

Tesis de Doctorado en Química
**“Estudios conjunto de trazas de metales y
compuestos orgánicos en alcachofa
(*Cynara scolymus*), como insumos para
evaluar su calidad nutracéutica e
inocuidad alimentaria”**

Quím. Ignacio Machado

Directoras de Tesis:

Dra. Mariela Pistón
Dra. Verónica Cesio

Director Académico:

Dr. Horacio Heinzen

Química Analítica – DEC

Farmacognosia y Productos Naturales – DQO

Facultad de Química

Universidad de la República

2016

ACTA DE EXAMEN

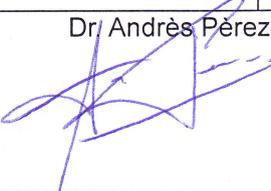
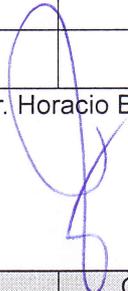
v.01
 2015/08/20

0 D.D.D.	6 B.B.B.
1 D.D.R.	7 B.B.MB.
2 R.R.D.	8 MB.MB.B.
3 R.R.R.	9 MB.MB.MB.
4 R.R.B.	10 MB.MB.S.
5 B.B.R.	11 S.S.MB.
	12 S.S.S.

FECHA 29/07/2016	
CARRERA	Doctorado en Química
PLAN	2004
ASIGNATURA	Defensa de Tesis
PERIODO	

	LUGAR	FECHA	HORA
EXAMEN	SALÓN CLAUSTRO	29/7/2016	15:00
ESCRITO/PRACTICO			
ORAL			

TRIBUNAL: Dra. Nelly Mañay Dr. Andrés Pérez Dr. Horacio Beldómenico

ESTUDIANTE		CALIFICACION	
APELLIDO Y NOMBRE	Cédula de Identidad	NUMERO	SIMBOLO
MACHADO MONTES, Ignacio Andres	4.051.654-8	19	S.S.S
TOTAL DE ESTUDIANTES	APROBADOS	APLAZADOS	EXAMINADO
	1		

OBSERVACIONES: Tesis: " Estudio conjunto de trazas de metales y compuestos orgánicos en alcachofa (*Cynara scolymus*) como insumos para evaluar su calidad nutracéutica e inocuidad alimentaria"



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

ACTA. En Montevideo a los veintinueve días del año 2016, se reúne en la Facultad de Química el Tribunal que entendió en la defensa de tesis de Doctorado en Química que postula el Químico Ignacio Machado (CI: 4051654-8), cuyo título es “Estudios conjunto de trazas de metales y compuestos orgánicos en alcachofa (*Cynara scolymus*), como insumos para evaluar su calidad nutracéutica e inocuidad alimentaria”.

Asisten todos los integrantes del tribunal: Dres. Horacio Beldoménico, Nelly Mañay y Andrés Pérez.

El Tribunal habiendo analizado la tesis en profundidad considera:

El manuscrito presentado refleja un trabajo de alta calidad técnica, desarrollado con elevada rigurosidad científica y con aportes originales a la literatura. El documento tiene aportes didácticos, ha sido redactado con rigor lógico y posee una estructura adecuada y completa. Siendo un trabajo muy extenso la escritura resulta de fácil comprensión. El trabajo se destaca por su multidisciplinariedad y un valorable logro de integración de distintas áreas de investigación fundamental y aplicada.

En la defensa oral, el expositor se destacó por su poder de síntesis con una exposición sumamente clara y buen uso del material audiovisual. Asimismo contestó con mucha solvencia y conocimientos las preguntas por este tribunal.

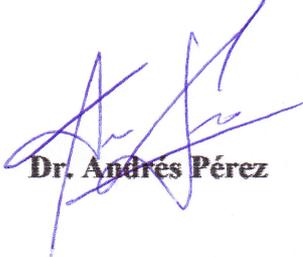
Por lo anterior, el tribunal le otorga la calificación de **EXCELENTE**



Dr. Horacio Beldoménico



Dra. Nelly Mañay



Dr. Andrés Pérez

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 directoras, Dra. Mariela Pistón y Dra. Verónica Cesio, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis, por su orientación y confianza. Por ponerse más de una vez la túnica y trabajar par a par conmigo en el laboratorio.

A mi director académico, Dr. Horacio Heinzen, por hacer grandes aportes con pocas palabras.

Al Dr. Moisés Knochen, Prof. Titular de Química Analítica, Facultad de Química, por permitirme trabajar libremente durante el desarrollo de esta tesis.

A la Q.F. Alicia Mollo de Química Analítica, Facultad de Química, quién dedicó parte de su tiempo a discutir aspectos de Espectrometría de Absorción Atómica conmigo. Por sus consejos y recomendaciones.

A la Prof. Ing. Quím. Isabel Dol de Química Analítica, Facultad de Química, quién nos ayudó a comprender mejor los mecanismos de acción del ozono y a diseñar el dispositivo para el tratamiento de muestras mediante ozonizado.

A la BSc. Natalia Gerez de Farmacognosia y Productos Naturales, Facultad de Química, por trabajar conmigo par a par cuando comencé mi trabajo con la determinación de residuos de pesticidas. Por capacitarme en la parte experimental y en el manejo de los software asociados a los instrumentos.

A la Qca. Natalia Besil del Grupo de Análisis de Compuestos Trazas, Departamento de Química del Litoral, por dedicar parte de su tiempo a la capacitación de los software asociados a los instrumentos y la inyección de muestras.

Al Quím. Esteban Rodríguez Arce de Química Analítica, Facultad de Química, por ayudarme con los tratamientos de preparación de las muestras.

Al grupo de trabajo perteneciente al Departamento de Ciencias Químicas de la Facultad de Farmacia (FFUP) de la Universidad de Porto (Portugal) con el cual se realizó en colaboración la determinación de actividad antioxidante de los extractos de alcachofa.

Al Prof. Eduardo Alonso (*in memoriam*) de Botánica, Facultad de Química, por realizar la clasificación taxonómica de las muestras de alcachofa.

A la Prof. Karen Ovsejevi de Bioquímica, Facultad de Química, por prestarme las enzimas utilizadas para el estudio de bioaccesibilidad.

A mis compañeros de Química Analítica quienes, de diferentes formas, me han apoyado durante estos años, en especial a “Las Mosqueteras”.

A los compañeros de Farmacognosia y Productos Naturales quienes, de diferentes formas, me han apoyado a lo largo de estos años, en especial a la Q.F. Alejandra Bojorge.

A la Q.F. Cristina Álvarez de Toxicología, Facultad de Química, por sus lecciones de Microsoft Word.

A mi familia, por ser la mejor familia que uno podría tener, por tener que haber cedido parte del tiempo que les correspondía al desarrollo de esta tesis.

A mis amigos, que hacen que la vida sea más alegre y divertida.

Al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) por su colaboración en la financiación de las actividades realizadas.

A la familia Bianco por proporcionar las muestras utilizadas para desarrollar y optimizar las metodologías analíticas y por compartir parte de su conocimiento sobre la alcachofa

Finalmente, a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) por otorgarme una Beca ANII-INIA de Posgrado Nacional (POS_NAC_2013_1_11407) y por apoyar este proyecto, y a la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por el apoyo económico en parte del trabajo.

A todos, ¡muchas gracias!

Índice General

Agradecimientos	1
Índice General	3
Índice de Figuras	8
Índice de Tablas.....	11
Listado de Abreviaturas	14
Resumen	17
Abstract.....	19
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	21
1.1 Generalidades	22
1.2 La Alcachofa.....	23
1.2.1 Orígenes.....	23
1.2.2 Características Taxonómicas y Botánicas	24
1.2.3 Composición Química y Propiedades Nutraceuticas.....	26
1.2.4 Producción mundial de alcachofa	29
1.2.5 Producción de alcachofa en Uruguay.....	30
1.2.6 Variedades	31
1.2.7 Reproducción y Cultivo	32
1.2.8 Exigencias edafoclimáticas y nutricionales de la planta.....	32
Clima.....	32
Suelo	33
Requerimiento hídrico.....	33
Requerimiento de nutrientes.....	34
1.3 Seguridad Alimentaria.....	34
1.3.1 Inocuidad Alimentaria	34
1.3.2 Calidad alimentaria	36
1.3.2.1 Nutraceutica	37
1.4 Análisis de residuos de pesticidas.....	38
1.4.1 Definiciones.....	38
1.4.2 Clasificación de pesticidas.....	40
1.4.3 Destino de los pesticidas.....	42
1.4.4 Legislación sobre residuos de pesticidas en alimentos	43
1.4.5 Análisis de residuos de pesticidas	44
1.4.6 Análisis de residuos de pesticidas en alimentos	44

1.4.7 Metodologías multiresiduo de análisis	45
1.4.8 Técnicas Instrumentales de Análisis.....	47
1.4.8.1 Espectrometría de masas.....	47
1.4.8.2 Cromatografía gaseosa con detector de masas (GC-MS).....	48
1.4.8.3 Cromatografía líquida con detector de masas (LC-MS/MS)	50
1.4.8.4 Criterios para la identificación y confirmación de residuos de pesticidas según DG SANCO.....	53
1.5 Análisis de metales y semimetales.....	55
1.5.1 Métodos de preparación de la muestra	55
Extracción asistida con ultrasonido	55
Extracción asistida con microondas.....	58
Extracción asistida con ozono.....	61
1.5.2 Métodos instrumentales de análisis.....	62
1.5.1.1 Espectrometría de Absorción Atómica.....	62
1.6 Validación de Métodos Analíticos.....	69
Parámetros de validación de métodos analíticos	69
1.7 Justificación.....	74
1.7.1 Determinación de residuos de pesticidas en alcachofa	74
1.7.2 Determinación de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en alcachofa	75
1.7.3 Determinación del contenido fenólico y estudio de actividad antioxidante en alcachofa.....	76
1.7.4 Estudio de bioaccesibilidad de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa	77
1.8 Objetivos de la tesis.....	78
1.8.1 Objetivo general	78
1.8.2 Objetivos específicos	78
1.9 Actividades desarrolladas.....	79
CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL	81
2.1 Determinación de residuos de pesticidas en alcachofa	82
2.1.1 Reactivos	82
2.1.2 Instrumentos	82
2.1.3 Muestras	83
2.1.4 Selección de los pesticidas	83
2.1.5 Fortificación de las muestras	84
2.1.6 Preparación de las muestras.....	84
2.1.6.1 Método QuEChERS.....	84
2.1.6.2 Método de extracción con acetato de etilo.....	85

2.1.6.3 Método MSPD.....	85
2.1.7 Determinaciones analíticas.....	86
2.1.7.1 Análisis mediante GC-MS: Selección del método multiresiduo.....	86
2.1.7.2 Análisis mediante GC-MS: Optimización y validación del método.....	88
2.1.7.3 Análisis mediante LC-MS/MS: Optimización y validación.....	90
2.1.8 Parámetros de validación.....	93
2.1.8.1 Identificación y confirmación.....	94
2.1.8.2 Muestra blanco.....	94
2.1.8.3 Ensayo de fortificación.....	94
2.1.8.4 Recuperación.....	94
2.1.8.5 Precisión: repetitividad y reproducibilidad intra-laboratorio.....	95
2.1.8.6 Linealidad.....	95
2.1.8.7 LOD y LOQ.....	95
2.1.8.8 Efecto matriz.....	96
2.2 Determinación de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en alcachofa.....	97
2.2.1 Reactivos.....	97
2.2.2 Instrumentos.....	97
2.2.3 Muestras.....	98
2.2.4 Preparación de las muestras.....	99
2.2.4.1 Método de extracción asistido con ultrasonido utilizando sonda (método A)	100
2.2.4.2 Método de extracción asistido con ultrasonido utilizando baño (método B)	101
2.2.4.3 Método de extracción asistido con ozono (método C).....	101
2.2.4.4 Método de digestión asistido por microondas (método D).....	102
2.2.4.5 Método de mineralización vía seca mediante calcinación (método E).....	103
2.2.4.6 Preparación de infusiones.....	103
2.2.5 Determinaciones analíticas.....	104
2.2.5 Optimización de las condiciones de extracción.....	106
2.3 Determinación del contenido fenólico y estudio de actividad antioxidante.....	108
2.3.1 Reactivos.....	108
2.3.2 Preparación de los extractos de hojas de alcachofa.....	108
2.3.3 Análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD-ESI-MS/MS.....	109
2.3.3.1 Ensayos de actividad secuestrante de especies ROS y RNS.....	110
2.3.3.2 Ensayo de actividad secuestrante de radical superóxido.....	110
2.3.3.3 Ensayo de actividad secuestrante de peróxido de hidrógeno.....	110
2.3.3.4 Ensayo de actividad secuestrante de ácido hipocloroso.....	111

2.3.3.5 Ensayo de actividad secuestrante de oxígeno singulete	111
2.3.3.6 Ensayo de actividad secuestrante de radical peroxilo	111
2.3.3.7 Ensayo de actividad secuestrante de óxido nítrico	112
2.3.3.8 Ensayo de actividad secuestrante de peroxinitrito.....	112
2.4 Estudio de bioaccesibilidad de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa.....	113
2.4.1 Reactivos	113
2.4.2 Instrumentos	113
2.4.3 Muestras	113
2.4.4 Procedimiento de preparación de la muestra.....	113
2.4.4.1 Preparación de las soluciones de simulación de jugo gástrico y jugo intestinal	113
2.4.4.2 Digestión gástrica.....	114
2.4.4.3 Digestión intestinal.....	114
2.4.4.4 Cálculo del porcentaje de bioaccesibilidad.....	115
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	116
3.1 Determinación de residuos de pesticidas en alcachofa	117
3.1.1 Optimización de las condiciones cromatográficas y MRM para el análisis mediante LC-MS/MS	117
3.1.2 Selección del método de preparación de muestra.	118
3.1.3 Validación de la determinación de residuos de pesticidas en hojas de alcachofa	121
Recuperación	121
Precisión	122
Linealidad.....	122
Límites de Detección y Cuantificación.....	122
Efecto matriz.....	125
3.1.4 Validación de la determinación de residuos de pesticidas en frutos de alcachofa	130
Recuperación	130
Linealidad.....	130
Límites de Detección y Cuantificación.....	131
Precisión	133
Efecto matriz.....	133
3.1.5 Aplicación a muestras reales.....	136
3.2 Determinación de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en alcachofa.....	141
3.2.1 Determinaciones analíticas mediante ETAAS	141
3.2.2 Optimización de las condiciones de extracción.....	142
3.2.3 Desempeño de los métodos.....	148

3.2.4 Validación.....	150
3.2.5 Modificaciones al método de referencia (método D).....	153
3.2.6 Contenido de elementos metálicos y semimetálicos a nivel de trazas en hojas y frutos de alcachofa.....	155
3.2.7 Contenido de elementos metálicos y semimetálicos en las infusiones de alcachofa	163
3.3 Determinación del contenido fenólico y estudio de actividad antioxidante.....	166
3.3.1 Contenido de compuestos fenólicos en extractos de alcachofa.....	166
3.3.2 Capacidad secuestrante de los extractos de alcachofa contra las especies ROS y RNS.....	169
3.4 Estudio de bioaccesibilidad de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa.....	173
3.4.1 Determinación de la fracción bioaccesible de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa.....	173
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES.....	177
4.1 Determinación de residuos de pesticidas en alcachofa.....	178
4.2 Determinación de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en alcachofa.....	179
4.3 Determinación del contenido fenólico y estudio de actividad antioxidante.....	180
4.4 Estudio de bioaccesibilidad de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa.....	181
4.5 Conclusiones generales.....	182
4.6 Perspectivas.....	183
CAPÍTULO 5: PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES	185
5.1 Publicaciones y presentaciones en eventos	186
5.1.1 Artículos publicados.....	186
5.1.2 Manuscritos en revisión.....	186
5.1.3 Trabajo presentados en eventos	187
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	189
ANEXO I: CLASIFICACIÓN DE LOS PESTICIDAS EN ESTUDIO	203
ANEXO II: ARTÍCULOS CIENTIFICOS PUBLICADOS	214

Índice de Figuras

Figura 1 Sistema radicular de la alcachofa.....	25
Figura 2 Hojas de la alcachofa.....	25
Figura 3 Flores de la alcachofa	25
Figura 4 Fruto de la alcachofa	26
Figura 5 Semillas de la alcachofa	26
Figura 6 Estructura de la Inulina	27
Figura 7 Estructuras del ácido cafeico (a) y cumárico (b).....	27
Figura 8 Estructura del ácido 5-O- cafeilquínico (ácido clorogénico).....	28
Figura 9 Estructura del ácido 1,3-di-O-cafeilquínico (cinarina).....	28
Figura 10 Mapa Político del Uruguay donde se marcan las zonas dedicadas a la horticultura	30
Figura 11 Var. Blanca de Tudela.....	31
Figura 12 Var. Green Globe	31
Figura 13 Var. Espinoso Sardo	31
Figura 14 Var. Violeta de Provenza	32
Figura 15 Definición del Riesgo.....	35
Figura 16 Esquema de analizador de tipo cuadrupolar	50
Figura 17 Esquema de sistema que utiliza ionización ESI	52
Figura 18 Esquema general de un sistema QTRAP LC-MS/MS	53
Figura 19 Esquema de sistema ozonizador que funciona con el método de descarga corona	62
Figura 20 Procesos que ocurren durante la atomización	64
Figura 21 Regiones de una llama.....	65
Figura 22 Quemador de flujo laminar.....	66
Figura 23 Esquema de un instrumento de absorción atómica electrotérmico con corrección de fondo con efecto Zeeman.....	68
Figura 24 Muestras utilizadas como blanco de matriz: <i>Cynara cardunculus</i> L. subsp. <i>Cardunculus</i> : “Purple Globe” (izquierda) y “Green Globe” (derecha).. ..	83
Figura 25 Método QuEChERS: Extracción (izquierda) y <i>clean-up</i> (derecha), hoja y fruto respectivamente.....	85
Figura 26 Tratamiento de muestra mediante el método MSPD.....	86
Figura 27 Cromatógrafo HP6890 acoplado a detector HP597.....	87
Figura 28 Programa de temperatura para las determinaciones mediante GC-MS (Selección del método).....	87

Figura 29 Cromatograma en modo <i>full scan</i> del mix de pesticidas a 1 mg L ⁻¹	88
Figura 30 Programa de temperatura utilizado para las determinaciones mediante GC-MS (Validación).....	89
Figura 31 Vista del cromatógrafo Agilent 1200 LC acoplado al sistema detector de masas 4000 QTRAP LC-MS/MS de AB SCIEX.	91
Figura 32 Gradiente de fase móvil utilizado para las determinaciones mediante LC-MS/MS.	91
Figura 33 Ubicación geográfica del establecimiento de la familia Bianco en Rincón del Cerro, Montevideo, Uruguay	98
Figura 34 Muestra de hojas de alcachofa. A la izquierda la muestra triturada y a la derecha la muestra luego del tamizado.	99
Figura 35 Sistema cerrado para la ozonización de muestras.....	100
Figura 36 Sonda de ultrasonido sumergida en un frasco que contiene la muestra y el extractante (ácido diluído).	100
Figura 37 Baño de ultrasonido utilizado para realizar los experimentos.	101
Figura 38 Horno microondas utilizado para los tratamientos de muestra.....	102
Figura 39 Mufla utilizada para llevar a cabo la calcinación de las muestras.....	103
Figura 40 Espectrómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica Thermo iCE 3500.....	105
Figura 41 Espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 200 acoplado a sistema MHS®.....	106
Figura 42 Diseño central compuesto de dos factores: a) El diseño consiste de un diseño factorial 2 ² combinaciones, más un diseño estrella y el punto central. b) El diseño compuesto.....	107
Figura 43 Imágenes del proceso de digestión gastrointestinal simulado.....	115
Figura 44 Cromatograma de iones totales de todos los pesticidas analizados en hojas de alcachofa 10 µg L ⁻¹	118
Figura 45 Cromatograma en modo <i>full scan</i> de la matriz blanco de hojas de alcachofa mediante los tres métodos de extracción estudiados.....	120
Figura 46 Ejemplificación del efecto matriz para el caso de la determinación de Azoxystrobin mediante LC-MS/MS a través de las curvas de calibración en matriz y en solvente.....	126
Figura 47 Comparación mediante gráfico de barras de los resultados del estudio de efecto matriz.....	129
Figura 48 Gráfico de barras comparativo del efecto matriz de la hoja y el fruto de alcachofa analizados mediante LC-MS/MS respectivamente.....	135

Figura 49 Variación de la concentración en ozono en la corriente de oxígeno en función del tiempo de ozonizado.....	144
Figura 50 Sistema cerrado de ozonización para el tratamiento de cuatro muestras simultáneamente.	149
Figura 51 Trompeta de Horwitz.....	153
Figura 52 Comparación gráfica de las concentraciones de As, Cd y Pb obtenidas luego de analizar las muestras comerciales. Para cada muestra aparece a la izquierda el valor de la hoja y a la derecha el del fruto.....	156
Figura 53 Comparación gráfica de las concentraciones de Cu, Fe, Ni y Zn obtenidas luego de analizar las muestras comerciales. Para cada muestra aparece a la izquierda el valor de la hoja y a la derecha el del fruto.....	159
Figura 54 Esquema general del transporte de metales dentro de la planta.....	160
Figura 55 Representación gráfica del contenido de metales y semimetales en infusiones de alcachofa.....	164
Figura 56 Cromatograma obtenido mediante HPLC–DAD (330 nm) de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de alcachofa. La caracterización de los picos se puede ver en la Tabla 40.....	166
Figura 57 Espectro MS/MS correspondiente a la cinarina.	169

Índice de Tablas

Tabla 1 Producción mundial de alcachofa en 2015 según los principales productores (FAOSTAT 2016).....	29
Tabla 2 Ejemplos de peligros que pueden producirse en los alimentos.....	36
Tabla 3 Ejemplos de las principales familias de pesticidas.....	40
Tabla 4 Ejemplos de pesticidas según la familia química y modo de acción.	41
Tabla 5 Clasificación de los pesticidas según su persistencia.....	41
Tabla 6 Clasificación de los pesticidas según la Organización Mundial de la Salud.	42
Tabla 7 Requisitos para la identificación de los compuestos según el sistema de detección de MS.....	54
Tabla 8 Tolerancias admitidas para GC-MS y LC-MS/MS.	54
Tabla 9 Características de los procesadores ultrasónicos (baño y sonda) disponibles para laboratorios.....	58
Tabla 10 Parametros cromatográficos y de adquisición para los compuestos seleccionados analizados mediante GC-MS (selección del método MRM).	88
Tabla 11 Parametros cromatográficos y de adquisición para los compuestos seleccionados analizados mediante GC-MS (Validación).....	90
Tabla 12 Parametros cromatográficos y de adquisición para los compuestos seleccionados analizados mediante LC-MS/MS.....	92
Tabla 13 Descripción de las muestras comerciales de alcachofa.	98
Tabla 14 Programas de temperatura de ETAAS para la determinación de As, Cd, Ni y Pb en CRM y muestras de alcachofa (^a As, ^b Cd, ^c Ni, ^d Pb).....	104
Tabla 15 Diseño central compuesto para los métodos A y C.....	107
Tabla 16 Diseño central compuesto para el método B.	107
Tabla 17 Resultados de la comparación de métodos de extracción evaluados mediante GC-MS.....	119
Tabla 18 Porcentajes de recuperación y respectivos valores de RSD obtenidos utilizando el método QuEChERS a los niveles 0,01 – 0,02 – 0,05 mg kg ⁻¹ mediante LC-MS/MS.....	123
Tabla 19 Porcentajes de recuperación y respectivos valores de RSD obtenidos utilizando el método QuEChERS a los niveles 0,01 – 0,05 – 0,10 mg kg ⁻¹ mediante GC-MS.....	124
Tabla 20 Efecto matriz (ME), límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) para LC-MS/MS.....	127
Tabla 21 Efecto matriz (ME), límites de detection (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) para GC-MS.....	128

Tabla 22 Porcentajes de recuperación y respectivos valores de RSD obtenidos utilizando el método QuEChERS sobre frutos de alcachofa a los niveles 0,01 – 0,02 – 0,05 mg kg ⁻¹ mediante LC-MS/MS.....	131
Tabla 23 Porcentajes de recuperación y respectivos valores de RSD obtenidos utilizando el método QuEChERS sobre frutos de alcachofa a los niveles 0,01 – 0,05 – 0,10 mg kg ⁻¹ mediante GC-MS.....	132
Tabla 24 Efecto matriz (ME), límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) para fruto de alcachofa mediante LC-MS/MS.....	134
Tabla 25 Efecto matriz (ME), límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) para fruto de alcachofa mediante GC-MS.....	136
Tabla 26 Resultados obtenidos luego de aplicar el método validado a muestras comerciales de hojas y frutos de alcachofa mediante LC-MS/MS.....	137
Tabla 27 Resultados obtenidos luego de aplicar el método validado a muestras comerciales de hojas y frutos de alcachofa mediante GC-MS.....	138
Tabla 28 Resultados obtenidos mediante los experimentos de optimización para el método A.....	142
Tabla 29 Resultados obtenidos mediante los experimentos de optimización para el método B.....	142
Tabla 30 Resultados obtenidos mediante los experimentos de optimización para el método C.....	142
Tabla 31 Resultados obtenidos mediante los experimentos de optimización para la determinación de Fe.....	145
Tabla 32 Contenido hallado de As, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn en el CRM (NIST 1570a) y comparación con los valores de referencia certificados mediante el test <i>t</i> de <i>Student</i>	147
Tabla 33 Principales cifras de mérito analíticas.....	150
Tabla 34 Contenido de metales y semimetales en hojas de alcachofa.....	151
Tabla 35 Contenido de metales y semimetales en frutos de alcachofa.....	151
Tabla 36 Resultados obtenidos luego de aplicar el método D a distintas concentraciones de HNO ₃	153
Tabla 37 Contenido de metales y semimetales en muestras comerciales de alcachofa (Muestras 1 y 2).	155
Tabla 38 Contenido de metales y semimetales en muestras comerciales de alcachofa (Muestras 3 y 4).	155
Tabla 39 Coeficientes de correlación de Pearson (<i>r</i>) para As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa.....	161

Tabla 40 Coeficientes de correlación de Pearson (r) para As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en hojas de alcachofa.....	161
Tabla 41 Contenido de metales en las infusiones de alcachofa y factores de transferencia respecto al contenido total del material vegetal de partida.....	164
Tabla 42 Tabla comparativa donde se incluyen los valores de IDR e IMT para cada elemento y los aportes de estos elementos según los niveles en las infusiones y en el fruto total.....	165
Tabla 43 Características cromatográficas y espectroscópicas y contenido de compuestos fenólicos en los extractos de infusión, decocción e hidroalcohólico de hojas de alcachofa.	167
Tabla 44 Capacidad secuestrante de los extractos de alcachofa contra radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$), oxígeno singulete (1O_2) y radical peroxilo (ROO^{\cdot}).	170
Tabla 45 Capacidad secuestrante de los extractos de alcachofa contra óxido nítrico ($\cdot NO$) y peroxinitrito ($ONOO^-$).	172
Tabla 46 Fracciones bioaccesibles y porcentajes de bioaccesibilidad <i>in vitro</i> para los elementos en estudio en las muestras de frutos de alcachofa analizadas.	1745
Tabla 47 Tabla comparativa donde se incluyen los valores de IDR e IMT según la Junta Directiva de Alimentación y Nutrición del Instituto de Medicina de E.E.U.U. para cada elemento y los aportes de estos elementos según su bioaccesibilidad en el fruto de alcachofa.....	1756

Listado de Abreviaturas

AOAC: International Association of Official Analytical Chemists.

APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization): Ionización Química a Presión Atmosférica.

BPA: Buenas Prácticas Agrícolas.

CE (Collision Energy): Energía de Colisión.

CI (Chemical Ionization): Ionización Química.

CID (Collision Induced Dissociation): Disociación por Colisión Inducida.

CL₅₀: Concentración Letal Media.

CRM (Certified Reference Material): Material de Referencia Certificado.

DG SANCO: Dirección General de Sanidad y Protección del Consumidor.

DIEA: Dirección de Estadísticas Agropecuarias

DL₅₀: Dosis Letal Media.

DP (Declustering Potential): Potencial de Desagrupación.

dSPE (Dispersive Solid Phase Extraction): Extracción Dispersiva en Fase Sólida.

ECD (Electron Capture Detector): Detector de Captura Electrónica.

EI (Electron Ionization): Ionización por Impacto Electrónico.

EM: Efecto Matriz.

EP (Entrance Potential): Potencial de Entrada.

EPA (Environmental Protection Agency): Agencia de Protección Ambiental.

EPI (Enhanced Product Ion): Ión Producto Mejorado.

ESI (Electrospray Ionization): Ionización por Electrospray.

ESL: Extracción Sólido-Líquido.

ETAAS (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry): Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica.

FAAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry): Espectrometría de Absorción Atómica de Llama.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations): Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FDA (Food and Drug Administration): Administración de Alimentos y Drogas.

FIA (Flow Injection Analysis): Análisis por Inyección en Flujo.

FID (Flame Ionization Detector): Detector de Ionización de Llama.

FM: Fase Móvil

FPD (Flame Photometric Detector): Detector Fotométrico de Llama

GC (Gas Chromatography): Cromatografía Gaseosa.

GCB (Graphitized Carbon Black): Carbón Grafitizado.

GC-MS (Gas Chromatography Mass Spectrometry): Cromatografía Gaseosa Acoplada a Espectrometría de Masas.

HGAAS (Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry): Espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros.

HPLC (High Resolution Liquid Chromatography): Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

IDA: Ingesta Diaria Admitida.

ISO (International Standardization Organisation): Organización Internacional de Estandarización.

IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry): Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

INIA: Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria

JMPR (Joint Meeting on Pesticide Residues): Junta de la FAO/WHO sobre Residuos de Pesticidas.

LC (Liquid Chromatography): Cromatografía Líquida.

LC-DAD: (Liquid Chromatography Diode Array Detector): Cromatografía Líquida con Detector de Arreglo de Diodos

LC-MS/MS (Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry): Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas Tándem.

LC-QLIT/MS (Liquid Chromatography Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry): Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas con Analizador híbrido de Triple Cuadrupolo y Trampa de Iones Lineal.

LC-QqQ/MS (Liquid Chromatography Triple Quadrupole Mass Spectrometry): Cromatografía Líquida Acoplada a Espectrometría de Masas con Analizador de Triple Cuadrupolo.

LDL (Low Density Lipoprotein): Lipoproteína de baja Densidad.

LMR: Límite Máximo de Residuo.

LOD (Limit of Detection): Límite de Detección.

LOQ (Limit of Quantification): Límite de Cuantificación.

MCL (Maximum Contaminant Level): Nivel Máximo de Contaminante.

MO: Materia Orgánica.

MRMs (Multiresidue Methods): Métodos Multiresiduo.

MRM (Multiple Reaction Monitoring): Monitoreo de Reacción Múltiple.

MS (Mass Spectrometry): Espectrometría de Masas.

MSP: Ministerio de Salud Pública.

MVOTMA: Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente.

MW (Microwaves): Microondas.

NCI (Negative Chemical Ionization) - Ionización Química Negativa.

NPD (Nitrogen Phosphorous Detector): Detector de Nitrógeno y Fósforo.

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAO: Procesos Avanzados de Oxidación

PCI (Positive Chemical Ionization): Ionización Química Positiva.

PP: Polipropileno

PSA (Primary Secondary Amine): Amina Primaria y Secundaria.

PTFE: Politetrafluoroetileno.

% Rec: Porcentaje de Recuperación.

QQQ (Triple Quadrupole): Triple Cuadrupolo.

QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe): Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro.

RNS (Reactive Nitrogen Species): Especies reactivas de Nitrógeno.

ROS (Reactive Oxygen Species): Especies Reactivas de Oxígeno.

RSD (Relative Standard Deviation): Desviación Estándar Relativa.

SIM (Selected Ion Monitoring): Monitoreo de Iones Seleccionados.

S/N (Signal to Noise ratio): Relación señal-ruido.

SPE (Solid Phase Extraction): Extracción en Fase Sólida

SRM (Selected Reaction Monitoring): Monitoreo de Reacción Seleccionada.

TIC (Total Ion Chromatogram): Cromatograma de Iones Totales.

TPP (Triphenyl Phosphate): Trifenil Fosfato.

UE: Unión Europea.

UNIT: Instituto Uruguayo de Normas Técnicas.

US (Ultrasound): Ultrasonido.

UV: Ultravioleta.

Resumen

En la actualidad, el consumo de vegetales en diversas formas y con mínimo procesamiento, es una práctica cada vez más extendida por la población, pues son reconocidos como fuente de principios activos benéficos para la salud. En general, son cultivados empleando prácticas agrícolas diversas, convencionales, integradas u orgánicas, con un claro predominio de la forma de cultivo convencional, donde el uso de agroquímicos es común. Considerando además la capacidad de estos vegetales de absorber metales y otros elementos del suelo donde se cultivan, algunos de ellos esenciales para la vida y otros potencialmente tóxicos, es que el interés en conocer los niveles de estos elementos se vuelve cada vez mayor.

El desafío de este trabajo de posgrado fue obtener una visión global de los aportes tanto benéficos como negativos para la salud que el consumo de estos vegetales podía tener, mediante un estudio de la composición química de los nutraceuticos, así como de los contaminantes orgánicos e inorgánicos presentes en una planta con reconocidas propiedades benéficas como lo es la alcachofa. El fruto de la misma es un alimento muy valorado debido a sus propiedades nutricionales. Su elevada humedad, bajo contenido calórico, la práctica ausencia de grasas y su naturaleza fibrosa la han convertido en uno de los alimentos dietéticos por excelencia. A esto se suma los efectos antioxidantes, coleréticos y adelgazantes reportados en la literatura. Se estudiaron las propiedades de los frutos y de las hojas de alcachofa, así como las propiedades de las correspondientes infusiones de las hojas, debido a su amplio consumo bajo forma de té y a su empleo en productos fitoterápicos. Para lograr esta evaluación integrada, se estudió el contenido de elementos con valor nutricional como ser algunos metales esenciales (Cu, Fe, Ni y Zn) y algunos metabolitos secundarios como los polifenoles de reconocida capacidad antioxidante. También se estudió el contenido de aquellos elementos que podían representar un riesgo para la salud, como ser As, Cd y Pb, y los residuos de algunos agroquímicos comúnmente utilizados para proteger los cultivos y asegurar rendimiento y calidad en la producción.

A lo largo de este trabajo se desarrollaron metodologías analíticas simples y originales que permitieron la evaluación de la presencia de contaminantes a nivel de trazas, orgánicos e inorgánicos, así como la determinación de compuestos orgánicos benéficos y de metales esenciales presentes en hojas y frutos de alcachofa, que contribuyeron no solo a constatar su valor nutraceutico sino también a asegurar la inocuidad del consumo de las muestras analizadas.

En cuanto al estudio de contaminantes orgánicos, se desarrolló, y validó una metodología multiresiduo de análisis para la determinación de residuos de pesticidas en hojas y frutos de alcachofa. Estas metodologías validadas permitieron la determinación de 98 pesticidas en forma simultánea lo cual constituye un importante aporte para el control de inocuidad de este producto. A partir de los resultados obtenidos se puede concluir que las metodologías desarrolladas tanto para frutos como hojas cumplieron con los criterios estipulados por las normativas de la Unión Europea para el análisis de residuos de pesticidas en frutas y hortalizas.

Por otra parte se realizaron estudios para evaluar la capacidad antioxidante de infusiones de hojas de alcachofa que demostraron una alta capacidad secuestrante de los extractos testeados contra varias especies ROS y RNS, esta actividad estuvo estrechamente relacionada con el contenido de compuestos fenólicos del vegetal. La evaluación de actividad antioxidante se realizó mediante técnicas analíticas novedosas utilizando sondas fluorescentes. Estos hallazgos sugieren que la alcachofa podría ser una potencial fuente de antioxidantes naturales.

Respecto a la determinación de metales y semimetales, se desarrollaron y validaron protocolos para el tratamiento de muestras de alcachofa rápidos asistidos mediante ondas de ultrasonido, microondas y ozonización, siguiendo los principios de la Química Verde. La novedosa estrategia del uso de gas ozono, fue desarrollada por primera vez en esta matriz, y resultó ser exitosa para todos los elementos estudiados.

Los resultados obtenidos para As, Cd y Pb, mostraron que tanto las hojas como los frutos analizados cumplieron con los requisitos establecidos por la normativa nacional y por lo tanto pueden ser utilizados con fines alimenticios.

El fruto de la alcachofa sería una prometedora fuente de minerales esenciales para el organismo como Cu, Fe, Ni y Zn. Mediante un estudio de bioaccesibilidad, desarrollado realizando la simulación de una digestión gastrointestinal *in vitro* del fruto, se demostró que efectivamente estos minerales tendrían un alto porcentaje de absorción y que por lo tanto, dicho vegetal podría considerarse un buen aporte a la ingesta diaria recomendada de dichos elementos.

Se podría afirmar que la inclusión en la dieta de extractos de hojas de alcachofa, así como la ingesta de sus frutos, serían potenciales fuentes de nutrientes para la dieta, que conllevarían a una mejor calidad de vida.

Abstract

Nowadays, consumption of vegetables in different ways and with minimal processing is an increasingly widespread practice by the population, as they are recognized as a source of active compounds beneficial to health. In general, they are cultivated using different agricultural practices, conventional, integrated or organic practices, with a clear predominance of the conventional form, where the use of pesticides is common. Considering the capacity of vegetables to absorb metals and other elements from the soil where they are grown, some of them essential to life and others potentially toxic, is that the interest of knowing the levels of these elements becomes relevant.

The challenge of getting an overview of the impact that these vegetables could generate to human health, was undertaken through a food security study, taking as an example a plant with recognized beneficial properties such as artichoke. Therefore, the properties of the fruit and of the infusions prepared from artichoke leaves were studied. To achieve this integrated assessment, the content of some essential trace elements such as Cu, Fe, Ni and Zn and some secondary metabolites like polyphenols, with recognized antioxidant capacity, were studied. Elements such as As, Cd and Pb that could be considered as a risk to human health, and residues of some pesticides commonly used to protect these crops were also studied.

To achieve a global approach, simple and original analytical methodologies were developed to determine both organic and inorganic contaminants at trace levels, as well as the determination of beneficial organic compounds and essential metals in artichoke leaves and fruits. This contributed not only to confirm the nutraceutical value of the vegetable but also to define safety of its consumption.

For the study of organic contaminants, a multi-residue analytical methodology for the determination of pesticide residues in artichoke fruits and leaves was optimized and validated. This methodology succeeded in determining 98 pesticides simultaneously, this constitutes an important contribution to food safety control of this product.

From the obtained results, it can be concluded that both the fruits and the leaves met the criteria set by the European Union regulations for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables.

Moreover, studies to evaluate the antioxidant capacity of different artichoke leaves extracts were conducted and demonstrated high scavenging activity against various ROS and RNS species, this activity was closely related to the phenolic content of the vegetable.

Scavenging activity assessment was performed with novel analytical techniques using fluorescent probes. These findings suggest that artichoke could be a potential source of natural antioxidants.

Regarding the determination of metals and semimetals, rapid sample treatment protocols assisted by ultrasound waves, microwaves and ozonation were optimized and validated according to the principles of Green Chemistry. The novel strategy of using ozone gas was developed for this matrix for the first time with success for all the elements studied.

The results obtained for As, Cd and Pb showed that both the analyzed leaves and fruits met the requirements established by national law and therefore can be consumed without risks. Regarding essential trace elements, the artichoke fruit could be a promising source of Cu, Fe, Ni and Zn to human diet. After a bioaccessibility study, performing an *in vitro* gastrointestinal digestion of the fruit, it was shown that these minerals had high absorption rate and therefore it could be considered a good contribution to the recommended daily intake of these elements.

It could be concluded that the intake of extracts from artichoke leaves as well as the whole fruit, would promote an optimal health for a better quality of life.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

En las últimas décadas ha habido un crecimiento en la producción agrícola, de aproximadamente un 150%. El área total destinada a la agricultura se ha expandido alrededor de un 11%, lo que ha traído aparejado un consumo de casi 4 veces más de fertilizantes, así como un aumento drástico en el uso de pesticidas en la agricultura, que alcanzan aproximadamente 2,6 billones de kg por año. Los factores descriptos anteriormente tienen un impacto positivo en la producción de alimentos a nivel mundial pero impactan negativamente en la salud de los consumidores y en el medio ambiente (1). A medida que la población aumenta, el uso de insumos como el agua, los fertilizantes y los pesticidas es cada vez mayor con el fin de incrementar la producción. Esta situación provoca una disminución en la calidad del ambiente causando la contaminación de los recursos naturales, agua, suelo y biota. Dicha realidad ha generado gran preocupación acerca del deterioro de los recursos naturales ocasionado por estas prácticas agrícolas. Así mismo, los cambios ambientales que se imponen por los nuevos y variables paquetes tecnológicos sobre el agroecosistema y sobre los organismos que no son blancos, deben ser evaluados como parte de estrategias de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) y su impacto en el aseguramiento de la calidad de los alimentos (2).

Hoy en día existe una creciente preocupación por la acumulación de metales y semimetales potencialmente tóxicos en vegetales de consumo humano y animal, así como la repercusión del uso de pesticidas y el riesgo de que los residuos permanezcan en los cultivos, si los tiempos de espera o las aplicaciones no son exactamente realizadas según lo estipulado (3).

La determinación analítica de elementos como el arsénico, el cadmio y el plomo son importantes en los vegetales. En el caso del cadmio se sabe que éste llega a los suelos y aguas debido al uso indiscriminado de fertilizantes fosfatados y como subproducto de la industria minera (4). En el caso del arsénico, en Uruguay las aguas alcanzan niveles en algunos acuíferos que superan el valor máximo de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ establecido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para agua potable y poca información hay respecto a los suelos. El plomo es uno de los contaminantes que se encuentra más ampliamente distribuido en la naturaleza. Éste puede entrar al ambiente a través de liberaciones desde minas de plomo y otros metales, y desde fábricas que manufacturan o utilizan plomo o alguno de sus compuestos. El plomo es liberado al aire atmosférico mediante la quema de carbón, petróleo o desechos. Antes de que se prohibiera el uso de gasolinas con tetraetilo de plomo como antidetonante, la mayor parte del plomo liberado al aire provenía de los escapes de los automóviles, producto de la combustión de gasolinas.

La deposición sobre los vegetales es la vía principal de entrada de este metal en la cadena alimentaria. Por lo tanto, la evaluación de estos elementos potencialmente tóxicos en los vegetales (debido a la captación por las raíces y translocación a otros órganos de la planta) es relevante desde el punto de vista toxicológico, teniendo en cuenta el riesgo asociado al consumo del alimento (5). En este sentido, el Reglamento MERCOSUR ha establecido límites máximos para As, Cd y en distintas matrices de origen vegetal.

En el caso de la acumulación de residuos de pesticidas, potencialmente tóxicos para los consumidores, el contenido de trazas presentes en productos de consumo humano se encuentra actualmente regulado por el *Codex Alimentarius*, quien fija para cada tipo de matriz y cada compuesto Límites Máximos de Residuos (LMR) que deben ser controlados a través de metodologías analíticas modernas, multiresiduales, miniaturizadas y amigables con el medio ambiente. Asimismo, las metodologías desarrolladas pueden también ser un insumo para el control, y sus resultados aportaran a los agricultores que tienden a la búsqueda de la implantación de las BPA en sus cultivos, buscando un mejor resultado para el impacto sobre el medio ambiente.

Por otra parte, el consumo popular de vegetales y sus respectivas infusiones, se asocia a propiedades benéficas para la salud. El creciente interés desde el punto de vista de la investigación es debido a que se reporta para muchos de ellos propiedades nutricionales y farmacológicas, donde se destaca la capacidad antioxidante. Esta capacidad ha sido relacionada al alto contenido de compuestos fenólicos y carotenoides (6). Estos compuestos pertenecen al grupo de los llamados compuestos bioactivos, a los cuales se ha atribuido la habilidad de reducir los riesgos de contraer ciertos desórdenes degenerativos, tales como el cáncer y enfermedades cardiovasculares (7). De igual forma, las determinaciones de metales traza esenciales, que forman parte de centros activos de enzimas que catalizan procesos vitales (Cu, Zn) o participan en el transporte de electrones (Fe, Ni), son de vital importancia, y ayudan a definir los aspectos nutraceuticos del vegetal.

1.2 La Alcachofa

1.2.1 Orígenes

La alcachofa es originaria de la costa mediterránea. Según cuenta la mitología, el Dios Júpiter se enamoró de *Cynara*, una chica de cabello rubio ceniza, la cual lo rechazó y como castigo fue transformada en lo que se conoce como "*Cynara scolymus*", una alcachofa.

El nombre del género *Cynara* viene de la palabra griega "*kinara*", que significa planta espinosa. El nombre actual alcachofa, viene de la palabra árabe "*al'qarshuff*", mientras que en inglés, francés, alemán y en otros idiomas de Europa del Norte, el nombre actual

artichoke, proviene de una palabra compuesta del latín “*articoculum*”, cuyo significado es *Artus* = espinosa y *cocolum* = esfera (8) (9).

El consumo de alcachofa se remonta al 2000 o 2500 A.C. En esa época únicamente se consumían los tallos florales y las nervaduras carnosas de las hojas de los cardos, ya que las inflorescencias eran pequeñas, espinosas y de sabor amargo (10).

La domesticación de la alcachofa tuvo lugar en el siglo XV en los monasterios cristianos de Sicilia, donde los monjes la cultivaban y mejoraban, evolucionando hasta la alcachofa que se conoce en la actualidad. Los árabes se encargaron de extender este cultivo a otras regiones mediterráneas, mientras que Italia fue una conexión importante para su propagación por el norte de Europa central y oriental (11).

La historia cuenta que los romanos y los griegos ya la consumían, pero fue gracias a la reina consorte de Francia Catalina de Médicis, a quien le encantaba la alcachofa, que durante el Renacimiento la introdujo en la corte francesa. A pesar de la creencia de que la misma era afrodisíaca y no era bueno consumirla, ella siguió haciéndolo. En esa época era muy cara y se la consideraba como una comida de ricos.

La alcachofa fue introducida en América en el año 1800 por los franceses en el estado de Luisiana y por los españoles en el estado de California. Tras la primera guerra mundial la migración italiana la llevó a Argentina, Chile, Perú y Uruguay.

En la actualidad, se consume el fruto de la alcachofa como alimento y las hojas bajo la forma de infusión o como materia prima base de productos fitoterápicos.

1.2.2 Características Taxonómicas y Botánicas

- ✓ Familia: Asteraceae (Compositae).
- ✓ Especie: *Cynara scolymus*, L.
- ✓ Planta: Planta vivaz, que puede considerarse como bianual y triannual, conservándose como vivaz en cultivos muy abandonados y con notable decrecimiento de la producción. Tallos erguidos, gruesos, acanalados longitudinalmente y ramificados, con más de un metro de altura.
- ✓ Sistema radicular: Extraordinariamente potente, que le permite adaptarse a una extensa gama de suelos. Se inserta en un rizoma muy desarrollado, en el que se acumulan las reservas alimenticias que elabora la planta.



Figura 1 Sistema radicular de la alcachofa. Foto original tomada por el autor en el cultivo de la familia Bianco.

- ✓ Hojas: Largas, pubescentes, grandes de 0,9 a un metro de color verde claro por encima y algodonosas por debajo. Los nervios centrales están muy marcados y el limbo dividido en lóbulos laterales, a veces muy profundos en las hojas basales y mucho menos hundidos en hojas de tallo.



Figura 2 Hojas de la alcachofa. Foto original tomada por el autor en el cultivo de la familia Bianco.

- ✓ Flores: En el extremo principal del tallo se genera una inflorescencia, que es una ramificación que termina en flores sésiles, de color violáceo o morado, que se insertan en el ápice o receptáculo rodeado por una serie de brácteas membranosas y carnosas.



Figura 3 Flores de la alcachofa (Extraído de <http://plantasmedicinales.co>).

- ✓ Fruto: Las hojas que envuelven al capítulo constituyen las brácteas, que junto al receptáculo (conocido como “fondo de alcachofa”) forman la parte comestible de la alcachofa. Debe consumirse antes de que se desarrolle la flor ya que en ese caso el receptáculo se endurece y forma espigas. Se trata de un aquenio de forma oblonga y color grisáceo, provisto de vilano plumoso encargado de favorecer la diseminación (12).



Figura 4 Fruto de la alcachofa (Extraída de <http://plantasmedicinales.co>).

- ✓ Semillas: Las semillas de la planta se encuentran en el interior del fruto y son aquenios pequeños (de unos 5 o 7 mm), de color grisáceo. Cada fruto puede contener entre 50 y 180 semillas, dependiendo de la variedad, con una capacidad germinativa de 6 a 7 años y una germinación entre 7 y 20 días (12).



Figura 5 Semillas de la alcachofa (Extraído de <http://blogs.diariovasco.com>)

1.2.3 Composición Química y Propiedades Nutraceuticas

La alcachofa es un alimento muy valorado en la dieta mediterránea gracias a sus saludables propiedades nutricionales. Su elevada humedad, bajo contenido calórico, la práctica ausencia de grasas y su naturaleza fibrosa la han convertido en uno de los alimentos dietéticos por excelencia. Otra característica importante es el alto contenido de minerales, sobre todo en potasio, sodio, magnesio, fósforo y calcio, que son fundamentales para el organismo, ya que participan en numerosas funciones como la regulación de líquidos en el cuerpo, control de la presión arterial y el funcionamiento del intestino,

músculos y nervios. El carbohidrato más importante que se encuentra en esta hortaliza es la inulina, un oligopolímero de fructosa que no puede ser digerido por el intestino delgado humano, y que tiene propiedades prebióticas y bifidobacterianas. Esta fibra aumenta la absorción intestinal de minerales como el calcio, reduciendo el riesgo de osteoporosis, reduce la síntesis de ácidos grasos en el hígado, descendiendo el riesgo de arterioesclerosis, y modula los niveles de glucosa en sangre (13).

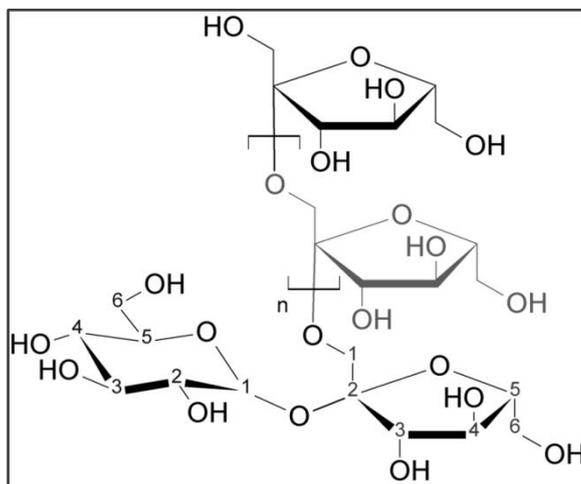


Figura 6 Estructura de la Inulina (Extraído de <http://www.scientificpsychic.com>)

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes en las plantas con una estructura que depende de su origen biosintético. Existen diversos tipos de compuestos fenólicos que se diferencian estructuralmente: ácidos fenólicos, flavonoides, antocianos y taninos, entre otros. Estos compuestos desempeñan numerosas funciones en las plantas: contribuyen al color, sabor y aroma, protegen del ataque de patógenos e intervienen en el crecimiento y madurez de la planta (14) (15).

La alcachofa contiene una gran cantidad de fenoles naturales, entre los que destacan los ácidos hidroxicinámicos, tales como el ácido p-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico) y en mayor medida derivados del ácido cafeico (ácido 3,4-dihidroxicinámico) (14).

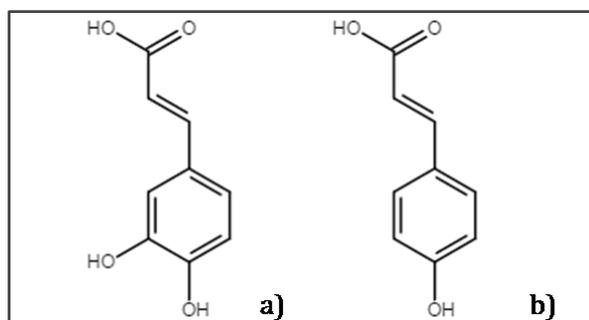


Figura 7 Estructuras del ácido cafeico (a) y cumárico (b) (Extraído de <http://www.chemicalize.org>).

Los ácidos hidroxicinámicos son compuestos con un esqueleto del tipo fenilpropanoide (C6-C3), que se diferencian por las sustituciones del anillo fenólico. La mayor parte de estos compuestos se encuentran conjugados con otros ácidos. En la alcachofa la mayor

parte del ácido cafeico presente se encuentra conjugado con el ácido quínico, formando derivados cafeoilquínicos. Los más relevantes son: el ácido clorogénico (ácido 5-O-cafeoilquínico), ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico, el ácido 3,4-di-O-cafeoilquínico y la cinarina (ácido 1,3-di-O-cafeoilquínico (1,5%)) (13).

Estos compuestos tienen propiedades anticancerígenas, diuréticas y coleréticas. Favorecen la formación y eliminación de bilis, facilitando la digestión de los alimentos y disminuyendo los niveles de colesterol. De esta forma se mejora el funcionamiento del hígado y se evitan problemas como la insuficiencia hepática o la hepatitis. La cinarina es la responsable del aumento en la eliminación de la orina, mejorando problemas de retención de líquidos, hipertensión y cálculos renales. Además es hidrocolerética e hipocolesterolemia y disminuye el cociente beta/alfa de las lipoproteínas.

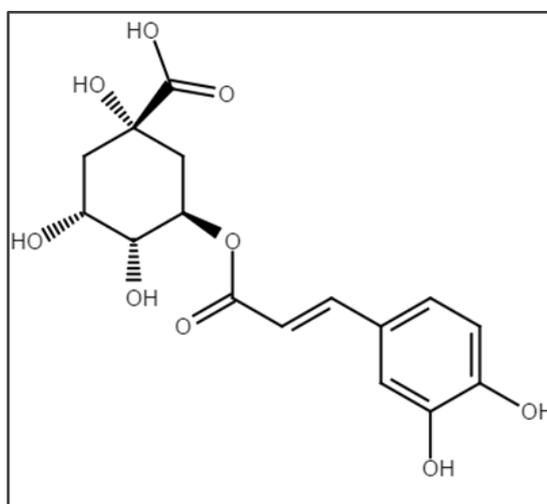


Figura 8 Estructura del ácido 5-O- cafeoilquínico (ácido clorogénico) (Extraído de <http://www.chemicalize.org>).

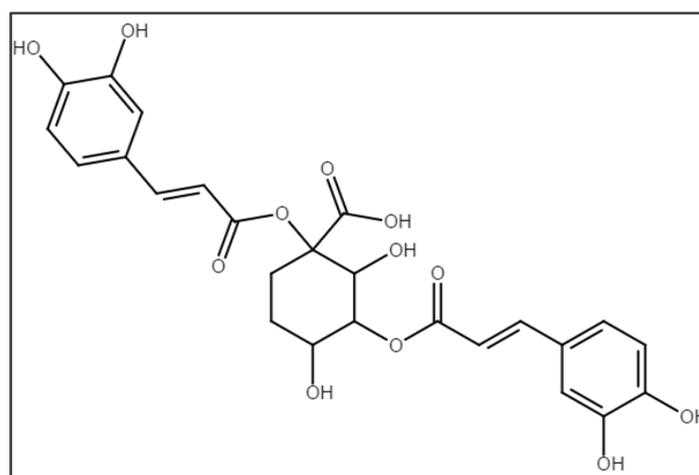


Figura 9 Estructura del ácido 1,3-di-O-cafeoilquínico (cinarina) (Extraído de <http://www.chemicalize.org>).

Son muchos los factores que pueden afectar al contenido fenólico de la alcachofa: genotipo, variedad, manejo pre-cosecha, época de recolección, estado de madurez, operaciones de procesado y conservación, entre otros.

Debido a la gran variedad de propiedades benéficas para la salud, es que la alcachofa se consume como planta medicinal. La misma se utiliza como “depurador hepático” en infusiones y productos farmacéuticos. Es la materia prima base de productos fitoterápicos que se encuentran en plaza, junto con la menta y el boldo. Efectos anti-obesidad por parte del ácido clorogénico han sido reportados en la literatura. A raíz de estos efectos, el efecto adelgazante de la alcachofa ha sido promovido, resultando en una gran popularidad de sus productos alrededor del mundo (16).

1.2.4 Producción mundial de alcachofa

Según los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), el volumen anual de alcachofa producido en el año 2015 fue de aproximadamente 1.700.000 toneladas. La región mediterránea contribuye con un 75% de la producción a nivel mundial, siendo Italia (35%) y España (15%) los mayores productores. América Latina constituye la segunda región en cuanto a producción (15%), siendo Perú, Argentina y Chile los países con mayor producción.

Tabla 1 Producción mundial de alcachofa en 2015 según los principales productores (FAOSTAT 2016).

Pais	Producción (Toneladas)
 Italia	483.561
 España	212.400
 Perú	134.244
 Argentina	90.000
 Egipto	74.000
 China	66.000
 Marruecos	60.190
 E.E.U.U.	53.890
 Francia	44.234
 Chile	38.000
 Turquía	36.320
 Argelia	25.000
 Grecia	21.300
 Túnez	18.000
 Irán	10.000

1.2.5 Producción de alcachofa en Uruguay

En la actualidad, los datos de la Dirección Nacional de Estadísticas Agropecuarias (MGAP/DIEA) indican que el sector granjero ocupa casi el 2% de la superficie agropecuaria de Uruguay, con unas 30.000 ha dedicadas a la horticultura y concentradas en un 80% en el sur del país y un 20% en el litoral norte. La producción hortofrutícola aporta un 15% del valor bruto agropecuario (más de 100 millones de dólares) y se caracteriza por estar desarrollado casi en su totalidad por productores familiares. En nuestro país unos 7000 establecimientos se dedican a esta producción, abasteciendo casi en su totalidad la demanda de producto fresco, durante todo el año.

Se estima que actualmente hay unas 20 ha dedicadas al cultivo de alcachofa en Uruguay, las cuales equivalen a una producción de 100 toneladas anuales. Los principales cultivos se desarrollan en los departamentos de Montevideo, Canelones, Salto y Paysandú.



Figura 10 Mapa Político del Uruguay donde se marcan las zonas dedicadas a la horticultura (Extraído de <http://www.sgm.gub.uy>).

1.2.6 Variedades de la alcachofa

Actualmente, hay más de 286 variedades cultivadas de alcachofa, originadas mayoritariamente en Italia, Francia y España. Muchas de estas variedades deben su nombre al lugar de origen: “Blanca de Tudela”, “Violeta de Provenza” y “Camus de Bretaña”, por ejemplo. (17). No es fácil identificar los diversos genotipos de alcachofa que existen (entre 100 y 120), debido a la gran variabilidad genética. Las variedades pueden diferenciarse atendiendo a la forma del capítulo (esférico u oval), tamaño y color del mismo (verde o violeta). También puede tenerse en cuenta la precocidad de la planta (11) (9). Entre las principales variedades que se cultivan en el mundo, destacan:

Blanca de Tudela: Es una planta temprana, de tamaño pequeño (1 m de desarrollo vegetativo) capaz de producir durante toda la primavera, otoño e invierno, dando dos o tres rebrotes por estación. Se cultiva principalmente en España, y su destino es tanto para el consumo en fresco como para la industrialización. El capítulo que genera esta variedad es pequeño, sin espinas y de forma cónica-cilíndrica, rodeado de brácteas verdes y compactas (18).

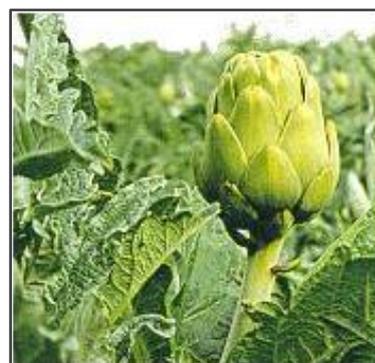


Figura 11 Var. Blanca de Tudela (18).

Green Globe: Se trata de una alcachofa con brácteas brillantes y espinosas, de tonos que varían entre el verde y el violeta, como resultado de la mezcla genética de esta variedad. La planta puede alcanzar 2 m de altura y posee hojas grandes y fruto globoso, dulce y tierno. Se cultiva principalmente en Estados Unidos (19).



Figura 12 Var. Green Globe (19).

Spinoso Sardo: Es la segunda variedad más cultivada en Italia, y la preferida para el consumo en fresco. Es una de las más llamativas por sus características morfológicas. Los capítulos de la planta son cónicos y se encuentran rodeados por brácteas alargadas, de color verde con tonos violetas y pardos. El ápice de las brácteas termina en una espina amarillenta muy pronunciada (20).



Figura 13 Var. Spinoso Sardo (20).

Violeta de Provenza: Esta variedad es originaria de Francia, pero también se cultiva en Italia y en menor medida, España. Es una planta algo menos productiva que “Blanca de Tudela”, comenzando a dar capítulos a partir de octubre y aumentando su producción tras la parada de invierno. La planta no es muy grande y sus capítulos son medianos y alargados, con brácteas de tonos verdosos y violeta rojizo (20).



Figura 14 Var. Violeta de Provenza (20).

1.2.7 Reproducción y Cultivo

La reproducción de la planta de alcachofa puede llevarse a cabo mediante dos vías: la propagación gámica, mediante semillas, o agámica, a través de material vegetal de una planta madre. La técnica más usada es la multiplicación a partir de órganos de la planta. En algunos países como España se usan zuecas o palos, mientras que en otros como Francia e Italia se prefieren hijuelos o rebrotes jóvenes. Actualmente están tomando relevancia las técnicas de micropropagación de alcachofa, ya que garantizan que el material vegetal esté libre de enfermedades. Es importante tener en cuenta la calidad y el manejo de las semillas y del material vegetal usado en la reproducción, ya que influye directamente sobre el desarrollo y el rendimiento de las plantas futuras (21) (22).

1.2.8 Exigencias edafoclimáticas y nutricionales de la planta

Clima

Uno de los factores que más afectan a la calidad y producción del cultivo de alcachofa es el clima. Variables como la temperatura, humedad relativa y luz, influyen directamente sobre el desarrollo de la planta.

✓ Temperatura

La alcachofa es un cultivo típico de la zona mediterránea, que requiere climas suaves y templados, sin cambios bruscos de temperatura. La planta no es capaz de resistir temperaturas de congelación, dañándose sus estructuras aéreas entre -2 y -4 °C, mientras que las subterráneas lo hacen por debajo de -10 °C. Tampoco soportan bien temperaturas superiores a 30 °C de forma continuada (23).

La temperatura óptima para el desarrollo de la planta depende, en gran medida, de la etapa fisiológica en la que se encuentre. En la fase de desarrollo vegetativo, el rango de temperatura ideal para el crecimiento de la planta es de 12 - 20 °C. Durante la formación

de las cabezuelas, el rango se hace más estrecho (15 - 18 °C) debido a la mayor sensibilidad de la planta, de modo que temperaturas superiores a 24 °C producen un alto grado de estrés en la planta, conduciendo a la formación de capítulos pequeños, abiertos y fibrosos (24).

✓ Humedad Relativa

El cultivo de alcachofa requiere humedades relativas elevadas (sobre el 60%) para garantizar la calidad de las cabezuelas producidas. La falta de humedad origina la apertura de las brácteas que rodean al capítulo, haciendo que se pierda la ternura de las mismas, y con ello, la alcachofa pierde su calidad (14).

✓ Luminosidad

La alcachofa es una planta de fotoperiodo largo (con un mínimo de 10,5 h). La cantidad de luz que recibe la planta influye en la temporada de floración y en la maduración de las alcachofas. Los cultivos más expuestos a la radiación solar tienden a adelantar la formación de las flores, y por tanto, la producción de alcachofas es más temprana (14).

Suelo

La alcachofa es una planta que necesita suelos profundos (de más de 80 cm) para desarrollarse de forma adecuada, debido a que posee un sistema radicular fuerte y penetrante. Los suelos fértiles, bien drenados y de textura franco-arenosa, arcillolimoso o franco-arcillo-arenosa son los que mejor se adaptan a este tipo de cultivo (25).

La planta de alcachofa se adapta a suelos ricos en carbonato cálcico (hasta un 45%) y ligeramente alcalinos (pH: 8,5), pero se desarrolla mejor en rangos de pH de 7- 8. Además es capaz de resistir muy bien la salinidad, desarrollándose un buen cultivo hasta valores de 2,5 dS/m (24). Cuando la salinidad supera los 4 dS/m, la planta puede presentar problemas de necrosis, enfermedades debidas a *Botrytis* y *Erwinia* y bajo rendimiento, con valores superiores a 7 dS/m se detiene el desarrollo de la planta (23).

Requerimiento hídrico

La alcachofa es una planta que necesita grandes cantidades de agua para su desarrollo, sobre todo en las etapas de crecimiento vegetativo y producción de cabezuelas. Cuando el agua necesaria en estas etapas de mayor demanda no está disponible, se producen plantas poco vigorosas y cabezuelas pequeñas con brácteas fibrosas. Las necesidades hídricas de la planta dependen de la temperatura, precipitaciones, textura del suelo, variedad, etc. El consumo medio del cultivo de alcachofa es de 7.000 a 10.000 m³ ha⁻¹ por ciclo de cultivo (26).

Requerimiento de nutrientes

La alcachofera necesita gran cantidad de nutrientes para su desarrollo, pero desde el punto de vista agronómico los elementos más importantes son nitrógeno, fósforo, potasio y magnesio. El nitrógeno afecta principalmente al crecimiento vegetativo de la planta, mientras que el fósforo influye en la precocidad de producción de capítulos y en la calidad de los mismos. El potasio aporta vigorosidad a los tejidos, y resistencia a la sequía y las heladas, ya que disminuye la transpiración de la planta. El magnesio es fundamental, ya que participa en la formación de los pigmentos vegetales (14).

1.3 Seguridad Alimentaria

Según FAO/OMS, existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias a fin de llevar una vida activa y sana. A su vez, un correcto estudio de seguridad alimentaria debe estar compuesto por dos grandes líneas de trabajo: una línea dedicada a estudios de inocuidad alimentaria y otra dedicada a estudios de calidad alimentaria y de propiedades nutraceuticas (27).

1.3.1 Inocuidad Alimentaria

La inocuidad alimentaria, está definida por el *Codex Alimentarius* como la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso al que se destinan (27).

Se estima que tres millones de personas mueren cada año a consecuencia de enfermedades transmitidas por los alimentos y el agua. Es por esto que FAO busca promover la inocuidad de los alimentos y evitar enfermedades de origen alimentario, resguardando a los consumidores y promoviendo prácticas justas en el comercio de alimentos mediante la adopción de las normativas del *Codex Alimentarius*.

El enfoque de la FAO abarca la cadena alimentaria y se basa en la respuesta estratégica a un complejo conjunto de problemas y necesidades de todos los sectores relacionados con los alimentos. Esta estrategia incluye: la adopción universal de un enfoque basado en los riesgos, el énfasis en la prevención de la contaminación de los alimentos en su origen, y la adopción de un enfoque integral relativo a la inocuidad de los alimentos que abarque toda la cadena alimentaria, desde la granja hasta la mesa (27).

Para garantizar la inocuidad de los alimentos y proteger a los consumidores es imprescindible que haya sistemas nacionales de control de los alimentos en cada país que sean eficaces, con una base oficial y de carácter obligatorio. También son decisivos para

permitir a los países garantizar la inocuidad y la calidad de los alimentos que se introducen en el comercio internacional y para asegurarse de que los alimentos importados se ajusten a los requisitos nacionales.

El control de los alimentos busca garantizar que todos los alimentos, durante su producción, manipulación, almacenamiento, elaboración y distribución, sean inocuos, sanos y aptos para el consumo humano, y estén etiquetados de manera objetiva y precisa, de acuerdo con las disposiciones de la ley.

El análisis del riesgo abarca tres componentes importantes (27):

- ✓ Evaluación de riesgos: proceso científico que consiste en i) la identificación de peligros, ii) caracterización de peligros, iii) evaluación de exposición y iv) caracterización de riesgos.
- ✓ Gestión de riesgos: proceso de analizar la alternativa de políticas en consulta con todas las partes interesadas, considerando la evaluación de riesgos y otros datos relevantes para la protección de la salud de los consumidores y para la promoción de prácticas de comercio legítimo y, de ser necesario, seleccionando las opciones de prevención y control que correspondan.
- ✓ Comunicación de riesgos: intercambio interactivo de información y opiniones durante todo el proceso de análisis de riesgo con respecto a factores relacionados con los riesgos y percepciones de riesgos entre evaluadores, administradores de riesgos, consumidores, industria, comunidad académica y otras partes interesadas, incluyendo la explicación de los hallazgos de la evaluación de riesgos y la base de las decisiones de administración de riesgos.

Dicho análisis proporciona a las autoridades encargadas de la reglamentación la información y las pruebas que necesitan para adoptar decisiones eficaces, contribuyendo a mejores resultados en materia de inocuidad de los alimentos y a la mejora de la salud pública.



Figura 15 Definición del Riesgo.

Según el *Codex Alimentarius*, un peligro alimentario es “un agente biológico, químico o físico presente en el alimento, o bien la condición en que éste se halla, que puede causar un

efecto adverso a la salud”. En la **Tabla 2** se enumeran varios peligros transmitidos por los alimentos que son actualmente motivo de preocupación.

Tabla 2 Ejemplos de peligros que pueden producirse en los alimentos.

Peligros biológicos	Peligros químicos	Peligros físicos
Bacterias infecciosas	Aditivos alimentarios	Astillas de huesos
Mohos	Alérgenos	Joyas
Microorganismos que producen toxinas	Contaminantes ambientales	Limaduras de metales y máquinas
Parásitos	Contaminantes químicos resultantes del envasado	Piedras
Priones	Residuos de medicamentos veterinarios	Vidrio
Virus	Residuos de pesticidas	---
Cianobacterias	Toxinas de origen natural	---

1.3.2 Calidad alimentaria

La noción de calidad ha sido objeto de diversas definiciones referidas a distintos sistemas de interpretación. Hay dos nociones de base en relación con la utilización de dicho término. La primera se refiere al enunciado de las características que determinan que una cosa sea lo que es en relación con la finalidad de su utilización, se trata de las propiedades que están supuestamente presentes. La Norma ISO 9000:2000 proporciona una definición bastante amplia: “la calidad es el conjunto de propiedades y características de un producto, de un proceso o de un servicio que le confieren su capacidad de satisfacer necesidades implícitas o explícitas”. La segunda noción consagra la expresión de un nivel de excelencia, una forma de distinción con respecto a cosas similares, que justifica que se la busque. Sin embargo en ambos casos, nada precisa lo que define el contenido de la calidad, entre quien ofrece y quien solicita. Nada indica cómo se elabora ni como se garantiza (28).

En materia de productos alimenticios, el término calidad es objeto de interrogantes, y ha sido asimismo empleado de formas diferentes en períodos sucesivos. Esto conduce a la consideración de tres niveles de enfoque (28):

- ✓ Tradicionalmente se entiende por calidad a la ausencia de defectos, fraudes y falsificación.
- ✓ Más recientemente, la calidad radica en propiedades previstas, tales como las características organolépticas, nutricionales y el valor de utilización.
- ✓ Por último, la calidad designa características deseadas, susceptibles de conferir el derecho a una plusvalía. Por ejemplo: las modalidades de producción (agricultura biológica, producción respetuosa del medio ambiente, bienestar de los animales),

las zonas de producción (territorio de origen, montaña) y las tradiciones que conllevan. Estas características deben ser declaradas en la oferta en la oferta del producto con el fin de precisar las intervenciones necesarias, las responsabilidades de cada operador y de aportar la valorización esperada.

Estos tres niveles de enfoque no pueden reemplazarse entre sí, se superponen y justifican distintos niveles de intervención de los poderes públicos, de los operadores y los consumidores.

Cabe considerar que los dos primeros niveles se analizan conjuntamente bajo la expresión “calidad genérica”, que ha de ser rigurosa y sin ambigüedad. Por el contrario, el tercer nivel supone estrategias de diferenciación de los productos y de segmentación de los mercados. Este tercer nivel, identificado con la expresión “calidad específica” implica la atribución de signos oficiales da calidad y supone dispositivos particulares.

1.3.2.1 Nutracéutica

En las últimas décadas, una novedosa etapa de desarrollo en el área de las ciencias de los alimentos y de la nutrición, se ha hecho presente con especial intensidad. La interacción alimentos-medicina reconocida con la denominación de "alimentos funcionales", acepta el papel de los componentes alimenticios como nutrientes esenciales para el mantenimiento de la vida y la salud y destaca también el papel de elementos no nutricionales, pero que contribuyen a prevenir o retardar las enfermedades crónicas de la edad madura. La idea de formular alimentos en base a los beneficios de salud que sus componentes no nutricionales pueden proveer al consumidor, se ha convertido actualmente en un marcado interés para las grandes compañías de alimentos. Especialistas en nutrición humana, ciencia y tecnología de alimentos, entre otros, investigan activamente esta nueva área y se encuentran formulando nuevos productos que permitan un futuro más saludable para la humanidad. Los alimentos funcionales, los productos alimentarios y los suplementos representan una oportunidad para el desarrollo de nuevos productos que proveen un posible beneficio fisiológico en el control o la prevención de enfermedades (29).

La tendencia mundial se ha dirigido hacia la introducción de los llamados productos nutraceuticos. El término “nutracéutico” surgió de la unión de las palabras “nutrición” y “farmacéutico” y fue creado en 1989 por el Dr. Stephen DeFelice, fundador y presidente de la Fundación para la Innovación en Medicina (FIM). Los nutraceuticos se definen como sustancias químicas o biológicas que pueden encontrarse como componentes naturales de los alimentos o adicionarse a los mismos y que resultan especialmente beneficiosas, tanto

en la prevención de enfermedades como en la mejora de las funciones fisiológicas del organismo (30).

Los nutracéuticos se diferencian de los suplementos dietarios por dos aspectos fundamentales: los nutracéuticos no solo suplementan la dieta sino que también intervienen en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad y/o desorden, y además pueden ser utilizados como comida convencional. Estos productos buscan lograr resultados terapéuticos con reducidos efectos secundarios, comparados con otros agentes terapéuticos de origen farmacéutico (30).

El interés del consumidor y de la población en general, por obtener dietas óptimas para mantener una buena salud y prolongar los años de vida, ha propiciado el aumento del mercado de los alimentos naturales en el que este tipo de productos tiene prioridad.

Los alimentos nutracéuticos se dividen en tres grupos (30):

- ✓ Nutrientes: azúcares y grasas.
- ✓ Compuestos químicos: fibras, antioxidantes, carotenos, ácidos grasos $\Omega 3$.
- ✓ Probióticos: microorganismos benéficos para la salud (lácteos).

En esencia, los nutracéuticos son micronutrientes que mejoran productos ya existentes y que permiten diversificar el mercado. Abarcan una amplia gama de productos que deben cumplir los siguientes criterios:

- ✓ Productos de origen natural.
- ✓ Aislados y purificados por métodos no desnaturalizantes.
- ✓ Aportar beneficios para la salud: mejora de una o más funciones fisiológicas, mejora de la calidad de vida y acción preventiva y/o curativa.
- ✓ Aportar estabilidad temporal.
- ✓ Estudios reproducibles de sus propiedades bioactivas en animales de experimentación y humanos.

1.4 Análisis de residuos de pesticidas

1.4.1 Definiciones

La producción y el consumo de productos vegetales y animales tienen un papel muy importante a nivel mundial. El rendimiento de la producción se ve afectado negativamente por organismos nocivos, por lo tanto es fundamental proteger los diferentes cultivos de dichas plagas con el fin de evitar una disminución del rendimiento de los cultivos o daños a la producción y así garantizar la cantidad y calidad de los productos cosechados y la productividad agrícola. Con este fin, existen diferentes métodos alternativos disponibles, tales como el uso de variedades resistentes, la rotación de cultivos (31), la eliminación de

malezas de forma mecánica, el control biológico (32) y el uso de productos fitosanitarios. Estos últimos son también denominados pesticidas, plaguicidas o agroquímicos, y es la práctica más común para la protección de los cultivos de las plagas o pestes (33).

El *Codex Alimentarius* define un pesticida como cualquier sustancia destinada a prevenir, destruir, atraer, repeler o combatir cualquier plaga, incluidas las especies indeseadas de plantas o animales, durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales, o que pueda administrarse a los animales para combatir ectoparásitos. El término incluye a las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o inhibidores de la germinación y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte. La definición no incluye normalmente los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal, aditivos alimentarios ni medicamentos para animales (34). Por otro lado la Unión Europea (UE) define un producto fitosanitario como una sustancia activa o un preparado presentado en la forma en que se ofrecen para su distribución a los usuarios, destinados a:

- ✓ Proteger los vegetales contra todos los organismos nocivos o evitar la acción de los mismos.
- ✓ Influir en el proceso vital de los vegetales de forma distinta de cómo lo hacen las sustancias nutritivas (por ejemplo, los reguladores de crecimiento).
- ✓ Mejorar la conservación de los productos vegetales siempre y cuando dichas sustancias o productos no estén sujetos a disposiciones particulares sobre conservantes.
- ✓ Destruir los vegetales inconvenientes.
- ✓ Destruir partes de vegetales, o controlar o evitar un crecimiento inadecuado de los mismos (35).

Existen más de 900 sustancias activas que son comercializadas como pesticidas en diversos tipos de formulaciones. Estas sustancias están divididas en más de 100 clases químicas, encontrándose las benzoilureas, triazoles, estrobilurinas, neonicotinoides, carbamatos, organofosforados, organoclorados, piretroides, sulfonilureas y triazinas, entre los grupos más importantes (36) (37).

Las características físico-químicas de los pesticidas son considerablemente diferentes, pueden presentar carácter ácido, básico ó neutro, ser volátiles o no, poseer diferente polaridad, entre otros. Estos compuestos pueden contener en su estructura halógenos,

fósforo, azufre y nitrógeno que permiten la detección selectiva de estos compuestos. Esta gran diversidad de propiedades fisicoquímicas causa serios problemas en el desarrollo de métodos analíticos universales para la determinación de residuos, que deberían tener el alcance más amplio posible (38).

1.4.2 Clasificación de pesticidas

Los pesticidas se clasifican en función de algunas de sus características principales, como son la estructura química y su uso, la vida media y la toxicidad. De acuerdo a su estructura química se nuclean en diversas familias, la **Tabla 3** muestra ejemplos de las familias químicas más representativas.

Tabla 3 Ejemplos de las principales familias de pesticidas.

Familia	Ejemplo
Amidas	Alaclor
Anilidas	Boscalid
Bifenilos clorados	Tetradifón
Carbamatos	Carbaril
Dinitroanilinas	Pendimetalín
Estrobilurinas	Azoxystrobin
Fenilureas	Isoproturón
Fenoxiacidos	2,4-D
Hidantoínas	Iprodiona
Imidazolinonas	Imazapic
Neonicotinoides	Imidacloprid
Organoclorados	DDT
Organofosforados	Diazinón
Piretroides	Cipermetrina
Sulfonilureas	Metsulfurón
Triazinas	Atrazinas
Triazoles	Difenoconazol

Según su finalidad se clasifican en herbicidas, insecticidas, fungicidas, rodenticidas, nematocidas, acaricidas, bactericidas y otros. En la **Tabla 4** se encuentran listados los grupos más representativos según la finalidad de uso (39).

