



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE QUÍMICA

Tesis para optar al Título de Doctor en Química

“Aplicación de técnicas de Análisis en Flujo a la automatización del análisis químico de la leche y sus derivados”

Autor: Mariela Mónica Pistón Pedreira

Director de tesis: Prof. Dr. Moisés Knochen

Montevideo – Uruguay
2009



UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA
FACULTAD DE QUÍMICA
Depto. de Bedelía

ACTA. En Montevideo a los seis días del mes de agosto de 2009, se reúne en la Facultad de Química el Tribunal que entendió en la defensa de Tesis de Doctorado en Química que postula la QF Mariela Pistón, cuyo título es: "Aplicación de técnicas de Análisis en Flujo a la automatización del análisis químico de la leche y sus derivados".
Asisten los integrantes del tribunal: Dres. Boaventura Freire dos Reis, María H. Torre, Horacio Heinzen y Moisés Knochen (director de tesis).

Iniciado el acto, da comienzo la exposición de la Q.F. Mariela Pistón y finalizada la disertación, el Tribunal se retira a deliberar, para emitir el siguiente juicio:

La tesis de Doctorado presentada por la Q.F. Mariela Pistón Pedreira reporta el uso de procesos analíticos de inyección en flujo siguiendo dos métodos principales de procesos de automatización de procedimientos analíticos: análisis por inyección secuencial y en flujo multiconmutado. Fueron seleccionados como especies químicas de interés la matriz de la leche, zinc, cobre, selenio, nitrato y nitrito, cuya selección fue fundamentada considerando la importancia que tienen para la salud humana.

El trabajo escrito fue desarrollado de forma completa, con calidad técnica y científica. Los procedimientos analíticos propuestos fueron validados empleando muestras certificadas, utilizando métodos de referencia y tratamientos estadísticos apropiados.

La exposición oral realizada utilizó medios audiovisuales adecuados y se destacó por la claridad y la jerarquización de los aspectos más importantes de su trabajo.

Posteriormente la postulante respondió con solvencia y seguridad a las preguntas del Tribunal, demostrando un amplio dominio del tema.

Por todo lo anterior, el tribunal otorga la calificación de excelente al trabajo presentado.


Boaventura Freire dos Reis


Horacio Heinzen


María H. Torre

Agradecimientos

A:

Mi director de tesis y tutor: Moisés Knochen.

Mi centro de soluciones... y mucho más, Isabel Dol.

Mis compañeros de grupo del proyecto CSIC 348 – Javier Silva, Ramiro Pérez.

Mis compañeros de grupo en el trabajo “SIA – nitrato/nitrito”: Alicia Mollo, Jeannette Araújo.

Mi compañera de trabajo de “SIA - zinc”: Carolina Pioda.

Mis compañeros de Cátedra (de ahora y de siempre): Ale (Choli), Gustavo, Alicia, Diego, Cecilia, Carolina, Andrea, Fernando, Silvino, Adriana, Verónica, Alejandro, Javier, Ramiro, Emilio, Lourdes, Inés.

Pablo Buccino por la colaboración en traducciones y diseños gráficos.

Quienes me dieron una mano con los programas y diseñaron el *software*: Moisés Knochen y Fernando Labandera.

Quienes donaron muestras de leche: Conaprole, Prof. Luís Barros, Gramón Bagó.

Los organismos que me ayudaron económicamente e hicieron posible este trabajo: CSIC, Pedeciba, ANII, Cátedra Química Analítica.

Familiares y amigos...

¡Muchas gracias por haber

contribuído a que esto fuera posible!

Índice de contenidos

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE DE CONTENIDOS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	7
1. RESUMEN	11
2. SIGLAS	13
3. INTRODUCCIÓN	14
3.1. Matriz seleccionada: leche y fórmulas infantiles de base láctea	14
3.1.1. Importancia.....	14
3.1.2. ¿Por qué automatizar los análisis químicos de productos lácteos? – Presentación del desafío analítico.....	30
3.1.3. Selección de los analitos a ser estudiados.....	36
3.1.4. Metales.....	39
3.1.4.1. Zinc.....	39
3.1.4.2. Cobre.....	43
3.1.5. Selenio (semimetal).....	49
3.1.6. Nitrato y nitrito.....	58
3.1.7. Selección de muestras	62
3.2. Técnicas en flujo empleadas	64
3.2.1. Análisis en Flujo.....	64
3.2.2. Análisis por Inyección en Flujo (FIA).....	69
3.2.3. Preconcentración en Análisis en flujo	91
3.2.4. Análisis por Inyección en Flujo Multiconmutado (MCFA).....	99
3.2.5. Análisis por Inyección Secuencial en Flujo (SIA)	110
3.3. Técnicas instrumentales	118
3.3.1. Espectrometría de Absorción Atómica de llama (FAAS).....	118
3.3.2. Espectrometría de Absorción Atómica con generación de Hidruros (HG-AAS).....	125
3.3.3. Espectrometría de absorción molecular visible.....	172
3.3.3.1. Métodos de desarrollo de color.....	178
3.4. Herramientas de <i>software</i>	186
3.5. Aseguramiento de la calidad	190
4. OBJETIVOS	222
5. DESARROLLO	223

5.1. Determinación simultánea de cobre y zinc en leche en polvo y fórmulas infantiles utilizando diferentes técnicas de análisis en flujo	223
5.1.1. Antecedentes y consideraciones preliminares	223
5.1.2. Desarrollo de un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA)	227
5.1.2.1. Materiales, métodos e instrumentación.....	227
5.1.2.2. Diseño del sistema en flujo y optimización	231
5.1.2.3. Preparación de las muestras	246
5.1.2.4. Resultados y discusión	250
5.1.2.4.1. Validación.....	253
5.1.2.4.2. Cifras de mérito	258
5.1.2.5. Conclusiones.....	261
5.1.3. Desarrollo de un sistema por Inyección Secuencial en Flujo (SIA)	262
5.1.3.1. Materiales, métodos e instrumentación.....	262
5.1.3.2. Diseño del sistema en flujo y optimización	266
5.1.3.3. Preparación de las muestras	274
5.1.3.4. Resultados y discusión	276
5.1.3.4.1. Validación.....	276
5.1.3.4.2. Cifras de mérito	279
5.1.3.5. Comparación de sistemas FIA-SIA.....	282
5.1.3.6. Conclusiones y continuación del trabajo	284
5.2. Determinación de nitrato y nitrito en leche en polvo y fórmulas infantiles mediante un sistema por Inyección Secuencial en Flujo (SIA)	285
5.2.1. Antecedentes y consideraciones preliminares	285
5.2.2. Materiales, métodos e instrumentación	287
5.2.3. Diseño del sistema en flujo y optimización.....	290
5.2.4. Preparación de las muestras	297
5.2.5. Resultados y discusión	298
5.2.5.1. Validación.....	298
5.2.5.2. Cifras de mérito	304
5.2.6. Conclusiones.....	307
5.3. Determinación de selenio total en leche en polvo y fórmulas infantiles utilizando diferentes técnicas de análisis en flujo	308
5.3.1. Antecedentes y consideraciones preliminares	308
5.3.2. Desarrollo de un sistema de Análisis por Inyección en Flujo (FIA).....	315
5.3.2.1. Materiales, métodos e instrumentación.....	315
5.3.2.2. Diseño de los sistemas en flujo y optimización.....	319
5.3.2.3. Preparación de las muestras	328
5.3.2.4. Resultados y discusión	331
5.3.2.4.1. Validación.....	331
5.3.2.4.2. Cifras de mérito	333
5.3.2.5. Conclusiones.....	340
5.3.3. Desarrollo de un sistema por Inyección en Flujo Multiconmutado (MCFA).....	341
5.3.3.1. Materiales, métodos e instrumentación.....	341
5.3.3.2. Diseño de los sistemas en flujo y optimización.....	345
5.3.3.3. Preparación de las muestras	359
5.3.3.4. Resultados y discusión	365
5.3.3.4.1. Validación.....	365
5.3.3.4.2. Cifras de mérito	373
5.3.3.5. Conclusiones.....	383
5.3.4. Consideraciones nutricionales respecto a los valores de selenio obtenidos en leche vacuna y fórmulas infantiles de Uruguay.	384
6. CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	386
7. BIBLIOGRAFÍA	391

8. ANEXOS	416
8.1. ANEXO I.....	416
8.2. ANEXO II.....	420

Índice de figuras

Figura 1. Esquema de la estructura de la leche	18
Figura 2. Composición y estructura de la leche	21
Figura 3. Sistema de flujo continuo segmentado	65
Figura 4. Esquema simplificado de un sistema FIA con sus componentes básicos	70
Figura 5. Típica señal transitoria	71
Figura 6. Señales analíticas y curva de calibración	71
Figura 7. Comparación de las condiciones de mezclado y dispersión	72
Figura 8. Cambios progresivos en el perfil de la muestra	73
Figura 9. Velocidad de distribución en un flujo laminar,	74
Figura 10. Patrón de dispersión	75
Figura 11. Tipo de reactores	76
Figura 12. Patrones de mezclado bobinas en forma de serpiente	77
Figura 13. Diferentes diseños de sistemas en flujo	78
Figura 14. Tipos de mezclado	79
Figura 15. Vista de los rodillos y tubos de bomba peristáltica	80
Figura 16. Modelo de bomba peristáltica	81
Figura 17. Modelo de bomba peristáltica con cartuchos	81
Figura 18. Diferentes tipos de uniones y conectores	84
Figura 19. Tipos de reactores	85
Figura 20. Válvulas rotativas y actuador Valco®	87
Figura 21. Esquema de conmutación de válvula de 6 puertos	87
Figura 22. Celdas de flujo comercial y esquema	89
Figura 23. Diferente vista de celda de flujo	89
Figura 24. Flujo a través de una celda con diodo emisor de radiación y fotodiodo	89
Figura 25. Flujo a través de una celda con una fibra óptica bifurcada	90
Figura 26. Celda de flujo comercial con fibra óptica	90
Figura 27. Sistema FIA con mini columna para preconcentración	94
Figura 28. Mini columnas para preconcentración	94
Figura 29. Válvulas solenoide de aislamiento	100
Figura 30. Válvulas solenoide de estrangulación	100
Figura 31. Válvulas solenoide	101
Figura 32. Inserción de la muestra con una válvula solenoide	103
Figura 33. Inserción de varios segmentos de muestra con una válvula solenoide	103
Figura 34. Sistema multiconmutado para determinación de dextrosa	106
Figura 35. Sistema multiconmutado para determinación de Na, K, Mg y Ca	107
Figura 36. Diagrama de tiempos de conmutación de las válvulas para la determinación de Na, K, Mg y Ca	108
Figura 37. Tiempos de conmutación de las válvulas para la determinación de Na, K, Mg y Ca	108
Figura 38. Comparación de un sistema FIA y un sistema SIA	111
Figura 39. Componentes básicos de un sistema SIA	112
Figura 40. Comparación de los perfiles de dispersión FIA y SIA	112
Figura 41. Principios de SIA	114
Figura 42. Válvulas multiposición comerciales	115
Figura 43. Bombas de jeringa comerciales	115
Figura 44. Vista de un sistema nebulizador-cámara de mezclado y quemador	119
Figura 45. Esquema de sistema en flujo continuo	145
Figura 46. Esquema de sistema de inyección en flujo, FIA	146
Figura 47. Separador hidrostático	151
Figura 48. Separador gas-líquido usado en el laboratorio	152
Figura 49. Separador gas-líquido hidrostático comercial	152
Figura 50. Separadores gas-líquido con salida forzada comerciales	154
Figura 51. Separadores de membrana	155
Figura 52. Membranas separador gas-líquido comerciales	156

Figura 53. Atomizador con llama interna (FIT).....	164
Figura 54. Celda de cuarzo y sus accesorios.....	165
Figura 55. Diseño de celda de cuarzo con entrada de aire.....	168
Figura 56. Tautomería de zincón.....	179
Figura 57. Estructura de la molécula de Zincón.....	180
Figura 58. Estructuras de complejos Zn-zincón.....	182
Figura 59. Reacciones en el método de <i>Griess</i>	184
Figura 60. Vista de impresión de pantalla de <i>software</i> de adquisición de datos utilizado para la determinación de cobre y zinc.....	188
Figura 61. Vista de impresión de pantalla de <i>software</i> de adquisición de datos utilizado para la determinación de selenio.....	189
Figura 62. Ejemplo de selección del rango de trabajo.....	196
Figura 63. Errores tipo α y tipo β	198
Figura 64. Efecto de una interferencia en la señal instrumental medida.....	210
Figura 65. Comparación de pendientes que pone en evidencia el efecto matriz.....	211
Figura 66. Gráfico de calibración de adiciones estándar.....	212
Figura 67. Incertidumbre (U).....	214
Figura 68. Esquema del sistema FIA para determinación de cobre y zinc.....	231
Figura 69. Fotografía del sistema automatizado para determinación de cobre y zinc.....	233
Figura 70. Fotografía del sistema FIA para determinación de cobre y zinc.....	233
Figura 71. Espectros de blanco de reactivo zincón y complejos metal-zincón a pH 5 con citrato.....	235
Figura 72. Espectros de blanco de reactivo zincón y complejos metal-zincón a pH 9 sin agregado de citrato.....	236
Figura 73. Espectros de blanco de reactivo zincón y complejos metal-zincón a pH 9 con citrato.....	238
Figura 74. Sistema FIA con preconcentración, posición de carga.....	240
Figura 75. Sistema FIA con preconcentración, posición de inyección.....	240
Figura 76. Variación de la estructura de la resina Chelex al aumentar el pH.....	243
Figura 77. Selectividad para iones divalentes tomando como referencia al zinc.....	244
Figura 78. Registro de señales correspondientes a una disolución patrón de cobre 0.05 mgL ⁻¹ luego de la preconcentración.....	250
Figura 79. Registro de señales correspondientes a una disolución patrón de cobre 0.25 mgL ⁻¹ luego de la preconcentración.....	251
Figura 80. Registro de señales correspondientes a una disolución digerida de leche en polvo comercial, luego de la preconcentración.....	251
Figura 81. Curva de calibración para la determinación de zinc a pH 9.....	253
Figura 82. Registro de señales.....	254
Figura 83. Registro de señales correspondientes a una disolución con interferentes.....	255
Figura 84. Curva de calibración para la determinación de cobre a pH 5 con citrato/etanol.....	256
Figura 85. Registro de señales.....	256
Figura 86. Esquema del sistema SIA para determinación de zinc.....	266
Figura 87. Vista de impresión de pantalla del programa para ejecución de la secuencia de análisis, adquisición de datos y registro para determinación de zinc.....	267
Figura 88. Fotografía de parte del sistema en funcionamiento.....	268
Figura 89. Disposición tipo “sandwich” en la reacción de zinc con zincón.....	270
Figura 90. Superficie de respuesta para sensibilidad en función de pH-concentración de citrato.....	271
Figura 91. Superficie de respuesta para s_r (%) en función de pH-concentración de citrato.....	272
Figura 92. Curva de calibración para la determinación de zinc utilizando un sistema SIA.....	276
Figura 93. Curva de calibración para la determinación de zinc utilizando un sistema SIA, señales analíticas.....	277
Figura 94. Esquema del sistema SIA para determinación de nitrato y nitrito.....	290
Figura 95. Fotografía del sistema SIA para determinación de nitrato y nitrito.....	291
Figura 96. Fotografía del sistema automatizado para determinación de nitrato y nitrito.....	291
Figura 97. Fotografía del dispositivo batch utilizado para la determinación de nitrato y nitrito.....	292
Figura 98. Minicolumna de Cd construida en el laboratorio.....	295
Figura 99. Curva de calibración para la determinación de nitrato + nitrito.....	298
Figura 100. Curva de calibración para la determinación de nitrito.....	299
Figura 101. Estudio de la respuesta a bajas concentraciones para la determinación de nitrato + nitrito.....	300

Figura 102. Estudio de la respuesta a bajas concentraciones para la determinación de nitrito.	300
Figura 103. Registro de señales de una curva de calibración para la determinación de nitrato+nitrito	301
Figura 104. Vista de impresión de pantalla de un registro de señales analíticas.	301
Figura 105. Registro de señales analíticas para la determinación de nitrito.....	303
Figura 106. Esquema del sistema en flujo continuo para la determinación de selenio.....	320
Figura 107. Separador gas-líquido.	321
Figura 108. Sistema FIA para la determinación de selenio.	323
Figura 109. Registro correspondiente a curva de calibración y muestras.	332
Figura 110. Sistema multiconmutado de 3 válvulas con dos confluencias.	345
Figura 111. Esquema eléctrico, dirección de las señales	346
Figura 112. Sistema multiconmutado de 3 válvulas con una confluencia en forma de cruz.	349
Figura 113. Fotografía del sistema de 3 válvulas con confluencia en forma de cruz.	351
Figura 114. Sistema multiconmutado de 2 válvulas y confluencia en forma de cruz (a la izquierda) y diagrama de tiempos (a la derecha).	352
Figura 115. Fotografía del sistema en flujo con dos válvulas.	353
Figura 116. Fotografía del sistema en flujo acoplado al sistema de detección.	353
Figura 117. Impresión de pantalla del programa para control de secuencias y adquisición de datos. .	354
Figura 118. Comparación de pendientes de la curva de calibración utilizando agua y HCl como portador.	356
Figura 119. Influencia del caudal del gas portador.	357
Figura 120. Horno de microondas y olla para digestión de muestras de leche en polvo.	362
Figura 121. Disposición de los viales dentro de la olla para digestión de muestras de leche en polvo	362
Figura 122. Curva de calibración para la determinación de selenio mediante MCFA-HGAAS.	365
Figura 123. Registro de señales analíticas. Evaluación de linealidad y precisión.	366
Figura 124. Curva de calibración realizada en el trabajo de rutina para la determinación de selenio.	367
Figura 125. Diagrama de cajas (contenido de selenio en leches uruguayas).	385

Índice de tablas

Tabla 1. Composición aproximada de la leche	15
Tabla 2. Tipos de llama.....	120
Tabla 3. Hidruros volátiles de algunos analitos.	126
Tabla 4. Cifras de mérito para la determinación de cobre y zinc utilizando un sistema FIA.	258
Tabla 5. Resultados de las determinaciones de cobre y zinc en muestras de leche en polvo utilizando un sistema FIA.	259
Tabla 6. Resultados de la evaluación de veracidad de las determinaciones de cobre y zinc en muestras de leche en polvo utilizando un sistema FIA.	260
Tabla 7. Comparación de algunos parámetros de validación para el sistema FIA con y sin preconcentración.	260
Tabla 8. Estudio de la influencia del tamaño de las bobinas de retención y mezclado.....	273
Tabla 9. Resultados de la validación para la determinación de zinc utilizando un sistema SIA.	279
Tabla 10. Evaluación de veracidad (NIST 1549).....	280
Tabla 11. Evaluación de veracidad (NIST 1846).....	280
Tabla 12. Evaluación estadística de veracidad.....	281
Tabla 13. Comparación de desempeño de un sistema en flujo FIA y uno SIA para la determinación de zinc en leche en polvo y fórmulas infantiles.	282
Tabla 14. Resultados de la validación para la determinación de nitrato y nitrito	304
Tabla 15. Determinación de nitrato y nitrito: veracidad	305
Tabla 16. Determinación de nitrato y nitrito: veracidad prueba de significancia “t”	306
Tabla 17. Resumen de las condiciones ensayadas en el sistema de flujo continuo.	321
Tabla 18. Estudio de influencia de variables del sistema FIA. Diseño multivariante.....	325
Tabla 19. Variables y niveles para el diseño de optimización del sistema FIA.	326
Tabla 20. Diseño experimental compuesto, 4 variables y 3 niveles.	327
Tabla 21. Cifras de mérito (FIA).....	333
Tabla 22. Variación de secuencias de análisis en el <i>software</i>	347
Tabla 23. Secuencia de análisis, sistema con confluencia en cruz.	350
Tabla 24. Influencia del caudal del gas portador.	357
Tabla 25. Comparación de pendientes de calibración de calibración directa y adiciones estándar.....	369
Tabla 26. Concentraciones de potenciales interferentes en las muestras analizadas según se indica en la literatura.	370
Tabla 27. Concentraciones de potenciales interferentes en las disoluciones.	371
Tabla 28. Cifras de mérito de la determinación de selenio mediante un sistema MCFA.	373
Tabla 29. Contenido de selenio total obtenido en los materiales de referencia	374
Tabla 30. Evaluación de veracidad para la determinación de selenio total en leche fluida.....	375
Tabla 31. Contenido de selenio en leche fluida.....	378
Tabla 32. Contenido de selenio en suero en polvo.....	379
Tabla 33. Contenido de selenio en leche en polvo entera.	380
Tabla 34. Contenido de selenio en fórmulas infantiles.....	381
Tabla 35. Características de las formulaciones infantiles analizadas.....	381

1. Resumen

Palabras clave: Automatización, Análisis en Flujo, Leche.

En esta tesis se aplicaron técnicas de Análisis en Flujo para la automatización de las determinaciones de cobre, zinc, selenio total, nitrato y nitrito en leche en polvo, leche fluida y fórmulas infantiles.

Se mostraron las ventajas de utilizar sistemas en flujo para estas determinaciones. Se diseñaron, optimizaron y validaron sistemas de Análisis por Inyección en Flujo (FIA) para la determinación de cobre y zinc en leche en polvo y fórmulas infantiles, con detección mediante espectrometría de absorción molecular UV-visible.

Para la determinación de nitrato, nitrito y zinc se diseñaron, optimizaron y validaron también sistemas en flujo con inyección secuencial (SIA) con detección mediante espectrometría de absorción molecular UV-visible.

Se obtuvieron datos sobre el contenido de selenio total en leche en polvo y leche fluida de nuestro país utilizando un sistema en flujo multiconmutado (MCFA) con detección mediante absorción atómica con generador de hidruros, el mismo fue optimizado y validado, resultando adecuado para estas determinaciones.

Para cada determinación fue necesario optimizar un tratamiento de preparación de muestra adecuado. En el caso particular de la determinación de selenio se optimizó un método para mineralización de leche en polvo vía húmeda con

HNO₃ y H₂O₂ utilizando microondas. Para leche fluida se optimizó un método utilizando descomposición de la matriz con ultrasonido y ácidos.

Los resultados de las determinaciones realizadas con las técnicas en flujo propuestas resultaron comparables con los métodos oficiales actualmente utilizados por la AOAC (*Association of Oficial Analytical Chemist*), e IDF (*Internacional Dairy Federation*). Se utilizó material de referencia certificado, siempre que fue posible, para la validación. Las frecuencias de muestreo de los métodos desarrollados estuvieron entre 30-160 hora⁻¹.

Los resultados obtenidos son importantes debido a que pueden contribuir a completar las tablas nutricionales nacionales que permanecen incompletas agregando el contenido de selenio en leche.

Los valores de selenio total obtenidos estuvieron en el rango de 11.5 – 34.1 µg.L⁻¹ para leche fluida, 31 – 130 µg.kg⁻¹ para leche en polvo y 42 -138 µg.kg⁻¹ para fórmulas infantiles comerciales.

El desarrollo de esta tesis permitió emplear diversas técnicas de Análisis en Flujo rápidas y eficientes para las determinaciones para las que fueron propuestas con las ventajas de la automatización.

2. Siglas

FIA: Flow Injection Analysis

SIA: Sequential Injection Analysis

MCFA: Multicommutated Flow Analysis

HG-AAS: Hydride generation-Atomic Absorption Spectrometry

AAS: Atomic Absorption Spectrometry

SFA: Segmented Flow Analysis

FI: Flow Injection

CF: Continuous Flow

GLS: Gas Liquid Separator

GLC: Gas Liquid Chromatography

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

ICP: Inductively Coupled Plasma

SPE: Solid Phase Extraction

HEPA: High Efficiency Particle Arresting

3. Introducción

3.1. Matriz seleccionada: leche y fórmulas infantiles de base láctea

3.1.1. Importancia

La leche y otros productos derivados lácteos han sido reconocidos como alimentos importantes desde el año 4000 AC, esto ha quedado en evidencia por las pinturas en las rocas de Sahara que describen técnicas de lechería y en tumbas egipcias que datan del 2300 AC donde fueron encontrados restos de queso (Miller *et al.*, 2000).

La leche es la secreción de las glándulas mamarias de las hembras de mamíferos elaborada para la nutrición de sus crías. Es un líquido complejo que contiene muchos componentes en diferentes estados de dispersión; comprender sus propiedades exige el conocimiento de todos sus componentes y de los efectos que unos ejercen en otros.

Principales componentes

La calidad nutritiva de la leche está determinada por su composición, su valor como materia prima para fabricar productos alimenticios y muchas de sus propiedades.

En la tabla 1 se muestra una clasificación muy simplificada de los principales componentes de la leche y sus porcentajes aproximados.

Tabla 1 - Composición aproximada de la leche.

Componente	Contenido medio % (m/m)	Rango(b) % (m/m)	Porcentaje medio en base seca
Agua	87,3	85,5 - 88,7	
Extracto seco magro	8,8	7,9 - 10,0	69
Grasa de la materia seca	31	21 - 38	---
Lactosa	4,6	3,8 - 5,3	36
Grasa	3,9	2,4 - 5,5	31
Proteína	3,25	2,3 - 4,4	26
Caseína	2,6	1,7 - 3,5	20
Sustancias minerales	0,65	0,53 - 0,80	5,1
Ácidos orgánicos	0,18	0,13 - 0,22	1,4
Varios	0,14	----	1,1

Datos de leche de Holanda (tierras bajas), sin embargo rara vez se supera el valor máximo del rango (b). (Modificado de Walstra y Jenness, 1987, Miller *et al.*, 2000).

Los macronutrientes son componentes principales que se encuentran en mayor concentración (por ejemplo calcio); sin embargo, no son necesariamente los más importantes en todos los aspectos. Es el caso de las vitaminas, que se encuentran en concentraciones pequeñas son nutritivamente muy importantes al igual que los oligoelementos. Estos micronutrientes, son esenciales para el organismo y se consumen en pequeñas cantidades (del orden de los miligramos o microgramos). Las enzimas por ejemplo son catalizadores importantes de las reacciones que producen deterioro de la leche y algún otro componente de menor concentración que contribuye al sabor de la leche.

La lactosa es el azúcar característico de la leche que posee también otros carbohidratos pero sólo en cantidades muy pequeñas. La lactosa es un disacárido reductor constituido por glucosa y galactosa; da a la leche un sabor ligeramente dulce y constituye la principal fuente de carbono de la mayoría de los microorganismos que crecen en la leche (Thelwall, 1997).

La grasa de la leche la forman numerosos lípidos; los triglicéridos suponen más del 98 % de la grasa láctea. Entre otros lípidos presentes en la leche citaremos: colesterol, diglicéridos, ácidos grasos libres, fosfolípidos y cerebrósidos. Los ácidos grasos que forman parte de los lípidos de la leche son muy variados, pueden tener de 4 a 20 átomos de carbono y de 0 a 4 dobles enlaces (Walstra y Jenness, 1987, Miller *et al.*, 2000).

Existen diversos tipos de proteínas lácticas que se clasifican corrientemente como caseína (que son insolubles a un pH de 4-5) y proteínas del suero. Las primeras representan aproximadamente el 80% de las proteínas lácteas. La leche contiene numerosas “proteínas menores”, especialmente enzimas.

Los minerales de la leche son principalmente sales inorgánicas. Parte de la materia inorgánica, como los fosfatos, se une covalentemente a las proteínas. La leche contiene otros muchos elementos en pequeñas cantidades; la leche fresca tiene sales de ácidos orgánicos: el citrato es la más importante (Holt, 1997).

En la leche existen muchos componentes distintos; y a medida que van mejorando las técnicas analíticas se van identificando más componentes. Probablemente la leche contiene, en total, del orden de 100.000 especies moleculares distintas, pero la mayoría de ellas no se han identificado y ni siquiera aislado.

Estructura

La leche de vaca tiene una densidad media de 1.032 g.mL^{-1} . Es una mezcla compleja y heterogénea compuesta por un sistema coloidal de tres fases:

- Disolución: los minerales así como los hidratos de carbono se encuentran disueltos en el agua.
- Suspensión: las sustancias proteicas se encuentran con el agua en suspensión.
- Emulsión: la grasa en agua se presenta como emulsión. Una emulsión es una mezcla íntima de dos líquidos inmiscibles en la que un líquido que es la fase dispersa, discontinua o interna se mezcla en forma de pequeñas gotitas en otro líquido que se denomina fase continua, dispersante o externa. Se trata de una emulsión del tipo grasa en agua.

Las proteínas de la leche son buenos agentes emulsificantes.

Contiene una proporción importante de agua (cerca del 87%).

Las propiedades de un producto biológico no se establecen totalmente con su composición; debe conocerse también su estructura física (es decir, la disposición espacial de sus componentes). Además son importantes las

fuerzas que interactúan entre sus componentes que en definitiva son las responsables de la integridad de todo el sistema bajo condiciones diversas.

La leche posee una estructura relativamente simple y ha sido bien estudiada; sus principales elementos estructurales se muestran de forma esquemática en la figura 1.

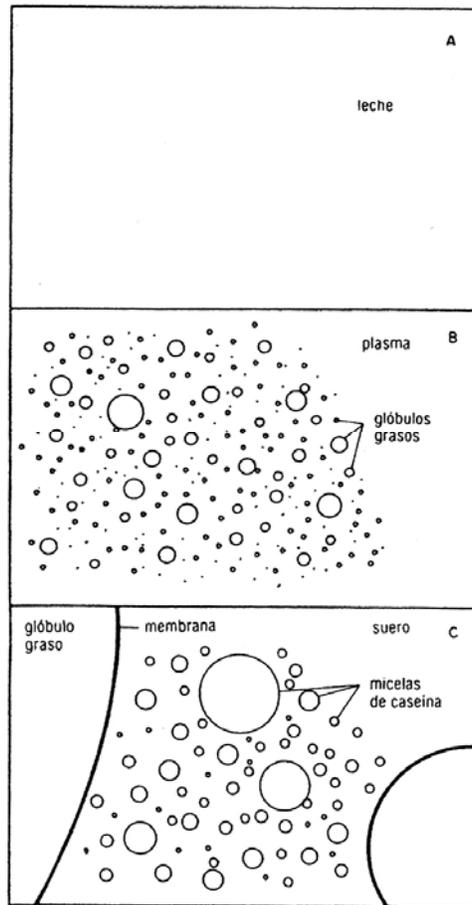


Figura 1. Esquema de la estructura de la leche, A: a simple vista, B: vista con aumento y C: vista con mayor aumento. (Extraído de Walstra y Jenness, 1987).

La leche, menos los glóbulos grasos, constituye el *plasma de la leche*; es casi igual pero no idéntico a la leche descremada; la separación (o descremado)

nunca es completa. Es común hablar de plasma y suero al referirse a las fracciones físicas de la leche -no de la sangre-, sin embargo estos términos se acuñaron para referirse al plasma y al suero sanguíneo.

Las micelas de caseína se componen de agua, caseína, sales y algunos componentes menores, incluidos lipasa y proteinasa; existen vestigios de caseína que están en solución sin formar parte de las micelas. Al pH de la leche (~6.7) la caseína retiene unidos, en general fuertemente, ciertos minerales, sobre todo Ca y Mg; por eso se dice que se presenta como caseinato. Las micelas de caseína contienen fosfato de calcio amorfo y pequeñas cantidades de citrato. A menudo se denomina fosfato coloidal, no porque se presente en un estado coloidal separado, sino porque forma parte de las partículas coloidales. Al conjunto se le denomina complejo caseinato cálcico-fosfato cálcico (Holt, 1997).

