA-Química, Comisión Académica de Posgrado (CAP).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest Fiorella Iaquina declares that she has no conflict of interest. Florencia Tissot declares that she has no conflict of interest. Lucimar Lopes Fialho declares that she has no conflict of interest. Joaquim A. Nóbrega declares that he has no conflict of interest. Mariela Pistón declares that she has no conflict of interest. Ignacio Machado declares that he has no conflict of interest.

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed Consent Not applicable.

References

- Alfaia C, Lopes A, Prates J (2013) Cooking and diet quality: a focus on meat. In: Preddy VR, Hunter LA, Patel VB (eds) Diet quality. Springer, Berlin, pp 257–284
- Aranha T, Oliveira A, Queiroz HM, Cadore S (2016) A fast alkaline treatment for cadmium determination in meat samples. *Food Control* 59:447–453. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.015>
- Barros AI, Pinheiro FC, Amaral CDB, Lorençatto R, Nóbrega JA (2018) Aerosol dilution as a simple strategy for analysis of complex samples by ICP-MS. *Talanta* 178:805–810. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.024>
- Bendicho C, De La Calle I, Pena F, Costas M, Cabaleiro N, Lavilla I (2012) Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *Trends Anal Chem* 31:50–60. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.018>
- Cabrera MC, Saadoun A (2014) An overview of the nutritional value of beef and lamb meat from South America. *Meat Sci* 98:435–444. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.06.033>
- Cabrera M, Ramos A, Saadoun A, Brito G (2010) Selenium, copper, zinc, iron and manganese content of seven meat cuts from Hereford and Braford steers fed pasture in Uruguay. *Meat Sci* 84(3):518–528. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.10.007>
- Instituto Nacional de Carnes (INAC) (2018) Available in: <https://www.inac.uy/innovaportal/file/17653/1/informe-consumo-mercado-domestico-2018.pdf> (Access: 16 March 2020)
- Instituto Nacional de Carnes (INAC) (2020) Available in: <https://www.inac.uy/innovaportal/v/16962/1/innova.front/exportaciones> (Access: 16 March 2020)
- Julshamn K, Andersen KJ (1979) A study on the digestion of human muscle biopsies for trace metal analysis using an organic tissue solubilizer. *Anal Biochem* 98:315–318. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90147-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90147-7)
- Lehtonen T, Peuravuori J, Pihlaja K (2004) Degradative analysis of aquatic fulvic acid: CuO oxidation versus pyrolysis after tetramethylammonium hydroxide treatments in air and helium atmospheres. *Anal Chim Acta* 511:349–356. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.02.008>
- Machado I, Tissot F (2020) Dispersive liquid-liquid microextraction as a preconcentration alternative to increase ETAAS sensitivity in the analysis of molybdenum in bovine meat and pasture samples. *Talanta* 212:120783. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120783>
- Machado I, Dol I, Rodríguez-Arce E, Cesio V, Pistón M (2016) Comparison of different sample treatments for the determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*). *Microchem J* 128:128–133. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.04.016>
- Magnusson B, Ömemark U (2014). *Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics*, 2nd edition. www.eurachem.org (Access: 17 March 2020)
- Massart DL, Vandeginste BGM, Buydens LMC, De Jong S, Lewi PJ, Smeyers-Verbeke J (1997) *Handbook of chemometrics and qualimetrics: part a, data handling in science and technology*, 20A. Elsevier Science, Amsterdam
- Matusiewicz H, Golik B (2004) Determination of major and trace elements in biological materials by microwave induced plasma optical emission spectrometry (MIP-OES) following tetramethylammonium hydroxide (TMAH) solubilization. *Microchem J* 76:23–29. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2003.10.007>
- Miller JN, Miller JC (2010) *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 6th edn. Prentice Hall, Pearson Education Limited, Harlow
- Murthy L, Menden EE, Eller PM, Petering HG (1973) Atomic absorption determination of zinc, copper, cadmium, and lead in tissues solubilized by aqueous tetramethylammonium hydroxide. *Anal Biochem* 53:365–372. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90082-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90082-1)
- National Research Council (2005) *Mineral tolerance of animals*, 2nd edn. The national academy press, Washington D.C.
- Nóbrega JA, Santos MC, De Souza RA, Cadore S, Barnes RM, Tatro M (2006) Sample preparation in alkaline media. *Spectrochim Acta B* 61:465–495. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2006.02.006>
- Nunes AM, Acunha TS, Oreste EQ, Lepri FG, Vieira MA, Curtius AJ, Ribeiro AS (2011) Determination of Ca, Cu, Fe and Mg in fresh and processed meat treated with tetramethylammonium hydroxide by atomic absorption spectrometry. *J Braz Chem Soc* 22(10):1850–1857. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011001000004>
- Nunes AM, Arromba de Souza R, Santos da Silva C, Alves Peixoto RR, Vieira MA, Ribeiro AS, Cadore S (2013) Fast determination of Fe, Mg, Mn, P and Zn in meat samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after alkaline solubilization. *J Food Compos Anal* 32:1–5. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2013.08.004>
- Official Methods of Analysis of AOAC International (2019) *Association of analytical communities*, 21st edn, Gaithersburg
- Pistón M, Suárez A, Bühl V, Tissot F, Silva J, Panizzolo L (2020) Influence of cooking processes on Cu, Fe, Mn, Ni, and Zn levels in beef cuts. *J Food Compos Anal*:103624. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103624>
- Ramos A, Cabrera MC, Saadoun A (2012) Bioaccessibility of Se, Cu, Zn, Mn and Fe, and heme iron content in unaged and aged meat of Hereford and Braford steers fed pasture. *Meat Sci* 91:116–124. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2012.01.001>
- Saadoun A, Cabrera MC (2012) Calidad nutricional de la carne bovina producida en Uruguay. *Arch Latinoam Prod Anim* 21(2):119–130 http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/carne_y_subproductos/161-calidad_uruguay.pdf. (Access: 30 May 2020)