Tabla 4 Ejemplos de pesticidas según la familia química y modo de acción.

Acción	Familia Química	Ejemplos
Insecticida	Organoclorados Organofosforados Carbamatos Piretroides Neonicotinoides Comp. de origen botánico	DDT, Aldrín, Endosulfán Diazinón, Clorpirifós, Malatión Carbaril, Carbofurán, Propoxur Cipermetrina, Fenvalerato, Permetrina Imidacloprid, Tiacloprid, Tiametoxam Rotenona Nicotina
Herbicida	Derivados bipyridilos Derivados de triazinas Sulfonilureas Imidazolinonas Sulfonamidas Ureas	Diquat, Paraquat Atrazina, Simazina, Terbutrín Pirazosulfurón-etil, Metsulfurón-metil Imazapic, Imazaquin, Imazapir Penoxulám, piroxulám Diurón, Linurón, Fenurón
Fungicida	Imidazoles Ditiocarbamatos Estrobilurinas Triazoles	Imazalil, Procloraz, Triflumizol Maneb, Mancozeb, Propineb Piraclostrobín, Azoxistrobín Tebuconazol, Epoxiconazol

Según su vida media, los pesticidas se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes (**Tabla 5**).

Tabla 5 Clasificación de los pesticidas según su persistencia.

Persistencia	Vida media	Ejemplos
No persistente	Hasta 12 semanas	Carbaril, Diazinón
Moderadamente persistente	De 1 a 8 meses	Paratión
Persistente	Hasta 20 años	DDT, Aldrin
Permanente	Indefinidamente	Mercuriales y arsenicales

La OMS clasifica a los pesticidas según su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, definida ésta como la capacidad del plaguicida de producir un daño agudo a la salud a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto (**Tabla 6**) (40). La toxicidad se mide a través de la dosis letal media (DL₅₀) o de la concentración letal media (CL₅₀) en determinadas especies animales. Ambos parámetros varían conforme a múltiples factores como la presentación del producto (sólido, gel, líquido, gas, polvo), la vía de entrada (oral, dérmica, respiratoria), la temperatura, la dieta, la edad o el sexo (40). La EPA define a la toxicidad como el grado al cual una sustancia o mezcla de sustancias puede hacerle daño a los seres humanos o animales. Toxicidad aguda se refiere a efectos adversos o nocivos en un organismo a través de una sola exposición o una exposición a corto plazo. Toxicidad crónica se refiere a la habilidad de una sustancia o mezcla de sustancias de causar efectos dañinos en un periodo de tiempo extenso, normalmente a

través de exposiciones continuas o repetidas a veces durante toda la vida del organismo expuesto (41).

Tabla 6 Clasificación de los pesticidas según la Organización Mundial de la Salud.

Clasificación de la OMS según el riesgo		LD ₅₀ en ratas (mg kg ⁻¹ peso)	
		Oral	Dérmico
Ia	Producto sumamente peligroso	<5	<50
Ib	Producto muy peligroso	5 - 50	50 - 200
II	Producto moderadamente peligroso	50 - 2000	200 - 2000
III	Producto poco peligroso	>2000	>2000
U	Producto que normalmente no ofrece peligro	>5000	>5000

1.4.3 Destino de los pesticidas

Se estima que menos del 45% de los pesticidas aplicados alcanza los cultivos y menos del 0,1% llega al organismo objetivo; el resto se incorpora al medio ambiente contaminando suelos, agua, aire o simplemente actúa sobre un organismo no objetivo. Según sus características físico-químicas, pueden persistir por largos períodos en un ecosistema y por esta propiedad de persistencia, pueden incluso entrar en la cadena alimenticia, sufrir biomagnificación y acumularse en tejidos grasos del organismo, llegando a concentraciones mayores que las que se encuentra en el ambiente (42) (43). Según el modo o sitio de aplicación los pesticidas tienen diferentes destinos. Por ejemplo los que son aplicados por medios aéreos pueden contaminar el aire y finalmente terminar en el suelo o el agua (44). De esta forma, el uso inadecuado de los pesticidas puede alterar la productividad de los suelos, deteriorar la calidad de los recursos hídricos, alterar la reproducción y desarrollo de especies acuáticas y terrestres, así como provocar problemas inmunológicos, neurológicos, hormonales, e intoxicaciones en humanos y otros animales (45) (46) (47). Aún en las mejores condiciones de uso, los pesticidas generan residuos que pueden persistir en el ambiente así como en los alimentos. Según el *Codex Alimentarius*, un residuo de pesticida es cualquier sustancia presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un pesticida. El término incluye cualquier derivado de pesticida, como productos de conversión, metabolitos y productos de reacción y las impurezas consideradas de importancia toxicológica (34).

La UE define un residuo de pesticida como una o varias sustancias que se encuentren en o sobre vegetales o productos de origen vegetal, productos animales comestibles, o

componentes del medio ambiente, que constituyan los restos de la utilización de un producto fitosanitario, incluidos sus metabolitos y los productos resultantes de su degradación o reacción (35).

1.4.4 Legislación sobre residuos de pesticidas en alimentos

Para evitar un impacto en la salud pública y seguir las BPA, se han establecido Límites Máximos de Residuo (LMR) para pesticidas en alimentos y agua potable en la mayoría de los países (38). Se entiende por LMR, la concentración máxima de residuos de un pesticida (expresada en mg kg^{-1}) presente en la superficie o la parte interna de productos alimenticios, recomendada por la Comisión del *Codex Alimentarius*, para que se permita legalmente su uso para consumo humano y animal. Legalmente, los LMRs representan la concentración máxima aceptable para residuos de pesticidas que cumplen con las BPA y que aseguran la mínima exposición posible al consumidor (27). El valor propuesto se define de forma que el residuo de producto que queda luego de una aplicación realizada empleando la cantidad de principio activo necesario para la protección del cultivo, sea menor que la concentración expresada en mg kg^{-1} que es significativa desde un punto de vista toxicológico. Actualmente los residuos de pesticidas se encuentran regulados por diferentes organismos en todo el mundo. La UE, a través de la Directiva 1107/2009/CE ha armonizado los LMR para todos los alimentos destinados al consumo animal o humano (34). Esta regulación además de reunir y armonizar los límites que se aplican a los diferentes productos, para consumo humano y animal, también establece, un límite máximo de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ aplicable por defecto para aquellos productos y/o pesticidas en los que no se ha establecido un LMR. El *Codex Alimentarius* también establece LMRs, que se aplican principalmente a productos que circulan en el comercio internacional. Estos se obtienen basándose en estimaciones hechas por la JMPR, después de: a) la evaluación toxicológica del pesticida y su residuo; y b) el examen de datos de residuos obtenidos en ensayos y usos supervisados, en particular usos que se ajustan a las BPA nacionales. En el examen se incluyen datos de ensayos supervisados realizados a la concentración de uso más elevada recomendada, autorizada o registrada en el país. Para tener en cuenta las variaciones introducidas en los requisitos nacionales de control de plagas, en los LMR del *Codex Alimentarius* se consideran los niveles más elevados observados en tales ensayos supervisados, que se estima representan las prácticas efectivas de control de plagas (48) (49). El examen de las diversas estimaciones y determinaciones, tanto a nivel nacional como internacional, de las ingestas de residuos a través de la alimentación, teniendo en cuenta la Ingesta Diaria Admitida (IDA), debería indicar que los alimentos que se ajustan a los LMR del *Codex* son inocuos para el consumo humano. Nuestro país según el decreto

285/009 adopta los LMR del *Codex*. Aunque al momento de la exportación debe seguir las legislaciones correspondientes al país de destino (50).

1.4.5 Análisis de residuos de pesticidas

Los pesticidas pueden encontrarse en los alimentos y en el ambiente en el orden de los ng o $\mu\text{g kg}^{-1}$, e incluso a concentraciones inferiores. La detección de esos niveles en presencia de grandes concentraciones de otros compuestos químicos que se encuentran naturalmente en las diferentes matrices es un desafío, debido a que éstos compuestos pueden interferir en el análisis. Por esto, para lograr la determinación de los residuos de pesticidas a tales niveles, la metodología analítica debe incluir las siguientes etapas:

- ✓ Preparación de la muestra: cada muestra requiere de un tratamiento determinado, en el caso de los alimentos es el *Codex Alimentarius* quien establece que partes de cada alimento se debe analizar (27).
- ✓ Extracción: consiste en la extracción de él o los pesticidas de los componentes mayoritarios de la matriz, llamado marco. Se obtiene una solución que contiene los analitos de interés más los compuestos co-extraídos en esas condiciones.
- ✓ *Clean-up*: consiste en la eliminación de los co-extractivos de la matriz que puedan interferir con el análisis del residuo de pesticida de interés.
- ✓ Análisis instrumental: la identificación, confirmación y cuantificación mediante una técnica adecuada

1.4.6 Análisis de residuos de pesticidas en alimentos

El análisis de residuos de pesticidas en alimentos es sumamente importante no solo para proteger la salud del ser humano sino también para el comercio internacional y los controles regulatorios. El gran número de posibles residuos de pesticidas, hace necesario el desarrollo de métodos multiresiduo (MRMs) que permitan a los laboratorios realizar un control efectivo. Hasta hace unos años un método multiresiduo implicaba el análisis de 10-15 pesticidas simultáneamente, pero debido al aumento del comercio de alimentos a nivel internacional, entre países que poseen diferentes regulaciones es crucial la expansión de estos MRMs a un mayor número de pesticidas. Actualmente existen MRMs altamente sensibles que incluyen el análisis de 100 o más pesticidas con límites de detección tales que aseguran el control de los LMRs (51).

Tratamiento de muestra

La extracción de los pesticidas de los alimentos depende de la polaridad y del tipo de matriz. En general consiste en la homogeneización de la muestra con un solvente orgánico

o mezclas de solventes con agua, con o sin ajuste de pH (52). Luego de la extracción por un método adecuado, en general se realiza un procedimiento de *clean-up* con el fin de eliminar compuestos que contiene la matriz y que pueden ser co-extraídos constituyendo una interferencia en el análisis cromatográfico, causando problemas durante la detección, identificación y cuantificación de los analitos (53).

1.4.7 Metodologías multiresiduo de análisis

De acuerdo a las tendencias actuales para la determinación de residuos de pesticidas en alimentos, los nuevos métodos analíticos deben combinar precisión, rapidez y sensibilidad, con tratamientos de muestra dinámicos y fundamentalmente miniaturizados. Las técnicas modernas intentan evitar protocolos de extracción y *clean-up* tediosos, largos y costosos. En general, los inconvenientes encontrados en los procedimientos clásicos se relacionan con el uso de extracciones líquido-líquido o sólido-líquido, las cuales utilizan grandes cantidades de solventes orgánicos peligrosos. Las técnicas modernas se basan en la miniaturización, así como en la rapidez y menor costo de los tratamientos de muestra. Esto ha promovido metodologías basadas en el uso de nuevos sorbentes o sorbentes adaptados, métodos integrados, métodos automatizados y no automatizados, los cuales pueden ser llevados a cabo sin la necesidad de equipamientos específicos (54).

✓ Extracción en Fase Sólida Dispersiva (dSPE)

Actualmente es una de las metodologías más utilizadas. Consiste en la extracción de una cierta cantidad de muestra con un solvente apropiado. El *clean-up* de una alícuota del extracto se realiza por medio de la dispersión del extracto con uno o más adsorbentes. Existen numerosas referencias en la literatura que reportan el uso de la técnica dSPE en distintas matrices, especialmente relacionadas con el método de QuEChERS y sus modificaciones (55) (56) (57).

QuEChERS

El método QuEChERS (del inglés Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro), fue desarrollado en el año 2003 y es una alternativa muy empleada en la actualidad para el análisis multiresiduo de pesticidas en frutas y hortalizas por su alta eficiencia, bajo costo, sencillez y mínimo número de pasos (58) (55) (59). Se basa en la extracción de una muestra sólida con ACN (soluble y miscible en agua) con una etapa posterior de salting-out, seguido por un *clean-up* dispersivo en fase sólida para remover las posibles interferencias de la matriz. El conjunto de sorbentes usados depende de la naturaleza de la

matriz y de los requerimientos de remoción de interferentes, constituyentes de cada matriz. Es fácilmente adaptable a distintos tipos de matrices, los pesticidas a analizar y el equipamiento del laboratorio. En los últimos años se han desarrollado varias modificaciones al método original, intentando mejorar las recuperaciones en matrices complicadas y de pesticidas problemáticos (60). Dichas modificaciones consisten en el uso de sales que actúan como buffer durante la extracción para, de esta forma, mantener el pH en un valor adecuado favoreciendo la recuperación de este tipo de pesticidas. Así se desarrollaron dos variaciones de esta metodología que actualmente son muy utilizadas: QuEChERS acetato (61) y QuEChERS citrato (56). Esto hace que la metodología QuEChERS sea muy versátil ya que permite trabajar a diferentes pH y realizar *clean-up* selectivos, en función del tipo de matriz y pesticidas a analizar, extendiendo de este modo el número de pesticidas a ser analizados. A partir de un esquema “*template*” original es posible agregar resinas poliméricas para absorber compuestos con propiedades fisicoquímicas específicas como ser lípidos (RP sil C₁₈), ácido base (resinas de intercambio de aniones o protones) o pigmentos (carbón grafitado). Dependiendo de la matriz en estudio y del grupo de pesticidas a analizar, diferentes variables pueden ajustarse, incluso el solvente de extracción, particularmente una variación muy utilizada es con acetato de etilo (60)(62).

QuEChERS citrato

Anastassiades et al., buscaron una alternativa al método QuEChERS acetato con el fin de evitar el problema asociado al *clean-up*. El uso de una mezcla de citrato disódico y trisódico en la etapa de salting-out mostró muy buenos resultados excepto para matrices que presentan pH < 3 y que requieren el agregado de hidróxido de sodio (NaOH) para ajustar el pH (59).

El método original se desarrolló para matrices con alto contenido en agua (~80%). Por lo que matrices de bajo contenido en humedad, previo a la extracción con solventes, requieren la adición de agua. El agua le provee la humedad necesaria para mejorar la accesibilidad del solvente en la matriz. Para el análisis de pesticidas en cereales mediante QuEChERS, se ha reportado el uso de diferentes cantidades de agua (56) (57) (61).

✓ MSPD (Dispersión de matriz en fase sólida)

Otra metodología muy versátil es la MSPD (dispersión de matriz en fase sólida), ampliamente utilizada para la determinación de trazas de pesticidas de diferentes familias químicas, con propiedades fisicoquímicas distintas y en matrices complejas. El mismo se basa en la maceración mecánica de la muestra junto con un material sorbente adecuado en

mortero. La homogenización de la muestra, extracción y *clean-up* pueden llevarse a cabo en simultáneo, utilizando cantidades de muestra relativamente pequeñas, con bajo consumo de solventes y mínima cantidad de fase sorbente. Así mismo la naturaleza de los analitos en estudio determina la naturaleza del sorbente a utilizar así como la del solvente de elución. Luego del mezclado, el sorbente es empacado en una columna y los analitos (o los interferentes dependiendo del diseño) son eluidos utilizando solventes compatibles. La selección de las condiciones experimentales es crítica para la extracción selectiva y la purificación de los extractos de la muestra. También pueden utilizarse técnicas de SPE (Extracción en Fase Solida) para la purificación de las muestras problema (63). Una de las grandes ventajas de la MSPD es que se trata de una metodología de tipo cromatográfica, con la cuál luego de optimizadas las condiciones de extracción, se puede lograr la separación y remoción de una gran cantidad de co-extractivos que pueden producir interferencias al momento del análisis instrumental.

1.4.8 Técnicas Instrumentales de Análisis

Desde 1970 hasta la década del 90 la mayoría de los métodos de rutina para el análisis de pesticidas en muestras de origen ambiental o alimentario se basaron principalmente en la cromatografía gaseosa (GC) con diferentes detectores tales como detector de Captura de Electrones (ECD), detector de Nitrógeno y Fósforo (NPD), detector Fotométrico de Llama (FPD). Estos son detectores selectivos, pero no otorgan información acerca de la estructura de los compuestos, por lo que no son los de elección en la actualidad para el desarrollo en un método multiresiduo.

La introducción del detector de masas (MS) permitió la identificación y confirmación simultánea de compuestos con una adecuada sensibilidad. Este detector puede ser acoplado tanto a un cromatógrafo de gases (GC-MS) como a un cromatógrafo de líquidos (LC-MS), permitiendo la separación e identificación de mezclas complejas en un solo análisis (38) (64).

1.4.8.1 Espectrometría de masas

Un espectrómetro de masas consta básicamente de una fuente de ionización que produce iones, un analizador que los clasifica por su masa y un detector que mide la intensidad relativa de las diferentes masas. El principio de todos los espectrómetros de masas es que el comportamiento de una corriente de iones en fase gaseosa, a través de un campo electromagnético es dependiente de la relación masa-carga (m/z) de los iones y dicha

relación es usada por el analizador para distinguir unos de otros, consiguiendo así su separación.

Los modos de operación del espectrómetro de masas son:

- ✓ “*Full scan*”: el detector “barre” en un rango de masas previamente definido, típicamente de 50 a 600 uma. Esto insume un tiempo (*dwell time*) para cubrir ese rango de masas, del orden de milisegundos. En ese tiempo, el detector puede perder cuantitativamente a todos los iones que llegan a él.
- ✓ SIM (*Single Ion Monitoring*): A diferencia de otros procedimientos de adquisición, como el *full scan*, donde el equipo barre todo el rango de masa seleccionado, en el análisis por SIM son monitoreados toda la corrida sólo los valores de m/z seleccionados. De esta forma la sensibilidad es hasta 50 veces mayor que en modo *full scan*, permitiendo el análisis cuantitativo de los compuestos de interés, incluso a nivel de trazas, mediante GC-MS o LC-MS.

1.4.8.2 Cromatografía gaseosa con detector de masas (GC-MS)

La cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas es una de las principales herramientas utilizadas en el análisis de residuos de pesticidas ya que permite la separación, identificación y confirmación de un gran número de compuestos simultáneamente en un único análisis. Las ventajas más importantes de los métodos basados en GC-MS son:

- ✓ Alta sensibilidad y eficiencia de separación.
- ✓ Gran capacidad de identificación por la abundante información que otorgan los espectros de masas.
- ✓ Posibilidad del uso de bibliotecas comerciales de espectros.

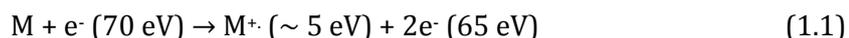
Modos de ionización

En GC-MS la ionización de los compuestos se puede realizar mediante impacto electrónico (EI) o ionización química positiva o negativa (PCI, NCI) (38) (65).

Impacto Electrónico (EI):

Un filamento calentado emite electrones que son acelerados dentro de la cámara de ionización por una diferencia de potencial generalmente de 70 eV. La ionización de la muestra se produce por la remoción de un electrón de la molécula generando un ión cargado positivamente con un electrón desapareado. Moléculas neutras, en fase gaseosa, a una presión de 10 E^{-5} torr, son bombardeadas por electrones, con una energía típica de 70

eV. Ocurre principalmente el desplazamiento o captura de un electrón formando iones M^+ (66). La alta energía de los electrones produce la formación del ión molecular y posteriormente la fragmentación de las moléculas de manera específica en iones cargados, llamados iones fragmento. Dicha fragmentación es única para cada molécula. El patrón de fragmentación que ocurre a través de mecanismos predecibles es una huella digital que permite la identificación inequívoca de cada compuesto (67). En general los iones positivos son predominantes (~100 veces más). Los M^+ se vuelven importantes para moléculas con alta energía de activación.



A partir de los años 50 se han registrado los espectros de muchos compuestos orgánicos conocidos empleando el impacto electrónico como modo de ionización. En general los espectros son reproducibles, pudiéndose construir bibliotecas de espectros de EI a 70 eV, lo que constituye una ventaja al momento de la identificación y confirmación de un analito (66). Se aplica a moléculas de media y baja polaridad y bajo PM (~500 uma), volátiles y termo-estables.

Analizadores

Una vez formados los iones en la fuente de ionización, son separados de acuerdo a su relación masa/carga (m/z) en un analizador de masa. Existen seis clases de analizadores disponibles: sector magnético, tiempo de vuelo, analizador con transformada de Fourier, Orbitrap™, trampa de iones y cuadrupolo, siendo estos 2 últimos los más empleados para el análisis de pesticidas, mediante GC (65).

Cuadrupolo:

Se trata de un filtro de masas que consiste en cuatro barras paralelas. Las opuestas tienen la misma polaridad mientras que las barras adyacentes tienen polaridad opuesta. A cada barra se le aplica un voltaje continuo y uno de radiofrecuencia generando una diferencia de potencial que permite la “filtración” de los iones de m/z seleccionada. Modificando los campos eléctricos, las masas de todos los iones pueden ser “escaneadas” secuencialmente, para generar un espectro de masas. En modo SIM, la selectividad viene dada porque sólo los iones de masa seleccionadas, conforme a las condiciones de operación del método analítico, van a atravesar el analizador para llegar al detector. En la **Figura 16** se muestra una representación esquemática de un analizador de cuadrupolo (65). El uso de este analizador está muy extendido debido a su relativa sencillez y relativo bajo costo. El cuadrupolo no es muy sensible en modo *full scan*, por lo que para el análisis de residuos de pesticidas se suele utilizar en modo SIM. Este modo presenta una mayor sensibilidad, pero

requiere el conocimiento previo de los compuestos que se van a analizar, ya que sólo se utilizan los iones seleccionados y no el barrido completo de iones de la muestra.

Esta técnica instrumental ha sido reportada para el análisis de compuestos no polares, volátiles y semi-volátiles. Por ejemplo los piretroides pueden ser analizados solamente por EI a 70 eV. Sin embargo, compuestos polares, no volátiles e inestables térmicamente, como las fenilureas, carbamatos, compuestos pirimidínicos, triazoles, y muchos productos de transformación no pueden ser analizados mediante esta técnica, por lo que la técnica de elección es LC (52).

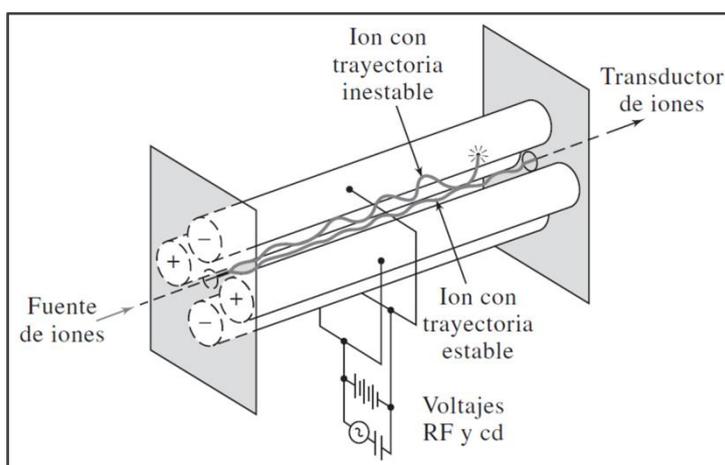


Figura 16 Esquema de analizador de tipo cuadrupolar (Figura adaptada de Skoog, 2008) (68)

1.4.8.3 Cromatografía líquida con detector de masas (LC-MS/MS)

Diez años atrás la técnica de cromatografía de líquidos era poco utilizada para el análisis de residuos de pesticidas. Sin embargo, los fabricantes de agroquímicos fueron desarrollando compuestos cada vez más polares, de menor volatilidad y más termolábiles, los que no pueden ser analizados por GC, impulsando un aumento en el número de métodos analíticos de residuos de pesticidas empleando cromatografía líquida primero con detector UV, posteriormente con detector de arreglo de diodos (LC-DAD) y en los últimos años con la incorporación de instrumentos de LC-MS y LC-MS/MS que proveen una gran sensibilidad y eficiencia (69) (70).

El uso de LC-MS/MS ha crecido enormemente en los últimos años, principalmente debido a la alta sensibilidad, que permite alcanzar niveles de detección muy bajos y a la elevada capacidad para la identificación y confirmación de los analitos. Estas capacidades han permitido el desarrollo de métodos sensibles capaces de identificar contaminantes a niveles trazas en muestras ambientales y alimentos (71) (72).

Sistemas de ionización

Después de la introducción de la muestra desde el sistema LC, ésta es ionizada en la fuente de ionización. Existen diferentes tipos de fuentes de ionización; termospray, particle beam, foto-ionización a presión atmosférica (APPI) e ionización a presión atmosférica (API), siendo esta última una de las más utilizadas (65) (73).

Ionización a Presión Atmosférica (API)

Es un proceso de ionización suave, a presión atmosférica (P. atm.) con una alta eficiencia, en comparación con otras formas de ionización convencionales. Incluye un grupo de interfases llamadas Electrospray (ESI) e Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI) (73).

Electrospray (ESI)

En modo positivo, el efluente del LC es bombeado a través de una aguja nebulizadora que se encuentra a un potencial bajo y éste pasa a través de un electrodo semicilíndrico que se encuentra a un alto potencial. La diferencia de potencial producida entre la aguja y el electrodo genera un campo eléctrico que carga la superficie del líquido y forma gotas cargadas. Éstas son conducidas a través de un capilar que por medio de un gas a alta temperatura (N_2) elimina el solvente no cargado. A medida que las microgotas atraviesan el capilar las cargas positivas migran hacia la superficie de la microgota mientras que las cargas negativas permanecen en el centro de esta. Paralelamente el solvente continúa evaporándose hasta que el tamaño de la microgota es tal que se rompe. En este momento el campo eléctrico generado logra ionizar el analito eliminando el resto del solvente, generando así iones cargados (sin solvente). Una vez obtenidos los iones, se introducen formando un ángulo de 90° con el analizador, separándolos así de las moléculas neutras (**Figura 17**). Dadas las características de ESI su aplicación, es indicada principalmente para el análisis de compuestos polares (65) (73).

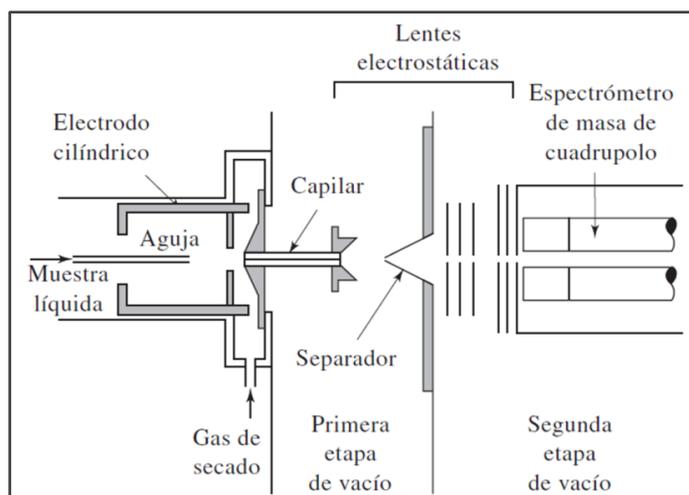


Figura 17 Esquema de sistema que utiliza ionización ESI (Figura adaptada de Skoog, 2008) (68)

Analizadores

Desde la fuente de ionización utilizada, los iones son transferidos al espectrómetro de masas, donde son separados según su relación m/z . El analizador opera en condiciones de vacío que aseguran el desplazamiento de los iones con la máxima eficacia. Los diferentes tipos de analizadores incorporados en los sistemas LC-MS/MS son el triple cuadrupolo y el tiempo de vuelo y los sistemas híbridos: cuadrupolo acoplado a trampa de iones lineal y cuadrupolo acoplado a tiempo de vuelo. El sistema utilizado en esta tesis se describe a continuación.

✓ **Sistemas híbridos: Q-TRAP LC-MS/MS**

Los sistemas híbridos combinan analizadores de diferente configuración, obteniendo considerables mejoras en cuanto a la información estructural que brindan y mejorando la sensibilidad que permite una mejor cuantificación.

El sistema Q-TRAP LC-MS/MS combina la tecnología de los triple cuadrupolo con la trampa lineal de iones. La especificidad y cuantificación de los triples cuadrupolos combinada con la sensibilidad del "full scan" en MS/MS que aporta la trampa lineal de iones permite alcanzar niveles de detección acordes a los exigidos a nivel mundial. El instrumento está basado en un QqQ en el cual Q3 puede actuar como un cuadrupolo normal o en modo LIT (Trampa Lineal de Iones). El modo de funcionamiento consiste en que una vez generados los iones en la fuente de ionización, estos son guiados y enfocados hacia Q1, el cual actúa como filtro de masas (selecciona los iones precursores con una determinada m/z). Estos iones, son después enviados hacia Q2 donde se promueve la activación de colisiones favoreciéndose la fragmentación de los iones precursores

previamente seleccionados. Según el modo de uso los iones fragmento pueden ser direccionados hasta Q3, que actúa como filtro para “escanear” las masas de los iones fragmentos producidos (iones producto), en la celda de colisión cuando el sistema actúa en modo QqQ o en modo LIT los fragmentos pueden permanecer atrapados en el Q3 en donde se aplica una rampa de potencial que dirige a los iones hacia el detector en el modo LIT (74). La combinación de estos modos de trabajo en un único análisis es posible gracias al uso del modo IDA (*Information-Dependent-Acquisition*) provisto por el software del sistema, el cual permite, mediante diferentes modos de operación, la obtención de abundante información estructural de forma rápida y sencilla. El modo EPI (del inglés *Enhanced Product Ion*), es uno de los más utilizados. La **Figura 18** muestra un esquema general de las distintas partes del sistema.

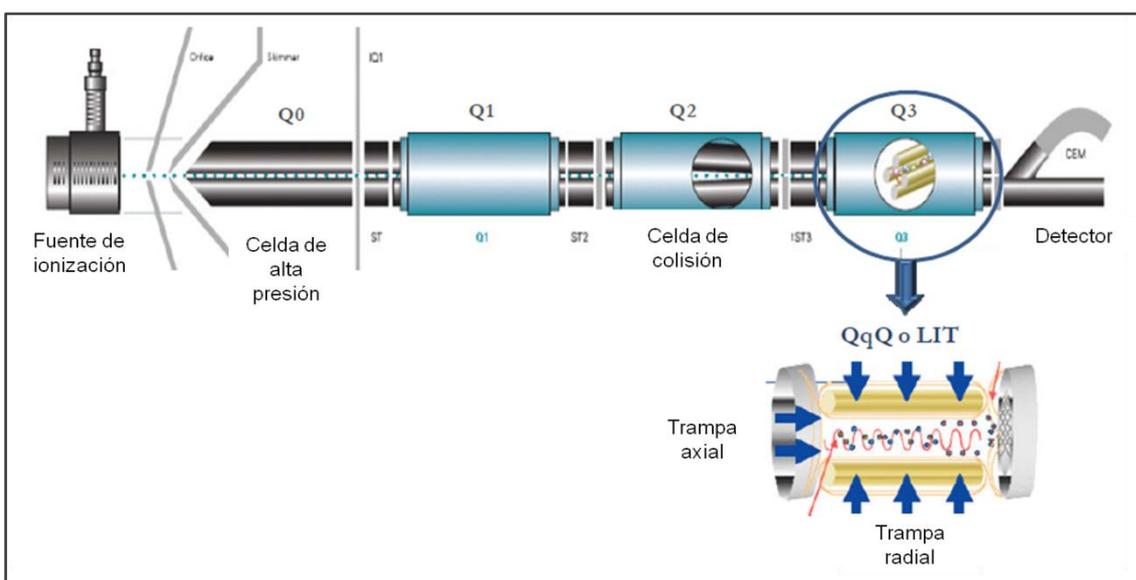


Figura 18 Esquema general de un sistema QTRAP LC-MS/MS (Figura adaptada <http://notijenck.com.ar/?p=3038>) (75)

1.4.8.4 Criterios para la identificación y confirmación de residuos de pesticidas según DG SANCO No. SANCO/12571/2013

Requisitos en cromatografía

El tiempo de retención del analito en la muestra debe coincidir con el del estándar en la curva de calibración, ya sea en solvente o en matriz (en LC la tolerancia es de 2,5%, en GC la tolerancia es de 0,5%).

Requisitos en espectrometría de masas

La identificación depende de la selección de iones diagnóstico adecuados. Siempre que sea posible debe seleccionarse el ión molecular para realizar la identificación y confirmación del analito de interés. En general los iones m/z mayores que 100 presentan mayor seguridad como iones diagnóstico. También los iones isotópicos, especialmente los de Cl o Br son particularmente útiles a la hora de la confirmación. Los picos observados en los cromatogramas generados para cada analito deben presentar S/N mayor que 3, con tiempos de retención, forma de pico, y relación de las abundancias de iones que coincidan con el estándar utilizado para la calibración. El ion que presente la mayor intensidad debe ser utilizado para la cuantificación. Además como la selectividad depende del detector, se deben seguir criterios de identificación determinados establecidos según el tipo de detector. En este trabajo se utilizó GC-MS y LC/MS/MS por lo que los criterios de identificación para estos sistemas se indican en la **Tabla 7**.

Tabla 7 Requisitos para la identificación de los compuestos según el sistema de detección de MS.

Modo de MS	Detector de MS simple de resolución estándar	Detector de MS/MS
Sistema típico	Cuadrupolo, trampa de iones	Triple cuadrupolo, trampa de iones, sistemas híbridos (Q-TOF y QTRAP)
Requisito para la identificación	≥ 3 iones diagnóstico (preferiblemente el ión molecular)	≥ 2 iones fragmento

Otro criterio que se debe cumplir para la identificación es la relación de iones o de iones fragmento. La intensidad relativa de los iones detectados, expresada en % de intensidad del ión o fragmento más abundante, se debe corresponder con la del estándar en las mismas condiciones de concentración y medida. Las tolerancias se expresan en la **Tabla 8**.

Tabla 8 Tolerancias admitidas para GC-MS y LC-MS/MS.

Intensidad relativa	GC-MS (IE)	LC-MS/MS
>50%	$\pm 10\%$	$\pm 30\%$
>20% a 50%	$\pm 15\%$	$\pm 30\%$
>10% a 20%	$\pm 20\%$	$\pm 30\%$
$\leq 10\%$	$\pm 50\%$	$\pm 30\%$

Todos estos parámetros deben de ser considerados a la hora del análisis de residuos de contaminantes orgánicos.

1.5 Análisis de metales y semimetales

1.5.1 Métodos de preparación de la muestra

La instrumentación para la detección de elementos traza ha evolucionado en forma muy rápida en los últimos años llegándose a detectar a niveles de ultratrazas (partes por billón y partes por trillón), pero de nada sirve tener instrumentos con detectores de última generación si la preparación de las muestras no se realiza correctamente, en forma eficiente, en áreas limpias y tratando de minimizar etapas intermedias de manipulación para disminuir errores.

Para el análisis de elementos traza en alimentos mediante espectrometría atómica (técnica utilizada para determinación de metales y semimetales), generalmente se requiere de un paso previo de preparación de la muestra para que la misma pueda ser introducida en el sistema de atomización en forma líquida. Usualmente se realizan tratamientos (digestiones) vía húmeda, las cuales conllevan largos tiempos de análisis, principalmente cuando se trata de alimentos con altos contenidos de fibra y materia grasa, de forma que se vuelven inviables los análisis de rutina a gran escala. De forma de evitar estos procedimientos largos y tediosos, surge la alternativa de la extracción asistida con ondas de ultrasonido. Esta estrategia se basa en la extracción con ácidos diluidos de los metales a partir de las muestras pulverizadas o en emulsiones con el aporte de energía mediante ultrasonido (76). El tratamiento de muestras alimenticias y ambientales sobre la base de los efectos de la cavitación (fenómeno que ocurre en un medio líquido al aplicar ultrasonido), se ha utilizado para el análisis de contaminantes biológicos y químicos en dichas muestras y ha recibido considerable atención en los últimos años (77) (78).

Extracción asistida con ultrasonido

El uso de ondas de ultrasonido desde su descubrimiento, a principios del siglo XX, se ha utilizado para una gran variedad de propósitos en diversas áreas tales como la síntesis química, la medicina y la ingeniería. La cavitación acústica es el punto clave para los procesos de sonoquímica, y la capacidad de aumentar o reducir este efecto es uno de los principales retos para aplicaciones del uso de las ondas de ultrasonido en química (79).

Las ondas de ultrasonido son ondas mecánicas que se propagan en medios materiales en ciclos consecutivos de compresión y rarefacción a frecuencias mayores que 16 kHz. Las ondas ultrasónicas de alta frecuencia (> 2 MHz) son comúnmente empleadas en medicina para la obtención de imágenes. En contraposición, las ondas ultrasónicas de baja frecuencia presentan mayor potencia y pueden alterar los medios expuestos a la

irradiación. Los sistemas generadores de ultrasonido de mayor potencia son aquellos que trabajan con frecuencias entre 20 y 100 kHz y pueden producir agitación, cavitación en el medio líquido (generación de microflujos y microjets) y calentamiento. Además, la erosión de sólidos así como la pérdida de estabilidad en las interfaces líquido-vapor, líquido-líquido y líquido-sólido, son relacionadas a la acción de ultrasonido de alta potencia (80).

Las ondas ultrasónicas son generadas por transductores piezoeléctricos o magnetoestrictivos. Estos transductores, al ser sometidos a un campo eléctrico sufren deformaciones electroelastomecánicas, resultando en la producción de ultrasonido. Varios materiales como ser la turmalina, el cuarzo y el topacio presentan propiedades piezoeléctricas. El titanato de bario (BaTiO_3) es una cerámica sintética muy empleada también como transductor. En general, en los dispositivos de ondas ultrasónicas, el transductor es posicionado entre dos chapas metálicas (armadura) para la amplificación de las señales y la frecuencia de la onda acústica generada puede ser calculada por el inverso del espesor del elemento transductor. Por lo tanto, siendo constante el espesor del elemento piezoeléctrico, la frecuencia de resonancia de las ondas ultrasónicas será siempre la misma. Además de la frecuencia, la intensidad de energía acústica es otra característica importante del ultrasonido, siendo la intensidad proporcional al cuadrado de la amplitud de vibración. (81)

El baño de ultrasonido es muy utilizado para la limpieza de material quirúrgico y odontológico, así como para la limpieza de material de vidrio de laboratorio. En estos equipos, el transductor es en general fijado al fondo del tanque metálico, de forma de evitar el contacto de este con el líquido insertado en el baño y de esta forma evitar la erosión del mismo. Los baños de baja intensidad equipados con modernos transductores piezoeléctricos tienen, en general, intensidades entre 1 y 2 Wcm^{-2} .

La cavitación es un fenómeno que ocurre cuando, en ciertas condiciones, líquidos son expuestos a ondas ultrasónicas. Este fenómeno es debido al “estrés” inducido en el líquido al pasar una onda acústica de alta potencia, la cual lleva a la producción de microburbujas en el seno del mismo. Las dimensiones de las burbujas aumentan y disminuyen en las consecutivas fases de rarefacción y compresión de la onda acústica que se propaga a través del medio líquido. Sin embargo, para que las burbujas sean consideradas como de cavitación, deben colapsar (implosionar) para llegar a una dimensión dada (diámetro crítico) en un cierto ciclo de compresión de la onda acústica que se propaga a una frecuencia dada (82).

Una vez formadas las microburbujas durante un ciclo de rarefacción, estas se encuentran vacías, produciéndose un flujo de materia (moléculas gaseosas presentes en el medio) hacia el interior de las mismas. Un ciclo de rarefacción será siempre sucedido por uno de

compresión, resultando en la inversión del sentido del flujo de materia en cada nuevo ciclo. En la fase de compresión una fracción de las moléculas gaseosas migrará de la burbuja al medio líquido, resultando en la disminución de las dimensiones de la misma. La inversión del flujo ocurrirá a una frecuencia dos veces mayor que la frecuencia de onda generada por el transductor.

La cavitación es responsable de muchas de las características de interés del ultrasonido para la Química. El colapso de una burbuja de cavitación ocurre en la fase de compresión luego de que la misma alcanzó el diámetro crítico en la fase de rarefacción precedente. La cavitación depende de la tensión superficial, la temperatura y los gases disueltos en el medio líquido, así como de la frecuencia y amplitud de la onda acústica que se propaga. La implosión eleva, puntualmente, la temperatura y la presión a valores extremos. El colapso de las microburbujas formadas resulta en la producción de temperaturas instantáneas de aproximadamente 5200 K en la fase gaseosa y 1900 K en la interface con el medio líquido, con una tasa de calentamiento enfriamiento de aproximadamente 10^{10} Ks⁻¹ y presiones instantáneas localizadas en la interface entre la burbuja y el solvente de hasta 1000 atm al momento del colapso. De esta forma, cada burbuja se comporta como un micro-reactor, generando microjets de hasta 400 ms⁻¹ y el rompimiento de enlaces químicos (83).

La irradiación con ultrasonido de sistemas heterogéneos (sólido-líquido) resulta en la formación de burbujas de cavitación en las proximidades del sólido pudiendo ocurrir: la degradación del material por acción de microjets, aumento de la actividad química a partir de especies presentes en el solvente por generación de radicales libres, disminución del gradiente de concentración en las proximidades del material sólido por la producción de microflujos de materia en el medio irradiado y hasta incluso la fusión del sólido debido a las temperaturas extremas alcanzadas (80).

Es importante destacar la transmisión indirecta de energía en los baños ultrasónicos, ya que la misma tiene que atravesar el recipiente de reacción y parte de esta es absorbida y/o reflejada en este proceso. Por eso se debe tener en cuenta las características de los recipientes, como ser la geometría, el espesor de las paredes y el coeficiente de atenuación del material. Por otra parte, la transmisión indirecta de energía, disminuye el riesgo de contaminación, ya que la muestra nunca está en contacto directo con el líquido del baño ni con piezas metálicas (80).

El otro dispositivo comúnmente utilizado para la extracción es la sonda de ultrasonido. En estos dispositivos el transductor es acoplado a una sonda de titanio, la cual se coloca directamente en el seno de la suspensión que contiene la muestra. Generalmente, la sonda ultrasónica proporciona al medio de extracción intensidades de ultrasonido mucho mayores que las observadas en baños (1 - 5 Wcm⁻² en baños versus 50 - 500 Wcm⁻² con

sondas). Las sondas ultrasónicas utilizadas en química analítica son operadas típicamente a 20 kHz y, generalmente, con intensidades entre 50 y 200 Wcm⁻². Al ser esas intensidades de potencia disipadas directamente sobre la suspensión, aumenta la eficiencia para reducir el tamaño de partícula, se reduce el tiempo de extracción y la eficiencia de la extracción mejora (84). Sin embargo, la inserción de la sonda directamente sobre la suspensión, puede aumentar el riesgo de contaminación de la muestra. La **Tabla 9** muestra las principales características entre baños y sondas y los valores medios frecuentemente reportados para equipamiento de uso en laboratorios.

Tabla 9 Características de los procesadores ultrasónicos (baño y sonda) disponibles para laboratorios.

Parámetro	Baño	Sonda
Intensidad (Wcm ⁻²)	1 – 5	50 – 200
Intensidad variable	Si	Si
Aplicación directa sobre la muestra	No	Si
Costo	< US\$ 1000	US\$ 2000 – 4500
Mezcla de ácidos para extracción	HNO ₃ /HCl (< 3 M)	HNO ₃ /HCl (< 3 M)
Frecuencia analítica	1 – 6 muestras/ 20 min	1 muestra/ 5 min

Extracción asistida con microondas

Los primeros experimentos que utilizaron radiación de microondas para descomposición de muestras fueron realizados en 1975, empleando hornos de microondas domésticos para la descomposición de tejidos vegetales y animales en recipientes abiertos. A mediados de los 90, el número de aplicaciones de aplicaciones que involucraban el uso de hornos microondas para la preparación de muestras creció de forma exponencial. Actualmente existen hornos de microondas analíticos y las descomposiciones y tratamientos de muestras en dichos equipos son muy utilizados. Los fundamentos teóricos que rigen la interacción de la radiación de microondas con la muestra y con los reactivos utilizados para la descomposición son, básicamente, aquellos que, en forma general, regulan la interacción entre materia y energía (80).

Las microondas son radiaciones electromagnéticas, y como tales, son portadoras de energía. Cubren la franja de frecuencias del espectro electromagnético que van desde 300 a 300000 MHz. Los hornos de microondas comerciales, emplean microondas en la frecuencia de 2450 MHz y la potencia generada es normalmente superior a 600 W.

Cuando un material no transparente a las microondas absorbe este tipo de radiación, puede sufrir un aumento considerable en su temperatura debido, principalmente, a la interacción de la radiación electromagnética con los iones disueltos y con el solvente, provocando los fenómenos de migración iónica y rotación de dipolos respectivamente.

La ocurrencia de estos dos procesos resulta de un movimiento molecular en el material, que también contribuye al calentamiento del mismo. Estos procesos ocurren cuando la radiación de microondas interacciona con la disolución de un ácido (o mezcla de ellos) utilizada para la descomposición de la muestra en estudio (80).

La energía de las microondas no es suficiente para romper enlaces químicos, pero sí para aumentar la temperatura del medio de modo directo debido a que el material absorbe la energía correspondiente a la radiación electromagnética, contrariamente a lo que ocurre por ejemplo en las digestiones en plancha calefactora donde el aumento de la temperatura se da por conducción. La radiación de microondas es no ionizante, con energía mucho menor que la necesaria para romper enlaces de las moléculas orgánicas comunes. Esto no significa que no ocurran otros efectos o interacciones importantes de este tipo de radiación electromagnética con la materia.

La migración iónica consiste en el movimiento electroforético de los iones disueltos en solución. El movimiento de los iones es causado por la interacción entre especies iónicas y el campo eléctrico oscilante de las microondas. Los iones se deslocalizan, produciendo un flujo de corriente cuyo movimiento experimenta resistencia causada por otras especies con flujo opuesto a la deslocalización. Como consecuencia de esto ocurren pérdidas del tipo $R \cdot I^2$ (producción de calor), observándose un aumento en la temperatura del medio. El movimiento de los iones aumenta a medida que la temperatura aumenta, provocando un efecto avalancha.

La rotación de dipolos ocurre cuando la radiación de microondas interactúa con agua: los átomos de oxígeno (más electronegativos) se alinean con el polo positivo del campo eléctrico mientras que los átomos de hidrógeno (menos electronegativos) se alinean con el polo negativo.

Al utilizar una frecuencia de 2450 MHz, el alineamiento de las moléculas y su retorno al estado de desorden ocurre $4,9 \times 10^9$ veces por segundo, lo cual resulta en un aumento de temperatura rápido y eficiente. Dicho aumento depende del tiempo de relajación de las moléculas y de la temperatura y viscosidad de la sustancia.

Cuando se irradia un determinado material con radiación de microondas, existen tres posibilidades de interacción con la onda electromagnética:

- ✓ Reflexión: el material refleja las microondas sin ser afectado por las mismas (por ejemplo los metales).
- ✓ Transparencia: las microondas atraviesan el material sin provocar ningún efecto en el mismo (por ejemplo el PTFE, material del cual están hechos los recipientes de descomposición).
- ✓ Absorción: el material absorbe total o parcialmente la radiación (por ejemplo el agua).

El efecto de absorción es estudiado en las descomposiciones asistidas por microondas. Cuando la energía electromagnética se absorbe y se convierte en energía térmica, se produce un aumento de temperatura en el medio. Debido a que los materiales difieren en su capacidad de conversión de energía electromagnética en calor, es importante conocer el factor de disipación de energía del mismo.

Un horno de microondas analítico consta fundamentalmente de 6 componentes: un magnetrón, una guía de ondas, un distribuidor de ondas (reflector rotatorio), una cavidad, un recipiente de descomposición y un rotor.

La radiación producida por el magnetrón es transportada a través de la guía de ondas hacia la cavidad (horno), donde es dispersada por el distribuidor en direcciones específicas, que permiten una mayor irradiación en la zona próxima al centro de la cavidad. Una bandeja rotatoria permite exponer la muestra a una radiación homogénea y reproducible.

El magnetrón consiste en la combinación de un ánodo, un cátodo y una serie de cavidades de resonancia, todo organizado en una geometría cilíndrica. Entre el ánodo y el cátodo se aplica un potencial constante y se produce un campo magnético axial producido por un imán permanente o un electroimán. La presencia de un fuerte campo magnético provoca que los electrones sigan trayectorias en espiral hacia afuera. La energía de los electrones se convierte en energía de radiofrecuencia en las cavidades de resonancia. Las ondas generadas pasan por la guía de ondas y llegan a la cavidad.

Todos los instrumentos poseen magnetrones que generan microondas con una frecuencia fija de 2450 MHz. La eficiencia de conversión de energía eléctrica consumida es del 60 a 70% para hornos convencionales (entre 600 y 1400 W).

La eficiencia en la producción de microondas, se ve afectada principalmente por el sobrecalentamiento del magnetrón, ya que la energía que no es absorbida puede volver hacia atrás por la guía y provocar sobrecalentamiento del mismo. Para evitar esto, existe un circulador que desvía las ondas reflejadas hacia una cavidad donde la energía es disipada sin provocar daños.

Los recipientes empleados para la descomposición deben ser transparentes a las microondas, de forma que la radiación sea absorbida solamente la disolución del medio de reacción. Los materiales más empleados son PTFE (teflón ®) y PFA (perfluoroalcoxi) entre otros. Dichos recipientes poseen volúmenes internos que varían de 25 a 120 mL y pueden estar equipados con sensores de presión y temperatura individuales o colectivos. Hoy en día existen recipientes de altísima resistencia, que pueden resistir presiones mayores a 150 bar.

Extracción asistida con ozono

El ozono es un gas que se genera de forma natural en la estratosfera por la acción de los rayos ultravioletas que provienen de la luz del sol, también se genera a nivel de la superficie de la tierra por el efecto de las descargas eléctricas atmosféricas.

Ya desde mediados del siglo XVIII se conocían las propiedades del ozono, cuando se confirmó que su molécula se encontraba formada por tres átomos de oxígeno, los cuales convierten a este gas en el oxidante más poderoso que existe en el planeta, después del flúor. Esta característica es de gran utilidad para aplicaciones de desinfección de aguas, ya que permite destruir un amplio espectro de microorganismos patógenos, además de reducir el olor y color del agua contaminada mediante la oxidación de la materia orgánica presente. La principal aplicación del gas ozono es la desinfección del agua, sin embargo, sus excelentes propiedades oxidantes han permitido incursionar en otros campos tales como: la medicina, avicultura, conservación de alimentos, fabricación de dispositivos semiconductores, entre otros.

Los procesos de oxidación que involucran la generación *in situ* de especies químicas oxidantes han sido reportados como métodos eficientes para la degradación de materia orgánica, a temperatura ambiente en ciertas matrices. Estos procesos, comúnmente llamados “procesos avanzados de oxidación” (AOPs), generalmente utilizan la ozonización combinada con radiación UV (85) (86). Varios autores han reportado la utilización de gas ozono (combinado con el uso de ultrasonido y/o radiación UV) en la preparación de muestras de matrices con alto contenido de materia orgánica para la determinación de metales y semimetales (87) (88) (89).

Para la generación de ozono, primero se debe disociar una molécula diatómica de oxígeno. De esta forma, el radical oxígeno generado puede reaccionar con otra molécula diatómica de oxígeno para formar la molécula triatómica de ozono. Sin embargo, para romper un enlace O-O se requiere de una gran cantidad de energía. El método de descarga corona puede ser utilizado con este fin, para inicializar la formación del radical oxígeno y generar así el ozono.

En las fuentes de descarga corona hay dos electrodos, uno de los cuales es de alta tensión y el otro de baja tensión, los cuales se encuentran separados por un medio dieléctrico cerámico y un estrecho espacio de descarga. Cuando los electrones alcanzan la energía cinética suficiente (6 - 7 eV) para disociar la molécula de oxígeno, ocurre una cierta fracción de estas colisiones y una molécula de ozono puede ser formada a partir de cada uno de los átomos de oxígeno.

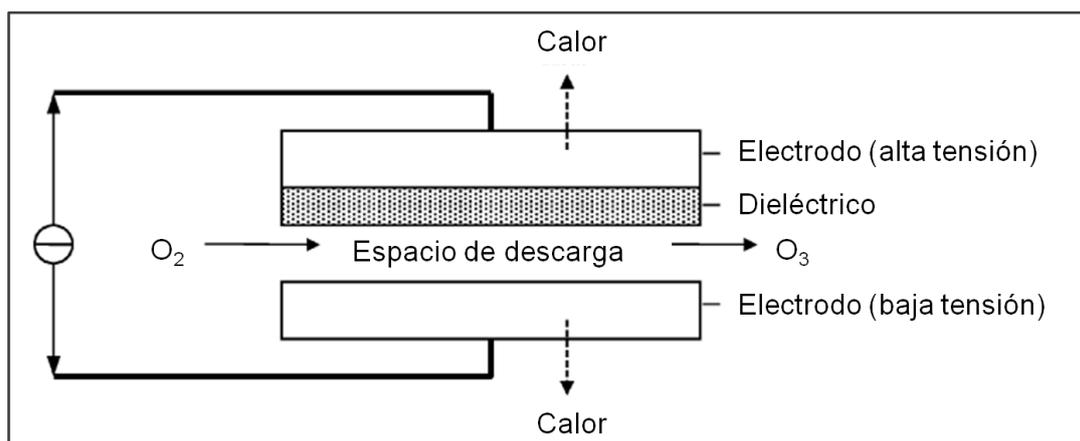


Figura 19 Esquema de sistema ozonizador que funciona con el método de descarga corona (Figura adaptada de Guzel-Seydim et al. 2004) (90)

La eficiencia es muy baja respecto a la generación de ozono. El ozono generado es arrastrado por la corriente de oxígeno, por lo cual se suele hablar de una corriente de oxígeno enriquecida en ozono.

1.5.2 Métodos instrumentales de análisis

1.5.1.1 Espectrometría de Absorción Atómica

Dentro de los métodos espectrométricos de análisis para identificar y cuantificar elementos presentes en distintas matrices, se encuentra la espectrometría óptica atómica. En la espectrometría óptica, los elementos presentes en una muestra se convierten en átomos o iones elementales en estado gaseoso por medio de un proceso denominado atomización. De esta manera se mide la absorción ultravioleta/visible, la emisión o la fluorescencia de las especies atómicas en el vapor (68).

Cuando la radiación atraviesa una capa de un sólido, líquido o gas, es posible eliminar en forma selectiva ciertas frecuencias mediante absorción, un proceso en el cual la energía electromagnética se transfiere a los átomos, iones o moléculas que forman la muestra. La absorción impulsa a estas partículas desde su estado normal a temperatura ambiente, o

estado fundamental, a uno o más estados excitados de energía superior. De acuerdo con la teoría cuántica, los átomos, moléculas e iones tienen sólo una cantidad limitada de niveles energéticos discretos. Para que haya absorción de radiación, la energía del fotón excitador debe corresponder exactamente con la diferencia de energía entre el estado fundamental y uno de los estados excitados de la especie absorbente. Como estas diferencias de energía son únicas para cada especie, el estudio de las frecuencias de radiación absorbida proporciona un medio para caracterizar los constituyentes de una muestra de materia.

En particular, el paso de radiación ultravioleta/visible a través de un medio que consta de partículas monoatómicas, origina la absorción de sólo unas frecuencias muy bien determinadas. La sencillez relativa de dichos espectros se debe a la pequeña cantidad de posibles estados de energía de las partículas absorbentes (68).

Espectrometría de Absorción Atómica de Llama

Un método muy utilizado para lograr la atomización de la muestra incluye la aplicación de una llama. Las llamas son un medio para convertir analitos en átomos libres. Dichos átomos libres son promovidos a estados electrónicos superiores de excitación, ya sea por absorción de energía térmica adicional desde la misma llama, o bien por absorción de energía radiante que proviene de una fuente externa de radiación electromagnética.

En la técnica de espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS), la llama que contiene los átomos libres también funciona como reservorio de átomos libres en estado fundamental, cumpliendo un papel análogo al que cumplen las cubetas en espectrometría de absorción molecular. Los átomos libres absorben la radiación enfocada en la llama desde una fuente externa a la misma, generalmente una lámpara de cátodo hueco o de descarga sin electrodos. La radiación incidente absorbida por los átomos libres al ir de desde el estado fundamental al excitado, da lugar a la señal analítica (68).

Para muestras líquidas o disoluciones de las mismas, se utiliza un sistema de introducción de muestra que consta de tres componentes:

- ✓ Nebulizador: Dispersa el líquido en gotas muy pequeñas, formando un aerosol líquido-gas.
- ✓ Modificador del aerosol: Descarta las gotas más grandes del mismo para permitir que solo pasen las que son menores a cierto tamaño.
- ✓ Llama: Convierte los analitos en átomos libres.

En general los atomizadores son de dos tipos, continuos y discretos. En los primeros, la muestra se introduce en el atomizador a una velocidad constante. La señal espectral, por tanto, es constante en el tiempo. Con los atomizadores discretos en cambio, se introduce una

cantidad de muestra discreta. La señal espectral en este caso no es continua, sino transitoria, alcanzando un valor máximo y luego disminuyendo a cero cuando el vapor atómico abandona la región de observación.

Los atomizadores continuos más comunes son los de llama. La disolución de la muestra se convierte en una niebla de pequeñas gotas finamente divididas, proceso que se denomina nebulización. Esto se realiza frecuentemente en forma neumática. A continuación, el flujo de gas transporta la muestra a una región calentada donde tiene lugar la atomización. La gran variedad de procesos complejos que tienen lugar, hace que la etapa de atomización sea la etapa más crítica en la espectrometría de llama, ya que limita la precisión de los métodos.

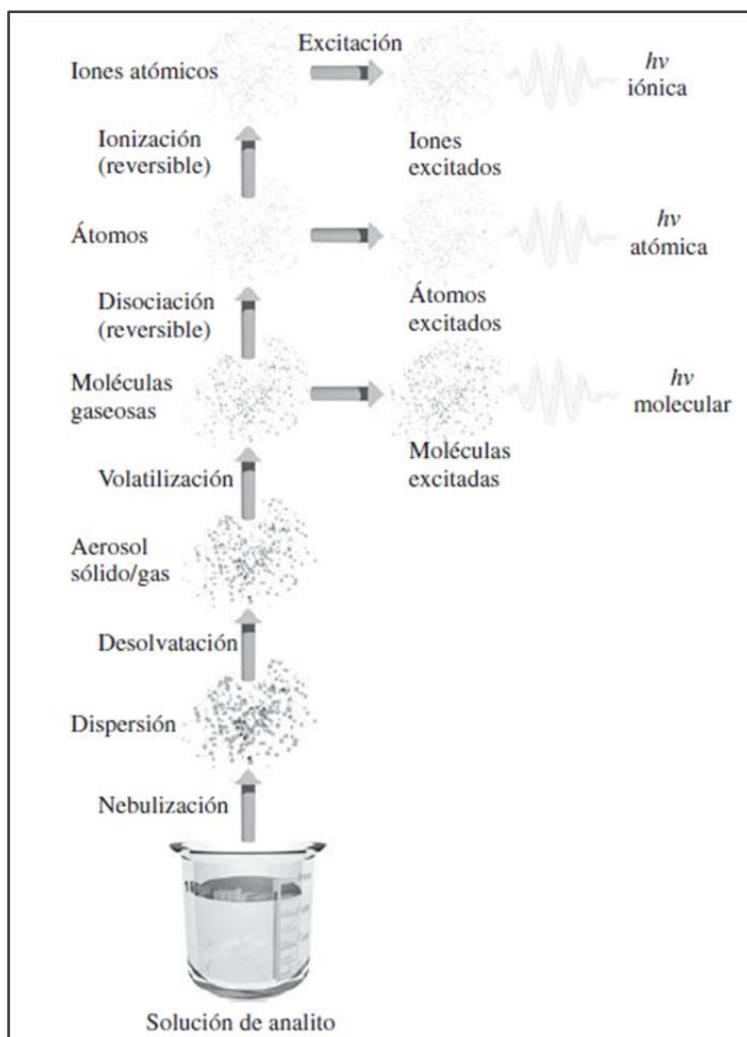


Figura 20 Procesos que ocurren durante la atomización (Figura adaptada de Skoog, 2008) (68)

Como se ilustra en la **Figura 21**, las regiones importantes de una llama incluyen la zona de combustión primaria, la región interzona y la zona de combustión secundaria. La apariencia y tamaño relativo de estas regiones varía en forma considerable con la relación entre combustible y oxidante, así como con la naturaleza de cada uno de ellos. El equilibrio

térmico no se alcanza por lo general en la zona de combustión primaria y, por tanto, rara vez se usa en la espectrometría de llama.

Debido a que en la región interzona predominan átomos libres, es la parte de la llama que más se usa para la espectroscopía. En la zona de reacción secundaria los productos de núcleo interno se convierten en óxidos moleculares estables que son dispersados después hacia los alrededores.

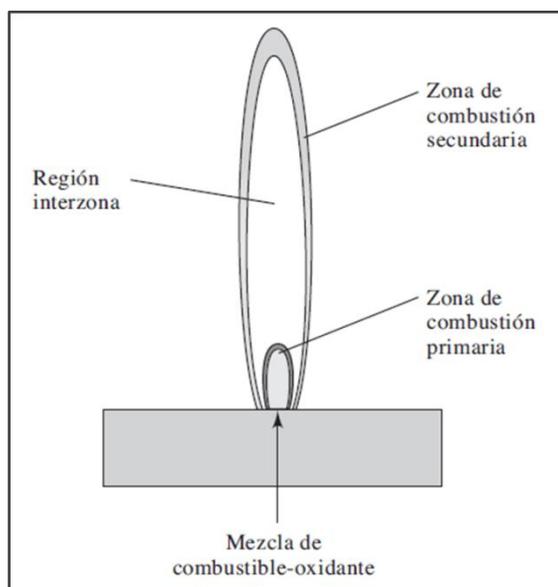


Figura 21 Regiones de una llama (Figura adaptada de Skoog, 2008) (68)

La **Figura 21**, muestra el diagrama de un quemador de flujo laminar comercial típico que utiliza un nebulizador de tubo concéntrico. El aerosol, formado por el flujo de oxidante, se mezcla con combustible y pasa por una serie de deflectores que eliminan todo excepto las gotas de solución más finas. Los deflectores ocasionan que la mayor parte de la muestra se reúna en el fondo de la cámara de mezcla donde se drena hacia un recipiente de desechos. El aerosol, el oxidante y el combustible arden entonces en un quemador ranurado que proporciona una llama de 5 a 10 cm de alto. Estos quemadores producen una llama relativamente estática y una longitud de trayecto larga para llevar al máximo la absorción. Estas propiedades tienden a incrementar la sensibilidad y reproductibilidad en la espectrometría de absorción atómica. La cámara de mezcla en este tipo de quemador contiene una mezcla potencialmente explosiva que puede producir un retroceso de la llama si el flujo es demasiado bajo. Está equipado con respiradores de alivio de presión por esta causa.

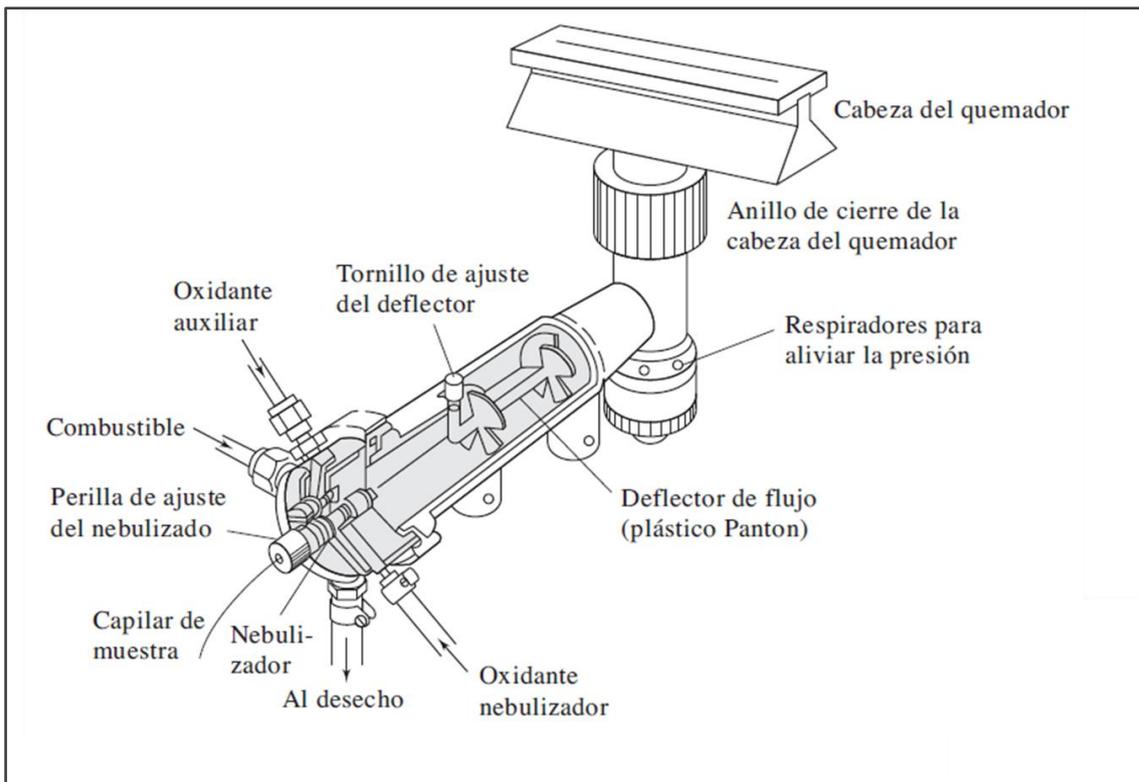


Figura 22 Quemador de flujo laminar (Figura adaptada de Skoog, 2008) **(68)**

Espectrometría de Absorción Atómica con atomización Electrotérmica

Otro método frecuentemente utilizado para lograr la atomización de la muestra incluye el uso de energía electrotérmica en horno de grafito (absorción atómica electrotérmica, ETAAS).

La técnica de ETAAS permite bajar los límites de detección al rango de partes por billón con una instrumentación relativamente sencilla.

El principio del método se basa en la absorción de la luz por parte de un elemento en estado atómico. La longitud de onda a la cual la luz es absorbida es específica de cada elemento. Se mide la atenuación de la intensidad de la luz como resultado de la absorción, siendo la cantidad de radiación absorbida proporcional a la cantidad de átomos del elemento presente.

El método involucra fundamentalmente dos procesos: la atomización de la muestra y la absorción de radiación proveniente de una fuente por los átomos libres. El tratamiento de la muestra hasta la atomización comprende las siguientes etapas:

- ✓ **Secado:** Una vez que la muestra ha sido inyectada en el tubo de grafito, se calienta a una temperatura algo inferior al punto de ebullición del solvente (usualmente entre 80 y 180 °C). El objetivo de esta etapa es la evaporación del solvente y de los componentes volátiles de la matriz.

- ✓ Pirolisis: El próximo paso es la pirolisis por incremento de la temperatura, para remover la mayor cantidad del material (materia orgánica) de la muestra como sea posible, sin pérdida de analito. La temperatura de pirolisis varía típicamente en el rango de 350 a 1600 °C. Durante esta etapa, el material sólido es descompuesto, mientras que los materiales refractarios como por ejemplo los óxidos, permanecen inalterados.
- ✓ Atomización: En esta etapa, el horno es calentado rápidamente a altas temperaturas (1800 a 2800 °C) para vaporizar los residuos de la etapa de pirolisis. Este proceso lleva a la creación de átomos libres en el camino óptico. Se mide la absorbancia durante esta etapa. La temperatura de atomización depende de la volatilidad del elemento. Cuanto mejor sea la separación de los elementos concomitantes del analito, mejor será la atomización y la determinación estará más libre de interferencias.
- ✓ Limpieza: Se agrega una cuarta etapa para limpieza del horno a una temperatura algo superior a la temperatura de atomización.

En estos sistemas, la atomización tiene lugar en un tubo cilíndrico de grafito abierto en ambos extremos y que tiene un orificio central para la introducción de la muestra mediante un inyector automático. Este tubo intercambiable se ajusta perfectamente a un par de contactos eléctricos que se ubican en los dos extremos del mismo. Estos contactos se mantienen dentro de un módulo refrigerado por agua. Dos corrientes de gas inerte circulan por este módulo: una corriente externa que evita la entrada de aire exterior y permite que dentro del tubo se alcance la atomización de la muestra y una corriente interna que fluye por entre los dos extremos del tubo y sale por el orificio central del compartimiento de muestra. Esta corriente no solo elimina el aire sino que sirve también para desalojar los vapores generados a partir de la matriz de la muestra durante las dos primeras etapas de calentamiento.

Los tubos de grafito pueden adquirir dos posiciones distintas dentro del instrumento según la forma en que fue diseñado: en posición longitudinal o transversal respecto al haz de luz proveniente de la lámpara.

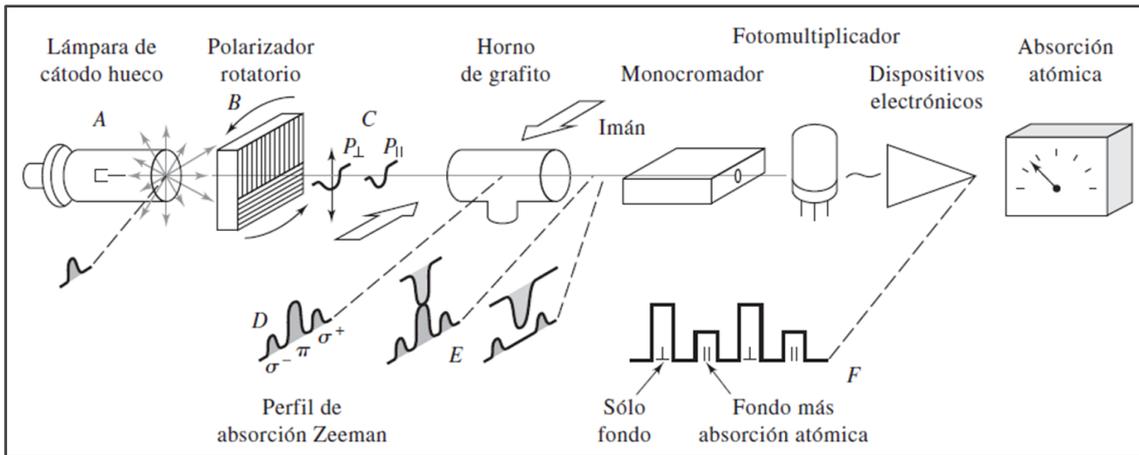


Figura 23 Esquema de un instrumento de absorción atómica electrotermostática con corrección de fondo con efecto Zeeman (Figura adaptada de Skoog, 2008) (68)

Los tubos transversales incluyen dispositivos de cada lado, los cuales están insertos en los contactos eléctricos. Cuando se aplica la potencia eléctrica, el tubo se calienta alrededor de su circunferencia (transversalmente). De esta forma, el tubo reduce los problemas de condensación que ocurren en los sistemas longitudinales. Una ventaja adicional, es que permiten la corrección por Zeeman y proveen una mejora significativa en el rendimiento de la luz. El efecto Zeeman es el cambio del espectro atómico cuando un átomo es modificado por acción de un campo magnético: la señal de absorción única se desdobra en dos o más componentes simétricamente dispuestos en torno a la posición normal de absorción. Por otro lado, el espectro de absorción de fondo no es usualmente afectado por campos magnéticos.

Espectrometría de Absorción Atómica con Generación de Hidruros

La técnica de absorción atómica con generación de hidruros (HGAAS) permite cuantificar en el orden de trazas o ultratrazas elementos como As, Bi, Ge, Hg, Pb, Sb, Se, Sn y Te, que tienen la propiedad de formar el hidruro correspondiente.

La muestra disuelta en ácido diluido se mezcla con un agente reductor, tal como cloruro de estaño (SnCl_2) o tetrahidroborato de sodio (NaBH_4). Esta reacción produce H atómico que reacciona con el elemento en cuestión para formar hidruros volátiles. El mecanismo de formación de los hidruros es complicado, y se han propuesto las siguientes reacciones, donde R se refiere a un radical orgánico o puede ser hidrógeno (91):



Los hidruros volátiles como la arsina (AsH_3) son arrastrados por un gas portador como nitrógeno a una celda de cuarzo, que es calentada externamente (eléctricamente o por medio de una llama) a una temperatura optimizada para producir la atomización del analito. Cuando los gases pasan a través de este tubo calentado, ocurre una descomposición térmica, y se liberan los átomos del elemento (92):



Al pasar la luz emitida por la lámpara a través del conjunto de átomos, la absorción crece a medida que estos se producen, llega a un máximo y cae al consumirse el analito y agotarse los átomos de la celda de absorción. Se puede registrar el máximo de absorción, que corresponde a la altura de pico, o el área bajo la curva, para relacionarlas con la concentración del analito (93).

Previamente a la generación de la arsina, la muestra, en caso de contener materia orgánica, debe ser sometida a un proceso de digestión para destruir los compuestos orgánicos del arsénico y oxidarlo a As(V) . El As(V) presente en el mineralizado es luego reducido a As(III) por reacción con yoduro de potasio o cloruro de estaño, el que posteriormente es convertido a arsina con borohidruro de sodio.

El sistema de generación de hidruros está diseñado de forma que optimiza la eficiencia de salida del analito de la disolución. El reactor que contiene la disolución a medir es de base cónica donde converge el agente reductor (tetrahidroborato de sodio) y el gas inerte portador (nitrógeno o argón) de forma que a la vez que se genera el hidruro se desprende de la solución.

1.6 Validación de Métodos Analíticos

Parámetros de validación de métodos analíticos

La validación de un método analítico se debe realizar para demostrar que éste es apto para el propósito analítico para el cual se va a utilizar, es decir, la validación asegura que los resultados analíticos arrojados por el método sean confiables. La validación del método es una exigencia de los organismos de acreditación nacionales e internacionales y debe ser apoyada y extendida mediante la verificación del desempeño de dicho método durante los análisis de rutina. Todos los pasos involucrados en un método deben validarse. A nivel internacional, organismos tales como la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada

(IUPAC), *International Standardization Organisation* (ISO), *Codex Alimentarius* y *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) han establecido guías para la validación de métodos analíticos. Las normas ISO definen a la validación como la confirmación mediante examen y provisión de evidencia objetiva de que las necesidades particulares para un uso específico previsto se cumplan. En la práctica, la validación de un método se realiza mediante la evaluación de una serie de características o parámetros de su performance tales como precisión, exactitud, selectividad/especificidad, linealidad, límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) y robustez (94).

La Unión Europea, por medio de la Dirección General de Sanidad y Protección del Consumidor (DG SANCO) establece criterios generales de validación de métodos y procedimientos de control de calidad en residuos de pesticidas en alimentos y piensos, a través del Documento No. SANCO/12571/2013 (95). Dicho documento incluye normas científicas ampliamente aceptadas a nivel internacional para el análisis de residuos de pesticidas en la UE según lo acordado por todos sus Estados miembros y constituye una guía técnica que establece criterios específicos para la validación de procedimientos de control de calidad en relación con los métodos de análisis para la determinación de residuos de pesticidas. Dicho documento, además de establecer criterios para la validación de una metodología, también ofrece lineamientos acerca de cómo se debe realizar el transporte, muestreo y procesamiento de la muestra a ser analizada, preparación de estándares, métodos de extracción, confirmación de resultados, cuantificación y expresión de resultados (95).

En general los métodos de análisis de residuos de pesticidas en alimentos se basan en los criterios establecidos por la DG SANCO. Los parámetros a ser evaluados para la validación de una metodología, se presentan a continuación (94) (95).

- ✓ Exactitud: se define como el grado de concordancia entre el resultado experimental y el valor de referencia aceptado (valor real).
- ✓ Precisión: el grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos en condiciones establecidas.

Repetitividad: se define como la precisión (desviación estándar) de medición de un analito (por lo general obtenido de la recuperación o análisis de materiales de referencia), obtenidos utilizando el mismo método, en la misma muestra en un solo laboratorio en un corto período de tiempo durante el cual no existen diferencias en los métodos, analistas, materiales y/ó equipos involucrados.

Reproducibilidad: se define como la precisión (desviación estándar) de medición de un analito (por lo general obtenido de la recuperación o análisis de materiales de

referencia), obtenidos utilizando el mismo método, en diferentes laboratorios, con diferentes analistas, ó durante un período de tiempo en el cual existan variaciones en los materiales y equipos. En el caso de que se evalúe en un mismo laboratorio se denomina reproducibilidad intra-laboratorio y se representa (WR).

Precisión intermedia: es la precisión en condiciones donde los resultados de un ensayo se obtienen con el mismo método, en pruebas idénticas, en el mismo laboratorio, realizado por diferentes analistas utilizando diferentes equipos durante un periodo de tiempo prolongado.

- ✓ Selectividad: La habilidad de la extracción, el sistema de separación y especialmente el detector de discriminar entre un analito y otro.
- ✓ Especificidad: La habilidad del detector de dar señales que identifiquen el analito de forma efectiva.
- ✓ Recuperación: la proporción de un analito remanente en el punto final de su determinación, luego de su adición, generalmente a una matriz blanco, inmediatamente antes de su extracción. Generalmente expresado como porcentaje.

Matriz blanco se define como una porción de muestra que se sabe que no contiene niveles detectables del analito en estudio. Para llevar a cabo ensayos de recuperación generalmente se fortifica la matriz blanco con los analitos de interés en al menos 2 niveles de concentración, el límite de reporte (o límite de detección, para comprobar la sensibilidad del método), y a un nivel más alto, tal vez un nivel de acción, por ejemplo, los LMR.

- ✓ Límite de detección: es la concentración mínima del analito que puede ser determinada cuantitativamente con una precisión y veracidad adecuada.
- ✓ Límite de cuantificación: se define como la mínima concentración o masa del analito que puede ser cuantificada con una exactitud y precisión adecuada (media de recuperación para cada producto representativo en el rango de 70 a 120%, con una $RSD \leq 20\%$).

Para la estimación del LOD y del LOQ existen diferentes aproximaciones, una de las más utilizadas es utilizar la relación señal-ruido (S/N, del inglés *signal-noise*). De esta forma se considera que el LOD se corresponde con la concentración del analito que presenta una relación señal-ruido mayor o igual a 3 y el LOQ se corresponde con la concentración del analito para la cual se observa una relación señal-ruido mayor o igual a 10 (96).

- ✓ Veracidad: se define como el grado de concordancia entre el valor promedio esperado y el valor de referencia aceptado (valor real). En el caso de existir materiales de

referencia se expresa como el z-score, en ausencia de materiales de referencia se expresa como el porcentaje de recuperación.

- ✓ Linealidad: la habilidad del método de obtener resultados experimentales (en un determinado rango) proporcionales a la concentración del analito.
- ✓ Robustez: es la medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inalterado por pequeñas y deliberadas variaciones en los parámetros operacionales del método y que provee la seguridad de obtención de resultados confiables durante su normal ejecución.
- ✓ Efecto Matriz (EM): Es la influencia de uno o más componentes de la muestra detectados durante la medición de la masa o concentración de un analito. La respuesta de ciertos analitos en algunos sistemas de detección puede verse afectada por la presencia de compuestos co-extraídos de la muestra (matriz). A pesar de que el mecanismo exacto de supresión o aumento de la señal ocasionado por la matriz no se conoce exactamente se asume que los componentes de la matriz afectan el proceso de ionización en la interface API (aumentando o disminuyendo la cantidad de iones de analito formados) (97).