Las micelas de caseína se componen de partículas más pequeñas, llamadas subunidades o submicelas. Son aproximadamente esféricas y de un diámetro en torno a 10 nm; el espacio entre las subunidades lo ocupa el agua, o hablando estrictamente el suero lácteo. Las micelas presentan estructura abierta y contienen, al menos, 1.5 g de agua por gramo de proteína.

El suero lácteo se define como plasma menos micelas de caseína; la eliminación de las micelas de la leche descremada, coagulándolas con renina, origina un líquido denominado suero. Este suero no equivale exactamente al suero lácteo fundamentalmente porque contiene algunos polipéptidos derivados de la caseína por acción de la renina (Walstra y Jenness, 1987).

Las proteínas del suero de queso son las que se encuentran en este líquido; las proteínas no micelares de la leche deberían llamarse proteínas del suero, pero este término se emplea poco. Las proteínas del suero (de queso) son principalmente proteínas globulares que se presentan como tales o como pequeños oligómeros. Éstas se unen a algunos cationes y en menor medida a agua.

Las partículas lipoproteínas, llamadas a veces microsomas de la leche, varían en cantidad, composición y forma; están constituidas por restos de membranas celulares, micropelillos, etc. (Walstra y Jenness, 1987, Miller *et al.*, 2000).

Las células somáticas, sobre todo leucocitos de diversos tipos, pueden considerarse como partículas extrañas, aunque siempre se encuentran en la leche; tienen unos 10 μm de diámetro, son unas 100.000 por mililitro y suponen el 0,005% del volumen de la leche. Contienen, por supuesto, todos los componentes del citoplasma, principalmente ácidos nucleicos y enzimas; son ricas en catalasa. En ciertas leches, como la de vacas con mastitis, su número es mucho mayor (Walstra y Jenness, 1987).

En la figura 2 se muestran las proporciones de los componentes mayoritarios de la leche asociados a glóbulo graso o a micelas de caseína.

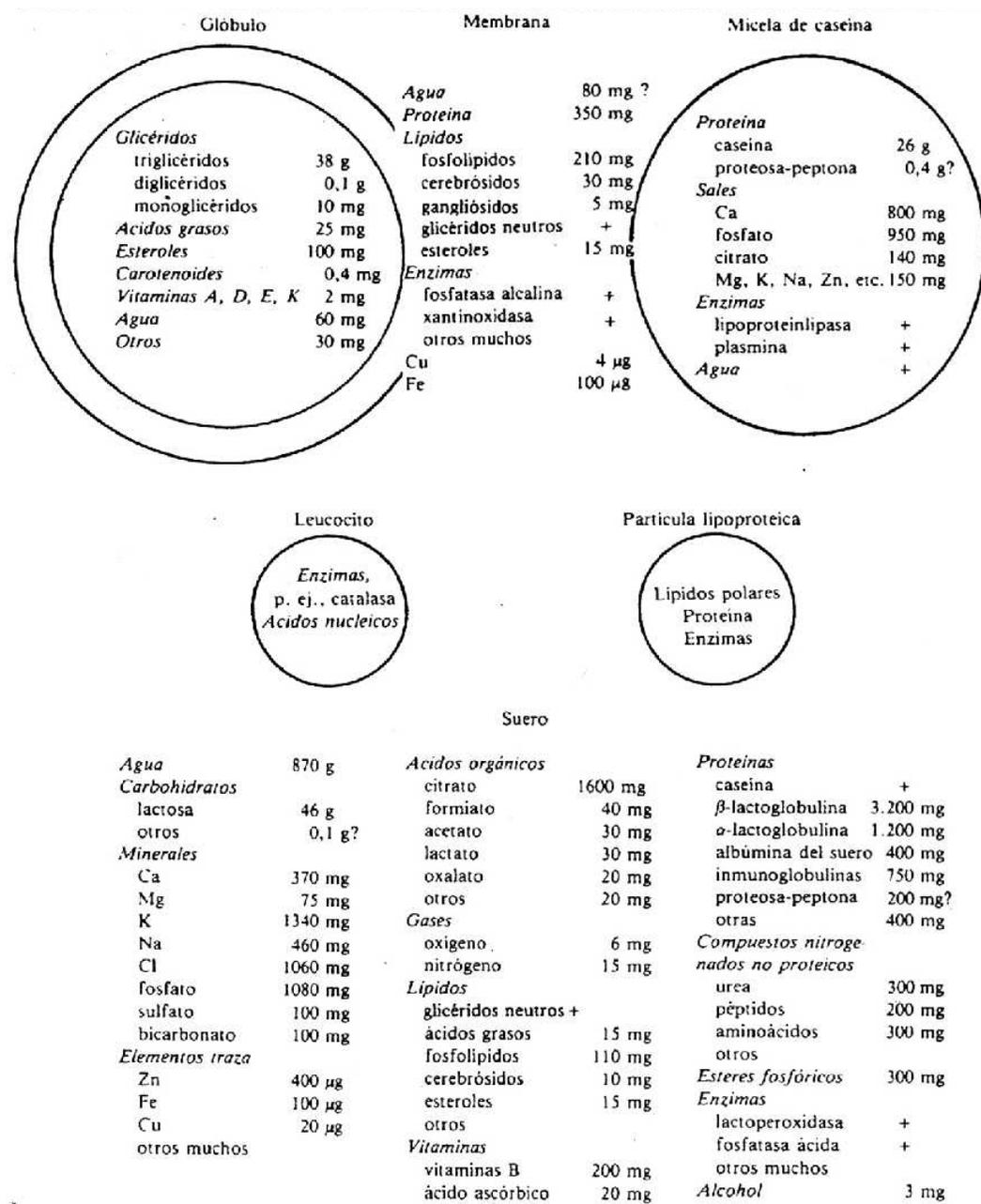


Figura 2- Composición y estructura de la leche. Cantidades medias en 1kg de leche. (Extraído de Walstra y Jenness, 1987).

Algunas propiedades

En la leche el componente mayoritario es el agua, constituyendo la fase continua; por lo tanto las propiedades de la leche son fundamentalmente las de un sistema acuoso.

Las sustancias polares se disuelven bien en la leche; su baja viscosidad permite que se mezcle fácilmente incluso por las corrientes de convección originadas por gradientes térmicos relativamente pequeños. Ello implica un rápido equilibrio de partición entre glóbulos grasos y plasma o entre micelas de caseína y suero; también significa que las sustancias apolares, especialmente las volátiles, pueden extraerse fácilmente ya que son solubles en los glóbulos grasos.

Las sustancias disueltas en el agua le confieren presión osmótica (~700 kPa), descenso crioscópico (-0.57 °C), conductividad eléctrica ($40 \cdot 10^{-4}$ - $50 \cdot 10^{-5}$ ohm.cm⁻¹), pH (~6.7), fuerza iónica (~0.08 M) y actividad del agua (~0.993) (Walstra y Jenness, 1987).

La leche puede modificarse fácilmente; posee muchos componentes capaces de reaccionar y sufre muchos cambios químicos, sobre todo cuando se calienta. En la práctica lactológica industrial en raras ocasiones se modifica deliberadamente la composición química de la leche. También puede sufrir transformaciones enzimáticas y la mayoría de los microorganismos crecen bien en ella debido a su variedad de nutrientes y a otras condiciones favorables (pH, a_w , potencial redox). De aquí que la leche pueda fermentarse de diversas formas. Sus fases pueden separarse mediante procesos, como la

centrifugación, que origina leche descremada y crema, y la coagulación que produce suero y coágulo. Además se le pueden aplicar los procesos de separación molecular corrientes en la industria alimentaria, como concentración, desecación, procesos de filtración por membrana y cristalización. Con ellos y ciertas transformaciones físicas, como batido, pueden elaborarse muchos productos a partir de la leche.

Aunque la leche en sentido cualitativo tiene una composición y propiedades constantes, presenta variaciones cuantitativas considerables. La composición química, el tamaño y la estabilidad de los componentes estructurales y las propiedades físicas difieren de unos lotes de leche a otros. Ello puede deberse a variaciones naturales o a cambios que ocurren después del ordeño.

Las variaciones naturales de la leche pueden deberse a las siguientes causas: genéticas (variabilidad entre razas e individuos), fisiológicas (si está en fase de lactación, edad, celo, gestación, estrés), ambientales (alimentación, clima). Lo que ocurre generalmente es que la cantidad de leche producida varía más que su composición.

La leche se manipula en su mayor parte en grandes cantidades que resultan del ordeño de muchísimas vacas; tal mezcla reduce las variaciones. Las principales diferencias entre lotes distintos de leche de mezcla se deben a la estación (climática), que generalmente se correlaciona con la fase de lactación y a regiones geográficas distintas que difieren en la raza vacuna predominante o en las prácticas alimentarias de los animales.

Existen además leches que son diferentes como ser:

Calostro: la primera secreción obtenida después del parto difiere mucho de la leche normal; es muy rica en proteínas del suero y a menudo tiene sangre.

Leche de una mama enferma o mastítica: su composición se aproxima más a la del suero sanguíneo. Contiene muchos leucocitos y otras varias aberraciones.

Contaminantes que llegan a la leche durante o después del ordeño: pueden estar constituidos casi por cualquier cosa, como desinfectantes, pesticidas, iones metálicos y polvo.

La leche en el interior de la ubre es estéril. Un ordeño y una manipulación adecuados eliminan en gran parte la contaminación, pero a la leche llegan inevitablemente algunos microorganismos.

Debe hacerse notar que, por intermedio del animal, con el pienso también pueden llegar a la leche componentes extraños; ciertos contaminantes (p. ej., pesticidas) pueden metabolizarse en el animal. Generalmente la vaca actúa como filtro de las sustancias extrañas, pero la eficacia de esta filtración difiere mucho con el tipo de producto.

Composición total

La leche fresca generalmente apenas contiene nitrato (como máximo 5 mg por kilogramo y normalmente mucho menos) y carece de nitrito. La determinación de nitrato y nitrito en leches concentradas en polvo y fórmulas infantiles fueron realizadas en esta tesis.

No todas las sales se encuentran en disolución; las micelas de caseína contienen fosfato cálcico sin disolver y un poco de citrato; al primero se le denomina “fosfato cálcico coloidal”. Algunos cationes y especialmente el Ca^{2+} y el Mg^{2+} se asocian a las proteínas cargadas negativamente. Casi todas las sales se encuentran en el suero y en las micelas de caseína y una cantidad muy pequeña está unida a los glóbulos grasos.

La leche contiene fósforo en diversas formas; está presente todo como ortofosfato, pero parte está unido a los componentes orgánicos, o esterificando a los radicales de serina y treonina de la caseína, o a diversas moléculas más pequeñas, como las hexosas y el glicerol y a los fosfolípidos. Contiene unos 0.36 g.kg^{-1} de azufre, pero la mayor parte del mismo se encuentra en los radicales de metionina y cisteína de las proteínas. Un 10% aproximadamente se presenta como sulfato inorgánico.

Se consideran naturales los componentes de la leche que se encuentran en la leche recién ordeñada que se han detectado en todas o casi todas las muestras de leche estudiadas. Existen otras sustancias que llegan a la leche

accidentalmente o debido a acciones químicas y bacterianas después de obtenida. Muchos de los componentes naturales son productos intermediarios de los procesos metabólicos que tienen lugar en la glándula mamaria. Por conveniencia se dividen en gases; elementos traza; alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos; compuestos nitrogenados no proteicos; compuestos azufrados; sustancias conjugadas; ésteres fosfóricos; nucleótidos y ácidos nucleicos y hormonas.

Las mejoras en los límites de detección y la selectividad de los métodos analíticos han dado lugar a un aumento considerable de los productos detectados en la leche.

En la leche normal se han detectado elementos traza por métodos espectrométricos y químicos. Son escasos los datos disponibles sobre concentraciones y forma de presentación, si bien el Mo parece encontrarse exclusivamente en la xantinoxidasa y el Co solamente en la vitamina B12. El hierro es un componente esencial de la xantinoxidasa, de la lactoperoxidasa y de la catalasa, siendo necesario para la acción de la sulfhidriloxidasa. El oligoelemento más abundante de la leche es el Zn ($\sim 3 \text{ mg.kg}^{-1}$); el 85% del Zn se asocia a las micelas de caseína (predominantemente como parte del fosfato coloidal) y quizás un pequeño porcentaje a los glóbulos grasos. El Cu ha sido muy estudiado por su interés en la auto oxidación de los lípidos de la leche; el contenido natural de Cu de la leche es de unos $20 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$, del que aproximadamente el 10% se encuentra en la membrana de los glóbulos grasos; en el calostro puede haber más de $100 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ La leche contiene unos 200

$\mu\text{g.kg}^{-1}$ de Fe del que casi la mitad está en las membranas. El Mn ($\sim 20 \mu\text{g.kg}^{-1}$) tiene importancia en el metabolismo de algunas bacterias lácticas, especialmente para la fermentación del citrato, y en algunas leches el contenido de Mn es demasiado escaso para la producción de diacetilo; el Fe y el Mn no catalizan la oxidación lipídica de los productos lácteos (Flynn y Cashman, 1997, Miller *et al.* 2000, Tabla de composición de alimentos de Uruguay, 2002).

Los elementos traza llegan a la leche o por medio de la vaca productora, o por contaminación posterior al ordeño. Las concentraciones de algunos de estos elementos en la leche (por ejemplo, B, Br, Co, Mn, Mo, Se, Zn) pueden aumentarse incrementando su nivel en la ración de las vacas productoras. La leche de vacas criadas en la vecindad de ciertas plantas industriales puede presentar concentraciones relativamente grandes de Cd y Pb; las vacas explotadas cerca de las autopistas producen leche muy rica en Pb. El contacto de la leche con recipientes y equipos metálicos constituyen una vía importante de contaminación con Cu, Fe, Ni y Sn.

Uruguay es un importante productor regional del leche y derivados lácteos, industrializa aproximadamente 1400 millones de litros por año, y las exportaciones originadas por el sector (aproximadamente 400 millones de dólares en el 2008), representan aproximadamente el 7% del total de las exportaciones del país.

Las exportaciones de Uruguay de productos lácteos, acumuladas a octubre de 2008, podrían haber alcanzado 353 millones de dólares, según lo publicado por

el anuario 2008-OPYPA (Vidal, 2008), del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Según esta misma fuente las leches en polvo habrían acumulado a esa misma fecha 140 millones de dólares en ventas al exterior.

En términos de destino de exportación, el principal mercado es el venezolano y mexicano en los dos primeros lugares, le siguen Cuba y Brasil, pero número de países destino de exportación supera los 70 (Vidal, 2008).

Para el año 2009 las predicciones y perspectiva no eran buenas, esperándose una caída de la producción en la industria lechera, debido a la sequía que afectó a Uruguay desde fines del 2008 y que continúa en el 2009 (Vidal, 2008).

Los niños, y especialmente los recién nacidos, tienen una mayor velocidad de crecimiento, y son más sensibles que los adultos a una deficiencia de los elementos esenciales. Esto tiene que ver con su rápido metabolismo y, por la misma razón, tienen también una mayor absorción de los elementos tóxicos.

Es de gran importancia que todos los nutrientes estén presentes en la leche y además en el intervalo de concentraciones requerido para cubrir las necesidades del niño en crecimiento. Esto es de especial importancia para aquellos elementos que no son almacenados por el feto durante su crecimiento en el útero materno (como ocurre con el Se y el Zn) requiriendo una inmediata y correcta suplementación externa ya desde el nacimiento; en el caso de otros oligoelementos (Fe y Cu) el organismo puede tener reservas para proteger al recién nacido (López Sastrea *et al.*, 2003).

En principio, la leche materna es el alimento “ideal” para el recién nacido ya que contiene todos los macro- y micro-nutrientes y en las dosis adecuadas.

Sin embargo existen múltiples razones por las que un niño puede no recibir leche materna o necesite complementar su nutrición, por tanto, las fórmulas lácteas con las que se alimenta a niños prematuros y/o de bajo peso deberían ser lo más parecidas posible a la composición de la leche materna.

Por lo tanto es necesario realizar análisis químicos para establecer la composición de la leche materna y así poder establecer los niveles de oligoelementos en las fórmulas comerciales, y además realizar el control de calidad que éste tipo de productos requiere.

3.1.2. ¿Por qué automatizar los análisis químicos de productos lácteos? – Presentación del desafío analítico.

En esta sección plantearemos el desafío analítico de esta tesis pero para comprender bien esto, comenzaremos diciendo que las determinaciones analíticas pueden describirse como un proceso que involucra una serie de etapas, cada una de las cuales consiste en la aplicación de una serie de operaciones unitarias. Las etapas involucradas en todo proceso analítico son: muestreo, tratamiento de muestra, medición analítica, procesamiento e interpretación de datos y resultados y emisión de reporte final.

Otro concepto importante es el aseguramiento de la calidad de los procesos analíticos, esto implica que cada una de las etapas del proceso debe ser bien planificada y ejecutada para obtener resultados confiables.

Se presentarán a continuación algunas definiciones, no sin antes comentar que las definiciones y términos empleados en Química Analítica son objeto de discusión y confusión muchas veces. Existen organismos que a través de sus publicaciones ofrecen definiciones y criterios que buscan armonizar la terminología de manera de utilizar un lenguaje común.

En esta tesis los términos y definiciones usadas fueron de acuerdo a IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry) publicadas en el compendio de nomenclatura analítica y en algunos casos también se utilizó la guía EURACHEM, según su publicación "The fitness for purpose of analytical methods" (Holcombe, 1998).

El término automatización se define como “el uso de combinaciones de dispositivos químicos e instrumentales para reemplazar, refinar, extender o suplementar el esfuerzo y facultades humanas en la realización de un determinado proceso, en el cual al menos una operación importante es controlada, sin intervención humana, por un sistema retroalimentado”. (IUPAC, 1998).

IUPAC distingue entre los términos “mecanización” y “automatización”, indicando que la diferencia se encuentra en que mecanización no involucra retroalimentación (feedback) y automatización sí. La retroalimentación es “el proceso por el cual la salida de un dispositivo es usada para modificar la operación de un instrumento analítico” (IUPAC, 1998), en definitiva si el sistema es capaz de modificar su comportamiento en función de información “de entrada” recibida del ambiente y tomar decisiones.

Ya definidos algunos términos podremos ahora responder a la pregunta: “¿porqué automatizar un proceso analítico?”.

La propia definición ya nos indica parte de la respuesta a esta pregunta, un proceso automatizado aumenta la productividad en un laboratorio pues una vez optimizado el sistema para trabajo de rutina es capaz de procesar muchas muestras por unidad de tiempo, con mínima intervención humana. Mejora la confiabilidad del proceso aumentando su precisión, consideremos que no se ve afectado por el cansancio del operador, puede funcionar durante tiempos prolongados (más horas que un operador humano) sin tiempos muertos. Esto por otra parte libera a los operadores de tareas rutinarias y tediosas y los deja

menos expuestos a situaciones donde pueden estar en contacto con productos tóxicos.

Los sistemas automatizados trabajan en general con reducción de escala, esto es reducción de consumo de reactivos, muestra y la consiguiente generación de menor cantidad de residuos tóxicos.

Los efectos que pueden causar errores humanos en el proceso analítico quedan prácticamente reducidos a ingresar mal parámetros de operación en una computadora, dado que los errores de manipulación desaparecen.

Y en definitiva todo lo expuesto trae como consecuencia un efecto sobre los costos, es entonces que debe evaluarse la relación costo-beneficio (Stockwell, 1996).

Poner en funcionamiento un sistema automatizado tiene costos de inversión importantes. Sin embargo el poder procesar muchas más muestras por unidad de tiempo, con mucho menos personal, mejorar la precisión, consumiendo menos reactivos por muestra y en forma más confiable, hace sin duda que el balance sea favorable hacia la automatización.

En el capítulo 5, se discute para cada sistema desarrollado, como esto es cierto teniendo en cuenta que los sistemas desarrollados procesan entre 60 y 160 muestras por hora dependiendo del caso, cuando algunos métodos manuales no superan 2 muestras por hora.

Para la automatización de los análisis de productos lácteos seleccionados en esta tesis se emplearon técnicas de Análisis en Flujo. En la sección 3.2 se explicará claramente que es el Análisis en Flujo y cuales fueron las técnicas

empleadas, pero a esta altura solo definiremos qué es Análisis en Flujo para poder plantear claramente el desafío analítico de esta tesis y el porqué de su título.

Análisis en Flujo es definido por IUPAC como “el nombre genérico para todos los métodos analíticos que están basados en la introducción y procesamiento de muestras de ensayo en un medio en flujo” (IUPAC, 1998).

La automatización de una determinación analítica y el Análisis en Flujo se acoplan perfectamente, desde la introducción de una muestra líquida al sistema en flujo, la toma de la alícuota necesaria para la determinación de uno o varios analitos, la preparación de la muestra, el mezclado con reactivos, la introducción de la misma al sistema de detección y su posterior descarte, todo puede ser automatizado. Además cuando la muestra se encuentra en la zona de detección, la obtención de la señal analítica y procesamiento de datos hasta la obtención del reporte final, también puede ser automatizado.

La importancia de la matriz seleccionada ya fue explicada en la sección 3.1.1. Los métodos aceptados y utilizados en los laboratorios de control para realizar las determinaciones de diversos analitos en leche y sus derivados son los publicados en AOAC (*Association of Oficial Analytical Chemists*, 1996) en el capítulo 9 dedicado a elementos traza e IDF (*Internacional Dairy Federation*, 1992) en su primer boletín sobre el mismo tema.

Muchos de los métodos allí publicados son sumamente lentos y requieren mucha manipulación del operador. En la sección 3.1.3 se explicará porqué se seleccionaron determinados analitos para el desarrollo de esta tesis, pero uno

de los ejemplos más representativos de la necesidad de algún grado de automatización que será discutido en esta tesis es la determinación de nitrato y nitrito en leche en polvo. Si bien ya la norma IDF: 189-1 (2001(E)) prevé el uso de un sistema en flujo como una de las alternativas, aún así no está totalmente automatizado y es un sistema complicado y lento.

En el caso de análisis de elementos traza en leche, es un tema complicado y requiere tratamientos especiales de muestra, involucra mucha participación del operador y eso trae riesgos de contaminación.

En particular en Uruguay no tenemos información de que los laboratorios realicen de rutina la determinación de elementos traza en leche. Sí bien algunos de los laboratorios más reconocidos de nuestro país tienen sus propios procedimientos de preparación de muestra y los adaptan para realizar determinaciones. Muchas veces es muy difícil cumplir exactamente con los requisitos de las normas, en general debido a que no se cuenta con la instrumentación adecuada.

La determinación de selenio total en leche aparece por primera vez en una publicación de el boletín de IDF en el 1992 (*Bulletin of the Internacional Dairy Federation* N° 278/1992), proponiendo un método fluorimétrico (Ihnat, 1996), que aún hoy se sigue utilizando, aunque es bien sabido que la determinación se puede realizar utilizando técnicas de absorción atómica como la generación de hidruros o la atomización electrotérmica.

En Uruguay no se han encontrado datos publicados que aporten información sobre el contenido de selenio en leche.

En suma, el desafío analítico de esta tesis fue automatizar, con todo lo que su definición implica, análisis de productos lácteos que han sido históricamente complejos y lentos, utilizando técnicas modernas de Análisis en Flujo.

3.1.3. Selección de los analitos a ser estudiados

Entre los analitos seleccionados: zinc, cobre y selenio son sin duda de gran importancia nutricional. Todos ellos se encuentran en la leche vacuna en bajos niveles, en el caso del selenio es un elemento traza cuya determinación analítica necesita de técnicas muy sensibles. Los elementos traza son esenciales para muchas funciones metabólicas en el cuerpo humano.

Los datos sobre el contenido de minerales y elementos traza de los alimentos (tablas nutricionales) son críticos para las personas involucradas en la investigación epidemiológica y patrones de enfermedades, evaluación de la salud y estado nutricional de los individuos y poblaciones. Este tipo de información se usa para determinar políticas de gobierno a nivel regional y nacional en relación a los programas de nutrición y alimentación.

Las fórmulas infantiles son básicamente leche vacuna modificada adicionada de nutrientes. Todas las fórmulas infantiles comerciales contienen sales de zinc y cobre agregadas, y recientemente se está incorporando cada vez más el agregado a las mismas de selenio, por lo que las determinaciones analíticas son parte del control de calidad de estos productos como rutina de los laboratorios correspondientes.

La determinación de cobre y zinc en particular se puede realizar en forma simultánea utilizando un sistema en flujo, por lo que desde el punto de vista

analítico es un desafío interesante para la resolución de un sistema de dos componentes.

Como ya se mencionó no se han encontrado datos publicados en nuestro país sobre la concentración de selenio en leche, por lo que los datos obtenidos son una primera aproximación a conocer más sobre la composición del producto. Si se ha reportado por parte de un grupo de investigación de São Carlos, Brasil, el contenido de selenio total en tres muestras de leche bovina fluida (dos descremadas y una entera), éste es el único dato encontrado en la literatura (Aleixo y Nóbrega, 2003).

Creemos que sería importante para nuestro país completar las tablas nutricionales que hoy en día figuran incompletas en cuanto a niveles de selenio total en leche (Ministerio de Trabajo y Seguridad Social, 2002).

La automatización de la determinación de selenio es el planteo más completo en cuanto a los objetivos de esta tesis, debido a la complejidad en el diseño del sistema en flujo que requiere separación gas-líquido, tratamientos de muestra especiales debido a matriz estudiada y acoplamiento al sistema de detección HG-AAS debiéndose alcanzar niveles de detección menores a $1 \mu\text{g.L}^{-1}$.

También se pone a punto en este trabajo un sistema para la determinación de nitrato y nitrito en leche en polvo, dicha determinación es muy lenta como ya se mencionó cuando se siguen los métodos de referencia que no son en flujo. La determinación de estos analitos es muy importante en leches en polvo y fórmulas infantiles. Su presencia es indicador de contaminación en el proceso

de manufactura y contaminación microbiana, y la población a la que están dirigidos estos productos es muy sensible a los efectos adversos que estas sustancias pueden producir. En el caso de las fórmulas infantiles se trata de productos no estériles por lo que el producto final puede llegar a tener algún grado de contaminación, esto hace que el control de calidad del mismo sea crítico.

3.1.4. Metales

3.1.4.1. Zinc

El término zinc fue usado por primera vez por Löhneyes, en 1697. Es uno de los elementos más comunes encontrados en la tierra. Puede ser encontrado en el aire, en el suelo, en el agua y está presente naturalmente en los alimentos.

Actualmente hay cinco sales de zinc que son clasificadas como sustancias GRAS (Generally Recognized as Safe), que pueden ser utilizadas como suplementos de la dieta y por tanto agregadas a alimentos: sulfato de zinc, cloruro de zinc, gluconato de zinc, óxido de zinc y estearato de zinc (aunque estos dos últimos tienen baja biodisponibilidad).

Es un metal esencial para los seres vivos, por lo que tanto su ausencia como una exposición excesiva pueden traer efectos nocivos. Es un oligoelemento necesario para el crecimiento normal y desarrollo del hombre. Las deficiencias de zinc se manifiestan en la regulación de la síntesis de ADN y ARN.

Es importante también en la replicación celular y en los procesos de crecimiento y reparación de tejidos. La primera deficiencia de zinc reportada en Medio Oriente se manifestó en anemia, disfuncionalidad e inmadurez sexual (Soares da Silva, 2003).

Existen más de 200 enzimas que utilizan zinc como cofactor por lo que su deficiencia traerá problemas en el funcionamiento de las mismas. Juega un papel fundamental en la regulación de la transcripción, uniéndose a proteínas

nucleares, para formar complejos llamados “zinc fingers” (Soares da Silva, 2003).

La forma biológicamente activa es Zn(II). En solución acuosa al elevar el pH tiende a formar un precipitado correspondiente al hidróxido a menos que haya presente otras especies que puedan formar complejos solubles como lo son los aminoácidos y otros ácidos orgánicos (Soares da Silva, 2003).

Las relaciones de cobre, hierro y zinc consumidas en la dieta por el hombre son muy importantes. La fortificación con zinc en la dieta puede tener efectos adversos en la entrada de cobre y hierro ya que al aumentar los niveles de zinc en la dieta, esto traerá como consecuencia que los requerimientos de cobre también aumenten.

Por este motivo en algunos países se toma en cuenta la relación hierro/zinc y las fortificaciones en los alimentos deben cumplir con las relaciones recomendadas de manera de mantener la correcta disponibilidad de cobre, hierro y zinc ya que la biodisponibilidad de uno y otro están muy relacionadas entre sí.

La intoxicación por exceso de zinc no es muy común, pero hoy en día aparece con más frecuencia debido al mal uso de complementos y suplementos vitamínicos que contienen zinc (recomendado para combatir el estrés). El exceso de zinc puede desencadenar respuestas inmunes adversas y afectar el perfil lipídico en suero; causará además debido a lo ya explicado en relación al cobre, deficiencia de cobre y anemia (Soares da Silva, 2003).

La ingesta recomendada diaria, RDA¹ (del inglés Recommended Daily Allowances), es el nivel promedio diario de consumo que se considera suficiente para satisfacer los requerimientos de nutrientes de cerca de todas (97% - 98%) las personas saludables en una etapa específica de la vida y grupo de género.

La ingesta recomendada diaria para adultos de zinc es 15 mg, pero para desarrollar efectos por intoxicación la dosis debe llegar a 400 mg por día (Flynn y Cashman, 1997).

En relación a la matriz en estudio en esta tesis, el zinc es un constituyente natural en la leche de vaca. Los productos lácteos en general son considerados una buena fuente de este elemento ya que aporta zinc asimilable a la dieta. Los productos derivados de la leche pueden contener una concentración media de 4.6 mg kg⁻¹ (IDF, 1992, Millar *et al.*, 2000, Ministerio de Trabajo y Seguridad Social, 2002).

La principal fuente de zinc en la leche de vaca es la que proviene de la dieta del animal, sin embargo incrementar el contenido de zinc en la dieta del mismo no hace que aumente directamente la concentración de zinc en la leche y tampoco varía estacionalmente en forma significativa (Flynn y Cashman, 1997).

Nota 1: El término RDA aparece en la literatura como ingesta diaria o ingesta dietaria recomendada, está siendo revisado para llamarse DRI (Dietary Reference Intake) (Food and Agricultural Organization (FAO), 2000).

La mayor proporción de zinc en la leche vacuna se encuentra en la fracción desnatada, solo de 3 – 14% aparece en la fracción lipídica. Más del 95% de metal presente en la fracción desnatada se encuentra unido a las micelas de caseína, el resto se una a compuestos de bajo peso molecular, probablemente citrato (*Bulletin of the International Dairy Federation* N° 278/1992, Flynn y Cashman, 1997)

3.1.4.2. Cobre

El cobre fue descubierto cerca del 9500 A.C., en el actual Irak. La isla de Chipre era la mayor fuente de cobre en el mundo antiguo. La palabra cobre viene de *cuprum*, nombre romano para el metal de Chipre.