- Shimizu S, Cho T, Murakami Y (1988) Trace element analytical chemistry in medicine and biology. In: Bratter P, Schramel P (eds) . Walter de Gruyter, Berlin
- Silva RGL, Willie SN, Sturgeon RE, Santelli RE, Sella SM (1999) Alkaline solubilization of biological materials for trace element analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analyst* 124: 1843–1846. <https://doi.org/10.1039/A906942I>
- Torres DP, Teixeira MBM, Cadore S, Queiroz HM (2016) Sequential factorial designs for method development of the determination of Cd and Pb in fish and shrimp by GF AAS after sample freeze-drying and tetramethylammonium hydroxide solubilization. *Anal Methods* 8:4263–4271. <https://doi.org/10.1039/C6AY01145D>
- Tsalev DL (1995) Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice, volume III, 1st edn. CRC Press, Boca Raton
- Tsalev DL, Dimitrov TA, Mandjukov P.B. (1990) Study of vanadium (V) as a chemical modifier in electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. *J Anal Atom Spectrometry* 5: 189–194. <https://doi.org/10.1039/JA9900500189>
- Tsalev DL, Tserovski EI, Raitcheva AG, Barzev AI, Georgieva RG, Zaprianov ZK (1993) Analytical scheme for the direct graphite-atomizer/flame atomic absorption spectrometric determination of fifteen trace elements in toenails for biological monitoring. *Spectrosc Lett* 26(2):331–346. <https://doi.org/10.1080/00387019308011535>
- Vázquez-González J, Bermejo-Barrera P, Bermejo-Martínez F (1989) Determination of traces of molybdenum in foods by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta* 219:79–87. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)80335-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)80335-9)
- Welz B, Sperling M (1999) Atomic absorption spectrometry, 3rd edn. Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.