Estos efectos de la matriz derivan de procesos físicos y químicos originados durante la ionización, generalmente difíciles o imposibles de eliminar. Se observan como un aumento o disminución de la respuesta del detector, en comparación con la producida por soluciones de estándar de la sustancia analizada, en disolvente. La presencia o ausencia de tales efectos puede ser demostrada por comparación de la respuesta producida por el compuesto analizado en solvente con la respuesta que se obtiene de la misma cantidad de analito en un extracto de la muestra. El efecto matriz tiende a ser variable e impredecible, aunque ciertas técnicas y sistemas (por ejemplo, HPLC-UV o de dilución de isótopos) son intrínsecamente menos propensos a presentar efecto matriz. Algunas condiciones instrumentales como la fuente de ionización (APCI vs. ESI), el modo de ionización y el flujo de fase móvil también influyen en el efecto matriz (98).

Existen algunas aproximaciones para tener en cuenta el efecto matriz. La más precisa sería la adición de estándares lo cual es sumamente inconveniente dado que el número de inyecciones por análisis aumentaría demasiado. En general el uso de estándar interno en análisis multiresiduo no es aconsejado ya que el efecto matriz depende en gran parte del analito. Un estándar interno ideal sería un estándar marcado isotópicamente, pero en general no están disponibles y los que existen tienen un costo elevado (98).

La guía SANCO No. SANCO/12571/2013 establece una posible práctica, a efectos de evitar este efecto matriz, que consiste en cuantificar mediante calibración en matriz. Esta se basa en la adición de concentraciones conocidas de analito estándar a extractos de matriz blanco, extraídas usando el mismo método con el cual se extraen las muestras reales o las recuperaciones. Es importante destacar que este tipo de calibración compensa el error que puede surgir durante la cuantificación de un analito pero no elimina el problema, ya que la causa es la variación en la intensidad de la respuesta observada y esta dependerá del tipo de matriz, de su concentración y del analito (98) (99).

La DG SANCO establece que durante la validación de un método debe estudiarse el efecto matriz. En caso que se demuestre que existe efecto matriz entonces la cuantificación de los analitos deberá realizarse mediante calibración en matriz, de lo contrario se podrá utilizar una curva de calibración en solvente. Como se mencionó anteriormente el EM puede variar dependiendo de la matriz; esto ocasiona ciertos problemas para los laboratorios que hacen análisis de rutina de diferentes matrices, ya que deberían realizar una curva en matriz para cada una de las matrices que evalúan, lo cual implica mucho tiempo de análisis. Para evitar esto la DG SANCO establece grupos de matrices representativas que pueden ser utilizadas para calibrar un rango más amplio de muestras.

En la práctica el efecto matriz se evalúa mediante la comparación de la pendiente de la curva de calibración de un analito en solvente y en matriz. Se calcula según la siguiente ecuación:

$$EM (\%) = [(pendiente \text{ en matriz} / pendiente \text{ en solvente}) - 1] \times 100 \quad (1.6)$$

Si el valor de % EM es igual a 100, no existe efecto matriz, un valor mayor o menor a 100 indica que existe efecto matriz, ya sea un aumento de la señal (EM mayor que 100), o una supresión de la señal (EM menor que 100). Dependiendo del valor resultante algunos autores clasifican el efecto matriz en diferentes categorías, que son las que se utilizaron en este trabajo de tesis. Un porcentaje entre -20% y 20% se considera como que no existe EM, ya que esta variación se encuentra en un valor cercano a la repetitividad aceptada por el método. Un EM medio se observa cuando los valores se encuentran entre - 50% y -20% ó 20% y 50%, mientras que si los valores son menores a -50% ó mayores que +50% el EM es pronunciado (100).

1.7 Justificación

1.7.1 Determinación de residuos de pesticidas en alcachofa

La agricultura ha se ha beneficiado con la utilización de pesticidas, pero un uso inapropiado de los mismos puede resultar en niveles inaceptablemente altos sobre los cultivos y llegar a los consumidores causando daños a la salud. Aunque los pesticidas sean aplicados de acuerdo a las BPA, pueden permanecer residuos (101). Es por eso que muchos países han establecido directivas legales y programas de monitoreo para controlar el uso de pesticidas en la agricultura, y de esta forma establecer si los residuos cumplen con los LMRs (59).

Dado que la alcachofa es consumida, debido a sus reconocidas propiedades nutricionales y farmacológicas, existe la necesidad de desarrollar metodologías analíticas rápidas mediante las cuales se pueda determinar de forma precisa y veraz los niveles de posibles contaminantes presentes en estos cultivos, especialmente los residuos de pesticidas, de forma de poder realizar una evaluación desde el punto de vista de su inocuidad alimentaria. Por éste motivo, la Unión Europea ha establecido LMRs para un gran número de pesticidas sobre estos vegetales (102).

Reportes sobre métodos multiresiduo para la determinación de residuos de pesticidas en alcachofa son escasos, especialmente para la determinación mediante LC-MS/MS. Hasta el momento solo se encontró un trabajo donde se reporta la determinación de nueve pesticidas mediante GC-ECD y confirmación mediante GC-MS (103).

Respecto al desarrollo de nuevas metodologías analíticas, los tratamientos de muestra efectivos son de vital importancia cuando se analizan matrices complejas, de forma de evitar interferencias y mejorar la sensibilidad de los métodos, especialmente cuando se trabaja con cromatografía líquida.

Para el análisis de residuos de pesticidas en alimentos, la necesidad se encuentra dirigida hacia metodologías analíticas rápidas, veraces y sensibles, con tratamientos de muestras dinámicos. Las técnicas modernas están basadas en la miniaturización, rapidez y bajo costo de los tratamientos de muestra seleccionados. Gran protagonismo han tomado los métodos multiresiduo versátiles como QuEChERS (y sus modificaciones) y MSPD que son adecuados para el análisis de residuos de pesticidas a gran escala en una variedad de matrices. Generalmente los pesticidas evaluados en este tipo de análisis poseen orígenes químicos diferentes y por lo tanto propiedades fisicoquímicas diferentes, lo cual dificulta la selección del método de tratamiento de muestra. En este trabajo se describe un método simple, rápido y de bajo costo, basado en una modificación del método QuEChERS, para el

análisis de 98 residuos de pesticidas, con el fin de proporcionar una herramienta útil para la evaluación de la seguridad alimentaria de los cultivos de alcachofa.

1.7.2 Determinación de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en alcachofa

El cuerpo humano requiere del aporte de metales a nivel de trazas para su correcto desarrollo y funcionamiento, muchos de los cuales son ingeridos a través de la dieta. Esto hace que la determinación de estos elementos en los alimentos, sea de gran interés. Las plantas pueden ser una fuente dietaria de minerales y elementos traza esenciales para la vida, pero también pueden proporcionar sustancias indeseables y potencialmente tóxicas para los organismos vivos, debido a la exposición a ciertos factores ambientales. Es de esperar que el origen geográfico, el medio de cultivo, el aporte de nutrientes, los insumos agropecuarios utilizados, el tiempo de cosecha y el tipo de suelo representen las principales vías de entrada de contaminantes inorgánicos en las plantas, concentrándose especialmente en las hojas.

En la región del MERCOSUR (Mercado Común del Sur) existe una regulación técnica sobre límites máximos de contaminantes inorgánicos en alimentos. Esta regulación debe ser cumplida por los países miembros (Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay y Venezuela). La misma establece los criterios para la comercialización de alimentos entre países miembros y para las importaciones desde otros países. En particular, se establecen los límites máximos para As, Cd, Hg, Pb y Sn en distintas matrices de origen vegetal. En el caso de los vegetales comestibles, los límites máximos para As y Pb están establecidos en $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ y para Cd en $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$. Para aquellos vegetales destinados a infusión, los límites máximos para As y Pb están establecidos en $0,6 \text{ mg kg}^{-1}$ y para Cd en $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ (104).

Los métodos oficiales de análisis de la AOAC (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) que aún son utilizados, requieren del uso de ácidos concentrados y altas temperaturas de trabajo para lograr la digestión de las distintas matrices, lo cual no está de acuerdo con los principios de la Química Verde. La preparación de las muestras es una etapa crítica en el proceso analítico y es la que mayor tiempo consume a lo largo de todo el procedimiento para el análisis de trazas.

Para la selección y desarrollo de metodologías analíticas apropiadas se debe considerar la veracidad y la precisión de los resultados obtenidos, de la disponibilidad de insumos y equipamiento, de la simplicidad de los procedimientos y de la rapidez de las determinaciones. Para lograr este objetivo, se requiere investigar diferentes alternativas para la preparación de las muestras que permitan la extracción cuantitativa de los analitos

de la matriz. La nueva tendencia en Química Analítica es evitar el uso de tratamientos drásticos y sustituirlos por procedimientos de extracción bajo condiciones suaves.

El objetivo de este estudio fue la evaluación de la inocuidad alimentaria de los cultivos de alcachofa desde el punto de vista del contenido total de As, Cd y Pb, utilizando metodologías analíticas novedosas, simples y rápidas, y al mismo tiempo evaluar algunas propiedades nutracéuticas relacionadas con el contenido de elementos esenciales para la vida como Cu, Fe, Ni y Zn. Para este propósito, se optimizaron y validaron tres metodologías analíticas de preparación de las muestras: dos de ellas asistidas mediante ondas de ultrasonido (utilizando sonda y baño) y la otra mediante ozonización.

1.7.3 Determinación del contenido fenólico y estudio de actividad antioxidante en alcachofa

Existe un creciente interés en la alcachofa debido a sus propiedades farmacológicas, tales como la inhibición de la biosíntesis del colesterol en los hepatocitos y el efecto hepatoprotectivo (105). La capacidad antioxidante de la alcachofa ha sido asociada con su alto contenido de compuestos fenólicos (106) (107) (13). Los compuestos bioactivos mayoritarios presentes en las hojas de alcachofa son el ácido clorogénico y los ácidos 1,3-, 3,4- y 4,5-di-O-cafeoilquínico, determinados por técnicas concluyentes (RMN) (107) (108). La cinarina (ácido 1,3-di-O-cafeoilquínico) puede ser considerado como uno de los compuestos con mayor capacidad para inhibir la biosíntesis de colesterol y la oxidación de la LDL (109) (13) (110), mientras que efectos anti-obesidad por parte del ácido clorogénico han sido reportados en ratones (16). A raíz de estos efectos, el efecto adelgazante de la alcachofa ha sido promovido, resultando en una gran popularidad de sus productos alrededor del mundo.

La capacidad secuestrante de las infusiones de hojas de alcachofa contra algunas especies reactivas de oxígeno (ROS), como el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($HO\cdot$), el ácido hipocloroso ($HOCl$) y los radicales peroxilo ($ROO\cdot$) ya ha sido reportada en la literatura (111). Sin embargo, a pesar del interés fitofarmacéutico respecto a los efectos antioxidantes de la alcachofa, no se han reportado estudios con otros tipos de extractos además de las infusiones. Más aún, la potencial capacidad secuestrante de las especies reactivas de nitrógeno (RNS) no había sido reportada en la literatura hasta este momento.

Por lo tanto, el objetivo de éste estudio, fue la obtención de tres extractos diferentes a partir de hojas de alcachofa (extractos de infusión, decocción e hidroalcohólico) utilizando diferentes solventes comúnmente aceptados para el consumo humano (agua y mezcla etanol/agua) y la determinación de las capacidades secuestrantes de cada uno de ellos

contra las principales especies ROS y RNS más importantes a nivel fisiológico. Se realizó la caracterización de compuestos fenólicos en cada extracto mediante HPLC-DAD-MS/MS y se compararon los resultados obtenidos con los resultados obtenidos de capacidad antioxidante.

1.7.4 Estudio de bioaccesibilidad de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa

El consumo normal de vegetales por las personas puede resultar en la exposición a elementos metálicos esenciales, requeridos para el correcto funcionamiento de la actividad metabólica, pero también a elementos no esenciales y potencialmente tóxicos para el organismo. Pero sea cual sea la situación, es importante lograr establecer la cantidad de dichos elementos que se encuentra potencialmente disponible para ser absorbida en el estómago o los intestinos.

La forma química y la naturaleza de estas especies metálicas pueden determinar que las mismas sean beneficiosas para el organismo o tóxicas. Sin embargo, el efecto sobre los humanos no puede ser directamente relacionado con la cantidad consumida o la cantidad absorbida por el torrente sanguíneo. Por este motivo, es que se deben realizar monitoreos de cuál es la fracción de estos elementos que realmente ingresa al organismo, ya sea si se trata de elementos beneficiosos o perjudiciales para la salud, lo cual se puede evaluar mediante estudios de bioaccesibilidad (112) (113).

La bioaccesibilidad ha sido definida como la fracción de un compuesto que es liberada de la matriz en la cuál se encuentra hacia el tracto gastrointestinal y que se vuelve disponible para ser absorbida por el intestino, por ejemplo, pasando al torrente sanguíneo.

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 dos procesos que ocurren en dos áreas distintas, pero vinculadas, del sistema digestivo humano: el estómago y el intestino delgado (113).

En el estómago, el ácido clorhídrico (pH 1 - 5) permite la disolución de óxidos minerales lábiles, sulfuros y carbonatos que liberan a las especies metálicas. La presencia de pepsina, una enzima proteasa, rompe los enlaces de las proteínas y por lo tanto ayuda a la disolución de la muestra. Las muestras pueden ser retenidas en el estómago entre 8 minutos hasta 3 horas (112).

El intestino está formado por tres componentes: duodeno, yeyuno e íleon. Las muestras son allí sometidas a un tratamiento adicional por acción de los jugos intestinales, formados por una serie de enzimas (tripsina, pancreatina y amilasa), sales biliares y bicarbonato. El efecto de este proceso lleva a la ruptura de polisacáridos, proteínas y grasas,

contribuyendo a la absorción. Las muestras pueden ser retenidas en el duodeno entre 30 - 45 minutos (pH 4 - 5,5), en el yeyuno entre 1,5 - 2 horas (pH 5,5 - 7,0) y en el íleon entre 5 - 7 horas (pH 7,0-7,5) (112).

El proceso de absorción ocurre mayoritariamente en el intestino delgado donde se lleva a cabo la digestión final. Como resultado de este proceso, es importante utilizar procedimientos *in vitro* que simulen de forma fiel lo que ocurre. En general, los procedimientos habituales consisten en una primera extracción de los elementos de interés presentes en la muestra a pH entre 1 - 4 utilizando ácido clorhídrico y pepsina por aproximadamente 2 horas y una segunda extracción en presencia de jugo intestinal por aproximadamente 2 horas más. Ambas extracciones se realizan a una temperatura constante de 37 °C (112).

1.8 Objetivos de la tesis

1.8.1 Objetivo general

El objetivo de este trabajo de tesis fue el desarrollo de metodologías analíticas para la determinación de metabolitos con valor nutracéutico (compuestos polifenólicos y metales esenciales a nivel de trazas) presentes en hojas y frutos de alcachofa, así como la determinación de residuos de pesticidas y contaminantes inorgánicos para el aseguramiento de la inocuidad y calidad de esta hortaliza tanto para su consumo alimentario, así como para su utilización como materia prima farmacéutica.

1.8.2 Objetivos específicos

- ✓ Desarrollo y validación de una metodología multiresiduo para la determinación de pesticidas en hojas y frutos de alcachofa mediante GC-MS y LC-MS/MS.
- ✓ Desarrollo y validación de diferentes metodologías de extracción y posterior determinación de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en hojas y frutos de alcachofa.
- ✓ Determinación del contenido de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en infusiones de hojas y frutos de alcachofa y comparación con los valores en base seca.
- ✓ Estudio de actividad antioxidante y determinación del contenido fenólico en distintos extractos de hojas de alcachofa.
- ✓ Estudio de biodisponibilidad *in vitro* de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa.

1.9 Actividades desarrolladas

Determinación de residuos de pesticidas en alcachofa:

En la búsqueda de la metodología de extracción más eficaz para la determinación de residuos de pesticidas en hojas y frutos de alcachofa, se llevó a cabo la comparación de tres metodologías multiresiduo diferentes, evaluando en cada caso la precisión y la veracidad obtenidas, mediante GC-MS. La metodología seleccionada fue posteriormente optimizada y validada siguiendo los parámetros estipulados por DG-SANCO para un mayor número de pesticidas, mediante GC-MS y LC-MS/MS. Se llevó a cabo la aplicación de la metodología validada a la determinación de residuos de pesticidas en muestras de alcachofa comerciales.

Determinación del contenido de contaminantes inorgánicos (As, Cd, Pb) y metales esenciales (Cu, Fe, Ni, Zn) en alcachofa:

Optimización y puesta a punto de la preparación de la muestra para la determinación de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) y espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS).

Para el tratamiento de la muestra se planteó la utilización de ozono como alternativa novedosa para extraer los analitos de la matriz. Así mismo, se utilizó la técnica de extracción asistida con ultrasonido utilizando una sonda y un baño. Las condiciones operativas se optimizaron mediante experimentos multivariados. Se realizó la validación correspondiente utilizando un material de referencia certificado de hojas de espinaca y comparando con el método de referencia de digestión total asistida con microondas.

Determinación del contenido de contaminantes inorgánicos (As, Cd, Pb) y metales esenciales (Cu, Fe, Ni, Zn) en infusiones de alcachofa:

Determinación del contenido de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en infusiones de hojas y frutos de alcachofa mediante espectrometría de absorción atómica de llama (Cu, Fe, Zn) y con atomización electrotérmica (As, Cd, Ni, Pb).

Determinación del contenido fenólico y ensayos de actividad antioxidante sobre extractos de hojas de alcachofa:

Trabajo realizado en colaboración con la Facultad de Farmacia de la Universidad de Porto (Portugal). Allí se realizaron ensayos de actividad antioxidante de distintos extractos de

hojas de alcachofa, basandose en el uso de sondas fluorescentes o quimioluminiscentes, que disminuyen su señal luminosa frente a especies reactivas de oxígeno (ROS) o nitrógeno (RNS). Los resultados se compararon con el perfil de compuestos fenólicos obtenido mediante LC-DAD-ESI-MS/MS. Los ensayos de actividad antioxidante se realizaron en Portugal y se reprodujeron algunos ensayos en Uruguay posteriormente. La caracterización se hizo en ambos países en colaboración.

Estudio de bioaccesibilidad de contaminantes inorgánicos (As, Cd, Pb) y metales esenciales (Cu, Fe, Ni, Zn) en frutos de alcachofa:

Se llevó a cabo la determinación del porcentaje de bioaccesibilidad de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn luego de una digestión gastrointestinal simulada *in vitro* del fruto de alcachofa, y se comparó con los valores de ingesta diaria recomendada en el caso de los minerales esenciales como una aproximación para evaluar la biodisponibilidad de los elementos.

CAPÍTULO 2

PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Determinación de residuos de pesticidas en alcachofa

2.1.1 Reactivos

Acetonitrilo (MeCN) y acetato de etilo (EtOAc) calidad HPLC fueron comprados a Pharmco (Brookfield, CT, USA). Sulfato de magnesio (MgSO_4), cloruro de sodio (NaCl), citrato trisódico di-hidratado ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), citrato disódico sesqui-hidratado ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$) y sulfato de sodio (Na_2SO_4) fueron obtenidos de J.T. Mallinckrodt Baker, Inc. (Phillipsburg, NJ, USA). Cloruro de calcio (CaCl_2), PSA and GCB fueron proporcionados por SUPELCO (Bellefonte, PA, USA).

Excepto por el MeCN y el EtOAc calidad HPLC, todos los reactivos utilizados en los análisis fueron de calidad analítica.

Agua ultrapura de resistividad 18,2 $\text{M}\Omega\text{cm}$ (ASTM Tipo I) fue obtenida mediante un purificador Millipore (São Paulo, Brazil) Simplicity 185.

Los estándares de pesticidas fueron obtenidos de Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany) y guardados a -18°C . Las soluciones stock individuales de pesticidas (1000–2000 mg L^{-1}) fueron preparadas en MeCN y EtOAc y guardadas en viales de vidrio color ámbar con tapa rosca y en ausencia de luz a -18°C . Los mix de soluciones utilizados para las calibraciones y las fortificaciones fueron preparados a partir de las soluciones stock individuales mediante diluciones apropiadas. La soluciones mix estándar de trabajo para las fortificaciones fueron de 10 mg L^{-1} en MeCN. Estas soluciones fueron luego diluidas para preparar las diferentes soluciones estándar de calibración: 1,0 - 5,0 - 10,0 - 50,0 - 100,0 y 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ en MeCN para análisis mediante LC-MS/MS y 10,0 - 30,0 - 80,0 - 150,0 - 400,0 y 600,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para análisis mediante GC-MS.

2.1.2 Instrumentos

- ✓ Balanza analítica (KERN ABJ, España).
- ✓ Vórtex (BioCote Stuart®, Reino Unido).
- ✓ Centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5702, Alemania).
- ✓ Evaporador rotatorio (Büchi RE 111, Suiza).
- ✓ Evaporador (Biotage TurboVap® LV, Suecia).
- ✓ Cromatógrafo de gases equipado con detector de masas (GC-MS-QP2010 Ultra).
- ✓ Cromatógrafo de líquidos (Agilent 1200 LC acoplado a un sistema 4000 QTRAP LC-MS/MS de AB SCIEX).

2.1.3 Muestras

Las muestras de hojas de alcachofa (2 kg) utilizadas como blanco de matriz durante la selección del método y la validación, fueron recolectadas en una granja familiar dedicada al cultivo de este vegetal en Montevideo-Uruguay. Los fragmentos de hojas fueron identificados como *Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus* en sus variedades Green Globe y Purple Globe. El voucher correspondiente al espécimen (MVFQ 4399) fue depositado en el Herbario de la Cátedra de Botánica de la Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay. Cuatro muestras de alcachofa (con sus correspondientes hojas y frutos) provenientes de distintos puntos del país, fueron compradas en mercados locales de Uruguay. Todas las muestras fueron secadas en horno con circulación de aire (70 °C), trituradas y guardadas a 20 °C en ausencia de luz.



Figura 24 Muestras utilizadas como blanco de matriz: *Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*: “Purple Globe” (izquierda) y “Green Globe” (derecha). Foto proporcionada por el Prof. Eduardo Alonso Paz (Curador del Herbario de la Facultad de Química).

2.1.4 Selección de los pesticidas

Se incluyeron los pesticidas más utilizados a nivel mundial en los paquetes tecnológicos destinados al cultivo de alcachofa. En total se eligieron 98 compuestos, 65 para ser analizados mediante LC-MS/MS y 35 para ser analizados mediante GC-MS, pertenecientes a diferentes familias químicas, tales como, estrobilurinas, hidantoínas, organofosforados, carbamatos, triazoles y piretroides. Algunos de estos pesticidas se utilizan normalmente en Uruguay para los cultivos de alcachofa, como es el caso del dimetoato. Para la selección de dichos compuestos se siguieron dos criterios: que tuvieran un LMR fijado por la Unión Europea para alcachofa y que pertenecieran a los paquetes más usados en estos cultivos.

2.1.5 Fortificación de las muestras

Para los estudios de recuperación, porciones representativas de la muestra fueron fortificadas con volúmenes apropiados de solución mix estándar (proporcionando niveles de 0,01 – 0,02 – 0,05 – 0,10 mg kg⁻¹ para el análisis mediante LC-MS/MS y 0,01 – 0,05 – 0,10 – 0,20 mg kg⁻¹ para el análisis mediante GC-MS). Las muestras fortificadas se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora antes de comenzar con los análisis.

2.1.6 Preparación de las muestras

2.1.6.1 Método QuEChERS

Se empleó una modificación del método QuEChERS de preparación de muestras (114). Luego de la homogenización, una porción de 2,0 g de muestra (hoja o fruto de alcachofa) fue pesada en tubos de centrifuga cónicos de PP. Luego, se agregaron 4 mL de agua Milli-Q para hidratar la muestra, seguidos de agitación en vórtex durante 30 s, y posteriormente un reposo de 30 min. Después de esto, se agregaron 10 mL de MeCN y las muestras fueron agitadas manualmente durante 5 min. Luego, fueron agregados 4 g de MgSO₄, 1 g de NaCl, 1 g de C₆H₅Na₃O₇·2H₂O y 0,5 g de C₆H₆Na₂O₇·1,5H₂O y las muestras se agitaron nuevamente de forma manual durante 5 min. El extracto obtenido fue luego centrifugado (3700 rpm) durante 5 min. Una toma de 5,0 mL del sobrenadante fue transferida a un tubo de centrifuga de PP de 15 mL conteniendo 150 mg de CaCl₂ y 150 mg de PSA. El extracto fue agitado en vórtex durante 30 s y centrifugado nuevamente (3700 rpm) durante 5 min más. Posteriormente, alícuotas de 1,0 y 3,5 mL fueron evaporadas bajo corriente de N₂ y reconstituidas con MeCN para el análisis mediante LC-MS/MS y con AcOEt para el análisis mediante GC-MS respectivamente. Antes de realizar las inyecciones, los extractos obtenidos fueron filtrados a través de filtros de PVDF de 0,45 μm (Millex FG, Millipore, Mildford, MA, USA). Trifenil fosfato (TPP, estándar interno) fue agregado de forma de obtener una concentración final de 1,0 mg L⁻¹ en todos los extractos para el análisis mediante GC-MS.



Figura 25 Método QuEChERS: Extracción (izquierda) y *clean-up* (derecha), hoja y fruto respectivamente.

2.1.6.2 Método de extracción con acetato de etilo

Se empleó una modificación del método de extracción con acetato de etilo (114). Se pesaron 2,0 g de muestra previamente homogeneizada en tubos cónicos de centrífuga de PP de 50 mL. Luego se agregaron 4 mL de agua y se agitó en vórtex durante 30 s y se dejó en reposo durante 30 min. Después de esto, se agregaron 10 mL de AcOEt y la mezcla fue agitada manualmente durante 5 min. Luego, se agregaron 4 g de $MgSO_4$ y 1 g de NaCl y se agitó manualmente durante 5 min. El extracto obtenido fue luego centrifugado (3700 rpm) durante 5 min. Una toma de 5,0 mL del sobrenadante fue transferida a tubos de centrífuga de PP de 15 mL conteniendo 200 mg de $MgSO_4$, 200 mg de GCB y 150 mg de PSA. El extracto fue agitado en vórtex durante 30 s y centrifugado nuevamente (3700 rpm) durante 5 min más. Posteriormente, una alícuota fue evaporada bajo corriente de N_2 y reconstituida con AcOEt para el análisis mediante GC-MS. Trifenil fosfato (TPP, estándar interno) fue agregado de forma de obtener una concentración final de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ en todos los extractos para el análisis mediante GC-MS.

2.1.6.3 Método MSPD

Se colocó 1,0 g de muestra previamente mezclada y macerada con 4 g de Na_2SO_4 en mortero de cerámica, en una columna de vidrio conteniendo una frita de polietileno al final, llenada (de abajo hacia arriba) con 0,4 g de GCB, 3,6 g de Florisil (como sorbentes en la etapa de *clean-up*). La elución fue realizada por gravedad con una mezcla Hex/AcOEt, conteniendo 60% de AcOEt. Un volumen de 25 mL del eluido fue recolectado en balones de vidrio y colocados en un evaporador rotatorio (Büchi RE 111, Switzerland) para evaporar los solventes. Finalmente, el extracto obtenido fue reconstituido con AcOEt para el análisis mediante GC-MS. Trifenil fosfato (TPP, estándar interno) fue agregado de forma de obtener una concentración final de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ en todos los extractos para el análisis mediante GC-MS (115).



Figura 26 Tratamiento de muestra mediante el método MSPD.

2.1.7 Determinaciones analíticas

2.1.7.1 Análisis mediante GC-MS: Selección del método multiresiduo

Para las determinaciones analíticas se utilizó un cromatógrafo de gases HP6890 acoplado a un detector de masas de tipo cuadrupolar HP597, equipado con una columna HP-5 (30m x 0,25mm x 0,25 μ m d.i.). El método de ionización utilizado fue impacto electrónico (EI) en modo positivo y los espectros de masas fueron obtenidos a 70 eV. El sistema detector de masas fue programado en el modo selected-ion monitoring (SIM) para confirmación. Los parámetros de trabajo fueron: temperatura del inyector 230 °C; temperatura de la interface 280 °C; gas carrier He a 1,0 mL/min. Las condiciones del horno fueron: temperatura inicial de 120 °C (5 min), aumento hasta 190 °C a 10 °C/min (1 min de espera), aumento hasta 250 °C a 5 °C/min (5 min de espera) y finalmente aumento hasta 300 °C a 5 °C/min (5 min de espera) (45 min total de la corrida). La inyección fue realizada en modo split, la relación de split fue 12:1 y el volumen de inyección de 1,0 μ L. Para la adquisición y procesamiento de los datos obtenidos, se utilizó el software MSD *ChemStation Data Analysis*.



Figura 27 Cromatógrafo HP6890 acoplado a detector HP597.

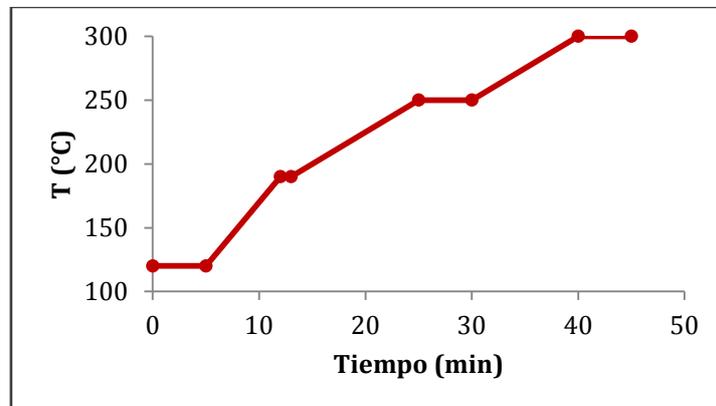


Figura 28 Programa de temperatura para las determinaciones mediante GC-MS (Selección del método).

Las cuantificaciones se realizaron utilizando las áreas relativas versus TPP utilizado como patrón interno a una concentración de 1 mg L^{-1} . Los parámetros cromatográficos y de adquisición para los compuestos seleccionados se listan en la **Tabla 10**. El método de detección MS fue optimizado primeramente mediante la inyección en modo *full scan* de soluciones individuales de los analitos a 1 mg L^{-1} para obtener los tiempos de retención de cada uno de ellos y seleccionar los iones precursores óptimos. Luego se realizó la inyección en modo *full scan* de una solución mix conteniendo todos los analitos a 1 mg L^{-1} para verificar el comportamiento en la mezcla. Se seleccionaron 3 iones, el más abundante se utilizó para la cuantificación mientras que los otros dos fueron para la confirmación. La identificación de los compuestos de interés se realizó a partir de la comparación del tiempo de retención y concordancia del espectro de masas entre el analito problema y una inyección de pesticida estándar. Se verificó que las abundancias relativas se encontraran dentro del rango $\pm 20\%$.

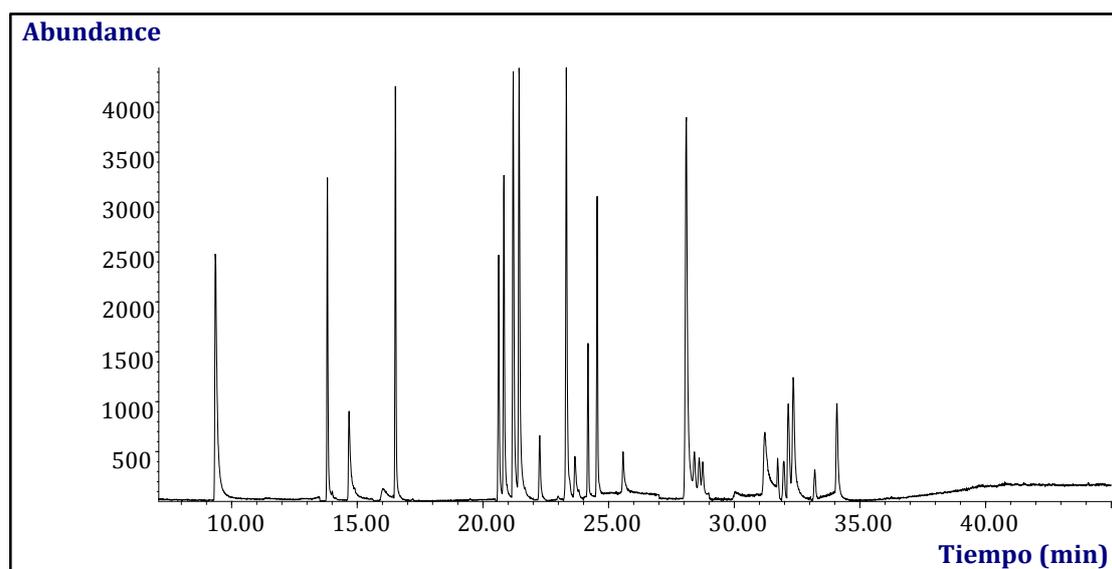


Figura 29 Cromatograma en modo *full scan* del mix de pesticidas a 1 mg L⁻¹.

Tabla 10 Parametros cromatográficos y de adquisición para los compuestos seleccionados analizados mediante GC-MS (selección del método MRM).

Nombre común del pesticida	t _R (min)	Iones característicos (m/z)	Ion Cuantificador	Ion Calificador
Azoxystrobin	34,11	344/388/345/372	344	372
Boscalid	28,11	140/342/142	140	342
Clorfenvinfos	16,52	267/269/323	267	323
Cipermetrina	28,11/28,43 28,62/28,75	163/165/181/209	163	181
Deltametrina	33,22	181/251/253/255	181	251
Difenoconazol	32,17/32,37	265/267/323/325	323	265
Iprodiona	22,26	187/189/314/316	314	187
Lambda-Cialotrina	24,55	181/197/208	181	208
Metiocarb	9,36/14,68	109/153/168/225	168	109
Propiconazol	20,63/20,84	173/259/261	173	261
Pyraclostrobin	31,33	111/132/133	132	111
Tau-Fluvalinato	31,74/31,98	181/250/251/252	250	181
Tebuconazol	21,22	83/125/250	125	252
Tetradifon	23,34	111/159/229/356	159	356
Vinclozolina	13,81	187/198/212/285	212	285

2.1.7.2 Análisis mediante GC-MS: Optimización y validación del método seleccionado

Debido a que el cromatógrafo utilizado al comienzo de este trabajo de tesis dejó de funcionar y se compró un nuevo equipo, se debió realizar nuevamente el ajuste y la optimización de los compuestos en estudio.

Para las nuevas determinaciones analíticas se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas (Shimadzu GC-MS-QP2010 Ultra), equipado con una columna TR-5MS Thermo (30m x 0,25mm x 0,25µm). El método de ionización utilizado fue impacto electrónico (EI) y los espectros de masas fueron obtenidos a 70 eV. El sistema detector de

masas fue programado en el modo selected-ion monitoring (SIM) para confirmación. Los parámetros de trabajo fueron: temperatura del inyector 230 °C; temperatura de la interface 280 °C; gas carrier He a 1mL/min. Las condiciones del horno fueron: temperatura inicial de 120 °C (5 min), aumento hasta 190 °C a 10 °C/min (1 min de espera), aumento hasta 250 °C a 5 °C/min (5 min de espera), aumento hasta 280 °C a 5 °C/min (5 min de espera) y finalmente aumento hasta 320 °C a 20 °C/min (2 min de espera) (45 min total de la corrida). La inyección fue realizada en modo split, la relación de split fue 12:1 y el volumen de inyección de 1,0 µL. Para la adquisición y procesamiento de los datos obtenidos, se utilizó el programa LabSolutions GC-MS Versión 4.11 SU2 de Shimadzu.

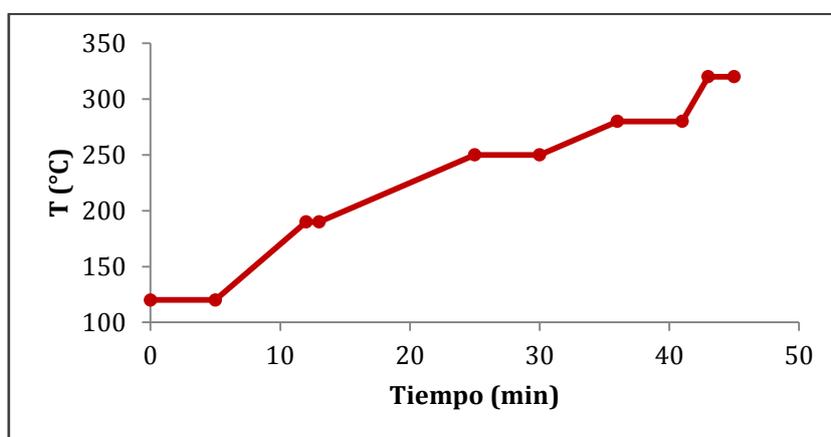


Figura 30 Programa de temperatura utilizado para las determinaciones mediante GC-MS (Validación)

Las cuantificaciones se realizaron utilizando las áreas relativas versus TPP utilizado como patrón interno. Los parámetros cromatográficos y de adquisición para los compuestos seleccionados se listan en la **Tabla 11**. El método de detección MS fue optimizado primeramente mediante la inyección en modo *full scan* de una solución mix conteniendo todos los analitos a 1 mg L⁻¹ para obtener los tiempos de retención de cada uno de ellos y seleccionar los iones precursores óptimos. Se seleccionaron 3 iones, el más abundante se utilizó para la cuantificación mientras que los otros dos fueron para la confirmación. La identificación de los compuestos de interés se realizó a partir de la comparación del tiempo de retención y concordancia del espectro de masas entre el analito problema y una inyección de pesticida estándar.

Tabla 11 Parametros cromatográficos y de adquisición para los compuestos seleccionados analizados mediante GC-MS (Validación).

Nombre común del pesticida	t _R (min)	Iones característicos (m/z)	Ión target (m/z)
Azoxystrobin	28,53	344/388/345/372	344
Boscalid	23,40	140/342/142	140
Bromopropilato	28,06	183/339/105	341
Buprofezin	23,028	172/175	105
Clorfenvinfos	20,27/20,69	269/323/295	267
Clorotalonil	16,51	264/268	266
Clorpirifos	19,15	258/199/314	197
Clorpirifos metil	17,60	286/288/109	125
Ciflutrina	35,46	165/206/226	163
Cipermetrina	24,33/24,52/24,71/24,86	163/165/181/209	163
Deltametrina	41,26	253/255/251	181
Diazinon	15,77	152/276	179
Dicofol	20,50	111/250/141	139
Difenoconazol	26,63/26,82	265/267/323/325	323
Etion	24,26	153/203/384	231
Fenhexamida	25,90	177/179	97
Fenitrotion	18,72	277/109/260	125
Fipronil	20,36	213/369	367
Fludioxonil	22,71	154/127/182	248
Iprodiona	27,63	187/189/316	314
Kresoxim metil	23,04	116/131	206
Lambda -cialotrina	30,72	197/209/208	181
Metiocarb	7,22/12,33	109/153/168/225	168
OPP	11,79	169/141	170
Paration metil	17,91	109/263/233	125
Permetrina	33,59	163/165/127	183
Propiconazol	20,63/20,84	173/259/261	173
Piraclostrobin	31,33	111/132/133	132
Piriproxifen	30,45	129/226	136
Tau-Fluvalinato	31,74/31,98	181/250/251/252	250
Tebuconazol	21,22	83/125/250	125
Tetradifon	29,80	111/229	159
Trifloxystrobin	25,15	131/145/186	116
Trifuralin	13,60	306/290	264
TPP	26,59	325/215/233	326
Vinclozolina	17,70	198/285	212

2.1.7.3 Análisis mediante LC-MS/MS: Optimización y validación

Las determinaciones analíticas de los pesticidas seleccionados fueron realizadas mediante un sistema de cromatografía líquida Agilent 1200 LC acoplado a un sistema detector de masas 4000 QTRAP LC-MS/MS de AB SCIEX ejecutado en el modo MS-MS programado. Para realizar las separaciones mediante cromatografía líquida se utilizó una columna ZORBAX Eclipse XDB-C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) y la temperatura del horno fue fijada a 20 °C. La fase móvil consistió de una mezcla (A) ácido fórmico 0,1 % en agua y (B) MeCN, y el siguiente programa de elución fue utilizado: se comenzó con 10 % B durante 3 min y luego se fue aumentando hasta alcanzar 100 % B en 17 min, donde se mantuvo durante 5

min. Finalmente, el porcentaje de B fue disminuido hasta 10 % en 3 min donde fue mantenido durante 5 min (33 min de corrida). El volumen de inyección fue de 5 μL y el flujo de 0,6 mL min^{-1} , para la adquisición de datos. El software Analyst versión 1.5.1 de AB SCIEX fue utilizado para la adquisición y procesamiento de datos.

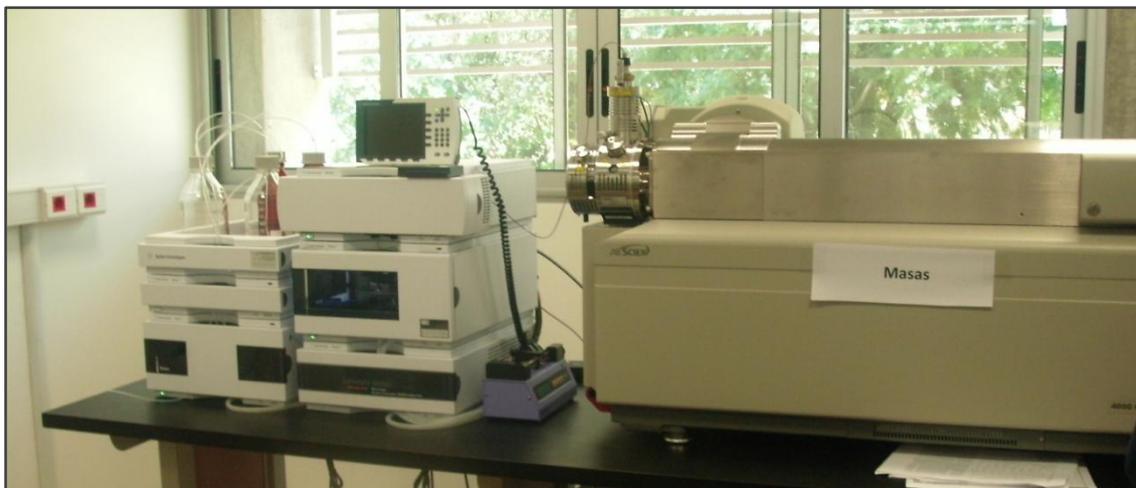


Figura 31 Vista del cromatógrafo Agilent 1200 LC acoplado al sistema detector de masas 4000 QTRAP LC-MS/MS de AB SCIEX.

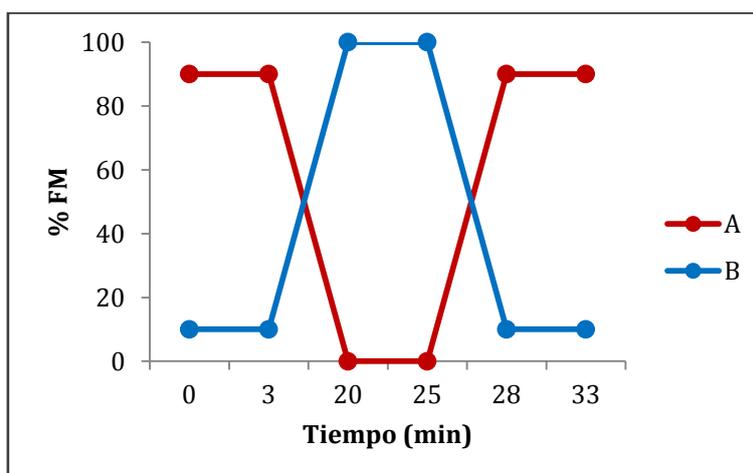


Figura 32 Gradiente de fase móvil utilizado para las determinaciones mediante LC-MS/MS.

La detección de masas en tándem fue realizada en el modo *multiple reaction monitoring* (MRM). Las condiciones óptimas de MRM para cada analito fueron optimizadas utilizando inyección directa en el modo ESI+. La temperatura de la fuente TurboV™ fue de 500 °C, el voltaje de ionización fue de 5000 V, como gas cortina se utilizó nitrógeno a 20 psi y el gas nebulizador fue aire a 50 psi. La calibración de los cuadrupolos se realiza automáticamente con una solución de 5⁻¹⁰ M de polipropilenglicol, introducida mediante una jeringa conectada a la interfase. Los parámetros cromatográficos y los ajustes de MS/-MS (transiciones, energía de colisión) utilizados en este estudio se listan en la **Tabla 12**. El modo MRM programado (*scheduled*) fue utilizado con un ajuste de 90 s de ventana de

detección cubriendo de esta forma el tiempo de retención esperado para cada analito, y el tiempo de scan del target fue de 2 s para todos los pesticidas.

La optimización de los compuestos, es decir la selección de las condiciones del voltaje de fragmentación y energías de colisión se realizó individualmente para cada pesticida. Para ello se prepararon soluciones patrones individuales de 1 mg L⁻¹ en MeOH y se inyectaron mediante el sistema FIA. Una vez inyectada la solución estándar del pesticida, el equipo busca la mejor combinación de voltaje de fragmentación (DP)/ión precursor. A continuación se realiza un barrido en *full scan* al DP establecido para buscar los iones fragmento más abundantes (se eligen 2) con sus correspondientes CE. Otros dos parámetros, el potencial de entrada y el potencial de salida de la celda de colisión también son optimizados, aunque en general se aplica un valor fijo para todos los pesticidas incluidos en el método. Los parámetros optimizados para cada uno de los pesticidas analizados mediante este sistema se encuentran detallados en la **Tabla 12**, junto con los tiempos de retención y las transiciones utilizadas para su identificación y cuantificación. La transición de mayor intensidad fue la seleccionada para la cuantificación, mientras que la más débil se utilizó para la identificación de los pesticidas de interés, de acuerdo a los criterios de la DG-SANCO.

Tabla 12 Parametros cromatográficos y de adquisición para los compuestos seleccionados analizados mediante LC-MS/MS.

Nombre común del pesticida	t _R (min)	MRM1	MRM2	DP (V)	CE1	CE2
Acefato	3,2	184/125	184/143	46	25	13
Acetamiprid	13,0	223/126	223/99	55	25	47
Aldicarb	14,4	208/116	208/191	28	10	6,5
Azinfos metil	18,4	318/261	318/160	50	10	11
Azoxystrobin	18,6	404/344	404/372	72	31	19
Benomilo	20,1	291/192	291/160	41	17	39
Boscalid	18,9	345/271	343/140	89	39	24
Carbaril	16,4	202/145	202/127	68	12	35
Carbendazim	8,7	192/132	192/105	80	42	48
Carbofuran	15,9	222/123	222/165	102	31	12
Clorpirifos	23,1	350/97	350/198	80	38	23
Ciproconazol	18,0	292/125	292/70	16	35	35
Clomazone	17,7	240/125	240/99	128	53	53
Clorfenvinfos	20,2	360/155	360/99	80	21	31
Clorpirifos metil	21,6	322/125	322/290	76	27	23
Clotianidina	12,3	250/169	250/132	56	17	19
Diazinon	21,4	305/169	305/153	51	29	27
Difenoconazol	20,5	406/251	406/337	90	37	21
Dimetoato	12,9	230/199	230/125	56	13	29
Epoxiconazol	18,7	330/121	330/101	36	27	63
Etion	23,0	385/198	385/143	66	13	33
Fenitrotion	19,8	278/246	278/125	76	23	27
Flufenoxuron	22,6	489/141	489/158	41	63	29
Fluopicolida	19,1	383/173	385/175	66	33	33
Flutriafol	15,9	302/70	302/123	100	35	37

Fosmet	18,4/18,7	318/160	318/77	56	21	69
Hexaconazol	19,5	314/70	316/161	46	37	43
Hexythiazox	23,3	353/228	353/168	70	23	34
Imazalil	13,4	297/159	297/255	130	32	23
Imidacloprid	12,7	256/209	256/175	86	22	23
Iprodiona	19,5	330/245	330/288	64	21	16
Isoprothiolane	19,9	291/189	291/145	51	31	49
Kresoxim metil	20,8	315/239	315/135	15	13	17
Linuron	18,5	249/160	249/182	61	25	23
Lufenuron	22,1	513/158	513/141	41	27	67
Malaoxon	15,5	315/127	315/99	66	17	31
Malation	19,7	331/285	331/99	56	11	35
Metalaxil	14,7	280/220	280/192	61	21	25
Metconazol	19,6	322/70	322/125	36	55	53
Metamidofos	3,2	142/94	141/125	26	19	19
Metidation	18,5	303/144	303/85	49	13	29
Metiocarb	18,2	226/169	226/121	78	13	26
Metomil	10,4/10,9	163/106	163/88	128	14	53
Metoxifenocida	19,2	369/149	369/313	51	21	11
Oxadixil	14,7	279/219	279/102	90	12	12
Pendimetanil	23,2	282/212	282/194	45	16	25
Pirimifos metil	21,7	306/108	306/164	130	42	31
Procloraz	17,8	376/308	376/266	78	15	24
Propiconazol	20,0	342/159	342/69	46	37	33
Piraclostrobin	21,1	388/194	388/163	67	17	39
Pirimetanil	16,1	200/107	200/143	40	31	38
Spinosad	15,3	732/142	732/98	136	43	81
Spiroxamine	15,2	298/144	298/100	90	28	40
Tebuconazol	19,0	308/70	308/125	85	40	53
Tebufenozide	19,8	353/297	353/133	128	11	23
Teflubenzuron	21,4	381/158	381/141	41	23	53
Tetraconazol	18,5	372/159	372/129	88	39	23
Tiacloprid	13,7	253/126	253/128	98	28	25
Tiametoxam	11,0	292/211	292/246	88	10	10
Tiodicarb	15,1	355/88	355/108	61	33	21
Tiabendazol	9,1	202/175	202/131	100	34	43
Trifloxystrobin	21,5	409/186	409/206	50	22	18
Triticonazol	17,7	318/70	318/125	66	51	53

2.1.8 Parámetros de validación

La validación de la metodología para el análisis de pesticidas en hojas y frutos de alcachofa se realizó a partir de la determinación y evaluación de los siguientes parámetros: veracidad (porcentaje de recuperación), reproducibilidad intra-laboratorio, repetitividad, linealidad, efecto matriz, LOD y LOQ según la definición sugerida en las guías de validación de métodos multiresiduo para el análisis de residuos de pesticidas establecida por la DG SANCO que se describen a continuación:

2.1.8.1 Identificación y confirmación

Según la DG SANCO el criterio de identificación y confirmación de los analitos varía según el sistema de detección utilizado (95).

Para los pesticidas analizados mediante LC-MS/MS, el criterio de confirmación utilizado para cada compuesto fue la presencia de 2 iones diagnóstico junto con el ión precursor (2 transiciones), la coincidencia del t_R de estas transiciones con las de un estándar y además la relación (MRM2/MRM1) en la muestra problema debe coincidir con la relación (MRM2/MRM1) obtenida para el estándar.

Para los pesticidas analizados mediante GC-MS, el criterio de confirmación utilizado para cada compuesto fue la presencia de 3 iones diagnóstico ($m/z > 100$), la coincidencia de los t_R respecto al estándar y las abundancias relativas en el rango $\pm 20\%$.

2.1.8.2 Muestra blanco

La DG SANCO define a un blanco como una muestra o una porción u extracto de muestra que se sabe que no contiene niveles detectables de los analitos de interés.

Las muestras blanco utilizadas en este trabajo fueron hojas y frutos de alcachofa recolectadas en un cultivo familiar, donde el productor aseguró que no se utilizaban agroquímicos. Además, el cultivo se encontraba enmarcado dentro de terraplenes de tierra y rodeado de árboles que funcionaban como cortinas, de forma que la contaminación aérea desde otros cultivos era poco probable.

2.1.8.3 Ensayo de fortificación

El ensayo de fortificación consiste en el agregado de un volumen conocido de una solución de una determinada concentración, conteniendo todos los analitos en estudio, a una masa de muestra (también conocida) de forma que se conoce exactamente la concentración final de los pesticidas en esa muestra.

2.1.8.4 Recuperación

Una vez identificados los compuestos de interés la veracidad del método se evaluó a partir de la fortificación de 5 réplicas de una determinada masa de muestra "blanco" en diferentes niveles de concentración conocidos. Posteriormente dichas réplicas se analizaron utilizando el método de preparación de muestra (extracción/*clean-up*) seleccionado y el sistema cromatográfico correspondiente. El valor de recuperación se calculó como la relación entre la concentración experimental y la teórica y expresado en porcentaje. **Criterio:** Recuperaciones entre 70 y 120%.

2.1.8.5 Precisión: repetitividad y reproducibilidad intra-laboratorio

La repetitividad del método se evaluó mediante la fortificación de 5 réplicas para cada uno de los niveles seleccionados. A partir de las concentraciones obtenidas se calculó el RSD (%).

La repetitividad del instrumento se determinó a partir de la inyección por quintuplicado de una solución de la curva de calibración en matriz de una solución de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ para los análisis realizados en LC-MS/MS. A partir de las concentraciones obtenidas se calculó el RSD (%) del instrumento. La reproducibilidad intra-laboratorio del método, también expresada como RSD (%), se evaluó a partir del análisis en diferentes días.

Criterio: RSD < 20%.

2.1.8.6 Linealidad

La linealidad de cada uno de los compuestos de interés se estudió a partir de la preparación de curvas de calibración en solvente y en matriz a partir de soluciones de estándares de los pesticidas de interés, de acuerdo a la sección **2.1.1**.

La preparación de la curva en matriz consiste en la extracción de la muestra blanco utilizando el mismo método de análisis que las muestras reales. El extracto obtenido es luego retomado en una solución de los pesticidas de interés a una concentración conocida. Se realiza este procedimiento para cada uno de los puntos de la curva de calibración. A partir de los datos de áreas obtenidos y con la ayuda del programa Microsoft® Excel se graficó el área en función de la concentración, para cada uno de los analitos, obteniéndose comportamientos lineales según inspección visual, cálculo del coeficiente de correlación (r^2) y distribución aleatoria de residuales. **Criterio:** Residuales < $\pm 20\%$.

2.1.8.7 LOD y LOQ

El LOD se estimó a partir de la inyección de la solución menos concentrada de la curva de calibración en matriz. Calculándose mediante regresión, la mínima concentración para la cual se observa una S/N mayor o igual que 3. Para LC-MS/MS se tomó la mínima concentración para la cuál la transición de confirmación presenta una S/N mayor o igual que 3. Este valor fue luego verificado experimentalmente.

El LOQ se determinó como el nivel mas bajo de fortificación de analito sobre la muestra que cumple con los criterios de veracidad y precisión establecidos por DG-SANCO.

Criterio: LOQ \leq LMR.

2.1.8.8 Efecto matriz

Comparación cuantitativa: Se evaluó la supresión u aumento de la señal a partir de la comparación de la pendiente de la curva de calibración de cada estándar en solvente y en matriz según se definió en la sección **1.6** de la Introducción.

Criterio: Establecer el grado de efecto matriz según si es bajo, medio o alto.

2.2 Determinación de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en alcachofa

2.2.1 Reactivos

Agua ultrapura de 18,2 MΩcm de resistividad (ASTM Tipo I) fue obtenida mediante un purificador Millipore (São Paulo, Brasil) Simplicity 185.

La solución stock estándar de Zn de 1000 mg L⁻¹ fue preparada a partir de Zn metálico (Aldrich, 99.99%) disuelto en una cantidad mínima de ácido clorhídrico 1+1 (v+v) y llevado a volumen con agua ultrapura. La solución stock estándar de Fe de 1000 mg L⁻¹ fue preparada a partir de sal de Mohr (sulfato ferroso amónico hexahidratado, Baker) disuelta en agua ultrapura. Soluciones stock estándar de 1000 mg L⁻¹ de As (V), Cd, Cu, Ni y Pb fueron utilizadas (Merck, Alemania). Las curvas de calibración fueron preparadas mediante dilución apropiada de la correspondiente solución stock, utilizando ácido nítrico 0,1% v/v preparado a partir de HNO₃ concentrado (67% v/v, Merck, Alemania).

Soluciones stock de Pd(NO₃)₂ (Merck, Alemania) y Mg(NO₃)₂ (Aldrich Chemical Company, EUA) conteniendo 10000 y 20000 mg L⁻¹ respectivamente, fueron utilizadas para preparar el modificador químico para las determinaciones de Cd y Pb. Solución stock de Nb(NO₃)₅ (Sigma- Aldrich, Suiza) de 1000 mg L⁻¹ fue utilizada para la preparación del modificador permanente para la determinación de As mediante espectrometría de absorción atómica electrotrémica (ETAAS). Acido clorhídrico diluido preparado a partir de HCl concentrado (37% v/v, Merck, Alemania), NaBH₄ (Sigma-Aldrich, EUA) y NaOH (Merck, Alemania) fueron utilizados para la determinación de As mediante espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HGAAS). Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Todo el material de vidrio fue sumergido en ácido nítrico 10% v/v durante toda la noche y luego enjuagado exhaustivamente con agua ultrapura.

2.2.2 Instrumentos

- ✓ Balanza analítica Radwag AS 220/C/2 (Radom, Polonia).
- ✓ Centrifuga Luguimac LC-15 (Buenos Aires, Argentina).
- ✓ Vórtex Qilinbeier 5 (Hangzhou, China).
- ✓ Baño de ultrasonido Cole-Parmer 8893 (Vernon Hills, IL, EUA).
- ✓ Sonda de ultrasonido Sonics Vibracell VC505 (Newtown, CT, EUA).
- ✓ Horno de microondas CEM Mars 6 (Matthews, NC, EUA).
- ✓ Mufla ATEC HFA10 (Montevideo, Uruguay)

- ✓ Espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 200 (Norwalk, CT, EUA).
- ✓ Espectrómetro de absorción atómica Thermo Scientific iCE 3500 (Cambridge, Reino Unido)

2.2.3 Muestras

Las muestras de hojas (2 kg) y frutos (10 kg) de alcachofa utilizadas durante la optimización y la validación, fueron recolectadas en una granja familiar dedicada al cultivo de este vegetal ubicada en el barrio Rincón del Cerro, Montevideo, Uruguay.

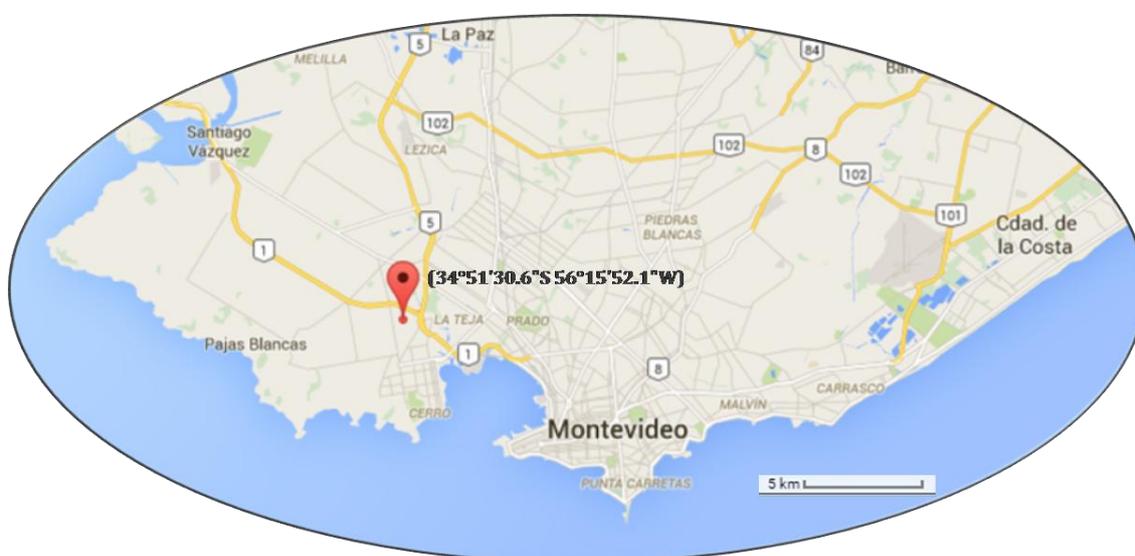


Figura 33 Ubicación geográfica del establecimiento de la familia Bianco en Rincón del Cerro, Montevideo, Uruguay (Extraída de <https://www.google.com.uy/maps/>)

Los fragmentos de hojas fueron identificados como *Cynara cardunculus L.* subsp. *Cardunculus* en sus variedades Green Globe y Purple Globe. El voucher correspondiente al espécimen (MVFQ 4399) fue depositado en el Herbario de la Cátedra de Botánica de la Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

Cuatro muestras de alcachofa (con sus correspondientes hojas y frutos) provenientes de distintos puntos del país, fueron compradas en mercados locales de Uruguay.

Tabla 13 Descripción de las muestras comerciales de alcachofa.

Muestra	Ciudad - Departamento	Cantidad	
		Hoja	Fruto
1	Las Brujas - Canelones		
2	Melilla - Montevideo	~0,5 kg	~2 kg
3	Salto Grande - Salto		
4	Paysandú - Paysandú		

A los efectos de su acondicionamiento, todas las muestras tomadas en su estado original, fueron secadas en horno con circulación de aire a 70 °C, trituradas y guardadas a 20 °C en ausencia de luz.

Un material de referencia certificado de hojas de espinaca (CRM) NIST 1570a fue analizado durante la optimización y utilizado para la evaluación de la veracidad y precisión de los métodos propuestos. Este material fue obtenido a partir de espinaca Grado A EUA congelada y picada.

Antes del tratamiento de muestra, las hojas y frutos de alcachofas trituradas y secas, fueron tamizadas de forma de obtener un tamaño de partícula similar al del CRM (tamaño de partícula de aproximadamente 200 mesh).

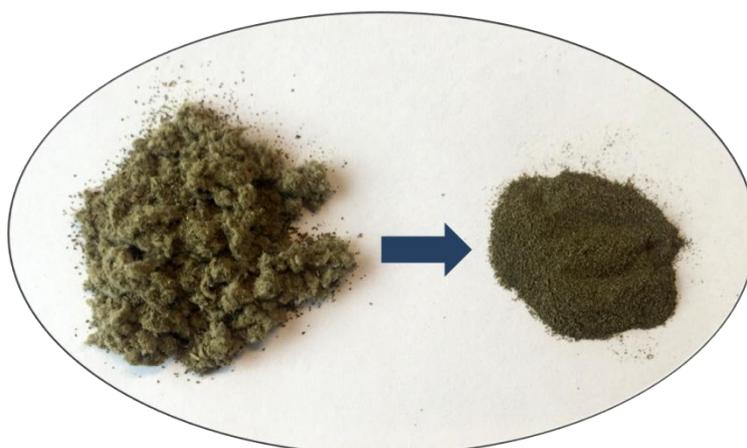


Figura 34 Muestra de hojas de alcachofa. A la izquierda la muestra triturada y a la derecha la muestra luego del tamizado.

2.2.4 Preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras se utilizaron los siguientes dispositivos:

- ✓ Baño de ultrasonido Cole-Parmer 8893 bath (Ultrasonic Cleaners) 47-kHz; 230 VAC y una sonda de ultrasonido (Sonics vibracell) 750-Watt; 20-kHz; 230 VAC equipada con una sonda de aleación de titanio de 13-mm.
- ✓ Para la ozonización, se utilizó el sistema descrito en la **Figura 35**, donde en un tubo impinger comercial de vidrio (borosilicato 3.3, Pyrex®) ubicado a la derecha, se coloca la muestra junto con ácido diluido. El ozono fue generado a partir de oxígeno (99.5%, Linde, Montevideo, Uruguay) utilizando un generador de ozono con descarga corona (OZOX - OG 75-A, Montevideo, Uruguay) con un flujo de oxígeno de 7 L min⁻¹. El ozono pasa a través de la membrana porosa de vidrio situada al final del tubo de vidrio (tamaño de poro: 200 μm) hacia la suspensión conteniendo la muestra. El sistema se completa con tubos de silicona y al final se ubica un recipiente conteniendo solución de Na₂S₂O₅ 5% (w/v) el cual actúa como una trampa para el exceso de gas ozono

generado durante el proceso, evitando de esta forma la contaminación del ambiente. Por lo tanto, el sistema propuesto es totalmente cerrado y seguro.

- ✓ Para la digestión asistida por microondas, se empleó un horno de microondas (CEM, Mars 6) 400-1800 W provisto con 12 vasos de reacción EasyPrep Plus®.

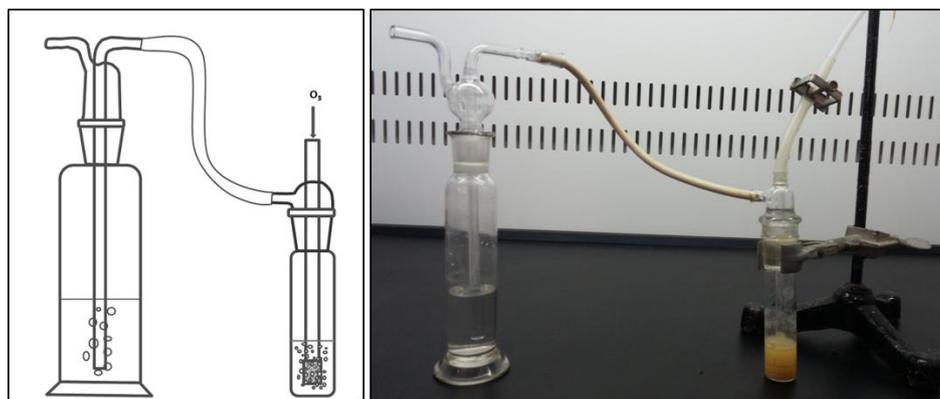


Figura 35 Sistema cerrado para la ozonización de muestras.

2.2.4.1 Método de extracción asistido con ultrasonido utilizando sonda (método A)

Para el método optimizado se pesaron 0,5 g de muestra en un matraz Erlenmeyer y luego se agregaron 10,0 mL de HNO_3 25% (m/m). Luego la sonda de ultrasonido se sumergió en la suspensión de muestra y extractante durante 10 minutos (a 35% de amplitud de sonicación). La suspensión así obtenida fue centrifugada durante 5 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante utilizado para las determinaciones analíticas. Se realizaron blancos de reactivos junto con las muestras.



Figura 36 Sonda de ultrasonido sumergida en un frasco que contiene la muestra y el extractante (ácido diluído).

2.2.4.2 Método de extracción asistido con ultrasonido utilizando baño (método B)

Para el método optimizado se pesaron 0,5 g de muestra en un matraz Erlenmeyer y luego se agregaron 10,0 mL de HNO_3 25% (m/m). El matraz conteniendo la muestra fue luego colocado en el baño de ultrasonido durante 25 minutos. La suspensión así obtenida se centrifugó durante 5 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante se utilizó para las determinaciones analíticas. Se realizaron blancos de reactivos en simultáneo con las muestras. Hasta ocho muestras pueden procesarse simultáneamente en un baño de ultrasonido de laboratorio de 9,5 L de capacidad.



Figura 37 Baño de ultrasonido utilizado para realizar los experimentos.

Para las determinaciones de As utilizando los métodos A y B, 10,0 mL de HCl 50% (m/m) se utilizaron en lugar de HNO_3 25% (m/m). Luego la sonda de ultrasonido se sumergió en la suspensión de muestra y extractante durante 10 minutos (a 35% de amplitud de sonicación) para el método A. En el caso del método B, el matraz conteniendo la muestra se colocó en el baño de ultrasonido durante 60 minutos. Alícuotas de 5,0 mL del sobrenadante fueron tratadas con 0,5 mL de solución de KI 20% (m/v). El KI utilizado en la etapa de pre-reducción se dejó actuar durante 1 hr. Luego las suspensiones obtenidas se colocaron en el reactor de un sistema comercial denominado MHS que estaba acoplado al instrumento de detección. En el reactor se agregó cantidad suficiente de una disolución de NaBH_4 2% (m/v) (preparada en NaOH 1% (m/v)) para formar el hidruro correspondiente. Se colocaron 3 gotas de octanol a cada solución antes de realizar las medidas para evitar la formación de burbujas en el reactor.

2.2.4.3 Método de extracción asistido con ozono (método C)

Para el método optimizado se pesaron 0,5 g de muestra en el tubo de *impinger* de 25 mL y luego se agregaron 10,0 mL de HNO_3 25% (m/m) junto con una gota de silicona, para prevenir la formación de espuma. Luego, el tubo se cerró con la parte superior del

impinger (las dos piezas de vidrio fueron encastradas utilizando una junta esmerilada 20/40 como se muestra en la **Figura 35**) y se dejó barbotear ozono durante 10 minutos. El procedimiento se realizó a temperatura ambiente. Luego de la ozonización, la suspensión obtenida fue centrifugada durante 5 minutos a 3000 rpm y el sobrenadante utilizado para las determinaciones analíticas. Se realizaron blancos de reactivos junto con las muestras.

Para cuantificar la concentración de ozono generada en el seno de la solución, se llevó a cabo una titulación iodométrica de acuerdo al método estándar APHA (116). Este método consistió en el barboteo de gas ozono en una solución de KI 20 g L⁻¹, y la cantidad de iodo formada fue luego valorada con una solución estándar de Na₂S₂O₃ 0,005 mol L⁻¹ utilizando solución de almidón como reactivo indicador. La concentración de ozono en solución luego de un barboteo de 10 minutos (condiciones óptimas) fue de 14 mg L⁻¹. Las reacciones involucradas son:



2.2.4.4 Método de digestión asistido por microondas (método D)

Para este método se pesaron 0,5 g de muestra en los vasos de reacción *EasyPrep Plus*® y se agregaron 10,00 mL de HNO₃ concentrado. La programación de temperatura fue la siguiente: potencia 400-1800 W, rampa de temperatura: 15 min hasta alcanzar 200 °C, 10 min a 200 °C, presión 500 psi. Se realizaron blancos de reactivos junto con las muestras. Este fue considerado como método de referencia (método de digestión total) para la validación de las determinaciones de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en alcachofa mediante los métodos propuestos A, B y C.



Figura 38 Horno microondas utilizado para los tratamientos de muestra.

2.2.4.5 Método de mineralización vía seca mediante calcinación (método E)

Se llevó a cabo la preparación de muestra para la determinación de As mediante calcinación según el método estándar AOAC 957.22 modificado (117) (118). Para este método se trataron 0,5 g de muestra en crisoles de porcelana junto con 0,2 g de MgO y se colocaron en mufla. El MgO se agregó a efectos de evitar una posible pérdida de analito debido a la volatilización a altas temperaturas. Se trabajó con temperatura controlada y aumentando lentamente la misma hasta alcanzar 450 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 2 horas. Las cenizas obtenidas fueron retomadas en 1 mL de HCl concentrado y llevadas a un volumen final de 5 mL con agua destilada. Se agregaron 0,5 mL de solución reductora de KI 20% (m/v) y se dejó transcurrir 1 hora. El agregado de KI es necesario para asegurar que las especies de arsénico se encuentren en su estado de oxidación (+3), ya que es bajo esta forma química que puede ser detectado con la instrumentación utilizada. Las determinaciones se realizaron mediante espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS). Este método fue considerado como método de referencia (mineralización completa) para la determinación de As mediante HG-AAS.



Figura 39 Mufla utilizada para llevar a cabo la calcinación de las muestras.

2.2.4.6 Preparación de infusiones

Para la preparación de las infusiones se siguió un protocolo estandarizado según Cañigueral et al. (119). Se colocaron 20 g de muestra (hoja o fruto) en contacto con 1000 mL de agua ultrapura a 95 °C durante 10 minutos. El extracto acuoso obtenido fue filtrado por papel de filtro (Whatman Grado 1: 11 µm) por gravedad y utilizado para las determinaciones analíticas.

2.2.5 Determinaciones analíticas

Las determinaciones analíticas de Cu, Fe y Zn fueron realizadas mediante absorción atómica de llama (FAAS) utilizando el espectrómetro Perkin Elmer AAnalyst 200 (Norwalk, CT, EUA) equipado con un quemador de 10 cm y operado a las líneas analíticas de 324,75 nm (Cu), 248,33 nm (Fe) y 213,86 nm (Zn) respectivamente. Las lámparas de cátodo hueco utilizadas (Photron, Narre Warren, Australia) fueron operadas según las recomendaciones del fabricante. La composición de la llama fue acetileno (2,5 L min⁻¹) - aire (10,0 L min⁻¹).

Las determinaciones analíticas de As (mediante ozonización), Cd, Ni y Pb fueron realizadas mediante espectrometría de absorción atómica electrotérmica (ETAAS) utilizando el espectrómetro Thermo Scientific iCE 3500 (Cambridge, Reino Unido) equipado con un atomizador de horno de grafito, auto-sampler y corrección de fondo basada en el efecto Zeeman. Un módulo de horno de tubo de grafito calentado transversalmente (GFS35Z) y un módulo auto-sampler (GFS33), ambos de Thermo Fisher Scientific, fueron utilizados. Las lámparas de cátodo hueco utilizadas (Photron, Pty. Ltd., Victoria, Australia), fueron operadas a las líneas analíticas de 193,7 nm (As), 228,8 nm (Cd), 232,0 nm (Ni) y 283,3 nm (Pb) respectivamente. El espectrómetro fue controlado mediante un software específico, SOLAAR (Thermo Scientific, Cambridge, Reino Unido). La absorbancia integrada (área de pico) fue utilizada para evaluación de las señales y la cuantificación. Tubos de grafito de vida extendida (Thermo Scientific) fueron utilizados para todas las determinaciones. Gas argón 99,998% (Linde, Montevideo, Uruguay) fue utilizado como gas de purge y protector. Los programas de calentamiento del horno de grafito utilizados para a las determinaciones analíticas se muestran en la **Tabla 14** donde se presentan las condiciones operativas optimizadas para cada analito.

Tabla 14 Programas de temperatura de ETAAS para la determinación de As, Cd, Ni y Pb en CRM y muestras de alcachofa (^aAs, ^bCd, ^cNi, ^dPb).

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C s ⁻¹)	Tiempo de espera (s)	Flujo de gas Ar (L min ⁻¹)
Secado 1	100	10 ^{a,c,d} /5 ^b	30	0,2
Secado 2 ^b	140	15	20	0,2
Pirolisis	1200 ^a /350 ^b /1000 ^{c,d}	15 ^a /10 ^b /150 ^{c,d}	15 ^a /0 ^b /20 ^{c,d}	0,2
Atomización	2200 ^a /1500 ^b /2500 ^c /1800 ^d	0	3	0
Limpieza	2600	0	3	0,2

Para las determinaciones de Cd y Pb, las temperaturas óptimas de pirolisis y atomización fueron 350/1000°C y 1500/1800 °C para Cd/Pb respectivamente. Los volúmenes de

inyección de muestra fueron de 20 μL . El modificador químico de matriz utilizado fue: 10 μL de solución conteniendo 5 μg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ y 3 μg de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$. En el caso del Cd dos etapas de secado fueron requeridas (120).

Para la determinación de As, el tubo de grafito fue tratado con Nb (121) pipeteando 50 μL de solución de $\text{Nb}(\text{NO}_3)_5$ de 1000 mg L^{-1} y sometiendo el tubo al siguiente programa de temperatura: [temperatura/rampa/tiempo de espera]: secado (100 $^\circ\text{C}/10 \text{ s}/60 \text{ s}$), atomización (2700 $^\circ\text{C}/0 \text{ s}/5 \text{ s}$) (122). El procedimiento entero fue repetido 6 veces de forma de obtener 300 μg de modificador permanente sobre las paredes del tubo. Las temperaturas óptimas de pirolisis y atomización fueron 1200 $^\circ\text{C}$ y 2200 $^\circ\text{C}$ respectivamente para la determinación de As. Los volúmenes de inyección de muestra fueron de 30 μL .

Para la determinación de Ni, las temperaturas óptimas de pirolisis y atomización fueron 1000 $^\circ\text{C}$ y 2500 $^\circ\text{C}$ respectivamente. No fue necesaria la utilización de modificador químico de matriz.

En todos los casos, el flujo de gas argón fue de 0,2 mL min^{-1} , excepto durante la etapa de atomización.



Figura 40 Espectrómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica Thermo iCE 3500.

Las determinaciones de As, luego de las extracciones asistidas con ultrasonido (métodos A y B), fueron llevadas a cabo mediante espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HGAAS) utilizando el espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 200, acoplado a un sistema MHS® Perkin Elmer generador de hidruros. Las condiciones operativas fueron: longitud de onda 193,7 nm, corriente de la lámpara de descarga sin electrodos (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA) de 400 mA, ancho de rendija de 0,5 nm y llama acetileno (2,5 L min^{-1}) - aire (10,0 L min^{-1}). Gas nitrógeno 99,99% (Linde, Montevideo, Uruguay) fue utilizado como gas carrier (flujo 60 mLmin^{-1}). El atomizador

consistió en una celda tubo de cuarzo en forma de “T” con un camino óptico de 165 mm y un diámetro de 12 mm, calentada aproximadamente a 900 °C gracias a la llama.



Figura 41 Espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 200 acoplado a sistema MHS®.

2.2.5 Optimización de las condiciones de extracción

La influencia de dos variables (concentración de ácido y tiempo de sonicación/ozonización) fueron estudiadas para los métodos A, B y C, mediante diseños experimentales factoriales de tipo central compuesto de tres niveles utilizando el CRM (NIST 1570a – Hojas de espinaca) (123). Estos experimentos fueron llevados a cabo para las determinaciones de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn. En el caso de Fe, dado que el CRM no informaba el valor de concentración certificado para dicho elemento, se realizaron los experimentos utilizando las muestras de alcachofa y se comparó directamente con el método de referencia (método D). En las siguientes tablas se resumen los experimentos realizados: Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Los diseños factoriales son una clase de diseños experimentales generalmente muy económicos, es decir, ofrecen una gran cantidad de información útil a partir de un pequeño número de experimentos. Los diseños factoriales involucran un cierto número de niveles (o valores) de cada uno de los factores (o variables de interés). Por lo tanto, cuando el interés se encuentra dirigido hacia los efectos producidos por la concentración de extractante y el tiempo de extracción, como ocurre en este caso, se debe considerar un diseño factorial de dos factores. En particular, el diseño central compuesto, surge de la yuxtaposición de un diseño “estrella” con $2k + 1$ combinaciones de factores y un diseño factorial de dos niveles y k factores con 2^k combinaciones de factores, para dar un total de $2^k + 2k + 1$ combinaciones. Cuando el centro de la estrella y del diseño factorial coinciden, el diseño se denomina “central”. La **Figura 42** muestra un diseño central compuesto de dos factores a dos niveles con $2^2 + (2 \times 2) + 1 = 9$ condiciones experimentales.

Los niveles pueden representarse de varias formas. Generalmente el nivel + (o +1) indica el nivel más alto, el nivel - (o -1) indica el nivel más bajo y el 0 indica el centro, el valor entre medio.