Al igual que el zinc, es un elemento esencial para la biota. Fue identificado en plantas y animales en el siglo XIX y proclamado como catalizador biológico en el siglo XX (Menezes Pedrozo, 2003).

La bioacumulación es definida como la red de absorción del cobre por los microorganismos, plantas o animales a partir de su entorno (agua, sedimento, suelo y dieta). La biodisponibilidad puede ser influenciada por la especie del metal o bien por otras propiedades físico-químicas del medio. El cobre presenta en general una biodisponibilidad limitada en el medio ambiente, algunas especies son capaces de bioacumularlo como por ejemplo especies marinas, peces, algas (Menezes Pedrozo, 2003).

La concentración en los alimentos varía de país en país de acuerdo con el tipo de producto, las condiciones, de cultivo (suelo, agua, uso de fertilizantes y fungicidas que puedan contener cobre), el tipo de procesamiento, el pH, el tipo de envases o el uso de utensilios de cobre, en general la mayoría de los alimentos contiene menos de 10 mg.kg^{-1} (Menezes Pedrozo, 2003). Se ha reportado un contenido de hasta 60 mg.L^{-1} en leche hervida en olla de cobre. En la leche el cobre se une a la caseína y es liberado con el pH ácido del estómago para su absorción. El chocolate puede contener más de 5 mg.kg^{-1} ,

algunos alimentos con elevado tenor de cobre son por ejemplo las frutas secas, cereales, nueces y moluscos (Flynn y Cashman, 1997).

Por ser considerado un elemento esencial puede ser adicionado en algunos alimentos. La forma química y los niveles de otros elementos esenciales interfieren en su absorción. Más del 25% de los suplementos vitamínicos comercializados en la actualidad contienen cobre, algunos de ellos contienen óxido de cobre el cual es poco absorbido, otras contienen sulfato o cloruro de cobre que tienen una elevada disponibilidad. En los alimentos infantiles, la mayoría presenta agregado de hierro y zinc sin que se alcance la concentración de cobre nutricionalmente significativa.

La ingesta diaria media de cobre según el país puede variar entre 0.8 hasta 1.7 mg/día (WHO, 1998).

La biodisponibilidad del cobre en leche es muy elevada en los individuos más jóvenes de todas las especies. La leche humana tiene una de las concentraciones más elevadas de cobre entre los mamíferos, entre 0.25 a 0.60 mg.L⁻¹. En leche de vaca esa concentración es hasta 4 veces menor respecto a la leche humana y la distribución del metal entre las fracciones proteicas de diferentes pesos moleculares y la fracción lipídica son bastante diferentes (Flynn y Cashman, 1997).

La absorción de cobre a lo largo del tracto gastrointestinal, puede ser modificada por el pH, por los macronutrientes presentes en la dieta y por factores patológicos.

Los cationes divalentes zinc y calcio provocan un efecto negativo en su absorción, así como también el hierro. El antagonismo entre cobre y zinc es conocido desde hace mucho tiempo, las concentraciones séricas y hepáticas de cobre decrecen linealmente en función del logaritmo de la concentración de zinc cuando ésta última aumenta en la dieta. Si la ingesta de zinc por algún motivo por ejemplo pasa de 5 a 20 mg/día, el ingreso de cobre necesita aumentar un 60% para mantener el equilibrio. Con hierro también existe una competencia en el proceso de absorción intestinal, esto es particularmente interesante cuando se formulan los preparados infantiles con alto contenido de hierro o cuando a las mujeres embarazadas se les recomienda el consumo de hierro no previendo el desbalance que ocurre con el cobre, en estos casos los requerimientos de cobre aumentan significativamente y los riesgos de deficiencia de cobre aumentan (Seiler, 1988).

El molibdeno también puede promover deficiencia de cobre ya que es capaz de retirarlo de la dieta por formación de molibdato de cobre que no es una especie absorbible.

El cobre absorbido por la mucosa intestinal es transportado al hígado, por la vía porta, unido principalmente a la albúmina. El hígado secuestra el cobre absorbido y lo redirecciona a través de la sangre a otros tejidos. En la sangre se encuentra distribuido en eritrocitos y plasma, en el hombre el 80 a 90% del cobre plasmático está firmemente unido a la ceruloplasmina, el resto se une a albúmina y otros aminoácidos. En las intoxicaciones agudas por cobre el exceso de cobre se une preferentemente a la albúmina.

La ceruloplasmina es sintetizada en los riñones, presenta 6 a 8 átomos de cobre (II) fuertemente ligados a ella. Además del transporte de cobre, presenta actividad ferroxidativa, facilitando la oxidación de Fe(II) a Fe(III):

La ceruloplasmina se une a receptores de membrana de las células de otros tejidos, los que inducen un cambio de la proteína promoviendo la liberación de los átomos de cobre. Los niveles plasmáticos de la ceruloplasmina son regulados por el hígado (Seiler, 1988, Menezes Pedrozo, 2003).

Las dietas deficientes de cobre disminuyen la concentración de cobre hepático, de metalotioneína, y la actividad de la cobre-zinc superóxido dismutasa. La síntesis de ceruloplasmina se ve activada por el hígado y esta actividad es disminuida o eliminada en aquellos que presentan la enfermedad de Wilson.

El cerebro es el segundo lugar de acumulación de cobre.

Por tanto la esencialidad de este metal se debe a su incorporación en un gran número de enzimas y proteínas estructurales, utilizado como cofactor en diversas enzimas celulares como catalasa, citocromooxidasa entre otras.

Las cantidades de cobre requeridas por un niño varían de 0.1 a 0.5 mg.kg⁻¹ de peso por día, los adultos necesitan de 0.002 a 0.05 mg.kg⁻¹ de peso por día. El requerimiento diario de lactantes y niños se estima en 0.05 y 0.1 mg.kg⁻¹, para adultos 2 a 3 mg es lo recomendado (RDA).

Las manifestaciones de deficiencia del metal incluyen disfunciones cardíacas, aumento de lipoproteínas de baja densidad, disminución de metionina y encefalina leucínica, disminución de cobre-zinc superóxido dismutasa eritrocitaria y disminución de la depuración de glucosa. El síndrome de Menkes es un desorden recesivo ligado al cromosoma X, que ocurre en

aproximadamente 1 entre 200 mil nacidos vivos, las condiciones clínicas de estos individuos son concordantes con el estado de deficiencia de cobre, caracterizada por anomalías óseas, retardo mental severo, degeneración neurológica.

La deficiencia de cobre durante los períodos embriogénicos y fetales de gestación puede resultar en numerosas anomalías bioquímicas y estructurales.

La enfermedad de Wilson es una dolencia metabólica recesiva, autonómica, hereditaria. Esta anomalía promueve una toxicidad crónica por cobre al causar un defecto en el transporte del metal. Bajas concentraciones de ceruloplasmina facilitan entonces la acumulación del cobre en primer lugar en el hígado, seguido del cerebro y luego el resto de los órganos. El cobre no puede excretarse por vía biliar. Algunas manifestaciones clínicas de la enfermedad de Wilson son: cirrosis, hepatitis crónica, rigidez, ataxia, convulsiones, disturbios en el comportamiento, Anillos de Kayser-Fleisher (depósitos de cobre en la córnea), osteomalacia e hiperpigmentación (Menezes Pedrozo, 2003).

En leche aproximadamente el 15 a 50% del cobre está asociado a glóbulos grasos, un 35% se asocia a caseína y un 28% puede asociarse a las proteínas de suero. Cataliza el proceso normal de la oxidación de las grasas en presencia de aire por lo que eso influye en el aroma y sabor de la leche. Tiene una gran influencia en la acidificación y en la velocidad de maduración del queso (Flynn y Cashman, 1997).

La leche de vaca es una fuente pobre de cobre ya que el animal actúa como filtro reteniendo los metales en su organismo, sin embargo se pueden

desarrollar productos a partir de la leche que con agregado de cobre se transforman en un excelente vehículo para la incorporación del mismo a la dieta.

El contenido de cobre varía con el animal dependiendo de su ubicación geográfica y de la alimentación que recibe. No está claro aún si suministrar al ganado ración con suplemento de cobre hará que leche tenga mayor contenido de cobre.

El contenido medio de cobre en leche de vaca está en 0.08 mg.L^{-1} y en leche en polvo 0.7 mg.kg^{-1} (*Bulletin of the International Dairy Federation* N° 278/1992).

3.1.5. Selenio (semimetal)

El selenio fue descubierto accidentalmente en una fábrica de ácido sulfúrico de Gripsholm en Suecia por J.J. Berzelius en 1818, fue nombrado así en alusión a la luna (“selene”) (Zingaro y Copper, 1974, Baran, 1990).

A partir de 1920-1930, pasa a tener importancia en la industria electrónica para la fabricación de rectificadores y fotocélulas. En el siglo XX se comenzó también a utilizar en la industria del vidrio (Tiglea y Mello, 2003).

Sin duda la característica más destacable de este elemento es su “personalidad esquizofrénica” comportándose como metal-no metal (“tiene dos caras como la luna” (Baran, 1990)).

El selenio se asemeja al azufre, pero es un semimetal, con configuración $4s^2$ y $4p^4$, pertenece al grupo VI de la tabla periódica (grupo de los calcógenos).

Las formas más comunes son Se(-II) , Se(IV) y Se(VI), pero la formas en las que el selenio se presenta en los organismos vivos y sistemas, depende de la cantidad y formas en los que se los provee, así como de la especie que lo asimila. Entre los compuestos orgánicos de selenio de importancia biológica se encuentran la selenometionina y la selenocisteína, los análogos de los S aminoácidos donde el S se sustituye por Se (Venugopal y Luckey, 1979, Baran, 1990).

Se encuentra en todos los ambientes distribuido en forma desigual en el planeta, siendo que algunos lugares se presenta en concentraciones tan bajas que no es suficiente para que los vegetales contengan una cantidad adecuada

para satisfacer la ingesta diaria recomendada de animales y el hombre. En otros sitios se encuentra en altos niveles en el suelo como en alguna zona muy seca de USA donde hay plantas con altas concentraciones de selenio (Fordyce, 2005).

En 1930 se evidenció toxicidad de selenio en la agropecuaria cuando se descubren enfermedades en animales que se restringían a determinadas áreas, como resultado de contaminación crónica resultante de la ingestión de vegetales con elevadas cantidades de selenio. Sin embargo ya desde la época de Marco Polo en su viaje a la China, se reporta la enfermedad animal debida a la contaminación con selenio (Tiglea y Mello, 2003, Fordyce, 2005).

En la década del 50 se conoció la esencialidad de del selenio en animales, y la esencialidad en humanos fue revelada con el descubrimiento de su capacidad para prevenir el mal de Kesham, descrito por primera vez en 1935 en la provincia China del mismo nombre. Esta población presentaba un cuadro con síntomas que fueron atribuidos a la carencia de selenio: diferentes grados de cardiopatías o de descompensación cardiaca, la histología del miocardio presentaba degeneración y necrosis de ultra-estructuras de fibras musculares.

Posteriormente se descubriría su importante papel como parte de los mecanismos antioxidantes del organismo y también su papel en la protección del organismo contra metales pesados así como también su importancia en el sistema inmune (Tiglea y Mello De Capitani , 2003, Fordyce, 2005).

Relacionado con esto último, también se ha demostrado que pacientes afectados por SIDA, presentan evidencias de deficiencia de selenio, como ser

una marcada disminución de la actividad de glutatión-peroxidasa. Además ha sido por otro lado reconocido como un agente nutricional de protección anticancerígeno de amplio espectro (Baran, 1990).

Los valores de RDA para selenio son: 15 μg , 20 μg y 30 μg para edades de 0.5 a 1 año, 1-5 años y de 7-10 años respectivamente, y alcanza valores de 70 μg para adultos (Flynn y Cashman, 1997).

La concentración de selenio en plantas y animales está relacionada con su concentración en el suelo. Las condiciones del suelo como ser su composición, pH y potencial redox afectan su disponibilidad. En suelos alcalinos (pH 7.5 a 8.5) el selenito puede ser oxidado a selenato soluble, aumentando su disponibilidad. La actividad microbiana también puede provocar transformaciones que incluyen pérdidas por formación de compuestos volátiles. Los selenatos solubles son absorbidos por las plantas y convertidos en formas orgánicas, como selenometionina, selenocisteína, dimetilselenio y dimetildiselenio. El selenio entra así en la cadena alimentaria, junto con el selenio que se encuentra en aguas potables y constituye un elemento importante en la nutrición.

Desempeña un papel similar al de la vitamina E, participando en sistemas biológicos que protegen de procesos oxidativos. Es un componente de la enzima glutatión peroxidasa la cual previene la acumulación de peróxidos tóxicos dentro de las células y está constituida por cuatro subunidades iguales, cada una de las cuales contiene un átomo de selenio en forma de resto de selenocisteína (Baran, 1990).

Existe en varios países la preocupación con respecto a los posibles efectos en la salud de niveles bajos y/o decrecientes de selenio en los suelos, dando contenidos de selenio bajos en, por ejemplo, granos y gramíneas, de esta manera implicando bajos contenidos de selenio en la leche producida a partir de este forraje (Tiglea y Mello De Capitani, 2003).

La concentración de selenio en diferentes alimentos puede variar ampliamente, dependiendo de su disponibilidad natural. Generalmente la carne, el pescado y los cereales (que pueden variar de país en país) son buena fuente de selenio para la nutrición humana, pero también la leche y los productos lácteos tienen una contribución significativa a la ingesta de selenio (Tiglea y Mello De Capitani, 2003).

El selenio es una paradoja debido a que su esencialidad termina debido a su estrecho margen entre la dosis necesaria para no presentar síntomas por deficiencia y la mínima para comenzar a observarse síntomas por intoxicación, como dice Baran, “por un lado es un tóxico poderoso y por el otro se ha revelado como un elemento-traza esencial, sin el cual no sobreviviríamos” (Baran, 1990).

La absorción intestinal de Se como formas solubles de selenito o selenato y compuestos orgánicos es rápida y eficiente en mamíferos (rumiantes y monogástricos). La absorción en los mamíferos monogástricos ocurre en el intestino delgado. En la sangre el Se se asocia a eritrocitos y con albúmina plasmática y globulinas. La albúmina parece ser el receptor inmediato y quien

transporta el selenio a sitios de unión más estables en la sangre y tejidos. Desde la sangre el Se se distribuye rápidamente a todos los tejidos, especialmente el hígado, riñones, hueso, uñas y pelo (Tiglea y Mello De Capitani, 2003).

La retención de selenio en tejidos depende de la ingesta en la dieta y de la reserva existente en el cuerpo del metal. La retención en los tejidos se debe en parte a la propiedad del selenio de reemplazar el azufre en la cisteína y metionina, los que puede existir como parte estructural de proteínas o libres como selenoaminoácidos.

El selenio se excreta principalmente por la orina, aunque también una parte por las heces y por aire exhalado, pero también aparece excretado en el sudor y en la leche (Tiglea y Mello De Capitani, 2003).

La incorporación desde la forma selenocisteína en la enzima glutatión peroxidasa puede tener lugar vía una ARN transferasa específica en el hígado. La selenocisteína puede ser sintetizada a partir de la selenometionina por la llamada vía de la cistationina y puede ser descompuesta por una enzima que actúa exclusivamente sobre la selenocisteína (Seiler y Sigel, 1988).

Un paso importante en el metabolismo de excreción de selenio es la metilación de la forma reducida. A pesar de ser mayoritariamente excretado en la orina, es conocido que el humano expuesto a altas concentraciones de selenio en su dieta tiene un aliento característico con olor a ajo, característico del dimetilseleniuro. Las metilaciones se llevan a cabo mediante la acción de metiltransferasas.

Cuando la ingesta de vitamina E es pobre, la susceptibilidad a sufrir los efectos de deficiencia o exceso de selenio se incrementa. (Seiler y Sigel, 1988)

Tiene la capacidad de unirse a otros metales pesados como selenitos o seleniuros inertes y así actuar como detoxificadores de metales pesados. La toxicidad del selenio es generalmente atribuida a su interferencia con el metabolismo del azufre y sus funciones, así puede afectar sistemas enzimáticos asociados a procesos de respiración celular reemplazando grupos tiol por grupos SeH inhibiendo la función de grupos enzimáticos. (Venugopal y Luckey, 1979).

De todos los elementos, presenta uno de los rangos más estrechos entre deficiencia en la dieta ($<40 \mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$) y niveles tóxicos ($>400 \mu\text{g}\cdot\text{día}^{-1}$), esto hace imprescindible que haya controles en la ingesta humana y de otros animales. (Fordyce, 2005).

La leche bobina y los productos lácteos que de ella derivan, son normalmente una fuente pobre de selenio en la nutrición humana. Mediante suplementos en el alimento del ganado, puede obtenerse un aumento en el contenido de selenio de la leche. Por ejemplo, en Suecia y Finlandia, la mayoría de los alimentos para ganado están enriquecidos con selenio (en forma de Na_2SeO_4 o Na_2SeO_3), normalmente 0.1 mg de selenio por kg de alimento seco. En Suecia, este suplemento ha incrementado los contenidos de selenio en la leche en casi un 40%, de 8 a $11 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (*Bulletin of the Internacional Dairy Federation* N° 278/1992).

Sin embargo para suplementar forraje con selenio hay que prestar especial cuidado a la biodisponibilidad. Se ha reportado que la leche bovina obtenida de

luego de alimentar el animal con forraje suplementado con selenio orgánico contiene una mayor proporción de selenio que la leche obtenida luego de alimentarlo con forraje suplementado con selenio inorgánico, lo que sugiere que las formas orgánicas tienen mayor biodisponibilidad (Silva *et al.*, 2000, Muñiz-Naveiro *et al.*, 2006).

Los datos que se han podido obtener sobre la alimentación del ganado en Uruguay, en cuanto al tipo de suplementación indican que en general la ración suministrada contiene agregado de selenio en forma de sales inorgánicas (Na_2SeO_4 o Na_2SeO_3).

Existen numerosos trabajos que reportan contenido de selenio en leche bobina y en fórmulas infantiles en diversas regiones del planeta (Alaejos y Díaz Romero, 1994, Foster y Sumar, 1995, Aleixo y Nóbrega, 2003, Van Dael y Barclay, 2006, Muñiz-Naveiro *et al.*, 2006).

Dependiendo de la región geográfica y la época del año en la que se analizaron las muestras se reporta gran variabilidad en el contenido de selenio total en leche fluida bobina. Un estudio realizado que involucró a 15 países indicó que los valores estaban en el rango de 3 a 40 $\mu\text{g.L}^{-1}$ con una media de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Flynn y Cashman, 1997).

Desde los años 90 al presente se mantienen ciertos rangos de concentración en leche fluida bobina discriminados por región según de detalla a continuación:

- Europa de 3 a 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Alaejos y Díaz Romero, 1994, Pappa *et al.*, 2006)

- América de 5 a 122 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Alaejos y Díaz Romero, 1994, Aleixo y Nóbrega, 2003), incluye la determinación de 3 muestras de leche Uruguay en el trabajo de Aleixo y Nóbrega.
- Asia de 2 a 64 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Alaejos y Díaz Romero, 1994).
- Oceanía de 1 a 7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Alaejos y Díaz Romero, 1994).

La leche humana es considerada la mayor fuente de selenio para los recién nacidos y lactantes. Se ha reportado, ya desde hace tiempo, que las concentraciones de selenio en leche humana son algo mayores que en leche bobina (Alaejos y Díaz Romero, 1994). Sin embargo continua siendo una fuente pobre de selenio en sí misma, esto ha hecho que en los últimos tiempos los fabricantes de formulaciones infantiles de base láctea consideren agregar selenio a las mismas (Van Dael, 2006).

No se han encontrado especificaciones claras de organismos internacionales sobre que componente de selenio agregar a una fórmula infantil, sin embargo es común y aceptado fortificar con formas inorgánicas como ser selenito de sodio y selenato de sodio (Foster *et al.*, 1997).

Las fórmulas infantiles del mercado uruguayo informan en su rotulación agregado de selenito de sodio en el rango de 4 a 15 $\mu\text{g}/100\text{g}$.

Tanto la leche en polvo como las fórmulas infantiles en polvo sufren procesos en su elaboración que alteran las propiedades del producto final, los tratamientos con calor y el secado spray pueden provocar pérdidas de selenio tanto intrínseco como agregado. En el caso de la leche fluida pasteurizada también existe este riesgo de pérdidas de selenio en el proceso de

pasteurización. En esta tesis se realizaron casi todas las determinaciones en leche fluida recién ordeñada (sin procesamiento) y en algunas muestras de leche pasteurizada entera y descremada.

3.1.6. Nitrato y nitrito

La toxicidad de nitratos y nitritos es conocida desde fines del siglo pasado. Si bien el agente responsable de causar enfermedad son los nitritos, éstos se forman naturalmente a partir de nitratos.

La presencia natural de nitratos y nitritos en el ambiente se debe al ciclo del nitrógeno, por lo que cualquier alteración antropogénica de este ciclo modificará los niveles normales de nitrato y nitrito en el ambiente (Smith y Smith, 2001).

En los alimentos es frecuente el uso de aditivos que contienen nitratos como fuente de nitritos y directamente nitritos en el “curado” de derivados de la carne que deben almacenarse por largo tiempo. En la industria del queso en algunos países se emplea nitrato de sodio o potasio como agentes antimicrobianos.

Una de las principales fuentes de ingreso de nitratos al organismo es el agua, en particular en sitios rurales donde se consume del agua de pozo es común que estos pozos presenten niveles elevados de nitratos.

Los lactantes y niños de corta edad son una población susceptible a sufrir los efectos tóxicos de nitratos y nitritos. Se han reportado casos de intoxicación de bebés debido al uso de agua de pozo en la reconstitución de la leche en polvo y de fórmulas infantiles. Este efecto tóxico puede llegar a producir un efecto adverso conocido como el “síndrome del bebé azul” (Yassi *et al.*, 2001).

En el proceso de elaboración de la leche en polvo y fórmulas infantiles puede incorporarse nitrato al producto final fundamentalmente por malas prácticas de manufactura. También cabe destacar, que cuando se abre un envase de leche en polvo se debe tener cuidado en como se guarda el producto una vez abierto y como se manipula, porque debido a que el mismo se mantiene abierto un cierto tiempo hasta que se consume todo el producto está expuesto al riesgo de contaminación bacteriana (Food Standards, 2006).

En humanos, el nitrato ingerido se absorbe en el intestino delgado y se distribuye en el organismo; el nitrato llega al intestino grueso a través de la sangre y ahí se convierte (en parte por los microorganismos fecales) en nitrito, el cual es muy reactivo y se reabsorbe a la sangre. Esta reducción es mediada por la enzima nitrato reductasa presente en plantas y varios microorganismos (Kotsonis *et al.*, 1996).

El nitrato también se puede convertir en nitrito en la saliva, debido a la reducción bacteriana dependiendo de la flora del individuo y de la dieta. Luego de la absorción, tanto nitratos como nitritos se distribuyen a todos los tejidos, una vez en circulación sanguínea, el nitrito reacciona con el ión ferroso de la desoxihemoglobina, formando methemoglobina en la cual el hierro se encuentra en estado férrico, por lo que es incapaz de transportar el oxígeno (Smith, 19976).

En el hígado, los nitratos se convierten en metabolitos denitrogenados y nitritos inorgánicos, los cuales son excretados con la orina. Entre el 60-70% de la dosis ingerida de nitratos se excreta con la orina durante las primeras 24 h. Un 25%

aproximadamente se excreta en saliva. Se ha demostrado que parte del nitrato se puede excretar a través de la leche humana.

Otro problema aún en controversia es la posibilidad de que los nitritos reaccionen con las aminos de las proteínas y formen nitrosaminas (derivados N-nitroso), las cuales son carcinogénicas (Smith, 1996).

El proceso de formación y reducción de la methemoglobina en los eritrocitos es continuo; por lo general, en individuos sanos la concentración de ésta es menor al 2%. A medida que la concentración de methemoglobina aumenta comienzan a aparecer los efectos nocivos, ya con 20% hay cianosis central de tronco y extremidades, hasta un 45% aparecen síntomas y signos de hipoxia (depresión del SNC, disnea), entre el 45 al 60% ya se entra en coma, arritmia, colapso y convulsiones y por encima de 70% hay riesgo de muerte (Smith, 1996).

Los niños son población de riesgo especial para desarrollar methemoglobinemia aguda a causa de la exposición a nitratos, en particular cuando se los alimenta con leche en polvo usando agua contaminada con nitratos (común en zonas rurales). Esto se debe a que el pH gastrointestinal de los bebés es normalmente mayor que en niños mayores y adultos, lo que favorece la reducción bacteriana del nitrato ingerido. En los lactantes además una importante proporción de hemoglobina se encuentra como hemoglobina fetal, la cual es oxidada a methemoglobina con mayor facilidad que la hemoglobina de adultos.

Según OMS (Organización Mundial de la Salud) el límite máximo es 10 mg.L^{-1} expresado como nitrógeno equivalente a 45 mg.L^{-1} de NO_3^- , también aceptado por EPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos). Para nitrito

se ha propuesto un límite de 1 mg.L^{-1} expresado en nitrógeno equivalente a 3.29 mgL^{-1} de NO_2^- .

3.1.7. Selección de muestras

En esta tesis se trabajó con muestras de leche vacuna en polvo, leche fluida y fórmulas infantiles del mercado Uruguayo.

La leche en polvo fue provista por una empresa láctea nacional, entre ellas se encuentra leche en polvo sin aditivos y leches que han sido modificadas con agregado de hierro. También se analizaron muestras de leche en polvo descremada.

La leche fluida fue recolectada en tambos de Florida y Libertad en el mes de noviembre de 2008 y provista por la Facultad de Veterinaria mediante el Departamento de Rumiantes a cargo del Dr. Luís Barros. Algunas muestras fueron compradas en el mercado local.

En el caso de las formulas infantiles, nuestro país las vende en farmacias y algunos supermercados. Es una realidad de nuestro país que este tipo de producto es bastante costoso por lo que se distribuyen solo unas pocas marcas que cuentan con cierta popularidad entre la población. Se realizó una investigación de manera de encontrar en lo posible todos los tipos de producto disponible, considerando de especial interés aquellos que adicionan sales de selenio. Recorriendo el mercado se encontraron seis fórmulas infantiles que se consideró representativas de la variedad de la oferta en cuanto a su formulación. Algunas de esas fórmulas estaban elaboradas para niños de 0-6 meses, otras para niños de 6-12 meses, y otras en general para lactantes y niños de corta edad. Incluso algunas también son usadas para suplementar la alimentación de ancianos o personas con problemas de anemia o desnutrición.

Para todas las validaciones analíticas se utilizó material de referencia certificado representativo de leche en polvo (NIST 1549, Non-Fat Milk Powder y fórmula infantil (NIST 1846 Infant Formula).

3.2. Técnicas en flujo empleadas

3.2.1. Análisis en Flujo

La definición según IUPAC indica que Análisis en Flujo es “el nombre genérico para todos los métodos analíticos que están basados en la introducción y procesamiento de muestras de ensayo en un medio en flujo” (Inczédy *et al.*, 1998).

La creciente necesidad de automatizar los procesos analíticos tiene como causa principal el aumento de la cantidad de muestras que debe analizar un laboratorio, cumpliendo con la rápida entrega de resultados al cliente.

En particular en el campo de los análisis clínicos y medio ambiente, es donde ha habido un aumento muy importante de la demanda de análisis, y donde se requieren sistemas que puedan operar las 24hs en los procesos de control.

Como ya se explicó en la sección 3.1.2, la automatización en Química Analítica tiene múltiples ventajas.

Debido a que la mayoría de las separaciones y reacciones químicas se producen normalmente en fase líquida, fue lógico desarrollar un proceso que transporte una porción de la muestra desde el punto donde ella se introduce hasta la unidad de detección. Uno de los pioneros en este tipo de diseños fue Skeggs por los años 50 y 60 (van der Linden, 1994).

Este concepto dio origen al Análisis en Flujo Continuo (CFA, del inglés, Continuous Flow Analysis).

Durante al menos 20 años se desarrollaron sistemas segmentados con aire, lo que significa que la corriente de flujo era dividida en pequeños segmentos correspondientes a muestras y reactivos separados por burbujas de aire. Esta fue la técnica de elección para evitar el ensanchamiento de la zona discreta de analito (dispersión de la muestra) en su camino desde el punto de inserción hasta la unidad de detección.

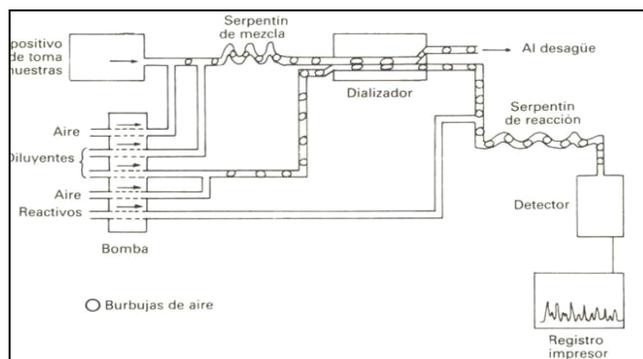


Figura 3- Sistema de flujo continuo segmentado.

No fue hasta los años 70 que se generalizó la idea de que la segmentación podría omitirse usando sistemas en flujo de dimensiones apropiadas, y empleando velocidades de flujo adecuadas. Esto simplificó el sistema analítico aumentando el número de muestras que podían analizarse por unidad de tiempo (frecuencia de muestreo o frecuencia de análisis). A este tipo de sistema se le llamó Análisis por inyección en flujo (FIA, del inglés Flow Injection Analysis) (Ruzicka y Hansen, 1988, van der Linden, 1994).

Existen situaciones intermedias entre CFA y FIA, como por ejemplo el Análisis en Flujo Continuo Monosegmentado, donde la muestra inyectada se intercala entre dos burbujas de aire (Vidal de Aquino, 2006).

Independientemente de los sistemas descritos, también fueron desarrollados otros métodos basados en medios en flujo. El principio era siempre el mismo,

una corriente continua de una solución conteniendo el analito podía también mezclarse a lo largo del camino hacia el detector con uno o varios reactivos.

La nomenclatura para este tipo de sistemas y la forma de expresar sus cifras de mérito o sea los requisitos analíticos que deben cumplirse y que caracterizan el desempeño del sistema, han sido publicadas en el 2002 en un reporte técnico de IUPAC (Zagatto *et al.*, 2002). Además de la evaluación de todos los parámetros que involucran la validación del sistema en flujo y el aseguramiento de la calidad, que será discutido en detalle en la sección 3.5 se agregan para este tipo de sistema algunos otros. Estas nuevas cifras de mérito son: frecuencia de muestreo y portabilidad (Zagatto *et al.*, 2002).

La frecuencia de muestreo es la cantidad de muestras que pueden ser analizadas (se realiza una determinación analítica) por unidad de tiempo estimado en asociación a un nivel *carry-over* específico. Cuando no se da información respecto a este nivel, se considera que el mismo fue despreciable (Zagatto *et al.*, 2002). El efecto *carry-over* aparece por ejemplo al pasar de una inyección de muestra a una de blanco, lo que se observa es que las primeras inyecciones de éste resultan contaminadas con restos de la anterior. En general esto puede evitarse realizando un lavado con nueva muestra cuando se cambia de un nivel de concentración a otro diferente o a otra muestra. Se recomienda informar la frecuencia de muestreo junto con el consumo de muestra, así puede caracterizarse el sistema en forma más completa.