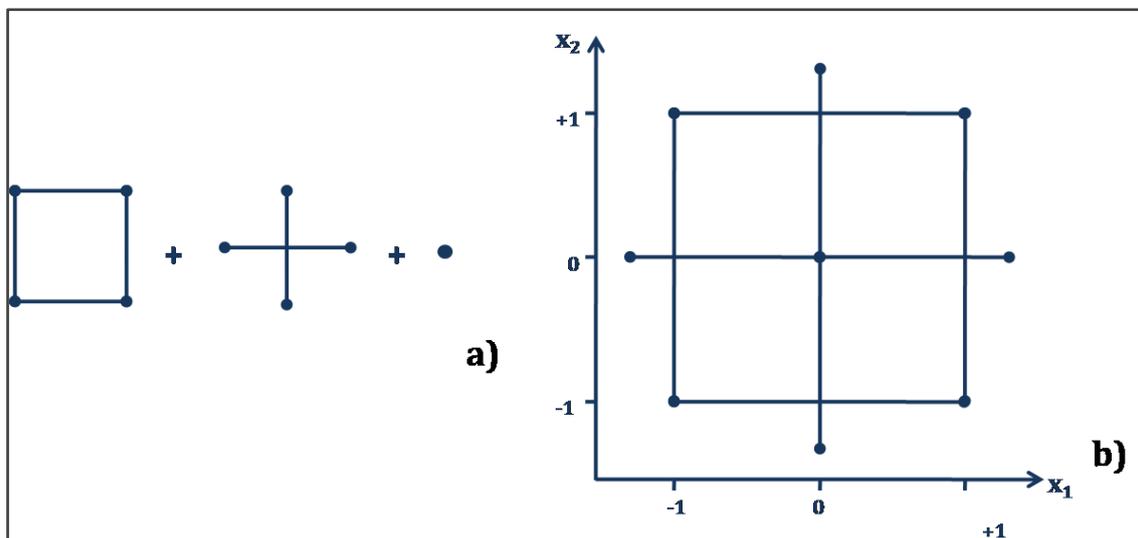


Figura 42 Diseño central compuesto de dos factores: a) El diseño consiste de un diseño factorial 2^2 combinaciones, más un diseño estrella y el punto central. b) El diseño compuesto. Figura adaptada de Massart et al. 1997 (123).

Tabla 15 Diseño central compuesto para los métodos A y C.

Experimento	Concentración de HNO_3 (% w/w)	Tiempo de sonicación u ozonización (min)
1	15	5
2	15	20
3	25	10
4	50	5/20 ^b
5	50/25 ^{a b}	10/25 ^a /30 ^b

^a Cd y Pb, ^b Fe.

Tabla 16 Diseño central compuesto para el método B.

Experimento	Concentración de HNO_3 o HCl * (% w/w)	Tiempo de sonicación (min)
1	15	15 / 30 ^a
2	15	35 / 60 ^a
3	25	25 / 45 ^a
4	50	15 / 30 ^a
5	50/25 ^b	35 / 60 ^a

* HCl solo para la determinación de As. ^a Tiempo de sonicación para la determinación de As y Fe.

^b Concentración de ácido para la determinación de Fe.

Una vez que las variables fueron optimizadas, se llevo a cabo la validación de las metodologías analíticas siguiendo las recomendaciones of Eurachem Guide: The Fitness

for Purpose of Analytical Methods (124). El método de digestión asistida por microondas (método de digestión total) fue considerado como método de referencia para las determinaciones de los analitos en estudio en hojas y frutos de alcachofa.

2.3 Determinación del contenido fenólico y estudio de actividad antioxidante en alcachofa

2.3.1 Reactivos

Los reactivos α,α' -Azodiisobutiramidina diclorhidrato (AAPH) y trolox fueron obtenidos de Fluka Chemie GmbH (Steinheim, Alemania). Los reactivos dihidrorodamina 123 (DHR), 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2), H_2O_2 (30%), solución de hipoclorito de sodio con 4% de cloro disponible, 3-(aminopropil)-1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazina (NOC-5), β -nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), metosulfato de fenazina (PMS), cloruro de nitroazul de tetrazolio (NBT), histidina, peroxidasa de rábano picante (HRP), 10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina (amplex red), ácido ascórbico, tiron, lucigenina, ácido clorogénico, luteolina, apigenina, acetonitrilo, ácido fórmico y todas las otras sales químicas y solventes de calidad analítica y calidad HPLC se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

El agua ultrapura fue obtenida del purificador arium® pro system (Sartorius, Alemania). Todos los estándares de compuestos fenólicos mostraron al menos 95% de pureza, determinados mediante HPLC-DAD.

2.3.2 Preparación de los extractos de hojas de alcachofa

Dos extractos acuosos (infusión y decocción) y un extracto hidroalcohólico fueron preparados de acuerdo a protocolos estandarizados según Cañigueral et al. (119).

Extracto de infusión: Se colocaron 20 g de hojas secas en contacto con 1000 mL de agua ultrapura a 95 °C durante 10 minutos. El extracto acuoso obtenido fue filtrado por algodón y liofilizado.

Extracto de decocción: A 20 g de hojas secas se agregaron 1000 mL de agua ultrapura, se calentó hasta ebullición y se mantuvo durante 10 min en esas condiciones. Luego la mezcla fue removida del calor y estacionada durante 5 min, para luego ser filtrada por algodón y posteriormente liofilizada.

Extracto hidroalcohólico: A 20 g de hojas secas se agregaron 1000 mL de una mezcla etanol/agua (70:30 v/v). La misma fue colocada en un shaker orbital y agitada a 70 rpm

durante 12 h a 25 °C. El extracto obtenido fue filtrado por algodón, concentrado a presión reducida en evaporador rotatorio (Büchi RE 111, Suiza) y luego liofilizado.

Todos los extractos liofilizados fueron guardados en recipientes de vidrio color ámbar, sellados bajo corriente de N₂ y guardados en condiciones libres de luz a -18 °C hasta el momento del análisis. Los rendimientos obtenidos para los extractos de decocción, infusión e hidroalcohólico fueron 4,9 g, 5,7 g y 2,4 g respectivamente. Es importante destacar que el extracto hidroalcohólico fue preparado de manera similar al producto farmacéutico de similares características comercializado en Uruguay.

2.3.3 Análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD-ESI-MS/MS

El análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD fue realizado en un sistema Accela LC (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) equipado con bombas cuaternarias (Accela 600), detector DAD y auto-sampler enfriado a 5 °C. El equipo fue conectado en serie a un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap™ XL (MS/MS) (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) con fuente de ionización electrospray (ESI), y sistema híbrido combinando una trampa de iones lineal y el analizador de masas Orbitrap. Para el análisis cromatográfico, muestras y solventes fueron filtrados mediante membranas de 0,22 µm (OlimPeak, Teknokroma®, España) y 0,45 µm (Billerica, MA, EUA) respectivamente.

Los compuestos fenólicos de cada extracto fueron analizados luego de disolver aproximadamente 3 mg de cada extracto en 1,5 mL de mezcla metanol/agua (1:1, v/v). La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD-ESI-MS/MS fue llevada a cabo utilizando una columna C18 Synergi Hydro (4 µm, 250 × 4,6 mm, Phenomenex) a 0,9 mL min⁻¹, con una temperatura de columna de 29 °C, con una fase móvil en gradiente lineal constituida por agua/ácido fórmico (99,5:0,5, v/v) y acetonitrilo/ácido fórmico (99,5:0,5, v/v) (125). Los espectros de masa fueron adquiridos con un rango de scan desde 100 hasta 1000 m/z; los parámetros MS fueron ajustados de la siguiente manera: fuente ESI en modo de ión negativo; temperatura del capilar de 275 °C y voltaje del capilar de 2,5 kV. Los flujos de gas protector y gas auxiliar fueron 40 y 10 respectivamente (en unidades arbitrarias según ajustes de software) y la energía de colisión normalizada para los experimentos MS/MS 35%. Los compuestos fenólicos fueron tentativamente identificados basado en la siguiente información: orden de elución, tiempo de retención de los picos, y espectros UV-visible y de masas (relación m/z exacta, patrones de fragmentación en MS/MS) comparando con los estándares correspondientes analizados bajo las mismas condiciones y la información disponible en la literatura para muestras de alcachofa (107) (108) (126) (110). Los compuestos fenólicos fueron cuantificados

mediante calibración externa utilizando curvas de calibración de seis puntos (cada punto por duplicado) para ácido clorogénico (0,5-49,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 325 nm, $r^2 \geq 0,99$), luteolina (0,6-20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 348 nm, $r^2 \geq 0,99$) y expresados como mg/g de extracto (en base seca), considerando tres procedimientos de extracción independientes (n = 3).

2.3.3.1 Ensayos de actividad secuestrante de especies ROS y RNS

Estos estudios se realizaron en la Universidad de Porto a partir de los extractos realizados en Uruguay con el mismo material vegetal registrado en el Herbario de Facultad de Química y se publicaron en el artículo: M. Pistón, I. Machado, C. S. Branco, V. Cesio, H. Heinzen, D. Ribeiro, E. Fernandes, R. Campos Chisté, M. Freitas. *Food Research International* 60 (2014) 150-156.

Se describen a continuación en forma resumida los métodos correspondientes.

Todos los análisis fueron realizados en un lector de microplacas (Synergy HT, BIO-TEK), equipado con termostizador, utilizando detección colorimétrica, fluorimétrica o quimioluminiscente. Para cada estudio se realizaron, al menos, cuatro experimentos independientes por triplicado, utilizando cinco concentraciones. Todos los ensayos fueron realizados a 37 °C. Los extractos de alcachofa fueron disueltos en el mismo buffer para los estudios de actividad secuestrante de especies ROS y RNS. En cada ensayo, experimentos adicionales fueron realizados para verificar posibles interferencias de la matriz con la metodología utilizada. Los valores de IC_{50} fueron calculados a partir de curvas de porcentaje de inhibición versus concentración del antioxidante, utilizando el software GraphPad Prism 5. Los compuestos quercetina, tiron y ácido ascórbico fueron utilizados como controles positivos.

2.3.3.2 Ensayo de actividad secuestrante de radical superóxido

El radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ fue generado a partir del sistema NADH/PMS/ O_2 y su capacidad secuestrante determinada mediante el monitoreo del efecto de los extractos sobre la reducción inducida por el radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ del NBT a 560 nm luego de 2 minutos (7). Los efectos fueron expresados como el porcentaje de inhibición de la reducción de NBT a diformazano.

2.3.3.3 Ensayo de actividad secuestrante de peróxido de hidrógeno

La capacidad secuestrante del H_2O_2 utilizando amplex red fue llevada a cabo según trabajos anteriores del equipo de trabajo (127) con algunas modificaciones. Las mezclas de reacción contenían los siguientes reactivos a la concentración final indicada (en un

volumen final de 250 μ L): buffer Tris-HCl 50 mM pH 7,4, amplex red 25 μ M, HRP 0,25 U/mL, extractos de alcachofa 6 - 1000 μ g/mL y H₂O₂ 1%. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 530 \pm 20 y 590 \pm 20 nm respectivamente. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de inhibición de la oxidación inducida por el H₂O₂ del amplex red.

2.3.3.4 Ensayo de actividad secuestrante de ácido hipocloroso

La actividad secuestrante del HOCl fue medida mediante el monitoreo del efecto producido por los extractos sobre la oxidación inducida por el HOCl de la DHR a rodamina 123 (7). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de inhibición de la reacción de oxidación inducida por HOCl de la DHR.

2.3.3.5 Ensayo de actividad secuestrante de oxígeno singulete

La capacidad secuestrante del ¹O₂ fue medida mediante el monitoreo del efecto de los extractos sobre la reacción de oxidación de la DHR no fluorescente a rodamina 123 fluorescente por acción de esta especie ROS (7). El ¹O₂ fue generado mediante descomposición térmica un endoperóxido NDPO₂ (disodio 3,3'-(1,4-naftaleno) bispropionato) soluble en agua previamente sintetizado (128). Los resultados (n = 2) fueron expresados como el porcentaje de inhibición de la reacción de oxidación inducida por ¹O₂ de la DHR.

2.3.3.6 Ensayo de actividad secuestrante de radical peroxilo

El ROO• fue generado mediante descomposición térmica de AAPH a 37 °C y su capacidad secuestrante medida mediante el monitoreo del efecto de los extractos de alcachofa sobre el decaimiento en la intensidad de la fluorescencia producto de la reacción de oxidación inducida por el ROO• de la fluoresceína (129). La señal de fluorescencia fue luego monitoreada a cada minuto a la longitud de onda de emisión 528 \pm 20 nm con excitación a 485 \pm 20 nm hasta decaimiento total. Solución de trolox (0,2-6 μ g/mL) fue utilizada como control estándar en cada ensayo. La capacidad secuestrante relativa del ROO• fue luego expresada como la relación entre la pendiente de cada extracto (o control positivo) y las pendientes obtenidas con trolox, según lo sugerido por Rodrigues et al. (130).

2.3.3.7 Ensayo de actividad secuestrante de óxido nítrico

La capacidad secuestrante del $\bullet\text{NO}$ fue medida mediante el monitoreo del efecto de los extractos sobre la reacción de oxidación inducida por el $\bullet\text{NO}$ de DAF-2 no fluorescente a triazolofluoresceína (DAF-2T) fluorescente (7). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de inhibición de la reacción de oxidación inducida por $\bullet\text{NO}$ de DAF-2.

2.3.3.8 Ensayo de actividad secuestrante de peroxinitrito

La capacidad secuestrante del ONOO^- fue medida mediante el monitoreo del efecto de los extractos sobre la reacción de oxidación inducida por ONOO^- de la DHR no fluorescente a rodamina 123 fluorescente (7). Esta evaluación es importante ya que, en condiciones fisiológicas, la reacción entre ONOO^- y bicarbonato es predominante, con una constante de velocidad muy alta ($k = 3\text{-}5,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (131). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de inhibición de la reacción de oxidación inducida por ONOO^- de la DHR.

2.4 Estudio de bioaccesibilidad de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa

2.4.1 Reactivos

Agua ultrapura de 18,2 M Ω cm de resistividad (ASTM Tipo I) fue obtenida mediante un purificador Millipore (São Paulo, Brasil) Simplicity 185.

Acido clorhídrico diluido preparado a partir de HCl concentrado (37% v/v, Merck, Alemania), NaOH (Merck, Alemania), NaHCO₃ (Merck, Alemania).

Enzimas pepsina y pancreatina (Sigma-Aldrich, E.E.U.U)

Soluciones stock estándar de Cu, Fe, Ni y Zn de 1000 mgL⁻¹ descritas en la sección **2.2.1**.

Todo el material de vidrio fue sumergido en ácido nítrico 10% v/v durante toda la noche y luego enjuagado exhaustivamente con agua ultrapura antes de su utilización.

2.4.2 Instrumentos

- ✓ Balanza analítica Radwag AS 220/C/2 (Radom, Polonia).
- ✓ Centrífuga Luguimac LC-15 (Buenos Aires, Argentina).
- ✓ Baño de agua térmico Memmert GmbH WNB45 (Schwabach, Alemania).
- ✓ Vórtex Qilinbeier 5 (Hangzhou, China).
- ✓ Espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 200 (Norwalk, CT, EUA).
- ✓ Espectrómetro de absorción atómica Thermo Scientific iCE 3500 (Cambridge, Reino Unido)

2.4.3 Muestras

Se utilizaron las mismas muestras de frutos de alcachofa secas y tamizadas utilizadas para la optimización de las metodologías analíticas (muestras blanco) y las muestras comerciales (muestras 1, 2, 3 y 4) descritas en la sección **2.2.3**.

2.4.4 Procedimiento de preparación de la muestra

2.4.4.1 Preparación de las soluciones de simulación de jugo gástrico y jugo intestinal

La solución de jugo gástrico simulada fue preparada mediante la disolución de 0,32 g de pepsina en 1 mL de HCl 12 M, seguido de la adición de agua ultrapura hasta completar un volumen final de 100 mL. Luego se ajustó el pH a 1,2 mediante el agregado de un volumen

adecuado de HCl 0,1 M. Dado que la actividad de la pepsina decae con el tiempo, la solución debe prepararse fresca antes de realizar el análisis.

La preparación de la solución de jugo intestinal simulada fue preparada mediante la disolución de 0,5 g de pancreatina en 8 mL de NaOH 0,2 M, seguido de la adición de agua ultrapura hasta completar un volumen final de 100 mL. Luego se ajustó el pH a 6,8 mediante el agregado de un volumen adecuado de solución de NaHCO₃ 3% (m/v).

2.4.4.2 Digestión gástrica

Una porción de 0,5 g de muestra de fruto obtenido según la sección 2.2.3 fue colocada en un tubo de polietileno con tapa (50 mL) junto con 5,0 mL de solución de jugo gástrico (pH 1,2). La mezcla fue agitada en vórtex durante 2 minutos y luego se colocó en el baño de agua termostatizado a 37 °C y se dejó incubando durante 2 horas. La mezcla fue agitada de forma manual periódicamente. Cada experimento se realizó por triplicado. Se realizaron blancos de reactivos que también se incubaron junto con las muestras (132).

2.4.4.3 Digestión intestinal

De forma de simular la digestión intestinal, el pH de la mezcla obtenida luego de la digestión gástrica fue ajustado a 6,8 mediante la adición gota a gota de solución de NaHCO₃ 3% (m/v). Se agregó luego 5,0 mL de solución de jugo intestinal y la mezcla fue agitada en vórtex durante 2 minutos. Por último, la mezcla se colocó en el baño de agua termostatizado a 37 °C y se dejó incubando durante otras 2 horas. La mezcla fue agitada de forma manual periódicamente. Cada experimento se realizó por triplicado. Transcurrido ese tiempo, la muestra fue retirada del baño y centrifugada durante 10 min a 3000 rpm. El sobrenadante fue utilizado para las determinaciones analíticas de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn mediante absorción atómica de llama (Cu, Fe, Zn) y absorción atómica electrotrémica (As, Cd, Ni, Pb) según las condiciones descriptas en la sección 2.2.5. Blancos de reactivos fueron realizados e incubados junto con las muestras (132).

La temperatura de incubación de 37 °C fue seleccionada para que coincidiera con la temperatura normal del cuerpo humano, permitiendo así que las enzimas digestivas funcionaran eficientemente.



Figura 43 Imágenes del proceso de digestión gastrointestinal simulado.

2.4.4.4 Cálculo del porcentaje de bioaccesibilidad

El porcentaje de bioaccesibilidad fue definido como la fracción (concentración) del elemento extraído durante el proceso de digestión simulada, comparada con la cantidad total (concentración) del elemento en la matriz, y el valor fue calculado de acuerdo a la siguiente relación (132):

$$\text{Bioaccesibilidad (\%)} = \left(\frac{\text{Fracción total extraída del elemento}}{\text{Concentración total del elemento}} \right) \times 100 \quad (2.3)$$

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN

3.1 Determinación de residuos de pesticidas en alcachofa

3.1.1 Optimización de las condiciones cromatográficas y MRM para el análisis mediante LC-MS/MS

Una de las primeras etapas durante el desarrollo del método cromatográfico es la selección de las condiciones de trabajo del LC; tipo de fase móvil, flujo de fase móvil, volumen de inyección y temperatura de la columna. Con respecto a la temperatura de la columna, para evitar la posible degradación de los pesticidas se trabajó a temperatura ambiente. Se utilizaron las fases móviles definidas en la sección 2.1.6.3. El ácido fórmico actúa como un modificador mejorando la sensibilidad y resolución de los iones en la fuente de ionización. Se realizaron diferentes inyecciones con diferentes proporciones de estas FM de forma de optimizar el programa de gradiente a utilizar. El flujo óptimo de fase móvil fue de 0,6 mL min⁻¹. El volumen de inyección fue 5 µL, suficiente para alcanzar una buena sensibilidad.

Según la normativa de la UE para lograr una correcta identificación y confirmación de los analitos mediante LC-MS/MS es necesario la optimización de dos transiciones (MRM) por compuesto. Por lo que se optimizó el ión precursor y dos iones fragmento, de forma que la transición menos intensa (MRM2) se utilizó para la confirmación mientras que la más abundante (MRM1) se usó para la cuantificación de los analitos de interés. El criterio de confirmación utilizado para cada compuesto fue el recomendado por la DG SANCO, que se basa en la presencia de ambas transiciones al mismo tiempo de retención, la coincidencia del t_R de estas transiciones con las de un estándar y además la relación (MRM2/MRM1) en la muestra problema debe coincidir con la relación (MRM2/MRM1) obtenida para el estándar.

En relación a las transiciones seleccionadas, en general fueron todas mayores que m/z 100, excepto para algunos compuestos como hexaconazol y tebuconazol, en donde uno de los fragmentos fue menor que 80. El usar m/z bajos, representa una desventaja, ya que disminuye la especificidad, sin embargo se seleccionaron esos iones porque los fragmentos encontrados no eran lo suficientemente sensibles.

La **Figura 44** muestra un cromatograma de iones totales conteniendo todas las transiciones de los pesticidas en estudio a 10 µg L⁻¹ en hojas de alcachofa (XIC, *Extracted Ion Chromatogram*).

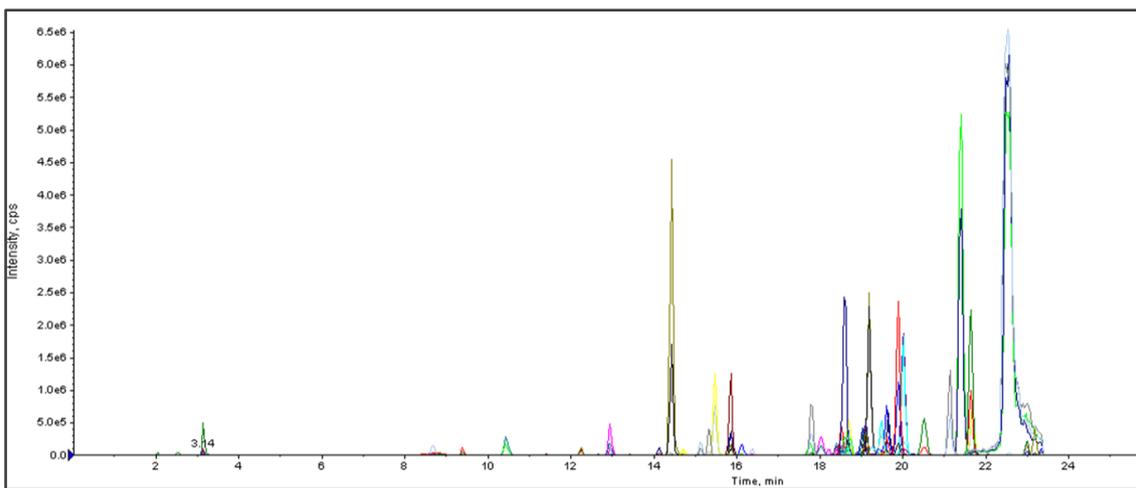


Figura 44 Cromatograma de iones totales de todos los pesticidas analizados en hojas de alcachofa $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

3.1.2 Selección del método de preparación de muestra.

De forma de seleccionar el método mas adecuado para extraer los pesticidas de la matriz en estudio, fue necesario comparar la respuesta a diferentes procedimientos de extracción. De acuerdo con esto, tres metodologías multiresiduo diferentes fueron ensayadas sobre muestras blanco fortificadas con 15 pesticidas (insecticidas, fungicidas y herbicidas) a $200 \mu\text{g L}^{-1}$: un método QuEChERS citrato modificado (sección 2.1.6.1), un método de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) (sección 2.1.6.2) y un método de extracción con acetato de etilo y *clean-up* dispersivo (sección 2.1.6.3). Los extractos obtenidos fueron luego analizados mediante GC-MS. De los tres métodos evaluados, QuEChERS citrato modificado exhibió el mejor desempeño para los 15 compuestos seleccionados con recuperaciones entre 70 y 120% y valores de RSD menores al 20%, mientras que para el método de extracción con acetato de etilo y el método MSPD solo se obtuvieron 8 compuestos con recuperaciones adecuadas. De acuerdo con los lineamientos de la DG-SANCO, las recuperaciones deben estar en el rango 70 - 120% y la precisión expresada como RSD debe ser menor al 20%. Los resultados de la comparación de métodos se muestran en la **Tabla 17**.

Al observar la **Tabla 17**, se puede notar como con el método MSPD, 7 de los 15 pesticidas no fueron detectados: clorfenvinfos, deltametrina, difenoconazol, iprodiona, propiconazol, pyraclostrobin y tebuconazol. La mayoría de ellos son fungicidas excepto por el clorfenvinfos y la deltametrina que son insecticidas. Además provienen de familias químicas diversas: triazoles, piretroides, organofosforados, hidantoínas y estrobilurinas. Mediante la extracción con acetato de etilo solo 1 de los pesticidas no fue detectado (pyraclostrobin) y 6 de los pesticidas presentaron recuperaciones bajas, no cumpliendo con los lineamientos de DG-SANCO. Todos ellos son fungicidas, a excepción del clorfenvinfos.

Los compuestos chlorfenvinfos, iprodiona y pyraclostrobin tuvieron problemas tanto en el método MSPD como en el método de extracción con acetato de etilo, sobre todo el pyraclostrobin, que no fue detectado en ninguno de los dos casos. Los valores de RSD fueron menores al 20% para ambos métodos, salvo para el caso de lambda-cialotrina en el método MSPD, cuyo valor fue 43,7%.

Tabla 17 Resultados de la comparación de métodos de extracción evaluados mediante GC-MS.

Nombre común del Pesticida	QuEChERS		AcOEt		MSPD	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Azoxystrobin	86,0	14,4	39,6	11,0	72,5	2,9
Boscalid	82,1	14,9	28,2	8,3	70,9	1,8
Clorfenvinfos	79,2	8,4	44,1	6,8	-	-
Cipermetrina	118,5	11,2	104,2	8,6	100,3	4,5
Deltametrina	114,2	15,1	100,6	8,6	-	-
Difenoconazole	85,6	6,8	71,2	11,3	-	-
Iprodiona	109,0	9,1	49,4	9,4	-	-
Lambda-Cialotrina	73,4	13,7	70,5	6,7	114,5	43,7
Metiocarb	84,5	11,6	81,5	7,7	81,6	11,9
Propiconazol	86,0	7,0	83,9	3,1	-	-
Piraclostrobin	90,4	25,0	-	-	-	-
Tau-Fluvalinato	116,6	16,4	100,5	6,4	94,6	4,0
Tebuconazol	80,8	20,4	136,3	10,0	-	-
Tetradifon	107,8	10,3	107,0	8,0	104,1	18,1
Vinclozolina	113,9	14,9	57,3	12,2	89,5	14,3

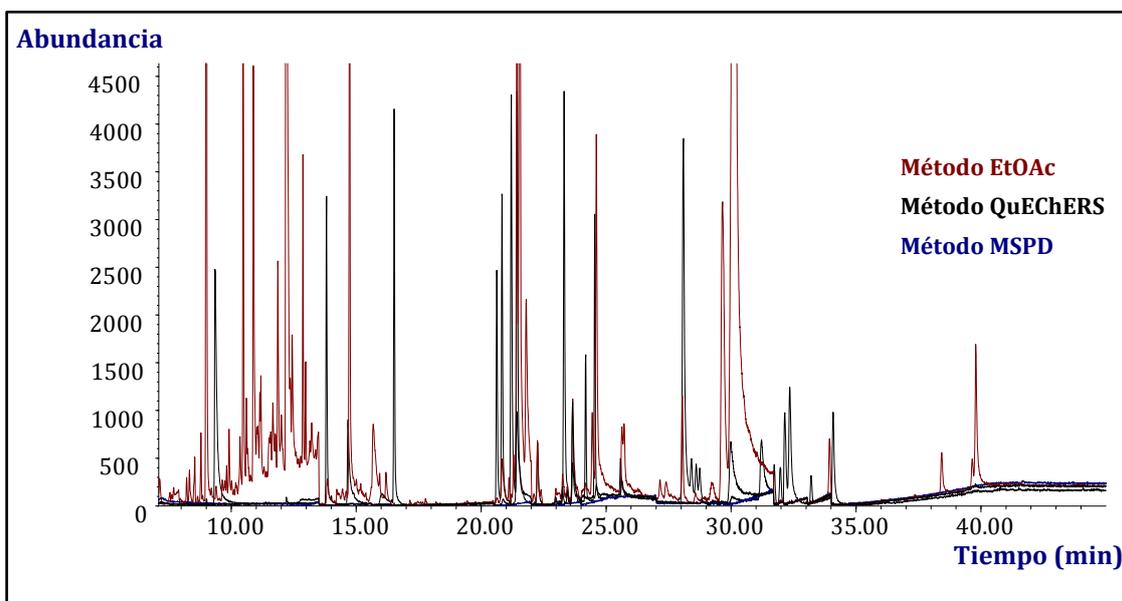
Las bajas recuperaciones obtenidas mediante la extracción con acetato de etilo pueden deberse a la presencia del carbono grafitizado (GCB) aplicado durante la etapa de *clean-up*. Ciertos tipos de pesticidas son especialmente propensos a adsorberse sobre el GCB (133). Es bien sabido que el GCB posee la habilidad de adsorber moléculas planas, tales como clorofilas y otros pigmentos, pero también puede retener a aquellos pesticidas que posean funcionalidad planar. Pero en este caso es poco probable, ya que ninguno de los pesticidas en cuestión presenta geometría plana. Otra explicación posible puede ser debida al propio solvente; el acetato de etilo tiene una pobre habilidad para penetrar ciertos tejidos vegetales (133). Además, siempre hay que tener en cuenta la solubilidad de los compuestos con el solvente de extracción. Sin embargo, en este caso, todos los compuestos que presentaron bajas recuperaciones poseen buena solubilidad en acetato de etilo (entre 10 y 50 g cada 100 mL), por lo cual este no sería el problema.

En cuanto al método MSPD, las polaridades del sorbente y del solvente de elución son reconocidas como factores clave, ya que determinan tanto la eficacia de la extracción como la pureza de los extractos finales (134). El solvente de elución debe proveer un amplio rango de polaridades compatible tanto con los sorbentes como con los analitos. Quizás en

este caso un gradiente de elución, cambiando la polaridad del solvente a lo largo del tiempo, hubiera sido la solución para que los pesticidas no detectados eluyeran de la columna. Quizás la utilización de acetato de etilo como solvente haya sido el problema en la etapa de extracción, debido a sus dificultades para penetrar ciertos tejidos vegetales, como se comentó anteriormente. Además, se debe recordar que con este tipo de metodología, la molienda de la muestra con el soporte se realiza en forma manual, con lo cual a veces es complicado dispersar la matriz de forma eficaz y alcanzar un tamaño de partícula adecuado para que haya un buen contacto con el solvente al realizar la extracción. A su vez, la diferencia en el tamaño de partícula, también puede ser un impedimento para una cromatografía eficiente. De todas formas, con los buenos resultados obtenidos con el método QuEChERS citrato modificado, y de su mayor simplicidad y rapidez, el método MSPD fue descartado.

De forma de chequear la cantidad de coextractivos, las matrices blanco fueron inyectadas en modo *full scan*. Analizando los cromatogramas obtenidos luego del análisis mediante GC-MS (**Figura 45**), se puede apreciar como la mayor cantidad de de coextractivos aparecen en el extracto preparado por el método de acetato de etilo seguido por el método QuEChERS modificado. El método MSPD prácticamente no presentó coextractivos, pero de todas formas, la mitad de los pesticidas tampoco fueron detectados en los extractos.

Figura 45 Cromatograma en modo *full scan* de la matriz blanco de hojas de alcachofa mediante los tres métodos de extracción estudiados.



El método QuEChERS citrato modificado ha sido reportado (135) como una buena opción para aquellas matrices vegetales más complejas, como lo son las plantas medicinales. Más

aún, en otro trabajo, se compara este método con la extracción con acetato de etilo y el método de mini-Luke en té verde, llegando a la conclusión de que el protocolo QuEChERS citrato modificado era el mejor para este tipo de matrices. Considerando los resultados obtenidos en este trabajo y las referencias bibliográficas consultadas, el método QuEChERS citrato modificado fue seleccionado para la extracción de residuos de pesticidas en hojas de alcachofa.

Buscando aumentar el scope de la primera selección de pesticidas, otros compuestos compatibles con GC y LC fueron incluidos durante el proceso de fortificación de las muestras. Los pesticidas en estudio fueron seleccionados a partir de los paquetes tecnológicos utilizados en estos cultivos. Se evaluó la metodología seleccionada en la primera etapa de trabajo para ambos sistemas de detección, obteniéndose muy buenos resultados.

3.1.3 Validación de la determinación de residuos de pesticidas en hojas de alcachofa

El método QuEChERS citrato modificado fue posteriormente validado para la determinación de 63 compuestos mediante LC-MS/MS y 35 compuestos mediante GC-MS respectivamente. Se llevaron a cabo estudios de linealidad, veracidad (porcentajes de recuperación), precisión, límites de detección, límites de cuantificación y efecto matriz siguiendo los lineamientos establecidos por DG-SANCO, como se describe en la sección **2.1.8.**

Recuperación

Los estudios de recuperación fueron realizados a cuatro niveles de concentración para el método seleccionado: 0,010 – 0,050 – 0,100 – 0,200 mg kg⁻¹ mediante GC-MS y 0,010 – 0,020 – 0,050 – 0,100 mg kg⁻¹ mediante LC-MS/MS. Todos los pesticidas fueron detectados en los dos niveles de concentración más altos ensayados para cada metodología instrumental, con recuperaciones entre 70 y 120%. En el caso de LC-MS/MS (**Tabla 18**), para el tercer nivel de fortificación (0,020 mg kg⁻¹) 12 de los 63 pesticidas no fueron detectados y 9 de ellos presentaron porcentajes de recuperación menores al 70%, y para el nivel más bajo ensayado (0,010 mg kg⁻¹); 26 de los pesticidas no fueron detectados y 6 presentaron recuperaciones menores al 70%. En el caso de GC-MS (**Tabla 19**), para el tercer nivel de fortificación (0,050 mg kg⁻¹) los 35 pesticidas se recuperaron correctamente pero para el nivel más bajo (0,010 mg kg⁻¹) solo 7 de los pesticidas presentaron recuperaciones mayores al 70%, el resto no fueron detectados. Esto se debe a

que el poder de extractabilidad del método no es suficiente para la extracción de esos compuestos a un nivel tan bajo de concentración.

Precisión

Como se muestra en la **Tabla 18** para la determinación mediante LC-MS/MS y en la **Tabla 19** para la determinación mediante GC-MS, la repetitividad, expresada como RSD, evaluada a los tres niveles de concentración fue menor al 20%. La reproducibilidad, también expresada como RSD, evaluada en los mismos niveles de concentración en dos días distintos por el mismo operador fue en promedio también menor al 20%.

Linealidad

La cuantificación mediante GC-MS, basada en las áreas de pico, fue realizada mediante el método de patrón interno utilizando TPP. La linealidad del método fue evaluada, considerando las áreas de los picos relativas al estándar interno, mediante la construcción de curvas de calibración de siete puntos (cada punto por triplicado) en un amplio rango de concentraciones. De igual forma, se construyeron curvas de calibración de siete puntos para el análisis mediante LC-MS/MS, pero sin la utilización de patrón interno. Buena linealidad fue observada para ambas metodologías, para todos los compuestos en estudio, dentro del rango de concentraciones evaluado (hasta 600 ug L⁻¹ para GC-MS y 100 ug L⁻¹ para LC-MS/MS) obteniéndose coeficientes de determinación (R²) mayores a 0,99. Para ambas metodologías, se estudiaron los residuales individuales para cada compuesto y las desviaciones respecto a la curva de calibración en la región relevante fueron menores a ± 20% en todos los casos, según lo estipulado por DG-SANCO.

Límites de Detección y Cuantificación

Para el análisis mediante LC-MS/MS, los límites de detección (LODs) fueron determinados como la mínima concentración de analito que provee transiciones en las cuales el calificador MRM2 posee una relación señal a ruido (S/N) de 3. La mayoría de los analitos pudieron ser detectados en un rango entre 0,003 y 0,015 mg kg⁻¹. De acuerdo a los lineamientos de DG-SANCO, el límite de cuantificación (LOQ) está definido como el nivel de fortificación más bajo validado que cumple con los criterios de aceptabilidad (recuperación y precisión) estipulados. En vista de los niveles de fortificación estudiados, 31 analitos (la mitad del total) posee LOQs en el nivel de 0,01 mg kg⁻¹. La distribución de los LOQs se resume en la **Tabla 20**. En todos los casos los valores de LOQ obtenidos fueron menores o iguales a los correspondientes valores de LMR establecidos por la Unión Europea, cumpliendo de esta forma con los lineamientos establecidos.

Tabla 18 Porcentajes de recuperación y respectivos valores de RSD obtenidos utilizando el método QuEChERS en hojas de alcachofa a los niveles 0,01 – 0,02 – 0,05 mg kg⁻¹ mediante LC-MS/MS.

Nombre común del pesticida	Nivel 0,05 mg kg ⁻¹		Nivel 0,02 mg kg ⁻¹		Nivel 0,01 mg kg ⁻¹	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Acefato	71,5	6,9	70,5	10,9	71,9	15,8
Acetamiprid	76,7	6,0	---	---	---	---
Aldicarb	73,8	1,9	74,5	5,8	72,5	10,3
Azinfos metil	77,9	11,8	58,7	17,8	37,9	19,4
Azoxystrobin	98,4	2,6	95,7	8,5	107,2	7,4
Benomilo	71,9	14,5	---	---	---	---
Boscalid	115,2	13,7	87,8	17,3	47,4	3,4
Carbaril	86,4	5,8	---	---	---	---
Carbendazim	82,3	11,7	85,4	15,6	82,5	19,8
Carbofuran	91,6	9,6	85,5	12,5	81,9	19,0
Clorpirifos	75,0	10,4	---	---	---	---
Ciproconazol	74,4	9,3	---	---	---	---
Clomazon	79,6	5,7	83,5	14,3	86,8	18,6
Clorfenvinfos	82,0	14,6	---	---	---	---
Clorpirifos metil	78,3	17,0	---	---	---	---
Clotianidin	75,8	3,0	---	---	---	---
Diazinon	73,0	6,4	73,5	8,7	74,5	11,9
Difenoconazol	84,1	1,6	79,5	4,3	72,3	3,7
Dimetoato	97,5	2,9	95,7	5,2	98,9	7,7
Epoxiconazol	104,1	7,5	105,7	4,3	119,4	1,5
Etion	70,1	12,9	72,8	15,9	73,1	16,5
Fenitrotrion	111,8	14,7	86,7	15,2	75,9	17,6
Flufenoxuron	77,9	16,0	100,3	11,7	119,3	12,0
Fluopicolide	93,0	10,4	90,3	12,6	86,8	15,7
Flutriafol	84,4	6,8	71,7	8,5	64,9	9,4
Fosmet	99,2	18,2	95,8	14,7	96,9	15,2
Hexaconazol	75,6	8,0	73,4	15,4	---	---
Hexitiazox	107,8	5,6	110,8	14,2	113,2	15,8
Imazalil	71,1	19,5	---	---	---	---
Imidacloprid	100,6	18,6	47,9	19,4	20,2	13,0
Iprodiona	117,1	3,6	109,8	6,2	119,8	5,3
Isoprotilane	82,0	8,1	78,7	10,2	72,7	12,2
Kresoxim metil	119,5	18,0	63,2	17,5	---	---
Linuron	97,4	11,6	93,1	5,8	79,8	2,9
Lufenuron	71,1	5,7	---	---	---	---
Malaoxon	77,6	17,7	38,9	22,5	---	---
Malation	70,2	0,5	71,9	5,9	---	---
Metalaxil	73,5	10,1	---	---	---	---
Metconazol	83,6	8,8	75,5	7,9	70,8	1,3
Metamidofos	72,3	10,5	42,3	17,5	---	---
Metidation	72,3	10,2	71,3	16,6	---	---
Metiocarb	76,8	11,1	45,7	19,5	---	---
Metomil	99,8	5,3	72,4	15,3	---	---
Metoxyfenozide	115,3	14,9	109,8	9,7	117,0	4,0
Oxadixil	76,6	16,2	74,5	14,2	73,5	15,4
Pendimetalin	89,1	3,4	58,7	16,8	---	---
Pirimifos metil	70,9	5,1	---	---	---	---
Procloraz	71,8	1,0	47,8	19,8	---	---
Propiconazol	72,3	6,8	60,8	16,7	---	---
Piraclostrobin	82,6	13,3	72,3	15,7	---	---
Pirimetanil	71,5	7,8	65,3	17,4	---	---
Spinosad	85,4	8,9	75,6	14,2	---	---
Spiroxamine	98,3	7,8	92,1	9,6	80,5	11,5
Tebuconazol	92,2	4,6	97,9	8,3	107,6	11,8

Tebufenozide	89,0	5,3	72,5	10,8	36,5	19,7
Teflubenzuron	85,3	8,9	90,3	10,6	109,3	16,8
Tetraconazol	91,7	11,3	93,1	9,7	92,5	18,1
Tiacloprid	94,4	7,4	95,9	8,2	100,7	4,0
Tiamethoxam	94,8	15,9	97,8	12,5	114,8	19,2
Tiodicarb	85,8	9,3	84,7	10,2	80,4	14,2
Tiabendazol	75,7	5,0	71,3	6,7	58,3	7,9
Trifloxystrobin	101,6	5,9	75,4	7,2	71,5	6,6
Triticonazol	85,3	7,3	85,9	8,5	86,3	12,9

En el análisis mediante GC-MS, los límites de detección (LODs) fueron determinados como la mínima concentración de analito que provee un espectro de masas en modo SIM en el cual el ión calificador posee una relación señal a ruido (S/N) de 3. Todos los pesticidas fueron detectados en los 3 niveles más altos ensayados con recuperaciones entre 70 y 120%. La mayoría de los analitos pudo ser detectado en el rango 0,005 - 0,025 mg kg⁻¹. En vista de los niveles de fortificación ensayados, 7 de los analitos alcanzaron valores de LOQs a nivel de 0,01 mg kg⁻¹. La distribución de valores de LOQ para cada analito se resume en la **Tabla 21**. De 35 pesticidas analizados, 31 presentaron valores de LOQ menores o iguales a su correspondiente LMR, según lo establecido por DG-SANCO. Los 4 analitos que no cumplieron con el criterio (diazinon, etion, fenitrotrion, iprodiona) fueron también evaluados mediante LC-MS/MS (**Tabla 18**) y con esta metodología si cumplieron con la normativa.

Tabla 19 Porcentajes de recuperación y respectivos valores de RSD obtenidos utilizando el método QuEChERS en hojas de alcachofa a los niveles 0,01 – 0,05 – 0,10 mg kg⁻¹ mediante GC-MS.

Nombre común del pesticida	Nivel 0,10 mg kg ⁻¹		Nivel 0,05 mg kg ⁻¹		Nivel 0,01 mg kg ⁻¹	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Azoxystrobin	87,3	12,7	84,1	15,3	---	---
Boscalid	83,7	13,5	79,8	14,9	---	---
Bromopropilato	77,9	11,7	74,0	19,2	72,0	18,7
Buprofezin	112,5	10,2	111,7	15,5	---	---
Clorfenvinfos	97,2	10,3	100,5	19,0	---	---
Clorotalonil	92,5	6,3	107,7	12,3	72,7	16,7
Clorpirifos	107,2	7,8	81,7	12,5	---	---
Clorpirifos metil	101,7	10,9	109,3	14,7	---	---
Ciflutrin	107,9	5,4	103,2	17,3	79,5	16,4
Cipermetrina	109,7	10,2	103,3	12,4	---	---
Deltametrina	83,5	14,8	95,5	16,6	---	---
Diazinon	79,8	9,2	71,3	15,4	---	---
Dicofol	85,0	6,7	81,9	10,5	72,5	15,7
Difenoconazol	90,7	8,2	85,7	10,5	---	---
Etion	94,8	9,7	112,4	18,7	---	---
Fenhexamida	78,5	10,1	110,4	10,8	---	---
Fenitrotrion	96,0	13,5	72,5	17,7	---	---
Fipronil	90,5	7,2	89,3	0,3	71,7	15,3
Fludioxonil	79,0	6,4	91,4	6,5	---	---
Iprodiona	93,0	10,9	85,6	14,5	---	---
Kresoxim metil	82,0	7,0	98,4	9,8	---	---
Lambda-Cialotrina	109,7	6,2	115,4	4,4	---	---

Metiocarb	87,9	12,3	75,3	15,8	---	---
OPP	93,2	8,5	108,9	10,7	---	---
Paration metil	73,2	9,0	75,6	10,3	70,9	16,3
Permetrina	85,0	9,8	90,1	12,3	---	---
Propiconazol	86,4	9,7	81,5	13,1	---	---
Piraclostrobin	91,4	10,3	88,4	14,9	---	---
Priproxifen	81,3	14,3	85,7	19,4	---	---
Tau-Fluvalinato	105,5	14,5	103,2	17,7	---	---
Tebuconazol	85,7	14,3	80,5	17,3	---	---
Tetradifon	75,8	15,5	74,8	15,7	73,7	16,2
Trifloxystrobin	83,8	11,2	119,5	15,1	---	---
Trifuralin	85,7	4,7	92,7	10,1	---	---
Vinclozolina	83,5	15,0	79,7	14,3	---	---

Efecto matriz

El estudio de efecto matriz se llevó a cabo comparando las pendientes de las curvas de calibración en matriz con las pendientes de las curvas de calibración en solvente. El cálculo se realizó mediante la siguiente ecuación, anteriormente descrita:

$$ME (\%) = [(pendiente\ curva\ en\ matriz / pendiente\ curva\ en\ solvente) - 1] \times 100 \quad (3.1)$$

El efecto matriz, ya sea el aumento o la supresión de la señal constituye uno de los mayores problemas durante el análisis de trazas. En el caso de LC-ESI/MS, los coextractivos de la matriz que sufran ionización simultáneamente con los compuestos de interés pueden comprometer la cuantificación de los compuestos, especialmente de aquellos que se encuentran en baja concentración, afectando la exactitud y reproducibilidad de la medida. En la literatura existen varios métodos para solucionar este problema, pero el más usado es el uso de curvas de calibración en matriz para realizar la cuantificación de los analitos. La alcachofa es una matriz compleja, sumado al hecho de que la técnica utilizada implica un paso de pre-concentración es de esperar que exista efecto de la matriz. El efecto matriz puede cuantificarse por medio de la ecuación descrita anteriormente y así definir si existe un aumento de la señal (si la diferencia entre las pendientes del estándar en matriz y en solvente es positiva) o supresión de la señal (si esta relación es negativa) y además se puede evaluar la magnitud de dicho EM tal como se describe en la sección 1.6.

Los valores obtenidos se resumen en la **Tabla 20** para LC-MS/MS y en la

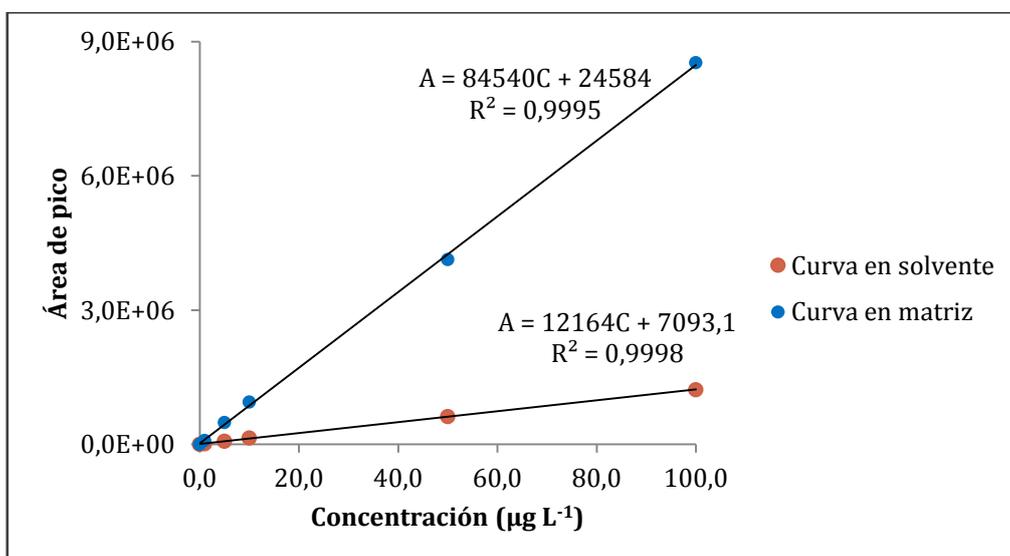
Tabla 21 para GC-MS. De los 63 pesticidas analizados mediante LC-MS/MS, 5 presentaron efecto matriz suave, lo cual significa una supresión o acrecentamiento menor al 20%. El efecto matriz en ese rango es lo suficientemente bajo como para ser considerado despreciable. En el grupo de efecto matriz medio (aumento/supresión > 20% y < 50%) se

encontraron 21 pesticidas. El grupo de efecto matriz fuerte fue el más grande de los tres, compuesto por 37 de los pesticidas. Dos de ellos (acefato y carbendazim) fueron los analitos con los tiempos de retención más cortos; estos resultados confirman observaciones de otros autores (136) que en cromatografía de fase reversa, los compuestos que eluyen primero son más fuertemente afectados, debido a la gran cantidad de elementos polares presentes en la matriz y que son pobremente retenidos. En LC-MS/MS, el efecto matriz generalmente se relaciona a los co-eluyentes generados durante el proceso de ionización, cuando se utilizan interfaces a presión atmosférica, como es el caso de ESI (utilizada en este trabajo), los cuales tienden a suprimir o aumentar las señales relativas de los iones precursores. En este caso, los fuertes efectos observados para acefato y carbendazim, pueden deberse a la presencia de derivados de ácidos hidroxycinámicos y flavonoides, tales como el ácido clorogénico, el ácido 1,3-dicafeoilquinico (cinarina) y la luteolina-7-rutinósido, que son los compuestos fenólicos mayoritarios encontrados en los extractos de estas mismas hojas de alcachofa (sección 3.3) y que presentan bajos tiempos de retención cuando se utilizan sistemas de separación mediante LC similares al utilizado en este caso (110).

El analito más fuertemente afectado por la matriz fue el azoxystrobin (EM = 594,9%). En la **Figura 46** se ejemplifica del efecto matriz para el caso de su determinación mediante LC-MS/MS a través de las correspondientes curvas de calibración en matriz y en solvente.

Como se observa en la **Tabla 20**, en este ensayo aproximadamente el 92% de los analitos estudiados (58 pesticidas de 63) presentaron supresión de la señal, lo cual es más común en los sistemas LC-MS/MS.

Figura 46 Ejemplificación del efecto matriz para el caso de la determinación de azoxystrobin mediante LC-MS/MS a través de las curvas de calibración en matriz y en solvente.



Si bien algunos de los pesticidas presentaron efecto matriz suave durante el análisis, las cuantificaciones se realizaron en todos los casos utilizando calibración en matriz.

Respecto a los compuestos analizados mediante GC-MS, presentaron menor aumento de la señal respecto a LC-MS/MS. De los 35 pesticidas analizados, 19 presentaron efecto matriz suave o despreciable, 5 presentaron efecto matriz medio y 11 presentaron efecto matriz fuerte. Los analitos más afectados en este caso fueron iprodiona, fenitrotion y cipermetrina, para los cuales se obtuvieron valores importantes de efecto matriz: 757, 598 y 529% respectivamente.

Tabla 20 Efecto matriz (ME), límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) para LC-MS/MS.

Nombre común del pesticida	ME (%)	LOD (mg kg ⁻¹)	LOQ (mg kg ⁻¹)	LMR (mg kg ⁻¹)
Acefato	377,2	0,003	0,010	0,02
Acetamiprid	-68,1	0,004	0,050	0,60
Aldicarb	-73,9	0,003	0,010	0,02
Azinfos metil	-42,4	0,008	0,050	0,05
Azoxystrobin	594,9	0,005	0,010	5,00
Benomilo	-90,7	0,004	0,050	0,05
Boscalid	-61,9	0,003	0,020	0,50
Carbaril	-69,7	0,006	0,050	0,05
Carbendazim	216,9	0,006	0,010	0,10
Carbofuran	-81,2	0,002	0,010	0,02
Clorpirifos	-91,1	0,011	0,050	1,00
Ciproconazol	18,3	0,010	0,050	0,10
Clomazone	-3,4	0,005	0,010	0,01
Clorfenvinfos	-52,6	0,014	0,050	0,02
Clorpirifos metil	-75,7	0,015	0,050	0,05
Clotianidin	-69,7	0,008	0,050	0,05
Diazinon	-29,5	0,003	0,010	0,01
Difenoconazol	-43,9	0,003	0,010	0,15
Dimetoato	-69,5	0,002	0,010	0,02
Epoxiconazol	-32,6	0,005	0,010	0,05
Etion	-80,5	0,005	0,010	0,01
Fenitrotion	-73,3	0,009	0,010	0,01
Flufenoxuron	-77,1	0,005	0,010	0,05
Fluopicolide	69,4	0,006	0,010	0,01
Flutriafol	-34,5	0,004	0,020	0,05
Fosmet	-40,5	0,004	0,010	0,05
Hexaconazol	-49,6	0,004	0,020	0,02
Hexitiazox	-76,5	0,005	0,010	0,50
Imazalil	-38,9	0,015	0,050	0,05
Imidacloprid	-51,9	0,011	0,050	0,50
Iprodiona	-66,7	0,005	0,010	0,02
Isoprotiolane	-35,9	0,004	0,010	0,01
Kresoxim metil	-41,1	0,015	0,050	0,05
Linuron	-57,2	0,002	0,010	0,05
Lufenuron	-77,8	0,015	0,050	0,10
Malaoxon	-39,9	0,006	0,050	0,05
Malation	-55,1	0,003	0,020	0,02
Metalaxil	-49,9	0,011	0,050	0,05
Metconazol	-81,5	0,004	0,010	0,02
Metamidofos	-69,8	0,012	0,050	0,10

Metidation	-47,9	0,005	0,020	0,02
Metiocarb	-54,8	0,005	0,050	0,10
Metomil	-59,2	0,003	0,020	0,02
Metoxyfenozide	-25,4	0,004	0,010	0,02
Oxadixyl	-42,7	0,007	0,010	0,01
Pendimetanil	-13,4	0,005	0,050	0,05
Pirimifos metil	-57,0	0,006	0,050	0,05
Procloraz	-60,5	0,004	0,050	0,05
Propiconazol	-58,6	0,007	0,050	0,05
Pyraclostrobin	-35,6	0,004	0,020	2,00
Pirimetanil	-61,8	0,004	0,050	0,05
Spinosad	-70,6	0,003	0,050	0,20
Spiroxamine	-36,8	0,003	0,010	0,05
Tebuconazol	-10,5	0,004	0,010	0,50
Tebufenozide	-10,0	0,006	0,050	0,05
Teflubenzuron	-82,7	0,005	0,010	0,05
Tetraconazol	-37,6	0,005	0,010	0,20
Tiacloprid	-72,2	0,002	0,010	0,02
Tiametoxam	-70,4	0,007	0,010	0,50
Tiodicarb	-47,7	0,003	0,010	0,01
Tiabendazol	-69,3	0,008	0,050	0,05
Trifloxystrobin	-46,1	0,002	0,010	0,20
Triticonazol	-34,6	0,003	0,010	0,01

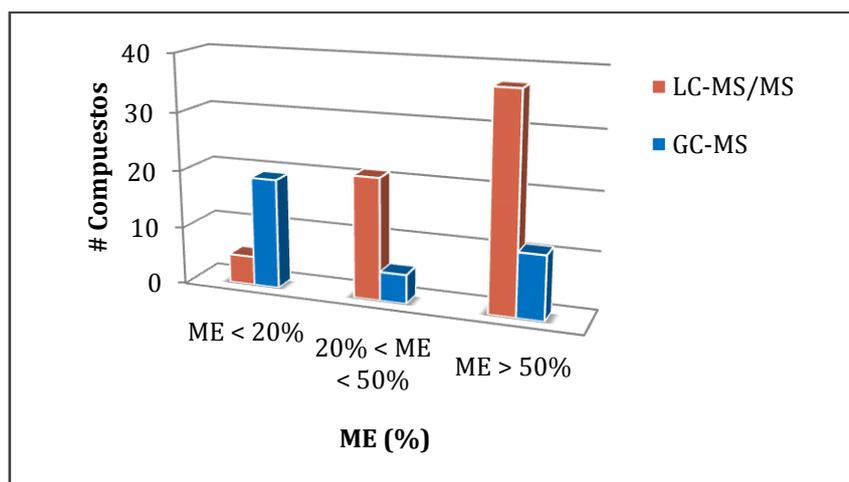
Tabla 21 Efecto matriz (ME), límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) para GC-MS.

Nombre común del pesticida	ME (%)	LOD (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)	LMR (mg kg⁻¹)
Azoxystrobin	61,0	0,011	0,050	5,00
Boscalid	72,1	0,009	0,050	0,50
Bromopropilato	-11,5	0,007	0,010	0,01
Buprofezin	10,9	0,012	0,050	0,05
Clorfenvinfos	9,9	0,011	0,050	0,02
Clorotalonil	178,9	0,005	0,010	0,01
Clorpirifos	5,4	0,024	0,050	1,00
Clorpirifos metil	16,8	0,015	0,050	0,05
Cyflutrin	127,5	0,005	0,010	0,02
Cipermetrina	528,7	0,016	0,050	2,00
Deltametrina	163,5	0,014	0,050	0,10
Diazinon	-13,0	0,021	0,050	0,01
Dicofol	72,9	0,004	0,010	0,02
Difenoconazol	13,6	0,063	0,050	0,15
Etion	3,6	0,019	0,050	0,01
Fenhexamida	78,2	0,015	0,050	0,05
Fenitrotion	598,2	0,025	0,050	0,01
Fipronil	7,1	0,005	0,010	0,01
Fludioxonil	3,5	0,012	0,050	0,05
Iprodiona	756,7	0,026	0,050	0,02
Kresoxim metil	-2,9	0,019	0,050	0,05
Lambda-Cialotrina	29,7	0,015	0,050	0,20
Metiocarb	43,1	0,014	0,050	0,10
OPP	-10,4	0,012	0,050	0,01
Paration metil	7,6	0,006	0,010	0,02
Permetrina	2,0	0,017	0,050	0,05
Propiconazol	45,1	0,008	0,050	0,05
Pyraclostrobin	34,3	0,024	0,050	2,00
Pyriproxifen	9,5	0,014	0,050	0,05
Tau-Fluvalinato	479,5	0,019	0,050	0,10
Tebuconazol	11,8	0,004	0,050	0,50

Tetradifon	7,0	0,004	0,010	0,01
Trifloxystrobin	5,9	0,021	0,050	0,2
Trifuralin	-5,4	0,018	0,050	0,5
Vinclozolina	46,6	0,017	0,050	0,05

En la **Figura 47** se puede observar un gráfico de barras donde se resumen los resultados de efecto matriz para ambas metodologías.

Figura 47 Comparación mediante gráfico de barras de los resultados del estudio de efecto matriz.



Los buenos resultados proporcionados por el método QuEChERS citrato modificado son debidos probablemente a la relativamente alta selectividad del mismo, que puede estar conectada a las propiedades del solvente, así como a los sorbentes utilizados en la etapa de *clean-up*. Es bien sabido que los extractos obtenidos con acetonitrilo contienen niveles relativamente bajos de sustancias no polares tales como ácidos grasos y ceras. Además, el uso de la mezcla de citrato disódico y trisódico en la etapa de salting-out, proporciona un control de pH (entre 5 y 5,5) que no estaba presente en los otros dos métodos. Esto puede ser un factor muy importante cuando se están analizando compuestos sensibles a pH ácido o básico. La buena performance del cloruro de calcio puede ser debida a la adsorción de co-extractivos sobre su superficie así como a la formación de sales de calcio insolubles con componentes de la matriz, mediante unión a los grupos hidroxilo catecólicos de los compuestos fenólicos derivados de los ácidos caféicos.

Un punto importante a destacar es que las determinaciones mediante GC-MS y LC-MS/MS fueron llevadas a cabo a partir de alícuotas de una misma extracción para ambos sistemas instrumentales; esto significa que una misma extracción proporcionó suficiente cantidad de extracto para ambas metodologías. De esta forma, el tiempo de trabajo fue reducido y se ahorraron reactivos y solventes, lo cual está muy de acuerdo con los principios de la Química Verde.

3.1.4 Validación de la determinación de residuos de pesticidas en frutos de alcachofa

En función de los buenos resultados en términos de recuperación y RSD fundamentalmente, obtenidos para la determinación de residuos de pesticidas en hojas de alcachofa utilizando el método QuEChERS citrato modificado, se decidió probar el mismo método de preparación de muestra con los frutos, procediendo de igual forma que en 2.1.5.

Se llevaron a cabo nuevamente estudios de linealidad, veracidad (porcentajes de recuperación), precisión, límites de detección y cuantificación y efecto matriz siguiendo los lineamientos establecidos por DG-SANCO.

Recuperación

Los estudios de recuperación fueron nuevamente realizados a cuatro niveles de concentración: 0,010 – 0,050 – 0,100 – 0,200 mg kg⁻¹ mediante GC-MS y 0,010 – 0,020 – 0,050 – 0,100 mg kg⁻¹ mediante LC-MS/MS. Todos los pesticidas fueron detectados en los dos niveles de concentración más altos ensayados, con recuperaciones entre 70 y 120% para ambas metodologías instrumentales y con valores de RSD menores al 20%. En el caso de LC-MS/MS (**Tabla 22**), para el tercer nivel de fortificación (0,020 mg kg⁻¹) 6 de los 63 pesticidas no fueron detectados y 2 pesticidas presentaron porcentajes de recuperación menores al 70% (aldicarb y procloraz), y para el nivel más bajo ensayado (0,010 mg kg⁻¹) 25 de los pesticidas no fueron detectados y 7 presentaron recuperaciones menores al 70%. En el caso de GC-MS (**Tabla 23**), para el tercer nivel de fortificación (0,050 mg kg⁻¹) los 35 pesticidas se recuperaron correctamente pero para el nivel más bajo (0,010 mg kg⁻¹) solo 9 de los pesticidas presentaron recuperaciones mayores al 70%, el resto no fueron detectados. Estos valores demuestran un mejor alcance aún para el fruto respecto a la hoja, luego de ser sometido al método de preparación de muestra seleccionado.

Linealidad

Las cuantificaciones se llevaron a cabo de la misma forma que para las hojas, según lo detallado en la sección 3.1.3. Buena linealidad fue observada para ambas metodologías, para todos los compuestos en estudio, dentro del rango de concentraciones evaluado (hasta 600 ug L⁻¹ para GC-MS y 100 ug L⁻¹ para LC-MS/MS) obteniéndose coeficientes de determinación (r²) mayores a 0,99. También, se estudiaron los residuales individuales para cada compuesto, observándose desviaciones menores a ± 20% en todos los casos, según lo estipulado por la DG-SANCO.

Límites de Detección y Cuantificación

En el análisis mediante LC-MS/MS todos los pesticidas evaluados fueron detectados en los dos niveles de concentración más altos ensayados, con recuperaciones entre 70 y 120%.

En vista de los niveles de fortificación estudiados, 31 analitos (la mitad del total) poseen LOQs en el nivel de 0,01 mg kg⁻¹. La distribución de los LOQs se resume en la **Tabla 25**. En todos los casos los valores de LOQ obtenidos fueron menores o iguales a los correspondientes valores de LMR establecidos por la Unión Europea, cumpliendo de esta forma con los lineamientos de la DG-SANCO.

Tabla 22 Porcentajes de recuperación y respectivos valores de RSD obtenidos utilizando el método QuEChERS sobre frutos de alcachofa a los niveles 0,01 – 0,02 – 0,05 mg kg⁻¹ mediante LC-MS/MS.

Nombre común del pesticida	Nivel 0,05 mg kg ⁻¹		Nivel 0,02 mg kg ⁻¹		Nivel 0,01 mg kg ⁻¹	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Acefato	77,3	15,0	75,2	14,7	73,4	16,7
Acetamiprid	90,7	7,2	75,4	10,2	---	---
Aldicarb	70,4	13,8	36,5	19,7	---	---
Azinfos metil	87,5	8,5	81,0	15,3	72,5	17,3
Azoxystrobin	80,7	11,3	72,5	12,7	71,3	18,2
Benomilo	96,7	12,0	70,4	15,6	22,5	14,0
Boscalid	81,3	9,2	73,1	14,3	40,5	8,4
Carbaril	89,8	9,9	---	---	---	---
Carbendazim	73,0	8,3	74,2	12,6	70,3	17,6
Carbofuran	86,6	13,8	83,2	10,5	75,4	15,1
Clorpirifos	86,8	11,9	73,8	18,2	---	---
Ciproconazol	74,8	16,2	---	---	---	---
Clomazon	72,6	11,1	73,5	16,3	70,2	19,5
Clorfenvinfos	86,3	6,2	74,0	10,3	---	---
Clorpirifos metil	74,8	7,1	---	---	---	---
Clotianidin	85,1	8,4	73,6	16,4	31,9	15,3
Diazinon	76,0	8,6	74,5	9,5	70,9	14,7
Difenoconazol	77,1	6,5	73,2	9,9	71,5	12,3
Dimetoato	90,3	7,6	93,2	10,7	85,9	14,2
Epoxiconazol	78,0	16,5	72,9	17,5	70,5	18,7
Etion	88,9	10,7	79,3	13,9	71,5	17,5
Fenitrothion	76,8	7,2	70,7	10,2	70,9	18,5
Flufenoxuron	77,2	12,1	73,4	10,8	70,3	17,9
Fluopicolide	99,2	5,4	93,7	9,8	84,7	16,9
Flutriafol	73,5	10,8	70,8	16,1	53,6	17,4
Fosmet	73,4	17,9	75,6	15,7	70,6	19,3
Hexaconazol	86,7	10,2	71,4	16,5	42,7	12,1
Hexitiazox	75,6	15,4	74,7	14,9	70,8	18,8
Imazalil	91,8	10,6	71,0	15,2	---	---
Imidacloprid	87,3	9,9	73,5	17,1	43,0	22,3
Iprodiona	79,9	10,6	75,7	9,8	70,9	16,4
Isoprotiolane	109,0	6,4	93,7	10,9	81,6	15,3
Kresoxim metil	73,9	4,9	70,8	18,5	---	---
Linuron	81,3	10,1	83,3	14,5	70,8	17,6
Lufenuron	80,4	15,5	71,5	18,7	---	---
Malaoxon	80,2	16,2	71,9	15,9	---	---
Malation	81,4	14,5	76,9	18,8	---	---
Metalaxil	74,7	15,1	---	---	---	---
Metconazol	70,8	2,0	---	---	---	---

Metamidofos	93,6	10,2	71,2	17,9	---	---
Metidation	82,2	9,2	76,3	17,3	---	---
Metiocarb	87,9	10,5	73,5	18,3	---	---
Metomil	82,8	11,1	74,7	16,4	---	---
Metoxyfenozide	93,0	7,1	88,9	12,5	77,3	14,6
Oxadixil	79,8	12,0	77,3	15,8	70,5	18,4
Pendimetalin	94,6	7,9	73,2	17,7	---	---
Pirimifos metil	73,6	8,3	---	---	---	---
Procloraz	72,7	12,3	59,8	18,8	---	---
Propiconazol	79,0	14,3	70,6	17,3	---	---
Piraclostrobin	82,8	10,7	75,3	16,8	---	---
Pirimetanil	80,3	9,2	74,4	15,9	---	---
Spinosad	74,8	5,5	70,8	18,4	---	---
Spiroxamine	85,0	7,7	80,2	10,3	71,9	16,1
Tebuconazol	80,4	12,7	76,8	13,7	70,6	18,7
Tebufenozide	90,6	11,0	83,3	12,9	70,5	19,3
Teflubenzuron	82,7	10,4	79,5	12,7	70,9	17,2
Tetraconazol	79,6	10,2	75,3	15,6	70,5	19,0
Tiacloprid	91,7	7,7	83,5	11,3	72,2	17,0
Tiamethoxam	99,0	11,8	91,8	15,7	79,5	18,3
Tiodicarb	82,7	17,3	76,7	10,2	71,6	17,2
Tiabendazol	72,8	18,7	70,8	17,5	47,3	18,2
Trifloxystrobin	84,7	12,8	79,4	15,3	72,2	16,5
Triticonazol	83,9	16,9	75,8	15,6	70,8	17,8

En el análisis mediante GC-MS todos los pesticidas fueron detectados en los tres niveles más altos ensayados con recuperaciones entre 70 y 120% y valores de RSD menores al 20% según los lineamientos de DG-SANCO. La distribución de valores de LOQ para cada analito se resume de la siguiente manera: de 35 pesticidas analizados, 31 presentaron valores de LOQ menores o iguales a su correspondiente LMR. Los 4 analitos que no cumplieron con el criterio (diazinon, etion, fenitrotion, iprodiona) fueron también evaluados mediante LC-MS/MS (**Tabla 22**) y con esta metodología si cumplieron.

Tabla 23 Porcentajes de recuperación y respectivos valores de RSD obtenidos utilizando el método QuEChERS sobre frutos de alcachofa a los niveles 0,01 – 0,05 – 0,10 mg kg⁻¹ mediante GC-MS.

Nombre común del pesticida	Nivel 0,10 mg kg ⁻¹		Nivel 0,05 mg kg ⁻¹		Nivel 0,01 mg kg ⁻¹	
	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
Azoxystrobin	91,2	12,7	81,5	13,7	---	---
Boscalid	86,3	13,5	74,0	15,9	---	---
Bromopropilato	96,5	11,7	84,7	15,3	75,6	18,0
Buprofezin	71,8	10,2	73,4	17,9	---	---
Clorfenvinfos	87,5	10,3	80,1	14,6	70,5	18,2
Clorotalonil	76,8	6,3	71,9	10,5	70,6	17,1
Clorpirifos	105,6	7,8	95,8	10,1	72,3	16,4
Clorpirifos metil	80,2	10,9	71,9	17,7	---	---
Ciflutrin	80,0	5,4	76,7	10,8	70,9	17,8
Cipermetrina	101,9	10,2	95,0	13,5	---	---
Deltametrina	89,6	14,8	93,1	15,8	73,5	16,9
Diazinon	104,5	9,2	84,6	14,4	---	---
Dicofol	72,3	12,5	70,9	17,5	---	---
Difenoconazol	87,3	8,2	80,6	15,4	---	---
Etion	83,9	9,7	75,2	14,7	---	---

Fenhexamida	81,0	10,1	73,2	16,8	---	---
Fenitrothion	89,2	13,5	77,5	16,5	---	---
Fipronil	88,5	7,2	80,6	10,8	72,5	17,3
Fludioxonil	102,8	6,4	93,7	9,7	---	---
Iprodiona	70,2	10,9	71,9	16,7	---	---
Kresoxim metil	97,5	7,0	95,3	11,5	---	---
Lambda-Cialotrina	101,6	6,2	93,4	10,2	---	---
Metiocarb	91,9	12,3	85,3	16,7	---	---
OPP	84,0	8,5	77,6	12,9	---	---
Paration metil	108,7	9,0	99,7	12,5	70,9	16,3
Permetrina	83,7	9,8	75,4	11,7	---	---
Propiconazol	90,7	9,7	83,5	12,0	---	---
Piraclostrobin	95,0	10,3	80,5	15,8	---	---
Piriproxifen	89,8	14,3	81,3	18,5	---	---
Tau-Fluvalinato	101,3	14,5	82,3	18,6	---	---
Tebuconazol	89,6	14,3	79,2	15,6	---	---
Tetradifon	90,5	15,5	81,3	14,3	70,7	18,3
Trifloxystrobin	71,5	11,2	73,5	17,2	---	---
Trifuralin	83,9	4,7	72,7	12,3	---	---
Vinclozolina	70,0	15,0	73,5	17,1	---	---

Precisión

Como se muestra en la **Tabla 22** para la determinación mediante LC-MS/MS y en la **Tabla 23** para la determinación mediante GC-MS, la repetitividad, expresada como RSD, evaluada a los tres niveles de concentración fue menor al 20%, mientras que la reproducibilidad, también expresada como RSD, evaluada en los mismos niveles de concentración en dos días distintos por el mismo operador fue en promedio también menor al 20%.

Efecto matriz

El estudio de efecto matriz se llevó a cabo de igual forma que para las hojas comparando las pendientes de las curvas de calibración en matriz con las pendientes de las curvas de calibración en solvente.

Los valores obtenidos se resumen en la **Tabla 24** para LC-MS/MS y en la **Tabla 25** para GC-MS. De los 63 pesticidas analizados mediante LC-MS/MS, 31 presentaron efecto matriz débil ($EM < 20\%$). En el grupo de efecto matriz medio ($20\% < EM < 50\%$) se encontraron 24 pesticidas. El grupo de pesticidas que presentó efecto matriz fuerte ($EM > 50\%$) fue el más pequeño de los tres, con 8 pesticidas. Nuevamente el acefato se encontró dentro de este grupo, pero con un efecto matriz bastante menor respecto al obtenido al tratar la hoja (88,2% en el fruto frente a 377,2% en la hoja). En general, el efecto matriz resultó ser más suave en el fruto respecto a la hoja para la mayoría de los pesticidas. Incluso el carbendazim que estaba fuertemente afectado por la matriz en la hoja (EM 216,9%) pasó a formar parte del grupo con efecto matriz medio (EM 30,7%).

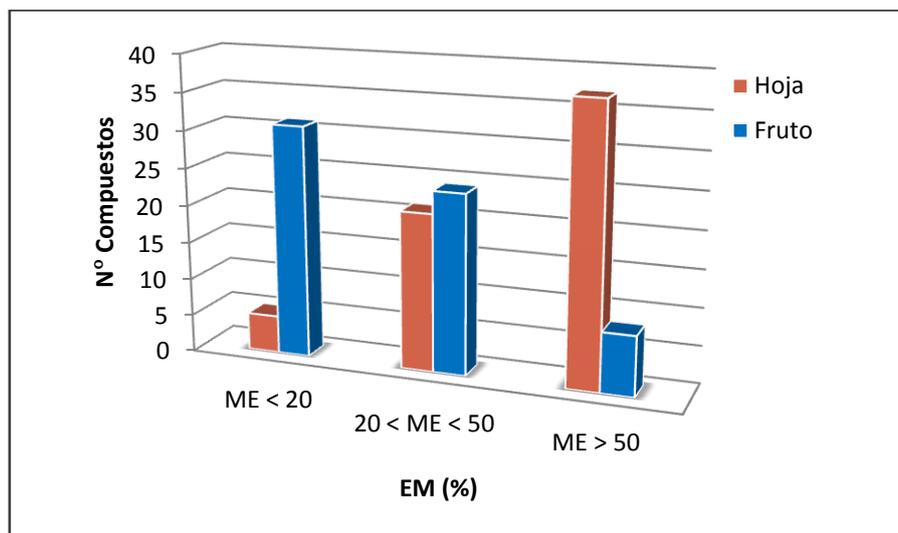
Tabla 24 Efecto matriz (EM), límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) para fruto de alcachofa mediante LC-MS/MS.

Nombre común del pesticida	EM (%)	LOD (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)	LMR (mg kg⁻¹)
Acefato	88,2	0,003	0,010	0,02
Acetamiprid	-40,4	0,004	0,050	0,60
Aldicarb	-54,5	0,003	0,010	0,02
Azinfos metil	-10,3	0,008	0,050	0,05
Azoxystrobin	6,7	0,005	0,010	5,00
Benomilo	-86,7	0,004	0,050	0,05
Boscalid	-23,8	0,003	0,020	0,50
Carbaril	-39,7	0,006	0,050	0,05
Carbendazim	30,7	0,006	0,010	0,10
Carbofuran	-49,7	0,002	0,010	0,02
Clorpirifos	-29,3	0,011	0,050	1,00
Ciproconazole	8,4	0,010	0,050	0,10
Clomazone	-14,3	0,005	0,010	0,01
Clorfenvinfos	0,4	0,014	0,050	0,02
Clorpirifos metil	-12,0	0,015	0,050	0,05
Clotianidin	-38,1	0,008	0,050	0,05
Diazinon	18,4	0,003	0,010	0,01
Difenoconazol	31,8	0,003	0,010	0,15
Dimetoato	-47,4	0,002	0,010	0,02
Epoxiconazol	1,0	0,005	0,010	0,05
Etion	-46,5	0,005	0,010	0,01
Fenitrotion	-20,5	0,009	0,010	0,01
Flufenoxuron	-35,7	0,005	0,010	0,05
Fluopicolide	140,2	0,006	0,010	0,01
Flutriafol	346,5	0,004	0,020	0,05
Fosmet	13,4	0,004	0,010	0,05
Hexaconazole	0,5	0,004	0,020	0,02
Hexitiazox	-43,4	0,005	0,010	0,50
Imazalil	-21,6	0,015	0,050	0,05
Imidacloprid	-40,3	0,011	0,050	0,50
Iprodiona	4,5	0,005	0,010	0,02
Isoprotilane	-6,4	0,004	0,010	0,01
Kresoxim metil	-22,0	0,015	0,050	0,05
Linuron	8,2	0,002	0,010	0,05
Lufenuron	-19,5	0,015	0,050	0,10
Malaoxon	15,2	0,006	0,050	0,05
Malation	-4,3	0,003	0,020	0,02
Metalaxil	6,8	0,011	0,050	0,05
Metconazol	-1,9	0,004	0,010	0,02
Metamidofos	-71,3	0,012	0,050	0,10
Metidation	-6,4	0,005	0,020	0,02
Metiocarb	-25,8	0,005	0,050	0,10
Metomil	-44,5	0,003	0,020	0,02
Metoxyfenozide	-5,5	0,004	0,010	0,02
Oxadixyl	-25,9	0,007	0,010	0,01
Pendimetanil	-17,0	0,005	0,050	0,05
Pirimifos metil	-6,9	0,006	0,050	0,05
Procloraz	-19,4	0,004	0,050	0,05
Propiconazol	-5,8	0,007	0,050	0,05
Pyraclostrobin	-11,6	0,004	0,020	2,00
Pirimetanil	-27,0	0,004	0,050	0,05
Spinosad	-35,5	0,003	0,050	0,20
Spiroxamine	-8,2	0,003	0,010	0,05
Tebuconazol	17,6	0,004	0,010	0,50

Tebufenozide	-11,1	0,006	0,050	0,05
Teflubenzuron	-21,5	0,005	0,010	0,05
Tetraconazol	11,7	0,005	0,010	0,20
Tiacloprid	-53,3	0,002	0,010	0,02
Tiametoxam	-73,8	0,007	0,010	0,50
Tiodicarb	-12,2	0,003	0,010	0,01
Tiabendazol	-39,9	0,008	0,050	0,05
Trifloxystrobin	-22,7	0,002	0,010	0,20
Triticonazol	6,4	0,003	0,010	0,01

En la **Figura 48** se puede visualizar mediante un gráfico de barras, las diferencias de efecto matriz entre los extractos de la hoja y el fruto, luego de ser analizados mediante LC-MS/MS. Se observa una tendencia de efecto matriz opuesta, lo cual pone de manifiesto que si bien se trata de matrices provenientes de una misma planta, ambas son diferentes, y por lo tanto los co-extractivos son diferentes.

Figura 48 Gráfico de barras comparativo del efecto matriz de la hoja y el fruto de alcachofa analizados mediante LC-MS/MS respectivamente.



Respecto a los compuestos analizados mediante GC-MS, también presentaron en su mayoría menor efecto matriz al analizar el fruto con respecto a la hoja. De los 35 pesticidas analizados, 22 presentaron efecto matriz suave o despreciable (EM < 20%), 5 presentaron efecto matriz medio y 8 presentaron efecto matriz fuerte. Los analitos más afectados en este caso fueron al igual que en la hoja iprodiona, fenitrothion y cipermetrina, pero con valores de efecto matriz un poco menores: 457, 382 y 225% respectivamente.

Tabla 25 Efecto matriz (EM), límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) para fruto de alcachofa mediante GC-MS.

Nombre común del pesticida	EM (%)	LOD (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)	LMR (mg kg⁻¹)
Azoxystrobin	45,2	0,011	0,050	5,00
Boscalid	49,7	0,009	0,050	0,50
Bromopropilato	-19,6	0,007	0,010	0,01
Buprofezin	8,7	0,012	0,050	0,05
Clorfenvinfos	3,2	0,011	0,010	0,02
Clorotalonil	82,3	0,005	0,010	0,01
Clorpirifos	7,3	0,024	0,050	1,00
Clorpirifos metil	10,4	0,015	0,050	0,05
Cyflutrin	85,4	0,005	0,010	0,02
Cipermetrina	224,5	0,016	0,050	2,00
Deltametrina	121,9	0,014	0,010	0,10
Diazinon	-27,0	0,021	0,050	0,01
Dicofol	44,8	0,004	0,010	0,02
Difenoconazol	8,8	0,063	0,050	0,15
Etion	5,9	0,019	0,050	0,01
Fenhexamida	63,7	0,015	0,050	0,05
Fenitrotion	382,3	0,025	0,050	0,01
Fipronil	9,7	0,005	0,010	0,01
Fludioxonil	2,8	0,012	0,050	0,05
Iprodiona	456,9	0,026	0,050	0,02
Kresoxim metil	-9,9	0,019	0,050	0,05
Lambda-Cialotrina	19,5	0,015	0,050	0,20
Metiocarb	18,1	0,014	0,050	0,10
OPP	-19,5	0,012	0,050	0,01
Paration metil	4,3	0,006	0,010	0,02
Permetrina	5,6	0,017	0,050	0,05
Propiconazol	25,3	0,008	0,050	0,05
Pyraclostrobin	18,1	0,024	0,050	2,00
Pyriproxifen	7,2	0,014	0,050	0,05
Tau-Fluvalinato	382,6	0,019	0,050	0,10
Tebuconazol	15,9	0,004	0,050	0,50
Tetradifon	10,3	0,004	0,010	0,01
Trifloxystrobin	4,8	0,021	0,050	0,20
Trifuralin	-12,3	0,018	0,050	0,5
Vinclozolina	19,8	0,017	0,050	0,05

3.1.5 Aplicación a muestras reales

Para demostrar la efectividad del protocolo seleccionado y la idoneidad para realizar análisis de rutina, 4 muestras de alcachofa de distintos puntos del Uruguay (hojas y frutos) fueron adquiridas en mercados locales y llevadas al laboratorio para ser sometidas al análisis de residuos de pesticidas utilizando el protocolo QuEChERS citrato modificado anteriormente validado. Los valores de concentración obtenidos para residuos de los plaguicidas evaluados, se encontraron todos por debajo de los respectivos LMRs establecidos por la Unión Europea, hecho que suma nueva evidencia científica acerca de la inocuidad alimentaria de estos cultivos. En la mayoría de los casos, las concentraciones se

encontraron por debajo del LOD. Sin embargo, los valores obtenidos para azinfos metil, diazinon, dimetoato, tebuconazol y teflubenzuron fueron menores al correspondiente LOQ obtenido mediante LC-MS/MS en algunas de las muestras como se puede observar en la **Tabla 26**.

En particular, los valores de concentración para azinfos metil fueron menores al correspondiente LOQ para la muestra 3, tanto en las hojas como en el fruto. En el caso del diazinon, los valores se encontraron por debajo del LOQ para la muestra 3 (solo en las hojas) y para la muestra 4 (hojas y fruto). Para el dimetoato, la muestra 1 (solo en las hojas) y la muestra 2 (hojas y frutos) presentaron valores menores al LOQ. Para el Metiocarb, solo se encontraron valores menores al LOQ en las hojas de la muestra 2. En el caso del tebuconazol, valores menores al LOQ se encontraron en la muestra 1 (hojas y fruto), la muestra 2 (hojas) y la muestra 4 (hojas). Por último, para el teflubenzuron se encontraron valores de concentración por debajo del LOQ en las hojas de la muestra 3.

Tabla 26 Resultados obtenidos luego de aplicar el método validado a muestras comerciales de hojas y frutos de alcachofa mediante LC-MS/MS.

Nombre común del pesticida	Muestras Comerciales (Concentración mg kg ⁻¹)							
	1 (Canelones)		2 (Montevideo)		3 (Salto)		4 (Paysandú)	
	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto
Acefato	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Acetamiprid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Aldicarb	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Azinfos metil	ND	ND	ND	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND
Azoxystrobin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Benomilo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Boscalid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Carbaril	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Carbendazim	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Carbofuran	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clorpirifos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ciproconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clomazon	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clorfenvinfos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clorpirifos metil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clotianidin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Diazinon	ND	ND	ND	ND	<LOQ	ND	<LOQ	<LOQ
Difenoconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dimetoato	<LOQ	ND	<LOQ	<LOQ	ND	ND	ND	ND
Epoxiconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Etion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenitrotion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Flufenoxuron	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fluopicolide	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Flutriafol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fosmet	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hexaconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hexitiazox	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imazalil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Imidacloprid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Iprodiona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Isoprothiolane	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kresoxim methil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Linuron	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lufenuron	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Malaoxon	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Malation	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metalaxil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metamidofos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metidation	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metiocarb	ND	ND	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND
Metomil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Metoxifenozone	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Oxadixil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pendimetanil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pirimifos metil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Procloraz	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Propiconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Piraclostrobin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pirimetanil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Spinosad	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Spiroxamine	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tebuconazol	<LOQ	<LOQ	ND	ND	<LOQ	ND	<LOQ	ND
Tebuconazole	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Teflubenzuron	ND	ND	ND	ND	<LOQ	ND	ND	ND
Tetraconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tiacloprid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tiametoxam	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tiodicarb	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tiabendazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Trifloxystrobin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Triticonazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

En el caso de los analitos determinados por GC-MS (**Tabla 27**), la mayoría no fue detectada en las cond del metodo, salvo para algunas muestras, donde los valores para lambda-cialotrina, metiocarb y tebuconazol fueron menores al LOQ.

En particular, los valores para lambda-cialotrina fueron menores al LOQ en las hojas de la muestra 4 y para el metiocarb en las hojas de la muestra 2. En el caso del tebuconazol sucedió algo similar, pero para las hojas de las muestras 1, 3 y 4, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos mediante LC-MS/MS.

Tabla 27 Resultados obtenidos luego de aplicar el método validado a muestras comerciales de hojas y frutos de alcachofa mediante GC-MS.

Nombre común del pesticida	Muestras Comerciales (Concentración mg kg ⁻¹)							
	1 (Canelones)		2 (Montevideo)		3 (Salto)		4 (Paysandú)	
	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto
Azoxystrobin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Boscalid	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bromopropilato	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Buprofezin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clorfenvinfos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clorotalonil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Clorpirifos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clorpirifos metil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ciflutrin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cipermetrina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Deltametrina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Diazinon	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Dicofol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Difenoconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Etion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenhexamida	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fenitrotion	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fipronil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fludioxonil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Iprodiona	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Kresoxim metil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lambda-Cialotrina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<LOQ	ND
Metiocarb	ND	ND	<LOQ	ND	ND	ND	ND	ND
OPP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Paration metil	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Permetrina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Propiconazol	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Piraclostrobin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Piriproxifen	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tau-Fluvalinato	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tebuconazol	<LOQ	ND	ND	ND	<LOQ	ND	<LOQ	ND
Tetradifon	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Trifloxystrobin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Trifuralin	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Vinclozolina	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

La aplicación de la metodología multiresiduo desarrollada permitió obtener datos acerca de los niveles de agroquímicos en cultivos de alcachofa en nuestro país. En principio los datos obtenidos muestran una baja presencia de residuos en este agroecosistema. Se observa en general, una prevalencia en la frecuencia de hallazgos de insecticidas. Los residuos de pesticidas encontrados en las muestras comerciales de alcachofa cumplen con los LMRs establecidos por las normativas internacionales para este alimento. Es aconsejable continuar con el monitoreo de pesticidas en estos cultivos (principalmente de aquellos cuyos valores de concentración fueron menores al LOQ), ampliar el número de muestras e incluir datos de residuos de pesticidas en organismos vivos.

La captación de pesticidas por parte de las plantas es un proceso complejo de difusión a través de la cera epicuticular, la cutícula, y la membrana plasmática de las células epidérmicas de la planta. Este proceso depende de las características de la superficie foliar, de las propiedades fisicoquímicas de los agroquímicos utilizados, de los tipos y concentración de los aditivos y de las condiciones ambientales. Como influyen cada uno de estos factores sobre la captación no está del todo comprendido, a pesar de que existe una demanda urgente por el uso eficiente de pesticidas (137).

A pesar de los problemas asociados a la aplicación de pesticidas, estos van a seguir siendo utilizados para asegurar el suministro de alimento para la creciente población mundial, debido a que los métodos alternativos para la protección de cultivos vegetales son aún ineficientes o muy costosos. La producción mundial de pesticidas ha crecido enormemente en los últimos años y se estima que solo una parte muy pequeña de estos alcanza el sitio de acción, siendo el resto considerado como deriva, pudiendo afectar otros cultivos y aumentando de esta forma el costo de producción y causando serios problemas ambientales. Es claro que aunque el uso de pesticidas sigue siendo indispensable para el desarrollo de la agricultura, aún hay mucho para mejorar en cuanto a la eficiencia de los mismos, para reducir de esta forma los impactos en el medio ambiente y sobre la cadena alimenticia. Mientras tanto, la correcta implementación de las BPA por parte de los productores, y el desarrollo de métodos multiresiduo cada vez más eficaces y sensibles por parte de los científicos, son dos armas muy poderosas, que permiten no solo la evaluación sino también la determinación de los correctos compases de espera.

3.2 Determinación de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en alcachofa

3.2.1 Determinaciones analíticas mediante ETAAS

Las determinaciones analíticas se realizaron luego del desarrollo y optimización de las condiciones experimentales óptimas. Esta técnica si bien tiene límites de detección muy adecuados para los fines propuestos suele presentar interferencias dependientes del tipo de matriz en estudio. Para vencer estas interferencias es preciso evaluar el uso de agentes que permitan mejorar el desempeño del método.

Generalmente, el uso de modificadores químicos permite alcanzar mayores temperaturas de pirolisis, reduciendo o eliminando la pérdida de analito y las interferencias que pudieran generarse en estado vapor, y minimizando las señales de fondo. La introducción de la mezcla de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2 + \text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como modificador ha sido utilizada para determinaciones libres de interferencias, especialmente para elementos volátiles como As, Cd y Pb (121).

En el caso de Cd y Pb, se utilizó como modificador una mezcla conteniendo 5 μg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ y 3 μg de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ con la cual se obtuvieron muy buenos resultados, observándose señales bajas para los blancos y picos muy bien definidos para estándares y muestras. En el caso del As, se intentó llevar a cabo las determinaciones utilizando esta misma mezcla como modificador de matriz, observándose resultados poco alentadores: si bien los estándares presentaban una adecuada forma de pico, las muestras no mostraban señal alguna. Se realizaron curvas de atomización y pirolisis tratando de encontrar las condiciones óptimas, sin resultados positivos. Se variaron las proporciones de la mezcla e incluso se intentó trabajar con soluciones conteniendo solamente $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ en distintas concentraciones, pero los resultados no fueron buenos.

Luego de una búsqueda bibliográfica exhaustiva sobre el tema, se decidió pasar a trabajar con llamados “modificadores permanentes” (121) (138) (122), en particular con el Niobio. Es bien sabido que varios elementos también han demostrado ser útiles como modificadores, como los del grupo del Pt (Pd, Ir, Rh y Ru) y los formadores de carburos (Zr, Nb, Ta, W). Cuando el modificador es aplicado como una solución sobre el tubo de grafito y sometido a un programa de temperatura, este actúa como modificador permanente, es decir, no debe ser agregado para cada determinación. Las principales ventajas del uso de modificadores permanentes son:

- ✓ Producción simple y rápida de la capa de modificador sobre las paredes del tubo utilizando un programa de horno adecuado.
- ✓ Limpieza *in situ* durante la producción de la capa, contribuyendo a la obtención de menores valores de blanco y mejores límites de detección.

- ✓ Eliminación o minimización de interferencias espectrales y no espectrales, permitiendo el análisis directo de ciertas muestras sin digerir.
- ✓ Protección del tubo de grafito, resultando en un aumento considerable de la vida útil del mismo.

Los resultados obtenidos luego de utilizar el modificador permanente de Nb fueron muy buenos, obteniéndose blancos bajos y picos bien definidos para estándares y muestras.

3.2.2 Optimización de las condiciones de extracción

La **Tabla 28**, la **Tabla 29** y la **Tabla 30** resumen los resultados obtenidos luego de realizar los diseños multivariados (de tipo central compuesto) para los métodos A, B y C respectivamente.

Tabla 28 Resultados obtenidos mediante los experimentos de optimización para el método A.

Experimento	% Rec (media; n=3)					
	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
1	<70	<90	<80	<80	<80	< 80
2	<70	<90	<90	<80	<90	< 90
3	<80	100,6	100,1	99,5	98,5	100,9
4	<90	99,7	101,2	99,7	98,9	99,8
5	99,5	100,1	100,5	100,3	99,0	101,9

Tabla 29 Resultados obtenidos mediante los experimentos de optimización para el método B.

Experimento	% Rec (media; n=3)					
	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
1	<60	<80	<80	<80	<80	< 80
2	<70	<90	<80	<80	<90	< 90
3	<70	99,8	98,7	98,9	97,3	99,5
4	<80	99,5	100,3	99,2	97,1	99,7
5	99,0	100,3	99,2	99,5	97,5	101,3

Tabla 30 Resultados obtenidos mediante los experimentos de optimización para el método C.

Experimento	% Rec (media; n=3)					
	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
1	<70	<80	<80	<70	<80	< 80
2	<80	<90	<80	<80	<90	< 80
3	99,2	100,2	99,3	100,1	93,2	97,9
4	100,1	102,7	101,2	99,8	<90	99,5
5	99,5	105,6	100,5	100,3	93,6	98,6

Todos los experimentos de optimización fueron realizados utilizando como muestra el CRM de hojas de espinaca, salvo para el hierro, cuyo valor no se encontraba en el certificado. Los valores certificados en este material eran: $0,068 \pm 0,012$ mg kg⁻¹ (As),

$2,876 \pm 0,058 \text{ mg kg}^{-1}$ (Cd), $12,22 \pm 0,86 \text{ mg kg}^{-1}$ (Cu), $2,142 \pm 0,058 \text{ mg kg}^{-1}$ (Ni), $0,20 \text{ mg kg}^{-1}$ (Pb) y $82,2 \pm 3,9 \text{ mg kg}^{-1}$ (Zn) respectivamente (expresados en base seca).

La cantidad de muestra a pesar y el volumen de ácido a agregar para la extracción, fueron seleccionados considerando los rangos de concentración de los diferentes elementos informados en el certificado del CRM. Con este criterio, todos los analitos se encontraron en un nivel adecuado para realizar tratamientos de muestra simultáneos. Una masa de 0,5 g y un volumen de 10 mL resultaron ser el mejor compromiso obtenido para llevar a cabo los métodos propuestos para la determinación de todos los elementos en estudio, en las muestras analizadas, sin cambiar estos parámetros y en una única extracción. Dependiendo del metal, alguno de ellos (Cd, Ni y Zn) requirieron una dilución posterior con HNO_3 0,1% v/v.

Las condiciones óptimas para los procedimientos de tratamiento de muestra descritos anteriormente en la sección 2.2.4 fueron seleccionadas mediante la evaluación de los porcentajes de recuperación obtenidos, estimados como $R (\%) = \text{concentración obtenida (mg kg}^{-1}) \times 100 / \text{concentración certificada (mg kg}^{-1})$ para cada experimento. La metodología más simple y rápida con un valor de $R (\%)$ estadísticamente igual al 100% (para los elementos en estudio) fue seleccionada como la metodología óptima para validar posteriormente. Todos los resultados fueron expresados en base seca.

Además, de forma de verificar si el CRM se encontraba dentro de especificaciones respecto a los valores certificados y como método comparativo, se llevo a cabo la determinación en dicho material de los elementos en estudio utilizando el método de digestión total asistido por microondas (método D) descrito en la sección 2.2.4.

Un estudio comparativo utilizando el test t de *Student* fue realizado para determinar si había diferencias significativas entre la utilización de los métodos asistidos por ultrasonido y ozonización (métodos A, B and C) bajo las condiciones correspondientes a los experimentos con recuperaciones cercanas al 100% (139). Los resultados de esta comparación estadística se presentan en la **Tabla 32**.

Para los métodos A, B y C los experimentos 1 y 2 no fueron adecuados para las determinaciones de Cd, Cu, Ni, Pb y Zn debido a que los porcentajes de recuperación fueron bajos. Esto demuestra que la concentración de ácido utilizada tiene influencia sobre la extracción, y el uso de HNO_3 15% (m/m) no fue suficiente para una extracción cuantitativa. El experimento 3 presentó el mejor desempeño para la determinación de Cd, Cu, Ni, Pb y Zn, y fue la metodología con el menor tiempo de análisis. No se observaron mejoras significativas adicionales luego de aplicar los experimentos 4 y 5. De acuerdo a estos resultados, el experimento 3 fue seleccionado como el método a validar. Las

condiciones para la metodología seleccionada fueron una concentración de HNO_3 25% (m/m) para los tres métodos y un tiempo de extracción de 10 minutos para los métodos A y C, y de 25 minutos para el método B. La diferencia en el tiempo de extracción para los métodos A y B es razonable ya que el aumento en la potencia de salida de las sondas ultrasónicas provee mayor energía en el seno de la suspensión y esto provoca un aumento de la temperatura, lo cual favorece la extracción. Para el método A, la temperatura final fue de 80 °C.

La variación de la concentración de ozono en agua (en ausencia de otros agentes oxidantes), fue determinada a distintos tiempos de barboteo del gas en la solución y se observó una relación lineal hasta 25 minutos (**Figura 49**). Pasado este tiempo, no hubo más variaciones; esto significa que la concentración máxima fue alcanzada bajo las condiciones operativas del equipo (saturación). Esta puede ser la causa de los resultados obtenidos en los experimentos 4 y 5, comparados con el experimento 3, donde no se observan mejoras con el aumento del tiempo de extracción o de la concentración de ácido.

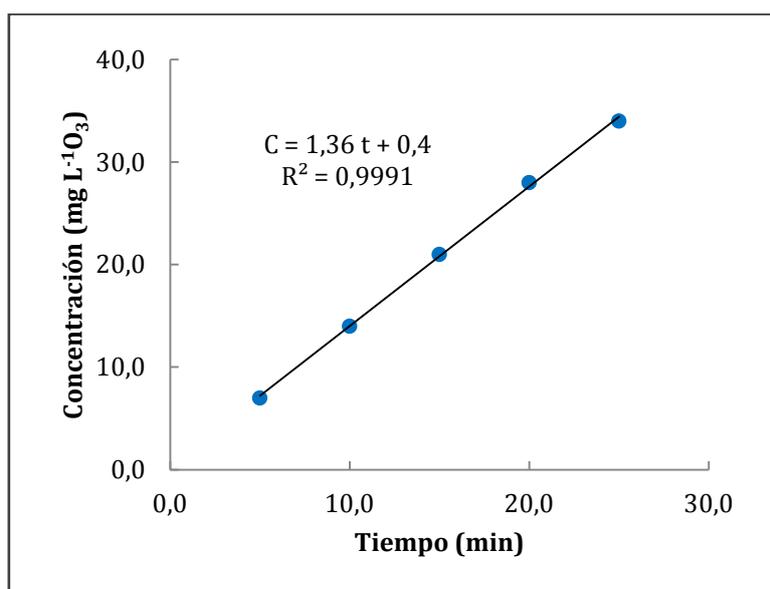


Figura 49 Variación de la concentración en ozono en la corriente de oxígeno en función del tiempo de ozonizado.

Los vegetales son matrices muy complejas, por lo cual el uso de ondas de ultrasonido o de una corriente de ozono, luego del agregado de un ácido diluido, es necesario para la extracción de todos los elementos en estudio. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos, tratamientos más drásticos y no amigables con el ambiente no se justifican.

Respecto a la determinación de As, el experimento 5 proporcionó los mejores resultados para los métodos A y B por las mismas razones establecidas anteriormente: los

experimentos de 1 a 4 presentaron bajas recuperaciones. Para el método C, las condiciones establecidas en el experimento 3 fueron las seleccionadas, ya que de esta forma se obtuvo un adecuado porcentaje de recuperación y además el resto de los elementos estudiados pueden ser determinados bajo las mismas condiciones.

Sin embargo, entre los métodos asistidos mediante ultrasonido (métodos A y B) se pueden remarcar algunas diferencias importantes. Ninguno de los experimentos resultó adecuado para la determinación de este elemento mediante ETAAS, ya que los porcentajes de recuperación fueron menores al 20%. Por lo tanto, para los métodos asistidos por ultrasonido, se decidió cambiar a la técnica HGAAS y utilizar HCl en la preparación de las muestras en lugar de HNO₃. El HCl no es un reactivo oxidante y considerando que la reacción del hidruro con NaBH₄ requiere de un medio ácido, este era una mejor opción en la etapa de reducción. El sistema MHS comercial (PerkinElmer) para la generación de hidruros no provee la adición de ácido como si lo hacen otros sistemas comerciales, tal es el caso de los sistemas de análisis por inyección en flujo (FIAS).

El uso de HCl 25% (m/m) no fue suficiente para lograr una extracción cuantitativa. Para lograr porcentajes de recuperación satisfactorios utilizando el CRM, una concentración de HCl 50% (m/m) y un tiempo de tratamiento de 10 minutos para el método A y de 60 minutos para el método B fueron necesarios (condiciones del experimento 5).

Respecto a la optimización de la determinación de Fe, dado que el CRM no informaba el valor de concentración certificado para dicho elemento, se realizaron los experimentos multivariados utilizando las hojas de alcachofa y comparando directamente con el valor de referencia obtenido mediante el método de referencia de digestión total asistida por microondas (método D). Los resultados para los tres métodos se resumen en la **Tabla 31**.

Tabla 31 Resultados obtenidos mediante los experimentos de optimización para la determinación de Fe.

Experimento	% Rec (Fe) (media; n=3)		
	Método A	Método B	Método C
1	<70	<70	<70
2	<80	<90	<80
3	<90	99,5	<80
4	92,3	94,2	90,7
5	99,8	99,7	100,3

Para los métodos A, B y C los experimentos 1 y 2 no fueron adecuados para las determinaciones de Fe debido a que los porcentajes de recuperación fueron bajos. El uso de HNO₃ 15% (m/m) no fue suficiente para una extracción cuantitativa. Para el método B el experimento 3 presentó la mejor performance para la determinación de Fe. No se observaron mejoras significativas adicionales luego de aplicar los experimentos 4 y 5. De

acuerdo a estos resultados, el experimento 3 fue seleccionado como el método a validar. Las condiciones para la metodología seleccionada fueron una concentración de HNO_3 de 25% (m/m) y un tiempo de extracción de 45 minutos. Para los métodos A y C se seleccionó el experimento 5, dado que el experimento 3 presentó también bajas recuperaciones, y el experimento 4 (si bien presentó recuperaciones mayores a 90%) no tuvo tan buena performance como el experimento 5. Además este último utilizaba una concentración de ácido menor que el anterior. Por lo cuál, las condiciones seleccionadas para los métodos A y C fueron una concentración de HNO_3 de 25% (m/m) y un tiempo de extracción de 30 minutos.

El hecho de que el tiempo de extracción para la determinación de Fe sea mayor respecto al tiempo necesario requerido por los otros metales en estudio, pareciera estar estrechamente relacionado con la cantidad de Fe presente en el material vegetal, hasta 3 órdenes superior. Es natural entonces que se requieran condiciones más drásticas para extraer tal cantidad de analito de la matriz. Además, es factible que el Fe se encuentre ligado a proteínas de la matriz, lo cuál hace necesario la aplicación de condiciones de extracción un poco más drásticas.

Tabla 32 Contenido hallado de As, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn en el CRM (NIST 1570a) y comparación con los valores de referencia certificados mediante el test *t* de Student.

Elemento	Valor Certificado o de Referencia	Método A (media \pm s ; n=6)	Método B (media \pm s ; n=6)	Método C (media \pm s ; n=6)	<i>t</i> -experimental
As (mg kg ⁻¹)	0,068 \pm 0,012	0,068 \pm 0,004	0,067 \pm 0,006	0,067 \pm 0,005	(A) -0,37 (B) -0,29 (C) -0,49
Cd (mg kg ⁻¹)	2,876 \pm 0,058	2,85 \pm 0,14	2,80 \pm 0,16	2,82 \pm 0,17	(A) -0,45 (B) -1,16 (C) -0,81
Cu (mg kg ⁻¹)	12,22 \pm 0,86	12,17 \pm 0,27	12,09 \pm 0,35	12,25 \pm 0,31	(A) -0,45 (B) 0,91 (C) 0,24
Ni (mg kg ⁻¹)	2,142 \pm 0,058	2,147 \pm 0,090	2,132 \pm 0,098	2,154 \pm 0,075	(A) 0,14 (B) -0,25 (C) 0,39
Fe (mg kg ⁻¹)	564 \pm 10**	559 \pm 12	554 \pm 14	557 \pm 11	(A) -1,02 (B) -1,75 (C) -1,56
Pb (mg kg ⁻¹)	0,20*	0,201 \pm 0,015	0,195 \pm 0,016	0,197 \pm 0,018	(A) 0,16 (B) -0,77 (C) -0,42
Zn (mg kg ⁻¹)	82,3 \pm 3,9	82,9 \pm 3,5	81,7 \pm 4,8	83,1 \pm 3,9	(A) 0,42 (B) -0,31 (C) 0,50

s: desviación estándar; $t(0,05, 5) = 2,57(139)$; *Valor informado, **Valor de referencia obtenido con método D.

3.2.3 Desempeño de los métodos

Una vez seleccionadas las condiciones experimentales óptimas para los tres métodos, sus desempeños fueron evaluados y comparados con el fin de seleccionar el más eficiente. Los resultados presentados en la **Tabla 32** y la **Tabla 33** muestran que los tres métodos presentaron buen desempeño en términos de veracidad y precisión.

Aunque los tres métodos son adecuados para la aplicación propuesta, algunas ventajas de utilizar la digestión asistida con baño de ultrasonido (método B) pueden ser destacadas. Cuando se utiliza una sonda de ultrasonido, solo una muestra puede ser preparada a la vez, y el riesgo de contaminación es alto debido a que la sonda se sumerge en el seno de la solución. Por otro lado, cuando se emplea un baño de ultrasonido, se pueden preparar varias muestras en forma simultánea (dependiendo del tamaño del baño) aunque el tiempo de extracción es más largo. Considerando que para un baño de ultrasonido de uso normal en laboratorios, al menos ocho muestras pueden ser procesadas simultáneamente, el hecho de que tiempo de extracción sea mayor se compensa. Además, cuando se utiliza el baño de ultrasonido se minimiza el riesgo de contaminación cruzada.

El método de ozonización (método C) presenta la ventaja de que varias muestras pueden ser preparadas a la mismo tiempo, utilizando un dispositivo de vidrio adecuado, el cual permita separar la corriente de ozono en diferentes caminos. En nuestro laboratorio contamos con un dispositivo de vidrio, construido en el Taller de vidrio de Facultad de Química, el cual permite separar la corriente en cuatro caminos independientes, de forma que cuatro muestras pueden ser preparadas al mismo tiempo, acoplado en tándem el sistema descrito en la **Figura 35** para dar el sistema descrito en la **Figura 50**.



Figura 50 Sistema cerrado de ozonización para el tratamiento de cuatro muestras simultáneamente.

El éxito de este procedimiento puede deberse, probablemente, a un efecto sinérgico debido al uso de un ácido oxidante (HNO_3) en combinación con un agente oxidante como el gas ozono, sumada a una agitación muy eficiente debido al barboteo del gas en el seno de la solución a través del vidrio poroso. El uso de ozono combinado con otras fuentes de energía, tales como el ultrasonido o la radiación UV, se han reportado en la literatura (87) (88) (89) (140), pero en este trabajo, el método utiliza solamente ozono, y el proceso completo es llevado a cabo a temperatura ambiente. Esto es un aporte original a la ciencia ya que se obtuvieron muy buenos resultados para esa matriz y estos analitos sin necesidad de otras fuentes de energía.

Una desventaja de utilizar el método de ozonización (método C) es que el riesgo de contaminación cruzada es alto, debido a que el dispositivo de vidrio se sumerge en la solución, al igual que ocurre cuando se utiliza la sonda de ultrasonido (método A). Se debe tener la precaución de descontaminar muy bien el material entre muestra y muestra.

Este procedimiento basado en la ozonización es un enfoque novedoso, con el cual se han obtenido resultados muy prometedores, y que podría ser aplicado a otras matrices complejas para este tipo de determinaciones. A su vez se trata de un procedimiento que se encuentra en acuerdo con los principios de la Química Verde, ya que el dispositivo diseñado consta de un sistema cerrado, donde el exceso de ozono es neutralizado en una trampa. Además, si se selecciona el método C como procedimiento de preparación de muestra, todos los elementos en estudio pueden ser determinados utilizando las mismas

condiciones experimentales (excepto para el Fe) y el uso de la técnica HGAAS no sería necesario. Esto ahorra tiempo en el análisis global.

3.2.4 Validación

La validación fue llevada a cabo utilizando las condiciones experimentales descritas para cada tratamiento en la sección 2.2.4, esto se corresponde en todos los casos con las condiciones del experimento 3 en la etapa de optimización excepto para el As que fue determinado bajo las condiciones del experimento 5 para los métodos A y B, y para el Fe que fue determinado bajo las condiciones del experimento 5 para los métodos A y C (Tabla 15 y, b Fe.

Tabla 16).

La veracidad fue evaluada mediante la aplicación de los métodos seleccionados utilizando el CRM (seis réplicas independientes) y realizando las determinaciones correspondientes. Los resultados se presentan en la Tabla 32 y las principales cifras de mérito para cada elemento se listan en la Tabla 33.

La precisión analítica expresada como RSD (%) correspondiente al análisis del CRM (n = 6) fue para todos los analitos menor 10 % para todos los métodos ensayados (Tabla 33).

Tabla 33 Principales cifras de mérito analíticas.

Parámetro	Elemento						
	As	Cd	Cu	Fe	Ni	Pb	Zn
Rango lineal (mg L ⁻¹)	Hasta 0,020	Hasta 0,004	Hasta 4,0	Hasta 2,0	Hasta 0,10	Hasta 0,050	Hasta 1,0
LD (3σ; n=10) (mg kg ⁻¹) *	0,007 ^a 0,008 ^b	0,002	0,16	0,10	0,02	0,012	0,08
LQ (10σ; n=10) (mg kg ⁻¹) *	0,022 ^a 0,024 ^b	0,006	0,54	0,34	0,05	0,038	0,26
Precisión (RSD %, n=6)	A: 5,9	A: 4,8	A: 2,2	A: 3,2	A: 4,2	A: 7,5	A: 4,2
	B: 8,9	B: 5,8	B: 2,9	B: 4,0	B: 4,6	B: 8,3	B: 5,9
	C: 8,3	C: 5,7	C: 2,5	C: 4,5	C: 3,5	C: 9,1	C: 4,7

A, B y C corresponden a los métodos A, B y C respectivamente bajo condiciones optimizadas utilizando el CRM.

* Expresados en base seca. ^aHGAAS, ^bETAAS.

Los métodos optimizados y validados fueron luego aplicados al análisis de muestras reales de hojas y frutos de alcachofa. Ya que no se contaba con un material de referencia certificado de este tipo muestras, los resultados obtenidos fueron comparados con los resultados obtenidos luego de aplicar el método de digestión total asistido por microondas (método D) como método de referencia. Los resultados se resumen en la Tabla 34 y la Tabla 35.

Los métodos desarrollados fueron validados para la determinación de As, Cd, Cu, Fe Ni, Pb y Zn en alcachofa utilizando el CRM de hojas de espinaca y la digestión asistida por microondas como método de referencia.

La **Tabla 32** muestra los resultados obtenidos luego de realizar el test t de Student. Todos los valores experimentales de t se encontraron por debajo del valor teórico de t (0,05, 5) 2,57. Por lo tanto, puede concluirse que a un nivel de significancia del 95%, las concentraciones obtenidas utilizando los métodos A, B o C no difieren significativamente de los valores certificados, con lo cual la veracidad de los métodos fue asegurada.

Observando los resultados presentados en la **Tabla 34** y la **Tabla 35** se puede notar como los niveles de concentración obtenidos para As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en alcachofa fueron equivalentes a aquellos obtenidos mediante la digestión total asistida por microondas. Por consiguiente, los métodos propuestos también resultaron ser adecuados para la determinación de dichos elementos en hojas y frutos de alcachofa.

Tabla 34 Contenido de metales y semimetales en hojas de alcachofa.

Elemento (mg kg ⁻¹)	Método			
	A	B	C	D
As	0,065 ± 0,007	0,062 ± 0,005	0,061 ± 0,007	0,061 ± 0,005
Cd	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,19 ± 0,01
Cu	9,3 ± 0,5	9,4 ± 0,3	9,1 ± 0,5	9,8 ± 0,1
Fe	559 ± 12	554 ± 14	557 ± 11	564 ± 10
Ni	1,5 ± 0,2	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,2
Pb	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,32 ± 0,01
Zn	94,2 ± 0,7	95,3 ± 0,4	94,7 ± 0,9	95,3 ± 0,8

Tabla 35 Contenido de metales y semimetales en frutos de alcachofa.

Elemento (mg kg ⁻¹)	Método			
	A	B	C	D
As	0,025 ± 0,002	0,024 ± 0,002	0,025 ± 0,005	0,026 ± 0,004
Cd	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Cu	6,3 ± 0,3	6,1 ± 0,2	6,2 ± 0,8	6,5 ± 0,2
Fe	32,3 ± 0,6	31,8 ± 0,9	32,9 ± 0,7	33,4 ± 0,7
Ni	2,4 ± 0,3	2,1 ± 0,2	2,6 ± 0,3	2,6 ± 0,1
Pb	0,059 ± 0,006	0,060 ± 0,007	0,061 ± 0,009	0,065 ± 0,006
Zn	32,7 ± 0,9	31,6 ± 1,2	33,6 ± 1,5	34,5 ± 0,9

La linealidad fue determinada mediante inspección visual de las curvas de calibración, valor del coeficiente de correación (r²) y el estudio de aleatoriedad de los residuales. Los coeficientes de correlación de las regresiones lineales obtenidos luego de realizar las curvas de calibración, fueron mayores a 0,99 para todos los elementos en estudio. Los rangos lineales se pueden apreciar en la **Tabla 33**. Los límites de detección (expresados como el contenido del elemento correspondiente a tres veces la desviación estándar del

blanco) en base seca fueron: 0,007 y 0,008 mg kg⁻¹ para As (HGAAS y ETAAS respectivamente), 0,002 mg kg⁻¹ para Cd, 0,16 mg kg⁻¹ para Cu, 0,10 mg kg⁻¹ para Fe, 0,02 mg kg⁻¹ para Ni, 0,012 mg kg⁻¹ para Pb y 0,08 mg kg⁻¹ para Zn respectivamente.

Los límites de detección obtenidos para As, Cd y Pb fueron apropiados para el monitoreo de la inocuidad alimentaria del vegetal, ya que se encontraron muy por debajo de los límites legales establecidos para este tipo de vegetales.

La precisión expresada como RSD(%) fue estudiada utilizando las muestras de alcachofa así como el CRM, fueron adecuados para fines de control de calidad del producto, obteniéndose valores de RSD menores al 10% para todos los métodos propuestos y para todos los elementos en estudio, como puede observarse en la **Tabla 33**.

El valor objetivo para la desviación estándar (σ) varía con la concentración de analito y para estimarlo se puede utilizar una relación funcional entre concentración y desviación estándar. La relación mejor conocida es la trompeta de Horwitz, denominada así por su forma. Horwitz demostró que la desviación estándar relativa de un método variaba con la concentración de acuerdo a la ecuación empírica y aproximada (139):

$$\text{RSD} = \pm 2 (1 - 0,5\log C) \quad (3.2)$$

Esta ecuación conduce a la curva con forma de trompeta mostrada en la **Figura 51** que se puede utilizar para derivar valores objetivos de σ para cualquier análisis. Dichos valores objetivos se pueden estimar también del conocimiento previo de las desviaciones estándar normalmente logradas en el análisis en cuestión. Otra aproximación utiliza la falta de ajuste para establecer criterios: si los resultados del análisis, utilizado de forma rutinaria, exigen una cierta precisión para que los datos sean interpretados adecuadamente y de forma útil, esa precisión proporciona el valor aceptable más grande (peor) de σ .

De esta forma, observando la **Figura 51**, se puede notar como para concentraciones alrededor de 1 ppm como las medidas, se pueden esperar valores de RSD de hasta 30%. Con lo cual, los resultados de precisión obtenidos a partir de los métodos desarrollados, con valores de RSD menores al 10% en todos los casos, son extremadamente alentadores, y junto con los resultados del estudio de veracidad, avalan la aplicación de los mismos como métodos de rutina para el control de calidad de estos vegetales.

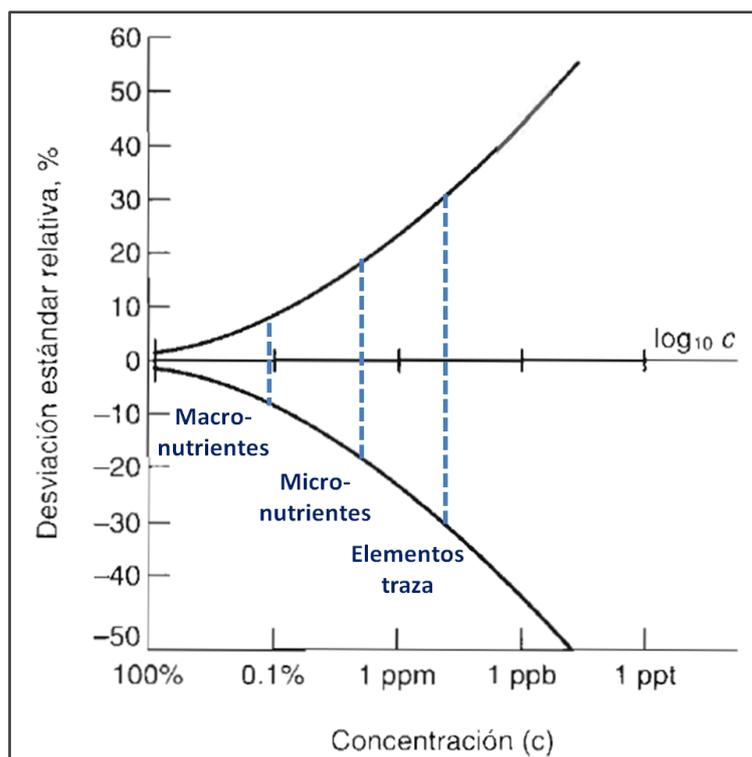


Figura 51 Trompeta de Horwitz (Figura adaptada de Miller y Miller, 1993) (139)

Según el estudio de la literatura publicada sobre el tema, una comparación de posibles métodos para análisis de rutina y control de calidad (sin calentamiento externo, utilizando ácidos diluidos y ozono) para la extracción y posterior determinación de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en alcachofa como la propuesta, no había sido reportada previamente.

3.2.5 Modificaciones al método de referencia (método D)

De forma de hacer que el método D fuera más amigable con el medio ambiente, trabajando con ácido diluido en lugar del concentrado, se sometieron las muestras de hojas de alcachofa al mismo programa de digestión asistida con microondas, pero utilizando HNO₃ 25% y 15% (v/v) respectivamente.

Tabla 36 Resultados obtenidos luego de aplicar el método D a distintas concentraciones de HNO₃.

Elemento (mg kg ⁻¹)	Concentración de HNO ₃		
	15% (v/v)	25% (v/v)	100% (v/v)
As	0,060 ± 0,008	0,060 ± 0,009	0,061 ± 0,005
Cd	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,03	0,19 ± 0,01
Cu	9,3 ± 0,2	9,5 ± 0,3	9,8 ± 0,1
Fe	556 ± 11	559 ± 11	564 ± 10
Ni	1,9 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,9 ± 0,2
Pb	0,31 ± 0,03	0,32 ± 0,02	0,32 ± 0,01
Zn	93,8 ± 0,9	94,9 ± 0,7	95,3 ± 0,8

Según se puede observar en la **Tabla 36**, los resultados obtenidos luego de los tratamientos de muestra en digester de microondas utilizando ácido diluido, fueron semejantes. Utilizar una concentración menor al 15% de ácido no es conveniente, ya que se corre el riesgo de que los recipientes de reacción se deformen por acción del calor, o que incluso se agrieten.

Para moléculas pequeñas como la del agua, a medida que la temperatura aumenta, la migración iónica también lo hace, pero la rotación de dipolo disminuye. Por lo tanto, cuando el agua aumenta su temperatura por absorción de radiación de microondas, la absorción es, en un principio, dominada por la contribución de la rotación dipolar, y a medida que la temperatura aumenta, la contribución de migración iónica se vuelve más importante. La contribución relativa de cada uno de estos factores depende, esencialmente, de la movilidad y del tiempo de relajación. A medida que la movilidad y la concentración aumentan, el calentamiento por microondas será dominado por la migración iónica y el tiempo de calentamiento va a depender cada vez menos del tiempo de relajación de la disolución.

La energía disipada no es absorbida solo por los ácidos minerales, sino también por moléculas de la muestra y por los materiales donde está contenida la muestra, que no es deseable que se calienten durante la reacción.

En general, las ventajas recomendadas para descomposiciones asistidas por microondas, al compararse con sistemas abiertos, son: mayor eficiencia de la descomposición a temperaturas elevadas, reducción del riesgo de pérdidas de analitos por volatilización, reducción de riesgo de contaminación debido al ambiente de trabajo y un menor consumo de reactivos de alta pureza.

Entre las desventajas inherentes a estos sistemas cerrados, se encuentra la limitación de poder digerir sólo poca masa de muestra, porque la presión interna que se desarrolla dentro del recipiente depende de la presión de vapor del ácido utilizado y de la presión causada por los productos gaseosos generados en la reacción de descomposición. En el caso de materiales orgánicos, el CO₂ es el principal producto gaseoso generado y su presión parcial es proporcional a la masa de carbono en la muestra.

3.2.6 Contenido de elementos metálicos y semimetálicos a nivel de trazas en hojas y frutos de alcachofa

La **Tabla 34** y la **Tabla 35** muestran los niveles de concentración de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en las muestras de hojas y frutos de alcachofas del cultivo familiar analizadas, utilizadas en los experimentos de optimización de las metodologías.

A su vez, se muestran en la **Tabla 37** y la **Tabla 38** los resultados obtenidos luego del análisis de muestras comerciales de alcachofas nacionales, obtenidas en mercados locales y provenientes de distintos puntos del país. Las determinaciones se realizaron mediante digestión asistida con microondas (método D).

Tabla 37 Contenido de metales y semimetales en muestras comerciales de alcachofa (Muestras 1 y 2).

Elemento (mg kg ⁻¹)	Muestras comerciales			
	1 (Canelones)		2 (Montevideo)	
	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto
As	0,031 ± 0,003	< LOQ	< LOQ	ND
Cd	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,093 ± 0,008
Cu	10,5 ± 0,7	7,2 ± 0,4	11,3 ± 0,5	8,5 ± 0,5
Fe	463,9 ± 9,8	47,2 ± 3,3	280,7 ± 3,8	50,1 ± 2,4
Ni	1,5 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1
Pb	0,21 ± 0,01	0,042 ± 0,005	0,17 ± 0,01	0,046 ± 0,005
Zn	88,7 ± 0,9	42,2 ± 0,7	75,7 ± 0,7	30,3 ± 0,5

Tabla 38 Contenido de metales y semimetales en muestras comerciales de alcachofa (Muestras 3 y 4).

Elemento (mg kg ⁻¹)	Muestras comerciales			
	3 (Salto)		4 (Paysandú)	
	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto
As	0,034 ± 0,004	<LOQ	0,054 ± 0,004	0,029 ± 0,003
Cd	0,075 ± 0,007	0,063 ± 0,001	0,097 ± 0,009	0,071 ± 0,001
Cu	7,9 ± 0,5	5,7 ± 0,4	9,1 ± 0,06	6,0 ± 0,5
Fe	412,7 ± 9,2	35,8 ± 0,2	357,5 ± 8,4	55,8 ± 3,9
Ni	2,9 ± 0,2	3,4 ± 0,2	1,7 ± 0,1	2,8 ± 0,1
Pb	0,42 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,082 ± 0,006
Zn	71,4 ± 0,9	29,2 ± 0,5	91,0 ± 0,9	37,5 ± 0,5

La contaminación de vegetales utilizados para alimentación con ciertas especies metálicas, debido a la captación desde el suelo de cultivo o desde el agua de riego, se ha convertido en una preocupación creciente a nivel mundial debido al transporte de estas especies a la cadena alimenticia.

Aunque se encontró que las muestras analizadas contienen niveles detectable de As, Cd y Pb, los resultados muestran que tanto las hojas como los frutos de alcachofa cumplen con los límites establecidos por el Reglamento MERCOSUR y por lo tanto pueden ser utilizadas para preparar infusiones con las hojas y diferentes comidas con los frutos

respectivamente, sin riesgos para la salud humana. Además, las concentraciones obtenidas no exceden los límites de 1 mg kg⁻¹ de As, 0,3 mg kg⁻¹ de Cd y 10 mg kg⁻¹ de Pb recomendados por la OMS para plantas medicinales (141), con lo cual las muestras de hojas analizadas también pueden ser destinadas a la preparación de productos fitoterápicos.

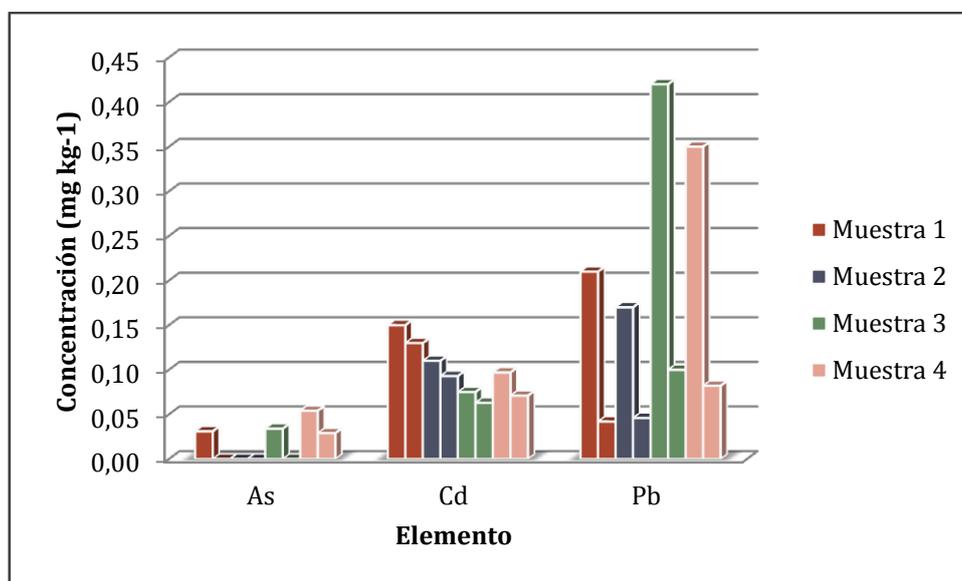


Figura 52 Comparación gráfica de las concentraciones de As, Cd y Pb obtenidas luego de analizar las muestras comerciales. Para cada muestra aparece a la izquierda el valor de la hoja y a la derecha el del fruto.

En la **Figura 52** se puede apreciar una representación gráfica en diagrama de barras de las concentraciones de As, Cd y Pb obtenidas luego de analizar las muestras comerciales. Los valores de concentración más bajos encontrados fueron en general para el As, en segundo lugar para el Cd y los valores más altos fueron para el Pb. Además los valores hallados para Pb fueron los que presentaron mayor variabilidad entre muestra y muestra.

No es de extrañar que los niveles de Pb fueran los más elevados, ya que este elemento es uno de los contaminantes que se encuentra más ampliamente distribuido en la naturaleza, siendo las emisiones más importantes las provenientes de las industrias del hierro y del acero. La deposición atmosférica de Pb en los vegetales es la vía principal de entrada de este metal en la cadena alimentaria, mientras que la incorporación desde el suelo a través de las raíces es muy baja.

En el caso del Cd, éste puede estar presente en los suelos en altas concentraciones, nocivas o letales en muchos casos para la mayoría de las plantas, como resultado de la actividad humana. La contaminación antropogénica de los suelos es debida a la presencia de industrias mineras o refinerías, donde las emisiones de partículas de polvo (diámetro medio de 1 μ m y pueden ser fácilmente dispersadas por el viento), así como las pérdidas

de agua contaminada, son las principales causas de contaminación ambiental. Otras fuentes de contaminación son la aplicación de fertilizantes minerales (que frecuentemente poseen Cd como contaminante) y el tráfico de autos (especialmente por la liberación de Cd por parte de los neumáticos). La movilidad y la biodisponibilidad de este elemento en el suelo, dependerán de la forma química en que se encuentre (142).

En ambientes terrestre, las formas inorgánicas del As son las dominantes y a su vez las más tóxicas e inhiben competitivamente el metabolismo del fosfato. El As(V) es la forma más comúnmente encontrada en los suelos en condiciones oxidantes, convirtiéndose en la especie predominante a ser captada por las plantas. Sin embargo, puede reducirse a formas menos tóxicas mediante procesos metabólicos de la propia planta. El As(III) por otra parte, se encuentra en condiciones reductoras y posee gran afinidad por los grupos tioles de las proteínas, de forma que puede inactivar un gran número de enzimas.

Incluso a nivel de trazas, ciertos elementos metálicos pueden inhibir varios procesos metabólicos de las plantas. El estrés oxidativo surge por los efectos nocivos que provocan las especies ROS generadas en condiciones de estrés, debido a la presencia de estos elementos metálicos. Las especies ROS pueden causar la peroxidación de lípidos, la inactivación de enzimas y daños en las membranas celulares. Para contrarrestar este daño, existen en las plantas sistemas de defensa altamente eficientes, que pueden mitigar o secuestrar estas especies. Estos sistemas antioxidantes juegan un rol muy importante en la estrategia de defensa celular contra el estrés oxidativo, induciendo a la resistencia contra las especies metálicas tóxicas, protegiendo las macromoléculas lábiles. Antioxidantes como la cisteína, el ácido ascórbico, los grupos tiol (sulfhidrilo) no protéicos y algunas enzimas juegan un rol muy importante en la detoxificación de iones metálicos tóxicos para la planta (143).

Las diferencias encontradas en la literatura respecto al contenido de minerales y elementos traza metálicos y semimetálicos en este tipo de cultivos, puede deberse a varios factores, como ser: el origen geográfico, el medio de cultivo, los nutrientes, el uso de pesticidas y fertilizantes, el tiempo de siembra y el tipo de suelo.

Las tasas de absorción, translocación y retención de metales varían fuertemente entre las distintas poblaciones y especies de plantas, dependiendo de la tolerancia y la fisiología. Excepto por las plantas hiperacumuladoras de metales, la mayoría de las plantas restringen el movimiento de los iones metálicos en los tejidos fotosintéticos. Esto se logra mediante la restricción del transporte a través de la endodermis y removiendo cualquier ión móvil en el xilema por medio del almacenamiento en las paredes celulares y en las vacuolas o mediante la unión a metalotioneínas o fitoquelatinas (144). El movimiento de

los iones metálicos en los tejidos fotosintéticos puede inducir al estrés celular, así como a la promoción de la liberación de metales. Más aún, los tejidos fotosintéticos tienden a tener mayor tasa de descomposición que los tejidos no fotosintéticos: hojas vs. tallos y partes aéreas vs. partes enterradas.

Como se mencionó en la introducción, la captación de metales y semimetales por parte de las plantas, es bien un proceso pasivo o un proceso activo. Las plantas vasculares, como la alcachofa, captan metales desde sus raíces, mediante transpiración a través de las estomas sobre la superficie de las hojas, y mediante deposición sobre la superficie de las hojas (145). La captación, translocación, transformación y acumulación de especies metálicas en plantas son extremadamente importantes para la salud humana. El aumento de las concentraciones de los analitos en estudio mostrado en la **Tabla 34** y la **Tabla 35** sigue el orden hojas > frutos (excepto para Ni). Esto está de acuerdo con lo descrito en la literatura, ya que la mayoría de las plantas retienen mayores cantidades de elementos metálicos en sus raíces que en otros tejidos. En general, los tejidos foliares presentan las siguientes mayores concentraciones, seguido por los tallos y luego por los frutos. El particionamiento de elementos inorgánicos a nivel de trazas en las diferentes partes de la planta es una estrategia común para prevenir la toxicidad de las partes aéreas, lo cual es debido a la unión de estos elementos con ligandos específicos (146).

De acuerdo al contenido de minerales, los valores de concentración obtenidos para Cu y Zn en frutos de alcachofa están en muy buen acuerdo por los reportados por Pandino et al. (126). Además, los valores obtenidos para Cu y Ni en fruto son similares a los reportados por Ferré-Huguet et al. (147).

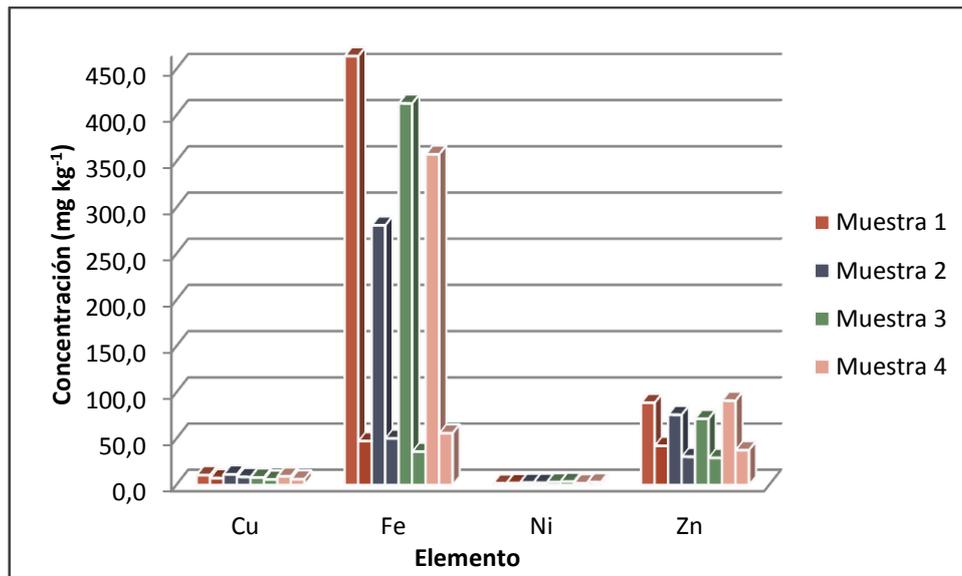


Figura 53 Comparación gráfica de las concentraciones de Cu, Fe, Ni y Zn obtenidas luego de analizar las muestras comerciales. Para cada muestra aparece a la izquierda el valor de la hoja y a la derecha el del fruto.

En la **Figura 53** se puede apreciar una representación gráfica en diagrama de barras de las concentraciones de Cu, Fe, Ni y Zn obtenidas luego de analizar las muestras comerciales de hojas y frutos de alcachofa. Los valores de concentración más altos encontrados fueron para el Fe en las hojas, siendo un orden mayor respecto al Zn y dos órdenes mayor respecto a Cu y Ni. Además fue el Fe el elemento que presentó mayor variabilidad entre muestra y muestra, y entre hoja y fruto pertenecientes a una misma muestra.

El fruto de la alcachofa podría considerarse como una fuente promisoría para cubrir los niveles de elementos esenciales de la ingesta diaria recomendada, en particular sería una buena fuente de elementos como Fe y Zn. En el caso del Zn, se trata de un mineral con propiedades quimiopreventivas en cáncer, que usualmente necesita ser ingerido de fuentes dietarias. Debido a los niveles encontrados, el fruto de la alcachofa podría ser destacado como una alternativa a los suplementos alimenticios, que son comúnmente utilizados para mitigar las deficiencias de este elemento.

Como organismos sésiles que son, las plantas han desarrollado estrategias para obtener metales esenciales del suelo. Ellas utilizan varios mecanismos para asimilar metales, los cuales involucran el transporte, la quelación y la secuestación. Como organismos multicelulares complejos, la captación y el flujo a nivel celular, deben estar muy bien coordinados con las necesidades de toda la planta para mantener la homeostasis de los iones metálicos. Los genomas de las plantas codifican grandes familias de transportadores metálicos que varían en las especificidades de sus sustratos, los patrones de expresión y la localización celular para gobernar la translocación de metales a lo largo de la planta. Los transportadores que están involucrados en el flujo de metales desde el citoplasma, ya sea

por el movimiento a través de la membrana plasmática o hacia los organelos, incluyen la familia P_{1B} -ATPasa y la familia de facilitadores de difusión de cationes (CDF). Estas proteínas transportadoras de metales, o bien movilizan metales desde la membrana plasmática hacia el citoplasma o bien desde los compartimentos intracelulares hacia el citoplasma. Una de ellas, encargada de la movilidad de hierro y zinc, es conocida como proteína transportadora de zinc/hierro- regulada (ZIP). Las P_{1B} -ATPasas utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para translocar cationes a través de las membranas biológicas y pueden dividirse en varias subfamilias, incluyendo las transportadoras de cationes divalentes como Cd, Pb y Zn y las transportadoras de iones monovalentes como el Cu.

En la **Figura 54** se puede apreciar un esquema general del transporte de iones metálicos dentro de la planta. Metales como Fe y Zn son asimilados del suelo y deben cruzar múltiples membranas celulares antes de ser transferidos al xilema para ser entregados a los tejidos en crecimiento. Los transportadores localizados en la membrana plasmática y sus sustratos están indicados. En este ejemplo la proteína IRT1 actúa en la epidermis para transportar Fe^{2+} hacia la raíz. La proteína YSL2 está localizada en la endodermis y en el periciclo para transportar Fe. Dos P_{1B} ATPasas (HMA2 y HMA4), translocan el Zn desde la raíz hasta los tejidos aéreos, probablemente exportándolo hacia el xilema.

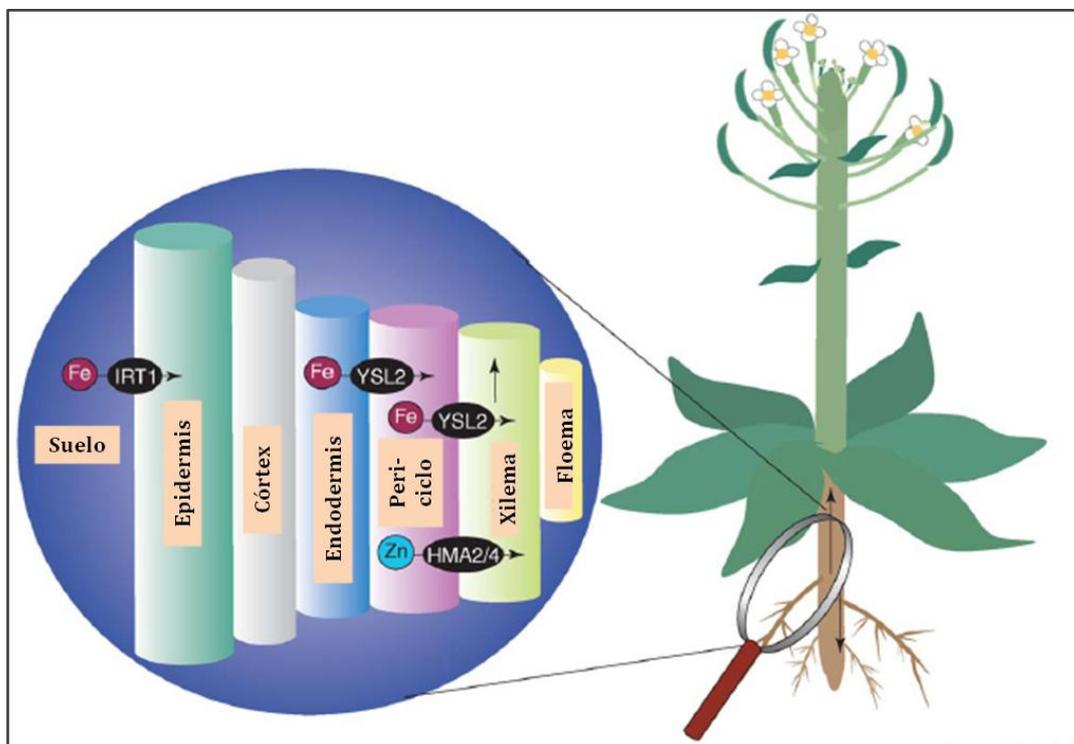


Figura 54 Esquema general del transporte de metales dentro de la planta (Figura adaptada de Colangelo et al. 2006) (146)

De forma de estudiar la interacción y correlación entre los elementos analizados en las muestras de hojas y frutos de alcachofa, se llevó a cabo un estudio de correlación de Pearson. Los resultados se presentan en la **Tabla 39** y la **Tabla 40**.

Tabla 39 Coeficientes de correlación de Pearson (r) para As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa.

<i>Elemento</i>	<i>As</i>	<i>Cd</i>	<i>Cu</i>	<i>Fe</i>	<i>Ni</i>	<i>Pb</i>	<i>Zn</i>
<i>As</i>	1						
<i>Cd</i>	-0,0383	1					
<i>Cu</i>	-0,4433	0,4384	1				
<i>Fe</i>	0,0716	-0,1664	0,3387	1			
<i>Ni</i>	0,1983	-0,7983	-0,7779	-0,4011	1		
<i>Pb</i>	0,2597	-0,8013	-0,8565	-0,3006	0,9828*	1	
<i>Zn</i>	0,2291	0,5984	-0,0254	0,3794	-0,5961	-0,4498	1

*Correlación significativa (P < 0,05).

Tabla 40 Coeficientes de correlación de Pearson (r) para As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en hojas de alcachofa.

<i>Elemento</i>	<i>As</i>	<i>Cd</i>	<i>Cu</i>	<i>Fe</i>	<i>Ni</i>	<i>Pb</i>	<i>Zn</i>
<i>As</i>	1						
<i>Cd</i>	0,3753	1					
<i>Cu</i>	-0,5329	0,4585	1				
<i>Fe</i>	0,7128	0,7477	-0,2187	1			
<i>Ni</i>	-0,3991	-0,5914	-0,4113	-0,3215	1		
<i>Pb</i>	0,6427	-0,3421	-0,9774*	0,2935	0,3709	1	
<i>Zn</i>	0,7207	0,7486	0,1867	0,6001	-0,8717	-0,0632	1

*Correlación significativa (P < 0,05).

Para estimar si los puntos experimentales correspondientes a dos variables aleatorias cuantitativas presentan una relación lineal, se puede calcular el coeficiente de correlación momento-producto o coeficiente de correlación de Pearson, r. El valor de r está dado por la siguiente ecuación (139):

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\{[(\sum_i (x_i - \bar{x})^2)][(\sum_i (y_i - \bar{y})^2)]\}^{1/2}} \quad (3.3)$$

Un minucioso estudio de esta ecuación muestra que r puede tomar valores en el intervalo de $-1 \leq r \leq +1$. Un valor de r de -1 describe una correlación negativa perfecta, es decir, todos los puntos experimentales se encuentran en una línea recta de pendiente negativa; en este caso el índice indica una dependencia total entre las dos variables llamada relación inversa: cuando una de ellas aumenta, la otra disminuye en proporción constante. En forma similar, cuando r es +1, se trata de una correlación positiva perfecta, ya que todos los puntos se encuentran exactamente en una línea recta de pendiente positiva; en este caso el índice indica una dependencia total entre las dos variables denominada relación

directa: cuando una de ellas aumenta, la otra también lo hace en proporción constante. Cuando no existe correlación entre x e y , el valor de r es cero; esto no necesariamente implica que las variables sean independientes: pueden existir todavía relaciones no lineales entre las dos variables.

Una vez calculado el valor del coeficiente de correlación se debe determinar si el valor obtenido muestra que las variables x e y están relacionadas en realidad o tan solo presentan dicha relación como consecuencia del azar. Un coeficiente de correlación es significativo si se puede afirmar, con una cierta probabilidad, que es diferente de cero. Más estrictamente, en términos estadísticos, preguntarse por la significación de un cierto coeficiente de correlación no es otra cosa que preguntarse por la probabilidad de que tal coeficiente proceda de una población cuyo valor sea cero. A este respecto, existen dos hipótesis posibles:

$H_0: r_{xy} = 0 \Rightarrow$ El coeficiente de correlación obtenido procede de una población cuya correlación es cero ($\rho = 0$).

$H_1: r_{xy} \neq 0 \Rightarrow$ El coeficiente de correlación obtenido procede de una población cuyo coeficiente de correlación es distinto de cero ($\rho \neq 0$).

Desde el supuesto de la Hipótesis nula se demuestra que la distribución muestral de correlaciones procedentes de una población caracterizada por una correlación igual a cero ($\rho = 0$) sigue una ley de *Student* con $N-2$ grados de libertad, de media el valor poblacional y desviación tipo (139):

$$s_r = \sqrt{\frac{1 - r_{xy}^2}{N - 2}} \quad (3.4)$$

En consecuencia, dado un cierto coeficiente de correlación r_{xy} obtenido en una determinada muestra se trata de comprobar si dicho coeficiente es posible que se encuentre dentro de la distribución muestral especificada por la Hipótesis nula. A efectos prácticos, se calcula el número de desviaciones tipo que presenta el coeficiente obtenido del centro de la distribución, según la siguiente ecuación (139):

$$t = \frac{r_{xy} - 0}{\sqrt{\frac{1 - r_{xy}^2}{N - 2}}} \quad (3.5)$$

Luego, se compara el valor obtenido con el valor de tablas para un cierto nivel de significación α y $N-2$ grados de libertad $t_{(\alpha, N-2)}$ que marca el límite (baja probabilidad de ocurrencia, según la Hipótesis nula) de pertenencia de un cierto coeficiente r_{xy} a la

distribución muestral de correlaciones procedentes de una población con $\rho = 0$. De esta forma si: $t > t_{(\alpha, N-2)} \Rightarrow$ Se rechaza la Hipótesis nula: la correlación obtenida no procede de una población cuyo valor $\rho_{xy} = 0$, por tanto las variables están relacionadas.

Los resultados del estudio de correlación realizado sobre los frutos de alcachofa presentados en la **Tabla 39** indican una fuerte correlación positiva ($P < 0,05$) entre el par Ni/Pb ($r = 0,98$; $t = 9,2$). También presentaron correlación positiva los pares As/Fe, As/Ni, As/Pb, As/Zn, Cd/Cu, Cd/Zn, Cu/Fe y Fe/Zn pero esta correlación no fue significativa. A su vez, los resultados indican una correlación negativa no significativa entre los pares As/Cd, As/Cu, Cd/Fe, Cd/Ni, Cd/Pb, Cu/Ni, Cu/Pb, Cu/Zn, Fe/Ni, Fe/Pb, Ni/Zn y Pb/Zn.

Los resultados del estudio realizado sobre las hojas de alcachofa presentados en la **Tabla 40** indican una correlación positiva no significativa entre los pares As/Cd, As/Fe, As/Pb, As/Zn, Cd/Cu, Cd/Fe, Cd/Zn, Cu/Zn, Fe/Pb, Fe/Zn y Ni/Pb. De igual forma, los resultados indican una fuerte correlación negativa ($P < 0,05$) entre el par Cu/Pb ($r = -0,98$; $t = 8,0$). El valor $t_{(0,05, 3)}$ extraído de tablas es 3,2.

3.2.7 Contenido de elementos metálicos y semimetálicos en las infusiones de alcachofa

Los contenidos de metales y semimetales encontrados en las infusiones de alcachofa se presentan en la **Tabla 41** junto con los correspondientes factores de transferencia respecto al contenido total de estos elementos en el material vegetal de partida.

Se puede apreciar una clara diferencia entre los factores de transferencia desde la hoja hacia la infusión y desde el fruto hacia la infusión, siendo mayores los de la hoja en todos los casos estudiados. El Cu fue quién se transfirió en mayor proporción tanto desde la hoja como desde el fruto (62,2% desde la hoja y 4,2% desde el fruto) dentro de los elementos en estudio. En segundo lugar se encontró el Zn (40,1% desde la hoja y 3,9% desde el fruto). Esto podría deberse a que estos elementos se encuentran en las hojas bajo la forma de sales solubles en agua.

Por otra parte el As y el Cd no fueron detectados en las infusiones, lo cual suma evidencia científica con respecto a la inocuidad alimentaria de las infusiones. Respecto al Pb, éste no fue detectado en las infusiones del fruto y se encontró por debajo del límite de cuantificación en las infusiones de la hoja.

Tabla 41 Contenido de metales en las infusiones de alcachofa y factores de transferencia respecto al contenido total del material vegetal de partida.

Elemento	Concentración (mg kg ⁻¹) (media, n=3)		Factor de transferencia (%)	
	Hoja	Fruto	Hoja	Fruto
As	ND	ND	-	-
Cd	ND	ND	-	-
Cu	6,1 ± 0,2	0,27 ± 0,01	62,2	4,2
Fe	12,2 ± 0,9	0,30 ± 0,01	2,2	0,9
Ni	0,93 ± 0,05	0,010 ± 0,001	48,9	0,4
Pb	<0,038	ND	-	-
Zn	38,2 ± 1,2	1,36 ± 0,07	40,1	3,9

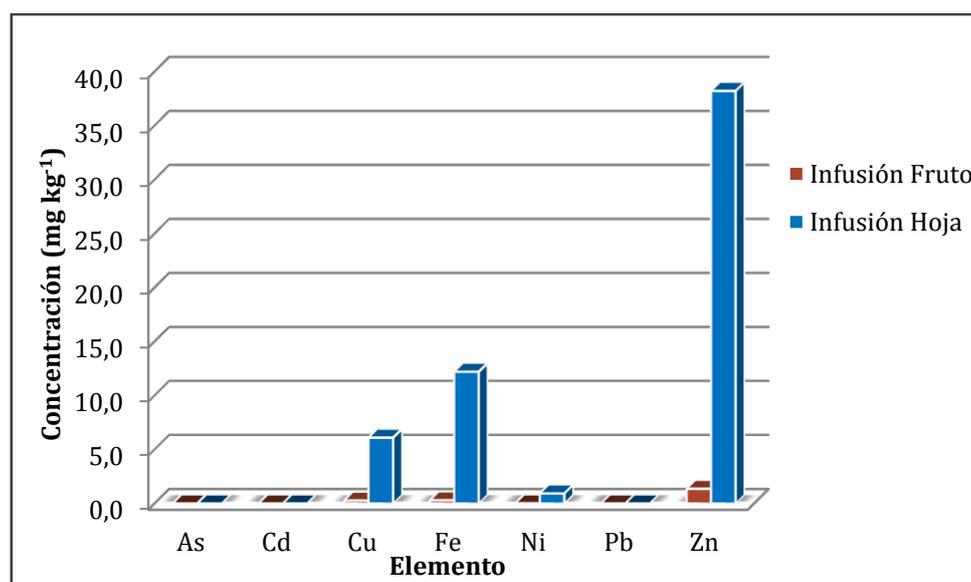


Figura 55 Representación gráfica del contenido de metales y semimetales en infusiones de alcachofa.

La Ingesta Dietaria de Referencia (IDR) consiste en un conjunto de documentos emitidos por la Junta Directiva de Alimentación y Nutrición del Instituto de Medicina de la Academia Nacional de Ciencias de E.E.U.U. Dicha Junta se ocupa de cuestiones de seguridad, calidad y suficiencia del suministro de alimentos, establece principios y directrices sobre la ingesta dietética adecuada y provee juicios de autoridad sobre las relaciones entre la ingesta de alimentos, la nutrición y la salud (148).

El término IDR es el término general para un conjunto de valores de referencia utilizados para planificar y evaluar la ingesta de nutrientes de personas sanas. Estos valores, que varían según la edad y el género, incluyen:

- ✓ La Ingesta Diaria Recomendada (IDR): nivel medio diario de la ingesta, suficiente para satisfacer los requerimientos nutricionales de casi todas (97% - 98%) las personas sanas.

- ✓ La Ingesta Adecuada (IA): establecida cuando la evidencia es insuficiente para desarrollar una IDR y se encuentra en un nivel asumido para asegurar una nutrición adecuada.
- ✓ La Ingesta Máxima Tolerable (IMT): ingesta máxima diaria que no causa efectos adversos para la salud.

En la **Tabla 42** se incluyen, a modo de ejemplo, los valores de IDR e IMT para Cu, Fe, Ni y Zn (para mujeres entre 31 y 50 años) y se comparan con los valores aportados por las infusiones de hojas y frutos, y por los frutos enteros de alcachofa. No existen aún valores de IDR para Ni, ni tampoco valores de IDR o IMT para As, Cd y Pb debido a la falta de datos.

Tabla 42 Tabla comparativa donde se incluyen los valores de IDR e IMT (**148**) para cada elemento y los aportes de estos elementos según los niveles en las infusiones y en el fruto total.

Elemento	IDR (mg/día)	IMT (mg/día)	Aporte (mg) de 1 taza (250 mL)		Aporte (mg) por porción (100 g)
			Fruto	Hoja	Fruto
Cu	0,9	10,0	0,001	0,031	0,69
Fe	18,0	45,0	0,002	0,061	3,34
Ni	---	1,0	0,0001	0,005	0,26
Zn	8,0	40,0	0,007	0,241	3,45

Valores de IDR e IMT definidos para mujeres entre 31 y 50 años de edad.

A modo de ejemplo, teniendo en cuenta los valores de concentración obtenidos y suponiendo que los elementos pudieran ser aprovechables en un 100% por el organismo, las infusiones de los frutos no serían de gran aporte nutricional. Sin embargo, las infusiones de las hojas podrían complementar la ingesta de estos nutrientes (sobre todo de Cu y Zn), aportando a la IDR de mujeres entre 31 y 50 años de edad, sumadas claro a una dieta saludable rica en minerales.

Respecto al fruto en su totalidad, consumido de forma sólida, suponiendo una ingesta de 100 g (aproximadamente 2 cabezales) y suponiendo que los elementos pudieran ser aprovechables en un 100% por el organismo, ya se estaría cumpliendo prácticamente con los requerimientos diarios de Cu de 0,9 mg/día según la IDR. De igual forma se estaría cubriendo aproximadamente la mitad del valor requerido para Zn de 8,0 mg/día y la quinta parte del valor requerido para Fe de 18,0 mg/día.

Estos hallazgos son de gran importancia para la evaluación de la alcachofa desde el punto de vista de sus propiedades nutraceuticas, y del papel que pueden jugar en el desarrollo de una dieta saludable.

3.3 Determinación del contenido fenólico y estudio de actividad antioxidante en alcachofa

3.3.1 Contenido de compuestos fenólicos en extractos de alcachofa

Se llevó a cabo la determinación del contenido fenólico en los tres extractos descritos en la sección 2.3.2. Como puede verse en la **Tabla 43**, la infusión posee el mayor contenido de compuestos fenólicos (108 mg/g extracto), seguido por el extracto hidroalcohólico (73 mg/g) y la decocción (63 mg/g); y estos contenidos representan el 10,8%, 7,3% y 6,3% del peso seco de cada extracto respectivamente. Estos resultados están de acuerdo con aquellos encontrados en extractos de hojas de alcachofa (en soluciones 60% metanol) de las variedades Imperial Star, Violet y Green Globe (6,8 – 9,8% de peso seco) (107). Además, los contenidos de compuestos fenólicos obtenidos fueron bastante más altos que los naturalmente encontrados en extractos de alcachofa, según lo reportado para varios clones estudiados (2,1 – 8,4 mg/g hojas, peso seco) (149).

La metodología HPLC-DAD-ESI-MS/MS aplicada permitió la separación (**Figura 56**), cuantificación e identificación tentativa de 9 compuestos fenólicos (**Tabla 43**).

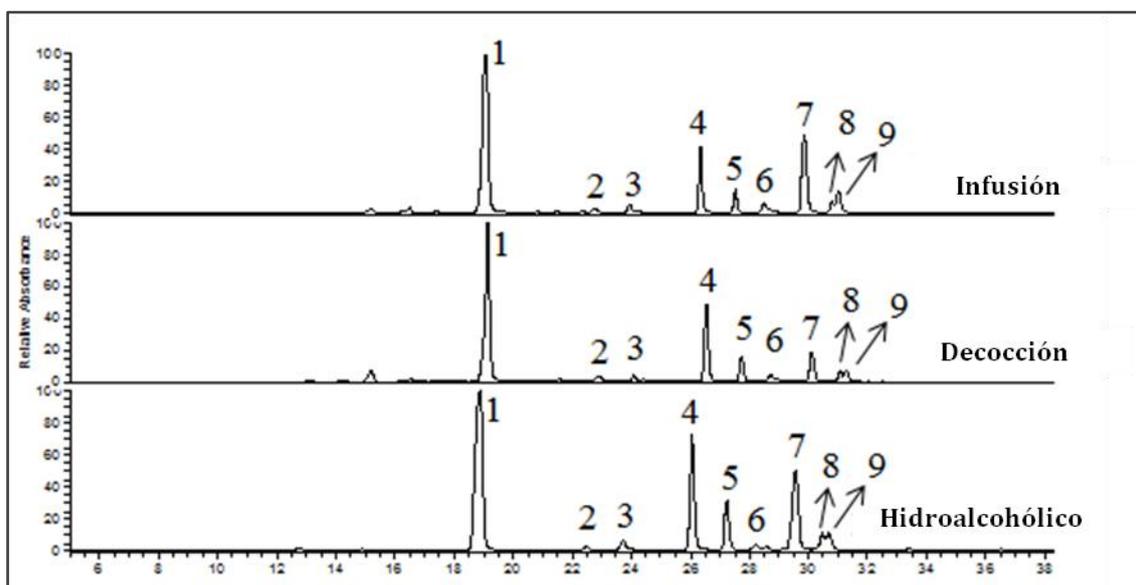


Figura 56 Cromatograma obtenido mediante HPLC-DAD (330 nm) de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de alcachofa. La caracterización de los picos se puede ver en la **Tabla 43**.

Tabla 43 Características cromatográficas y espectroscópicas y contenido de compuestos fenólicos en los extractos de infusión, decocción e hidroalcohólico de hojas de alcachofa.