En cuanto a la portabilidad del sistema, es algo útil a tener en cuenta el hecho de desarrollar sistemas que puedan transportarse, si el sistema de detección

así lo permite, sobre todo en las determinaciones relacionadas con el medio ambiente para realizar trabajos de campo.

Clasificación de métodos analíticos basados en medios en flujo (van der Linden, 1994):

- Análisis en Flujo: con muestreo continuo
 - segmentado
 - no segmentado
- Análisis en Flujo: con muestreo intermitente
 - Con aspiración de la muestra:
 - de flujo segmentado- CFA
 - de flujo no segmentado
 - Con inyección de la muestra:
 - de flujo no segmentado
 - Análisis por inyección en flujo (FIA)
 - Cromatografía Líquida (LC)
 - de flujo mono-segmentado (MSFA)

Para mejorar el desempeño analítico, han aparecido nuevas técnicas en flujo, las mismas aumentan el grado de automatización y amplían el campo de aplicaciones analíticas, en la década de los 90 tienen gran difusión especialmente las técnicas de análisis en flujo por inyección secuencial (SIA) (Ruzicka y Marshall, 1990) y los sistemas en flujo multiconmutados (MCFA) (Reis *et al.*, 1994).

Recientemente aparecen técnicas aún más modernas y sofisticadas alcanzando grados de miniaturización muy interesantes como la llamada “laboratorio en una válvula” (Lab-on-valve, LOV) (Ruzicka, 2000, Chao-Hsiang y Ruzicka, 2001, Wang y Hansen, 2003) y “laboratorio en un chip” (lab-on-a chip) (Wang *et al.*, 2008).

En esta tesis se desarrollaron y validaron sistemas por inyección en flujo (FIA), por inyección secuencial (SIA) y multiconmutado (MCFA), en las siguientes secciones se explicará un poco más en detalle estas técnicas en particular.

3.2.2. Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

La primera definición aparece en 1975 cuando Ruzicka y Hansen definieron FIA como “la inserción secuencial de muestras en forma discreta en un flujo de corriente continúa con posterior detección del analito”. En 1981 estos mismos autores ampliaron la definición original a “método basado en la inyección de una muestra líquida en una corriente no segmentada en movimiento de un líquido adecuado. La muestra inyectada forma una zona, que es transportada hacia un detector que continuamente registra la absorbancia, potencial de electrodo, o cualquier otro parámetro físico, que estará cambiando continuamente debido al pasaje de la muestra a través de la celda flujo” (Martínez Calatayud, 1995).

Desde aquel entonces las definiciones se fueron ampliando así como el campo de aplicación de esta técnica. Es importante remarcar que FIA es una técnica que se lleva a cabo bajo condiciones reproducibles de manipulación de la muestra y reactivos y que la evaluación cuantitativa de la concentración del analito se lleva a cabo bajo condiciones de no-equilibrio termodinámico (Fang, 1993).

En un sistema FIA (como también en los sistemas SIA y MCFA), las muestras y los patrones están afectados de la misma forma por las variables del sistema así como también los patrones de analito, por tanto no es imprescindible alcanzar las condiciones de equilibrio termodinámico (por ejemplo que se complete un desarrollo de color) ya que tanto los patrones como las muestras

se miden en condiciones reproducibles (por ejemplo en el mismo punto de avance de la reacción de desarrollo de color).

Se trata de una técnica basada en el fenómeno de dispersión, luego de ser insertada la muestra en la corriente portadora sufre una continua dilución hasta que pasa por la celda de flujo frente al detector, se obtiene una señal transitoria que es registrada.

En la figura 4 se muestra un esquema simple de un sistema FIA de una línea, con los componentes básicos indicados y en la figura 5 la señal transitoria típica que se obtiene.

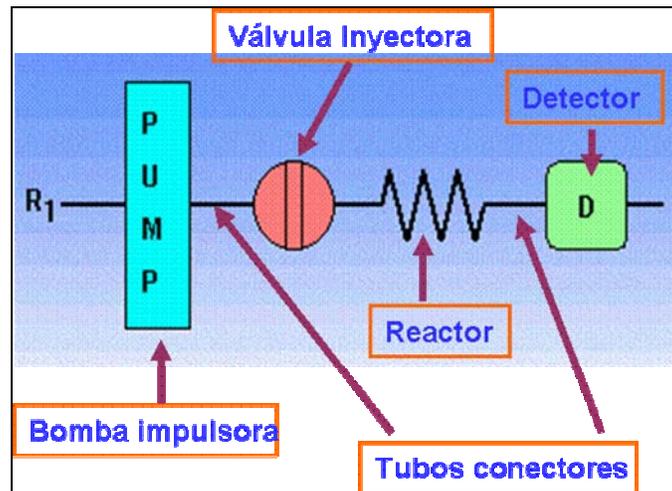


Figura 4- Esquema simplificado de un sistema FIA con sus componentes básicos. R1: reactivo o portador

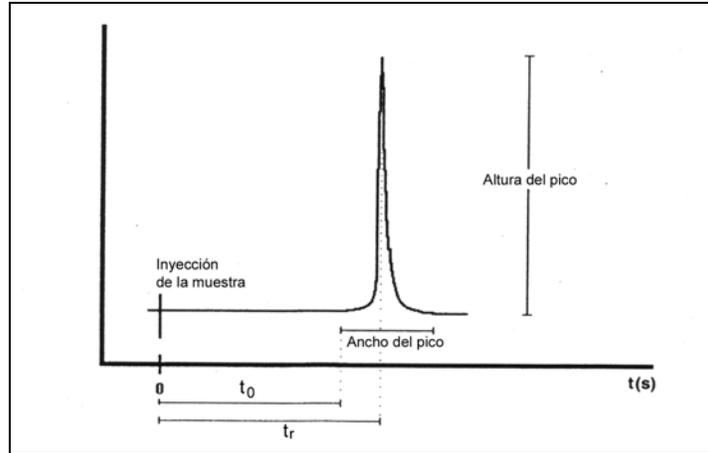


Figura 5 - Típica señal transitoria t_r = tiempo de residencia (Modificado de Martínez Calatayud, 1995)

La señal analítica de un sistema FIA es registrada de manera continua, cada muestra o disolución de calibración es registrada de manera sucesiva como se muestra en la figura 6.

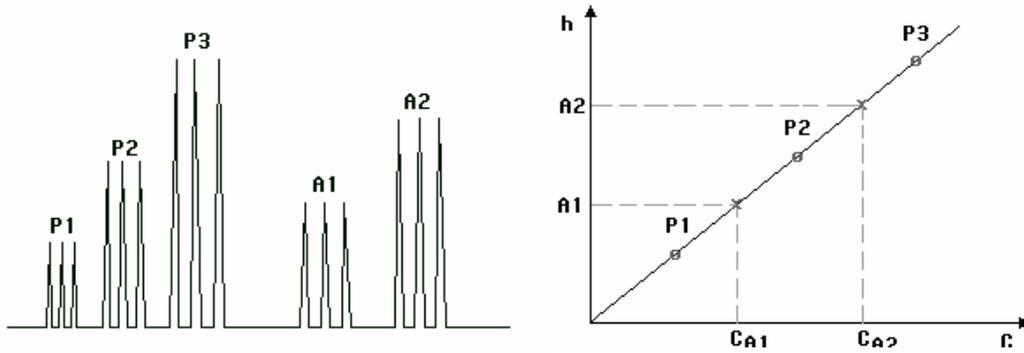


Figura 6- Señales analíticas y curva de calibración. A la izquierda señales analíticas, P1, P2, P3 inyecciones de disoluciones de calibración A1, A2 problema y a la derecha curva de calibración (altura de pico en función de la concentración de analito).

El fenómeno físico más importante que domina las zonas de muestra o reactivos en un sistema en flujo no-segmentado, y que caracteriza la gran mayoría de los sistemas en flujo, es la dispersión de las zonas en la corriente de lo que se denomina portador (Fang, 1993). En las figuras 7 y 8 se muestran perfiles de dispersión y mezclado y como varía la señal transitoria según el avance de la muestra en la corriente de portador respectivamente.

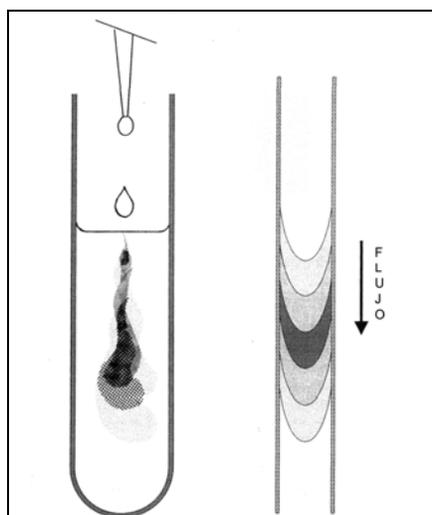


Figura 7- Comparación de las condiciones de mezclado y dispersión, a la izquierda en modo batch y a la derecha en modo en flujo. (Extraído de Fang, 1993).

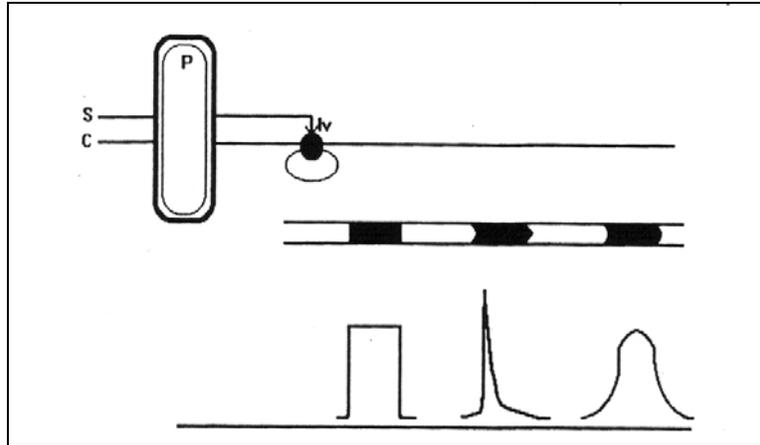


Figura 8- Cambios progresivos en el perfil de la muestra, P: bomba propulsora, S: disolución de la muestra, C: portador, Iv: válvula inyectora. (Extraído de Martínez-Calatayud, 1995).

Se desarrolla en esta sección el fundamento teórico en forma breve para explicar más en detalle este fenómeno, ya que se aplica a todos los sistemas desarrollados en esta tesis.

Las especies químicas que se encuentran en el volumen de inyección se dispersan longitudinalmente y por difusión radial en el portador hasta el detector.

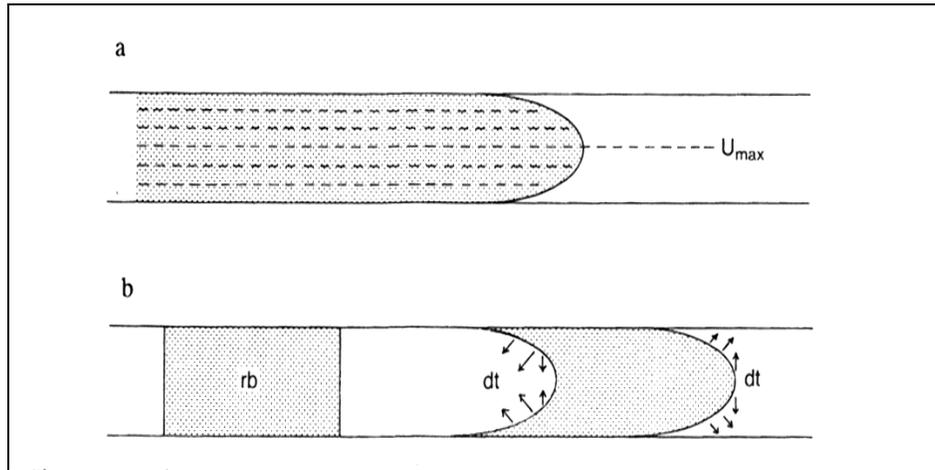


Figura 9 - Velocidad de distribución en un flujo laminar, (a) se observa la distorsión del flujo rectangular del bolo de muestra, se muestra en (b) rb: bolo rectangular, dt: transporte difusional. (Extraído de Martínez-Calatayud, 1995).

La velocidad instantánea de las moléculas que viajan a lo largo de un tubo recto bajo condiciones de flujo laminar se muestran en la figura 9, y está dada por la ecuación 3.2.2 (1). Estas condiciones se cumplen considerando que se trabaja con tubos cuyo diámetro interno es muy pequeño, en el rango de 0.5 a 1 mm.

$$U = U_{max} \left(1 - \frac{r^2}{a^2} \right) \text{ Ec 3.2.2 (1)}$$

U=velocidad instantánea de las moléculas

$U_{m\acute{a}x}$ = velocidad de las moléculas en el eje central del tubo

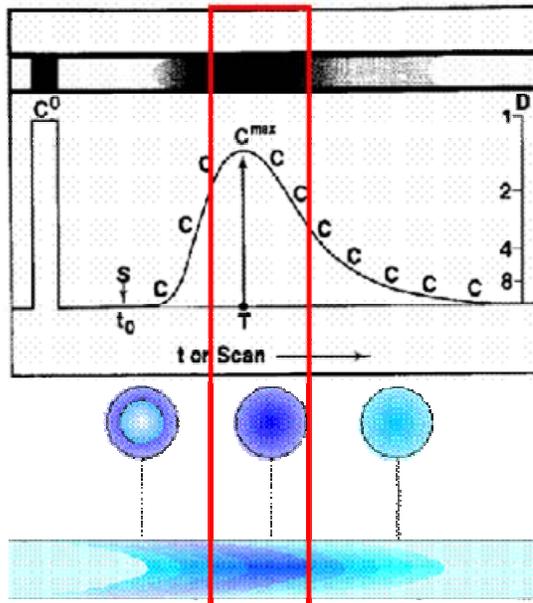
a= el radio del tubo

r=distancia al eje central del tubo

La muestra sufre dispersión axial y radial, la dispersión es controlada en el tiempo y en el espacio y se define como:

$$D = \frac{C^0}{C^{\max}} \quad \text{Ec 3.2.2 (2)} \quad (\text{Fang, 1993})$$

Figura 10- Patrón de dispersión. (Extraído de Ruzicka y Hansen, 1988).



C^0 : Concentración inyectada al sistema
 C^{\max} : Concentración máxima en el reactor tubular
 C : concentración que va teniendo la muestra inyectada en un punto y su variación con el tiempo.

Al cambiar el volumen inyectado se cambia la dispersión, cambia el ancho del pico y la altura del mismo, por lo tanto la sensibilidad en la medición.

Puede aumentarse el tiempo de reacción sin aumentar la dispersión. Para eso se puede detener la bomba propulsora con la consiguiente detención del movimiento y posterior reinicio del mismo, procedimiento conocido como "stopped flow". Esto puede ser útil por ejemplo si se desea aumentar la sensibilidad de la medida dejando que un desarrollo de color u otra reacción que es más lenta se complete.

A medida que aumenta el largo de los tubos o el largo de los reactores o bobinas de mezclado, aumenta la dispersión (dilución de la muestra) disminuyendo la altura de los picos, esto disminuye la sensibilidad. Por este

motivo siempre que sea posible se prefiere trabajar con tubos no demasiado largos. Para reducir la dispersión axial el canal de flujo debe ser uniforme. Los cambios de diámetro de los tubos producen efectos similares a los de una mala cámara de mezclado, pero además puede traer otros inconvenientes como generar sobrepresiones dentro del sistema.

Para favorecer el mezclado del bolo de muestra con el portador o con un reactivo puede recurrirse a diversas formas de reactor manteniendo la sección de tubo, esto es importante ya que si el mezclado no es bueno el pico podría presentar deformaciones (hombros, doble pico).

Como estrategias que favorecen el mezclado pueden introducirse cambios súbitos de dirección del flujo, o colocarse reactores o cámaras de mezclado.

En la figura 11 se muestran algunos tipos de diseños de reactores, estos dispositivos se intercalan en el sistema en el camino hacia el detector de manera que el mezclado de los productos de reacción sea lo más eficiente posible.

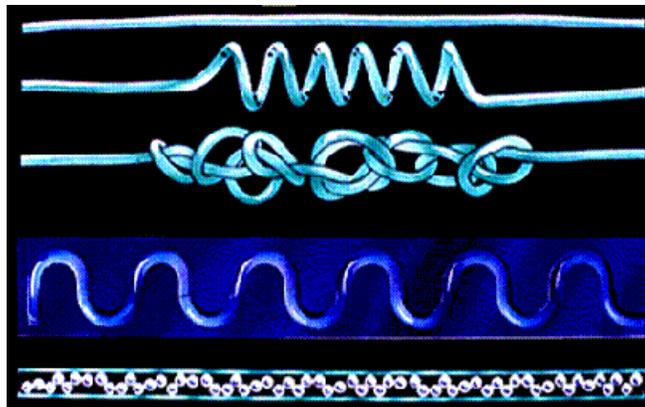


Figura 11- Tipos de reactores. (Extraído de FIALab[®], 2009)

Las bobinas en forma de serpentina son muy usadas, en ellos los patrones de dispersión se alteran favoreciendo el mezclado como se muestra en la figura 12.

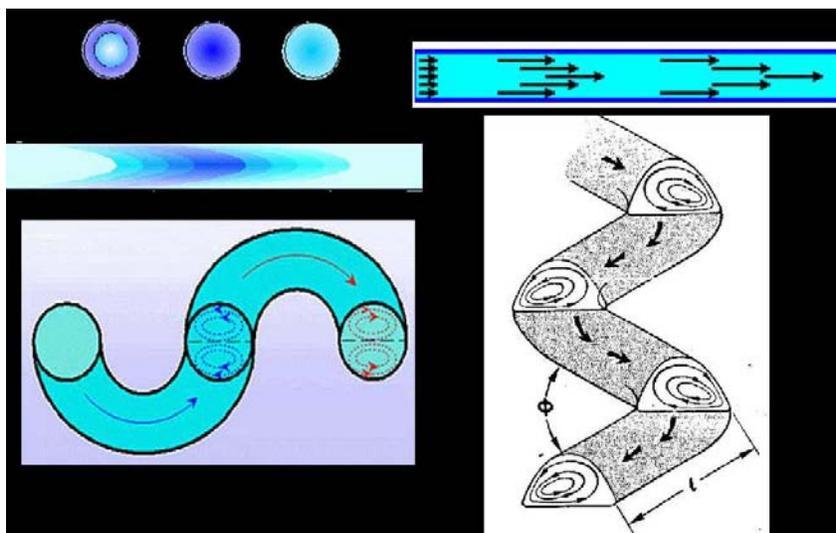


Figura 12- Patrones de mezclado bobinas en forma de serpentina. (Extraído de FIAlab[®], 2009)

Los sistemas FIA pueden ser tan simples como los de una línea única o complicarse bastante según la aplicación para la que han sido diseñados. En sistemas más complicados comienzan a aparecer zonas de confluencia, se intercalan sistemas para preconcentración, diálisis, separaciones de fases, etc. Algunos diseños se muestran en la figura 13.

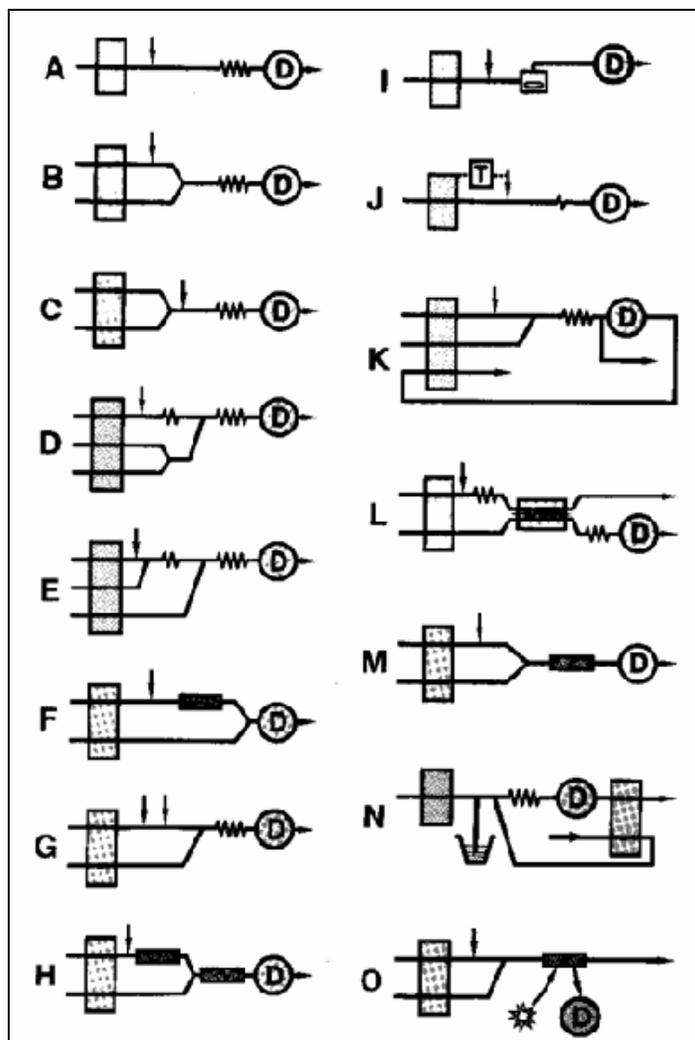


Figura 13. – Diferentes diseños de sistemas en Flujo (Extraída de Ruzicka y Hansen, 1988).

En estos sistemas más complejos aparecen confluencias donde tienen lugar otros fenómenos de mezclado, en la figura 14 se muestran algunos ejemplos como ser zonas de mezclado por confluencia (“merging zones”) y zona de penetración donde el reactivo solo fluye cuando entra en contacto con la muestra.

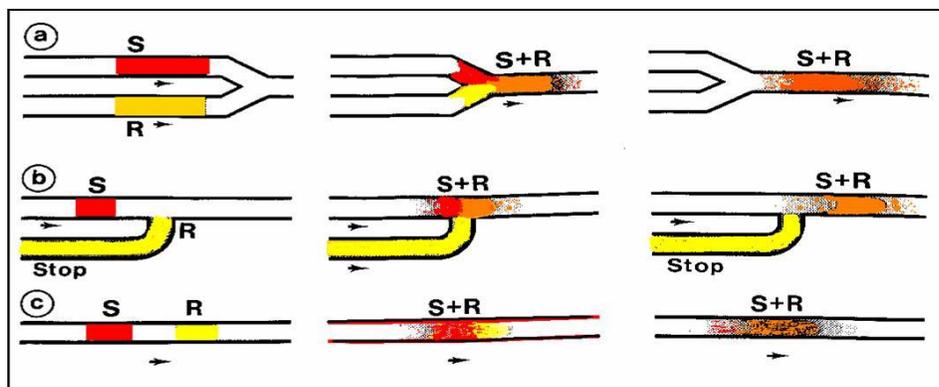


Figura 14: Tipos de mezclado. a: zona de mezclado "Merging zone", b: zona de penetración, c: reactivo y muestra en forma secuencial. (Extraída de Ruzicka y Hansen, 1988).

La instrumentación para FIA tiene varios elementos en común con otro tipo de técnicas en flujo. En esta sección se describe la instrumentación común a todas las técnicas en general y componentes de sistemas FIA en particular.

En secciones posteriores solo se hará referencia a aquellos componentes que sean exclusivos de esas técnicas, aunque también es posible diseñar sistemas híbridos donde componentes de varias técnicas se mezclen.

Cabe destacar que existen varios proveedores comerciales de instrumentación y accesorios para Análisis en Flujo, de cada uno dependerá la variedad dentro de los componentes y el costo, en esta sección se describirán los componentes en forma genérica. También es interesante mencionar que muchos investigadores diseñan sus propios dispositivos (separadores gas-líquido, columnas, desgaseadores, cámaras de mezclado, etc.) en forma artesanal obteniendo excelentes resultados.

Sistemas impulsores

En un sistema FIA, el sistema impulsor es el centro del mismo, es quien impulsa los líquidos a través de él. Estos sistemas deben cumplir con ciertos requisitos como ser: proveer de un flujo constante, baja pulsación (estabilidad), ser de fácil control, resistencia química.

Los sistemas impulsores son bombas, éstas pueden ser de diferentes tipos: de jeringa, de pistón (como los empleados en HPLC), peristálticas (de tubo), otros sistemas (neumáticos, por gravedad, por vacío).

Las bombas peristálticas han sido y son por lejos las más utilizadas en sistemas FIA, se basan en el movimiento causado por un rodillo que presiona contra un tubo flexible conteniendo el líquido. Pueden tener varios canales, debe seleccionarse una bomba tal que tenga suficiente número de canales para transportar los reactivos, la muestra y el portador.

En las figuras 15, se observa el sistema de rodillos y tubos, en las figuras 16 y 17, se muestran algunas bombas peristálticas.

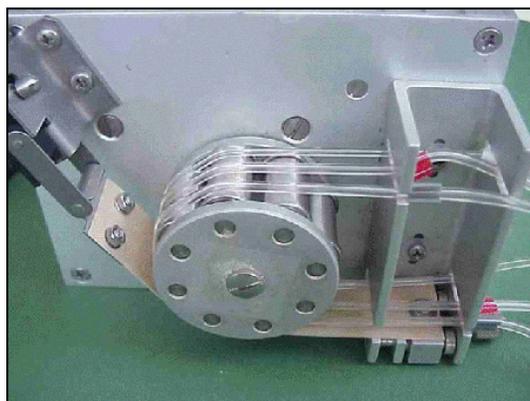


Figura 15 – Vista de los rodillos y tubos de bomba peristáltica.



Figura 16- Modelo de bomba peristáltica.



Figura 17- Modelo de bomba peristáltica con cartuchos.

Existen diversos materiales para tubo de bomba (Tygon®, Viton®, Solvaflex®, silicona, etc.). Los materiales de los tubos deben seleccionarse de acuerdo a su resistencia química y mecánica.

Alguna de las ventajas de utilizar bombas peristálticas como sistemas impulsores son: posibilidad de trabajar con varios canales simultáneos, poseen buen control del caudal, flexibles, robustas, el líquido no entra en contacto con la bomba, posibilidad de tener velocidad variable e inversión de dirección. Para llegar a la automatización total es importante que cuenten la posibilidad de ser controladas por microprocesador, para ello hay que asegurarse e que tengan interfase serial (RS-232 o RS-485), conexiones para interruptores o relés, control analógico de la velocidad (mediante un voltaje variable).

Tubos, conectores y reactores

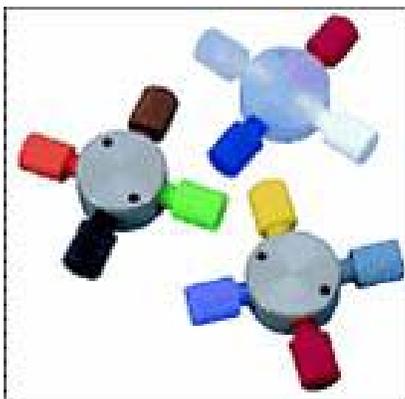
Los tubos y conectores forman la arquitectura del sistema, con los tubos se construyen los sistemas, son los que conectan los diferentes dispositivos que dan unidad al mismo y con ellos también se construyen reactores de mezcla. También existen los tubos de bomba que ya se mencionaron anteriormente.

En general se emplea tubo de pequeño calibre (< 1 mm diámetro interno), es común utilizar tubos de 0.5 mm y 0.8 mm (diámetro interno). El material de los tubos es variado; polietileno, Teflon PTFE, Teflon FEP, Teflon PFA, PVC son muy usados. En cada caso habrá que evaluar que tipo de tubo usar según la resistencia química y otras características no menores como ser si son o no fácil de curvar. En general si son muy duros es difícil para el investigador armar el sistema, ya que no debe olvidarse se los mismos se arman en forma manual.

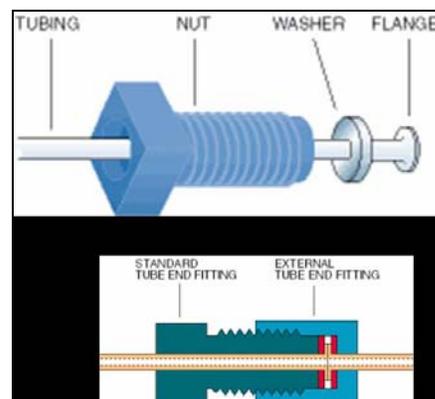
Como criterio general es conveniente armar los sistemas con el mismo tipo de tubo, y con el mismo diámetro interno ya que cambios de diámetro ocasionan cambios en el patrón de flujo.

Los conectores van desde uniones simples de dos tubos con un tubo más flexible calzado a presión hasta uniones más sofisticadas que se obtienen comercialmente. Las conexiones pueden ser de tipo uniones en "T", uniones con ángulos determinados, cruces, cruces múltiples (manifolds), entre otras.

Muchas veces son necesarios accesorios que son dispositivos de precisión para unir tubos en zonas de confluencia, o conectarlos a válvulas inyectoras, estos pueden ser uniones roscadas o a presión. Las uniones roscadas tienen dimensiones de rosca y orificios normalizados, son de materiales plásticos resistentes (Kel-F, PEEK) y son construidas de manera tal de minimizar los volúmenes muertos en el sistema.



a



b

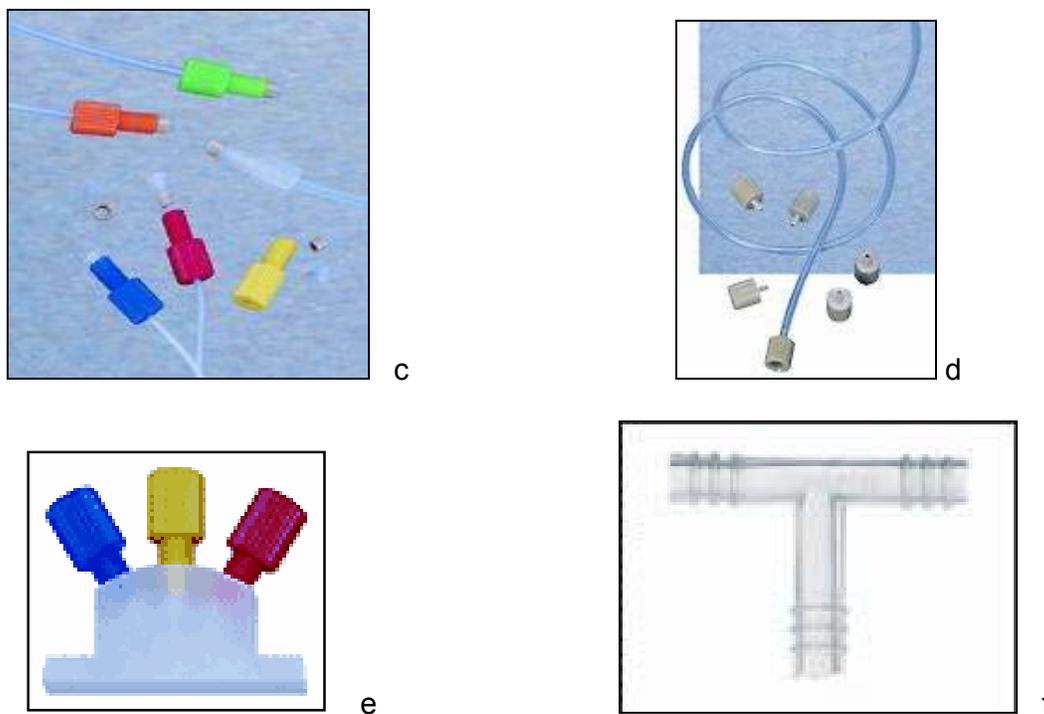


Figura 18. – Diferentes tipos de uniones y conectores. a: uniones roscadas, b: uniones con pestaña(flanged fittings), c: uniones sin pestaña (flangeless fittings), d: adaptadores para tubos de bomba, e: pieza de unión para varios reactivos con conexión roscada, f: unión flexible “T”. (Extraído de FIAlab®, 2009)

Las bobinas de mezcla son en general construidos artesanalmente, aunque también los hay comerciales. Van desde un simple tubo recto a tubos que son arrollados de diversas formas para cambiar los patrones de flujo y favorecer el mezclado. Hay reactores de tubos arrollados en forma helicoidal simple, anudados, arrollados en 8, etc. El diámetro del arrollamiento es importante ya que afecta la fuerza centrífuga producida sobre las moléculas.