Pico	t_R (min) ^a	λ_{max} (nm) ^b	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (-) (m/z) ^c	Compuesto	Concentración (mg/g extracto) ^d		
						Infusión	Decocción	Hidroalcohólico
1	19,1	300(sh), 326	353.0885	191, 179, 173, 161, 135	Ácido clorogénico ^e	64 ± 2	40 ± 3	43 ± 2
2	22,7	280(sh), 311	337.0933	191, 163, 145, 109	Ácido <i>p</i> -cumaroilquínico ^e	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,1	0,09 ± 0,03
3	23,9	290(sh), 325	367.1040	191, 173, 161, 143, 135, 127	Ácido 5-Feruloilquínico ^e	1,6 ± 0,3	0,9 ± 0,1	0,6 ± 0,1
4	26,3	265(sh), 348	593.2840	447, 327, 285, 257, 241	Luteolina-7-rutinósido ^f	7,6 ± 0,1	7,4 ± 0,8	9,3 ± 0,4
5	27,5	265(sh), 348	447.0938	327, 285, 241	Luteolina-7-glucósido (cinarosida) ^f	3,0 ± 0,1	2,9 ± 0,4	3,8 ± 0,3
6	28,5	295(sh), 325	515.1202	353, 335, 179, 173	Ácido 3,4-Dicafeoilquínico ^e	2,1 ± 0,1	0,9 ± 0,3	0,03 ± 0,01
7	29,9	290(sh), 326	515.1207	353, 335, 191	Ácido 1,3-Dicafeoilquínico (cinarina) ^e	22,4 ± 0,1	6,5 ± 0,5	14 ± 1
8	30,8	270(sh), 346	533.0952	489, 447, 371, 285	Luteolina-7-malonil-hexósido ^f	1,7 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,0 ± 0,1
9	31,1	295(sh), 327	515.1209	353, 335, 299, 255, 203, 173	Ácido 4,5-Dicafeoilquínico ^e	5,1 ± 0,1	1,9 ± 0,4	1,1 ± 0,1
Contenido fenólico (suma total)						108 ± 2	63 ± 5	73 ± 4

^a Tiempo de retención utilizando la columna C18 Synergi Hydro (4µm). ^b Solvente: gradiente 0,5% de ácido fórmico en agua y acetonitrilo con 0,5% de ácido fórmico. ^c En el MS², se muestra resaltado el ión más abundante. ^d Media ± Desviación estándar (n = 3). Los picos fueron cuantificados como equivalentes de ^e ácido clorogénico (a 325 nm) y ^f luteolina (a 348 nm).

Como puede apreciarse en la **Tabla 43**, el ácido clorogénico (pico 1) fue el compuesto fenólico mayoritario en todos los extractos y fue positivamente identificado luego de comparar el comportamiento cromatográfico y las características espectroscópicas (espectro UV-Vis, relación m/z exacta y espectros MS/MS) contra un estándar. El pico 2 muestra una molécula desprotonada [M-H]⁻ a 337 m/z, un fragmento MS/MS a 191 m/z, el cual representa a la molécula de ácido quínico luego de la pérdida neutra de una fracción cumaril (-146 u), y fue asignado como ácido p-cumaroilquínico. El pico 3 fue tentativamente identificado como ácido 5-feruloilquínico, con [M-H]⁻ a 367 m/z y un fragmento MS/MS a 191 m/z [M-H-fracción feruloil]⁻; el cual se corresponde con patrones de fragmentación descritos en extractos de alcachofa (110). Los picos 4, 5 y 8 fueron tentativamente identificados como luteolina-7-rutinósido, luteolina-7-glucósido y luteolin-7-malonilhexósido respectivamente; aunque en el presente estudio, la posición exacta de la fracción azúcar no pudo ser determinada por la metodología aplicada. La asignación fue basada en reportes anteriores relativa a la identificación concluyente (Resonancia Magnética Nuclear, NMR) de estos compuestos en extractos de alcachofa (107) (108) (150) (110). Adicionalmente, estos compuestos presentaron [M-H]⁻ a 593 m/z (pico 4), 447 m/z (pico 5) y 533 m/z (pico 8) y fragmentos característicos en el espectro MS/MS, que indican la escisión del enlace glicosídico como pérdidas neutras: 162 u (hexosa), 146 u (ramnosa) y 308 u (rutinosa). Finalmente, los picos 6, 7 y 9 fueron asignados como 3,4-, 1,3- (cinarina) y ácido 4,5-dicafeoilquínico respectivamente, con el mismo [M-H]⁻ a 515 m/z y fragmentos intensos en el espectro MS/MS a 353 m/z [M-H-fragmento cafeoil]⁻. Estos isómeros del ácido dicafeoilquínico fueron identificados mediante LC-MS y NMR (107) (108) y son comúnmente reportados en extractos de alcachofa, siendo la cinarina (ácido 1,3-O-dicafeoilquínico) el más abundante (150) (110). El ácido 4,5-dicafeoilquínico es considerado un artefacto de la cinarina que es inevitablemente producido durante el proceso de extracción para liberar la tensión estérica de la molécula de cinarina, que se reorganiza formando isómeros más estables (151). Otros productos posibles de la hidrólisis de la cinarina, como el ácido caféico, que han sido reportados en la literatura (106), no fueron detectados en los extractos estudiados.

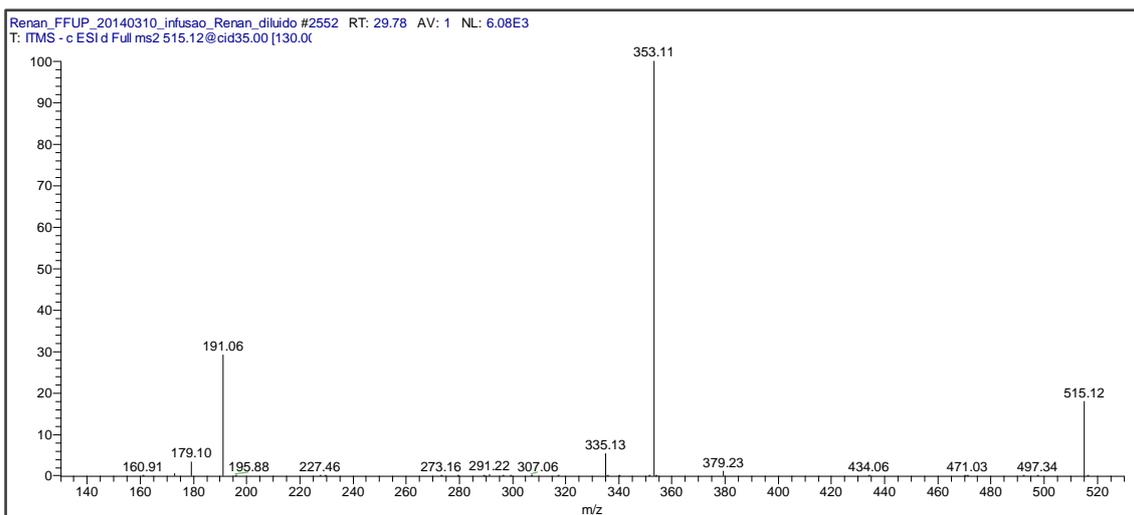


Figura 57 Especto MS/MS correspondiente a la cinarina.

3.3.2 Capacidad secuestrante de los extractos de alcachofa contra las especies ROS y RNS

La producción de especies reactivas es beneficiosa en algunos procesos fisiológicos, como ser la defensa contra agentes infecciosos y en la función de un gran número de sistemas de señalización celular. Sin embargo, un desequilibrio entre la generación de especies reactivas pro-oxidantes y la capacidad antioxidante de la célula, afecta varios componentes celulares como ser los lípidos, las proteínas y el ADN (denominado estrés oxidativo). Este fenómeno está estrechamente relacionado con un gran número de desordenes humanos, incluyendo enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, enfermedades neurodegenerativas y patologías del hígado. Por lo tanto es de vital importancia el equilibrio de las defensas antioxidantes ya que representan la remoción de radicales libres (pro-oxidantes), proporcionando máxima protección para los sitios biológicos (152). Los extractos estudiados presentaron una notable capacidad para remover las especies ROS y RNS analizadas, con excepción del H₂O₂, tal como se muestra en la **Tabla 44**. Es importante destacar que la actividad antioxidante de estos extractos no puede ser atribuida a la presencia de un compuesto fenólico en particular sino a la acción conjunta de varias especies bioactivas. La capacidad secuestrante de los compuestos estudiados proporcionó excelentes resultados, dado los bajos valores de IC₅₀ encontrados. La capacidad secuestrante de todos los extractos es muy dependiente del contenido fenólico. Es importante destacar que los extractos fueron realizados de la forma en que son más comúnmente consumidos por la población: como infusión a nivel domestico y como alcoholatura como materia prima en los productos farmaceuticos.

Tabla 44 Capacidad secuestrante de los extractos de alcachofa contra radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl), oxígeno singulete (1O_2) y radical peroxilo (ROO^{\bullet}).

Extractos	IC ₅₀ (µg/mL)				ROO [•] (S _{Muestra} /S _{Trolox})
	O ₂ ^{•-}	H ₂ O ₂	HOCl	¹ O ₂	
Infusión	34 ± 2	NA	3,7 ± 0,7	29,0 ± 0,9 ^a	0,64 ± 0,09
Decocción	43 ± 2	NA	4,2 ± 0,9	30,1 ± 2,2 ^a	0,62 ± 0,07
Hidroalcohólico	NA	NA	4,7 ± 1,1	20,5 ± 1,0 ^a	0,31 ± 0,04
Controles (+)					
Quercetina	-	-	0,28 ± 0,07	0,8 ± 0,2 ^b	1,34 ± 0,07
Tiron	0,065 ± 0,003	-	-	-	-
Ácido Ascórbico	-	106,5 ± 7,9	-	-	1,44 ± 0,09

IC₅₀ = Concentración *in vitro* requerida para disminuir al 50% la reactividad de las especies reactivas en estudio en el medio ensayado (media ± desviación estándar, n = 4). S_{Muestra} = pendiente de las curvas de los extractos de alcachofa. S_{Trolox} = pendiente de la curva de trolox. NA = No se encontró actividad hasta 1 mg/mL.

^a(n = 2). ^b Valor de IC₅₀ obtenido según Chisté et al. (2012).

En primer lugar se estudió la inhibición de la producción de $O_2^{\bullet-}$ por los extractos de alcachofa. La producción de $O_2^{\bullet-}$ juega un papel importante en la señalización celular redox y en el desarrollo de condiciones fisiopatológicas, tales como hipertensión y aterosclerosis (153). La producción excesiva de $O_2^{\bullet-}$ es crítica no por la acción de la especie en sí misma, ya que es relativamente poco reactiva contra la mayoría de los sustratos biológicos, sino por el hecho de que la especie $O_2^{\bullet-}$ es precursora de una gran variedad de poderosos agentes oxidantes (154). La inhibición contra el superóxido fue mayor al utilizar la infusión, la cual presentó un valor de IC₅₀ de 34±2 µg mL⁻¹. La eficacia de la infusión puede estar relacionada con el mayor contenido de compuestos fenólicos, o más precisamente con el contenido de ácido clorogénico, ya que este compuesto fue descrito como un buen secuestrador de $O_2^{\bullet-}$ (155) (156). La especie $O_2^{\bullet-}$ es producida *in vivo* por múltiples procesos que llevan a la generación de otras tantas especies oxidantes. Por ejemplo, la especie $O_2^{\bullet-}$ es rápidamente dismutada, espontáneamente o mediante catálisis enzimática (por la superóxido dismutasa, SOD), a H_2O_2 (154). El H_2O_2 , por si mismo, es una de las especies ROS menos reactivas. Sin embargo, al igual que el $O_2^{\bullet-}$, el H_2O_2 puede generar otras especies con efectos más potentes y tóxicos, como los radicales hidroxilo (HO•).

No se detectó actividad secuestrante para los compuestos en estudio contra H_2O_2 . Estos resultados fueron obtenidos utilizando amplex red como sonda específica para H_2O_2 . Para evitar conclusiones erróneas, también se utilizó lucigenina para detectar H_2O_2 , y nuevamente, los extractos analizados no inhibieron la generación de H_2O_2 hasta una concentración de 1 mg mL⁻¹. El H_2O_2 resulta en la producción de dos de las especies ROS más peligrosas, el radical HO• y el HOCl. En presencia de hierro y otros iones metálicos, el

H₂O₂ puede formar HO• mediante la reacción de Fenton (152). La mayor parte del H₂O₂ producido por células fagocíticas es consumido por la enzima mieloperoxidasa (MPO) para catalizar la formación de HOCl. Esta especie reactiva es muy tóxica, entre 100 y 1000 más tóxica que O₂⁻ y H₂O₂ (157). El HOCl ha sido implicado en varias patologías como ser aterosclerosis, daño en los riñones, algunos tipos de cáncer, esclerosis múltiple y enfermedad de Alzheimer (158) (159) (160).

Los tres extractos analizados presentaron buena capacidad secuestrante contra HOCl, con valores de IC₅₀ bajos y muy similares entre ellos. Sin embargo, la infusión fue la más eficiente con un valor de IC₅₀ (3,7 ± 0,7) µg mL⁻¹. De acuerdo a Pérez-García et al. 2000 (106), el ácido clorogénico, el ácido caféico, la cinarina y la luteolina contribuyen a la actividad antioxidante de los extractos de alcachofa en neutrófilos humanos. Esto puede explicar los mejores resultados obtenidos con la infusión, el cuál presentó un mayor contenido de compuestos fenólicos. Sin embargo, además de estos constituyentes, otros componentes del extracto pueden haber contribuido a la actividad antioxidante.

El radical HO• es uno de los agentes oxidantes más fuertes, el cual induce severos daños al inicializar la peroxidación de lípidos debido a su reactividad con ácidos grasos poli-insaturados, resultando en la producción de especies ROO• entre otros agentes citotóxicos (161). En este trabajo se evaluó el potencial de los extractos de alcachofa para secuestrar especies ROO• mediante el ensayo ORAC. Los resultados mostraron que la infusión fue el más eficiente de los tres extractos ensayados. La capacidad de los extractos de alcachofa de inhibir la peroxidación de lípidos ya ha sido previamente reportada (162). Estos autores atribuyen la inhibición de la peroxidación de lípidos a la luteolina (1 µM), que ha demostrado una eficacia similar a la de 20 µg mL⁻¹ de extracto de alcachofa. También el ácido clorogénico ha demostrado su capacidad antioxidante mediante el aumento de la resistencia de la LDL a la peroxidación (162). Esto puede deberse a la actividad secuestrante de la alcachofa contra las especies ROO•. Estos resultados constituyen un hallazgo importante, teniendo en cuenta la importancia de la oxidación de lípidos en los sistemas biológicos.

También en este trabajo se estudiaron los efectos de los extractos de alcachofa contra especies RNS, ya que no había reportes previos en la literatura. La reactividad de las especies RNS puede poseer profundos efectos sobre la actividad biológica de numerosas moléculas (163). La producción de especies RNS comienza con la producción de la especie •NO que es producida por la enzima óxido nítrico sintasa inducible mediante la conversión de L-arginina a L-citrulina (163). La especie •NO juega un papel crítico en numerosos procesos fisiológicos, así como en la fisiopatología de muchas enfermedades humanas. Su toxicidad no está solo relacionada con los niveles de generación de •NO sino que también

depende ampliamente de los niveles y tipos de otras especies que reaccionan con $\cdot\text{NO}$, convirtiéndolo en especies oxidantes tóxicas y agentes de nitración. Por ejemplo, la reacción entre $\cdot\text{NO}$ and $\text{O}_2\cdot^-$ produce ONOO^- que ha demostrado la capacidad de oxidar biomoléculas tales como, lípidos, proteínas, carbohidratos y ADN, mediante mecanismos de reacción complejos y fuertemente dependientes del pH. Esta especie RNS ha sido implicada en enfermedades tales como arteriosclerosis, problemas cardiovasculares, shock séptico, cáncer, diabetes, asma y desordenes neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson (163). Los resultados obtenidos demuestran claramente que los extractos de alcachofa estudiados son efectivos secuestradores de especies RNS, tales como $\cdot\text{NO}$ y ONOO^- . El contenido fenólico de los extractos de alcachofa se atribuye como responsable de la eficacia en la inhibición de los efectos oxidantes de $\cdot\text{NO}$ y ONOO^- . Los extractos de infusión y decocción, que presentaron los mayores contenidos de compuestos fenólicos, presentaron también la mayor capacidad secuestrante contra las especies $\cdot\text{NO}$ y ONOO^- , con valores de IC_{50} muy pequeños (**Tabla 45**). La capacidad de ácido clorogénico de secuestrar la especie ONOO^- ha sido reportada previamente (164).

Tabla 45 Capacidad secuestrante de los extractos de alcachofa contra óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) y peroxinitrito (ONOO^-).

Extractos	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	$\cdot\text{NO}$	ONOO^-	
		Ausencia de NaHCO_3	Presencia de NaHCO_3 25 mM
Infusión	$5,5 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,2$	$5,6 \pm 0,2$
Decocción	$6,8 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,4$
Hidroalcohólico	$11,0 \pm 0,8$	$5,1 \pm 0,3$	$6,5 \pm 0,2$
Control (+)			
Quercetina*	$0,53 \pm 0,04$	$0,156 \pm 0,001$	$0,26 \pm 0,02$

IC_{50} = Concentración *in vitro* requerida para disminuir en un 50% la reactividad de las especies reactivas en estudio en el medio ensayado (media \pm desviación estándar, n = 4).

Ha sido reportado que las concentraciones fisiológicas de CO_2 pueden modular la reactividad del ONOO^- debido a la rápida reacción entre ellos, dando lugar a las especies $\cdot\text{NO}_2$ y $\text{CO}\cdot^-$, que son las principales especies radicales responsables de las reacciones de nitración y oxidación que generalmente se observan *in vivo* (154). De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio es de esperarse que los extractos de alcachofa sean también efectivos secuestradores de las especies $\cdot\text{NO}_2$ and $\text{CO}\cdot^-$ ya que esta capacidad es mantenida en presencia y ausencia de la especie HCO_3^- .

3.4 Estudio de bioaccesibilidad de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa

3.4.1 Determinación de la fracción bioaccesible de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa

Las fracciones bioaccesibles halladas para As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn luego de los procesos simulados de digestión gástrica y digestión intestinal de los frutos de alcachofa analizados en la etapa de optimización y de las muestras adquiridas comercialmente, y el porcentaje de bioaccesibilidad de cada uno de ellos, se resumen en la **Tabla 46**.

El elemento mayormente bioaccesible en la solución gastrointestinal simulada fue el Cu con un valor de bioaccesibilidad promedio de 77%, seguido por el Zn, luego el Ni y por último el Fe. Los contaminantes inorgánicos As, Cd y Pb no fueron detectados en las soluciones gastrointestinales, hecho que aporta evidencia científica respecto a la inocuidad alimentaria del vegetal. Si bien, como se había comentado anteriormente en la sección **3.2.7**, las concentraciones de estos elementos potencialmente tóxicos se encuentran por debajo de los límites máximos establecidos por el Reglamento MERCOSUR, el hecho de que su absorción intestinal sea mínima es muy positivo, ya que evita la posible acumulación de los mismos en los diferentes tejidos biológicos.

La fracción bioaccesible es la porción del nutriente ingerido que se encuentra disponible para su utilización en las funciones fisiológicas normales y para almacenamiento. Los factores que pueden afectar esta disponibilidad pueden ser la especie química del nutriente, la forma en que se libera de la matriz alimenticia, las interacciones con otros componentes presentes en la matriz alimenticia, la presencia de supresores y otros cofactores y la formación de compuestos estables de metabolización lenta.

De acuerdo a Sandberg 2002 (165), las fibras y los fitatos presentes en ciertos vegetales pueden formar compuestos insolubles con proteínas cargadas positivamente y con cationes del Cu o del Zn a pH intestinal y como consecuencia, la bioaccesibilidad de estos elementos puede verse reducida.

Puede notarse en la **Tabla 46** como los porcentajes de bioaccesibilidad de algunos elementos variaron ligeramente según la muestra en estudio. Esto puede deberse a la composición específica de cada una de las muestras de alcachofa, por ejemplo, a la cantidad y calidad de proteínas y a la presencia de compuestos tales como fibras, polifenoles y fitatos (que pueden inhibir la bioaccesibilidad de los minerales) así como a la forma química de los elementos y a las interacciones entre nutrientes.

Tabla 46 Fracciones bioaccesibles y porcentajes de bioaccesibilidad *in vitro* para los elementos en estudio en las muestras de frutos de alcachofa analizadas.

Elemento	Fracción bioaccesible (mg kg ⁻¹)					Bioaccesibilidad (%)				
	B	1	2	3	4	B	1	2	3	4
As	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cd	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cu	4,8 ± 0,4	5,9 ± 0,3	6,6 ± 0,3	4,1 ± 0,2	4,8 ± 0,3	74,4	82,3	77,8	71,3	79,5
Fe	14,2 ± 0,6	19,2 ± 0,9	23,7 ± 1,1	17,7 ± 0,9	22,4 ± 1,2	42,5	40,7	47,3	49,5	40,1
Ni	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,1	1,1 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	46,2	49,3	51,2	41,3	54,7
Pb	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Zn	19,3 ± 0,8	21,6 ± 0,7	18,1 ± 0,6	18,5 ± 0,07	21,2 ± 0,06	55,9	51,2	59,7	63,5	56,4

B: Muestras blanco de frutos de alcachofa utilizadas en la etapa de optimización.

1, 2, 3 y 4: Muestras comerciales de frutos de alcachofa.

ND: No detectado.

Los elementos traza esenciales son nutrientes que se encuentran presentes en bajas cantidades pero que son indispensables en la dieta para mantener un correcto funcionamiento del metabolismo humano. Sin embargo, altas concentraciones de esos elementos, por ejemplo concentraciones que exceden los valores necesarios requeridos para activar las funciones biológicas de los organismos vivientes, pueden ser peligrosas y producir efectos tóxicos. El exceso de metales traza puede ser acumulado en el cuerpo humano y producir daños en varios tejidos biológicos, incluyendo los del sistema nervioso, el sistema inmune y el sistema endócrino entre otros (166). Por lo tanto, una ingesta apropiada de minerales esenciales es un aspecto muy importante de una dieta saludable.

Se han establecido varios niveles de referencia para minerales esenciales, seguros para el consumo humano. Estos han sido establecidos, como se comentó anteriormente en la sección 3.2.8, por la Junta Directiva de Alimentación y Nutrición del Instituto de Medicina de E.E.U.U., la cuál ha definido la IDR y la IMT para los elementos esenciales para la salud.

Tabla 47 Tabla comparativa donde se incluyen los valores de IDR e IMT según la Junta Directiva de Alimentación y Nutrición del Instituto de Medicina de E.E.U.U. (148) para cada elemento y los aportes de estos elementos según su bioaccesibilidad promedio en los frutos de alcachofa.

Elemento	IDR (mg/día)	IMT (mg/día)	Aporte (mg) por porción (100 g)
			Fruto
Cu	0,9	10,0	0,52
Fe	18,0	45,0	1,94
Ni	---	1,0	0,12
Zn	8,0	40,0	1,97

Valores de IDR e IMT definidos para mujeres entre 31 y 50 años de edad.

Considerando los resultados de bioaccesibilidad promedio obtenidos luego de la digestión gastrointestinal simulada, se calcularon los aportes de Cu, Fe, Ni y Zn generados por la ingesta de una porción de 100 g de fruto, tal como se muestra en la **Tabla 47**.

Por lo tanto, a modo de ejemplo, suponiendo la ingesta de 100 g de fruto (aproximadamente 2 cabezales), ya se estaría cumpliendo con más de la mitad de los requerimientos diarios de Cu de 0,9 mg/día según la IDR de mujeres entre 31 y 50 años de edad. De igual forma se estaría cubriendo aproximadamente la cuarta parte del valor requerido para Zn de 8,0 mg/día y la novena parte del valor requerido para Fe de 18,0 mg/día. De igual forma, si la ingesta fuera de 200 g de fruto (aproximadamente 4 cabezales), ya se estaría cubriendo la ingesta diaria de Cu, la mitad de la ingesta diaria

de Zn y la quinta parte de la ingesta diaria de Fe y no se estaría excediendo el valor de IMT para Ni de 1,0 mg/día.

Estos hallazgos son de gran importancia para la evaluación de la alcachofa desde el punto de vista de sus propiedades nutraceuticas 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.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES

4.1 Determinación de residuos de pesticidas en alcachofa

Se evaluaron diferentes metodologías para el análisis de residuos de pesticidas en hojas y frutos de alcachofa, con el fin contribuir a la sustentabilidad del ecosistema agrícola. Para ello, se buscó por un lado desarrollar una estrategia para conocer el nivel de residuos en estos cultivos, y por otro, generar una herramienta de análisis ambientalmente más amigable en comparación con las técnicas clásicas de extracción líquido – líquido que conllevan la utilización de grandes cantidades de solventes.

El método seleccionado es una metodología novedosa para las matrices del estudio, que permitió determinar simultáneamente 98 pesticidas (63 pesticidas mediante LC-MS/MS y 35 pesticidas mediante GC-MS), los cuales pertenecen a los paquetes tecnológicos internacionales utilizados en estos cultivos, muchos de ellos utilizados en Uruguay. La metodología desarrollada es de bajo costo y pasible de ser aplicada en laboratorios de rutina para la evaluación de la presencia de estos residuos de pesticidas utilizados en los cultivos de alcachofa y sobre todo como una herramienta para llevar a cabo estudios de inocuidad alimentaria de estos cultivos altamente consumidos en todo el mundo debido a sus vastas propiedades nutricionales y farmacológicas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el método seleccionado para el análisis de residuos de pesticidas en hojas y frutos de alcachofa, fue el protocolo QuEChERS citrato modificado con la adición de CaCl_2 en la etapa de *clean-up*. Este método probó ser el mejor de los evaluados, en cuanto a las cifras de mérito obtenidas. Los buenos resultados alcanzados se pueden deber a las ventajas que el método QuEChERS posee sobre la extracción con acetato de etilo y sobre la extracción MSPD, como ser las propiedades del solvente así como el comportamiento de los sorbentes utilizados durante la etapa de *clean-up*. Mientras que el acetonitrilo se encarga de que haya una baja cantidad de compuestos no polares coextraídos de la matriz, el CaCl_2 y el PSA remueven en forma eficaz los coextractivos polares y moderadamente polares presentes en los extractos.

El método validado presentó buena selectividad, veracidad, precisión y sensibilidad. Los límites de cuantificación obtenidos fueron menores o iguales a los correspondientes LMRs establecidos por la Unión Europea.

El método validado fue exitosamente aplicado al análisis de muestras reales de hojas y frutos de alcachofa nacionales. Las concentraciones de residuos de pesticidas encontradas en las muestras analizadas fueron menores o iguales a los respectivos LMRs, cumpliendo de esta forma con normativas legales de la Unión Europea. Esta información aporta evidencia científica sobre la inocuidad alimentaria de estos cultivos en Uruguay.

4.2 Determinación de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en alcachofa

Tres métodos novedosos, simples y amigables con el medio ambiente para la preparación de muestras para la extracción y subsecuente determinación de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en hojas y frutos de alcachofa fueron optimizados y validados.

Los métodos de extracción asistida con ultrasonido y con ozono para la preparación de las muestras fueron llevados a cabo utilizando ácidos diluidos y sin la necesidad de calentamiento externo, estando esto de acuerdo con los principios de la Química Verde. Los tres métodos fueron precisos y veraces para la determinación de los elementos en estudio, siendo la extracción asistida con ozono la metodología más novedosa de las tres, ya que no se ha reportado en la literatura sobre el tratamiento de muestras vegetales de esta forma.

Respecto a los niveles de concentración de los contaminantes inorgánicos As, Cd y Pb encontrados en las muestras analizadas, estas cumplen con lo establecido en el Reglamento MERCOSUR y por lo tanto se consideran aptas para ser consumidas por la población sin riesgos mayores para la salud. No se sabe si los niveles de estos elementos, aún cumpliendo con los requisitos de la normativa, no pudieran representar algún riesgo a largo plazo.

Los métodos propuestos pueden postularse como alternativas para el monitoreo de la inocuidad alimentaria de estos cultivos, desde el punto de vista del cumplimiento con las normativas y para control de los niveles de estos contaminantes para estudios toxicológicos.

Respecto al contenido de minerales esenciales, tanto las hojas de alcachofa (utilizadas en infusiones) como los frutos, son posibles fuentes de Cu y Ni, pero sobre todo representan una importante fuente de aporte de Fe y Zn a la dieta, principalmente el fruto consumido en forma sólida.

4.3 Determinación del contenido fenólico y estudio de actividad antioxidante en alcachofa

La capacidad antioxidante de las infusiones de hojas de alcachofa y de los frutos se relaciona con el alto contenido de compuestos fenólicos de la misma. Los compuestos fenólicos pertenecen al grupo de los llamados compuestos bioactivos, a los cuales se ha atribuido la habilidad de reducir los riesgos de contraer ciertos desórdenes degenerativos, tales como el cáncer, inflamaciones, enfermedades cardiovasculares y las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. En general, estos efectos preventivos se han relacionado con la capacidad de los compuestos de inhibir reacciones de oxidación a nivel fisiológico.

La producción de especies reactivas es beneficiosa en algunos procesos fisiológicos, sin embargo, un desequilibrio entre la generación de especies reactivas pro-oxidantes y la capacidad de defensa antioxidante de la célula, puede afectar los principales componentes celulares.

Se ha demostrado la importancia de consumir infusiones preparadas a partir de hojas de alcachofa, debido a su alto contenido de compuestos fenólicos. Más aún, el trabajo conjunto con el grupo de investigación de Portugal ha generado una publicación que constituye el primer reporte acerca de la capacidad secuestrante de los extractos acuosos e hidroalcohólicos de hojas de alcachofa contra las especies RNS y ROS más relevantes a nivel fisiológico. Estos hallazgos confirman que la producción de extractos naturales a partir de fuentes naturales accesibles, con altos contenidos de compuestos bioactivos, pueden ser considerados como interesantes abordajes para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. A partir de este estudio se concluyó que los extractos de alcachofa poseen eficiente capacidad antioxidante contra las especies ROS y RNS, siendo el extracto de infusión acuosa el de capacidad antioxidante más prometedora. Estos hallazgos sugieren entonces que la alcachofa podría ser una potencial fuente de antioxidantes naturales y que posee un innegable valor nutracéutico.

4.4 Estudio de bioaccesibilidad de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa

Se realizó un estudio gastrointestinal simulado *in vitro* para evaluar la bioaccesibilidad de As, Cd, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en frutos de alcachofa. El enfoque se basó en una técnica de extracción que simula lo que ocurre en los compartimentos del estómago y del intestino delgado.

Comparando, a modo de ejemplo, los resultados de bioaccesibilidad obtenidos para los elementos en estudio con los correspondientes valores de IDR establecidos por la Junta Directiva de Alimentación y Nutrición del Instituto de Medicina de E.E.U.U. para mujeres entre 31 y 50 años, la ingesta de una porción de 100 g de fruto de alcachofa por día sería una fuente muy rica para una dieta saludable ya que aportaría más de la mitad de la cantidad de Cu requerida por día y además también aportaría de forma importante a los requerimientos diarios de Fe y Zn. Más aún, los valores de IMT para este grupo étnico no se ven excedidos.

Esta es la primera vez que se realiza un estudio de bioaccesibilidad de minerales en frutos de alcachofa (*Cynara Cardunculus L subsp. Cardunculus*) utilizando un modelo de digestión gastrointestinal *in vitro*. Los datos que relacionan la concentración total con la fracción bioaccesible de los minerales presentes proveen el punto de partida para la realización de estudios más complejos y en profundidad desde el punto de vista nutricional, de forma de poder establecer recomendaciones para la ingesta dietaria diaria de este vegetal.

4.5 Conclusiones generales

Todos los objetivos planteados se han cumplido exitosamente. Los resultados obtenidos se han difundido en publicaciones científicas internacionales con referato y varios eventos científicos del área de investigación.

Se ha establecido contacto con los productores de alcachofa para promover la calidad de este alimento de consumo, no muy popular en Uruguay creando un vínculo universidad-productores.

Durante el desarrollo de esta tesis se utilizaron estrategias simples, rápidas y novedosas de preparación de las muestras como ser el uso de la extracción asistida mediante ondas de ultrasonido y mediante ozonización.

La estrategia del uso de gas ozono para la preparación de las muestras resultó ser exitosa para todos los elementos estudiados y se trata de un procedimiento en acuerdo con los principios de la Química Verde. Esta investigación original fue difundida mediante una publicación internacional referada en una revista de buen impacto.

Los resultados obtenidos aportan evidencia sobre las propiedades nutracéuticas de la alcachofa, por lo que se espera continuar la difusión de los mismos en el área de horticultura para promover el uso del mencionado vegetal y fundamentalmente el uso de las hojas buscando darle un valor adicional a este producto de desecho en el cultivo convencional.

Respecto a la evaluación de residuos de pesticidas, en todos los casos las metodologías seleccionadas evaluadas cumplieron con los criterios establecidos por la guía DG-SANCO, respondiendo así a las exigencias de la Unión Europea para el análisis de residuos de pesticidas en frutas y hortalizas. Además, ninguno de los pesticidas investigados presentó niveles cuantificables en las muestras comerciales analizadas, hecho que aporta evidencia científica sobre la inocuidad alimentaria del vegetal y su adecuación al empleo del mismo en productos fitoterápicos e infusiones en el caso de las hojas y alimentos en el caso del fruto, promoviendo su incorporación en dietas saludables modernas. Esto pone en evidencia las buenas prácticas de agricultura de los productores de alcachofa locales.

Considerando que actualmente está bien establecido el papel del colesterol como uno de los principales factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares, desde el punto de vista fitoterapéutico, este problema podría ser tratado con plantas hipolipemiantes, como lo es la alcachofa, que actúan sobre el metabolismo del colesterol.

Desde hace ya varios años, se ha estudiado la acción fitoterapéutica de los extractos de hojas de alcachofa para reducir los niveles de colesterol en sangre por diversos mecanismos de acción. Se ha comprobado que esta actividad beneficiosa es debida a la presencia de compuestos fenólicos presentes en las hojas, que le dan este aporte favorable al tratamiento de la hipercolesterolemia. En este trabajo se pudo verificar el contenido de compuestos fenólicos de infusiones de hojas y frutos de alcachofa así como sus propiedades antioxidantes. Esta caracterización se realizó mediante técnicas novedosas y en colaboración con la Universidad de Porto y los resultados fueron difundidos mediante una publicación científica internacional arbitrada de impacto en el área de investigación en alimentos.

Mediante la investigación llevada adelante en esta tesis podría pensarse en la utilización de extractos de hojas de alcachofa como potenciales fitoterápicos luego de la realización de las pruebas farmacológicas necesarias que confirmen sus propiedades. Además, la inclusión del fruto en la dieta, sería un buen aporte para los requerimientos diarios de minerales esenciales como Cu, Fe, Ni y Zn.

Se podría afirmar que la inclusión de extractos de hojas de alcachofa, así como la ingesta de sus frutos, en conjunto con hábitos de alimentación y de vida saludable, fomentaría un estado óptimo de salud para lograr una mejor calidad de vida.

4.6 Perspectivas

Los tratamientos de muestra desarrollados a lo largo de este trabajo de tesis para la determinación de metales y semimetales, han sido también aplicados por nuestro grupo de investigación (GATPREM: Grupo de Análisis de Elementos Traza y Desarrollo de Estrategias Simples para Preparación de Muestras) a otras matrices de tipo vegetal como ser semillas de trigo y de soja, obteniéndose muy buenos resultados. Actualmente se están aplicando también dichas metodologías a la determinación de metales y semimetales en arroz. En particular, se obtuvieron muy buenos resultados en cuanto a la determinación de arsénico en esta matriz. Un trabajo que presenta los resultados de estas determinaciones fue recientemente aceptado para su presentación oral en el “6th International Congress on Arsenic in the Environment (As2016)” y será incluido el resumen expandido en el volumen correspondiente al evento “Arsenic Research and Global Sustainability” publicado por la CRC Press.

Por lo tanto, los tratamientos de muestra desarrollados no son solo rápidos, eficientes y amigables con el medio ambiente, sino que además poseen aplicación real. Se trata de

metodologías versátiles, factibles de ser aplicadas a una amplia gama de matrices vegetales y no vegetales. En el futuro, el grupo de trabajo emprenderá nuevos proyectos de investigación, donde se incluirán muestras de origen animal para ser sometidas a este tipo de tratamientos.

Respecto al estudio de propiedades antioxidantes, la experiencia adquirida en este trabajo permitirá, con la reciente llegada a Facultad de Química de un equipamiento, similar al empleado en las determinaciones realizadas en este trabajo, continuar con los estudios de la actividad secuestrante de diferentes tipos de extractos naturales frente a las especies ROS y RNS más relevantes a nivel fisiológico, en la búsqueda de compuestos bioactivos con valor nutracéutico.

En cuanto a la metodología desarrollada para la determinación de residuos de pesticidas, se trata de una metodología multiresiduo moderna y muy versátil, la cuál podría ser utilizada en el análisis de otras matrices vegetales similares, con fin de desarrollar una herramienta de monitoreo de este tipo de contaminantes. Con estos resultados es posible plantearse diversas continuaciones del trabajo en pesticidas, como ser el estudio de la transferencia de los contaminantes desde el material vegetal a la infusión o a los extractos alcohólicos para completar el estudio de inocuidad, o la determinación de las causas de las diferencias en el efecto matriz que se observaron en fruto y alcachofa.

En suma las metodologías evaluadas y validadas en esta tesis sirven de insumos para el aseguramiento de la inocuidad alimentaria de hojas y frutos de alcachofa, reafirman sus propiedades nutraceuticas y dan a los productores un valor agregado, en los que a las hojas respecta, que hasta el momento eran material de desecho, permitiendo una revalorización de un cultivo familiar.

CAPÍTULO 5

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES

5.1 Publicaciones y presentaciones en eventos

A continuación se presentan las publicaciones en revistas arbitradas internacionales y las presentaciones en congresos, simposios y encuentros a nivel nacional, regional e internacional, a que ha dado lugar hasta el momento esta Tesis.

5.1.1 Artículos publicados

- ✓ “Infusion, Decoction and Hydroalcoholic Extracts of Leaves from Artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*) are Effective Scavengers of Physiologically Relevant ROS and RNS”. M. Pistón, I. Machado, C. S. Branco, V. Cesio, H. Heinzen, D. Ribeiro, E. Fernandes, R. Campos Chisté, M. Freitas*. Food Research International 60 (2014) 150-156.
- ✓ “A rapid sample preparation method for the determination of cadmium and lead in spinach and artichoke leaves using ozone”. I. Machado, M. V. Cesio, I. Dol, M. Pistón*. American Journal of Food Science and Technology 3 (2015) 55-59. Science and Education Publishing.
- ✓ “Comparison of different sample treatments for the determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*)”. I. Machado, Esteban Rodríguez-Arce, Isabel Dol, M. Verónica Cesio, Mariela Pistón*. Microchemical Journal (2016).

5.1.2 Manuscritos en revisión

- ✓ “Determination of pesticide residues in globe artichoke leaves and fruits by GC-MS and LC-MS/MS using the same QuEChERS procedure”. I. Machado, N. Gerez, M. Pistón, H. Heinzen, V. Cesio*. Food Chemistry.

5.1.3 Trabajo presentados en eventos

- ✓ “Comparación de tres métodos multiresiduo para el análisis de pesticidas en hojas de alcachofa (*Cynara scolymus*)”. Presentación oral en el 7º Congreso Argentino de Química Analítica (Argentina, Octubre 2013). Expositor: I. Machado.
- ✓ “Estudio de inocuidad y seguridad alimentaria sobre extractos de hojas de alcachofa (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*)”. Trabajo presentado en modalidad póster en el 13º Congreso Nacional de Hortifruticultura de la Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura (SUHF) (Uruguay, Setiembre 2014). Expositor: I. Machado.
- ✓ “Propiedades nutracéuticas de extractos de hojas de alcachofa (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*)”. Trabajo presentado en modalidad póster en el 13º Congreso Nacional de Hortifruticultura de la Sociedad Uruguaya de Hortifruticultura (SUHF) (Uruguay, Setiembre 2014). Expositor: I. Machado.
- ✓ “Propiedades nutracéuticas de extractos de hojas y frutos de alcachofa (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*)”. Presentación oral en el 3º Congreso Uruguayo de Química Analítica (Uruguay, Octubre 2014). Expositor: I. Machado.
- ✓ “Evaluation of ozonation as sample treatment for the determination of cadmium and lead in spinach leaves”. Trabajo presentado en modalidad póster en el 13º Rio Symposium on Atomic Spectrometry (México, Octubre 2014). Expositor: I. Machado.
- ✓ “Determinación de cadmio en alimentos utilizando ozono como alternativa para la preparación de las muestras”. Trabajo presentado en modalidad póster en el XI Simposio Latinoamericano de Química Analítica Ambiental y Sanitaria (Ecuador, Abril 2015). Expositor: I. Dol.
- ✓ “Methods to accomplish with the new regulatory frameworks for pesticide residue analysis of herbs”. Presentación oral en el 5º Congreso Latinoamericano de Residuos de Plaguicidas (Chile, Mayo 2015). Expositor: H. Heinzen.

- ✓ “Comparación de diferentes tratamientos de muestra para la determinación de Cu, Cd, Ni, Pb y Zn en alcachofa (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*)”. Trabajo presentado en modalidad poster en el 8º Congreso Argentino de Química Analítica (Argentina, Noviembre 2015). Expositor: I. Machado.

- ✓ “Determinación de residuos de pesticidas en hojas de alcachofa (*Cynara Cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*) mediante GC-MS y LC-MS/MS”. Trabajo presentado en modalidad poster en el 4º Encuentro Nacional de Ciencias Químicas (Uruguay, Noviembre 2015). Expositor: N. Gerez.

- ✓ “Evaluation of ultrasound-assisted methods for sample preparation for the determination of total arsenic in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*)”. Trabajo presentado en modalidad poster y resumen extendido en el 6th International Congress on Arsenic in the Environment (As2016) (Suecia, Junio de 2016). Expositor: I. Machado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referencias bibliográficas

1. **Pretty, J.** *Agricultural Sustainability: Concepts, Principles and Evidence. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2008, 363, 447-465.
2. **López Pérez, M.A., Vicente Martínez, C., Fernández Castelao, A., Fuente Gómez, U.** *Agrosistemas*. <http://www.ucm.es/info/ecologia/Descriptiva/Agrosistem/Resumen/> (Enero 2016).
3. **Yang, Y., Zhang, F., Li, H., Jiang, R.** *Journal of Environmental Management*, 2009, 90, 1117-1122.
4. **Chen, L., Long, X., Zhang, Z., Zheng, X., Rengel, Z., Liu, Z.** *Pedosphere*, 2011, 21, 573-580.
5. **Brundschuh, A., Pérez Carrera, A., Litter, M.I.** *Iberoarsen. Distribución del arsénico en las regiones ibérica e iberoamericana. CYTED-Argentina*, 2008.
6. **Marques, V., Farah, A.** *Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. Food Chemistry*, 2009, 113, 1370-1376.
7. **Chisté, R. C., Mercadante, A. Z., Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., Bragagnolo, N.** *In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. Food Chemistry*, 2011, 127, 419-426.
8. **Bianco, V.V.** *Carciofo (Cynara scolymus L.)*. In: *Bianco V.V. and Pimpini F.(eds). Orticoltura. Patron Editore, Bologna*, 1990, pp. 209-251.
9. **Pignone, D., Sonnante, G.** *Origine ed evoluzione. AA.VV. Il cardofo e il cardo. Coordinamento scientifico N. Calabrese. Collana coltura & coltura. Ed. Script Bologna*, 2009, pp. 2-11.
10. **Bartual, R.** *IV cursos internacionales de horticultura en climas áridos. Ministerio de Agricultura y Ministerio de Asuntos Exteriores*, 1985, 5, 1-25.
11. **Pignone, D., Sonnante, G.** *Wild artichokes of south Italy: did the story begin here? Genetic Resources and Crop Evolution*, 2004, 51, 577-580.
12. **Maroto, J.V.** *Horticultura herbácea especial. 4ª edición. Ed. Mundi-Prensa, Madrid*, 1983.
13. **Lattanzio, V., Paul, A., Kroon, P.A., Linsalata, V., Cardinali, A.** *Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. Journal of functional foods*, 2009, 1, 131-143.
14. **Lattanzio, V., Cardinali, A., Di Venere, D., Linsalata, V., Palmieri, S.** *Browning phenomena in stored artichoke (Cynara scolymus L.) heads: enzymic or chemical reaction? Food Chemistry*, 1994, 50, 1-7.
15. **Tomás-Barberán, F.A., Espin, J.C.** *Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2001, 81, 853-876.

16. **Cho, A., Jeon, S., Kim, M., Yeo, J., Seo, K., Choi, M., Lee, M.** *Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. Food and Chemical Toxicology, 2010, 48, 937–943.*
17. **Bianco, V.V.** *Present situation and future potential of artichoke in the Mediterranean Basin. Acta Horticulturae, 2005, 681, 39-55.*
18. **Martínez Serna, J.A., Carbonell M.** *Estudio comparativo de cultivares de alcachofa de propagación sexual o vegetativa. XXXVII Seminario de Técnicos y Especialistas en Horticultura. Almería, 2007, pp. 153–162.*
19. **Martínez Serna, J.A.** *Estudio de precocidad y producción de cuatro variedades de alcachofa cultivadas por semilla y zueca en el primer año de cultivo. Revista de Horticultura, 1998, 197, 274-277.*
20. **Dellacecca, V., Magnifico, V., Marzi, V., Porceddu, E., Scarascia, G.T.** *Contributo alla conoscenza delle varietà di carciofo coltivate nel mondo. Atti II Congresso Internazionale Studi sul Carciofo, Bari. Ed. Minerva Medica, Torino, 1976, pp. 199-316.*
21. **Gil-Ortega, R.** *Selección y mejora de la alcachofa. 1ª Jornadas Técnicas de Alcachofa. Tudela, Navarra, 1996, pp. 99-107.*
22. **Iranzo, B.** *La alcachofa en “el proyecto de hortalizas”. Agrícola Vergel, 1995, 165, 487-489.*
23. **Maroto, J.V.** *Horticultura herbácea especial. 4ª edición. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 1995.*
24. **Rojas, C.** *Cultivo de alcachofa (Cynara cardunculus sub scolymus L.). Instituto de Investigaciones Agropecuarias, centro de investigación especializado en agricultura del desierto y altiplano (CIE), INIA URURI, Región de Arica y Parinacota. Ministerio de Agricultura. Informativo nº56, octubre 2011.*
25. **Cardenas, G.** *Alcachofa cualidades y producción. Ed. Ripalme, Lima, 2006, 7-113.*
26. **Serrano, Z.** *La Alcachofa. Ed. Junta de Andalucía, 2006, pp. 49-58.*
27. *Codex Alimentarius. <http://www.codexalimentarius.net/search/advancedsearch.do> (Febrero 2016).*
28. *FAO. 24ª Conferencia Regional de la FAO para Europa. <http://www.fao.org>.*
29. **Best, D.** *All natural and nutraceutical. Prepared Foods, 1997, 166, 32-38.*
30. **Kalra, E.K.** *Nutraceutical. Definition and Introduction. AAPS PharmaSci, 2003, 5(3). <http://www.pharmasci.org>.*
31. **Struik, P.C. y Kropff, M.J.K.** *An Agricultural Vision. In Pesticides: Problems, Improvements, Alternatives, F. den Hond, P. G., N. M. van Straalen, Eds. Blackwell Science Ltd.: Oxford, Reino Unido, 2003; pp. 15-25.*
32. **Charudattan, R., Wyss, G.S. y Chandramohan, S.** *Biological Control in Pesticides in Agriculture and the Environment, Wheeler, W.B., Ed. Gainesville, Florida, 2002; pp. 34.*

33. **Guest, R.T. y Shwartz, P.H.** *Pest Management Issues on Minor Crops. In Pesticides in Agriculture and the Environment, Wheeler, W.B., Ed. Gaineville, Florida, 2002; pp. 32.*
34. *Codex Alimentarius, Comisión del Codex Alimentarius: Manual de procedimiento. In Secretaría del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, FAO, Roma: Roma, 1997.*
35. *European Commission, Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market, Official Journal of the European Communities: 1991, pp. 290.*
36. **Tomlin, C.** *The Pesticide Manual. British Crop Protection Council Farnham, Reino Unido, 1996, pp. 32-57.*
37. **Cremllyn, R.J.** *Agrochemicals, Preparation and Mode of Action. 2nd ed.; John Wiley & sons, 1991, pp. 406.*
38. **Alder, L., Greulich, K., Kempe, G., Vieth, B.** *Residue Analysis of 500 High Priority Pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS? Mass Spectrometry Reviews 2006, 25, 838-865.*
39. *EU Reference Laboratories (EURLs) for Residues of Pesticides, <http://www.eurl-pesticides-datapool.eu/default.aspx?ziel=asp/en/stoff.aspx> (Febrero 2016).*
40. *World Health Organization, The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. In WHO: Geneva, 2009; pp. 54.*
41. **Boreen, A.L., Arnold, W.A. y McNeill, K.** *Triplet-Sensitized Photodegradation of Sulfa Drugs Containing Six-Membered Heterocyclic Groups: Identification of an SO₂ Extrusion Photoproduct. Environmental Science & Technology 2005, 39, 3630-3638.*
42. **Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J.C., Mejuto, L., García-Río, L.** *The Mobility and Degradation of Pesticides in Soils and the Pollution of Groundwater Resources. Agriculture, Ecosystems and Environment 2008, 123, 247-260.*
43. **Gavrilescu, M.** *Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. Engineering in Life Sciences 2005, 5, 497-526.*
44. **Zacharia, J.T.** *Ecological Effects of Pesticides. En Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits, Stoytcheva, M., Eds. In Tech: Nueva York, Estados Unidos, 2011, pp. 129-142.*
45. **Cortinas de Nava, C.** *Comunicación de Riesgos para el Manejo de Sustancias Peligrosas con Énfasis en Residuos Peligrosos. En Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México, 2000; pp. 60.*
46. *European Commission, The FOOTPRINT Pesticide Properties Database. [www. eu-footprint.org](http://www.eu-footprint.org) (Febrero 2016).*
47. **Kegley, S.E., Hill, B.R., Orme, S., Choi, A.H.** *PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America. <http://www.pesticideinfo.org> (Febrero 2016).*

48. **Wessel, J.R.** *Codex Committee on Pesticide Residues-A Plan for Improved Participation by Governments. Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1992, 116, 126- 149.
49. *FAO/WHO Food Standards Programme Joint, Codex Alimentarius Commission, Committee of the Codex Executive, Alimentarius Commission, Determination, Interpretation and Application of Residue Limits. Food Control* 1997, 8, 55-62.
50. *Presidencia de la República, Ministerio de Salud Pública, Decreto 285/009, Modificaciones al Reglamento Bromatológico Nacional. Diario Oficial: Montevideo*, 2009.
51. **Fernández-Alba, A.R. y García-Reyes, J.F.** *Large-Scale Multi-Residue Methods for Pesticides and Their Degradation Products in Food by Advanced LC-MS. Trends in Analytical Chemistry* 2008, 27, 973-990.
52. **Lambropoulou, D.A. y Albanis, T.A.** *Methods of Sample Preparation for Determination of Pesticide Residues in Food Matrices by Chromatography-Mass Spectrometry-Based Techniques: A review. Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, 389, 1663-1683.
53. **Pareja, L., Cesio, V., Heinzen, H., Fernández-Alba, A.R.** *Analytical Methods for Pesticide Residues in Rice. Trends in Analytical Chemistry* 2011, 30, 270-291.
54. **Pérez-Parada, A., Colazzo, M., Besil, N., Dellacassa, E., Cesio, V., Heinzen, H., Fernández-Alba, A.** *Pesticidas in the Modern World – Trends in Pesticides Analysis*, 2011, 14, 357-390.
55. **Anastassiades, M.** *QuEChERS, A Mini-Multiresidue Method for the Analysis of Pesticide Residues in Low-Fat Products. CVUA: Stuttgart, pp. 12, <http://quechers.cvua-stuttgart.de/pdf/reality.pdf> (Febrero 2016).*
56. **Payá, P., Anastassiades, M., Mack, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., Barba, A.** *Analysis of Pesticide Residues Using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) Pesticide Multiresidue Method in Combination with Gas and Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometric Detection. Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007, 389, 1697-1714.
57. **Mol, H.G.J., Plaza-Bolaños, P., Zomer, P., De Rijk, T.C., Stolker, A.A.M., Mulder, P.P.J.** *Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food Matrixes. Analytical Chemistry* 2008, 80, 9450-9459.
58. **Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Štajnbaher, D., Schenck, F.J.** *Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce. Journal of AOAC International* 2003, 86, 412-431.
59. **Anastassiades, M., Scherbaum, E., Taúdelen, B., Štajnbaher, D.** *Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis. In Pesticide Chemistry, H. Ohkawa, H.M., P.W. Lee, Eds. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2007; p 497.*

60. **Lehotay, S.J., Maštovská, K. y Lightfield, A.R.** *Use of Buffering and Other Means to Improve Results of Problematic Pesticides in a Fast and Easy Method for Residue Analysis of Fruits and Vegetables. Journal of AOAC International* 2005, 88, 615-629.
61. **Lehotay, S.J.** *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe Approach for Determining Pesticide Residues. In Pesticide Protocols, José L. Martínez Vidal, A.Garrido Frenich., Eds. Humana Press: Almeria, España, 2006; pp 239-260.*
62. **Mastovska, K., Lehotay, S.J.** Evaluation of common organic solvents for gas chromatographic analysis and stability of multiclass pesticide residues. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1040, 259.
63. **Barker, S.A.** *Matrix solid phase dispersion (MSPD). Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, 70 (2), 151-162.
64. **Thurman, E.M. Ferre, I. y Fernández-Alba, A.R.** *LC-MS. I: Basic Principles and Technical Aspects of LC-MS for Pesticide Analysis. In Chromatographic-Mass Spectrometric Food Analysis for Trace Determination of Pesticide Residues, Barceló, D., Ed. Wilson & Wilson's, Elsevier: Amsterdam, Paises Bajos. 2005; 43, pp. 368-400.*
65. **Barceló, D.** *Comprehensive Analytical Chemistry Elsevier: 2005; 43, pp. 269-401.*
66. **Gross, J.H.** *Gas Phase Ion Chemistry. In Mass Spectrometry, A Text Book, Springer, Ed. Heidelberg, Alemania, 2004; pp. 15-16.*
67. *Instrumentation. In Mass Spectrometry, A text Book, Springer-Verlag: Heidelberg, Alemania, 2004; pp. 113-119.*
68. **Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R.** *Principios de Análisis Instrumental, Sexta Edición, Cengage Learning Editores, México D.F., 2008.*
69. **Gan, J. y Bondarenko, S.** *Determination of Pesticides in Water. In Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples, Tadeo, J.L., Ed. CRC Press, Taylor & Francis Group: Boca Raton, 2008.*
70. **Soler, C. y Picó, Y.** *Recent Trends in Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry to Determine Pesticides and Their Metabolites in Food. Trends in Analytical Chemistry* 2007, 26, 103-115.
71. **Jeannot, R., Sabik, H., Sauvard, E., Genin, E.** *Application of Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Combined with Photodiode Array Detection and Tandem Mass Spectrometry for Monitoring Pesticides in Surface Waters. Journal of Chromatography A* 2000, 879, 51-71.
72. **Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E.R., Herrero-Hernández, E., Hernández-Méndez, J.** *Simultaneous Determination of Phenyl- and Sulfonylurea Herbicides in Water by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with UV Diode Array or Mass Spectrometric Detection. Analytica Chimica Acta* 2004, 517, 71-79.

73. **Picó, Y., Font, G., Moltó, J.C., Mañes, J.** *Pesticide Residue Determination in Fruit and Vegetables by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Journal of Chromatography A* 2000, 882, 153-173.
74. *Absciex Hardware Guide, 4000 QTRAP System, How the system works, <http://www.absciex.com/documents/downloads/literature/4000-Qtrap-hardware-guide.pdf> (Febrero 2016).*
75. *Notijenck, Amplificando la certeza de la confirmación en monitoreo y cuantificación de pesticidas presentes en muestras de frutas y vegetales utilizando sistemas LC/MS-MS QTRAP, <http://notijenck.com.ar/?p=3038> (Marzo de 2016).*
76. **Aleixo, P., Santos, D., Tomazelli, A., Rufini, I., Berndt, H., Krug, F.** *Cadmium and lead determination in foods by beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry after ultrasound-assisted sample preparation. Analytica Chimica Acta, 2004, 512, 329–337.*
77. **Gil, S., Lavilla, I., Bendicho, B.** *Mercury removal from contaminated water by ultrasound-promoted reduction/vaporization in a microscale reactor. Ultrasonics Sonochemistry, 2008, 15, 212–216.*
78. **Collings, A.F., Gwan, P.B., Sosa-Pintos, A.P.** *Large scale environmental applications of high power ultrasound. Ultrasonics Sonochemistry, 2010, 17, 1049–1053.*
79. **Mason, T.J., Collings, A., Sumel, A.** *Sonic and ultrasonic removal of chemical contaminants from soil. Ultrasonics Sonochemistry, 2004, 11, 205–210.*
80. **Krug, F.J. Ed.** *Métodos de preparo de amostras. fundamentos sobre preparo de amostras orgánicas e inorgánicas para análise elemental. 1ª Edición, Piracicaba, 2008.*
81. **Mason, T.J., Lorimer, J.P.** *Applied Sonochemistry: uses of power ultrasound in chemistry and processing. Weinheim: Wiley-VCH, 2002, 314p.*
82. **Suslick, K.S.** *The chemical effects of ultrasound. Scientific American, Nueva York, 1989, 260, 80-86.*
83. **Suslick, K.S., Didenko, Y., Fang, M.M., Hyeon, T., Kolbeck, K.J., McNamara, W.B., Mdleleni, M.M., Wong, M.** *Acoustic cavitation and its chemical consequences. Philosophical Transactions of The Royal Society of London. Series A - Mathematical Physical and Engineering Sciences, Londres, 1999, 357, 335-353.*
84. **Capelo, J.L., Maduro, C., Vilhena, C.** *Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid-liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. Ultrasonics Sonochemistry, Londres, 2005, 12, 225-232.*
85. **Capelo, J.L., Maduro, C., Mota, A.M.** *Advanced oxidation process for degradation of organomercurials: determination of inorganic and total mercury in urine by FI-CV-AAS. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2003, 19, 414-416.*
86. **Capelo, J.L., Pedro, H.A., Mota, A.M.** *Ozone treatment for mercury determination in white wines, Talanta, 2003, 61, 485-491. .*

87. **Kim, M.J., Nriagu, J.** *Oxidation of arsenite in groundwater using ozone and oxygen*, *Science of the Total Environment*, 2000, 247, 71-79. .
88. **Khuntia, S., Majumder, S.K., Ghosh, P.** *Oxidation of As (III) to As (V) using ozone microbubbles*, *Chemosphere*, 2014, 97, 120-124.
89. **Matusiewicz, H., Mroczkowska, M.** *Hydride generation from slurry samples after ultrasonication and ozonation for direct determination of trace amounts of As(III) and total inorganic arsenic by their in situ trapping followed by graphite furnace atomic absorption spectrometry.*, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2003, 18, 751-761.
90. **Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K., Seydima, A.C.** *Use of ozone in the food industry*. *Lebensm.-Wiss. u.-Technology*, 2004, 37, 453-460.
91. **Howard, A.G.** *Hydride techniques in trace elements speciation*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1997, 12, 267-272.
92. **Litter, M.I., Armienta, M.A., Fariás, S.S. Ed.** *Iberoarsen. Metodologías Analíticas para la Determinación y Especiación de Arsénico en Aguas y Suelos*. CYTED, Argentina, 2009.
93. **Dedina, J., Tsalev, D.L.** *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. John Wiley & Sons, England, 1995.
94. **Taverniers, I., De Loose, M. y Van Bockstaele, E.** *Trends in Quality in the Analytical Laboratory. II. Analytical Method Validation and Quality Assurance. Trends in Analytical Chemistry 2004*, 23, 535-552.
95. *European Commission, DG-SANCO, Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed. In Document No. SANCO/12571/2013*, 2014, 1-40.
96. **Vial, J. y Jardy, A.** *Experimental Comparison of the Different Approaches to Estimate LOD and LOQ of an HPLC Method*. *Analytical Chemistry* 1999, 71, 2672-2677.
97. **Haslová, J. y J., Zrostliková.** *Matrix Effects in (Ultra)Trace Analysis of Pesticide Residues in Food and Biotic Matrices*. *Journal of Chromatography A* 2003, 1000, 181-197.
98. **Kruve, A., Künnapas, A., Herodes, K., Leito, I.** *Matrix Effects in Pesticide Multi-residue Analysis by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. *Journal of Chromatography A* 2008, 1187, 58-66.
99. **Niessen, W.M.A., Manini, P. y Andreoli, R.** *Matrix Effects in Quantitative Pesticide Analysis Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. *Mass Spectrometry Reviews* 2006, 25, 881-899.
100. **Ferrer, C., Lozano, A., Agüera, A., Jiménez Girón, A., Fernández-Alba, A.R.** *Overcoming Matrix Effects Using the Dilution Approach in Multiresidue Methods for Fruits and Vegetables*. *Journal of Chromatography A* 2011, 1218, 7634-7639.

101. **Stepán, R., Tichá, J., Hajslová, J., Kovalczuk, T., Kocourek, V.** *Baby food production chain: pesticide residues in fresh apples and products. Food Additives and Contaminants, 2005, 22, 1231-1242.*
102. **European Commision, 2005.** *Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. Off. J. Eur. Union, 1-16.*
103. **Viana, E., Moltó, J.C., Font, G.** *Optimization of a solid-phase dispersion method for the analysis of pesticide residues in vegetables. Journal of Chromatography A, 1996, 754, 437-444. .*
104. *Reglamento técnico MERCOSUR (DEROGACIÓN DE LAS RES GMC N° 102/94 y N° 35/96) MERCOSUR/GMC/RES. N° 12/11. http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_12-11.pdf (Abril 2016).*
105. **López, P.G, Ferrado, E.G., Brousassalis, A.M.** *Determinación del contenido de derivados cafeilquínicos en especies sudamericanas del género Achyrocline. Acta Farmaceutica Bonaerense, 2006, 25, 571-573.*
106. **Pérez-García, F., Adzet, T., Cañigüeral, S.** *Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes. Free Radical Research, 2000, 33, 661-665.*
107. **Wang, M., Simon, J. E., Aviles, I. F., He, K., Zheng, Q. Y., Tadmor, Y.** *Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (Cynara scolymus L.). Journal Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51, 601- 608.*
108. **Zhu, X., Zhang, H., Lo, R.** *Phenolic Compounds from the leaf extract of artichoke (Cynara scolymus L.) and their antimicrobial activities. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52, 7272-7278.*
109. **Grancai, D., Nagy, M., Suchy, V., Novomesky, P.** *Cynarin from the fresh flower buds of Cynara cardunculus. Fitoterapia, 1994, 65, 282.*
110. **Gouveia, S. C., Castilho, P. C.** *Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. Food Research International, 2012, 48, 712-724.*
111. **Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Bastos, M. L.** *Antioxidative properties of cardoon (Cynara cardunculus L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 2002, 50, 4989-4993.*
112. **Intawongse, M., Dean, J.R.** *In-vitro testing for assessing oral bioaccessibility of trace metals in soil and food samples. Trends in Analytical Chemistry, 2005, 25 (9), 876-886.*
113. **Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A., Romarís-Hortas, V., Moscoso-Pérez, C., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Bermejo-Barrera, P., Prada-Rodríguez, D.** *In-vivo and in-vitro testing to assess the bioaccessibility and the bioavailability of arsenic,*

selenium and mercury species in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 2011, 30 (2), 324-345.

114. **Rajski, L., Lozano, A., Belmonte-Valles, N., Uclés, A., Uclés, S., Mezcua, M., Fernandez-Alba, A.R.** Comparison of three multiresidue methods to analyse pesticides in green tea with liquid and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Analyst*, 2013, 138 (3): 921-931.

115. **García-Rodríguez, D., Cela-Torrijos, R., Lorenzo-Ferreira, R.A., Carro-Díaz, A.M.** Analysis of pesticide residues in seaweeds using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry detection. *Food Chemistry*, 2012, 135: 259-267.

116. APHA; AWWA; WPCF. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Washington: American Public Health Association, 2005.

117. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 17th ed., Association of Analytical Communities, Gaithersburg, MD, USA, 2000.

118. **Almela, C., Clemente, M.J., Vélez, D., Montoro, R.** Total arsenic, inorganic arsenic, lead and cadmium contents in edible seaweed sold in Spain. *Food and Chemical Toxicology*, 2006, 44, 1901-1908.

119. **Cañigüeral, S., Wichtl, M., Vila, R.** *Plantas Medicinales y Drogas Vegetales para infusión y tisana*. Milán: OEMF International, 1998, ISBN: 88-7076-216-5.

120. **Arpadjan, S., Celik, G., Taskesen, S., Gücer, S.** Arsenic, cadmium and lead in medicinal herbs and their fractionation. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, 2871-2875.

121. **Giacomelli, M.B.O., Carminati Lima, M., Stupp, V., de Carvalho Júnior, R.M., Borba da Silva, J.B., Bermejo Barrera, P.** Determination of As, Cd, Pb and Se in DORM-1 dogfish muscle reference material using alkaline solubilization and electrothermal atomic absorption spectrometry with Ir+Rh as permanent modifiers or Pd-Mg in solution, *Spectrochim. Acta Part B*. 2002, 57, 2151-2157.

122. *AOCS Official Method Ca 18b-91. Determination of Cu, Fe and Ni by Direct Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrophotometry.*

123. **Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J.** *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Data Handling in Science and Technology Volume 20A*, Elsevier Science, Amsterdam, 1997.

124. **Magnusson, B., Örnemark, U. (eds).** *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, second ed., 2014. ISBN 978-91-87461-59-0 www.eurachem.org.

125. **Chisté, R. C., Mercadante, A. Z.** Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60, 5884-5892.

126. **Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G.** *Chemical and Morphological Characteristics of New Clones and Commercial Varieties of Globe Artichoke (Cynara cardunculus var. scolymus)*, *Plant Foods Hum. Nutr.*, 2011, 66, 291–297.
127. **Freitas, M. Costa, V. M., Ribeiro, D., Couto, D., Porto, G., Carvalho, F., Fernandes, E.** *Acetaminophen prevents oxidative burst and delays apoptosis in human neutrophils*. *Toxicology Letters*, 2013, 219, 170-177.
128. **Costa, D., Fernandes, E., Santos, J. L. M., Pinto, D. C. G. A., Silva, A. M. S., Lima, J. L. F. C.** *New noncellular fluorescence microplate screening assay for scavenging activity against singlet oxygen*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387, 2071-2081.
129. **Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R. L.** *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49, 4619-4626.
130. **Rodrigues, E., Mariutti, R. B. L., Chisté, R. C., Mercadante, A. Z.** *Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxy radical scavenger capacity: application to carotenoids and structure–activity relationship*. *Food Chemistry*, 2012, 135, 2103-2111.
131. **Whiteman, M., Ketsawatsakul, U., Halliwell, B.** *A reassessment of the peroxynitrite scavenging activity of uric acid*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, 962, 242-259.
132. **Labronici Bertin, R., França Maltez, H., Santos de Gois, J., Borges, D.L.G., Da Silva Campelo Borges, G., Valdemiro Gonzaga, L., Fett, R.** *Mineral composition and bioaccessibility in Sarcocornia ambigua using ICP-MS*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2016, 47, 45–51.
133. **Pang, G.F., Fan, C.L., Zhang, F., Li, Y., Chang, Q.Y., Cao, Y.Z., Liu, Y.M., Li, Z.Y., Wang, Q.J., Hu, X.Y., Liang, P.** *High-throughput GC/MS and HPLC/MS/MS techniques for the multiclass, multiresidue determination of 653 pesticides and chemical pollutants in tea*. *Journal AOAC International*, 2011, 94, 1253-1296.
134. **Poole, C.F.** *Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography*. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1158: 241-250.
135. **Lozano, A., Rajski, Ł., Belmonte-Valles, N., Uclés, A., Uclés, S., Mezcua, M., Fernández-Alba, A.R.** *Pesticide analysis in teas and chamomile by liquid chromatography and gas chromatography tandem mass spectrometry using a modified QuEChERS method: Validation and pilot survey in real samples*. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1268:109-122.
136. **Kittlaus, S., Schimanke, J., Kempe, G., Speer, K.** *Assessment of sample cleanup and matrix effects in the pesticide residue analysis of foods using postcolumn infusion in liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218: 8399-8410.
137. **Wang, C.J., Liu, Z.Q.** *Foliar uptake of pesticides—Present status and future challenge*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2007, 87, 1–8.