Como dispositivos de mezcla también existen cámaras de mezclado y reactores empacados por ejemplo con bolitas de algún material inerte.

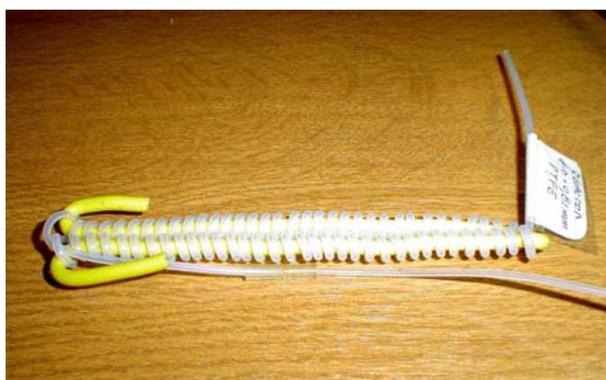
En las figuras 19 (a), (b) y (c) se muestran reactores construidos artesanalmente en el laboratorio.



(a)



(b)



(c)

Figura 19 – Tipos de reactores. (a) y (b) doble 8, (c) doble helicoidal.

El reactor tipo “8” fue el utilizado en todos los sistemas construidos para esta tesis, el mismo produce mínimo mezclado axial y máximo radial.

Sistemas de inyección

A lo largo de la historia de FIA, varios tipos de dispositivos se han utilizado para inyectar la muestra en la corriente del líquido portador (Reis y Bergamín, 1993). Según la técnica de inyección se utilizan distintos dispositivos. Estos pueden inyectar la muestra mediante sistemas basados en volumen inyectado (con “loop”) o basados en tiempo de inyección (la muestra se deja pasar un tiempo determinado).

En los comienzos se utilizaba jeringa y aguja para introducir la muestra a través de un septo, pero obligaba a detener el flujo por lo que cayó en desuso por ser dificultosa.

También existe en la literatura reportado el uso de inyectoros “proporcionales” construidos de material acrílico e inyectoros deslizantes que permiten el ingreso de la muestra a la corriente de portador cambiando su posición e inyectando el contenido de uno o varios “loops” de muestra a dicha corriente (Reis y Bergamín, 1993).

Actualmente es muy utilizado el modelo de inyector de tipo válvula rotativa de 6 puertos como las que se usan para HPLC. En el mercado existen además de las válvulas de 6 puertos, válvulas de 4, 8 y 10 puertos, que tienen diferentes aplicaciones.

En esta tesis se trabajó con válvulas de 6 y 10 puertos Valco® Cheminert con actuador “microeléctrico”. Estas válvulas pueden operarse manualmente accionando una tecla en un comando o pueden controlarse desde un PC, lo cual permite conseguir la automatización en los sistemas FIA desarrollados.

En las figuras 20, se muestra una vista de las válvulas rotativas (a), (b) y actuadores (c).

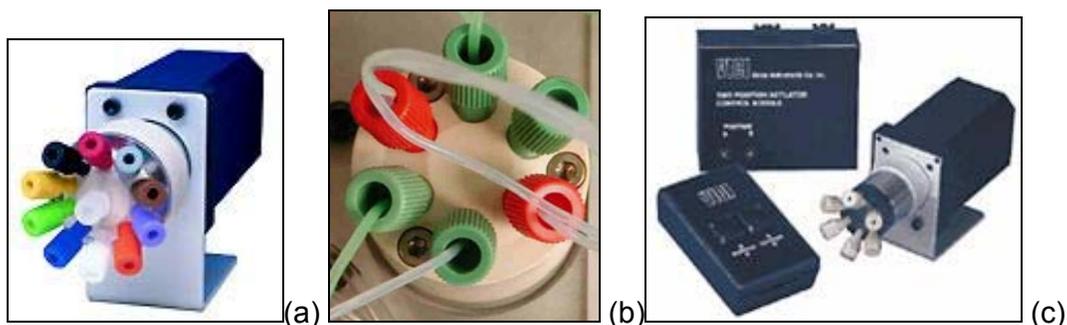


Figura 20 – Válvulas rotativas y actuador Valco®. (Extraído de FIAlab®, 2009)

En la figura 21 se muestra el esquema de conmutación de una válvula de 6 puertos. (Extraído de catálogo Valco®)

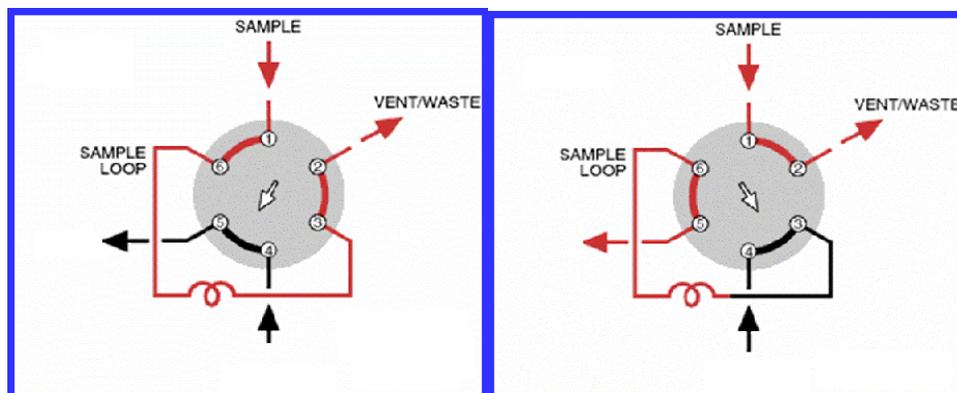


Figura 21- Esquema de conmutación de válvula de 6 puertos (Extraído de FIAlab®, 2009).

Otros sistemas de inyección basados en el tiempo serán descritos en la sección 3.2.3.

Detectores

Las técnicas de Análisis en Flujo admiten diversas técnicas para la detección, entre ellas: espectrometría de absorción (UV-visible, IR), fluorimetría, espectrometría de absorción atómica, espectrometría de emisión de ICP, quimioluminiscencia, conductimetría, amperometría, potenciometría (electrodos selectivos a iones), así como también otros sistemas en flujo como HPLC y GC. En cada caso habrá que estudiar cómo acoplar el sistema en flujo según el sistema de detección empleado.

En esta tesis se trabajó con sistemas en flujo con sistema de detección espectrofotométrico UV-Vis (espectrometría de absorción molecular) y espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros.

En el caso de utilizar un espectrofotómetro como detector se necesita una celda de flujo.

En la figura 22 se muestra una celda de flujo comercial como la utilizada en los trabajos de esta tesis.



Figura 22- Celdas de flujo comercial y esquema.

Cuando se utilizan este tipo de celdas debe cuidarse el volumen interno (de él dependerá la sensibilidad analítica) y la distancia del piso al canal óptico (alineación con el haz de radiación).

En la figura 23 se muestran las diferentes caras de la celda de flujo y se marca por donde atraviesa el haz de radiación la celda. En las figuras 24 a 26 se muestran otro tipo de celdas con detectores.

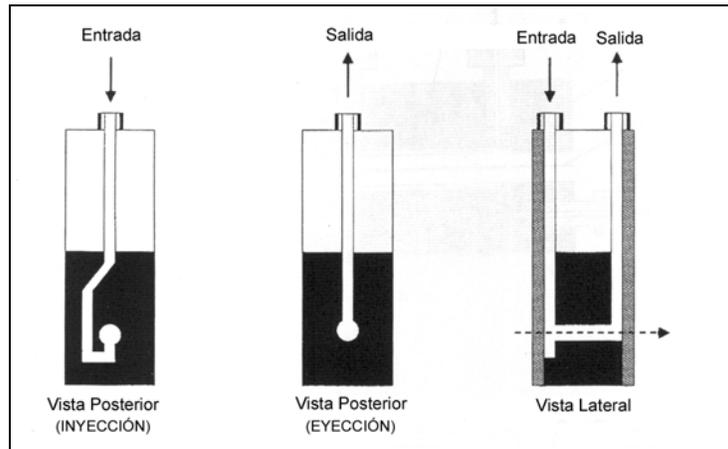


Figura 23- Diferente vista de celda de flujo. (Extraída de Fang, 1993)

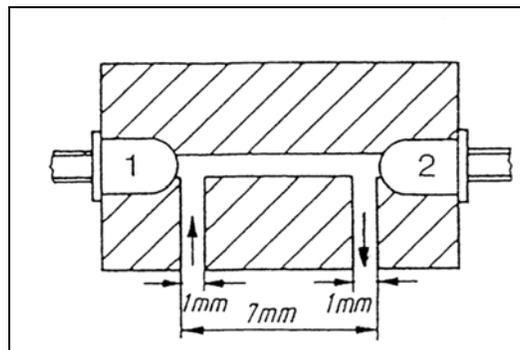


Figura 24- Flujo a través de una celda con diodo emisor de radiación y fotodiodo). (Extraída Trojanowicz, 2000)

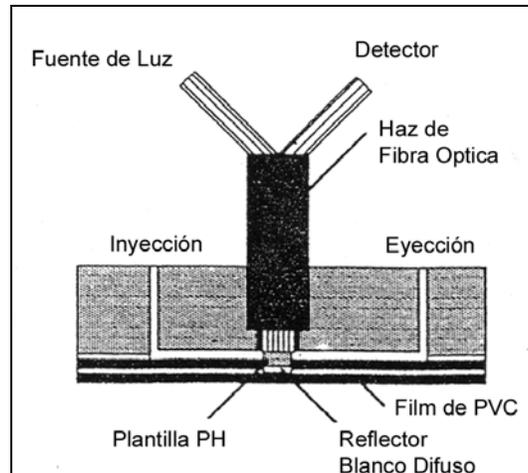


Figura 25- Flujo a través de una celda con una fibra óptica bifurcada. (Extraída de Trojanowicz, 2000)

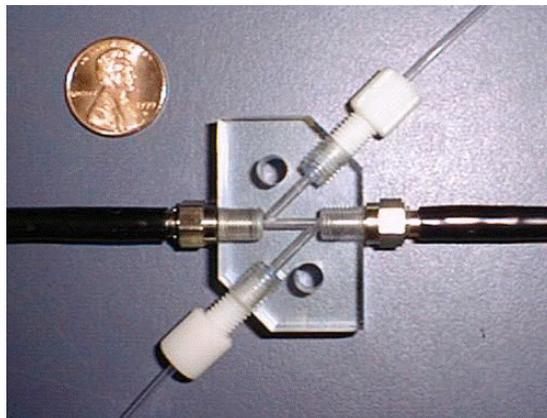


Figura 26- Celda de flujo comercial con fibra óptica. (Extraída de FIALab[®], 2009)

Entre las numerosas aplicaciones de FIA se encuentran determinaciones en matrices como: alimentos (López García, 1996, Lima, 2000, Palmesano, 2001), aleaciones (Richter *et al.*, 1997, Gervasio, 2006), productos farmacéuticos (Knochen, 2003), aguas residuales (Cerdá *et al.*, 1995), sedimentos (Piñeiro-Ávila, 1998) , aceites lubricantes (Pignalosa, 2001, Pignalosa *et al.*, 2004), fluidos biológicos (Higuchi y Motomizu, 1999), entre muchos otros.

3.2.3. Preconcentración en Análisis en flujo

En particular en este apartado se hará referencia a la extracción en fase sólida en Análisis en Flujo que fue aplicada en un sistema desarrollado en esta tesis. El sistema desarrollado se utilizó para la preconcentración de cobre y zinc mediante un sistema FIA.

Un sistema de extracción en fase sólida permite la concentración y purificación de analitos de una solución por retención en un sólido. Generalmente el líquido pasa a través de una columna, un cartucho, un tubo o disco conteniendo el sorbente donde se retiene un analito.

Luego que la muestra ha pasado por el sólido, él o los analitos retenidos se recuperan mediante una elución con un disolvente apropiado.

En un análisis en *batch* se asume completa transferencia de masa del analito desde la muestra hacia la fase que concentra.

En Análisis en Flujo la transferencia de masa entre fases es incompleta (factor de transferencia es <1). Se realiza el monitoreo de señales reproducibles en condiciones tales que no se ha alcanzado el equilibrio termodinámico (Fang, 1993). Esto trae como ventaja el obtener mayor rapidez en el análisis, sin disminución de precisión ni sensibilidad, el requisito es medir en forma reproducible.

Tanto los patrones como la muestra deben ser tratados en las mismas condiciones.

Además esta técnica puede acoplarse a varias técnicas analíticas on-line como Cromatografía de gases, Cromatografía líquida, Espectrometría Atómica.

Existe un amplio rango de fases sólidas disponibles, esto es muy conveniente a la hora de escoger una fase sólida según la aplicación buscada.

Para la evaluación del desempeño del sistema existen varios criterios como se detalla a continuación (Fang, 1993):

- Factor de enriquecimiento (FE): es la relación entre la concentración de analito en el concentrado C_e y la concentración original C_0 .

FE = C_e/C_0 (pendiente de las curvas de calibración antes y después de preconcentrar) (Fang, 1993).

- Factor de “mejora” que se puede aplicar cuando se usan disolventes orgánicos en la etapa de elución que mejoran la sensibilidad.
- Eficiencia de concentración (EC), **EC = FE x (f/60)** (f= frecuencia de muestreo expresada en muestras por hora).
- Índice de consumo de muestra (IC): volumen de muestra (en mL), consumida para alcanzar el valor de FE, **IC= Vs/FE**
- Factor de transferencia entre fases (P): relación entre la masa de analito en la muestra original, y en el concentrado, **P= m_e/m_0** , en columnas de preconcentración a veces se refiere a la eficiencia de retención, definida como el porcentaje de analito en una muestra recuperado de una columna luego de la adsorción y elución (%E).

Trabajar con extracción en fase sólida (SPE) reduce consumo y exposición a disolventes, permite altas recuperaciones y buenos factores de enriquecimiento.

En las separaciones FIA en – línea se utilizan habitualmente columnas. Los primeros trabajos reportados fueron sistemas FIA para la separación y preconcentración de metales y posterior detección por absorción y emisión atómica (Fang, Ruzicka y Hansen, 1984).

El realizar estos procesos en flujo permite simultáneamente preconcentración de elementos traza y remoción de interferencias. La elución se realiza utilizando un pequeño volúmen de disolvente reduciendo el uso de los mismos que en general son tóxicos y contaminantes.

Actualmente se puede dar el acoplamiento a cualquier sistema de detección (espectrofotometría, electrodo selectivo a iones, conductimetría, ICP-MS, fluorescencia).

En la figura 27 se muestra un sistema FIA al que se le ha incorporado en la válvula de inyección una mini columna.

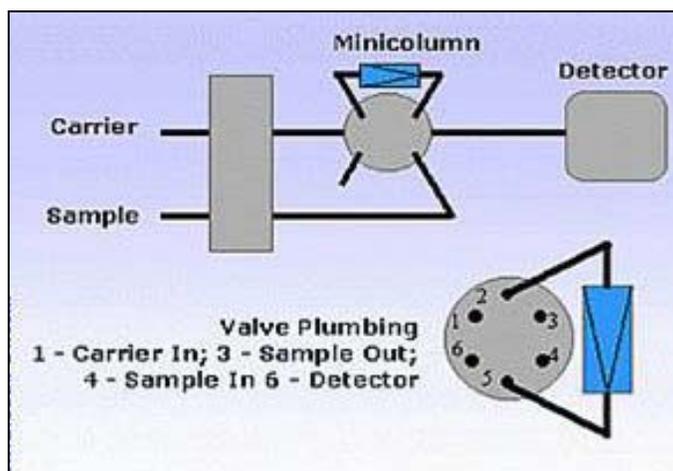


Figura 27- Sistema FIA con mini columna para preconcentración. (Extraída de GlobalFIA®, 2009).



Figura 28- Mini columnas para preconcentración. A la izquierda mini columna comercial, a la derecha mini columna empacada con una resina quelante construida en el laboratorio.

Existen diversos diseños de mini columnas para preconcentración pero en general el rango de volumen de las mismas esta entre 15 μL a 400 μL , los diámetros típicos van de 1.5 mm a 7.5 mm. Este tipo de dispositivos no solo sirven para preconcentración sino que también se utilizan como reactores en fase sólida (por ejemplo columnas empacadas con partículas de Cd para la determinación de nitrato, en este caso ocurre una reducción).

En todos los casos en que se interponga una columna en un sistema en flujo deben evaluarse algunos compromisos como ser:

- Evaluar el material de construcción según el tipo de empaque que contendrá la columna.
- Lograr buenos factores de enriquecimiento sin generar problemas de sobrepresión y dispersión.
- Considerar como afectarán largo de la columna y tamaño de partícula en la capacidad de carga.
- Compatibilidad con el sistema de detección.
- Las columnas empacadas en – línea crean un grado de impedancia extra en el flujo dependiendo de la geometría de la columna y el material de empaque de la misma.
- Aparecen nuevas etapas en la secuencia de análisis (ej. acondicionamiento de la columna).
- Se crean diferencias en las características de los patrones de flujo entre carga y elución.

La carga de la muestra se puede realizar mediante inyección por tiempo, esto elimina el paso de llenado del loop (sistemas FIA), y posterior arrastre de la muestra por la corriente del portador. Pero en este caso el sistema de bombeo debe mantener un flujo constante, lo que requiere bombas de alta calidad.

También se puede realizar la carga por volumen, pero en general deben utilizarse loops grandes, luego la muestra es conducida hacia el sistema de

preconcentración en el recorrido el cambio en la dispersión hace que luego puedan aparecer “colas”. Por otro lado este tipo de modalidad es mucho menos dependiente de la estabilidad del flujo (Fang, 1993).

Cuando se considera el diseño total del sistema se debe tener en cuenta la dispersión en el transporte del eluato y reacciones post-columna. En algunos casos el transporte de la zona de muestra concentrada hacia el detector es directa pero en otros casos se requiere una reacción posterior de manera que pueda ser detectada.

En el caso de introducción directa al sistema detector lo más importante es usar tubos cortos y de diámetro uniforme en lo que resta del camino. Cuando se requieren reacciones posteriores, se puede agregar el reactivo por una unión tipo “T”, y agregado de bobinas de mezclado.

Se debe tener especial cuidado con las condiciones de pH, compatibilidades con el eluyente, cambios en los índices de refracción, entre otros.

El eluyente no debe reaccionar con el adsorbente (no dañarlo al menos por un número adecuado de eluciones) y debe haber compatibilidad con el sistema detector (no usar corrosivos).

El índice de refracción en espectrofotometría es muy importante, el índice de refracción del eluyente debe ser lo más parecido posible al de la interfase de la muestra, portador y solución de lavado, de lo contrario aparecerán señales distorsionadas (Efecto Schlieren).

Es una práctica común realizar la elución reversa para evitar el empaquetamiento sucesivo lo que llevaría al apilamiento del analito en zonas y también para evitar la dispersión por efecto de camino múltiple

(difusión por torbellino). Los diferentes índices de refracción en la interfase muestra/portador y eluyente puede provocar efecto Schlieren. Esto ocasiona deformación en el perfil de los picos y puede provocar interferencias en las determinaciones espectrofotométricas. El índice de refracción del eluyente deberá ser lo más similar posible al de la interfase.

Como ya se mencionó existe una gran variedad de fases sólidas que pueden seleccionarse según la aplicación de interés.

Los sólidos pueden ser de base orgánica polímeros (naturales como la celulosa o sintéticos como el poliestireno-divinilbenceno, poliacrilatos, entre otros) o de base inorgánica (silica gel, silica gel funcionalizada o cargada, C18-SiO₂, alúmina, magnesia, óxidos).

En esta tesis se trabajó con Chelex[®]-100 una resina quelante (es un copolímero estireno-divinilbenceno con iones iminodiacetato) muy popular. La misma fue utilizada en los primeros trabajos publicados de preconcentración con una columna en Análisis en Flujo (Olsen *et al.*, 1983, Fang *et al.*, 1993). En la sección 5.1.2.2 se explicará con detalle la aplicación para la que se utilizó esta resina y sus propiedades.

Las resinas quelantes son muy usadas para preconcentración, sin embargo no se obtuvo tan buenos resultados en flujo como en batch debido a sus características de dilatación-contracción. En un sistema en flujo el hecho de que un material por el que atraviesa el flujo se dilate o contraiga durante una determinación genera muchos problemas.

Encontrar resinas selectivas es muy difícil, por lo que los estudios de interferencias deben ser exhaustivos.

Los agentes quelantes pueden ser introducidos directamente con la muestra y los quelatos luego ser retenidos por un sólido adecuado o introducir el grupo funcional quelante en la fase sólida. La unión del analito va a depender de: la naturaleza, carga y tamaño del átomo metálico (en el caso de preconcentración de metales), naturaleza del átomo donador presente en el ligando, condiciones de pH y “cross-linkage” del polímero usado en la fase sólida.

Es importante realizar lavados del lecho de la columna antes y después de la carga de la muestra, en general se realiza un acondicionamiento con *buffers* antes de la carga.

El volumen de la muestra debe ser suficiente para obtener buena sensibilidad y además la elución debe ser lo suficientemente lenta para permitir interacción.

Luego de la elución deben realizarse lavados con agua para remover residuos (evitar efecto *carry over*).

Velocidad de flujo – volumen de muestra- interacción-sensibilidad son relaciones que implican compromisos a la hora del diseño del sistema.

3.2.4. Análisis por Inyección en Flujo Multiconmutado (MCFA)

Los pioneros en emplear esta técnica de Análisis en Flujo fueron B. F. Reis, J. L. Costa Lima *et al.* en la Universidad de San Pablo, Piracicaba y de la Universidad de Porto, Portugal respectivamente. Si bien es un concepto incorporado hace ya más de 20 años en análisis en flujo, este grupo de investigadores brasileños y portugueses en los años 90 publicó una serie de trabajos que mostraron las ventajas de esta técnica emergente (Reis *et al.*, 1994, Olivera *et al.*, 1996, Vieira *et al.*, 1998, Rocha *et al.*, 2002).

Conmutación se define como “el pasaje de un estado a otro”, en electricidad es el cambio de dirección de una corriente realizado por un conmutador. La conmutación mecánica más simple involucra solo redireccionamiento de una corriente de flujo. Esto último es sencillo de lograr con una válvula de 3 vías (Rocha *et al.*, 2002).

“Un sistema multiconmutado se puede considerar como una red analítica que involucra la actuación de n dispositivos activos (o n operaciones con un dispositivo único) sobre una única muestra permitiendo establecer hasta 2^n estados” (Rocha *et al.*, 2002).

Estos sistemas en flujo tienen una configuración tipo redes, en ellos la muestra y los reactivos se insertan en la corriente de portador con un flujo constante mediante válvulas solenoide que funcionan en forma independiente. Controlando el tiempo en que las válvulas solenoide se encuentran en el modo ON/OFF es que se controla la cantidad de muestra y reactivo que ingresa al

sistema. El volumen de muestra inyectado debe ser exacto y reproducible. Esto depende principalmente de la precisión con que se controla el tiempo de activación de la válvula que a su vez es controlada por *software* y de la activación mecánica.

Las válvulas solenoide de aislamiento son dispositivos de dos posiciones en material inerte (PTFE), se accionan por un solenoide (bobina), que puede ser de bajo voltaje (p. ej. 12 V). Existen dos tipos básicos: de paso (abre/cierra) y selectoras de dos posiciones y 3 vías (una entrada, dos salidas). Pueden emplearse solas o agrupadas. En la figura 29 se muestran válvulas solenoide comerciales.



Figura 29- Válvulas solenoide de aislamiento. A la izquierda una válvula aislada a la derecha en diseño agrupado (Extraído de NRresearch Inc., 2009)

Un solenoide mueve una pieza que ocluye o libera un tubo flexible (ver figura 30).

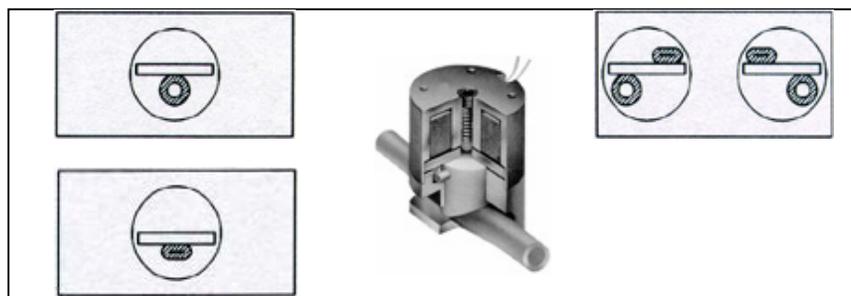


Figura 30- Válvulas solenoide de estrangulación (Extraído de NRresearch Inc., 2009).

En esta técnica se reemplaza el concepto de inserción de volumen de muestra o reactivo por el de inserción por tiempos, es una técnica basada en tiempo de muestreo (Catalá *et al.*, 2002).

En esta tesis se trabajó con válvulas solenoides de 3 vías, con ellas se construyeron sistemas que son redes con varias válvulas. Cada una de ellas es un conmutador independiente controlado por *software*.

Estas redes se parecen a circuitos electrónicos donde un número variable de nodos activos pueden adoptar dos estados: ON y OFF (activo o inactivo). Esto determina si por ejemplo la muestra PASA o NO PASA a través del sistema en flujo.

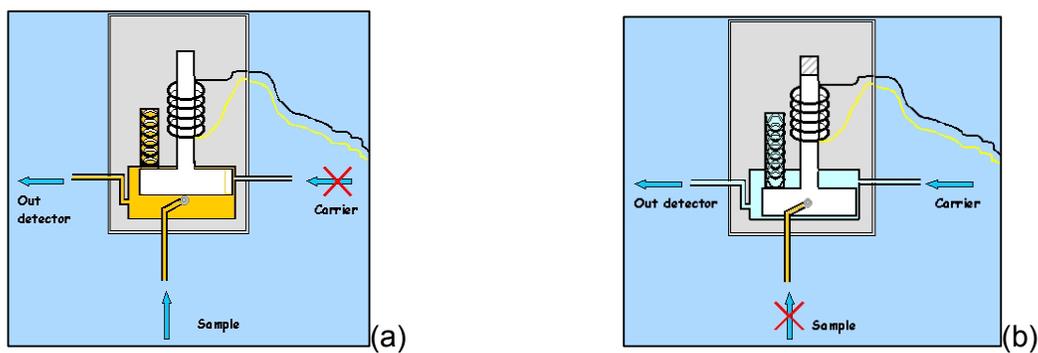


Figura 31- Válvulas solenoide (a) posición ON deja pasar un segmento de muestra (sample); (b) posición OFF deja pasar portador (carrier). (Modificado de Catalá Icardo *et al.*, 2002).

En un instante dado dos de los tres puertos de la válvula están permanentemente conectados. Cuando la válvula está en el estado OFF como se muestra en la figura 31 (b), el líquido pasa a través de ella hacia el detector. Cuando está en el estado ON, un pulso eléctrico de largo programable permite que la muestra pueda insertarse en el flujo de portador. Si el caudal es

constante el volumen de muestra insertado es proporcional al tiempo que dura el pulso eléctrico, o sea al tiempo en que permanece activada la válvula.

De forma análoga se puede insertar en el sistema segmentos de reactivos, disolventes, etc.

En la figura 32 se muestra como es el perfil de inserción de un segmento de muestra en un portador. Cuando la válvula no está activa (estado: OFF) el portador pasa en forma continua con una velocidad de flujo constante ya sea aspirado o impulsado por un sistema de bombeo (S_2). Al activar la válvula (estado: ON), el flujo de portador se corta y se inserta un segmento de muestra en la línea principal del sistema (S_1). El tamaño del segmento depende del tiempo que permanezca activada la válvula. Cuando la válvula se desactiva vuelve a pasar portador y el segmento de muestra inyectado es arrastrado a través del sistema hacia el detector por dicho portador. Mientras ocurre la muestra que no está pasando al sistema se puede reciclar. Esto es una ventaja ya que se consume menor cantidad de la misma.

Los procesos de dispersión que ya fueron descritos en la sección anterior ocurren también en este tipo de sistema de forma análoga. Como ya se mencionó la activación de las válvulas se controla vía *software*.

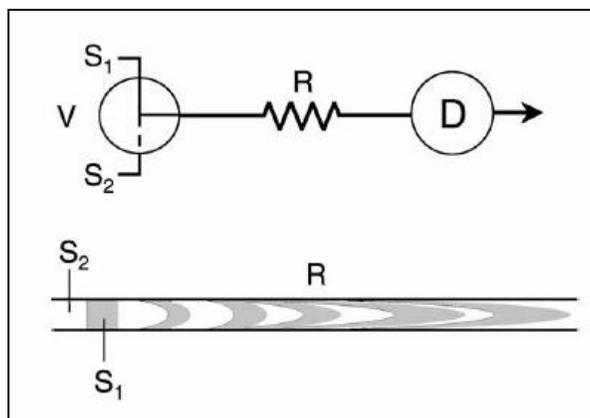


Figura 32- Inserción de la muestra con una válvula solenoide. V: válvula solenoide de 3 vías, R: bobina de mezclado, S1: muestra, S2: portador. (Extraído de Rocha *et al.*, 2002).

Este proceso se puede repetir varias veces de forma tal de insertar pequeños segmentos de muestra (del orden de los microlitros, lo que implica en general tiempos de menos de 1s) en tandem en el flujo del portador (muestreo binario).

En la figura 33 se muestra gráficamente como se insertan segmentos de muestra que pueden ser iguales o no formando un tandem.

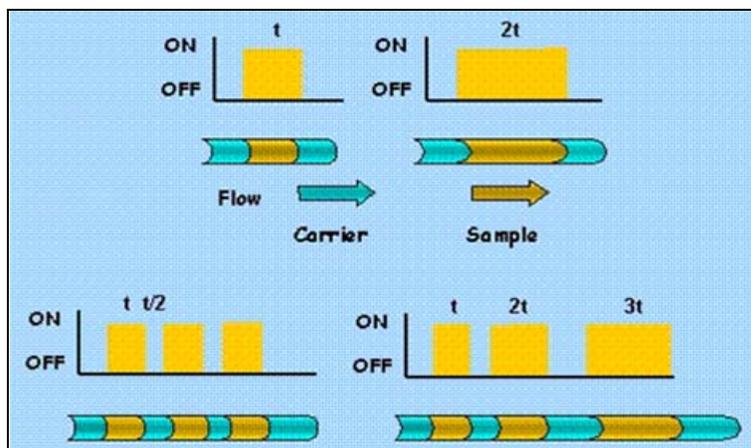


Figura 33- Inserción de varios segmentos de muestra con una válvula solenoide. (Extraído de Catalá Icardo *et al.*, 2002).