138. **Dos Santos Costa, B.E., Melo Coelho, N.M., Melo Coelho, L.** *Determination of arsenic species in rice samples using CPE and ETAAS. Food Chemistry, 2015, 178, 89-95.*
139. **Miller, J.N., Miller, J.C.** *Estadística para Química Analítica, second ed., Addison-Wesley Iberoamerican S.A., Wilmington, Del, EUA, 1993.*
140. **Capelo, J.L., Maduro, C., Mota, A.M.** *Evaluation of focused ultrasound and ozonolysis as sample treatment for direct determination of mercury by FI-CV-AAS. Optimization of parameters by full factorial design, Ultrason. Sonochem. 2006, 13, 98-106.*
141. *WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues, World Health Organization, Ginebra, 2007.*
142. **Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O.** *Cadmium: From Toxicity to Essentiality. Metal Ions in Life Sciences 11, 2013.*
143. **Singh, S., Sinha, S., Saxena, R., Pandey, K., Bhatt, K.** *Translocation of metals and its effects in the tomato plants grown on various amendments of tannery waste: evidence for involvement of antioxidants. Chemosphere, 2004, 57, 91-99.*
144. **MacFarlane, G.R., Burchett, M.D.** *Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove Avicennia marina (Forsk.) Vierh. Aquatic Botany, 2000 68, 45-59.*
145. **Kroukamp, E.M., Wondimu, T., Forbes, P.B.C.** *Metal and metalloid speciation in plants: Overview, instrumentation, approaches and commonly assessed elements, Trends Anal. Chem. 2016, 77, 87-99.*
146. **Colangelo, E.P., Guerinot, M.L.** *Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants, Curr. Opin. Plant Biol. 2006, 9, 322-330.*
147. **Ferré-Huguet, N., Martí-Cid, R., Schuhmacher, M., Domingo, J.L.** *Risk Assessment of Metals from Consuming Vegetables, Fruits and Rice Grown on Soils Irrigated with Waters of the Ebro River in Catalonia, Spain, Biol. Trace. Elem. Res. 2008, 123, 66-79.*
148. *US Department of Health & Human Services. National Institute of Health. http://ods.od.nih.gov/Health_Information/Dietary_Reference_Intakes.aspx.*
149. **Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G.** *Globe artichoke leaves and floral stems as a source of bioactive compounds. Industrial Crops and Products, 2013, 44, 44-49.*
150. **Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., Williamson, G.** *Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild Cynara cardunculus L. genotypes. Food Chemistry, 2011, 126, 417-422.*
151. **Wagner, H., Bladt, S.** *Plant drug analysis. A thin layer chromatographic Atlas. Springer Verlag, Berlin, 1996.*
152. **Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., Telser, J.** *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2007, 39, 44-84.*

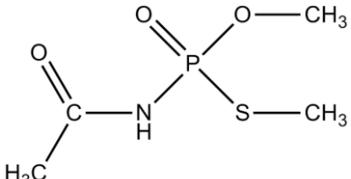
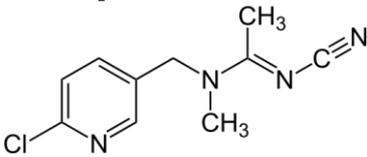
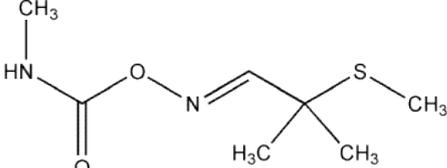
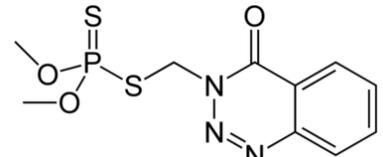
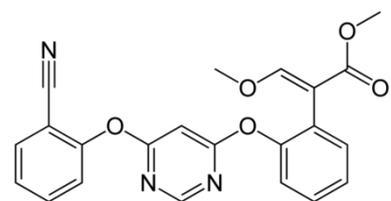
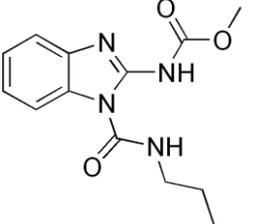
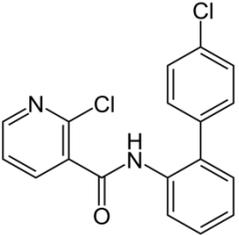
153. **Dikalov, S., Griendling, K. K., Harrison, D. G.** *Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. Hypertension, 2007, 49, 717-727.*
154. **Freitas, M., Lima, J. L., Fernandes, E.** *Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. Analytica Chimica Acta, 2009, 649, 8-23.*
155. **Nakatani, N., Kayano, S., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K., Mitani, T.** *Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (Prunus domestica L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000, 48, 5512-5516.*
156. **Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., Sugawara, M., Iseki, K.** *In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. International Journal of Pharmaceutics, 2011, 403, 136-138.*
157. **Conner, E. M., Grisham, M. B.** *Inflammation, free radicals, and antioxidants. Nutrition, 1996, 12, 274-277.*
158. **Spickett, C. M., Jerlich, A., Panasenko, O. M., Arnhold, J., Pitt, A. R., Stelmaszyńska, T., Schaur, R. J.** *The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. Acta Biochimica Polonica, 2000, 47, 889-899.*
159. **Malle, E., Marsche, G., Arnhold, J., Davies, M. J.** *Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, 1761, 392-415.*
160. **Ho, E., Karimi Galoughi, K., Liu, C. C., Bhindi, R., Figtree, G. A.** *Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. Redox biology, 2013, 1, 483-491.*
161. **Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L., Mira, L., Corvo, M. L.** *Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. Current Medicinal Chemistry, 2008, 15, 1586-1605.*
162. **Brown, J. E., Rice-Evans, C. A.** *Brown, Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation in vitro. Free Radical Research, 1998, 29, 247-255.*
163. **Pacher, P., Beckman, J. S., Liaudet, L.** *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. Physiological Reviews, 2007, 87, 315-424.*
164. **Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y., Shibata, H.** *Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. Biochimica et Biophysica Acta, 1997, 1335, 335-342.*
165. **Sandberg, A.S.** *Bioavailability of minerals in legumes. British Journal of Nutrition, 2002, 88 (3), S281-S285.*

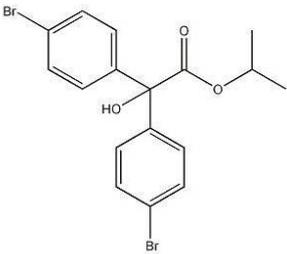
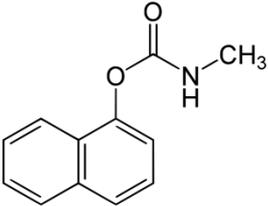
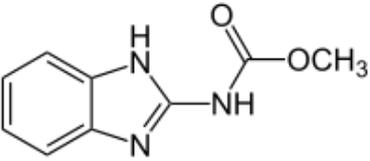
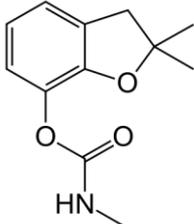
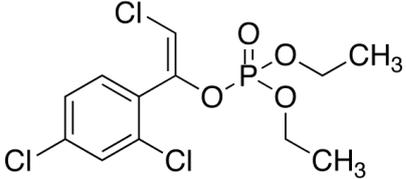
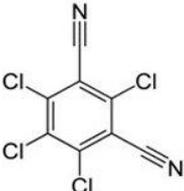
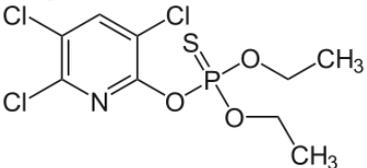
166. **Rusyniak, D.E., Arroyo, A., Acciani, J., Froberg, B., Kao, L., Furbee, B.** *Heavy metal poisoning: management of intoxication and antidotes. Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, 2010, 100, 365-396.*

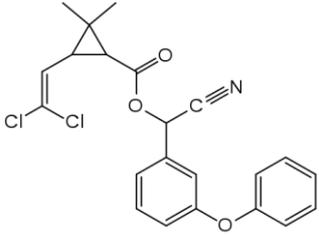
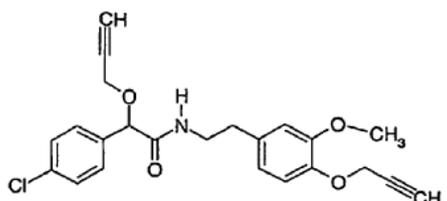
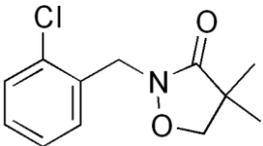
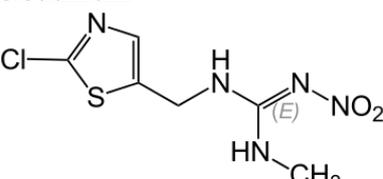
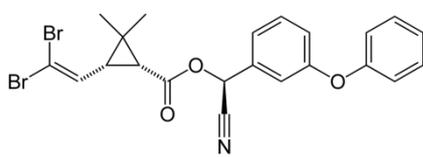
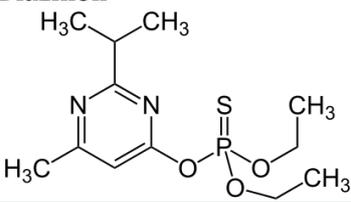
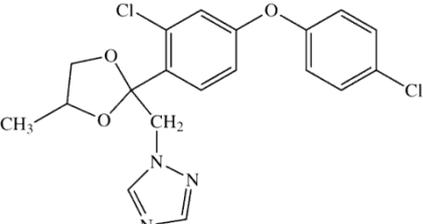
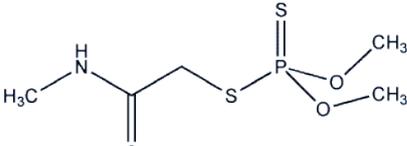
167. **Commission, European.** *Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.*

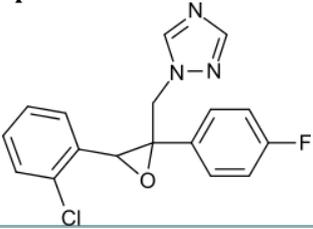
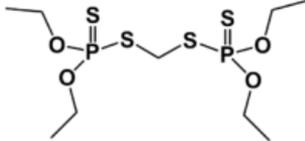
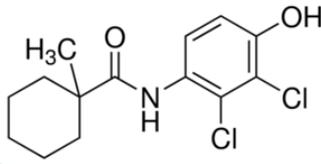
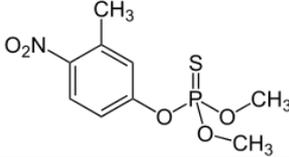
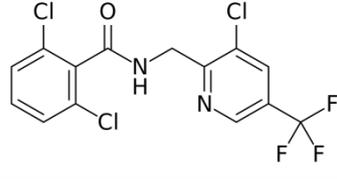
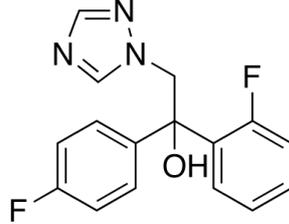
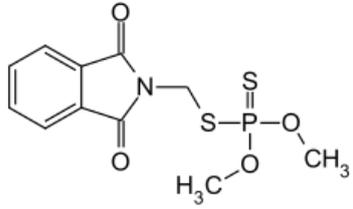
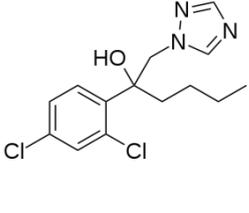
ANEXO I

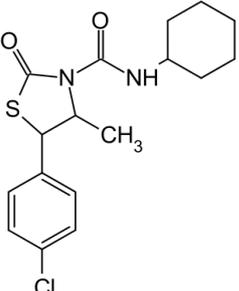
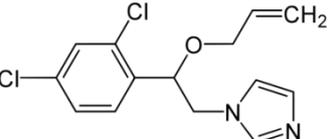
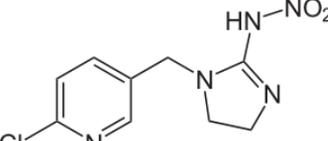
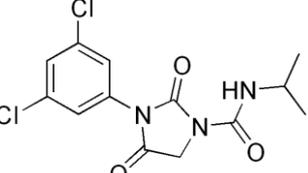
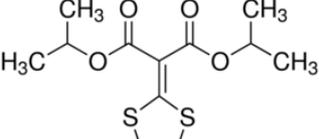
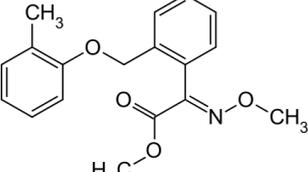
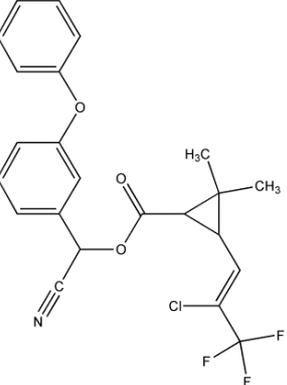
CLASIFICACIÓN DE LOS PESTICIDAS EN ESTUDIO

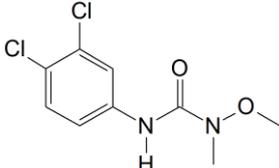
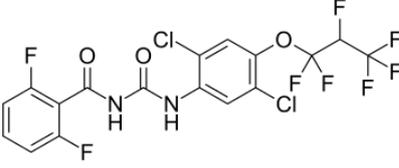
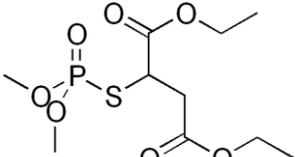
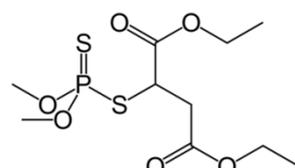
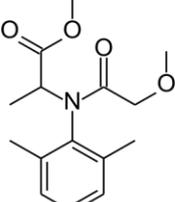
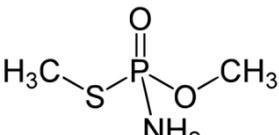
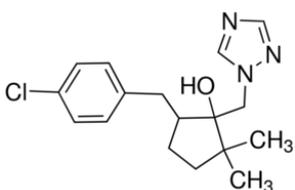
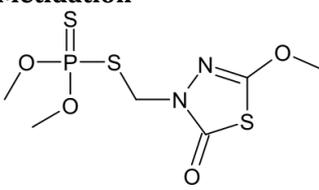
Pesticida	Características (DL ₅₀ en ratas)
<p>Acefato</p> 	<p>Familia: Organofosforados Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) >1.300 (Oral)</p>
<p>Acetamiprid</p> 	<p>Familia: Neonicotinoides Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) >1.000 (Oral)</p>
<p>Aldicarb</p> 	<p>Familia: Carbamatos Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >200 (Dérmico) >0,5 (Oral)</p>
<p>Azinfos metil</p> 	<p>Familia: Organofosforados Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >150 (Dérmico) > 9 (Oral)</p>
<p>Azoxystrobin</p> 	<p>Familia: Estrobilurinas Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >5.000 (Dérmico) >2.000 (Oral)</p>
<p>Benomilo</p> 	<p>Familia: Carbamatos Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >10.000 (Dérmico) >10.000 (Oral)</p>
<p>Boscalid</p> 	<p>Familia: Anilidas Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) >2.000 (Oral)</p>

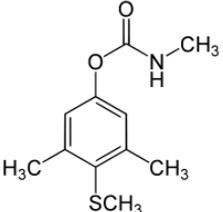
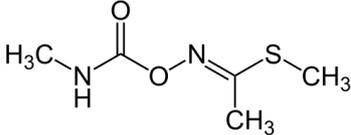
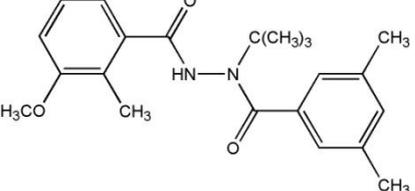
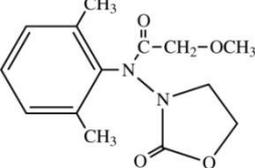
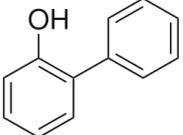
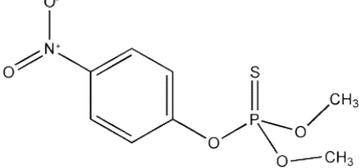
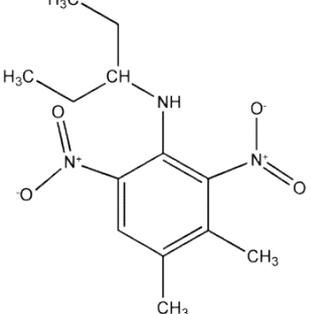
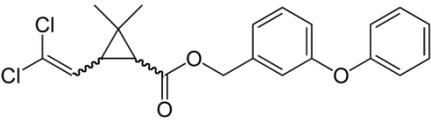
<p>Bromopropilato</p> 	<p>Familia: Difenilos bromados Acción: Acaricida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >5.000 (Dérmico) >4.000 (Oral)</p>
<p>Carbaril</p> 	<p>Familia: Carbamatos Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >4.000 (Dérmico) >250 (Oral)</p>
<p>Carbendazim</p> 	<p>Familia: Carbamatos Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 5.000 (Dérmico) > 2.000 (Oral)</p>
<p>Carbofurano</p> 	<p>Familia: Carbamatos Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 2.000 (Dérmico) > 8 (Oral)</p>
<p>Clorfenvinfos</p> 	<p>Familia: Organofosforados Acción: Insecticida, Acaricida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 400 (Dérmico) >15 (Oral)</p>
<p>Clorotalonil</p> 	<p>Familia: Ftalimidas Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 400 (Dérmico) >15 (Oral)</p>
<p>Clorpirifos</p> 	<p>Familia: Organofosforados Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 2.000 (Dérmico) > 30 (Oral)</p>

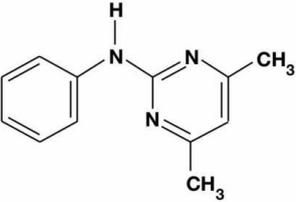
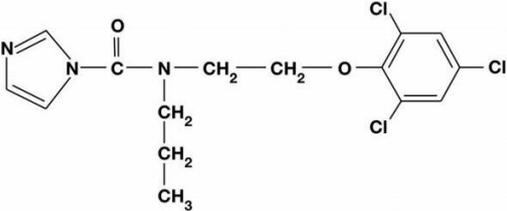
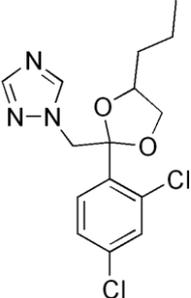
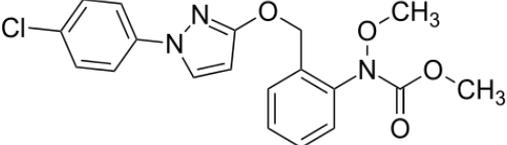
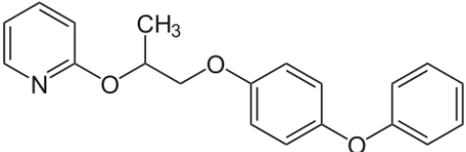
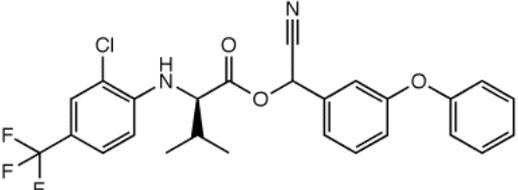
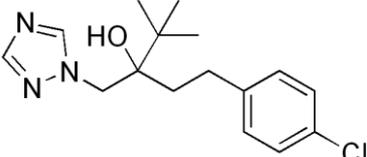
<p>Cipermetrina</p> 	<p>Familia: Piretroides Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): 2.000 (Dérmico) 250 (Oral)</p>
<p>Ciproconazol</p> 	<p>Familia: Triazoles Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): 2.000 (Dérmico) < 350 (Oral)</p>
<p>Clomazone</p> 	<p>Familia: Isoxazolidinonas Acción: Herbicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): 2.000 (Dérmico) < 1300 (Oral)</p>
<p>Clotianidin</p> 	<p>Familia: Neonicotinoides Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >5.000 (Dérmico) > 2.000 (Oral)</p>
<p>Deltametrina</p> 	<p>Familia: Piretroides Acción: Insecticida, Acaricida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) 430 (Oral)</p>
<p>Diazinon</p> 	<p>Familia: Organofosforados Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.100 (Dérmico) 1.250 (Oral)</p>
<p>Difenoconazol</p> 	<p>Familia: Triazoles Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): 2.010 (Dérmico) 1.453 (Oral)</p>
<p>Dimetoato</p> 	<p>Familia: Organofosforados Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) >540 (Oral)</p>

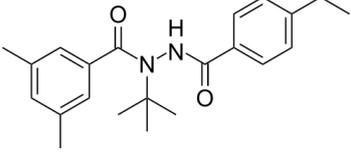
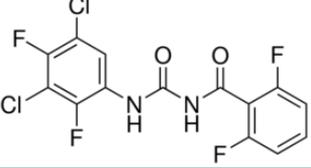
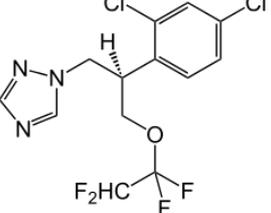
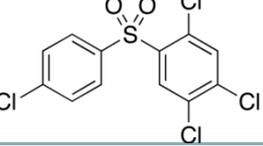
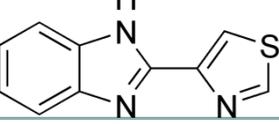
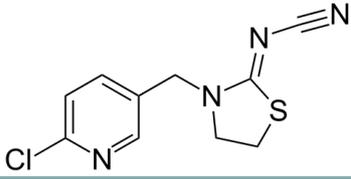
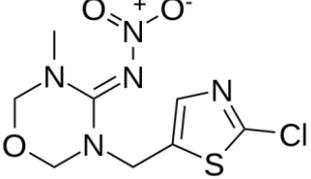
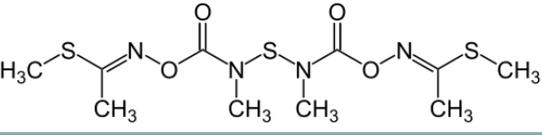
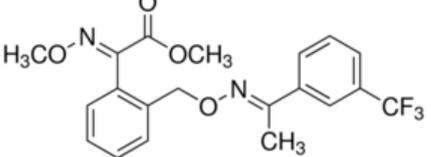
<p>Epoxiconazol</p> 	<p>Familia: Azoles Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >3.000 (Dérmico) >2.000 (Oral)</p>
<p>Etion</p> 	<p>Familia: Organofosforados Acción: Insecticida, Acaricida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >1.000 (Dérmico) >200 (Oral)</p>
<p>Fenhexamida</p> 	<p>Familia: Hidroxianilidas Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >4.000 (Dérmico) >2.500 (Oral)</p>
<p>Fenitrotion</p> 	<p>Familia: Organofosforados Acción: Insecticida, Acaricida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >900 (Dérmico) >250 (Oral)</p>
<p>Fluopicolide</p> 	<p>Familia: Acylpicolidas Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >5.000 (Dérmico) >5.000 (Oral)</p>
<p>Flutriafol</p> 	<p>Familia: Triazoles Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >1.000 (Dérmico) >1.000 (Oral)</p>
<p>Fosmet</p> 	<p>Familia: Organofosforados Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >1.000 (Dérmico) >100 (Oral)</p>
<p>Hexaconazol</p> 	<p>Familia: Triazoles Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) >2.000 (Oral)</p>

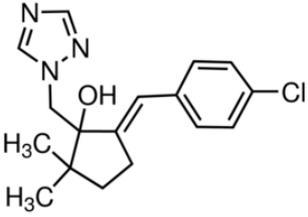
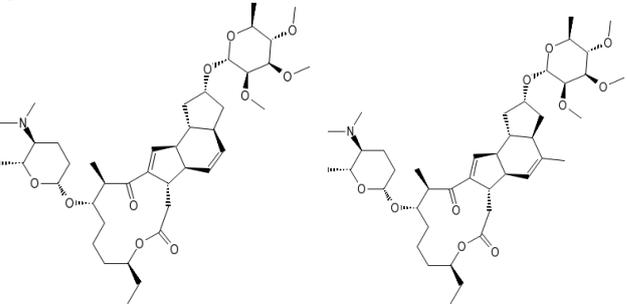
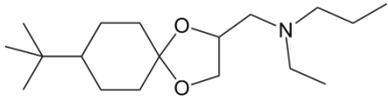
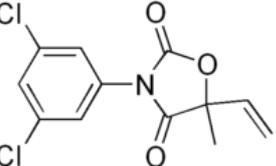
<p>Hexitiazox</p> 	<p>Familia: Tiazolidinas Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >5.000 (Dérmico) >2.000 (Oral)</p>
<p>Imazalil</p> 	<p>Familia: Imidazoles Acción: Fungicidas DL₅₀ (mg kg⁻¹): >4.000 (Dérmico) >200 (Oral)</p>
<p>Imidacloprid</p> 	<p>Familia: Neonicotinoides Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >5.000 (Dérmico) 450 (Oral)</p>
<p>Iprodiona</p> 	<p>Familia: Hidantoínas Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) >4.400 (Oral)</p>
<p>Isoprotiolane</p> 	<p>Familia: Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >10.000 (Dérmico) >1.000 (Oral)</p>
<p>Kresoxim metil</p> 	<p>Familia: Estrobilurinas Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >5.000 (Dérmico) >2.000 (Oral)</p>
<p>Lambda-Cialotrina</p> 	<p>Familia: Piretroides Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): 632 (Dérmico) 79 (Oral)</p>

<p>Linuron</p> 	<p>Familia: Ureas Acción: Herbicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): 632 (Dérmico) 79 (Oral)</p>
<p>Lufenuron</p> 	<p>Familia: Benzoilureas Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): 4.000 (Dérmico) 2.000 (Oral)</p>
<p>Malaoxon</p> 	<p>Familia: Organofosforado Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >100 (Dérmico) >100 (Oral)</p>
<p>Malation</p> 	<p>Familia: Organofosforado Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >4.000 (Dérmico) >1.000 (Oral)</p>
<p>Metalaxil</p> 	<p>Familia: Acilalaninas Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >3.000 (Dérmico) >600 (Oral)</p>
<p>Metamidofos</p> 	<p>Familia: Organofosforado Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >50 (Dérmico) >20 (Oral)</p>
<p>Metconazol</p> 	<p>Familia: Triazoles Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) >500 (Oral)</p>
<p>Metidation</p> 	<p>Familia: Organofosforado Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >80 (Dérmico) >25 (Oral)</p>

<p>Metiocarb</p> 	<p>Familia: Carbamatos Acción: Insecticida, Acaricida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >400 (Dérmico) >100 (Oral)</p>
<p>Metomilo</p> 	<p>Familia: Carbamatos Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) >30 (Oral)</p>
<p>Metoxifenozide</p> 	<p>Familia: Diacilhidrazinas Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >5.000 (Dérmico) >2.000 (Oral)</p>
<p>Oxadixil</p> 	<p>Familia: Anilidas Acción: Fungicidas DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) >1.000 (Oral)</p>
<p>OPP</p> 	<p>Familia: O-fenilfenatos Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 2.700 (Dérmico) > 2.000 (Oral)</p>
<p>Paratión metil</p> 	<p>Familia: Organofosforado Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 60 (Dérmico) > 6 (Oral)</p>
<p>Pendimetalina</p> 	<p>Familia: Dinitroanilinas Acción: Herbicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >5.000 (Dérmico) >2.000 (Oral)</p>
<p>Permetrina</p> 	<p>Familia: Piretroides Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 4.000 (Dérmico) > 400 (Oral)</p>

<p>Pirimetanil</p> 	<p>Familia: Anilino pirimidinas Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >5.000 (Dérmico) >4.000 (Oral)</p>
<p>Procloraz</p> 	<p>Familia: Imidazoles Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) >2.000 (Oral)</p>
<p>Propiconazol</p> 	<p>Familia: Triazoles Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >4.000 (Dérmico) 1517 (Oral)</p>
<p>Pyraclostrobin</p> 	<p>Familia: Estrobilurinas Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >4.000 (Dérmico) >500 (Oral)</p>
<p>Pyriproxifen</p> 	<p>Familia: Piridinas Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) >5.000 (Oral)</p>
<p>Tau-Fluvalinato</p> 	<p>Familia: Piretroide Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) >2.00 (Oral)</p>
<p>Tebuconazol</p> 	<p>Familia: Triazoles Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): 5.000 (Dérmico) 4.000 (Oral)</p>
<p>Tebufenozide</p>	<p>Familia: Diacilhidrazinas Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 5.000 (Dérmico) > 5.000 (Oral)</p>

	
<p>Teflubenzuron</p> 	<p>Familia: Benzoilureas Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 2.000 (Dérmico) > 5.000 (Oral)</p>
<p>Tetraconazol</p> 	<p>Familia: Triazoles Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 2.000 (Dérmico) > 1.000 (Oral)</p>
<p>Tetradifon</p> 	<p>Familia: Bifenilos Clorados Acción: Acaricida DL₅₀ (mg kg⁻¹): 10.000 (Dérmico) 10.000 (Oral)</p>
<p>Tiabendazol</p> 	<p>Familia: Benzimidazoles Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): 10.000 (Dérmico) 10.000 (Oral)</p>
<p>Tiacloprid</p> 	<p>Familia: Neonicotinoides Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 2.000 (Dérmico) > 400 (Oral)</p>
<p>Tiametoxam</p> 	<p>Familia: Neonicotinoides Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 2.000 (Dérmico) > 1.500 (Oral)</p>
<p>Tiodicarb</p> 	<p>Familia: Carbamatos Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 2.000 (Dérmico) > 300 (Oral)</p>
<p>Trifloxystrobin</p> 	<p>Familia: Estrobilurinas Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >5.000 (Dérmico) >5.000 (Oral)</p>

<p>Triticonazol</p> 	<p>Familia: Triazoles Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >2.000 (Dérmico) >2.000 (Oral)</p>
<p>Spinosad</p> 	<p>Familia: Espinosinas Acción: Insecticida DL₅₀ (mg kg⁻¹): > 3.600 (Dérmico) > 3.600 (Oral)</p>
<p>Spiroxamina</p> 	<p>Familia: Spiroketalamidas Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >1.600 (Dérmico) >500 (Oral)</p>
<p>Vinclozolin</p> 	<p>Familia: Dicarboximidias Acción: Fungicida DL₅₀ (mg kg⁻¹): >10.000(Dérmico) >10.000 (Oral)</p>

ANEXO II
ARTÍCULOS CIENTÍFICOS
PUBLICADOS

ANEXO II
ARTÍCULOS CIENTÍFICOS
PUBLICADOS



Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS



Mariela Pistón^a, Ignacio Machado^a, Cátia S. Branco^b, Verónica Cesio^c, Horacio Heinzen^c, Daniela Ribeiro^d, Eduarda Fernandes^d, Renan Campos Chisté^{d,*}, Marisa Freitas^{d,*}

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad de la República (UdelaR), P.O. Box 1157, 11800 Montevideo, Uruguay

^b Institute of Biotechnology, University of Caxias do Sul (UCS), 95070-560 Caxias do Sul, RS, Brazil

^c Department of Natural Products and Pharmacognosy, Faculty of Chemistry, Universidad de la República (UdelaR), P.O. Box 1157, 11800 Montevideo, Uruguay

^d REQUIMTE, Department of Chemical Sciences, Faculty of Pharmacy (FFUP), University of Porto, 4050-313 Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2014

Received in revised form 10 May 2014

Accepted 30 May 2014

Available online 17 June 2014

Keywords:

Cynara cardunculus

Phenolic compounds

LC–MS

Antioxidant capacity

Reactive oxygen species

Reactive nitrogen species

ABSTRACT

The globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) is a perennial plant cultivated in the Mediterranean region and Americas for its edible young flower heads and as an interesting source of bioactive compounds. The present study was undertaken to evaluate scavenging capacity against the most physiologically relevant reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) of three different extracts from artichoke leaves (infusion, decoction and hydroalcoholic) using different solvents, commonly accepted for human consumption (water and a mixture of ethanol/water). Additionally, the phenolic compounds in each extract were identified and quantified by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometer detectors (HPLC–DAD–MS/MS). Chlorogenic acid was the major phenolic compound identified in all extracts, followed by 1,3-dicaffeoylquinic acid (cynarin), luteolin-7-rutinoside and the infusion extract presented the highest phenolic content (108 mg/g extract, dry basis). In general, the extracts of artichoke leaves presented a remarkable capacity to scavenge ROS and RNS with IC₅₀ values in a low µg/mL range (3.4–43 µg/mL). These findings suggest that artichoke could be a potential source of natural antioxidants and has an undeniable nutraceutical value.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) is a perennial plant cultivated in the Mediterranean region and Americas for its edible young flower heads. Nowadays, artichoke is consumed in many countries all over the world; but in South America, although it has been cultivated for over a century, it became popular only in the last 10 years, not only as a healthy food, but also and especially as a raw material used in herbal medicine products to relieve indigestion and as an hepatoprotective. The commercial herbal medicine consists of an aqueous/alcoholic extract and it is very common to drink the infusion (teas) made with artichoke leaves for liver and digestive issues.

There is a growing interest in artichoke for its pharmacological activities, such as the inhibition of cholesterol biosynthesis in hepatocytes and its hepatoprotective effect (López et al., 2006). In addition, the antioxidant capacity of artichoke has been associated to its high phenolic compound content (Fratianni, Tucci, De Palma, Pepe, & Nazzaro, 2007;

Gebhardt, 1997; Lattanzio, Kroon, Linsalata, & Cardinali, 2009; Lutz, Henríquez, & Escobar, 2011; Pérez-García, Adzet, & Cañigüeral, 2000; Valentão et al., 2002; Wang et al., 2003). The artichoke leaves are rich in phenolic compounds and chlorogenic acid and the isomers 1,3-, 3,4- and 4,5-di-*O*-caffeoylquinic acid are the major bioactive compounds present in its phenolic composition, as determined by conclusive techniques (NMR) (Wang et al., 2003; Zhu, Zhang, & Lo, 2004). Cynarin (1,3-di-*O*-caffeoylquinic acid) may be considered as the one with the highest capacity to inhibit cholesterol biosynthesis and LDL oxidation (Gouveia & Castilho, 2012; Grancai, Nagy, Suchy, & Novomesky, 1994; Lattanzio et al., 2009), while an anti-obesity effect of chlorogenic acid was already reported in mice (Cho et al., 2010). In line with these effects, the slimming effect of artichoke has been promoted, resulting in a high popularity of artichoke products around the world.

The potential scavenging capacity of infusion of artichoke leaves against some reactive oxygen species (ROS), such as superoxide anion radical (O₂⁻), hydroxyl radical (HO[•]), hypochlorous acid (HOCl) and peroxy radicals (ROO[•]) was already reported in the literature (Valentão et al., 2002; Wu et al., 2004). However, despite the phytopharmaceutical interest in the antioxidant effects of artichoke, no studies have been performed in other types of artichoke extracts, besides infusions. Moreover, its potential scavenging capacity against

* Corresponding authors at: REQUIMTE, Department of Chemical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal. Tel.: +351 220428662; fax: +351 226093483.

E-mail addresses: rcchiste@ff.up.pt (R.C. Chisté), marisafreitas@ff.up.pt (M. Freitas).

reactive nitrogen species (RNS) was not reported in the literature until this moment.

Therefore, the goal of this study was to obtain three different extracts from artichoke leaves (infusion, decoction and hydroalcoholic) by different solvents commonly accepted for human consumption (water and a mixture of ethanol/water) and to determine their scavenging capacities against the most physiologically relevant ROS and RNS. In addition, the phenolic compounds of each extract were characterized by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometer detectors (HPLC–DAD–MS/MS).

2. Material and methods

2.1. Chemicals

α,α' -Azodiisobutyramidine dihydrochloride (AAPH) and trolox were obtained from Fluka Chemie GmbH (Steinheim, Germany). Dihydrorhodamine 123 (DHR), 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), H_2O_2 (30%), sodium hypochlorite solution with 4% available chlorine, 3-(aminopropyl)-1-hydroxy-3-isopropyl-2-oxo-1-triazene (NOC-5), β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), phenazine methosulfate (PMS), nitroblue tetrazolium chloride (NBT), histidine, horseradish peroxidase (HRP), 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (amplex red), ascorbic acid, tiron, lucigenin, quercetin, chlorogenic acid, luteolin, apigenin, acetonitrile, formic acid and all other chemical salts and solvents of analytical and HPLC grade were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Ultrapure water was obtained from the arium® pro system (Sartorius, Germany). All standards of phenolic compounds showed at least 95% of purity, as determined by HPLC–DAD.

2.2. Artichoke samples

Artichoke leaves (2 kg) were collected in Montevideo, Uruguay. The fragments of leaves were identified by the Professor of Botany Eduardo Alonso Paz (Curator of the Herbarium MVFQ, Uruguay) as *Cynara cardunculus* subsp. *cardunculus* (or *Cynara scolymus* mixture of leaves of the cv. Purple Globe and cv. Green Globe). A voucher specimen (MVFQ 4399) has been deposited in the Herbarium of the Cathedra of Botany of the Faculty of Chemistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. The artichoke leaves were chopped and dried in an oven with forced air circulation (70 °C) and stored at 20 °C at light-free conditions until extract preparation.

2.3. Preparation of artichoke leaf extracts

Two aqueous extracts (infusion and decoction) and a hydroalcoholic extract were prepared according to Cañigüeral, Wichtl, and Vila (1998). Briefly, for decoction preparation, the dried chopped leaves (20 g) were added to 1000 mL of ultrapure water, heated, kept in boiled water for 10 min and then, the mixture was removed from the heat and stood for 5 min to be filtered through cotton. Infusion was prepared by adding 1000 mL of ultrapure water at 95 °C to 20 g of dried chopped leaves and the mixture was left to stand for 10 min to be also filtered through cotton. Both the infusion and decoction extracts were frozen and freeze-dried. To obtain the hydroalcoholic extract, 1000 mL of a mixture of ethanol/water (70:30, v/v) were added to 20 g of dried chopped leaves and stirred on an orbital shaker (70 rpm) for 12 h at 25 °C. The hydroalcoholic mixture was filtered through cotton, concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator ($T < 40$ °C) (Büchi RE 111, Switzerland) and then freeze-dried. All the extracts were transferred to amber flasks, sealed under N_2 flow and stored under light-free conditions at -18 °C until analysis. The yield of decoction, infusion and hydroalcoholic extracts were 4.9 g, 5.7 g and 2.4 g, respectively. It is important to highlight that the hydroalcoholic extract was prepared in a similar way to how it is a pharmaceutical product commercialized in Uruguay.

2.4. HPLC–DAD–ESI–MS/MS analysis of phenolic compounds

HPLC–DAD analysis of phenolic compounds was performed in an Accela LC system (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) equipped with quaternary pumps (Accela 600), a DAD detector and an auto-sampler cooled to 5 °C. The equipment was also connected in series to a LTQ Orbitrap™ XL mass spectrometer (MS/MS) (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) with electrospray ionization source (ESI), and a hybrid system combining a linear ion-trap and the Orbitrap mass analyzer. For chromatographic analysis, samples and solvents were filtered using, respectively, membranes of 0.22 μm (OlimPeak, Teknokroma®, Spain) and 0.45 μm (Billerica, MA, USA).

The phenolic compounds of each extract were analyzed after solubilizing ≈ 3 mg of each extract in 1.5 mL of methanol/water (1:1, v/v). Both identification and quantification of phenolic compounds by HPLC–DAD–ESI–MS/MS were carried out on a C_{18} Synergi Hydro column (4 μm , 250 \times 4.6 mm, Phenomenex) at 0.9 mL/min, column temperature at 29 °C, with a mobile phase in a linear gradient of water/formic acid (99.5:0.5, v/v) and acetonitrile/formic acid (99.5:0.5, v/v) (Chisté & Mercadante, 2012). The mass spectra were acquired with a scan range from m/z 100 to 1000; the MS parameters were set as follows: ESI source in negative ion mode; the capillary temperature was 275 °C and the capillary voltage of was set at 2.5 kV. The sheath gas and the auxiliary gas flow rates were set to 40 and 10, respectively, (arbitrary unit as provided by the software settings) and normalized collision energy for MS/MS experiments of 35%. The phenolic compounds were tentatively identified based on the following information: elution order, retention time of peaks, and UV-visible and mass spectra features (exact m/z , fragmentation patterns in MS/MS) as compared to authentic standards analyzed under the same conditions and data available in the literature for artichoke (Gouveia & Castilho, 2012; Pandino, Lombardo, Mauromicale, & Williamson, 2011; Wang et al., 2003; Zhu et al., 2004). Phenolic compounds were quantified by comparison to external standards using six-point analytical curves (in duplicate) for chlorogenic acid (0.5–49.5 $\mu g/mL$ at 325 nm, $r^2 \geq 0.99$), luteolin (0.6–20 $\mu g/mL$ at 348 nm, $r^2 \geq 0.99$) and expressed as mg/g of extract (dry basis), considering three independent extraction procedures ($n = 3$).

2.5. ROS and RNS scavenging assays

All analyses were performed in a microplate reader (Synergy HT, BIO-TEK), equipped with a thermostat, using colorimetric, fluorimetric or chemiluminometric detection. Each study corresponds, at least, to four individual experiments, in triplicate, using five concentrations. All the assays were performed at 37 °C. The artichoke extracts were dissolved in the same buffer used in ROS and RNS scavenging assays. In each assay, additional experiments were performed in order to verify the possible interference effects of the artichoke extracts with the used methodology. Additionally, the artichoke extracts did not showed any pro-oxidant effect, at the tested concentration range, as evaluated if these extracts have the ability to oxidize each specific fluorescent or colorimetric probe in the absence of ROS or RNS generators (data not shown). All IC_{50} values were calculated from the curves of percentage of inhibition versus antioxidant concentration, using the GraphPad Prism 5 software. Quercetin, tiron and ascorbic acid were used as positive controls.

2.5.1. Superoxide anion radical scavenging assay

The $O_2^{\cdot -}$ was generated by the NADH/PMS/ O_2 system and the $O_2^{\cdot -}$ scavenging capacity was determined by monitoring the effect of the extracts on the $O_2^{\cdot -}$ -induced reduction of NBT at 560 nm after 2 min (Chisté et al., 2011). The effects were expressed as the inhibition percentage of the NBT reduction to diformazan.

2.5.2. Hydrogen peroxide scavenging assay

The H₂O₂ scavenging capacity using amplex red was performed as previously reported (Freitas et al., 2013) with modifications. Reaction mixtures contained the following reagents at the indicated final concentrations (in a final volume of 250 µL): 50 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4, amplex red (25 µM), HRP (0.25 U/mL), artichoke extracts (6–1000 µg/mL) and 1% H₂O₂. The excitation and emission wavelengths used were 530 and 590 nm, respectively. The results were expressed as the inhibition percentage of the H₂O₂-induced oxidation of amplex red.

2.5.3. Hypochlorous acid scavenging assay

The HOCl scavenging capacity was measured by monitoring the effect of the extracts on HOCl-induced oxidation of DHR to rhodamine 123 (Chisté et al., 2011). The results were expressed as the inhibition percentage of the HOCl-induced oxidation of DHR.

2.5.4. Singlet oxygen scavenging assay

The ¹O₂ scavenging capacity was measured by monitoring the effect of the extracts on the oxidation of non-fluorescent DHR to fluorescent rhodamine 123 by this ROS (Chisté et al., 2011). ¹O₂ was generated by the thermal decomposition of a previously synthesized water-soluble endoperoxide NDPO₂ (disodium 3,3'-(1,4-naphthalene) bispropionate) (Costa et al., 2007). The results (n = 2) were expressed as the percentage inhibition of ¹O₂-induced oxidation of DHR.

2.5.5. Peroxyl radical scavenging assay

ROO[•] was generated by thermodecomposition of AAPH at 37 °C and the ROO[•] scavenging capacity was measured by monitoring the effect of artichoke extracts on the fluorescence decay resulting from ROO[•]-induced oxidation of fluorescein (Ou, Hampsch-Woodill, & Prior, 2001). The fluorescence signal was then monitored every minute at the emission wavelength of 528 nm with excitation at 485 nm until the total decay of fluorescence. Trolox (0.2–6 µg/mL) was used as a control standard in each assay. The relative ROO[•] scavenging capacity was then expressed as the ratio between the slope of each extract (or positive control) and the slopes obtained for trolox, as suggested by Rodrigues, Mariutti, Chisté, and Mercadante (2012).

2.5.6. Nitric oxide scavenging assay

The [•]NO scavenging capacity was measured by monitoring the effect of the extracts on [•]NO-induced oxidation of non-fluorescent DAF-2 to the fluorescent triazolofluorescein (DAF-2T) (Chisté et al., 2011). [•]NO was generated by decomposition of NOC-5 and the results were expressed as the inhibition percentage of the [•]NO-induced oxidation of DAF-2.

2.5.7. Peroxynitrite scavenging assay

The ONOO⁻ scavenging capacity was measured by monitoring the effect of the extracts on ONOO⁻-induced oxidation of non-fluorescent DHR to the fluorescent rhodamine 123 (Chisté et al., 2011). ONOO⁻ was synthesized as previously described by Beckman, Chen, Ischiropoulos, and Crow (1994). In a parallel set of experiments, the assays were performed in the presence of 25 mM NaHCO₃, in order to simulate the physiological CO₂ concentrations. This evaluation is important because, under physiological conditions, the reaction between ONOO⁻ and bicarbonate is predominant, with a very fast rate constant ($k = 3\text{--}5.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Whiteman, Ketsawatsakul, & Halliwell, 2002). The results were expressed as the inhibition percentage of the ONOO⁻-induced oxidation of DHR.

3. Results and discussion

3.1. Phenolic compounds in artichoke extracts

As can be seen in Table 1, infusion extract presented the highest phenolic content (108 mg/g extract), followed by the hydroalcoholic (73 mg/g) and decoction (63 mg/g) extracts; and these contents account for 10.8%, 7.3% and 6.3% of dry weight of each extract, respectively. These results are in agreement with those found in artichoke leaf extracts (in 60% methanol solution) from Imperial Star, Violet and Green Globe varieties (6.8–9.8% of dry weight) (Wang et al., 2003). Moreover, the phenolic contents obtained in this study were much higher than that naturally found in artichoke leaves, as reported for various clones derived from the two Sicilian landraces (2.1–8.4 mg/g leaves, dry matter) (Pandino, Lombardo, & Mauromicale, 2013).

Considering that a detailed description about the identification of phenolic compounds from artichoke leaves and other extracts was already reported in details by the literature (Gouveia & Castilho, 2012; Pandino et al., 2011; Wang et al., 2003; Zhu et al., 2004), only the most important aspects will be discussed below. The applied HPLC–DAD–ESI–MS/MS methodology allowed the separation (Fig. 1), quantification and tentative identification of 9 phenolic compounds (Table 1).

Chlorogenic acid (peak 1) was the major phenolic compound in all extracts and was positively identified after matching both the chromatographic behavior and spectroscopic characteristics (UV–Vis, exact *m/z* and MS/MS spectra) with authentic standard. Peak 2 showed a deprotonated molecule [M–H]⁻ at *m/z* 337, a MS/MS fragment at *m/z* 191, which represents the quinic acid molecule after the neutral loss of a coumaroyl moiety (–146 u), and was assigned as *p*-coumaroylquinic acid. Peak 3 was tentatively identified as 5-feruloylquinic acid, with [M–H]⁻ at *m/z* 367 and a MS/MS fragment

Table 1
Chromatographic, spectroscopic characteristics and contents of phenolic compounds of infusion, decoction and hydroalcoholic extracts from artichoke leaves (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*).

Peaks	t _R (min) ^a	λ _{max} (nm) ^b	[M–H] ⁻ (<i>m/z</i>)	MS/MS (–)(<i>m/z</i>) ^c	Compound	Concentration (mg/g extract) ^d		
						Infusion	Decoction	Hydroalcoholic
1	19.1	300(sh), 326	353.0885	191 , 179, 173, 161, 135	Chlorogenic acid ^e	64 ± 2	40 ± 3	43 ± 2
2	22.7	280(sh), 311	337.0933	191 , 163, 145, 109	<i>p</i> -Coumaroylquinic acid ^e	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.09 ± 0.03
3	23.9	290(sh), 325	367.1040	191 , 173, 161, 143, 135, 127	5-Feruloylquinic acid ^e	1.6 ± 0.3	0.9 ± 0.1	0.6 ± 0.1
4	26.3	265(sh), 348	593.2840	447, 327, 285 , 257, 241	Luteolin-7-rutinoside ^f	7.6 ± 0.1	7.4 ± 0.8	9.3 ± 0.4
5	27.5	265(sh), 348	447.0938	327, 285 , 241	Luteolin-7-glucoside (cynaroside) ^f	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.4	3.8 ± 0.3
6	28.5	295(sh), 325	515.1202	353 , 335, 179, 173	3,4-Dicaffeoylquinic acid ^e	2.1 ± 0.1	0.9 ± 0.3	0.03 ± 0.01
7	29.9	290(sh), 326	515.1207	353 , 335, 191	1,3-Dicaffeoylquinic acid (cynarin) ^e	22.4 ± 0.1	6.5 ± 0.5	14 ± 1
8	30.8	270(sh), 346	533.0952	489 , 447, 371, 285	Luteolin-7-malonyl-hexoside ^f	1.7 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.0 ± 0.1
9	31.1	295(sh), 327	515.1209	353 , 335, 299, 255, 203, 173	4,5-Dicaffeoylquinic acid ^e	5.1 ± 0.1	1.9 ± 0.4	1.1 ± 0.1
					Phenolic contents (total sum)	108 ± 2	63 ± 5	73 ± 4

^a Retention time on the C₁₈ Synergi Hydro (4 µm) column.

^b Solvent: gradient of 0.5% formic acid in water and acetonitrile with 0.5% formic acid.

^c In the MS², the most abundant ion is shown in boldface.

^d Mean ± standard deviation (n = 3).

^e The peaks were quantified as equivalent of chlorogenic acid (at 325 nm).

^f The peaks were quantified as equivalent of luteolin (at 348 nm).

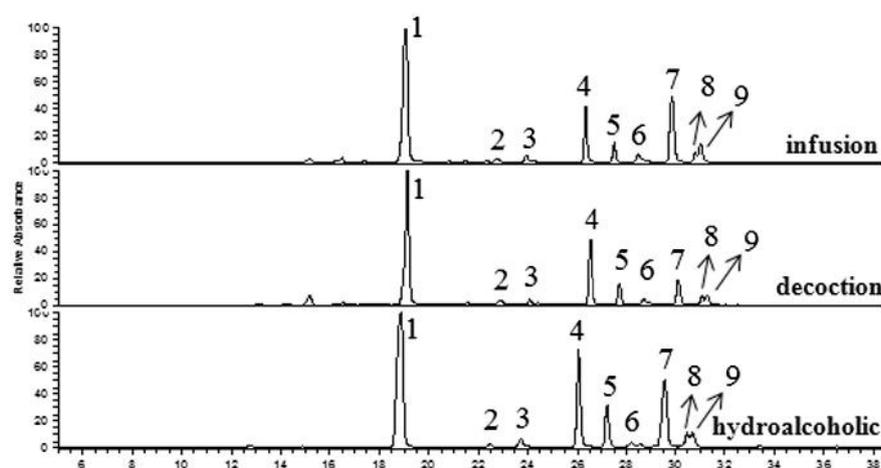


Fig. 1. Chromatogram obtained by HPLC–DAD (330 nm) of phenolic compounds of infusion, decoction and hydroalcoholic extracts from artichoke leaves (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*). Peak characterization is given in Table 1.

at m/z 191 [M–H–feruloyl moiety][–], which fragmentation pattern matches those already described in artichoke extracts (Gouveia & Castilho, 2012). Peaks 4, 5, and 8 were tentatively identified as luteolin-7-rutinoside, luteolin-7-glucoside and luteolin-7-malonylhexoside, respectively; although in the present study, the exact position of the sugar moiety could not be determined by the applied methodology. The assignment was based on previous reports concerning the conclusive identification (Nuclear Magnetic Resonance, NMR) of these compounds in artichoke leaf extracts (Gouveia & Castilho, 2012; Pandino et al., 2011; Schütz, Kammerer, Carle, & Schieber, 2004; Wang et al., 2003; Zhu et al., 2004). Additionally, these compounds showed [M–H][–] at m/z 593 (peak 4), m/z 447 (peak 5) and m/z 533 (peak 8) and characteristic fragments in MS/MS spectra, which indicate the cleavage of the glycosidic linkage as neutral losses: 162 u (hexose), 146 u (rhamnose) and 308 u (rutinose). Finally, peaks 6, 7 and 9 were assigned as 3,4-,1,3- (cynarin) and 4,5-dicaffeoylquinic acid, respectively, with the same [M–H][–] at m/z 515 and intense fragments in MS/MS spectra at m/z 353 [M–H–caffeoyl moiety][–]. These isomers of dicaffeoylquinic acid were already identified by LC–MS and NMR (Wang et al., 2003; Zhu et al., 2004) and are commonly reported in artichoke extracts, being cynarin (1,3-*O*-dicaffeoylquinic acid) the most abundant among them (Gouveia & Castilho, 2012; Pandino et al., 2011; Schütz et al., 2004). 4,5-dicaffeoylquinic acid has been suggested to be an artifact from cynarin that is unavoidable produced during the extraction step to release steric strain in the cynarin molecule, that rearranges itself to other more stable isomers (Wagner & Bladt, 1996). Other possible products of cynarin hydrolysis, such as caffeic acid, that have been reported in the literature (Pérez-García et al., 2000) were not detected in the extracts from the artichoke cultivar studied.

3.2. Scavenging capacity of artichoke extracts against ROS and RNS

The production of reactive species is beneficial in some physiological processes, as example, in defense against infectious agents and in the function of a number of cellular signaling systems. However, an imbalance between the generation of pro-oxidant reactive species and the antioxidant defense capacity of the cell, affects major cellular components, including lipids, proteins and DNA (termed oxidative stress). This phenomenon is closely related to a number of human disorders, including cardiovascular diseases, diabetes, cancer and neurodegenerative diseases and with almost all liver pathologies. As such, it is of utmost importance the equilibrium of the antioxidant defenses as they represent the direct removal of free radicals (pro-oxidants), thus providing maximal protection for biological sites (Valko et al., 2007). The artichoke leaf extracts presented a remarkable capacity to scavenge all the tested ROS and RNS, with exception of H₂O₂, as shown in Table 2. It is important to note that the antioxidant activity of this extract could not be attributed just to one particular phenolic constituent but rather to the agonist action of the mixture of several bioactive molecules. The scavenging ability of the studied compounds provided outstanding results, considering the lower range of the IC₅₀ values found. The scavenging capacity of all the extracts seemed to be closely dependent on the phenolic compound contents. It is important to note that the extracts of artichoke leaves were prepared using different solvents commonly used for human consumption (water and ethanol).

Our study starts with the evaluation of the inhibition of O₂^{•–} production by artichoke leaf extracts. O₂^{•–} production plays an important role in redox cell signaling and development of pathophysiological conditions, such as hypertension, ischemia-reperfusion injury, inflammation

Table 2

Superoxide anion radical (O₂^{•–}), hydrogen peroxide (H₂O₂), hypochlorous acid (HOCl), singlet oxygen (¹O₂) and peroxy radical (ROO[•]) scavenging capacities of artichoke extracts.

Extracts	IC ₅₀ (µg/mL)				
	O ₂ ^{•–}	H ₂ O ₂	HOCl	¹ O ₂	ROO [•] (S _{sample} /S _{Trolox})
Infusion	34 ± 2	NA	3.7 ± 0.7	29.0 ± 0.9 ^a	0.64 ± 0.09
Decoction	43 ± 2	NA	4.2 ± 0.9	30.1 ± 2.2 ^a	0.62 ± 0.07
Hydroalcoholic	NA	NA	4.7 ± 1.1	20.5 ± 1.0 ^a	0.31 ± 0.04
<i>Positive controls</i>					
Quercetin	–	–	0.28 ± 0.07	0.8 ± 0.2 ^b	1.34 ± 0.07
Tiron	0.065 ± 0.003	–	–	–	–
Ascorbic acid	–	106.5 ± 7.9	–	–	1.44 ± 0.09

IC₅₀ = concentration, *in vitro*, required to decrease in 50% the reactivity of the studied reactive species in the tested media (mean ± standard error of the mean, n = 4). S_{sample} = slope of artichoke extracts curves. S_{Trolox} = slope of trolox curve. NA = no activity was found up to 1 mg/mL.

^a (n = 2).

^b IC₅₀ value obtained by our research group (Chisté et al., 2012).

and atherosclerosis (Dikalov, Griendling, & Harrison, 2007). The excessive production of $O_2^{\cdot-}$ is critical not by the action of this species by itself, since it is relatively unreactive toward the most biological substrates, but by the fact that $O_2^{\cdot-}$ is a precursor of a variety of powerful oxidants (Freitas, Lima, & Fernandes, 2009). One of the main sources of $O_2^{\cdot-}$ is the enzyme xanthine oxidase (XO), which has been used to evaluate the antioxidant activity of plant extracts (Valentão et al., 2002). However this methodology presents some pitfalls, such as the possibility of the substance under test to inhibit directly xanthine oxidase (Halliwell, Aeschbach, Loliger, & Aruoma, 1995). As so, in order to avoid the confounding effects derived from the XO, in this work $O_2^{\cdot-}$ activity was measured by a non-enzymatic methodology. The inhibition against superoxide was higher using the infusion extract, which presented an IC_{50} value of $34 \pm 2 \mu\text{g/mL}$. The efficacy of lyophilized infusion of *Cynara cardunculus* in scavenging $O_2^{\cdot-}$ using the xanthine/xanthine oxidase system and NADH/PMS/ O_2 system was already reported and corroborates the results obtained in this work (Valentão et al., 2002). The efficacy of the infusion extract could be related with the higher content of phenolic compounds, namely chlorogenic acid, since this component was described as a good $O_2^{\cdot-}$ scavenger (Nakatani et al., 2000; Sato et al., 2011). According to Sato et al. (2011) chlorogenic acid has a stronger antioxidant activity, namely against $O_2^{\cdot-}$, with IC_{50} values close to those obtained to allopurinol, a frequently prescribed agent for gout and which is the most commonly used xanthine oxidase inhibitor (Pacher, Nivorozhkin, & Szabó, 2006). $O_2^{\cdot-}$ is produced readily by multiple processes *in vivo* and leads to the generation of many other oxidants. As example, $O_2^{\cdot-}$ is rapidly dismutated either spontaneously or through enzyme-catalysis (by superoxide dismutase, SOD) into H_2O_2 (Freitas et al., 2009). H_2O_2 , per se, is one of the less reactive among ROS. However, as $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 could generate other species with more potent and toxic effects, such as hydroxyl radicals (HO^{\cdot}).

No activity was found for the tested compounds against H_2O_2 . These results were obtained using amplex red as a specific probe for H_2O_2 . To avoid erroneous conclusions, lucigenin was also used to detect H_2O_2 , and once again, the tested extracts did not inhibit the generation of H_2O_2 up to 1 mg/mL (data not shown). H_2O_2 results in the production of two of the most harmful ROS, HO^{\cdot} and HOCl. In the presence of iron and other metal ions, H_2O_2 can form HO^{\cdot} , through the Fenton reaction (Valko et al., 2007). Most of the H_2O_2 produced by phagocytic cells is consumed by myeloperoxidase (MPO) to catalyze the formation of HOCl. This reactive species is very toxic, it is almost 100–1000 times more toxic than $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 (Conner & Grisham, 1996). HOCl has been implicated in several pathologies induced as a result of chronic inflammation (e.g., in atherosclerosis, glomerulosclerosis, ischemia-reperfusion injury, kidney damage, some cancers, multiple sclerosis and Alzheimer's disease among others) (Ho, Karimi Galougahi, Liu, Bhindi, & Figtree, 2013; Malle, Marsche, Arnhold, & Davies, 2006; Spickett et al., 2000). The oxidation of low density lipoprotein (LDL) and subsequently accumulation of primary and secondary lipid peroxidation products appear to play a key role in the damage induced by HOCl (Ho et al., 2013; Malle et al., 2006; Spickett et al., 2000). Due to this effect, it was of our great interest to evaluate the HOCl-scavenging capacity of artichoke leaf extracts. All of the three extracts showed a good scavenging activity of HOCl, with low IC_{50} values. The IC_{50} values were very similar between the studied extracts. Nevertheless infusion extract was the most efficient with an IC_{50} of $3.7 \pm 0.7 \mu\text{g/mL}$. Schaffer et al. (2004), have already reported the HOCl scavenging efficiency of an extract of *Cynara cardunculus* (ethanol-based extraction), which scavenged almost 25% of HOCl at 10^{-5} M. Surprisingly, it was reported a weak antioxidant protective effect against HOCl by lyophilized infusion of *Cynara cardunculus*, which was not concentration-dependent, in the range of 0–1 mg of extract/mL, measured by the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) (Valentão et al., 2002). Interestingly, Schaffer et al. (2004) find no inhibitory effect of the extract in MPO of neutrophils, as opposed to reference antioxidants such as quercetin, trolox, and highly concentrated ascorbic acid

(500 μM). Pérez-García et al. (2000) studied the effect of artichoke leaves against oxidative stress in human neutrophils. The extract revealed a good scavenging activity of reactive species produced by neutrophils. Taking into account our results and the results provided by Schaffer et al. (2004), we can conclude that the protective effect of artichoke extracts occurs by a direct scavenging process and not by the MPO inhibition. According to Pérez-García et al. (2000), chlorogenic acid, caffeic acid, cynarin and luteolin contributed to the antioxidant activity of artichoke leaf extract in human neutrophils. This could explain the best results obtained in this work with infusion extract, which presented the higher phenolic content. However, besides these constituents, other components of the extract may participate in its antioxidant activity, since in PMA-stimulated neutrophils the pure constituents were less effective than the extract in inhibiting ROS production (Pérez-García et al., 2000).

As mentioned above, although being a rather unreactive molecule, H_2O_2 can originate HO^{\cdot} , one of the most harmful reactive species. Valentão et al. (2002) tested lyophilized infusion of *Cynara cardunculus* leaves for its scavenging capacity of HO^{\cdot} , generated by the Fe^{3+} -EDTA/ascorbate Fenton system and concluded that the extract was able to chelate iron ions only for concentrations above 200 $\mu\text{g/mL}$.

HO^{\cdot} is one of the strongest oxidizing agents, which induce severe damages by initiating lipid peroxidation due to its well-known reactivity with polyunsaturated fatty acids, resulting in the production of ROO^{\cdot} among other cytotoxic agents (Gomes, Fernandes, Lima, Mira, & Corvo, 2008). In the present study, we evaluated the potential of artichoke leaf extracts to scavenge ROO^{\cdot} by the ORAC assay. The results indicated that the infusion extract was the most efficient than the other two extracts tested. The ability of artichoke extract to inhibit lipid peroxidation was already reported (Brown & Rice-Evans, 1998). The authors attributed the protection of lipid peroxidation to luteolin (1 μM), which demonstrated an efficacy similar to that of 20 $\mu\text{g/mL}$ of artichoke extract in inhibiting lipid peroxidation. Moreover, chlorogenic acid showed antioxidant activities by increasing the resistance of LDL to peroxidation (Brown & Rice-Evans, 1998). We speculate that this could occur by the scavenging activity of artichoke, namely against ROO^{\cdot} . These results constitute an important finding, considering the relevance of lipid oxidation to biological systems.

It was also our purpose to study the effect of artichoke leaf extracts against RNS, since there are no reports in the literature about this issue. The reactivity of RNS may have profound effects on the biological activity of numerous molecules (Pacher, Beckman, & Liaudet, 2007). The production of RNS is started by $^{\cdot}\text{NO}$ production which is produced by inducible nitric oxide synthase through the conversion of L-arginine to L-citrulline (Pacher et al., 2007). $^{\cdot}\text{NO}$ has been found to play a critical role in numerous physiological processes, as well as in the pathophysiology of many human diseases. Its toxicity is not only related to the levels of $^{\cdot}\text{NO}$ generation but is also highly dependent upon the levels and types of other species which react with $^{\cdot}\text{NO}$, converting it into toxic oxidants and nitrating agents. As example, the fast reaction of $^{\cdot}\text{NO}$ and $O_2^{\cdot-}$ produce ONOO^- that has been shown to oxidize a variety of biomolecules including thiols, lipids, proteins, carbohydrates, DNA, among others, via complex and strongly pH-dependent oxidative reaction mechanisms. This RNS has been implicated in an increasing list of diseases, including arteriosclerosis, cardiovascular diseases, inflammation, ischemia-reperfusion, septic shock, cancer, diabetes, asthma, and neurodegenerative disorders such as Alzheimer's or Parkinson's diseases (Pacher et al., 2007). Our results clearly demonstrated that artichoke extracts are effective scavengers of RNS, namely of $^{\cdot}\text{NO}$ and ONOO^- . It seems that the phenolic content of artichoke extracts is responsible for the efficiency in the inhibition of the oxidizing effect of $^{\cdot}\text{NO}$ and ONOO^- . The infusion and decoction extracts, which presented the highest phenolic contents, showed the greatest scavenging capacity against $^{\cdot}\text{NO}$ and ONOO^- , with very low IC_{50} values (Table 3). In addition, the ability of chlorogenic acid to scavenge ONOO^- was already described (Kono et al., 1997).

Table 3
Nitric oxide (NO) and peroxynitrite (ONOO^-) scavenging capacities of artichoke extracts.

Extracts	IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	NO	ONOO^-	
		Absence of NaHCO_3	Presence of 25 mM NaHCO_3
Infusion	5.5 ± 0.5	3.5 ± 0.2	5.6 ± 0.2
Decoction	6.8 ± 0.5	3.4 ± 0.3	4.8 ± 0.4
Hydroalcoholic	11.0 ± 0.8	5.1 ± 0.3	6.5 ± 0.2
Positive control			
Quercetin	0.53 ± 0.04	0.156 ± 0.001	0.26 ± 0.02

IC_{50} = concentration, *in vitro*, required to decrease in 50% the reactivity of the studied reactive species in the tested media (mean ± standard error of the mean, n = 4).

It has been reported that physiological concentrations of CO_2 can modulate ONOO^- reactivity due to the fast reaction between these two compounds, yielding NO_2 and CO_3^{2-} , which are the main responsible radicals for the nitration and oxidation reactions that are usually observed *in vivo* (Freitas et al., 2009). Following the results of the present study it may be expected that the artichoke leaf extract is also an effective scavenger for NO_2 and CO_3^{2-} since it maintained its scavenging effectiveness in the presence and absence of HCO_3^- .

Therefore, we clearly demonstrate the importance of consuming an infusion preparation of artichoke leaves, due to their high phenolic content. Moreover, this is the first report concerning the scavenging capacity of artichoke leaf extracts against the most physiologically relevant RNS. These findings confirm that the production of extracts from accessible natural sources, with high levels of bioactive compounds, can be considered as a very interesting approach to the food, pharmaceutical and cosmetic industries (Chisté, Benassi, & Mercadante, 2014). From this study it became clear that the artichoke extracts have efficient antioxidant activity against biologically relevant ROS and RNS, being infusion extract the most promising antioxidant agent. The scavenging capacities of artichoke extracts against all tested ROS and RNS were closely related to the content of phenolic compounds. These findings suggest that artichoke could be a potential source of natural antioxidant and has an undeniable nutraceutical value.

Acknowledgments

We are grateful for the financial support from Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC, Uruguay), in the ambit of "Programa de pasantías en el exterior en centros académicos de reconocida calidad", and PEDECIBA-Química (Uruguay). This work also received financial support from the European Union (FEDER funds through COMPETE), National Funds (FCT, Fundação para a Ciência e Tecnologia) through project Pest-C/EQB/LA0006/2013 and from European Union (FEDER funds) under the framework of QREN, through Project NORTE-07-0124-FEDER-000066. Daniela Ribeiro and Marisa Freitas acknowledge Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) the financial support for the PhD grant (SFRH/BD/72966/2010) and Pos-doc grant (SFRH/BPD/76909/2011), respectively, in the ambit of "QREN-POP-H-Tipologia 4.1-Formação Avançada", co-sponsored by FSE and by national funds of MCTES. We are also grateful Prof. Eduardo Alonso Paz for the botanical classification of artichoke samples and Bianco family from Rincón del Cerro (Montevideo, Uruguay) for the kind donation of artichoke leaves.

References

Beckman, J. S., Chen, J., Ischiropoulos, H., & Crow, J. P. (1994). Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods in Enzymology*, 223, 229–240.

Brown, J. E., & Rice-Evans, C. A. (1998). Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation *in vitro*. *Free Radical Research*, 29, 247–255.

Cañigual, S., Wichtl, M., & Vila, R. (1998). *Plantas Medicinales y Drogas Vegetales para infusión y tisana*. Milano: OEMF 88-7076-216-5.

Chisté, R. C., Benassi, M. T., & Mercadante, A. Z. (2014). Efficiency of different solvents on the extraction of bioactive compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*

and the effect on its antioxidant and colour properties. *Phytochemical Analysis*, 25, 364–372.

Chisté, R. C., Freitas, M., Mercadante, A. Z., & Fernandes, E. (2012). The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 135, 1740–1749.

Chisté, R. C., & Mercadante, A. Z. (2012). Identification and quantification, by HPLC–DAD–MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 5884–5892.

Chisté, R. C., Mercadante, A. Z., Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L. F. C., & Braganholo, N. (2011). *In vitro* scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 127, 419–426.

Cho, A., Jeon, S., Kim, M., Yeo, J., Seo, K., Choi, M., et al. (2010). Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 937–943.

Conner, E. M., & Grisham, M. B. (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition*, 12, 274–277.

Costa, D., Fernandes, E., Santos, J. L. M., Pinto, D. C. G. A., Silva, A. M. S., & Lima, J. L. F. C. (2007). New noncellular fluorescence microplate screening assay for scavenging activity against singlet oxygen. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 2071–2081.

Dikalov, S., Griendling, K. K., & Harrison, D. G. (2007). Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*, 49, 717–727.

Fratianni, F., Tucci, M., De Palma, M., Pepe, R., & Nazzaro, F. (2007). Polyphenolic composition in different parts of some cultivars of globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. var *scolymus* (L.) Fiori). *Food Chemistry*, 104, 1282–1286.

Freitas, M., Costa, V. M., Ribeiro, D., Couto, D., Porto, G., Carvalho, F., et al. (2013). Acetaminophen prevents oxidative burst and delays apoptosis in human neutrophils. *Toxicology Letters*, 219, 170–177.

Freitas, M., Lima, J. L., & Fernandes, E. (2009). Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. *Analytica Chimica Acta*, 649, 8–23.

Gebhardt, R. (1997). Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 144, 279–286.

Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. L., Mira, L., & Corvo, M. L. (2008). Molecular mechanisms of anti-inflammatory activity mediated by flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, 15, 1586–1605.

Gouveia, S. C., & Castilho, P. C. (2012). Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke-based dietary supplements. *Food Research International*, 48, 712–724.

Grancai, D., Nagy, M., Suchy, V., & Novomesky, P. (1994). Cynarin from the fresh flower buds of *Cynara cardunculus*. *Fitoterapia*, 65, 282.

Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., & Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33, 601–617.

Ho, E., Karimi Galougahi, K., Liu, C. C., Bhindi, R., & Figtree, G. A. (2013). Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology*, 1, 483–491.

Kono, Y., Kobayashi, K., Tagawa, S., Adachi, K., Ueda, A., Sawa, Y., et al. (1997). Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1335, 335–342.

Lattanzio, V., Kroon, P. A., Linsalata, V., & Cardinali, A. (2009). Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of Functional Foods*, 1, 131–144.

López, P. G., Ferrado, E. G., & Brousassalis, A. M. (2006). Determinación del contenido de derivados cafeilquímicos en especies sudamericanas del género *Achyrocline*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, 25, 571–573.

Lutz, M., Henríquez, C., & Escobar, M. (2011). Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2, 49–54.

Malle, E., Marsche, G., Arnhold, J., & Davies, M. J. (2006). Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1761, 392–415.

Nakatani, N., Kayano, S., Kikuzaki, H., Sumino, K., Katagiri, K., & Mitani, T. (2000). Identification, quantitative determination, and antioxidative activities of chlorogenic acid isomers in prune (*Prunus domestica* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 5512–5516.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619–4626.

Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiological Reviews*, 87, 315–424.

Pacher, P., Nivorozhkin, A., & Szabó, C. (2006). Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: Renaissance half a century after the discovery of allopurinol. *Pharmacological Reviews*, 58, 87–114.

Pandino, G., Lombardo, S., & Mauromicale, G. (2013). Globe artichoke leaves and floral stems as a source of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*, 44, 44–49.

Pandino, G., Lombardo, S., Mauromicale, G., & Williamson, G. (2011). Phenolic acids and flavonoids in leaf and floral stem of cultivated and wild *Cynara cardunculus* L. genotypes. *Food Chemistry*, 126, 417–422.

Pérez-García, F., Adzet, T., & Cañigual, S. (2000). Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes. *Free Radical Research*, 33, 661–665.

Rodrigues, E., Mariutti, R. B. L., Chisté, R. C., & Mercadante, A. Z. (2012). Development of a novel micro-assay for evaluation of peroxyl radical scavenger capacity: Application to carotenoids and structure–activity relationship. *Food Chemistry*, 135, 2103–2111.

Sato, Y., Itagaki, S., Kurokawa, T., Ogura, J., Kobayashi, M., Hirano, T., et al. (2011). *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403, 136–138.

- Schaffer, S., Eckert, G. P., Müller, W. E., Llorach, R., Rivera, D., Grande, S., et al. (2004). Hypochlorous acid scavenging properties of local Mediterranean plant foods. *Lipids*, *39*, 1239–1247.
- Schütz, K., Kammerer, D., Carle, R., & Schieber, A. (2004). Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC–DAD–ESI/MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 4090–4096.
- Spickett, C. M., Jerlich, A., Panasenko, O. M., Arnhold, J., Pitt, A.R., Stelmaszyńska, T., et al. (2000). The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochimica Polonica*, *47*, 889–899.
- Valentão, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Bastos, M. L. (2002). Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 4989–4993.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *39*, 44–84.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis—A thin layer chromatographic Atlas*. Berlin: Springer Verlag.
- Wang, M., Simon, J. E., Aviles, I. F., He, K., Zheng, Q. Y., & Tadmor, Y. (2003). Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Journal Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 601–608.
- Whiteman, M., Ketsawatsakul, U., & Halliwell, B. (2002). A reassessment of the peroxyxynitrite scavenging activity of uric acid. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *962*, 242–259.
- Wu, X., Beecher, G., Holden, J., Haytowitz, D., Gebhardt, S., & Prior, R. (2004). Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 4026–4037.
- Zhu, X., Zhang, H., & Lo, R. (2004). Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 7272–7278.

A Rapid Sample Preparation Method for the Determination of Cadmium and Lead in Spinach and Artichoke Leaves Using Ozone

Ignacio Machado¹, María Verónica Cesio², Isabel Dol¹, Mariela Pistón^{1,*}

¹Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

²Department of Natural Products and Pharmacognosy, Faculty of Chemistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

*Corresponding author: mpiston@fq.edu.uy

Received May 18, 2015; Revised June 03, 2015; Accepted June 07, 2015

Abstract A novel method for sample preparation using an ozone-based process was optimized for the determination of Cd and Pb using electrothermal atomic absorption spectrometry (ET-AAS). Advanced oxidation processes, which involve the *in situ* generation of highly potent chemical oxidants, are a promising technology to accelerate the oxidation at room temperature and the degradation of organic matter. A certified reference material of spinach leaves was used to evaluate the methodology. The sample was treated with diluted nitric acid, then a glass device was immersed in the solution and ozone was passed through for 10 minutes. The experimental conditions were optimized by means of a multivariate experiment. Figures of merit were: detection limits (3s): 0.002 mg kg⁻¹ (Cd), 0.01 mg kg⁻¹ (Pb), relative standard deviation lower than 10 % for both elements (n=5), the mean recovery was 97.6 % (Cd) and 98.3 % (Pb) compared with the certified value (n=5). The method was also applied for monitoring these elements in artichoke leaves and the results were in good agreement with those obtained with microwave digestion procedure. This procedure is simple, fast and showed to be adequate for the monitoring of these inorganic contaminants in spinach leaves and artichoke leaves.

Keywords: ozone, cadmium, lead, spinach, artichoke, contaminants in food

Cite This Article: Ignacio Machado, María Verónica Cesio, Isabel Dol, and Mariela Pistón, “A Rapid Sample Preparation Method for the Determination of Cadmium and Lead in Spinach and Artichoke Leaves Using Ozone.” *American Journal of Food Science and Technology* vol. 3, no. 3 (2015): 55-59. doi: 10.12691/ajfst-3-3-1.

1. Introduction

In the MERCOSUR region (acronym of the Southern Common Market) there exists a technical regulation on maximum limits of inorganic contaminants in food as well as in the European Union. This regulation must be fulfilled by the member countries of MERCOSUR (Argentina, Brazil, Paraguay and Uruguay). It establishes criteria for commercialization of food between these countries and those imported from elsewhere. The maximum limits allowed for cadmium (Cd) and lead (Pb) in vegetable edible leaves are 0.2 mg kg⁻¹ and 0.3 mg kg⁻¹ respectively [1].

To ensure food safety, the laboratories need simple and rapid validated analytical methodologies to provide fast response, to allow the commercialization of the products.

The official methods, although they have been reviewed and tend to decrease processing time of the samples, are based on acid digestions involving a long time; they have many stages and consume large amounts of dangerous reagents (mainly mineral acids to oxidize organic matter). Quite recently, the reference manuals began to incorporate microwave-assisted treatments in the standard methods; this proved to be an efficient strategy for extracting metals

and sample preparation [2]. A microwave digestion equipment costs approximately USD 25.000 in South America, which is expensive for laboratories and has high-energy consumption.

Attention is currently given to certain critical parameters in the development of new methods, such as operating time, security, ratio of volume / concentration of solvents, energy consumption, among others [3].

Oxidation processes involving *in situ* generation of oxidant chemical species have been reported as effective emerging technologies to accelerate the degradation of organic matter, at room temperature, in certain matrices. These processes, commonly called “advanced oxidation processes” (AOPs), generally use ozone combined with UV radiation [4,5].

Ozone-based procedures are used to remove organic matter that, otherwise are very difficult to remove, e.g. from water or industrial effluents [6-8].

It is also used to remove organic contaminants in waters and polluting effluents emerging in the pharmaceutical industry using the advance of the oxidizing ability to degrade organic compounds and pesticide residues [9,10,11,12].

Only a few works reported that ozone gas (combined with the use of ultrasound and/or UV radiation) can be used for the sample preparation of matrices containing

organic matter for the determination of metals and semimetals (ozonation and sonication) [5,6,8,13,14].

Khuntia et al. in 2014 postulated that ozone would be effective as an oxidant of organic matter due to the formation of hydroxyl radicals in situ [8], but there is scarce information regarding the possible mechanisms.

In this work the optimization and validation of a novel method for the determination of Cd and Pb in spinach and artichoke leaves with an ozone-based procedure for sample pre-treatment is presented. The entire method can be performed in 15 minutes using dilute acid. The analytical determinations were carried out by ET-AAS.

Artichoke leaves are widely used for infusions and for phytopharmaceutical products. An infusion preparation of artichoke leaves has recognized and demonstrated antioxidant capacity and high content of bioactive compounds [15].

The proposed procedure showed to be adequate for the purpose and could be a useful tool for the control of these inorganic contaminants in spinach and artichoke leaves and similar green leafy vegetables for food control. The treatment is simple, fast and also economical, with the novelty of the use of ozonation in the sample treatment. To the best of our knowledge, this has not been reported for Cd and Pb or for this matrix before.

2. Materials and Methods

2.1. Instrumentation

Ozone was generated from oxygen (99.5%, Linde, Montevideo, Uruguay) with a corona discharge ozone generator (OZOX - OG 75-A, Montevideo, Uruguay) with an oxygen flow rate of 7 L min⁻¹. A borosilicate 3.3 glass (Pyrex®) piece, constructed by a glassblower at the Faculty, was placed at the end of the tube that transports the gas. This device has a porous glass membrane (pore size: 200 µm) through which ozone gas passes into the solution during the ozonation process.

For the analytical determinations of Cd and Pb an iCE 3500 Atomic Absorption Spectrometer with graphite furnace (Thermo Scientific, Cambridge, United Kingdom) was used. The light sources were hollow cathode lamps (Photron Pty. Ltd., Victoria, Australia), operated at the 228.8 nm (Cd) and 283.3 nm (Pb) analytical lines. The spectrometer was controlled with specific software SOLAAR (Thermo Scientific, Cambridge, United Kingdom). Integrated absorbance (peak-area) was used for signal evaluation and quantification. The GFS35Z transversely heated graphite tube furnace supplied with the iCE 3500, and the GFS33 auto sampler (both from Thermo Fisher Scientific) were used throughout. Injections were of 20 µL sample solutions. Extended lifetime graphite tubes (Thermo Scientific) were used. Argon 99.998 % (Linde, Montevideo, Uruguay) was used as the purge and protective gas.

The graphite furnace heating programs used for the analytical determinations are showed in Table 1 where the optimized conditions are described for each element. The optimal temperatures for pyrolysis and atomization were 350/1000 °C and 1500/1800 °C for Cd/Pb respectively.

Chemical matrix modifier for Cd and Pb: 10 µL of solution containing 5 µg of Pd(NO₃)₂ and 3 µg of Mg(NO₃)₂. For Cd two drying steps were required [16].

Table 1. Heating programs for the determination of Cd and Pb using ET-AAS with Zeeman background correction

Stage	Temperature (°C)	Ramp rate (°C/s)	Hold time (s)	Ar flow rate (L/min)
Drying 1	100	5 ^{Cd} /10 ^{Pb}	30	0.2
Drying 2 ^{Cd}	140	15	20	0.2
Pyrolysis	350 ^{Cd} /1000 ^{Pb}	10 ^{Cd} /150 ^{Pb}	0 ^{Cd} /20 ^{Pb}	0.2
Atomization	1500 ^{Cd} /1800 ^{Pb}	0	3	0
Cleanup	2600	0	3	0.2

2.2. Reagents and Samples

All chemicals used were of analytical reagent grade. Ultrapure water of 18.2 MΩcm resistivity (ASTM Type I) was obtained from a Millipore Simplicity 185 purifier. All glassware was soaked overnight in 10% (v/v) nitric acid and then rinsed exhaustively with ultrapure water.

Nitric acid (HNO₃ 65%, Merck, Germany) was used for sample preparation.

Stock standard solutions of Cd and Pb, containing 1000 mg L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Germany) were used to prepare the working standard solutions with concentrations 10 mg L⁻¹ for Cd and Pb, in 0.1% w/w HNO₃. Working aqueous standard solutions were prepared fresh daily by dilution with 0.1% w/w HNO₃. The calibration curves for ET-AAS measurements were constructed in the range 0.3 - 4 µg L⁻¹ for Cd and 2-50 µg L⁻¹ for Pb. Stock solutions of Pd(NO₃)₂ (Merck, Darmstadt, Germany) and Mg(NO₃)₂ (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI, USA) containing 10000 and 20000 mg L⁻¹ respectively, were used to prepare the chemical matrix modifier. The chemical matrix modifier for Cd and Pb was a mixture containing 5 µg of Pd(NO₃)₂ and 3 µg of Mg(NO₃)₂ in a 10 µL volume, injected into the furnace with the auto sampler.

A certified reference material (CRM) of trace elements in spinach leaves (NIST 1570a) was used for the optimization and for the evaluation of the trueness and precision of the proposed method. This material consists of U.S. Grade A chopped frozen spinach. At NIST, the freeze-dried material was sieved through a polypropylene sieve having pores of 0.25 mm. The sieved material was then jet milled and air classified to a particle size of approximately 75 µm (200 mesh) [17].

The certified value for Cd was (2.876 ± 0.058) mg kg⁻¹ (dry-mass basis). For Pb the informed value was 0.2 mg kg⁻¹ (dry-mass basis); in this case, the certificate did not provide the uncertainty.

Artichoke leaves (2 kg) were collected in Montevideo, Uruguay. Professor Eduardo Alonso Paz (Curator of the Herbarium MVFQ, Uruguay) identified the fragments of leaves as *Cynara cardunculus* subsp. *cardunculus*. A voucher specimen (MVFQ 4399) has been deposited in the Herbarium of the Cathedra of Botany of the Faculty of Chemistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. The artichoke leaves were chopped and dried in an oven with forced air circulation (70 °C) and stored at 20 °C at light-free conditions. Before sample preparation, the material was milled in order to obtain a particle size similar to that of the CRM.

For the validation of the Cd and Pb determination in artichoke leaves a microwave assisted digestion was carried out using a MARS-6 (CEM, Mathews, NC, USA) equipment. The procedure for this digestion consisted in

the digestion of the artichoke samples (0.3 g) with 10 mL HNO₃ 65% and using a microwave program provided by the manufacturer called "Plant material". This program has two stages with a maximum temperature of 200 °C [19].

2.3. Sample Preparation

To quantify ozone concentration, the iodometric method was used according to the APHA standard method [18]. Briefly, in this method, the ozone gas is bubbled into a solution of KI 20 g L⁻¹, and the amount of iodine formed is titrated with a standard solution of Na₂S₂O₃ (0.005 mol L⁻¹) using starch suspension as indicator. The ozone concentration in solution under the optimum experimental conditions was 14 mg L⁻¹ (ozonation time: 10 minutes).

The sample was prepared as follows: 0.5 g were accurately weighed in a glass vessel and then 10 mL of HNO₃ 25% (w/w) and a drop of silicone, to prevent foaming, were added. Afterwards, a glass device (described in 2.1) was placed in the solution and ozone was passed through for 10 minutes. The procedure was carried out at room temperature. After the ozonation process, the obtained suspension was centrifugated for 2 min at 3000 rpm. The centrifugation step can be avoided, but a clear supernatant was consider better than the use of the obtained slurry since the homogeneity of the sample is important for reproducible results when it is injected into the graphite furnace. The supernatant was used for the analytical determinations by ET-AAS. All the sample preparation procedures were carried out in a fume hood. Reagent blanks were measured alongside the samples.

3. Results and Discussion

3.1. Optimization

The influence of two critical variables (concentration of nitric acid and ozonation time) was studied using a three-level central composite design [20].

Table 2 summarizes the experimental design conditions.

Table 2. Central composite experimental design: two variables – three levels

Experiment	Concentration of HNO ₃ (% w/w)	Ozonation time (min)	% R (Cd) (mean %; n=3)	% R (Pb) (mean %; n=3)
1	15	5	70.5	76.1
2	50	5	102.7	85.3
3	25	10	100.2	93.2
4	15	25	89.1	83.2
5	25	25	105.6	83.6

The optimal conditions for the sample preparation procedure were selected evaluating the recovery percentage estimated as $R (\%) = \text{obtained concentration (mg kg}^{-1}) \times 100 / \text{certified/informed concentration (mg kg}^{-1})$ for each experiment. The most simple and rapid experiment with an R (%) statistically equal to 100% (for both elements) was selected as the optimal for the subsequent validation. The results (dry-mass basis) for each experiment are showed in Table 2.

When 5 minutes of time interval is used and the acid concentration varies according to experiments 1 and 2, it can be observed that increasing the concentration of HNO₃ improves the recovery of both metals. For experiment 1

neither the concentration of ozone nor the concentration of acid is enough for quantitative extraction of the studied metals. For experiment 2, the recoveries are better probably due to the higher concentration of HNO₃ used. The best results were obtained in the conditions of the experiment 3, increasing the ozonation time to 10 minutes with a concentration of 25% of HNO₃. These results show that increasing the time of ozonation has influence on the process improving recoveries of both metals.

The variation of ozone concentration in water (in absence of other oxidant agents), was determined changing the time that the gas is bubbled in the solution and a linear relationship was observed up to 25 minutes. After this time, there was not more variation; this means that the maximum concentration was reached under the operative conditions of the equipment (saturation). This can be the cause of the results in experiments 4 and 5, compared with experiment 3, where no improvement was observed by increasing time or the acid concentration. The recoveries even decreased in these experiments.

Once the process was completed, the obtained suspension was centrifuged and the supernatant was used for the determination of Cd and Pb by direct calibration with aqueous standards. The entire process takes only 12 minutes.

This simple procedure does not require drastic conditions of sample preparation. It also uses an economical and easy to maintain equipment. The ozone generator costs USD 2500 in the region.

3.2. Figures of Merit

The validation was carried out using the experimental conditions described in the experiment 3.

For the evaluation of linearity, a blank and 3 standard solutions in the range 0.3 - 4 µg L⁻¹ for Cd and 2-50 µg L⁻¹ for Pb were measured (n =3) and the results were plotted as a function of the concentration. Linearity of the resulting curves was confirmed by visual inspection of the plot and analysis of residuals. Detection (LD, 3s) and quantification (LQ, 10s) limits were estimated by measuring the dispersion of the blank signal (n=10) and referring the measurements to the calibration curve. The LD/LQ presented in Table 3 corresponds to 0.002 mg kg⁻¹(Cd)/0.01 mg kg⁻¹ (Pb) and 0.007 mg kg⁻¹ (Cd)/0.03 mg kg⁻¹ (Pb) respectively expressed on spinach leaves (dry- mass basis).

Analytical repeatability, expressed as relative standard deviation (RSD (%)), for the analysis of the CRM (n = 5) was 5.7% for Cd and 9.1% for Pb. The figures of merit are summarized in Table 3.