El intercalar pequeños segmentos de muestra o reactivos, formando “sándwiches” con segmentos de portador facilita el mezclado aún cuando el volumen total de la muestra sea grande. La coalescencia de las zonas lleva a homogeneizar la muestra mientras recorre el sistema hacia la zona de detección.

Otras disposiciones de estos sistemas permiten mezclar segmentos de varios reactivos y muestra. Las redes pueden ser muy simples o muy complejas según la complejidad de la reacción o de la cantidad de analitos que se desee determinar. En general en los sistemas FIA los reactivos circulan permanentemente por el sistema, en este caso los reactivos se pueden insertar en segmentos discretos y el resto del tiempo se reciclan disminuyendo así su consumo.

La instrumentación para este tipo de sistemas es igual que para los sistemas FIA excepto por la incorporación de las válvulas solenoide como dispositivos de introducción de la muestra. Los tubos y conexiones no difieren de lo explicado en la sección 3.2.2.

Como impulsores se utilizan también bombas peristálticas o bombas de jeringa (estas últimas serán mencionadas con más detalle en la sección 3.2.4) funcionando tanto impulsando el flujo como aspirando muestra, reactivos y portador. En el caso de aspirar muestra, reactivos y portador la bomba se coloca después del sistema de detección. Este tipo de disposición tiene como desventaja la formación de burbujas lo que afecta el perfil de dispersión y la detección (Feres *et al.*, 2008).

En este tipo de sistemas donde el muestreo es controlado por tiempos, los errores están directamente relacionados con la precisión con que las válvulas conmutan y con las pulsaciones de la bomba peristáltica.

El control de tiempos debe ser muy preciso, tiempos menores a 0.2 s no son convenientes debido a la incertidumbre en el tiempo de conmutación causada por el sistema mecánico-fluídico de la bomba. Por otro lado se debe seleccionar una bomba peristáltica que no tenga mucha pulsación cuando está funcionando o lograr sincronizar la conmutación de las válvulas con dicha pulsación (Reis *et al.*, 1994).

La conmutación de las válvulas es responsable entonces de la adición de los componentes al sistema en flujo o de re-direccionar el flujo de ellos hacia un descarte o botella de reciclado. Pero también con la conmutación controlada por *software* se pueden modificar condiciones de operación en tiempo real.

Esto permite realizar operaciones como mezclado en tandem, diluciones en línea (*splitting* y *slicing*), y en sistemas multiparamétricos el pasaje de una u otra muestra o reactivo según el analito a determinar. También si en el sistema hay interpuestos otros dispositivos como columnas de preconcentración o membranas de diálisis permite controlar el pasaje o no de la muestra a través de los mismos.

En las figuras 34 y 35 se muestran los esquemas de dos sistemas multiconmutados, con muestreo binario, diseñados en nuestro laboratorio como ejemplo de disposiciones de diferente complejidad y aplicación.

Por convención se suele representar las válvulas solenoide de 3 vías como círculos y en su estado normal antes de que comience a funcionar el sistema. La línea llena muestra por donde pasa el flujo cuando está entonces en estado OFF (por convención se le asigna el valor 0), cuando la válvula se activa el flujo pasa por la vía que se representa con línea punteada, estado ON (por convención se le asigna el valor 1).

En la figura 34 un sistema para la determinación de dextrosa en soluciones parenterales y concentrados para hemodiálisis. Este sistema insertaba en la corriente de portador varios segmentos de muestra y reactivo. Dentro de un baño a 37°C tenía lugar una reacción enzimática y se formaba un compuesto coloreado cuya absorbancia se monitoreaba a 505 nm (Knochen *et al.*, 2005).

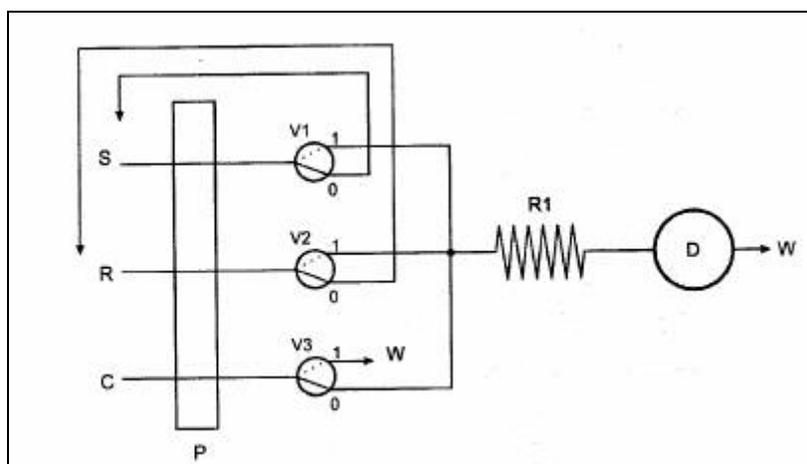


Figura 34- Sistema multiconmutado para determinación de dextrosa. (Extraído de Knochen *et al.*, 2005).

En la figura 35 se muestra el esquema de un sistema de 5 válvulas que permitía por medio de las válvulas 4 y 5 tomar submuestras más pequeñas de analito en forma consecutiva o sea dos diluciones en línea (splitting).

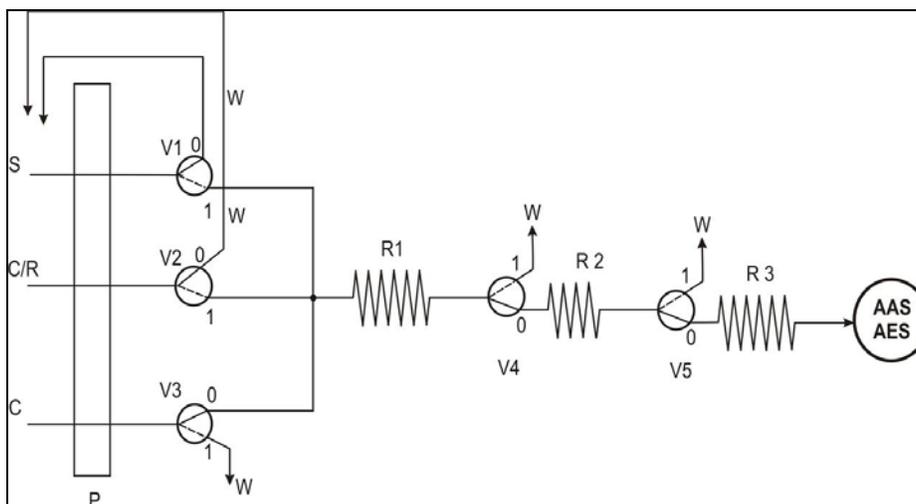


Figura 35- Sistema multiconmutado para determinación de Na, K, Mg y Ca. V1, V2, V3, V4 y V5: válvulas solenoide, R1, R2 y R3: bobinas de mezclado (Extraído de Pistón *et al.*, 2006).

Para explicar como funcionan las conmutaciones del sistema se suelen realizar diagramas como el que se muestra en la figura 36 que se corresponde con los tiempos detallados en la figura 37. Cuando la línea está arriba indica que la válvula está activada.

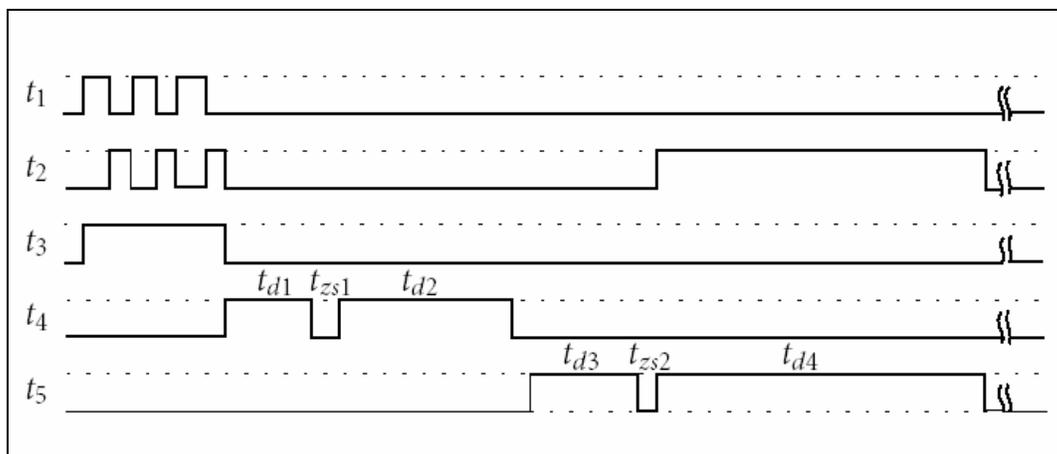


Figura 36- Diagrama de tiempos de conmutación de las válvulas para la determinación de Na, K, Mg y Ca. (Extraído de Pistón *et al.*, 2005).

Parameter	Analyte			
	Sodium	Potassium	Calcium	Magnesium
t_{v1} (s)	1.5	1.4	1.3	1.5
t_{v2} (s)	1	1	1	1
No. of segments	3	3	3	6
t_{d1} (s)	5	9	8	15
t_{zs1} (s)	1.5	1.5	1.5	2
t_{d2} (s)	10	10	15	10
t_{d3} (s)	6	0	0	0
t_{zs2} (s)	1.3	0	0	0
t_{d4} (s)	20	0	0	0
Total time (s)	51.3	47.7	51.4	62
Sampling frequency (h^{-1})	70	75	70	58

Figura 37- Tiempos de conmutación de las válvulas para la determinación de Na, K, Mg y Ca. (Extraído de Pistón *et al.*, 2005).

De todo lo explicado surgen algunas ventajas de los sistemas multiconmutados frente a los sistemas FIA clásicos como ser:

- en general menor consumo de muestra y reactivos debido al diseño de los sistemas miniaturizados es posible obtener buenos resultados insertando pequeños segmentos de muestra y reactivos.
- son sistemas miniaturizados capaces de ser fácilmente transportados
- pueden ser fácilmente automatizados, la conmutación de las válvulas se controla desde un PC, y fácilmente se pueden cambiar los parámetros de operación lo que los vuelve sistemas muy flexibles y versátiles.
- son más económicos que FIA en cuanto a que las válvulas solenoides son menos costosas que las válvulas de inyección.

Entre las desventajas está el problema de tener que sincronizar las pulsaciones de la bomba con las conmutaciones de lo contrario dichas pulsaciones introducen imprecisión en la repetibilidad de los tiempos de inyección y además distorsionan el perfil de dispersión en el sistema.

Existe poca disponibilidad de *software* para control de las válvulas, en general se termina fabricando controladores caseros y programas diseñados en el laboratorio para la operación.

3.2.5. Análisis por Inyección Secuencial en Flujo (SIA)

El Análisis por Inyección Secuencial (del inglés *Sequential-injection analysis*, SIA) fue al comienzo desarrollada como una alternativa para superar las desventajas de la técnica en flujo más empleada en aquél momento, FIA (Economou, 2005). En 1990 Ruzicka y Marshall publicaron el primer trabajo de esta técnica que es una extensión de FIA pero con algunas diferencias en sus principios (Ruzicka y Marshall, 1990).

En SIA se emplea una bomba de jeringa u otra bomba bidireccional, una válvula multiposición, una bobina de retención helicoidal (*holding coil*), una segunda bobina de mezcla (opcional) y un detector.

En esta técnica las muestras y reactivos se toman por aspiración a través de una válvula multiposición y son enviados al *holding coil*. La mezcla se produce dentro de la bobina de retención (*holding coil*) por sucesivas inversiones del sentido del flujo y luego la zona es enviada al detector.

En la figura 38 se muestra un esquema comparativo de un sistema FIA y un sistema SIA.

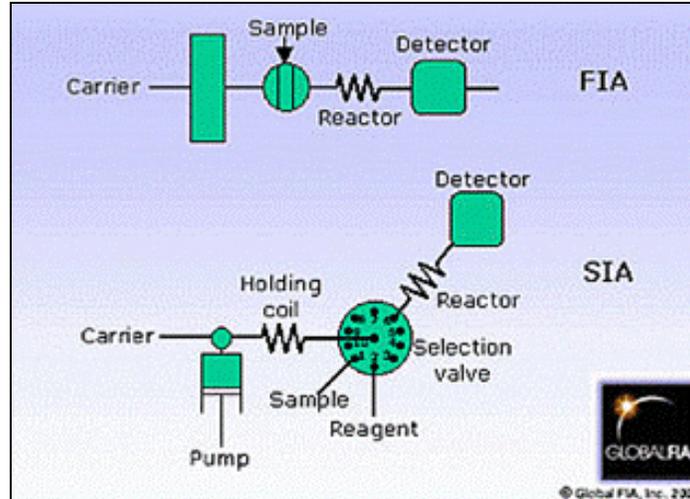


Figura 38- Comparación de un sistema FIA y un sistema SIA. Carrier: portador, Sample: muestra, Reactor: bobina de mezcla, Holding coil: bobina de retención, Pump: bomba, Reagent: reactivo, Selection valve: válvula selectora. (Extraído de GlobalFIA®, 2009).

Básicamente un sistema SIA consiste en un dispositivo impulsor bidireccional (bomba peristáltica, bomba de jeringa o de pistón), una válvula multiposición como ya se indicó anteriormente con varios puertos para la entrada de muestras y reactivos (este dispositivo sustituye la válvula inyectora de FIA), uniones y conexiones, un detector y un software.

La válvula multiposición funciona sincronizada con la bomba y el detector, se programa una secuencia vía *software* para coordinar los eventos.

En la figura 39 se muestra un esquema básico de un sistema SIA.

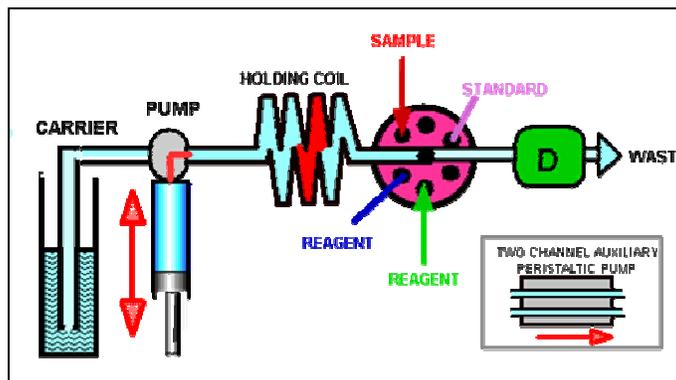


Figura 39- Componentes básicos de un sistema SIA. Carrier: portador, Sample: muestra, Holding coil: bobina de retención, Pump: bomba, Reagent: reactivo, Standard: patrón, Waste: descarte.

El perfil de dispersión en este caso cambia respecto a FIA, se observa en la figura 40 que en FIA el flujo siempre va en la misma dirección mientras que en SIA el mismo sufre al menos una inversión de sentido. Esto favorece el mezclado de las zonas, y ocurre en la bobina de retención.

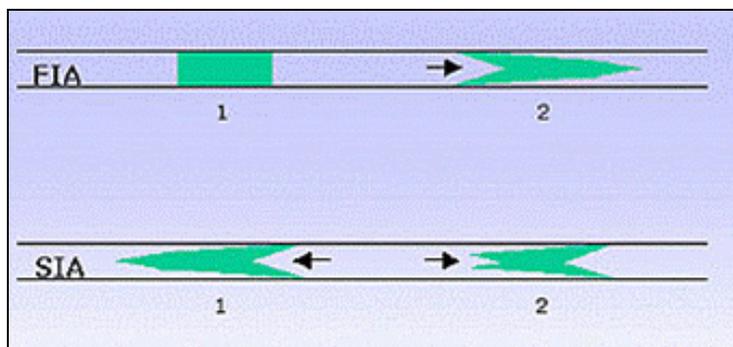


Figura 40- Comparación de los perfiles de dispersión FIA y SIA.(Extraído de GlobalFIA®, 2009).

Mientras en FIA la zona de reactivo se insertaba en la corriente del portador mediante un punto de confluencia y posteriormente se encontraba con la muestra en algún otro punto de confluencia, en SIA la interacción entre la muestra y los reactivos tiene lugar mediante la penetración de zonas. En estas zonas de superposición tendrán lugar las reacciones químicas.

Una secuencia simple, típica en SIA sería:

1- aspiración de portador desde un puerto de la válvula multiposición hacia la bobina de retención utilizando por ejemplo una bomba de jeringa.

2- aspiración de la muestra (volumen exacto medido con la jeringa) desde otro puerto de la válvula multiposición hacia la bobina de retención.

3- aspiración de un reactivo desde otro puerto de la válvula multiposición hacia la bobina de retención. En este instante 3 segmentos están apilados en la bobina de retención, portador, muestra y reactivo.

4- inversión del sentido de flujo para impulsar con el portador la muestra y el reactivo hacia el detector.

En el recorrido hacia el detector se puede intercalar una bobina de mezcla lo cual puede mejorar la mezcla de muestra y reactivo, aunque este proceso ya ocurrió en la bobina de retención. Según la aplicación se pueden acoplar al sistema mini columnas para preconcentración o para reacciones en fase sólida, dispositivos separador gas-líquido, líquido - líquido entre otros.

Las señales, análogamente a los sistemas ya explicados, son de tipo transitorio como se muestra en la figura 41 C, existe una zona de superposición, la altura H será proporcional a la concentración de analito.

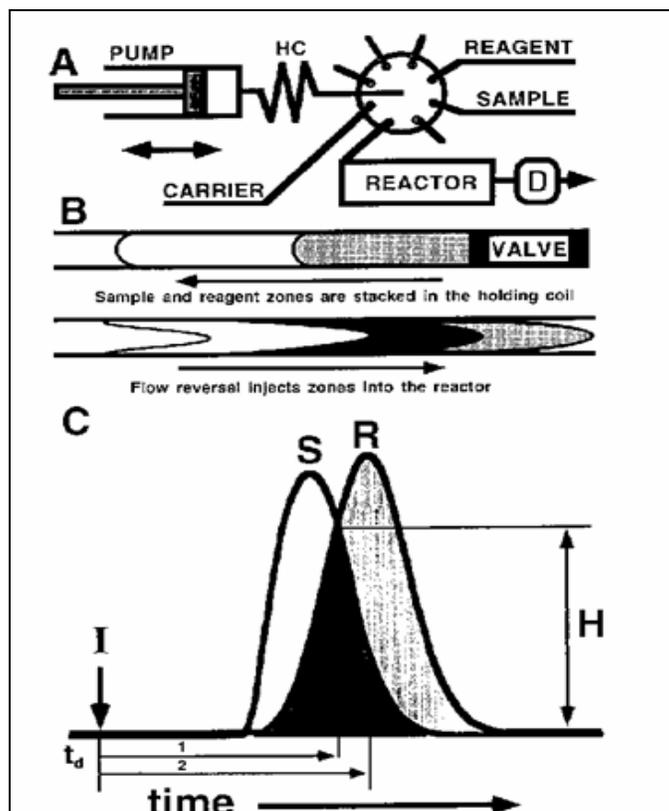


Figura 41- Principios de SIA. A: esquema de un sistema SIA, B: perfil de zonas aspiradas hacia la bobina de retención, C: perfil de concentración como lo ve el detector (I: punto de inyección, S: muestra, R: reactivo, H: altura de pico, en negro zona de superposición) (Extraído de Ruzicka y Marshall, 1990).

La instrumentación para SIA es similar que la que utiliza en las técnicas ya mencionadas. Como componentes nuevos aparecen las válvulas multiposición, que como ya se comentó sustituyen a las válvulas de inyección de FIA o a las

válvulas solenoide de MCFA, y el uso de bombas de jeringa (aunque también se utilizan bombas peristálticas).

En la figura 42 se muestra una válvula multiposición comercial y en la figura 43 una bomba de jeringa (en esta tesis se trabajó con válvulas multiposición de 10 puertos y bomba de jeringa de 3 mL).

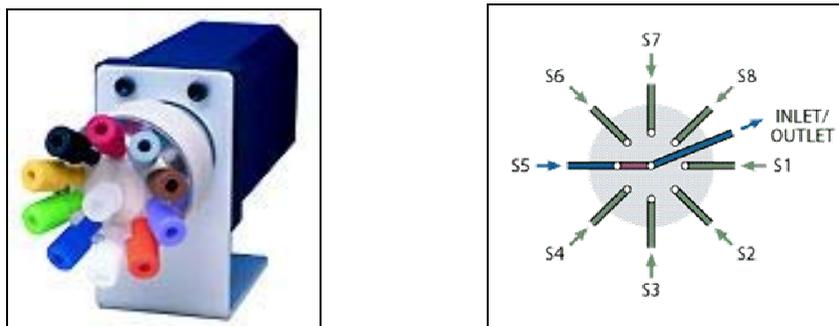


Figura 42- Válvulas multiposición comerciales.(Extraído de FIAlab®, 2009).



Figura 43- Bombas de jeringa comerciales.(Extraído de GlobalFIA®, 2009).

En cuanto a los materiales para diseñar los sistemas, como ser conexiones, bobinas de retención, bobinas de mezcla o uniones, todos son similares a los utilizados en el diseño de sistemas FIA o MCFA.

SIA es compatible con diversos sistemas de detección y utiliza celdas de flujo igual que FIA y MCFA cuando se realizan determinaciones con un sistema de detección espectrofotométrico (UV-vis).

Es una técnica que trabaja con pequeñas zonas por lo que las condiciones de dispersión pueden controlarse mejor y el hecho de realizar inversión de flujo contribuye significativamente al mezclado eficiente de las zonas (Lenehan *et al.*, 2002).

Al igual que MCFA, los dispositivos (válvula multiposición y bomba de jeringa) deben ser controlados vía *software*, esto hace que el sistema se vuelva flexible ya que no hace falta cambiar todo el sistema para introducir una modificación sino que los cambios se hacen desde el *software*. Por ejemplo si una muestra es muy concentrada, se realiza una toma de menor volumen con la jeringa programando el volumen de toma. También se pueden realizar análisis multiparamétricos.

Existen empresas dedicadas al desarrollo de estos sistemas para comercializar y junto con el sistema se vende también el *software*.

En esta tesis se diseñaron dos sistemas SIA (determinación de zinc, sección 5.1.3 y determinación de nitrato y nitrito, sección 5.2), en ambos casos el *software* fue diseñado en nuestro laboratorio. Los únicos dispositivos

comerciales fueron la válvula multiposición y la bomba de jeringa, el resto se diseñó completamente en el laboratorio.

Una ventaja de los sistemas SIA es el bajo consumo de reactivos y muestra con la consecuente generación de menor cantidad de residuos químicos, ventaja que comparte con los sistemas MCFA sobre FIA.

En general la frecuencia de muestreo suele ser más baja que en FIA y MCFA. Esto puede deberse a que la válvula multiposición tiene un tiempo mínimo para pasar de una posición a otra, al tiempo de carga de la jeringa que debe optimizarse (no puede ser muy rápido porque genera burbujas) y a que los segmentos en algunas etapas se alejan del detector (deben recorrer distancias más largas).

Este tipo de técnica se ha utilizado en numerosas aplicaciones como ser análisis de alimentos (Pérez-Olmos *et al.*, 2005), de productos farmacéuticos, muestras ambientales, en control de procesos industriales, entre otros (Lenehan, 2002).

3.3. Técnicas instrumentales

3.3.1. Espectrometría de Absorción Atómica de llama (FAAS)

La capacidad de los metales de colorear las llamas es bien conocida: los electrones excitados por acción del calor retornan a sus “estados basales” (configuraciones electrónicas más estables) y emiten cuantos de energía lumínica de longitud de onda característica de cada elemento. Eso se conoce como emisión atómica. El proceso complementario, por el cual los átomos en sus estados basales absorben cuantos de energía y alcanzan estados excitados se conoce como absorción atómica. La cantidad de radiación absorbida a la longitud de onda característica aumenta con el número de átomos del elemento en cuestión en el camino del haz de radiación; por comparación con patrones adecuados (calibración), la concentración del elemento en la muestra puede ser estimada a partir de la cantidad de radiación absorbida.

Para medir la absorbancia debida a un analito se debe remover componentes de la matriz que puedan interferir en la determinación del mismo. Esto puede realizarse ya sea restando el fondo midiendo un “blanco” libre del analito, o simultáneamente se puede medir y sustraer la señal de fondo (background).

La muestra se mide en disolución por lo que la viscosidad de la misma (que afecta la nebulización de dicha disolución en la llama) así como en la volatilidad del analito (que afecta la absorbancia en las medidas de absorción atómica)

son características de la muestra que deben ser tenidas en cuenta a la hora de realizar determinaciones mediante esta técnica.

La técnica de introducción de muestras más comúnmente empleada en la espectrometría de absorción atómica es aquella en la cuál la muestra, bien como un líquido o una disolución, es nebulizada neumáticamente dentro de una cámara de nebulización (el líquido o la disolución se reducen a una niebla al pasar a través del nebulizador). El aerosol producido es conducido junto con una mezcla de un gas combustible y un gas oxidante hacia un quemador (Broekaert, 2002). En la figura 44 se muestra un esquema de un nebulizador-quemador usado en equipos de espectrometría atómica.

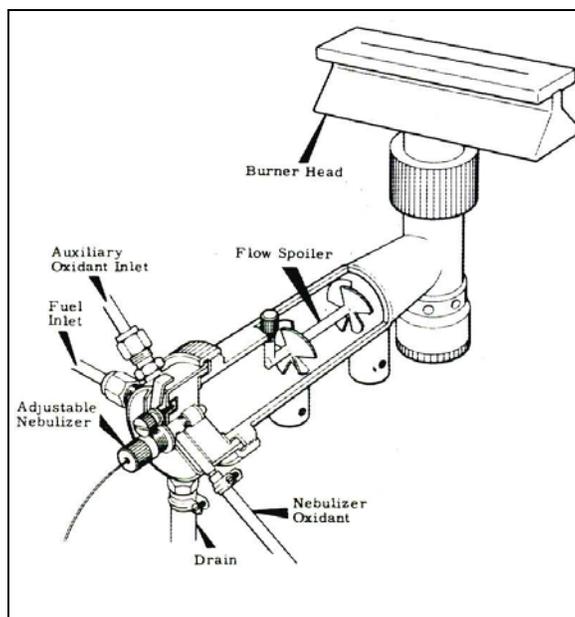


Figura 44- Vista de un sistema nebulizador-cámara de mezclado y quemador. (PerkinElmer®).

Una vez que alcanzan la llama, las gotitas de líquido se secan para dar partículas sólidas las cuales luego se convierten en moléculas en fase gaseosa (mecanismo más general). Posteriormente las moléculas se disocian para dar átomos libres.

Solo el 10% de la disolución aproximadamente realmente llega a la llama. Ésta es una razón para la limitada sensibilidad de las técnicas de llama. La otra razón importante para dicho inconveniente es el corto tiempo de residencia de los átomos libres en la llama (y especialmente en el camino del haz de radiación).

Diferentes tipos de llama se pueden usar en espectrometría de absorción atómica, algunos ejemplos aparecen en la tabla 2:

Tabla 2- Tipos de llama

Gas combustible	Oxidante	Temperatura de la llama (°C)
Hidrógeno	Aire/Argón (difusión)*	400 (350-1000)
Propano	Aire**	1930
Hidrógeno	Aire**	2000-2050
Acetileno	Aire	2100-2400
Acetileno	Óxido nitroso	2650-2800

* actualmente casi en desuso, excepto en para las determinaciones de algunos hidruros mediante atomizadores con llama interna.

**Poco usadas.

Las llamas aire/acetileno son el tipo de llama más usado ya que proveen un “entorno adecuado” y una temperatura lo suficientemente alta para la determinación de muchos elementos. No hay ionización considerable en la llama (con la excepción de los elementos alcalinos) y no existe prácticamente

absorción a longitudes de onda por encima de 230 nm. Además, la emisión de radiación de la llama es bastante baja.

La llama óxido nitroso/acetileno debido a su elevada temperatura, se recomienda para la determinación de elementos que forman parte de moléculas que necesitan una alta energía de disociación (esto es, la requerida para formar átomos libres). Para éstos elementos, esta llama provee condiciones térmicas, químicas y ópticas adecuadas. La emisión de fondo, sin embargo, es bastante alta a ciertas longitudes de onda y la alta temperatura conlleva un considerable riesgo de ionización para ciertos elementos.

Las llamas aire/hidrógeno o aire/propano son principalmente recomendadas para el análisis de elementos alcalinos dado que la temperatura es lo suficientemente baja para prevenir grandes efectos de ionización, pero son muy poco usadas.

La llama hidrógeno/aire-argón, llamada "llama de difusión" fue muy usada especialmente para la determinación de As y Se (con nebulización clásica de la muestra y con generación de hidruro). Este tipo de llama presentaba la ventaja de que su absorción a longitudes de onda por debajo de 200 nm era mucho menor que la absorción de otros tipos de llama. Esta llama tiene un perfil único, que se destaca especialmente cuando se utiliza un quemador de 3 rendijas. En el exterior donde existe mezclado con el aire exterior tiene una temperatura de 850 °C, mientras que en el centro la temperatura alcanza

solamente 300-400°C, dependiendo de la altura en la llama. Dada su baja temperatura, debe esperarse que presente interferencias químicas (Welz y Sperling, 1999).

Instrumentación

Los instrumentos usados en absorción atómica son espectrómetros que emplean un sistema óptico de simple haz o de doble haz.

Más allá del sistema óptico que emplee el instrumento, existen componentes que son básicos en un espectrómetro de absorción atómica a saber:

- Una fuente de radiación que emite un haz de una longitud de onda característica del elemento que quiere determinarse;
- Una “celda de absorción” en donde la muestra se reduce a una nube de átomos en su estado fundamental, por ejemplo, una llama o un horno de grafito;
- Un monocromador para aislar la radiación que es absorbida por el elemento a medir;
- Un detector, por ejemplo un tubo fotomultiplicador que detecta y mide la intensidad del haz de radiación resultante;
- Un amplificador y componentes electrónicos asociados para amplificar y procesar la señal del detector;

→ Un dispositivo de lectura y/o registrador el cual muestra la señal medida luego de que ésta fue procesada.

Las fuentes de radiación usadas comúnmente en absorción atómica son lámparas de cátodo hueco. El cátodo hueco está situado en el centro de la lámpara y está compuesto normalmente de la forma pura de un elemento o de una aleación del mismo. La lámpara está llena con un gas inerte, normalmente neón o a veces argón.

Son generalmente confiables y la mayoría tienen vidas operativas que exceden los 5000 mA hora. La vida útil de las lámparas con cátodos construidos con aleaciones o elementos volátiles como As o Se suele ser más corta.

Estas lámparas pueden ser mono-elemento o multi-elemento, en estas últimas el cátodo de las mismas está compuesto por varios elementos.

La fuente emite un haz, cuyo espectro se caracteriza por el elemento a partir del cual está hecha, es enfocado a través de la celda de absorción hacia el monocromador. La fuente de radiación puede ser modulada en amplitud de alguna forma, por ejemplo, por modulación electrónica o corte óptico de tal modo que sea posible distinguir entre la señal de la fuente de radiación y la debida a la emisión de la llama u horno (celda de absorción). Al pasar por el monocromador, se aísla la radiación de longitud de onda específica del elemento a determinarse y pasa al tubo fotomultiplicador (detector) donde se

produce una corriente eléctrica la cual es dependiente de la intensidad de la radiación.

En un instrumento de doble haz el haz de radiación de la fuente de luz es dividido por un dispositivo (splitter) en dos haces: uno (haz de la muestra) que atraviesa la “celda de absorción” y el haz de referencia. El instrumento entonces mide la relación entre la intensidad de los haces de la muestra y de la referencia. Mediante este proceso, el instrumento es capaz de compensar el efecto de deriva y fluctuaciones de la fuente de luz y de los componentes electrónicos de tal forma que puede obtenerse una línea de base más estable.

El sistema óptico de un espectrómetro de simple haz es más sencillo que el requerido por uno comparable de doble haz. Esto significa que en el sistema de simple haz hay una menor cantidad de la energía de la fuente lumínica absorbida por los componentes ópticos del instrumento. Por otro lado los instrumentos de doble haz son capaces de compensar las fluctuaciones de la intensidad de salida de las fuentes de luz durante su período de calentamiento. De aquí que éstos no están influidos por tales fluctuaciones.

En esta tesis se utilizó la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica con llama acetileno-aire para la determinación de cobre y zinc como se indica en los métodos de referencia (Bueno, 1996).

3.3.2. Espectrometría de Absorción Atómica con generación de Hidruros (HG-AAS)

Principio Básico

Los métodos de generación de hidruros pueden ser usados para determinar aquellos elementos que forman hidruros volátiles cuando se tratan con disolución ácida de NaBH_4 . Este método es particularmente útil para As, Sb, Bi y Se.

Los hidruros liberados fluyen del recipiente de reacción por medio de una corriente de un gas portador inerte (N_2 o Ar por ejemplo) a un tubo de cuarzo abierto en los extremos, el cual es calentado por medio de una llama de aire/acetileno. El tubo de cuarzo se monta por encima del quemador y se alinea con el haz de radiación proveniente del espectrómetro. La temperatura del tubo calentado de esta manera es tal que los hidruros se descomponen para producir átomos libres de los elementos a ser determinados, e hidrógeno.

La técnica es muy sensible, con límites de detección típicamente en el orden de 0.0001 a $0.001 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, para los analitos mencionados anteriormente. La respuesta es dependiente de los estados de oxidación de los elementos a ser determinados. De esta manera, los compuestos de As y Sb deberán contenerlos en su estado (III) y los de selenio en estado (IV) antes del agregado de NaBH_4 (Ramesh y Riyazuddin, 2005).

Tabla 3- Hidruros volátiles de algunos analitos.

Analito	Estado de oxidación óptimo	Fórmula	Nombre común
antimonio	Sb(III)	SbH ₃	estibina
arsénico	As(III)	AsH ₃	arsina
bismuto	Bi(III)	BiH ₃	bismutina
germanio	Ge(IV)	GeH ₄	germano
plomo	Pb(II)	PbH ₄	plumbano
selenio	Se(IV)	SeH ₂	hidruro de selenio
teluro	Te(IV)	TeH ₂	hidruro de teluro
estaño	Sn(II), Sn(IV)	SnH ₄	estannano

Teoría y mecanismos

Las primeras determinaciones de arsénico a partir de su hidruro, fueron realizadas por Marsh en 1836. Su equipo consistía en un tubo en forma de U en donde se colocaba la disolución que podía contener arsénico junto con zinc y ácido sulfúrico. La arsina (AsH₃) generada se descomponía en una llama hidrógeno-aire y se recolectaba el arsénico elemental en una “ventana de vidrio fría” (Brindle, 2007).

Posteriormente varias mejoras fueron introducidas al método de Marsh, pasando por el test de Gutzeit que involucraba el pasaje de la arsina generada a través de un papel filtro impregnado con sales de mercurio, en el papel aparecía un precipitado amarillo y el diámetro del círculo amarillo formado era

medido contra medidas de diámetros generadas por patrones de concentración conocida lo que se transformó en una de las primeras determinaciones semi-cuantitativas (Brindle, 2007).

Pero fue Holak en 1969 el primero en aplicar la generación de hidruros para la determinación de As usando AAS (Welz y Sperling, 1999). Hollak determinó As convirtiéndolo en AsH_3 , la arsina era recolectada en una trampa de nitrógeno líquido, luego el dispositivo era calentado y la arsina desprendida arrastrada hacia la llama con un flujo de nitrógeno (Brindle, 2007)

Hoy en día la técnica de generación de hidruros acoplada a la espectrometría de absorción atómica de llama es muy utilizada y diversos equipos son comercializados con accesorios para este fin.

Las técnicas de introducción de muestra en fase gaseosa se basan usualmente en la generación de un compuesto volátil. Esto implica la conversión selectiva del analito de la muestra líquida a la fase gaseosa por medio de una reacción química apropiada que da como resultado un compuesto volátil del analito.

En el proceso ocurre la preconcentración del analito y su separación de la matriz de la muestra. Esto tiene como resultado una sensibilidad superior y principalmente una importante supresión de interferencias durante la atomización. El proceso de determinación de elementos que forman compuestos volátiles por medio de cualquier método espectrométrico involucra tres pasos independientes: (1) preparación de la muestra, (2) generación del compuesto volátil y (3) atomización/detección (Dědina y Tsalev, 1995).

El primer paso involucra la transformación de la muestra original en una disolución (en los casos de determinación mediante HG-AAS). Esto significa convertir la muestra en una disolución sin pérdidas de analito y sin contaminación. Las matrices biológicas u orgánicas deberán ser completamente descompuestas, esto hace que para la técnica de generación de hidruros el paso de mineralización de una matriz con alto contenido de materia orgánica sea crítico (*Bulletin of the Internacional Dairy Federation* N° 278/1992, Dědina y Tsalev, 1995).

En la preparación de la muestra, que como se dijo es un paso crucial, uno de los grandes riesgos es tener pérdidas por volatilización o descomposición incompleta de las matrices biológicas (lo que trae como consecuencia un mayor riesgo de tener interferencias por la matriz), también blancos de reactivos significativos (con cantidad de analito cuantificable) y conversión incompleta del analito al estado de oxidación óptima, todos estos son problemas que deben resolverse.

El segundo paso, la generación del compuesto volátil, consiste la pre-reducción y en la liberación del compuesto volátil de la disolución de la muestra, y su transferencia a la fase gaseosa, y el transporte del compuesto liberado por un flujo de gas portador a un atomizador/detector.

En tanto el último paso de la determinación de elementos que forman compuestos volátiles (llevado a cabo en atomizadores localizados en el espectrómetro empleado) es específico para el método espectroscópico y dependerá de la técnica empleada, los primeros dos pasos son comunes a

todos las técnicas de detección (Dědina y Tsalev, 1995, Ramesh y Riyazuddin, 2005).

La separación gas-líquido puede ser llevada a cabo en modo batch o mediante métodos en flujo.

La introducción de la espectrometría de absorción atómica en los laboratorios a lo largo del mundo fue un incentivo para la aplicación masiva de la generación de hidruros (del inglés, HG) en la espectrometría de absorción atómica (del inglés, AAS) y también en otros métodos analíticos de espectrometría atómica. Ésta técnica fue introducida en los años 70 por Holak como se comentó anteriormente, para sobreponerse a problemas asociados a determinaciones de AAS de llama, para As y Se (Dědina y Tsalev, 1995).

En años siguientes, las ventajas del método condujeron a que el mismo se aplicara a todos los elementos que son capaces de formar hidruros volátiles: As, Sb, Bi, Ge, Pb, Se, Te y Sn (Dědina, 1999, Brindle, 2007).

Para convertir el analito presente en una disolución en su hidruro correspondiente han sido usadas varias estrategias y los mecanismos involucrados en la formación de hidruros aún hoy siguen siendo controvertidos y discutidos (Dědina y Tsalev, 1995, Dědina, 1999, Ramesh y Riyazuddin, 2005).

Preparación de la muestra

Cuando se realiza la preparación de la muestra es conveniente que el analito finalice su transformación en el estado de oxidación óptimo para la formación de su hidruro. En el caso del Sb, As, Se y Te, los cuales están frecuentemente en estados de oxidación superiores, se requiere una pre-reducción dado que los analitos de mayor estado de oxidación, o bien no se convierten en absoluto en sus hidruros (Se, Te), o la conversión se hace con poca eficiencia (Sb, As) (Dědina y Tsalev, 1995).

Se encuentran en la literatura numerosos procedimientos para la preparación de la muestra, a menudo específicos para una combinación matriz-analito determinada y para la pre-reducción (Brown *et al.*, 1981, Schramel y Xu, 1991, Welz *et al.*, 1993, Zhang 2008, Clesceri *et al.*, 1998, p. 3-59).

En esencia, los procedimientos para la pre-reducción de As(V) y Sb(V) son bastantes similares. La mayoría de los procedimientos de pre-reducción emplean yoduros y/o ácido ascórbico, o más recientemente, L-cisteína (Dědina, 1999, Pitzalis *et al.*, 2009).

Los procedimientos de pre-reducción para Se(VI) y Te(VI) son mutuamente similares pero diferentes a aquéllos usados para As(V) y Sb(V). En el caso de las especies de Se y Te lo que sucede es que pueden ser reducidas a sus formas elementales (y por lo tanto se pierden para la HG) por parte de los pre-reductores más comunes (yoduros, ácido ascórbico) usados para As(V) y Sb(V)

(Dědina, 1999). Un procedimiento típico para el Se(VI) o el Te(VI) consiste en calentar la solución de la muestra con HCl (1:1) por 25-30 minutos en un baño de agua en ebullición a 95-100 °C para obtener las especies de interés Se(IV) y Te(IV) (Clesceri *et al.*, 1998, p. 3-59).

En el caso del análisis de especiación se puede trabajar con diferentes niveles de acidez tal que la reducción se puede detener en estados de oxidación intermedios. Esto ha sido aplicado para especiación de las formas inorgánicas de Sb, As, Se y Te en solución acuosa: Sb(III) y Sb(V), As(III) y As(V), Se(IV) y Se(VI), Te(IV) y Te(VI). (Pyrzyńska, 1998, Qiu *et al.*, 2006, Caroli, 1996).

El procedimiento típico para análisis de especiación se basa en la determinación del analito en su menor estado de oxidación en una alícuota de la muestra y de la suma del analito en ambos estados en una segunda alícuota. Luego se calcula el contenido del analito en su mayor estado de oxidación por diferencia (Dědina, 1999, Qiu *et al.*, 2006).

Mecanismos propuestos

Descomposición del Tetrahidroborato en medio ácido.

La formación de hidruros por medio de la reducción con tetrahidroborato (BH_4^- / medio ácido) del analito es llevada a cabo usualmente en medio ácido (más comúnmente HCl). El BH_4^- se descompone muy rápidamente en medio ácido para dar ácido bórico e hidrógeno. Entre pH 3.8 y 14, la reacción de descomposición es de segundo orden (con una velocidad directamente proporcional a la concentración de BH_4^- y H^+) teniendo una constante de

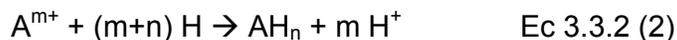
velocidad de $1.22 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ (30°C) (Agterdenbos y Bax, 1986, Narsito, Agterdenbos y Santosa, 1990).

Existe evidencia de que a $\text{pH} > 7$ la descomposición transcurre vía un mecanismo de dos pasos (Agterdenbos y Bax, 1986). En el primer paso (el lento), un complejo activado se forma a partir del BH_4^- y el H^+ el cual se descompone para formar hidrógeno y BH_3 acuoso. En el segundo paso (rápido), el BH_3 reacciona con agua para dar ácido bórico e hidrógeno. A $\text{pH} < 3.8$ la reacción de descomposición se presenta demasiado rápida para determinaciones cinéticas. Sólo se ha encontrado que el BH_4^- se descompone completamente en 1 ms. Dada la extrema rapidez de descomposición en medios muy ácidos ($\text{pH} 1$ o menor), el mecanismo de la descomposición no ha sido aún determinado (Dědina, 1999).

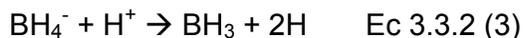
La única evidencia experimental que indica que existen otros productos en la descomposición ácida del BH_4^- la dieron Vien y Fry, quienes identificaron trazas de boranos volátiles como subproductos de la generación de hidruros al usar BH_4^- / medio ácido (Dědina, 1999).

En el primer review sobre la HG publicado en 1979, Robbins y Caruso postularon un “mecanismo con hidrógeno naciente”, análogo a aquél del sistema de reducción metal/ácido.

En ecuación 3.3.2 (1) se forma hidrógeno atómico en la reacción de la descomposición del BH_4^- y en la ecuación 3.3.3 (2) el analito se reduce de acuerdo a la reacción indicada (Welz y Sperling, 1999).



Broekaert y Boumans postularon que una aproximación al mecanismo de “hidrógeno naciente” se debía a la descomposición de BH_4^- a borano e hidrógeno atómico:



Seguida de la reducción del analito al hidruro de acuerdo con la ecuación 3.3.2 (2) (Broekaert y Boumans, 1987)

Para la generación de hidruro de selenio, arsina, hidruro de telurio, germano, y estannano, se ha empleada una modificación de la reacción en medio ácido del BH_4^- , la disolución de muestra alcalina conteniendo BH_4^- se mezcla con ácido (en lugar de mezclar la muestra acidificada con solución alcalina de BH_4^- en el modelo típico de la reacción BH_4^- / medio ácido), (Bye, 1989).

Como sugiere Bye, quien estudió la generación de hidruro de selenio en medio alcalino, el selenito es reducido por el BH_4^- (el cual es un fuerte reductor en

medio alcalino) a seleniuro el cual es liberado como hidruro luego de la acidificación de la mezcla.

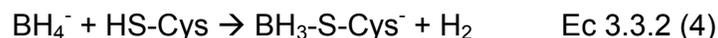
No obstante, las observaciones experimentales presentadas por Bye, pueden también ser compatibles con el mecanismo de hidrógeno nascente asumiendo que el analito es convertido al hidruro luego de la acidificación de la muestra alcalina conteniendo BH_4^- . Sin embargo, la exactitud del mecanismo sugerido por Bye fue apoyada por Qiu el cual mostró que el stannano puede ser generado a partir del medio alcalino (Qiu, 1995).

Consecuentemente, un mecanismo similar que no involucra hidrógeno nascente de la reacción de formación de hidruros puede tener lugar aún en el modelo ácido de la reacción BH_4^- / medio ácido. Para el stannano, Qiu *et al.* dedujeron a partir de una serie de experimentos que su generación “podría ser una reacción inducida o catalizada por la neutralización entre H^+ y OH^- y que no tiene lugar un mecanismo de formación de hidruro por hidrógeno nascente”.

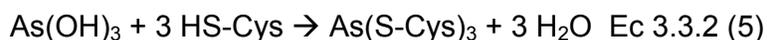
A continuación de la publicación de Brindle *et al.*, han aparecido una gran cantidad de artículos que describen un efecto beneficioso si se utiliza cisteína en la generación de hidruros de As, Sb y Sn (Ramesh y Riyazuddin, 2005, Pitzalis *et al.*, 2009).

En resumen, la adición de cisteína a la disolución de la muestra facilita la reacción de formación de hidruros, reduce las interferencias de la fase líquida y pre-reduce las formas As(V) y Sb(V) a las correspondientes III. Brindle y Le (Chen, Brindle y Le, 1992) encontraron evidencia por medio de espectros UV y

RMN de la formación de un complejo entre el BH_4^- y la cisteína, sugiriendo la siguiente reacción entre el grupo tiol de la cisteína (Cys-SH) y el BH_4^- :



El complejo así formado puede ser el intermediario que resulta más eficiente en la reacción de formación del hidruro. Esta sería una fuerte indicación en contra del mecanismo que involucra hidrógeno naciente. Sin embargo, Le *et al.* presentaron una explicación alternativa al efecto significativo de la adición de cisteína a la solución de la muestra en la generación de arsina. Ellos propusieron que el ácido arsénico reacciona con cisteína para formar un complejo Cys-As(III):



Howard y Salou sugirieron que el complejo Cys-As (III) puede ser rápidamente reducido a arsina por el BH_4^- . Naturalmente, esta explicación del efecto de la cisteína es compatible tanto con el mecanismo de hidrógeno naciente como con el que no lo implica (Ramesh y Riyazuddin, 2005).

Otros argumentos que muestran la inconsistencia de la teoría del “hidrogeno naciente” surgen de los experimentos realizados Mesmer y Jolly, quienes estudiaron la descomposición del tetrahidrobórato (THB) en medio ácido, pero llevaron a cabo experimentos utilizando reactivos deuterados, algunos de estos experimentos mostraron que la reacción de As (III) y As (V) con NaBD_4 en HCl

y H_2O producía AsD_3 como principal producto. Cuando la reacción se llevaba a cabo en NaBH_4 , DCl y D_2O , el principal producto era AsH_3 . Por tanto si el “hidrógeno naciente” estuviera involucrado en los procesos anteriores, todos los productos posibles de arsina se habrían formado con la fórmula $\text{AsH}_n\text{D}_{3-n}$. Estos descubrimientos apoyan fuertemente que en realidad se produce un mecanismo de “hidrógeno no naciente” (llamado así como argumento negativo hacia el mecanismo propuesto históricamente del hidrógeno naciente), este mecanismo de hidrógeno no naciente indicaría que lo que tiene lugar es una transferencia del átomo hidrógeno del boro al analito que formará el hidruro. (Ramesh y Riyazuddin, 2005).

En conclusión, el mecanismo real de la reacción de reducción aún continúa sin ser clarificado. No obstante, el mecanismo no es de importancia primaria en la práctica analítica dado que hay siempre un exceso de BH_4^- en varios órdenes de magnitud respecto al analito (Dědina, 1999, Laborda *et al.*, 2002).

Aspectos experimentales involucrados en la reducción con tetrahidroborato (THB).

Se utiliza como fuente de BH_4^- la sal sódica, ésta debe ser de pureza adecuada para las determinaciones en las que será usado. Se prepara una disolución acuosa estabilizada con NaOH (o con KOH aunque es poco frecuentemente).

La concentración de BH_4^- varía en varios órdenes de magnitud dependiendo del analito y del tipo de generador de hidruro utilizado.

Aún las soluciones alcalinas de NaBH_4 se descomponen lentamente. La descomposición es probablemente catalizada por superficies y es más lenta en soluciones más concentradas de hidróxido. Es aconsejable la filtración, o preferiblemente, la ultrafiltración por membrana (Dědina, 1999). En general concentraciones en el rango de 0.05-2% (m/v) de NaOH es lo que se emplea para la estabilización de la disolución de NaBH_4 (Schramel y Xu, 1991, Clesceri *et al.*, 1998, p.3-59, Pitzalis, 2009). Aunque las disoluciones del reductor son preparadas en el día en muchos laboratorios, esto no es generalmente necesario. La estabilidad es generalmente mejor en soluciones filtradas y más alcalinas. La vida media del reductor se extiende considerablemente cuando se almacena bajo refrigeración o más aún, se congela (Dědina, 1999). Nuestra experiencia indica que lo más conveniente en el caso de disoluciones de NaBH_4 de concentración menor a 1% (m/v) en NaOH 0.05% (m/v), es prepararlas diariamente.

La reacción de reducción se lleva a cabo casi exclusivamente mezclando un exceso de volumen de la muestra acidificada con BH_4^- de tal modo que la mezcla de reacción sea ácida (Dědina, 1999). Sin embargo como ya se indicó anteriormente la aproximación "inversa", en donde soluciones de muestra alcalinas conteniendo BH_4^- se mezclan con ácidos, se han empleado en varias aplicaciones.

Debido a que la reacción se produce en medio ácido, el cambio en la acidez de la mezcla de reacción durante la reacción es un parámetro que hay que tener en cuenta. La acidez deberá ser optimizada para una dada combinación de

analito y matriz de muestra y para desarrollar el sistema para la realización del experimento.

Una alternativa interesante es la formación de “medios organizados” agregando surfactantes a la mezcla de reacción (Fernández de la Campa *et al.*, 1995). La presencia de un medio orgánico con una superficie activa, como en el caso de la formación de micelas o vesículas, mejora las características químicas de la generación de vapor. Esto puede deberse a la estabilización de compuestos inestables y mejora en el transporte de las especies volátiles (Welz y Sperling, 1999). Este puede ser un medio promisorio de mejorar la liberación de hidruros especialmente en el caso de matrices complejas o hidruros inestables.

Siempre hay un exceso, en general de varios órdenes de magnitud, del agente reductor frente al analito en HG. El hidrógeno resultante obviamente conduce el hidruro desde la mezcla de reacción a la fase gaseosa dado que la concentración del hidruro en la mezcla es típicamente mucho menor que la solubilidad del hidruro. Esta es la función adicional del agente reductor. Bajo condiciones óptimas y en ausencia de una matriz, la eficiencia de liberación del hidruro se aproxima a la unidad (Dédina, 1999).

Modelo para la liberación de los hidruros en el caso de la reducción con tetrahidroborato

Dédina y Tsalev proponen en su libro un modelo simplificado para la liberación de hidruros basado en las siguientes suposiciones (Dédina y Tsalev, 1995, p.3):

- (a) La disminución de la concentración de BH_4^- c_B en la mezcla de reacción luego de la acidificación es un proceso de primer orden con una constante de velocidad k_1 (dimensiones: tiempo⁻¹) la cual no cambia a lo largo del proceso de liberación del hidruro:

$$c_B = (c_B)_0 e^{-k_1 \cdot t} \quad \text{Ec 3.3.2 (6)}$$

- (b) La liberación del hidruro desde la solución es un proceso de segundo orden con una constante de velocidad k_2 (concentración tiempo)⁻¹:



El proceso involucra la reducción del analito a hidruro así como la liberación del mismo a la fase gaseosa, fuera de la mezcla de reacción. En consecuencia, la magnitud de la constante de velocidad también se ve influida por la velocidad de flujo del gas portador, la composición química de la solución de la muestra y el diseño del generador de hidruros empleado. La concentración de analito en la mezcla de reacción, c , sigue una cinética de segundo orden:

$$\frac{dc}{dt} = -k_2 \cdot c \cdot c_B \quad \text{Ec 3.3.2 (8)}$$

Resolviendo esta ecuación, es claro que luego de la descomposición completa del BH_4^- ($t \gg 1/k_1$), la concentración de analito viene dada por la siguiente fórmula:

$$c = c_0 \cdot e^{-\frac{(c_B)_0 k_2}{k_1}} \quad \text{Ec 3.3.2 (9)}$$

En donde c_0 es la concentración de analito en la muestra (inicial).

La eficiencia en la liberación del hidruro, β_R , es la fracción de analito liberado en forma de hidruro de la disolución. De esta forma podemos caracterizar la eficiencia de la separación gas-líquido:

$$\beta_R = \frac{N_{\text{liberado}}}{c_0 V_s} \quad \text{Ec 3.3.2 (10)}$$

Donde N_{liberado} es el número total de átomos liberados de la muestra líquida en la forma de hidruro, y V_s es el volumen de la muestra. La eficiencia en la liberación del hidruro puede ser expresada a partir de la ecuación 3.3.2 (9) como sigue:

$$\beta_R = 1 - e^{-\frac{(c_B)_0 k_2}{k_1}} \quad \text{Ec 3.3.2 (11)}$$

La completa liberación de hidruro se alcanza cuando:

$$(c_B)_0 \gg \frac{k_1}{k_2} \quad \text{Ec 3.3.2 (12)}$$

He seleccionado este modelo para explicar el proceso debido a que como indican Dêdina y Tsalev en su libro, este modelo es válido independientemente

del mecanismo real de la descomposición del BH_4^- y el de la reacción de reducción. El modelo fue formulado para un caso ideal en el cual el BH_4^- está perfectamente mezclado con el ácido y el analito antes de que la reacción química comience, lo cual nos independiza de las discusiones que aún hoy en día continúan respecto a como se genera el hidruro (Dědina y Tsalev, 1995).

Se asume que el modelo describe satisfactoriamente la liberación de hidruros, en situaciones reales; sin embargo, situaciones no ideales reales del proceso se ven reflejadas en los valores de las constantes k_1 y k_2 las cuales de esta forma también dependen de la configuración real del experimento. El modelo implica que una liberación completa de hidruro ($\beta_R = 1$) es una cuestión sólo de un suministro suficiente de BH_4^- y un tiempo suficiente para la descomposición del mismo. Esto está en razonable acuerdo con las observaciones experimentales para las concentraciones de analito, por debajo del rango de pg mL^{-1} (Dědina y Tsalev, 1995).

La cantidad de BH_4^- requerida para la completa liberación de hidruro es por tanto controlada solo por el volumen de muestra y por el cociente entre las constantes de velocidad k_2/k_1 .

Transporte de hidruros

El hidruro liberado de la disolución de la muestra es transportado por un flujo de gas portador a un atomizador/detector. La eficiencia del proceso β_t , es la fracción de analito transportado bajo la forma de hidruro al atomizador:

$$\beta_t = \frac{N_0}{N_{\text{liberado}}}$$

Ec 3.3.2 (13)

Donde N_0 es el número total de átomos del analito que llegan al atomizador/detector. El gas portador puede también ayudar a la liberación del hidruro por arrastre del hidruro fuera de la solución de la muestra (Dědina, 1999).

El requisito esencial para usar un determinado gas como portador es, que sea inerte frente al hidruro formado. El gas portador se elige además teniendo en cuenta aspectos económicos y óptimo desempeño en el atomizador/detector.

Como posibles gases portador se encuentran el argón, nitrógeno, helio e hidrógeno, el argón entre ellos es uno de los más populares (Zhang y Adeloju, 2008).

Las pérdidas de hidruro sobre superficies de vidrio o plástico durante su transporte pueden ser un serio problema, estas pérdidas son probablemente debidas a su descomposición, absorción o adsorción.

Las trazas de agua que usualmente están presentes en los generadores de hidruro también pueden incrementar las pérdidas.

A modo de ejemplo, la solubilidad del SeH_2 en soluciones a pH alrededor de 2 o 3 es muy alta debido a su disociación ácida. Estos efectos pueden reducir la eficiencia de transporte de los hidruros, y por ende la sensibilidad observada, pero principalmente deterioran la reproducibilidad de las medidas. Una forma eficiente para prevenir pérdidas de hidruros sobre superficies de vidrio, es su

silanización para bloquear los sitios activos de la superficie (Dědina y Tsalev, 1995).

Está claro que las pérdidas en el transporte de hidruros deben ser minimizadas trabajando sobre el diseño del sistema en forma exhaustiva.

Métodos de generación de hidruros

Existen dos modelos básicos de generación de hidruros: modo de transferencia directa y modo de recolección. En el modo de transferencia directa, el hidruro liberado de la disolución de la muestra es directamente transportado al atomizador/detector. En el modo de recolección, el hidruro queda atrapado en un dispositivo de recolección hasta que su evolución sea completa y luego, se transporta en su totalidad de una sola vez (Dědina y Tsalev, 1995).

Cada generador de hidruros puede caracterizarse por dos parámetros: (a) una tasa de suministro de hidruro que está relacionado con el número de átomos de analito entregados al atomizador/detector en la forma de hidruro por unidad de tiempo y (b) una tasa total de flujo gaseoso, que comprende el flujo del gas portador, y el flujo de hidrógeno liberado de la descomposición del agente reductor.

La sensibilidad generalmente se incrementa al incrementarse la tasa de suministro de hidruro y al disminuir la tasa total de flujo gaseoso, dado que ésta controla la dilución del hidruro que llega al atomizador/detector (Dědina y Tsalev, 1995).

Modo Batch

Un generador batch es un recipiente de vidrio o plástico que sirve como reactor y como separador de gases de la mezcla de reacción. Un batch (lote) de disolución de muestra acidificada se coloca dentro y luego se introduce la disolución de BH_4^- . El flujo de gas portador se introduce o en el volumen muerto del generador, o por debajo del nivel de líquido (Dědina y Tsalev, 1995). El hidruro liberado es arrastrado por el flujo de gas portador al atomizador/detector junto con el hidrógeno formado por la descomposición del agente reductor. Luego de terminado el desprendimiento del hidruro, la mezcla de reacción se desecha, el generador se enjuaga, y un nuevo batch de muestra se agrega.

La tasa de suministro de hidruro es una función que presenta un máximo. Cuya amplitud máxima depende, de la eficiencia de transporte de hidruro y de la concentración de analito. Pero también es función de la relación entre las constantes de velocidad k_2/k_1 , la relación de volúmenes del generador y la muestra, la tasa de flujo de gas de purga y la tasa de flujo de BH_4^- .

Esto hace posible una evaluación simple de la influencia del tamaño y otros parámetros experimentales de generadores de hidruro en batch sobre el desempeño del equipo para el análisis.

Métodos en flujo

En la figura 45 se muestra un esquema general de un generador de hidruros de flujo continuo. En el mismo un flujo constante de la disolución de la muestra (sample) se mezcla con un flujo constante de la disolución de BH_4^- y del gas portador (purge gas). El líquido y el gas se separan por un separador gas-líquido (del inglés GLS) dando lugar a dos flujos de salida – el hidruro gaseoso con hidrógeno y el gas portador fluyendo hacia el atomizador/detector, y el efluente líquido para descarte.

Algunos sistemas de flujo continuo (del inglés CF) emplean un suministro de la muestra y del ácido por separado, y se mezclan en bobinas de mezclado como se muestra en la figura 45, sin embargo, en muchos casos la solución de la muestra se acidifica fuera del sistema.

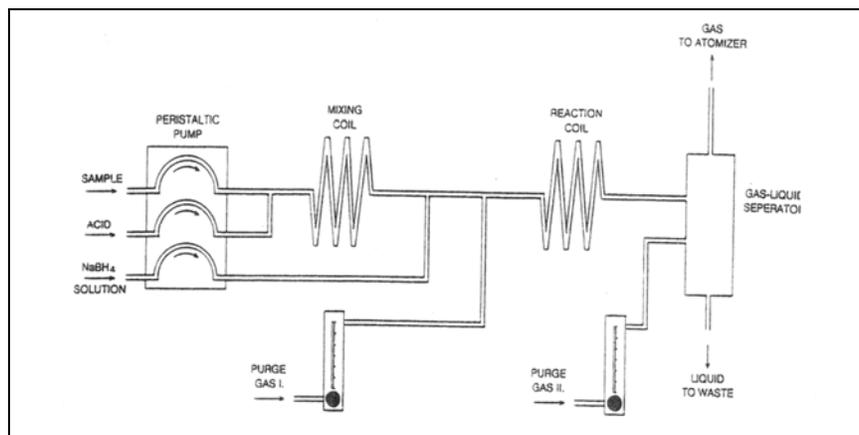


Figura 45- Esquema de sistema en flujo continuo. (Extraído de Dědina, 1999)

En la figura 46, se muestra un esquema general de un generador de hidruros en un sistema de inyección en flujo (del inglés FI). El arreglo experimental es

similar al del método CF con la diferencia que un flujo constante de portador ácido, usualmente HCl diluido, se utiliza en lugar del flujo de la muestra. El volumen de muestra se inyecta mediante un loop, por medio de una válvula especial y posteriormente ese volumen de muestra es dispersado en la corriente portadora. El resto del sistema es idéntico al del modo CF.