Table 3. Analytical figures of merit

	Result	
	Cd	Pb
Linearity	Up to 4.0 µg L ⁻¹ (r ² = 0.998)	Up to 50.0 µg L ⁻¹ (r ² = 0.998)
LD (3σ; n= 10)*	0.09 µg L ⁻¹	0.6 µ L ⁻¹
LQ (10 σ; n= 10)*	0.3 µg L ⁻¹	1.9 µ L ⁻¹
Precision (RSD %; n=5)	5.7	9.1

* Aqueous solution

As it is presented in Table 4, all the experimental t - values were below the theoretical t (0.05, 4) 2.78. Thus it may be concluded that the concentrations obtained with the proposed method do not differ significantly from the

certified value/informed value, and the trueness of the method is ensured for these samples.

Table 4. Metal contents found in the certified reference material (NIST 1570 a) and comparison with reference value by Student's *t*-test

	Certified value	Proposed Method (mean \pm s; n=5)	% R	<i>t</i> -experimental
Cd (mg kg ⁻¹)	2.876 \pm 0.058	2.82 \pm 0.16	97.6	-0.787
Pb (mg kg ⁻¹)	0.2 *	0.197 \pm 0.018	98.3	-0.415

*NIST informed value; s: standard deviation; *t* (0.05, 4) = 2.78 [21].

It is worth mentioning that for Cd the certified value is 10 times higher than the allowed by the regulations, so it is expected that the dilution factor will be different for other samples. According to the information provided by NIST, the CRM consists of spinach leaves. Although it was purchased with the objective of evaluating the reliability of analytical methods, to be a natural material contains an impressive amount of Cd.

This method was further applied to determine Cd and Pb in artichoke leaves. The MERCOSUR regulation allows a maximum of 0.4 mg kg⁻¹ for Cd and 0.6 mg kg⁻¹ for vegetables to prepare infusions (teas). The results were: (0,174 \pm 0,022) mg kg⁻¹ for Cd and (0,290 \pm 0,030) mg kg⁻¹ for Pb expressed as (mean \pm s), n=3, in dry-mass basis. These values were in good agreement compared with those obtained performing microwave digestion (0.185 and 0.319 mg kg⁻¹ respectively).

These results show that artichoke leaves comply with the regulation and therefore can be used to prepare infusions without health risks.

These are very promising results and encourage further investigation on the possible mechanisms involved. Probably a synergetic effect due to the use of an oxidizing acid in combination with an oxidizing agent such as ozone, and a very efficient agitation due to the bubbling of the gas are responsible for this success.

In published studies, the use of ozone is combined with other sources of energy such as ultrasound or UV, in this work the method only uses ozone, and the entire process was carried out at room temperature.

This method can be postulated as an alternative for sample preparation since the figures of merit are adequate to monitor compliance with the international regulations and food control, for both contaminants in spinach and artichoke leaves.

4. Conclusions

A novel method for the sample preparation of spinach and artichoke leaves for the determination of Cd and Pb using ET-AAS was optimized and validated.

This procedure proved to be adequate for the purpose of control of these inorganic contaminants in spinach leaves according to the regional regulations.

The method is simple, fast and in good agreement with Green Chemistry, with the novelty of the use of an ozonation procedure for sample preparation.

Acknowledgement

Agencia Nacional de Investigación e Innovación – ANII (Grant: POS_NAC_2013_1_11407), PEDECIBA-Química and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC).

Competing Interests

The authors have no competing interests.

References

- [1] Technical Regulation "Reglamento técnico MERCOSUR" (DEROGACIÓN DE LAS RES GMC N° 102/94 y N° 35/96) MERCOSUR/GMC/RES. N° 12/11 Available: http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_12-11.pdf [Accessed, May 18, 2015].
- [2] Nobrega, J. A., Trevizan, L.C., Araujo, G.C.L. & Nogueira, A.R.A. "Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. A review". *Spectrochim. Acta Part B*, 57, 1855-1876. 2002.
- [3] Bendicho, C., de la Calle, I., Pena, F., Costas, M., Cabaleiro, N. & Lavilla, I. "Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry". *TrAC*. 31, 50-60. 2012
- [4] Capelo, J. L., Pedro, H. A. & Mota A. M. "Ozone treatment for mercury determination in white wines." *Talanta*, 61, 485-491. 2003.
- [5] Capelo, J. L., Maduro, C. & Mota, A. M. "Advanced oxidation process for degradation of organomercurials: determination of inorganic and total mercury in urine by FI-CV-AAS". *J.Anal. At. Spectrom.* 19, 414-416. 2003.
- [6] Kim, M. J. & Nriagu, J. "Oxidation of arsenite in groundwater using ozone and oxygen". *Sci. Total Environ.* 247, 71-79. 2000.
- [7] Audenert, W.T.M., Vandierendonck, D., Van Hulle, S.W.H. & Nopens, I. "Comparision of ozone and HO. Induced conversion of effluent organic matter (EfOM) using ozonation and UV/H2O2 treatment". *Water Res.* 47, 2387-2398. 2013.
- [8] Khuntia, S., Majumder, S.K. & Ghosh, P. "Oxidation of As (III) to As (V) using ozone microbubbles". *Chemosphere*, 97, 120-124. 2014.
- [9] Domenjoud, B., Tatari, C., Esplugas, S. & Baig, S. "Ozone-Based Processes Applied to Municipal Secondary Effluents". *Ozone-Sci.Eng.* 33, 243-249. 2011
- [10] Sponza, D. T. & Oztekin, R. "Effect of Ultrasonic Irradiation on the Treatment of Poly-Aromatic Substances (PAHs) from a Petrochemical Industry Wastewater". *Ozone-Sci.Eng.* 33, 194-210. 2011.
- [11] Whangchai, K., Uthairutra, J., Phiyanalimat, S., Pengphol, S. & Nomura, N. "Effect of ozone treatment on the reduction of Chlorpyrifos residues in fresh lychee fruits." *Ozone-Sci. Eng.* 33, 232-235. 2011.
- [12] Quero-Pastor, M., Valenzuela, A., Quiroga, J. M. & Acevedo, A. "Degradation of drugs in water with advanced oxidation processes and ozone". *J. Environ. Manage.* 137, 197-203. 2014.
- [13] Matusiewicz, H. & Mroczkowska, M. "Hydride generation from slurry samples after ultrasonication and ozonation for direct determination of trace amounts of As(III) and total inorganic arsenic by their in situ trapping followed by graphite furnace atomic absorption spectrometry". *J. Anal. At. Spectrom.* 18, 751-761. 2003.
- [14] Capelo, J.L., Maduro, C. & Mota, A.M. "Evaluation of focused ultrasound and ozonolysis as sample treatment for direct determination of mercury by FI-CV-AAS. Optimization of parameters by full factorial design". *Ultrason. Sonochem.* 13, 98-106. 2006.
- [15] Pistón, M., Machado, I., Branco, C.S, Cesio, V., Heinzen, H., Ribeiro, D., Fernandes, E., Chisté, R.C. & Freitas, M. "Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS". *Food Res. Int.*, 64, 150-156. 2014.

- [16] Arpadjan, S., Celik, G., Taskesen, S. & Gücer, S. "Arsenic, cadmium and lead in medicinal herbs and their fractionation." *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2871-2875. 2008.
- [17] National Institute of Standards and Technology (NIST) Certificate of Analysis Standard Reference Material® 1570a. Trace elements in spinach leaves. Available: https://www-s.nist.gov/srmors/view_cert.cfm?srm=1570a [Accessed May 18, 2015].
- [18] APHA; AWWA; WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington: American Public Health Association. 2005.
- [19] Santos, J., Oliva-Teles, M.T., Delerue-Matos, C., Oliveira M.B.P.P. "Multi-elemental analysis of ready-to-eat "baby leaf" vegetables using microwave digestion and high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry". *Food Chemistry*, 151, 311-316. 2014.
- [20] Massart, D. L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., de Jong, S., Lewi, P.J. & Smeyers-Verbeke, J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Amsterdam: Elsevier Science, 1997, Chapter 24.
- [21] Miller, J. N. & Miller, J.C. (1993). *Estadística para Química Analítica*. (2nd ed.), Addison-Wesley Iberoamerican S.A. Wilmington, 1993.



Comparison of different sample treatments for the determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*)



Ignacio Machado^a, Isabel Dol^a, Esteban Rodríguez-Arce^a, María Verónica Cesio^b, Mariela Pistón^{a,*}

^a Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad de la República (UdelaR), Av. Gral. Flores 2124, P.O. Box 1157, 11800 Montevideo, Uruguay

^b Pharmacognosy and Natural Products, Faculty of Chemistry, Universidad de la República (UdelaR), Av. Gral. Flores 2124, P.O. Box 1157, 11800 Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 March 2016

Received in revised form 16 April 2016

Accepted 18 April 2016

Available online 20 April 2016

Keywords:

Globe artichoke

Ultrasound

Ozonation

Sample preparation

ABSTRACT

New and environmentally friendly procedures for the determination of nutritious and harmful elements in highly consumed foodstuffs such as vegetables are needed. Three accurate and efficient methods for the extraction of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke were optimized and validated. The sample preparation methodologies developed consisted of extraction with diluted acid assisted by either an ultrasonic probe or an ultrasonic bath, and an ozone-based treatment of the acid solution. The elements were determined by flame atomic absorption spectrometry, electrothermal atomic absorption spectrometry and hydride generation atomic absorption spectrometry. Experimental conditions were optimized by means of multivariate experiments. A comparative study using Student's *t*-test to establish whether there was a difference between using ultrasound (probe and bath) or ozone was performed. The results showed that the three methods were adequate for the extraction of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke. Trueness was verified by analysis ($n = 6$) of a certified reference material and by performing a total digestion with a microwave-assisted procedure. At the 95% significance level, results were statistically equivalent to the certified values and to those obtained by total digestion for all the elements. Analytical precision expressed as relative standard deviation (RSD (%), $n = 6$) was less than 10% in all cases. Samples of globe artichoke from a Uruguayan family farmer were analyzed. Results showed that globe artichoke fruits and leaves are a promising source of Cu and Ni and particularly they are a good source of Zn. Regarding food safety monitoring, the proposed methods can be easily implemented in laboratories for routine analysis of As, Cd and Pb in these crops, with the advantage of being straightforward and in good agreement with Green Chemistry.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*) is a perennial plant cultivated in the Mediterranean and American region for its edible young flower heads. Infusions (teas) made with artichoke leaves are commonly consumed for liver and digestive conditions and recently, they became popular due to their antioxidant and slimming properties [1].

Plants can be a source of mineral components and trace elements essential to life, as well as some undesirable substances due to exposure to the environment. It could be expected that the geographical origin, growth media, nutrients, agro-input, harvesting time and soil represent the main sources of potentially inorganic toxic contaminants in plants, especially in their leaves. Other sources may include pesticides and fertilizers [2].

In the MERCOSUR region (acronym of the Southern Common Market in Spanish), there is a technical regulation on maximum limits of inorganic contaminants in food. This regulation establishes criteria for food commercialization between member countries and those imported from elsewhere. For edible vegetables, the maximum limits are for arsenic (As) and lead (Pb) 0.3 mg kg^{-1} and for cadmium (Cd) 0.2 mg kg^{-1} and for vegetables for infusions 0.6 mg kg^{-1} for As and Pb and 0.4 mg kg^{-1} for Cd [3]. This differentiation is very important, especially when it comes to artichoke, because its fruits must be considered as edible vegetables, but its leaves must be considered as vegetables for infusions, since they are not eaten; only consumed in teas.

Official methods for analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) that are still used require concentrated acids and high temperature for matrix digestion, which is not in agreement with the principles of Green Chemistry [4].

Development or selection of appropriate analytical methodologies must consider the trueness and precision of measurements, available facilities and equipment, simplicity of procedure and

* Corresponding author.

E-mail address: mpiston@fq.edu.uy (M. Pistón).

rapidity of determination. To achieve this goal, it requires investigating different alternatives for sample preparation that should allow the quantitative extraction of the analytes from the matrix. The new trend in analytical chemistry is to avoid drastic treatments and to look for efficient extraction procedures under mild conditions.

Ultrasound-assisted sample preparation is recognized as an efficient technique that significantly reduces working times and acid consumption [5–11]. Microwave-assisted extraction (MAE) is another strategy of sample preparation that showed to be very efficient. This methodology has the advantage of working with closed vessels, which reduces the risk of contamination [12,13].

On the other hand, oxidation processes involving *in situ* generation of oxidant chemical species have been reported as effective emerging technologies to accelerate the degradation of organic matter, at room temperature in certain matrices. These processes, commonly called “advanced oxidation processes” (AOPs), generally use ozone combined with UV radiation [14,15]. Several authors reported that ozone gas (combined with the use of ultrasound and/or UV radiation) can be used for the sample preparation of matrices containing organic matter for the determination of metals and semimetals (ozonation and sonication) [16–19].

The aim of the present work is to evaluate food safety of globe artichoke, in terms of total As, Cd and Pb contents, using simple and rapid analytical methodologies, and at the same time to study some nutraceutical properties related to the content of some essential elements such as copper (Cu), nickel (Ni) and zinc (Zn). For this purpose, a simple ultrasound-assisted method and an ozone-based procedure were optimized and validated. In addition, a comparative study was performed by applying the proposed methods using two different ultrasonic devices (probe and bath). The results were compared with those obtained with MAE as reference method, a certified reference vegetable material was analyzed using the proposed methods, and the obtained values checked for accuracy.

Globe artichoke samples from a Uruguayan family farmer in Montevideo (Uruguay) were analyzed.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Ultrapure water of 18.2 MΩ cm resistivity (ASTM Type I) was obtained from a Millipore® (São Paulo, Brazil) Simplicity 185 purifier.

A 1000 mg L⁻¹ Zn standard solution (stock) was prepared from Zn metal (Aldrich, 99.99%) dissolved in a minimum volume of hydrochloric acid (HCl) 1 + 1 (v + v) and made up to volume with ultrapure water. Commercial standard solutions 1000 mg L⁻¹ of As (V), Cd, Cu, Ni and Pb were used (Merck, Germany). Calibration solutions were prepared by dilution of the corresponding stock solution, using 0.1% v/v nitric acid (HNO₃) prepared from concentrated HNO₃ (67% v/v, Merck, Germany).

Stock solutions of Pd(NO₃)₂ (Merck, Germany) and Mg(NO₃)₂ (Aldrich Chemical Company, USA) containing 10,000 and 20,000 mg L⁻¹ respectively, were used to prepare the chemical matrix modifier for Cd and Pb determination. Stock solution of Nb(NO₃)₅ (Sigma-Aldrich, Switzerland) 1000 mg L⁻¹ was used for the preparation of permanent modifier for As determination by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). Dilute HCl prepared from concentrated HCl (37% v/v, Merck, Germany), NaBH₄ 99.99% (Sigma-Aldrich, USA) and NaOH (Merck, Germany) were used for As determination by hydride generation atomic absorption spectrometry (HGAAS). All other reagents were of analytical reagent grade.

All glassware was soaked overnight in 10% v/v HNO₃ and then rinsed exhaustively with ultrapure water.

2.2. Analytical determinations

Analytical determinations of Cu and Zn were performed by flame atomic absorption atomic spectrometry (FAAS) using a Perkin Elmer AAnalyst 200 spectrometer (Norwalk, CT, USA) fitted with a 10 cm burner and operated at the 324.75 nm (Cu) and 213.86 nm (Zn) analytical lines. Hollow cathode lamps (Photron, Narre Warren, Australia) were operated as recommended by the manufacturer. The flame composition was acetylene (2.5 L min⁻¹) and air (10.0 L min⁻¹).

Arsenic (when ozonation procedure was used), Cd, Ni and Pb were determined by ETAAS using a Thermo Scientific iCE 3500 spectrometer (Cambridge, United Kingdom) equipped with a graphite furnace atomizer, auto-sampler and employing Zeeman-based correction. A transversely heated graphite tube furnace module (GFS35Z), and an auto sampler module (GFS33) both from Thermo Fisher Scientific, were used. Hollow cathode lamps (Photron, Pty. Ltd., Victoria, Australia), operated at the 193.7 nm (As), 228.8 nm (Cd), 232.0 nm (Ni) and 283.3 nm (Pb) analytical lines were used. The spectrometer was controlled with specific software SOLAAR (Thermo Scientific, Cambridge, United Kingdom). Integrated absorbance (peak-area) was used for signal evaluation and quantification. All the determinations were performed using extended lifetime graphite tubes (Thermo Scientific). Argon 99.998% (Linde, Montevideo, Uruguay) was used as the purge and protective gas. The graphite furnace heating programs used for the analytical determinations are shown in Table 1 where the optimized conditions are described for each element.

Injection volume was 20 μL. Chemical matrix modifier used was: 10 μL of solution containing 5 μg of Pd(NO₃)₂ and 3 μg of Mg(NO₃)₂. For Cd two drying steps were required using conditions presented in Table 1 [20].

For As determination, graphite tubes were treated with niobium [21] by pipetting 50 μL of a 1000 mg L⁻¹ Nb(NO₃)₅ solution and submitting the tube to the following temperature program: [temperature/ramp time/hold time]: drying (100 °C/10 s/60 s), atomization (2700 °C/0 s/5 s). The entire procedure was repeated six times in order to obtain 300 μg of the permanent modifier on the tube. Then the temperature program shown in Table 1 was performed, in this case the injection volume was 30 μL.

For Ni determination, no chemical modifier was needed.

When ultrasound-assisted methods were used, arsenic determinations were carried out by HGAAS. For these analytical determinations, a flame atomic absorption spectrometer (AAnalyst 200, Perkin Elmer) coupled to a MHS® system (Perkin Elmer) was used. Operating conditions were wavelength 193.7 nm, lamp current 400 mA, slit width 0.5 nm and acetylene-air flame. Nitrogen (99.99%) was used as the carrier gas (flow rate of 60 mL min⁻¹). The atomizer consisted of a quartz T-tube cell with a path-length of 165 mm and a diameter of 12 mm heated to approximately 900 °C.

Table 1
ETAAS optimized temperature programs for the determination of As, Cd, Ni and Pb.

Stage	Temperature (°C)	Ramp rate (°C s ⁻¹)	Hold time (s)	Ar gas flow rate (L min ⁻¹)
Drying 1	100	10 ^{a,c,d} /5 ^b	30	0.2
Drying 2 ^b	140	15	20	0.2
Pyrolysis	1200 ^a /350 ^b /1000 ^{c,d}	15 ^a /10 ^b /150 ^{c,d}	15 ^a /0 ^b /20 ^{c,d}	0.2
Atomization	2200 ^a /1500 ^b /2500 ^c / 1800 ^d	0	3	0
Cleaning	2600	0	3	0.2

^a As.

^b Cd.

^c Ni.

^d Pb.

2.3. Samples

Globe artichoke leaves (2 kg) and fruits (10 kg) were collected in Montevideo, Uruguay, and they were identified as *C. cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*. A voucher specimen (MVFO 4399) has been deposited in the Herbarium of the Cathedra of Botany of the Faculty of Chemistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. This is the largest artichoke crop in Uruguay and supplies the majority of the local commercial market.

Samples were chopped and dried in an oven with forced air circulation (70 °C) and stored at 20 °C, in darkness.

A certified reference material (CRM) NIST 1570a was analyzed for the optimization and for the evaluation of trueness and precision of the proposed methods. This material consists of U.S. Grade A chopped frozen spinach.

Before sample preparation, the dry leaves and fruits were milled in order to obtain a particle size similar to that of the CRM.

2.4. Sample preparation

For sample preparation, the following ultrasonic devices were used: a Cole-Parmer 8893 bath (Ultrasonic Cleaners) 47-kHz; 230 VAC and an ultrasonic homogenizer (Sonic s vibracell) 750-Watt; 20-kHz; 230 VAC equipped with a 13-mm titanium alloy probe.

For ozonation, a commercial glass (borosilicate 3.3, Pyrex®) midget impinger, with fritted nozzle, was used. Fig. 1 shows a scheme of the complete system. Ozone was generated from oxygen (99.5%, Linde, Montevideo, Uruguay) with a corona discharge ozone generator (OZOX – OG 75-A, Montevideo, Uruguay) with an oxygen flow rate of 7 L min⁻¹. Ozone passes through the porous glass membrane situated at the end (pore size: 200 μm) into the solution with the sample. The system was completed with silicone tubes and at the end a flask with a Na₂S₂O₅ solution, 5% (w/v) acts as a trap for the excess of ozone gas generated in the process thus avoiding contamination of the environment. Thus, the proposed system is totally closed and safe.

For microwave-assisted digestion, a microwave oven (CEM, Mars 6) 400–1800 W provided with 12 EasyPrep Plus® vessels was employed.

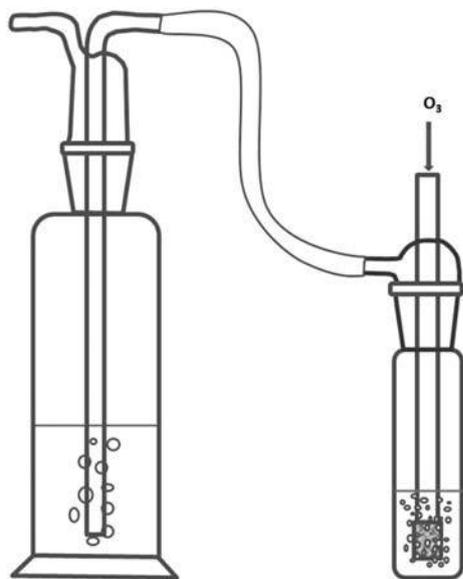


Fig. 1. Closed system for ozone-based procedure. On the right a commercial glass (borosilicate 3.3, Pyrex®) midget impinger 25 mL tube, with fritted nozzle, on the left a flask containing a Na₂S₂O₅ solution to neutralize the excess of ozone gas.

2.4.1. Ultrasound-assisted method using a probe (method A)

The optimized method was 0.5 g of the sample accurately weighed in a 50 mL amber flask and then 10.00 mL of HNO₃ 25% (w/w) were added. Then the ultrasound probe was immersed in the sample for 10 min (35% sonication amplitude). The obtained suspension was centrifuged for 3 min at 3000 rpm and the supernatant used for the analytical determinations. Reagent blanks were also run.

2.4.2. Ultrasound-assisted method using a bath (method B)

The optimized method was 0.5 g of the sample accurately weighed in a 50 mL amber flask and then 10.00 mL of HNO₃ 25% (w/w) were added. The vessel was put into the ultrasonic bath for 25 min. The obtained suspension was centrifuged for 3 min at 3000 rpm and the supernatant used for the analytical determinations. Reagent blanks were also run. Up to eight samples can be processed simultaneously in a laboratory bath with 9.5 L of capacity.

For As determination performing methods A and B 10.00 mL of HCl 50% (w/w) was used instead of HNO₃. Then the ultrasound probe was immersed in the suspension for 10 min (35% sonication amplitude) for method A and the vessel was put into the ultrasonic bath for 60 min for method B. Aliquots of 5.00 mL of the supernatant were treated with 0.5 mL of 20% (w/v) KI as pre-reductant for 1 h. Then the solutions were put into the reaction vessel of the instrument where 2% (w/v) NaBH₄ (prepared in 1% (w/v) NaOH) was added to form the hydride.

2.4.3. Ozone-based method (method C)

The optimized method was 0.5 g of the sample was accurately weighed in a midget impinger 25 mL tube and then 10.00 mL of HNO₃ 25% (w/w) with a drop of silicone added, to prevent foaming. Afterwards, the impinger was closed (the two pieces of glass were fitted together using a 20/40 ground joint as shown in Fig. 1) and ozone was passed through for 10 min. The procedure was carried out at room temperature. After ozonation, the obtained suspension was centrifuged for 3 min at 3000 rpm and the supernatant was used for the analytical determinations. Reagent blanks were measured alongside the samples.

2.4.4. Microwave-assisted method (method D)

For this method 0.5 g of sample was accurately weighted, and 10.00 mL of HNO₃ was added into each EasyPrep Plus® vessel. The program was: power 400–1800 W, 15 min ramp time until 200 °C, 10 min hold at 200 °C, and 500 psi pressure. Reagent blanks were also run. This was considered a reference method (total digestion) for the determinations in artichoke leaves and fruits.

2.5. Optimization

The influence of two variables (concentration of acid and sonication/ozonation time) was studied for methods A, B and C, by means of a three-level central composite design using a CRM (NIST 1570a – Spinach Leaves) [22]. These experiments were carried out for As, Cu, Ni and Zn determination. Table 2 summarizes the performed experiments. All the experiments were run in triplicate. Similar experiments for Cd and Pb were performed in a previous work [23].

Table 2
Central composite design for the proposed methods.

Experiment	Concentration of HNO ₃ or HCl ^b (% w/w)	Sonication or ozonation time (min)
1	15 (ABC)	5 (AC)/15(B)/30(B) ^a
2	15 (ABC)	20 (AC)/35(B)/60(B) ^a
3	25 (ABC)	10 (AC)/25(B)/45(B) ^a
4	50 (ABC)	5 (AC)/15(B)/30(B) ^a
5	50 (ABC)	10 AC/35B/60 (B) ^a

(A): method A; (B): method B and (C): method C.

^a Sonication times for As determination.

^b HCl only for As.

Once the variables were optimized, the validation was performed according to the recommendations of Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods [24].

3. Results and discussion

3.1. Optimization

All the optimization experiments were performed using the CRM. Table 3 summarizes the obtained results using multivariate experiments for methods A, B and C respectively.

The sample amount and volume of the acid extraction solution were selected considering the concentration ranges of the different elements informed in the CRM certificate. With this criterion, all analytes were in an adequate level for a simultaneous treatment. A mass of 0.5 g and a volume of 10 mL of acid solution were the best compromise obtained for the determination of all the elements under study in the analyzed samples in one single extraction. Depending on the element, some of them required further dilution in 0.1% v/v HNO₃ (Cd and Ni) or ultra-pure water (Zn).

The optimal conditions for sample preparation described in Sections 2.4.1, 2.4.2 and 2.4.3 were selected evaluating the recovery percentage estimated as $R(\%) = \text{obtained concentration (mg k}^{-1}) \times 100 / \text{certified concentration (mg kg}^{-1})$ for each experiment. The simplest and fastest method with an R (%) statistically equal to 100% was selected for subsequent validation. All the results were expressed on a dry basis.

For methods A, B and C, experiments 1 and 2 were not adequate for the determination of Cu, Ni and Zn since the recoveries were low. This shows that the acid concentration had an influence in the extraction, and the use of HNO₃ 15% (w/w) was not enough for a quantitative extraction. Experiment 3 had the best performance for Cu, Ni and Zn, and was the methodology with the minimum analysis time. No additional significant improvement was observed in experiments 4 and 5. According to these results, conditions of experiment 3 were selected for validation (acid concentration of 25% (w/w) for the three methods and extraction time set at 10 min for methods A and C and 25 min for method B). The difference between the time for methods A and B is reasonable since increased power output of ultrasonic probes provides more energy in the sinus of the suspension in the vessel and increases the temperature. For method A, the final temperature was 80 °C.

Vegetables are very complex matrices, so the use of ultrasound energy or an ozone stream plus the addition of a dilute acid is required for the extraction of all the studied elements. The three alternative methods described show that drastic treatments and therefore not environmentally friendly are not justified.

Regarding As determination, experiment 5 was the best for methods A and B for the same reasons stated before (Table 3). For method C, the conditions for experiment 3 were selected since it has an adequate recovery and all the studied elements can be determined under the same conditions.

However, between ultrasound-assisted methods (A and B) some differences appeared. None of the experiments was adequate for the determination of As using ETAAS (recoveries below 20%). Therefore, for ultrasound-assisted methods, it was decided to change to HGAAS technique and HCl was selected for sample preparation instead of HNO₃. HCl is not an oxidant reagent and considering that the hydride reaction with

NaBH₄ requires an acid medium this one was better for the reduction step. The MHS commercial systems (PerkinElmer) for hydride generation do not provide on line addition of acid as other commercial systems such as continuous flow injection manifold (FIAS).

The use of HCl 25% (w/w) was not enough for a quantitative extraction. To yield adequate recoveries using the CRM an acid concentration of 50% (w/w) and time of 10 min of treatment for method A and 60 min for method B were needed.

3.2. Method performance and validation

Once the optimal experimental conditions were established for the three methods, their performance was evaluated and compared using Student's *t*-test with the aim of choosing the best [25]. Table 4 shows the results of the statistical comparison. All the experimental *t* values were below the theoretical *t* (0.05, 5) 2.57. Thus, it may be concluded that at the 95% significance level, the concentrations obtained using either method A or B or C do not differ significantly from the certified value so trueness was ensured. In addition, it can be observed that the results between methods do not differ significantly.

Although all of them were suitable for the proposed application, some advantages for method B (using an ultrasonic bath) can be highlighted. When an ultrasound probe is employed, only one sample at a time can be prepared, and the contamination risk is high because the probe is immersed in the solution. On the other hand, when an ultrasonic bath is used, several samples can be prepared at the same time (it depends on the size of the bath) despite it being more time consuming. Considering that for a common laboratory bath at least eight samples can be processed simultaneously, the time can be compensated. In addition, when a bath is employed, the cross-contamination risk is minimized.

Ozonation (method C) has the advantage that several samples can be prepared at the same time, using an adequate glass device that separates the ozone stream into different pathways. Our laboratory counts with a glass device with four pathways, so four samples can be prepared at a time coupling systems as shown in Fig. 1 in tandem. The success in this procedure may be probably a synergetic effect due to the use of an oxidizing acid in combination with an oxidizing agent such as ozone, and a very efficient agitation due to the bubbling of the gas. The use of ozone combined with other sources of energy such as ultrasound or UV has been reported in other studies [14–19], but in this work, only ozone was used, and the entire process was carried out at room temperature with success.

A disadvantage of method C is the risk of cross-contamination because the glass device is immersed in the solution, the same situation occurs when an ultrasound probe is used (method A).

Ozone-based procedures are novel approaches with promising results, which could be applicable to other complex matrices and in good agreement with the principles of the Green Chemistry, since the designed device is a closed system and the ozone that does not react is neutralized in a trap. In addition, if method C is selected for sample preparation all the studied elements can be determined using the same conditions and the use of the HGAAS technique is not necessary. This saves time in the overall analysis, avoids the use of HCl and reduces costs.

Table 3

Results corresponding to the optimization experiments for the proposed method.

Experiment	% R (As)	% R (Cu)	% R (Ni)	% R (Zn)
1	<70 (AC)/<60(B)	<80(ABC)	<80(AB)/<70(C)	<80(ABC)
2	<70(AB)/<80(C)	<90(A)/<80(BC)	<80(ABC)	<90(AB)/<80(C)
3	<80(A)/<70(B)/99.2(C)	100.1(A)/98.7(B)/99.3(C)	99.5(A)/98.9(B)/100.1(C)	100.9(A)/99.5(B)/97.9(C)
4	<90(A)/<80(B)/100.1(C)	101.2(A)/100.3(B)/101.2(C)	99.7(A)/99.2(B)/99.8(C)	99.8(A)/99.7(B)/99.5(C)
5	99.5(AC)/99.0(B)	100.5(A)/99.2(B)/100.5(C)	100.3(AC)/99.5(B)	101.9(A)/101.3(B)/98.6(C)

(A): method A; (B): method B and (C): method C. Results expressed as mean recovery percentage (%R) n = 3.

Table 4
Element contents found in CRM (NIST 1570a) and comparison with reference value by Student's *t*-test.

	Certified value	Method A	Method B	Method C	<i>t</i> -experimental
As (mg kg ⁻¹)	0.068 ± 0.012	0.068 ± 0.004	0.067 ± 0.006	0.067 ± 0.005	(A) -0.37 (B) -0.29 (C) -0.49
Cd (mg kg ⁻¹)	2.876 ± 0.058	2.85 ± 0.14	2.80 ± 0.16	2.82 ± 0.17	(A) -0.45 (B) -1.16 (C) -0.81
Cu (mg kg ⁻¹)	12.22 ± 0.86	12.17 ± 0.27	12.09 ± 0.35	12.25 ± 0.31	(A) -0.45 (B) 0.91 (C) 0.24
Ni (mg kg ⁻¹)	2.142 ± 0.058	2.147 ± 0.090	2.132 ± 0.098	2.154 ± 0.075	(A) 0.14 (B) -0.25 (C) 0.39
Pb (mg kg ⁻¹)	0.20 ^a	0.201 ± 0.15	0.195 ± 0.016	0.197 ± 0.018	(A) 0.16 (B) -0.77 (C) -0.42
Zn (mg kg ⁻¹)	82.3 ± 3.9	82.9 ± 3.5	81.7 ± 4.8	83.1 ± 3.9	(A) 0.42 (B) -0.31 (C) 0.50

Results expressed as mean ± standard deviation, n = 6 (dry basis); *t* (0.05, 5) = 2.57 [25].

^a Informed value.

Considering the novel approach of ozone-based sample treatments, and that it presented adequate results for all the elements in the same experimental conditions, it was chosen to be applied for the determination of these elements in real samples.

The main figures of merit obtained for each element are listed in Table 5. The correlation coefficient of the linear regression for the calibration curves for all elements was greater than 0.99. Detection limits were expressed as the element content corresponding to three times the standard deviation of a blank (3 s) in dry samples.

Detection limits for As, Cd and Pb were appropriate for monitoring food safety since they are far enough below the legal limits allowed for these vegetables.

Precision as RSD (%) is informed for the three methods since it is an important parameter to decide which had the best performance. Ozonation method has good precision according to the Horwitz theory about variability at trace levels (coefficients of variation less than 45%) [26].

Ozonation method was applied to analyze real samples of globe artichoke leaves and fruits. Since no certified reference material was available for these samples, the obtained results were compared with those obtained performing a microwave-assisted digestion as a reference method (method D).

Observing the results presented in Table 6 it can be noticed that the concentration levels of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke obtained using ozonation were equivalent to those obtained by means of total microwave-assisted digestion. Therefore, the proposed method is also adequate for globe artichoke leaf and fruit analyses.

To the best of our knowledge, a comparison of methods for routine analysis and quality control (without external heat, using diluted acid and ozone) for extraction and subsequent determination of As, Cu, Cd, Ni, Pb and Zn in globe artichoke as complete as that described in this work was not reported before.

3.3. Trace element contents in globe artichoke leaf and fruit samples

Even though the samples contained quantifiable levels of As, Cd and Pb (Table 6), both globe artichoke leaves and fruits comply with the MERCOSUR regulation (maximum limits for vegetables for teas and edible vegetables respectively) and therefore can be used to prepare infusions and foods respectively, without health risks. Moreover, concentrations do not exceed the limits of 1 mg kg⁻¹ As, 0.3 mg kg⁻¹ Cd and 10 mg kg⁻¹ Pb recommended by WHO for raw medicinal plants [27].

Regarding the essential trace element content of Cu and Zn, the concentration values obtained in globe artichoke fruits are in agreement with those reported by Pandino et al. [28]. In addition, the obtained values for Cu and Ni are similar to those reported by Ferré-Huguet et al. [29].

Plant uptake of metals and metalloids is either a passive or an active process. Vascular plants, as globe artichoke, take up metals from their roots, transpiration through stomata on the leaf surface, and deposition on the surface of leaves [30]. The uptake, translocation, transformation and accumulation of metallic species in crop plants are extremely

Table 5
Analytical figures of merit.

Parameter	Element					
	As	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
Linearity (mg L ⁻¹)	Up to 0.020	Up to 0.004	Up to 4.0	Up to 0.10	Up to 0.050	Up to 1.0
LD (3σ; n = 10) (mg kg ⁻¹) ^c	0.007 ^a /0.008 ^b	0.002	0.16	0.02	0.012	0.08
LQ (10σ; n = 10) (mg kg ⁻¹) ^c	0.022 ^a /0.024 ^b	0.006	0.54	0.05	0.038	0.26
Precision (RSD %, n = 6)	A: 5.9	A: 4.8	A: 2.2	A: 4.2	A: 7.5	A: 4.2
	B: 8.9	B: 5.8	B: 2.9	B: 4.6	B: 8.3	B: 5.9
	C: 8.3	C: 5.7	C: 2.5	C: 3.5	C: 9.1	C: 4.7

A, B and C correspond to methods A, B and C respectively under optimized conditions using a certified reference material.

^a HGAAS technique.

^b ETAAS technique.

^c Dry basis.

Table 6
Element contents in globe artichoke leaves and fruits.

Element (mg kg ⁻¹)	Leaves		Fruits	
	Method C	Method D	Method C	Method D
As	0.061 ± 0.007	0.061 ± 0.005	0.025 ± 0.005	0.026 ± 0.004
Cd	0.17 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01
Cu	9.1 ± 0.5	9.8 ± 0.1	6.2 ± 0.8	6.5 ± 0.2
Ni	1.7 ± 0.1	1.9 ± 0.2	2.6 ± 0.3	2.6 ± 0.1
Pb	0.29 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.061 ± 0.009	0.065 ± 0.006
Zn	94.7 ± 0.9	95.3 ± 0.8	33.6 ± 1.5	34.5 ± 0.9

Results expressed as: mean value ± standard deviation, n = 6 (dry basis).

important for human health. The increase of inorganic trace elements content shown in Table 6 followed the order leaves > fruits (except for Ni). This is in agreement with the literature, since the majority of plants retain higher amounts of metals in their roots than in other tissues. In general, leaf tissues have the next highest concentrations, followed by stems and fruits. Partitioning of inorganic trace elements in different parts of the plant is a common strategy to prevent toxicity to the above-ground parts, which is due to the elements binding with specific ligands [31].

Globe artichoke may be of use as a promising source for covering essential element recommended intake, particularly it could be considered as a good source of Zn. This mineral element with chemopreventive features in cancer usually needs to be ingested from dietary sources. Owing to its concentration, globe artichoke (fruits and infusions) could be highlighted as an alternative to food supplements, which are commonly used to ease deficiencies of this element.

4. Conclusions

Three simple methods for extraction and subsequent determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichokes leaves and fruits were optimized and compared.

Ultrasound-assisted methods and ozone-based procedures for sample preparation were carried out using dilute acid and without the need of external heating, thus being in good agreement with the principles of Green Chemistry. All of them were accurate for the determination of the studied trace elements. The ozone-based procedure was selected for validation since it is a novel approach in sample preparation.

Globe artichoke leaves for infusions and fruits can be a promising source of Cu and Ni and good source of Zn.

Regarding the levels of inorganic contaminants, the concentrations of As, Cd and Pb found in the globe artichoke samples, comply with the regional regulation and therefore can be consumed by humans without health risks. The proposed method can be postulated for monitoring food safety.

Disclosure statement

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgments

The research that gives rise to the results obtained in this work, received support from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII POS_NAC_2013_1_11407), PEDECIBA-Química and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC).

References

[1] M. Pistón, I. Machado, C.S. Branco, V. Cesio, H. Heinzen, D. Ribeiro, E. Fernandes, R.C. Chisté, M. Freitas, Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS, *Food Res. Int.* 64 (2014) 150–156.

[2] A.A. Shaltout, M.S. Abdel-Aal, B. Welz, I.N.B. Castilho, Determination of Cd, Cu, Ni, and Pb in black tea from Saudi Arabia using graphite furnace atomic absorption spectrometry after microwave-assisted acid digestion, *Anal. Lett.* 46 (2013) 2089–2100.

[3] Technical Regulation “Reglamento técnico MERCOSUR”, (DEROGACIÓN DE LAS RES GMC No. 102/94 y No. 35/96) MERCOSUR/GMC/RES. No. 12/11, http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_12-11.pdf (accessed 11.04.16).

[4] Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th ed. Association of Analytical Communities, Gaithersburg, MD, USA, 2000.

[5] K. Ashley, R.N. Andrews, L. Cavazos, M. Demange, Ultrasonic extraction as a sample preparation technique for elemental analysis by atomic spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 1147–1153.

[6] J.L. Capelo, A.M. Mota, Ultrasonication for analytical chemistry, *Curr. Anal. Chem.* 1 (2005) 193–201.

[7] J.L. Capelo, C. Maduro, C. Vilhena, Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid-liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview, *Ultrason. Sonochem.* 12 (2005) 225–232.

[8] F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro, Ultrasound-assisted digestion: a useful alternative in sample preparation, *J. Biochem. Bioph. Meth.* 70 (2007) 299–310.

[9] M.G. Andrade Korn, E.S. da Boa Morte, D.C.M.B.d. Santos, J.T. Castro, J.T.P. Barbosa, A.P. Teixeira, A.P. Fernandes, B. Welz, W.P.C.d. Santos, E.B.G.N.d. Santos, M. Korn, Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods – a review, *Appl. Spectrosc. Rev.* 43 (2008) 67–92.

[10] S. Seidi, Y. Yamini, Analytical sonochemistry: developments, applications, and phenomena of ultrasound in sample preparation and analytical techniques, *Cent. Eur. J. Chem.* 10 (2012) 938–976.

[11] Y. Picó, Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples, *Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 84–99.

[12] J.A. Nóbrega, L.C. Trevizan, G.C.L. Araujo, A.R.A. Nogueira, Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. A review, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 1855–1876.

[13] Ş. Tokahoğlu, Determination of trace elements in commonly consumed medicinal herbs by ICP-MS and multivariate analysis, *Food Chem.* 134 (2012) 2504–2508.

[14] J.L. Capelo, C. Maduro, A.M. Mota, Advanced oxidation process for degradation of organomercurials: determination of inorganic and total mercury in urine by FI-CV-AAS, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2003) 414–416.

[15] J.L. Capelo, H.A. Pedro, A.M. Mota, Ozone treatment for mercury determination in white wines, *Talanta* 61 (2003) 485–491.

[16] M.J. Kim, J. Nriagu, Oxidation of arsenite in groundwater using ozone and oxygen, *Sci. Total Environ.* 247 (2000) 71–79.

[17] S. Khuntia, S.K. Majumder, P. Ghosh, Oxidation of As (III) to As (V) using ozone microbubbles, *Chemosphere* 97 (2014) 120–124.

[18] H. Matusiewicz, M. Mroczkowska, Hydride generation from slurry samples after ultrasonication and ozonation for direct determination of trace amounts of As(III) and total inorganic arsenic by their in situ trapping followed by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 751–761.

[19] J.L. Capelo, C. Maduro, A.M. Mota, Evaluation of focused ultrasound and ozonolysis as sample treatment for direct determination of mercury by FI-CV-AAS. Optimization of parameters by full factorial design, *Ultrason. Sonochem.* 13 (2006) 98–106.

[20] S. Arpadjan, G. Celik, S. Taskesen, S. Gücer, Arsenic, cadmium and lead in medicinal herbs and their fractionation, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 2871–2875.

[21] M.B.O. Giacomelli, M. Carminati Lima, V. Stupp, R.M. de Carvalho Júnior, J.B. Borba da Silva, P. Bermejo Barrera, Determination of As, Cd, Pb and Se in DORM-1 dogfish muscle reference material using alkaline solubilization and electrothermal atomic absorption spectrometry with Ir + Rh as permanent modifiers or Pd–Mg in solution, *Spectrochim. Acta Part B* 57 (2002) 2151–2157.

[22] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Data Handling in Science and Technology*, 20A, Elsevier Science, Amsterdam, 1997.

[23] I. Machado, M.V. Cesio, I. Dol, M. Pistón, A rapid sample preparation method for the determination of cadmium and lead in spinach and artichoke leaves using ozone, *Am. J. Food Sci. Technol.* 3 (2015) 55–59.

[24] B. Magnusson, U. Örnemark, *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, second ed., 2014 (ISBN 978-91-87461-59-0. www.eurachem.org (accessed 11.04.16)).

[25] J.N. Miller, J.C. Miller, *Estadística para Química Analítica*, second ed. Addison-Wesley Iberoamerican S.A., Wilmington, Del, USA, 1993.

[26] W. Horwitz, R.J. Albert, The Horwitz ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision, *Assoc. Off. Anal. Chem.* 89 (2006) 1095–1109.

[27] WHO Guidelines for Assessing Quality of Herbal Medicines With Reference to Contaminants and Residues, World Health Organization, Geneva, 2007.

[28] G. Pandino, S. Lombardo, G. Mauromicale, Chemical and morphological characteristics of new clones and commercial varieties of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*), *Plant Foods Hum. Nutr.* 66 (2011) 291–297.

[29] N. Ferré-Huguet, R. Martí-Cid, M. Schuhmacher, J.L. Domingo, Risk assessment of metals from consuming vegetables, fruits and rice grown on soils irrigated with waters of the Ebro River in Catalonia, Spain, *Biol. Trace Elem. Res.* 123 (2008) 66–79.

[30] E.M. Kroukamp, T. Wondimu, P.B.C. Forbes, Metal and metalloid speciation in plants: overview, instrumentation, approaches and commonly assessed elements, *Trends Anal. Chem.* 77 (2016) 87–99.

[31] E.P. Colangelo, M.L. Guerinet, Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants, *Curr. Opin. Plant Biol.* 9 (2006) 322–330.



“Sustentabilidad e Integración Multidisciplinaria: nuevos desafíos de la Química Analítica”

1 al 4 de octubre

Auditorio Ángel Bustelo
Mendoza - Argentina

Libro de Resúmenes



COMPARACIÓN DE TRES MÉTODOS MULTIRESIDUO PARA EL ANÁLISIS DE PESTICIDAS EN HOJAS DE ALCACHOFA (*Cynara scolymus*)

PO-11

Ignacio Machado
Ani Balemian
Natalia Gérez
Mariela Pistón
Horacio Heinzen
María Verónica Cesio

Facultad de Química



PESTICIDAS
 ALCACHOFA
 MÉTODOS MULTIRESIDUO
 GC-MS

En la actualidad, el consumo de vegetales con mínimo procesamiento, es una práctica cada vez más extendida por la población, pues son reconocidos como fuente de principios activos benéficos para la salud.

Los vegetales se cultivan siguiendo prácticas agrícolas diversas: convencionales, integradas u orgánicas. La primera es la más empleada, y su característica tecnológica principal es el uso de agroquímicos, que son utilizados para protegerlos y asegurar rendimiento y calidad en la producción. Dentro de los vegetales de hoja ancha que presentan gran consumo, debido a sus propiedades y usos, se encuentra la alcachofa (*Cynara scolymus*). Esta se consume como alimento y como planta medicinal ya que contiene cinarina, compuesto con capacidad para aumentar la secreción biliar. La cinarina además de hidrocolerético es hipocolesterolemizante y disminuye el cociente beta/alfa de las lipoproteínas. Se utiliza como "depurador hepático" en infusiones y productos farmacéuticos [1]. Sin embargo, para lograr una evaluación global del impacto en la salud del consumo de vegetales, se debe determinar no sólo los principios activos benéficos, sino también el contenido de xenobióticos riesgosos, como los residuos de agroquímicos.

El objetivo del trabajo fue comparar tres métodos multiresiduo para la extracción de pesticidas en hojas de alcachofa: QuEChERS Citrato [2], Extracción con Acetato de Etilo [2] y Dispersión de Matriz en Fase Sólida [3].

Para lograr este objetivo se definieron los analitos a determinar, basados en los paquetes tecnológicos usados en alcachofa. Se evaluaron las diferentes metodologías analíticas en base a la precisión y exactitud para el mayor número de analitos y para los seleccionados, se determinaron los parámetros de validación exigidos en el Documento SANCO de la Unión Europea [4].

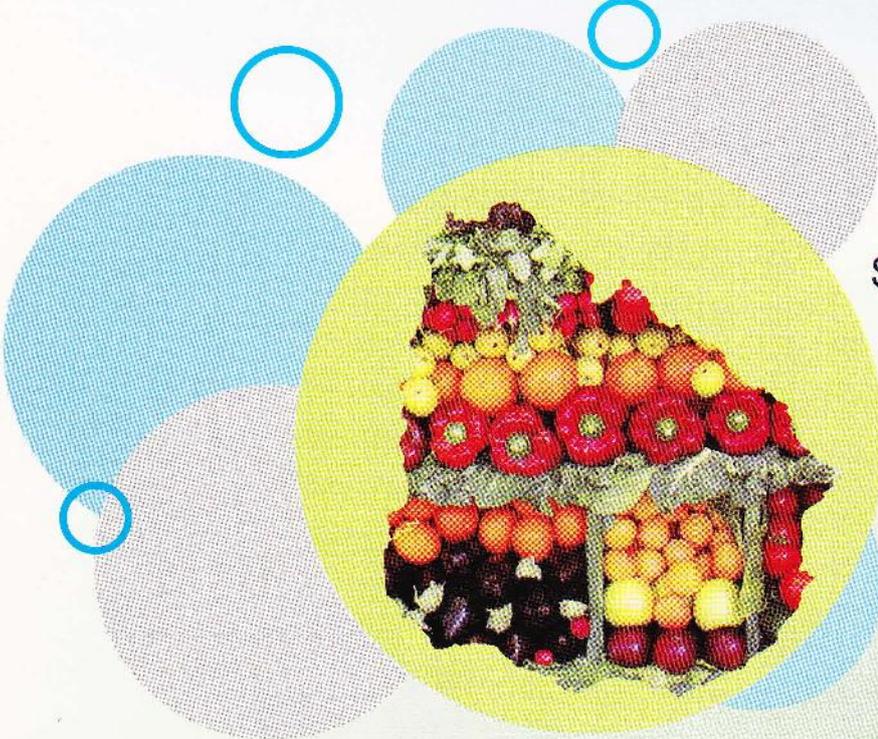
Se realizaron fortificaciones sobre las muestras con 17 pesticidas a un nivel de $160 \mu\text{gkg}^{-1}$. Los extractos fueron analizados por GC-MS. Los resultados indican que los dos primeros métodos cumplen globalmente con los requisitos de la guía SANCO evaluados. El método de Dispersión en Fase Sólida fue descartado debido a su mayor complejidad al momento de la dispersión y la extracción, resultando en un procedimiento muy largo. Para los métodos seleccionados se evaluarán las principales cifras de mérito: repetibilidad, reproducibilidad intermedia, linealidad, límites de detección y cuantificación, así como efecto matriz a dos niveles de fortificación para los pesticidas en estudio.

Referencias

- [1] D. Samec, J. Piljac-Zegarac, M. Bogovic, K. Habjanic, J. Grúz. *Scientia Horticulturae*, 128 (2011) 78.
- [2] L. Rajski, A. Lozano, N. Belmonte-Valles, A. Uclés, S. Uclés, M. Nezcu, A. Fernandez-Alba. *Analyst*, 138 (2013) 921.
- [3] D. García-Rodríguez, R. Cela-Torrijos, R. A. Lorenzo-Ferreira, A. M. Carro-Díaz. *Food Chemistry*, 135 (2012) 259.
- [4] DG-SANCO. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed, No. SANCO/10684/2009, 2009.

En el año de la agricultura familiar de la FAO

13^{er.} CONGRESO NACIONAL DE HORTI-FRUTICULTURA



Sostenibilidad de la
producción
hortifrutícola
familiar

INIA Las Brujas
Estación Experimental "Wilson Ferreira Aldunate"
50 años de investigación acompañando al sector hortifrutícola



Setiembre, 2014

Sociedad Uruguaya de Horti-Fruticultura

En el año de la Agricultura Familiar de la FAO

13º Congreso Nacional de Horti-Fruticultura

Centro de Convenciones de la Intendencia de Montevideo

3 al 6 de setiembre de 2014

Montevideo, Uruguay

**Estudio de inocuidad y seguridad alimentaria sobre extractos de hojas de alcachofa
(*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*)**

Machado I.¹, Gérez N.², Pistón M.¹, Cesio M. V.²

¹ *Química Analítica, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay.*

² *Farmacognosia y Productos Naturales, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay.*

Email: imachado@fq.edu.uy

Hoy en día existe una creciente preocupación por la acumulación de metales y semimetales potencialmente tóxicos en vegetales de consumo humano, así como la repercusión del uso de pesticidas y el riesgo de que los residuos que permanezcan en el cultivo lleguen al consumidor final. Por lo tanto, para lograr una evaluación global del impacto en la salud del consumo, se debe determinar no sólo los principios activos benéficos, sino también el contenido de estos xenobióticos riesgosos. Los pesticidas en estudio fueron seleccionados de acuerdo a los paquetes tecnológicos utilizados en alcachofa. Se realizaron fortificaciones sobre las muestras con 15 de ellos a un nivel de 0.5 mg/kg. El método de extracción utilizado fue QuEChERS Citrato. Los extractos concentrados fueron retomados con AcOEt, utilizando TPP como patrón interno y analizados por GC-MS. Se obtuvieron recuperaciones entre 70 - 120 % y valores de RSD menores al 20 % para todos los pesticidas evaluados, tal como estipula DG-SANCO, respondiendo así a las exigencias de la Unión Europea para el análisis de residuos de pesticidas en frutas y hortalizas. Ninguno de los pesticidas investigados fue detectado en las muestras reales estudiadas. A su vez se determinó el contenido de arsénico, cadmio y plomo en la infusión acuosa de las hojas. Las determinaciones se realizaron mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica. Los resultados obtenidos fueron 0.29 µg/L para cadmio, y menores al límite de detección para arsénico (0.5 µg/L) y plomo (0.6 µg/L). Dichos niveles no representan un riesgo para la salud si se comparan los resultados obtenidos con los niveles máximos admitidos de estos elementos en agua potable. Este estudio conjunto aporta evidencia científica sobre la inocuidad alimentaria del vegetal proveniente de un cultivo familiar y sobre las posibilidades de empleo del mismo en productos fitoterápicos y en infusiones.

Propiedades nutraceuticas de extractos de hojas de alcachofa (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*)

Machado I. ¹, Heinzen H. ², Cesio M. V. ², Pistón M. ¹

¹ *Química Analítica, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay. Email: imachado@fq.edu.uy.* ² *Farmacognosia y Productos Naturales, Facultad de Química, UdelaR, Montevideo, Uruguay.*

La alcachofa (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*) es una fuente de compuestos bioactivos, consumida como alimento y como planta medicinal, por su contenido en cinarina, compuesto con capacidad para aumentar la secreción biliar, además de ser hidrocolerético e hipocolesterolemiante. Si bien las variedades de *Cynara* sp. que se emplean para la producción de alimentos y fitoterápicos son diferentes, la biomasa producida por el vegetal puede ser una importante fuente de materia prima para su uso medicinal, aumentando la productividad, esencial para hacer más rentable un cultivo familiar. Se plantea en este trabajo, una evaluación global de las propiedades nutraceuticas de hojas de cultivares empleados con fines alimentarios de aquellos principios activos benéficos para la salud, como los metales esenciales los cuales forman parte de centros activos de enzimas que catalizan procesos vitales (Cu, Zn) o participan en el transporte de electrones (Fe, Ni). Estos metales se determinaron en infusiones de hojas provenientes de un cultivo familiar para evaluar su biodisponibilidad para el consumidor, empleando espectrometría de absorción atómica. Los resultados promedio obtenidos fueron 6.0 mg/kg, 12.2 mg/kg, 0.93 mg/kg y 48.2 mg/kg para Cu, Fe, Ni y Zn respectivamente (RSD≤10%). El otro grupo farmacológicamente relevante son los polifenoles por su capacidad secuestrante frente a especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) relevantes a nivel fisiológico. Estos fueron evaluados y determinados por LC-DAD-MS/MS en extractos acuosos e hidroalcohólicos. La actividad antioxidante resultó ser muy buena. El ácido clorogénico fue el compuesto fenólico mayoritario, seguido por la cinarina y la luteolina-7-rutinósido. El contenido fenólico total fue de 108 mg/g. Estos hallazgos demuestran que la alcachofa es una potencial fuente de antioxidantes naturales y que la infusión de las hojas contiene elementos esenciales para la salud en concentraciones que pueden contribuir a la ingesta diaria recomendada, en particular de hierro. Conservación de frutos de guayabos del país

O ALI 01

Propiedades nutraceuticas de infusiones de hojas y frutos de alcachofa (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*)

*Machado, Ignacio*¹; *Heinzen, Horacio*²; *Cesio, María Verónica*²; *Pistón, Mariela*¹

¹ Química Analítica, DEC, Facultad de Química, UdelaR.

² Farmacognosia y Productos Naturales, DQO, Facultad de Química, UdelaR.
imachado@fq.edu.uy

La alcachofa (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*) es una reconocida fuente de compuestos bioactivos. El fruto es consumido como alimento y las hojas utilizadas en infusiones y como materia prima base de productos fitoterápicos, dado su alto contenido de cinarina, compuesto con capacidad para aumentar la secreción biliar, hidrocólico y hipocolesterolemiante.

En este trabajo se plantea una evaluación global de las propiedades nutraceuticas de infusiones obtenidas a partir de hojas y frutos de cultivares de alcachofa empleados con fines alimentarios, estudiando algunos de los principios activos con beneficios para la salud. Las infusiones se prepararon según protocolos estándar [1].

Por un lado se determinó en infusiones de hojas y frutos la concentración de metales traza esenciales, que forman parte de centros activos de enzimas que catalizan procesos vitales (Cu, Zn) o participan en el transporte de electrones (Fe, Ni). Las muestras fueron provenientes de un cultivo familiar. Las técnicas empleadas fueron espectrometría de absorción atómica de llama (Cu, Fe y Zn) y con atomización electrotérmica (Ni).

Los resultados promedio obtenidos se resumen en la siguiente tabla:

Elemento	Concentración (mg/kg de material vegetal)	
	Fruto	Hoja
Cobre	0,27	6,05
Hierro	0,27	12,2
Níquel	0,01	0,93
Zinc	1,36	48,2

Por otra parte se evaluó en infusiones obtenidas de las hojas el contenido de compuestos polifenólicos, relevantes por su capacidad secuestrante (antioxidante) frente a especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) a nivel fisiológico. Los mismos fueron determinados mediante LC-DAD-MS/MS. El ácido clorogénico fue el compuesto fenólico mayoritario, seguido por la cinarina y la luteolina-7-rutinósido. El contenido fenólico total fue de 108 mg/g.

Para el estudio de actividad antioxidante se utilizó un lector de microplacas con detección colorimétrica, fluorimétrica o quimioluminiscente dependiendo de la especie en estudio. La misma en la infusión de hojas resultó ser muy buena, obteniéndose valores de IC₅₀ dentro del rango 3,5 - 34 µg/mL. [2]

Estos hallazgos demuestran que la infusión de las hojas de alcachofa es una potencial fuente de antioxidantes naturales. Por otro lado, la infusión de las hojas en comparación con la del fruto sería una mayor fuente de elementos traza esenciales para la salud en niveles de concentración que pueden contribuir a la ingesta diaria recomendada.

EVALUATION OF OZONATION AS SAMPLE TREATMENT FOR THE DETERMINATION OF CADMIUM AND LEAD IN SPINACH LEAVES

Ignacio MACHADO ^{a)}; Verónica CESIO ^{b)}; Isabel DOL ^{a)}; Mariela PISTÓN ^{a)}

^{a)} Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay;

^{b)} Department of Natural Products and Pharmacognosy, Faculty of Chemistry, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

imachado@fq.edu.uy

The levels of contaminants in food are controlled by the sanitary authorities in all the countries. In the MERCOSUR region there is a regulation that indicates that the maximum limit of cadmium (Cd) and lead (Pb) in comestible vegetables is 0.3 mg kg⁻¹ for both metals (MERCOSUR/GMC/RES. No 12/11). To ensure food safety, the laboratories need simple and rapid analytical methodologies validated to provide fast response so the products can be commercialized in the region.

Advanced oxidation processes which involve the *in situ* generation of highly potent chemical oxidants were reported as a promising technology to accelerate the oxidation at room temperature and the degradation of organic matter. These processes were used combined with sonication (sonozone) for the sample preparation for the determination of inorganic contaminants in different samples [1].

The process of ozonation (not combined with other technologies) was evaluated as an alternative for sample preparation of spinach leaves for the determination of Cd and Pb.

The sample used to evaluate this method was a certified reference material of trace elements in spinach leaves (NIST 1570a). 0.5 g of the sample were introduced in a glass vessel with 10 mL of HNO₃ 25% (v/v), then a glass device constructed in our laboratory was placed in the solution and ozone was passed through for 15 minutes. The procedure was carried out at room temperature; the final temperature was 9°C.

The experimental conditions were optimized by means of a multivariate experiment (2 variables: acid concentration and ozonation time in 3 levels).

Ozone was generated from oxygen with a yield of 1.6 gh⁻¹ with an ozone generator (OZOX - OG 75-A, Montevideo, Uruguay). After the ozonation process, the obtained suspension was centrifugated for 5 min at 3000 rpm. The supernatant was used for the analytical determinations by means of electrothermal atomic absorption spectrometry. The experimental conditions were 350 °C (Cd) and 1000 °C (Pb) for the pyrolysis and 1500 °C (Cd) and 1800 °C (Pb) for the atomization process.

The figures of merit were: detection limits, expressed in dry mass (3s): 0.002 mg kg⁻¹ (Cd), 0.01 mg kg⁻¹ (Pb), precision better than 10 % for both metals (RSD, n=6), the mean recovery was 95.8 % (Cd) and 96.6 % (Pb) compared with the certified value (n=7).

This procedure showed to be adequate for the purpose of control of these inorganic contaminants in spinach leaves according to the regional regulations. This treatment is simple, fast and also in good agreement with the Green Chemistry, with the novelty of the use of ozonation in the sample treatment which is not been reported for this kind of sample before.

References:

- [1] Capelo, J.L.; Maduro, C.; Mota, A.M. J.Anal. At. Spectrom. 2003, 19, 414.

Acknowledgments: Agencia Nacional de Investigación e Innovación – ANII (Grant: POS_NAC_2013_1_11407) and PEDECIBA-Química.

Poster 4

Determinación de cadmio en alimentos utilizando ozono como alternativa para la preparación de las muestras

I. Dol, I. Machado, M. Pistón

Química Analítica, DEC, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay-
idol@fq.edu.uy

Palabras clave: cadmio, ozono, alimentos

Los niveles de contaminantes en alimentos deben ser controlados en cada país. En la región del MERCOSUR, existe un reglamento que indica el límite máximo de cadmio (Cd) en vegetales comestibles, trigo y arroz son 0.2 y 0.4 mg kg⁻¹ respectivamente (MERCOSUR/GMC/RES. No 12/11). Para garantizar la seguridad alimentaria los laboratorios deben contar con metodologías validadas que sean rápidas de forma de dar respuestas en los tiempos requeridos para el comercio. Los procedimientos estándar para la determinación de Cd en alimentos involucran tratamientos de muestra con ácidos concentrados en caliente.

Los procesos de oxidación que involucran la generación *in situ* de especies químicas oxidantes son tecnologías emergentes para acelerar el proceso de degradación de la materia orgánica, con ácidos diluidos y a temperatura ambiente, en ciertas matrices. El ozono (O₃) es un poderoso oxidante, con un potencial de oxidación de 2,07 V [1]. Se plantea como alternativa amigable para el ambiente en el laboratorio, la preparación de las muestras mediante ozonizado en medio ácido diluido.

La evaluación de la metodología se realizó con materiales de referencia certificados de hojas de espinaca (NIST 1570a), harina de trigo (NIST 1567a) y harina de arroz (NIST 1568a).

0.5 g de la muestra se colocaron en un recipiente de vidrio con 10 a 15 mL de HNO₃ 25% (m/m), la suspensión se ozonizó durante 15 min. El gas O₃ se generó a partir de oxígeno O₂ con un generador de ozono(OZOX - OG 75-A, Montevideo,

Uruguay) con un rendimiento de 1.6 g h⁻¹ a un flujo de oxígeno enriquecido en ozono de 7 L/min. Luego del proceso de ozonizado la suspensión obtenida se centrifugó durante 5 min (3500 rpm). Las determinaciones de Cd se realizaron directamente en el sobrenadante mediante espectrometría atómica con atomización electrotérmica.

Las cifras de mérito estudiadas fueron: Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) (criterio 3s, n=10), precisión (expresada como RSD, n=6), y recuperación (comparado con el valor de referencia certificado, n=6).

	Espinaca	Trigo	Arroz
LOD (mg kg ⁻¹)	0,002	0,003	
LOQ (mg kg ⁻¹)	0,006	0,008	
RSD (%)	< 10 %		
Recuperación (%)	90 – 115 %		

Este procedimiento es adecuado para monitorear los niveles de Cd en los alimentos propuestos con la ventaja de ser rápido y amigable con el ambiente.

Agradecimientos

Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y PEDECIBA-Química por el apoyo financiero.

Referencias

Capelo, J.L.; Maduro, C.; Mota, A.M. 2004. Advanced oxidation process for degradation of organomercurials: determination of inorganic and total mercury in urine by FI-CV-AAS J.Anal.At.Spectrom. 19, 414-416.

Comparación de diferentes tratamientos de muestra para la determinación de Cu, Cd, Ni, Pb y Zn en alcachofa (*Cynara cardunculus L. subsp. Cardunculus*)

Machado, I.^{1*}; Rodríguez Arce, E.¹; Heinzen, H.²; Cesio, V.²; Pistón, M.¹

1. Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
2. Farmacognosia y Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

*e-mail: imachado@fq.edu.uy

Para evaluar en forma global las propiedades benéficas de la alcachofa y asegurar su inocuidad alimentaria, se debe no solo estudiar el contenido de compuestos de reconocido valor nutracéutico, sino también el de aquellos compuestos que puedan representar un riesgo para la salud. Los vegetales absorben metales del suelo, algunos de ellos son esenciales y otros perjudiciales para la salud, por lo que resulta importante conocer los niveles de concentración de estos elementos.

De acuerdo a las tendencias actuales, los tratamientos de muestra deben ser dinámicos y sencillos, evitando protocolos largos y costosos. Se llevó a cabo la comparación de tres metodologías de preparación de la muestra, asistida con ondas de ultrasonido (sonda US), microondas (MW) y ozonización [1]. Para los tratamientos asistidos por ultrasonido y ozonización, se optimizaron las condiciones experimentales mediante un diseño experimental multivariado de dos variables en tres niveles: concentración de ácido nítrico (entre 25 – 50 % v/v) y tiempo de extracción (entre 5 – 25 minutos). Las condiciones óptimas fueron: HNO₃ 25% v/v y 10 minutos de tratamiento. Se realizó la cuantificación de los metales luego de cada tratamiento mediante espectrometría de absorción atómica. Para evaluar la veracidad, se trabajó con un material de referencia certificado de hojas de espinaca (NIST 1570a). Las recuperaciones para todos los metales, respecto a los valores certificados, estuvieron en el rango 92 – 106 % para los tres tratamientos propuestos. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla a continuación.

Elemento	Hoja – Concentración (mg kg ⁻¹)			Fruto - Concentración (mg kg ⁻¹)		
	Sonda US	Ozonización	MW	Sonda US	Ozonización	MW
Cu	8,4 ± 0,3	9,1 ± 0,5	9,8 ± 0,1	6,1 ± 0,2	6,2 ± 0,8	6,9 ± 0,2
Ni	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,6 ± 0,3	2,64 ± 0,1
Zn	95,3 ± 0,4	88,4 ± 0,5	95,3 ± 0,8	31,6 ± 1,2	33,6 ± 1,8	34,5 ± 0,9
Cd	0,19 ± 0,02	0,17 ± 0,01	0,19 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Pb	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,060 ± 0,007	0,061 ± 0,009	0,065 ± 0,006

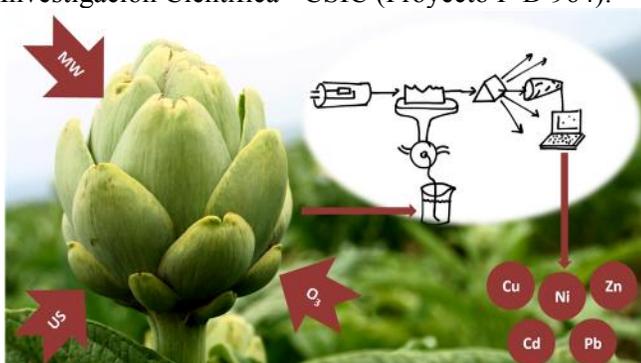
Los métodos desarrollados resultaron ser comparables y adecuados para la determinación de Cu, Ni y Zn en hoja y fruto de alcachofa, así como para el monitoreo de Cd y Pb de acuerdo a las regulaciones regionales. Los tratamientos de muestra fueron simples y rápidos, con la novedad del uso de la ozonización y en acuerdo con la química verde.

Referencias

- [1] Machado, I (2015). *American Journal of Food Science and Technology*, 3, 55-59

Agradecimientos

Agencia Nacional de Investigación e Innovación - ANII (Beca POS_NAC_2013_1_11407) y Comisión Sectorial de Investigación Científica - CSIC (Proyecto I+D 964).



Determinación de residuos de pesticidas en hojas de alcachofa (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*) mediante GC-MS y LC-MS/MS.

Ignacio Machado¹, Natalia Gérez², Mariela Pistón¹, Verónica Cesio²

1- Química Analítica, DEC, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; 2- Farmacognosia y Productos Naturales, DQO, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

imachado@fq.edu.uy

Los cultivos de vegetales se llevan a cabo siguiendo prácticas agrícolas diversas: convencionales, integradas u orgánicas. La primera es la más empleada, y su característica tecnológica principal es el uso de agroquímicos, que son utilizados para proteger y asegurar rendimiento y calidad en la producción. Dentro de los vegetales de hoja ancha que presentan gran consumo, debido a sus propiedades y usos, se encuentra la alcachofa. Esta se consume como alimento y como planta medicinal ya que contiene cinarina, compuesto con capacidad para aumentar la secreción biliar. La cinarina además de hidrocolerético es hipocolesterolemiante y disminuye el cociente beta/alfa de las lipoproteínas. Se utiliza como “depurador hepático” en infusiones y productos farmacéuticos [1]. Sin embargo, para lograr una evaluación global del impacto sobre la salud del consumo de vegetales, se debe determinar no sólo los principios activos benéficos, sino también el contenido de xenbióticos riesgosos, como lo son los residuos de agroquímicos. El objetivo del trabajo consistió en la validación de una metodología multiresiduo (QuEChERS Citrato modificado [2]), para la extracción y posterior determinación de residuos de pesticidas en hojas de alcachofa. Para lograr este objetivo se definieron los analitos a determinar, basados en los paquetes tecnológicos utilizados en estos cultivos. Se evaluó la metodología analítica según los parámetros de validación exigidos en el Documento SANCO de la Unión Europea [3]. Uno de los grandes desafíos de esta investigación consistió en encontrar una estrategia de preparación de las muestras para poder realizar la determinación simultánea de un gran número de analitos en una misma corrida cromatográfica. Una vez optimizada esta etapa crítica se evaluaron las principales cifras de mérito: porcentaje de recuperación, precisión (repetibilidad), precisión intermedia, linealidad (calibración por matriz), límites de detección y cuantificación y efecto matriz. Se realizaron fortificaciones a 3 niveles de concentración sobre las muestras con 87 pesticidas, 60 para ser analizados por LC-MS/MS (a niveles de 10, 50 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y 27 para ser analizados por GC-MS (a niveles de 50, 100 y 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$). El método cumplió globalmente con los requisitos de la guía SANCO evaluados, obteniéndose en todos los casos valores de recuperación en el rango 70-120% y valores de RSD menores al 20%. Los límites de cuantificación obtenidos fueron en todos los casos menores a los respectivos Límites Máximos de Residuos fijados por la Unión Europea. Ninguno de los pesticidas investigados fue detectado en las muestras reales analizadas, hecho que aporta evidencia científica sobre la inocuidad alimentaria del vegetal proveniente de un cultivo familiar y sobre las posibilidades de empleo del mismo en productos fitoterápicos y en infusiones.

Los autores agradecen a ANII (Beca POS_NAC_2013_1_11407) y a PEDECIBA – Química.

[1] Pistón, M. et al. *Food Res. Int.* 2014, 64, 150-156. [2] Anastassiades et al. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. In: Ohkawa, H., Miyagawa, H., Lee, P.W. (Eds.). *Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. [3] European Commission DG-SANCO, 2014. Method validation and quality control procedures for pesticide residue analysis in food and feed. Document SANCO/12571/2013.

Evaluation of ultrasound-assisted methods for sample preparation for the determination of total arsenic in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*)

I. Machado¹, E. Rodríguez Arce¹, M. Pistón¹ & M.V. Cesio²

¹Analytical Chemistry, DEC, Faculty of Chemistry, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay.

²Pharmacognosy and Natural Products, DQO, Faculty of Chemistry, Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay

ABSTRACT: The aim of the present study was to evaluate the food safety of globe artichoke crops, in terms of total arsenic content, using simple and rapid analytical methodologies. For this purpose, two ultrasound-assisted methods followed by Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry (HG-AAS) were evaluated and compared with a microwave-assisted digestion followed by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry (ET-AAS). The proposed methods showed to be adequate for the purpose of control of this contaminant according to the regional regulations and in good agreement with the principles of the Green Chemistry. The levels of total arsenic in all analyzed samples were below the maximum level admitted.

1 INTRODUCTION

Globe artichoke is a well known plant in South America, not only as a healthy food (fruits), but also as raw material used in herbal medicine products to relieve indigestion and as hepatoprotective (leaves) (Pistón *et al.*, 2014). In the MERCOSUR region there is a regulation that indicates that the maximum limits of total Arsenic (As) in infusion and edible vegetables are 0.6 and 0.3 mg/kg respectively (MERCOSUR, 2015).

The aim of the present study is to evaluate the food safety of these crops, in terms of total arsenic content, using simple and rapid analytical methodologies. For this purpose, two simple ultrasound-assisted methods for sample preparation followed by HG-AAS and a microwave-assisted digestion followed by ET-AAS were compared. Samples from a family of farmers that are dedicated to grow crops of globe artichokes where analyzed in order to make an assessment.

2 EXPERIMENTAL

2.1 Instrumentation

An ultrasonic homogenizer (VC505, Sonics) 750 W; 20 kHz; 230 VAC equipped with a 13 mm titanium alloy probe and an ultrasonic bath (8893, Cole Parmer) 469 W; 47 kHz were used for ultrasound-assisted methods. For total digestion procedure a Microwave oven (Mars6, CEM) 400–1800 W provided with 12 EasyPrep™ vessels was employed.

For analytical determinations by HG-AAS, a flame atomic absorption spectrometer (AAAnalyst 200, Perkin Elmer) coupled to a MHS system (Perkin Elmer) was used. Operating conditions were: wavelength 193.7 nm, lamp current 400 mA, slit width 0.5 nm and acetylene-air flame. Nitrogen (99.99%) was used as carrier gas, with a flow rate of 60 mL/min. A quartz T-tube cell with a path-length of 165 mm and a diameter of 12 mm, was heated to approximately 900°C. For those determinations using ET-AAS, an atomic absorption spectrometer (iCE 3500, Thermo) equipped with a graphite furnace atomizer, auto-sampler and Zeeman-based correction was employed. Argon (99.99%) was used as purge gas. Operating conditions were: wavelength 193.7 nm, lamp current 10 mA and spectral resolution 0.5 nm. Extended life graphite tubes treated with permanent modifier were used.

2.2 Reagents

All chemicals used were of analytical reagent grade and all the solutions were prepared with ultrapure water of 18.2 MΩcm resistivity (ASTM Type I).

All glassware was soaked overnight in 10% (v/v) HNO₃ before use. HNO₃ (65% v/v, Merck) and HCl (37% v/v, Merck) were used for sample preparation. A commercial standard solution (1000 mg/L) of As(V) (Merck) was used for the calibration curves.

2.3 Samples

Globe artichoke leaves (2 kg) and fruits (10 kg) were collected in Montevideo, Uruguay.

The fragments of leaves were identified as *Cynara cardunculus* subsp. *Cardunculus*. Samples were chopped and dried in an oven with forced air circulation (70°C) and stored at 20°C, at light-free conditions.

2.4 Ultrasound-assisted methods: using a probe and a bath

For both methods 0.5 g of sample were accurately weighted in a glass vessel and then 10.0 mL of HCl 50% (v/v) were added. The probe was immersed in this suspension for 15 min (35% sonication amplitude); when an ultrasonic bath was employed, the vessel was put into the bath for 90 min. The slurries obtained by both methods were then centrifuged at 3700 rpm for 3 min. Reagent blanks were also run.

2.5 Microwave-assisted method

For this method 0.5 g of sample were accurately weighted, and 10.0 mL of HNO₃ were added into the EasyPrep™ vessel. The vessel was sealed with the screw cap and placed inside the microwave oven: power 400–1800 W, 20 min ramp time until 200°C, 10 min hold at 200°C, 800 psi pressure. Reagent blanks were also run.

2.6 Total arsenic determination

HG-AAS: 5.0 mL of the solutions obtained in 2.4 were treated with 0.5 mL of 20% (w/v) KI as pre-reductant for 1 hour. Then the solution was put into the reaction vessel of the instrument where 2% (w/v) NaBH₄ (prepared in 1% (w/v) NaOH) was added to form the hydride. Three drops of octanol were added to each sample to avoid foaming.

ET-AAS: Graphite tubes were treated with niobium by pipetting 50 µL of a 1000 mg/L Nb(NO₃)₅ solution and submitting the tube to the following temperature program: [temperature/ramp time/hold time]: drying (100°C/10 s/60 s), atomization (2700°C/0 s/5 s). The entire procedure was repeated 6 times in order to obtain a 300 µg of modifier on the tube. The temperature program for As determination was: drying (100°C/10 s/30 s), pyrolysis (1200°C/15 s/15 s), atomization (2200°C/0 s/3 s), cleaning (2600°C/0 s/3 s). Argon flow of 0.2 mL/min was used, except during atomization step. Injection volume was 30 µL. Solutions obtained in 2.5 were directly injected.

3 RESULTS AND DISCUSSION

The main features of merit for both analytical techniques are shown in Table 1.

Table 2 shows the results obtained using the three procedures for samples of artichoke leaves and fruits from the family crop. These results show that the methods are comparable.

The ultrasound-assisted methods were simple and relatively fast and can be postulated as an alternative

Table 1. Main figures of merit obtained.

Parameter	HG-AAS	ET-AAS
Linearity (µg/L)	Up to 10.0	Up to 20.0
LOD (3σ, n = 10) (mg/kg)	0.007	0.007
LOQ (10σ, n = 10) (mg/kg)	0.022	0.024
Precision (RSD, n = 6)	≤ 10%	≤ 10%
Trueness (compared to certified value, n = 6)*	98%	97%

*CRM NIST 1570a Trace Elements in Spinach Leaves.

Table 2. Comparison of the sample treatments.

Sample	As (mg/kg)		
	US-probe	US-bath	MW
Leaves	0.065 ± 0.007	0.062 ± 0.005	0.064 ± 0.005
Fruits	0.025 ± 0.002	0.025 ± 0.003	0.026 ± 0.004

Results expressed as: mean value ± standard deviation, n = 6. US: ultrasound

to those classical methods involving total digestion. All the obtained concentrations were below the maximum admitted values for this kind of food.

4 CONCLUSIONS

Ultrasound-assisted methods show to be simple and in better agreement with the principles of the Green Chemistry since they utilize diluted acid. These procedures showed to be adequate for the purpose of control of this contaminant, according to the regional regulations.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Bianco family for providing samples. The research that gives rise to the results, received funding from Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII POS_NAC_2013_1_11407), PEDECIBA-Química, and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-UdelaR).

REFERENCES

- MERCOSUR. 2015. "Reglamento técnico MERCOSUR" (Technical Regulation) MERCOSUR/GMC RES. N° 12/11 <http://www.puntofocal.gov.ar/doc> (Accessed 18-10-2015).
- Pistón, M., Machado, I., Branco, C.S., Cesio, V., Heinzen, H., Ribeiro, D., Fernandes, E., Campos Chisté, R. & Freitas, M. 2014. Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS. *Food Res. Int.* 64: 150–156.