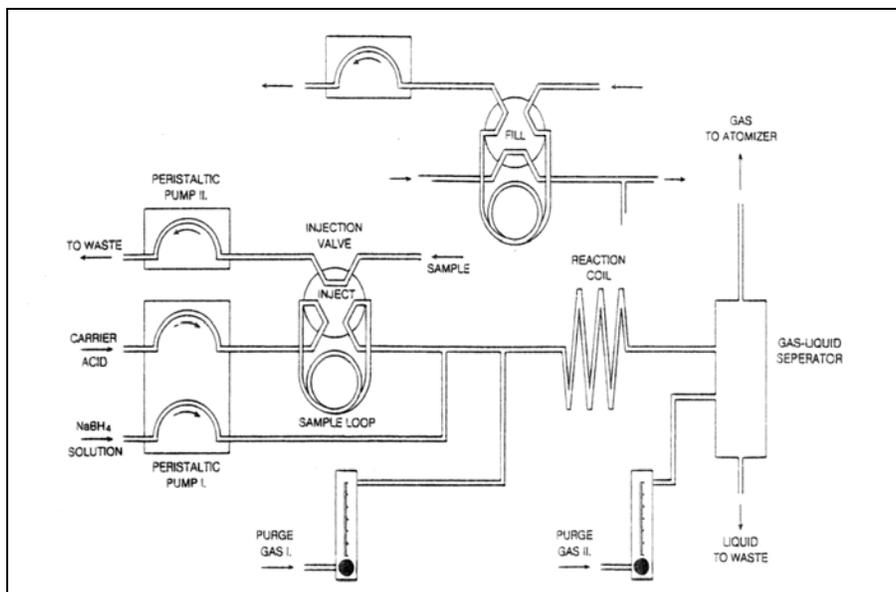


Figura 46- Esquema de sistema de inyección en flujo, FIA. Se muestra el llenado del loop y como se inserta la muestra al corriente del portador mediante el mismo. (Extraído de Dědina, 1999)

El primer sistema FI-HG fue descrito por Åström en 1982. Hasta 1990, las publicaciones en este campo fueron escasas; sin embargo, desde entonces, han aparecido varias publicaciones respecto a esta novedosa y muy ventajosa técnica. Han sido empleados tanto sistemas FI-HG hechos en el laboratorio como comercialmente disponibles (Fang, 1993).

Hoy en día no solamente se continúan utilizando sistemas en flujo del tipo continuo y por inyección en flujo sino que además reconocidas marcas

comerciales venden estos sistemas para acoplar a los instrumentos de absorción atómica de llama e ICP. Sin embargo en el terreno de la investigación se han diseñado sistemas que aplican las técnicas más modernas en análisis en flujo como por ejemplo SIA y MCFA. En particular en esta tesis se desarrolló un sistema en flujo multiconmutado (MCFA) para la determinación de selenio.

La mayoría de los sistemas de flujo usan una bomba peristáltica para conducir las soluciones de los reactivos. Los flujos de los reactivos típicos son de 1 a 10 mL/min. El flujo portador de la mezcla ácida es impulsado por la bomba peristáltica y se mezcla con el flujo de la solución reductora en una bobina de reacción, la cual provee tiempo suficiente para la liberación del hidruro.

El gas portador se introduce a favor de la corriente del flujo de la bobina de reacción, o en contra de la corriente. En el último caso, puede ser introducido al dispositivo separador gas-líquido o directamente a través de una entrada en particular, o a través de la misma entrada que la mezcla de reacción. Las razones para introducir el gas portador a favor de la corriente respecto a la bobina de reacción son tales que (a) facilitan la liberación del hidruro de la mezcla en la bobina de reacción y, consecuentemente, reducen la cantidad requerida de BH_4^- , y (b) reduce las pulsaciones de la presión del gas en contra de la corriente en el punto donde el flujo portador de la mezcla ácida se mezcla con la solución reductora. En el diseño particular de las figuras 45 y 46 el flujo del gas portador se divide en dos puntos de entrada, esto puede ser conveniente para disminuir las tasas de flujo del gas dentro del sistema y

disminuir así la probabilidad de tener puntos con gran exceso de presión, sin embargo también es común que la entrada del gas de purga sea por un único punto. Dependerá en cada caso del diseño del sistema. En general se utilizan flujos entre 50 y 500 mL/min de gas portador con buenos resultados (Fang, 1993, Dědina, 1999), datos que fueron confirmados en esta tesis.

Teniendo en cuenta la dispersión del volumen inyectado de muestra V_S en la corriente portadora, puede asumirse que la dispersión a favor de la corriente del GLS tiene lugar solo antes del punto del sistema en donde el flujo de ácido (con la muestra dispersada) se mezcla con el flujo de la solución de BH_4^- dado que aquí el flujo está segmentado por burbujas de hidrógeno formadas por la descomposición del BH_4^- . Sin embargo, cualquier dispersión que ocurra después de este punto no va en contra del siguiente tratamiento. La extensión con la cual ocurre la dispersión se cuantifica mediante el coeficiente de dispersión (ya explicado en la sección 3.2):

$$D = \frac{C_0}{C_{\text{máx}}} \quad \text{Ec 3.3.2 (14)}$$

Donde $C_{\text{máx}}$ es la concentración pico de analito en la corriente ácida. El suministro de analito hacia el punto de mezclado se expresa a través de la función de suministro de analito líquido $s(t)$.

Ésta toma la forma de un pico con perfil no simétrico, o sea un pico que posee una pendiente empinada hacia un lado, y una cola descendiente hacia el otro (Dědina, 1999).

$$s(t) = c(t) \cdot f_s \quad \text{Ec 3.3.2 (15)}$$

Donde $c(t)$ y f_s son respectivamente, la concentración de analito en la corriente ácida en el punto de mezclado y la tasa de flujo de la corriente portadora de muestra.

Las piezas de unión en zonas de confluencia y los tubos conectores que se utilizan en este tipo de sistemas son simples con forma de T o Y con diámetro interno de alrededor de 1 mm. Éstos conectores se emplean para armar los sistemas para mezclar las disoluciones de la muestra, portador y de BH_4^- y también para introducir el gas portador a la corriente de la mezcla de reacción (Fang, 1993).

Es importante mantener el flujo de BH_4^- lo más uniforme posible. Debe prevenirse la formación de burbujas de hidrógeno en los tubos de suministro del agente reductor, por ejemplo, estabilizando la disolución de NaBH_4 según se explicó anteriormente. El material de los tubos de bomba y transporte debe ser seleccionado según la disolución que transporten de manera de ser lo más inertes posible frente a ellas, es habitual que los tubos deban cambiarse con frecuencia debido al deterioro.

La longitud y el diámetro de las bobinas de reacción y tubos de forman la arquitectura del sistema deben ser suficientes para proveer el tiempo necesario

de permanencia para la liberación óptima del hidruro del analito. En consecuencia, ello depende de (a) la tasa de liberación del hidruro del analito la cual está controlada, como se discutió anteriormente, por la identidad del analito, por la acidez de la muestra y su composición, por la relación de las tasas de flujo de BH_4^- y la muestra, y por la tasa de flujo del gas de purga introducido a favor de la corriente de la bobina de reacción; y (b) de la tasa total de flujo de la mezcla de reacción a través de la bobina de reacción y del diámetro interno del tubo de la bobina de reacción. En principio, una bobina de reacción demasiado corta puede causar liberación incompleta del hidruro, pero bobinas muy largas incrementan el riesgo de interferencias en la fase líquida o pérdidas del analito por otros mecanismos (Fang, 1993, Dědina, 1999).

Por lo expuesto es claro que es importante la optimización del tamaño de las bobinas de mezclado en el desarrollo de un sistema en flujo.

Tipos de separadores gas-líquido (GLS)

Existen numerosos diseños para separadores gas-líquido (GLS) que se pueden emplear en sistemas en flujo. Los mismos se pueden clasificar en tres tipos:

(a) hidrostáticos

(b) con salida forzada

(c) de membrana

(d) la cámara de spray de la antorcha ICP-OES o del quemador es usada como GLS en algunas aplicaciones.

Separadores hidrostáticos

Los GLS hidrostáticos son pequeños sifones, generalmente tienen forma de U, con la columna líquida para balancear pequeñas variaciones de presión en la cámara donde se logra la separación. Mientras que los gases liberados son descargados a través de la salida superior, arrastrados por el gas portador hacia el atomizador, la mezcla de reacción fluye hacia los desechos.

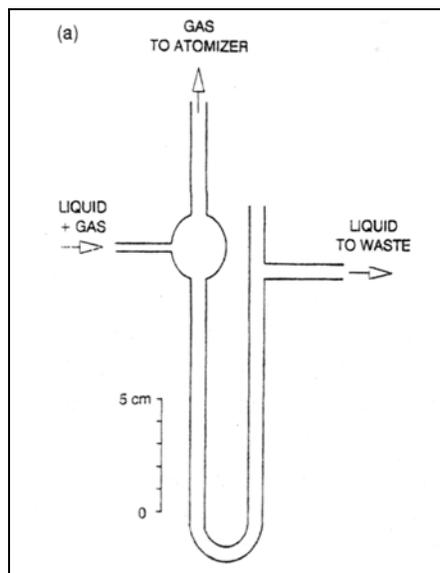


Figura 47- Separador hidrostático. (Extraído de Dědina, 1999)

En la figura 47 se muestra el modelo empleado en el primer trabajo publicado que trataba sobre CF-HG. En la figura 48 se muestra el separador gas-líquido (GLS) de vidrio usado en la determinación de selenio en leche en nuestro laboratorio.



Figura 48- Separador gas-líquido usado en el laboratorio.

Se han propuesto varias modificaciones a este diseño en U, volviéndose los mismos más complejos en busca de mejorar la eficiencia de separación. Muchos de ellos son comercializados por reconocidas empresas, en la figura 49 se muestra un ejemplo.



Figura 49 - Separador gas-líquido hidrostático comercial

El nivel de líquido en los separadores gas-líquido hidrostáticos se puede controlar empleando una bomba para sacar el líquido que reaccionó del tubo de descarte del sifón, o simplemente si el dispositivo es correctamente diseñado sifonará cuando el nivel del líquido alcance la altura correspondiente.

En algunas modificaciones del GLS hidrostático, el gas portador se introduce por debajo del nivel del líquido en el GLS, más convenientemente a través de un tubo de dispersión de porosidad media. Las pequeñas burbujas que se forman del gas portador ayudan a una separación gas/líquido eficiente.

La desventaja del GLS hidrostático es que con él no se puede trabajar con sobrepresión que exceda la dada por la altura de la columna de agua en el brazo de desperdicios del sifón. Esto es muy importante debido a que si el nivel del líquido dentro del bulbo aumenta demasiado y no sifona a tiempo, el líquido pasará a la celda de atomización y el proceso deberá ser detenido inmediatamente.

La otra desventaja es su volumen muerto el cual puede traducirse en una reducción de la altura del pico en el modo FI.

Separadores con conexión de salida forzada

Son similares a los GLS hidrostáticos, la separación tiene lugar en una cámara pero ésta está firmemente cerrada y los desechos deben por lo tanto ser eliminados mediante una salida forzada usando una bomba peristáltica.

La figura 50 (a) muestra el primer modelo de GLS con salida forzada. Es en realidad un embudo Büchner con vidrio con frita con y su parte interior sirve para la introducción del flujo del gas portador. Brindle *et al.*. Lo modificaron

introduciendo canales de corriente hacia la cámara para la muestra/portador y el BH_4^- por separado. Un diseño particular de GLS fue descrito conteniendo entradas de la mezcla de reacción y el gas portador y una salida de la fase gaseosa al atomizador/detector en la cámara, con una gasa de algodón en la parte inferior. El líquido pasa a través de dicha gasa hacia los desperdicios y no se requiere una bomba de separación.

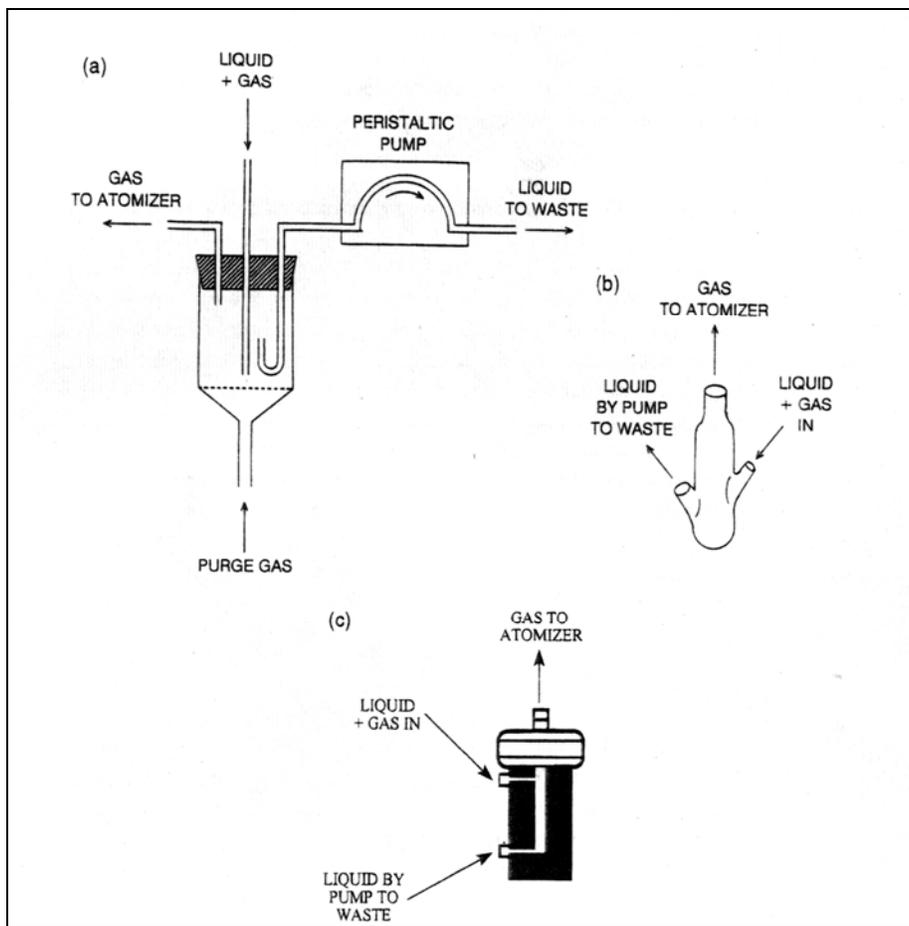


Figura 50- Separadores gas-líquido con salida forzada comerciales (Extraído de Dédina, 1999)

Separadores de membrana

En lugar de llevar a cabo la separación gas-líquido en una cámara, como en los tipos previos de GLS, los GLS de membrana consiguen la separación en un canal con la mezcla de reacción fluyendo a través de lo que en realidad es (una extensión de) la bobina de reacción. La pared del canal está completamente o parcialmente construida con una membrana microporosa permeable sólo a gases. Los mismos difunden a través de la membrana a un canal adyacente desde donde son transportados por una corriente de gas portador al atomizador/detector. La mezcla líquida de reacción permanece en la bobina de reacción y fluye hacia los desechos. En principio, hay dos diseños básicos de GLS de membrana: (a) tubular (Yamamoto *et al.*, 1987) y (b) sándwich (Chan y Hon, 1990) mostrados esquemáticamente en la figura 51.

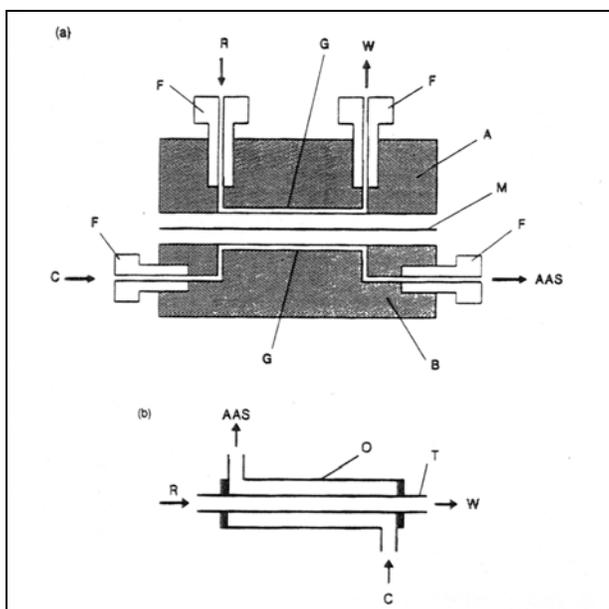


Figura 51- Separadores de membrana, (a) tipo sándwich, (b) tipo tubular (Extraído de Dědina, 1999)

En los GLS de membrana que se utilizan actualmente; la membrana está hecha o de politetrafluoroetileno, de polipropileno o de goma de silicona.



Figura 52-Membranas separador gas-líquido comerciales. (Extraído de GlobalFIA®, 2009)

Cámaras de aerosol (spray)

Las cámaras de spray de las antorchas ICP-OES son usadas para determinaciones simultáneas lo que no puede lograrse con espectrometría de llama. El BH_4^- es usualmente mezclado con la solución de la muestra y subsecuentemente nebulizado, o la muestra es nebulizada y mezclada con el BH_4^- el cual se introduce en la cámara por separado. Alternativamente, el BH_4^- puede ser mezclado con la solución de la muestra y subsecuentemente introducido en la cámara de spray por una entrada hecha a medida o a través de un nebulizador modificado. La desventaja para el modo FI es la dispersión en la cámara la cual deforma la señal analítica (debido al gran volumen muerto) haciéndola más baja y ancha, en consecuencia, la separación gas-líquido en la cámara de spray es empleada con mucha más frecuencia en el modo CF que el modo FI (Dědina, 1999, Schramel y Xu, 1991).

Interferencias en la generación de hidruros

Las interferencias pueden aparecer:

→ en la fase líquida: durante la formación del hidruro y/o durante su transferencia de la disolución a la fase gaseosa.

→ en la fase gaseosa: afectando al analito en la fase gaseosa durante el pasaje del hidruro hacia el atomizador (interferencias de transporte).

Estas interferencias pueden tener lugar en la superficie o en el volumen muerto del separador y en los tubos conectores causando un retraso (interferencia cinética de transporte) y/o pérdida del hidruro (interferencia de la eficiencia de transporte).

Las interferencias de este tipo pueden actuar en forma directa afectando la eficiencia de liberación del hidruro o también generando un efecto memoria que afecta la siguiente determinación y altera la forma de los picos.

Influencia de las interferencias en la forma de la señal

El modo CF representa la situación más simple dado que las interferencias en la cinética de liberación son eliminadas y las interferencias en la cinética de transporte influyen sólo en el tiempo requerido para alcanzar el estado estacionario, pero no en la altura de la meseta de la señal.

Las interferencias en la eficiencia de la generación del hidruro influyen en la altura de la meseta de la señal. Sin embargo, si la constante cinética k_2 se reduce a un valor tal que la liberación del hidruro de la fase líquida no finaliza

durante el tiempo que tiene la mezcla de reacción a disposición en el generador, aparece la interferencia por eficiencia de liberación. La aparición de dicha interferencia en tal caso, puede ser evitada, o al menos atenuada, incrementando o el suministro de BH_4^- , y/o la longitud de la bobina de reacción (Dědina, 1999).

Cualquier interferencia de eficiencia reducirá el área del pico y su altura en la misma extensión dado que la forma del pico no debería ser influida. Sin embargo hay que tener en cuenta que la forma del pico de señales transitorias producidas por el modo FI puede cambiar aún cuando sólo existan interferencias de eficiencia. La razón es que, como se mostró anteriormente, la magnitud de la interferencia no está influida por la concentración del analito sino por la concentración de los interferentes. Lo mismo se aplica para las interferencias de transporte, dado que la concentración de los interferentes gaseosos en el volumen muerto del generador cambia dentro del intervalo del pico. En contraste con las interferencias cinéticas en el transporte, las interferencias en la eficiencia no pueden ensanchar la señal observada (Dědina, 1999).

Las señales producidas por el modo de generación batch sufren la influencia debida a las interferencias en la cinética de liberación, dado que la forma correspondiente a la tasa de suministro de hidruro depende de la tasa de liberación. La forma de la señal observada está afectada también por las interferencias en la cinética de transporte. Las interferencias cinéticas no deberían tener influencia sobre el área del pico dado que ellas no influyen

sobre la masa de hidruro transportada al atomizador/detector. Sin embargo, si hay cambios significativos en la tasa total de flujo gaseoso dentro del intervalo de formación del pico, como podría suceder en el modo batch, aún el área del pico puede cambiar por una interferencia cinética. Las interferencias en la eficiencia reducen el área del pico, pero su forma probablemente esté influida también por la concentración de interferente en la mezcla de reacción, así como en la fase gaseosa, por lo que pueden cambiar considerablemente dentro del intervalo crítico para formar la señal. Análogamente, como en el caso del modo FI, las interferencias por eficiencia no pueden ensanchar la señal observada (Dědina, 1999).

En los sistemas en flujo la reacción de separación del hidruro tiene lugar en mayor extensión en zonas separadas. El tiempo de reacción, durante el cual puede tener lugar la separación de fases en forma natural, está influenciada por el largo de las zonas de reacción y el flujo del líquido portador. Si se usan sistemas con recorridos cortos lo que implica zonas de reacción cortas y con velocidades de flujo suficientemente altas, es posible suprimir reacciones de cinética lenta. Esto se denomina “discriminación cinética” y es de especial aplicación en sistemas de inyección en flujo para eliminar interferencias y para análisis de especiación (Welz y Sperling, 1999).

Como conclusión sobre estos aspectos podemos señalar que todos los métodos en flujo son menos susceptibles a las influencias de interferencias cinéticas que los métodos batch. Dentro de los métodos en flujo los de flujo

continuo debido a al tipo de señal que producen, se ven menos afectados por estas interferencias que los métodos por inyección en flujo.

Interferencias de la fase líquida

Hay numerosas interferencias en la fase líquida pero todas pueden clasificarse en dos grupos básicos: interferencias por compuestos e interferencias de la matriz.

Interferencias por compuestos

Si el analito en la muestra está parcialmente en una forma diferente que en la empleada en la disolución estándar, la liberación del hidruro puede ser distinta en la muestra con respecto a la liberación en el estándar, aún si el estándar se agrega a la muestra. Este tipo de interferencias tienen lugar si enlaces orgánicos del analito no han sido completamente destruidos durante el pretratamiento de la muestra o si el analito está en un estado de oxidación con el cual su conversión a hidruro se da con baja eficiencia.

Para prevenir las interferencias por compuestos, deben tomarse precauciones (métodos apropiados de digestión y/o prerreducción). En el paso de preparación de la muestra teniendo en cuenta que los tratamientos con HNO_3 son muy comunes para la digestión de matrices con alto contenido de materia orgánica, la interferencia debida a la presencia de nitrato remanente y óxidos de nitrógeno volátiles debe ser eliminada ya que de lo contrario las señales analítica se verán fuertemente afectadas (Brown *et al.*, 1981, Cutter, 1982). Se

sugiere que la interferencia puede deberse a la reacción entre nitrito y el hidruro generado, para remover los óxidos de nitrógeno volátiles se ha reportado el uso de urea y ácido sulfámico entre otros (Lopes Nunes *et al.*, 2005).

Interferencias de la matriz

Este tipo de interferencias tienen lugar cuando los componentes de la matriz afectan la liberación del hidruro. Las interferencias de la matriz dada por componentes de fases heterogéneas presentes en la mezcla de reacción (partículas sólidas o suspensiones orgánicas) pueden ser bastante serias así sea debido a la sorción de los iones del analito o la captura del hidruro formado. Los compuestos orgánicos disueltos son interferentes potenciales. Sin embargo, el tipo de interferencia de la matriz más frecuentemente encontrado viene dado por compuestos inorgánicos solubles (interferencias inorgánicas). Los interferentes inorgánicos más serios son iones de metales de transición, ejemplo: Ni, Cu, Co, Fe, Ag, Au, Pd, Pt, Rh, algunos de ellos muy comunes en matrices como aguas y alimentos entre otras (Pierce y Brown, 1976, Dédina y Tsalev, 1995, Zhang y Adeloju, 2008).

El mecanismo más probable de esta interferencia es una captura del hidruro por las especies formadas por la reacción del interferente con BH_4^- .

Los interferentes de otras clases son típicamente mucho menos pronunciados que las interferencias por los metales de transición, pero su mecanismo puede ser similar (Dédina y Tsalev, 1995).

Control de las interferencias de la matriz

La forma más directa de prevenir las interferencias dadas por la matriz es remover el interferente. La preparación de la muestra es crítica y debe minimizar el contenido de partículas sólidas o suspensiones orgánicas en la muestra. En el caso de interferencias inorgánicas, su remoción requiere una separación. Aunque generalmente es inconveniente dado que complica el análisis y conlleva riesgo de contaminación, ha sido empleada en numerosas aplicaciones. La separación de los interferentes se consigue típicamente cuando se realiza la preconcentración del analito que intenta mejorar su límite de detección. Algunas estrategias muy usadas para preconcentración/separación son: (a) extracción con solvente, (b) separación por intercambio iónico, (c) coprecipitación con $\text{Fe}(\text{OH})_3$, $\text{La}(\text{OH})_3$, $\text{Mg}(\text{OH})_2$ - $\text{Ca}(\text{OH})_2$, $\text{MnO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, etc., (d) destilación y (e) precipitación selectiva del interferente. Otra alternativa de controlar las interferencias inorgánicas es mediante la elección apropiada de las condiciones químicas e instrumentales del paso de generación de hidruro. Esto puede ser hecho con eficiencia en base al conocimiento del mecanismo de interferencia: la extensión de las interferencias se reducen previniendo la precipitación de los interferentes o minimizando el contacto con el hidruro formado con la forma precipitada del interferente (Pierce y Brown, 1976).

La precipitación puede ser reducida empleando agentes enmascarantes o agentes liberadores. Los agentes enmascarantes se unen al interferente y forman compuestos (una manera de enmascarar algunos interferentes es por

ejemplo aumentar la concentración de HCl), mientras que los agentes liberadores reaccionan con BH_4^- preferiblemente. En ambos casos, la formación de un precipitado interferente es demorada o prevenida. (Zhang y Adeloju, 2008).

Las manipulaciones con la concentración de HCl o con la tasa de flujo de BH_4^- han sido exitosamente utilizadas para evitar el efecto de las interferencias en la generación de hidruro de selenio y arsina, no obstante, también deberían funcionar con otros analitos (Pierce y Brown, 1976). La otra manera de disminuir el tiempo de contacto del hidruro formado con el precipitado es hacer la separación gas-líquido más rápida. En principio, esto se puede lograr o bien químicamente (por ejemplo, por la adición de ioduro a la solución de BH_4^- o la presencia de L-cisteína en la mezcla de reacción), o bien instrumentalmente, optimizando el sistema de HG. Es el potencial del diseño instrumental para acelerar la separación gas-líquido lo que hace que el modo de flujo de HG sea el método de elección para controlar las interferencias de la matriz en la fase líquida. Las interferencias son típicamente mucho más pronunciadas en el modo batch dado que el tiempo de contacto del hidruro formado con los precipitados interferentes es el más largo. En contraste, los métodos de flujo brindan mucha más libertad para minimizar el tiempo de contacto, acortado o aún quitando la bobina de reacción y/o empleando GLS con tiempos mínimos de residencia de la mezcla de reacción en su interior (Dědina, 1999).

Atomización de hidruros volátiles en celda de cuarzo.

Después del desarrollo de la técnica de generación de hidruros, se propuso el uso de tubos de cuarzo eléctricamente calentados o calentados con una llama.

Comparados con la llama de difusión (argón-hidrógeno) los atomizadores de cuarzo ofrecieron mayor sensibilidad y menor efecto de señales de fondo (Welz y Sperling, 1999).

Si bien los atomizadores de cuarzo (celdas de cuarzo) calentados externamente, son los más usados hoy en día. Deben mencionarse también los atomizadores con llama dentro del tubo (flame-in-tube atomizers-FIT), en los cuales una pequeña llama de oxígeno-hidrógeno arde en el interior del tubo por lo que no necesitan calentamiento externo.

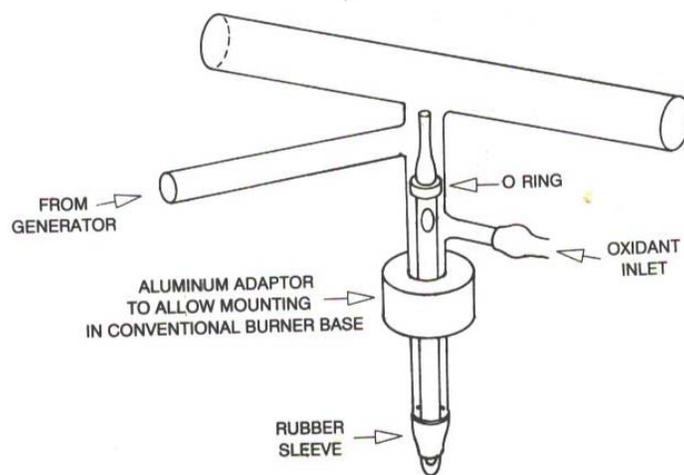


Figura 53 – Atomizador con llama interna (FIT) (Extraído de Dědina, J., Tsalev, D.L., 1995)

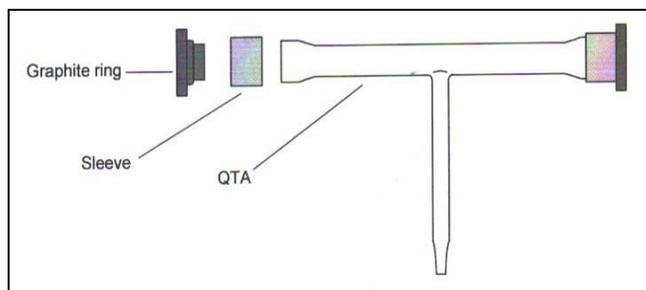
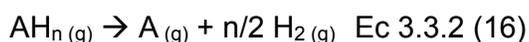


Figura 54- Celda de cuarzo y sus accesorios.

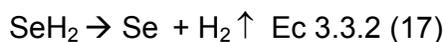
Nuevamente existe controversia en cuanto a los mecanismos de atomización de los hidruros covalentes en tubos de cuarzo calentados y continúa siendo una cuestión aún no resuelta del todo. Se puede encontrar en la literatura al menos tres posibles mecanismos de atomización propuestos: atomización vía descomposición térmica, por oxidación del hidruro y el mecanismo de los radicales libres (Ramesh y Riyazuddin, 2005).

Atomización vía descomposición térmica

Inmediatamente de la aparición de los tubos de cuarzo como atomizadores, la opinión general fue que los hidruros se atomizaban por descomposición térmica. El aumento en la sensibilidad analítica al aumentar la temperatura parecía ser la evidencia objetiva que apoyaba esta idea (Ramesh y Riyazuddin, 2005). La ecuación correspondiente sería:



Si tomamos como ejemplo la descomposición del hidruro de selenio (SeH_2) la ecuación sería:



Los cálculos teóricos predicen que esta descomposición se da aproximadamente a 800 °C (Narsito *et al.*, 1990). Dado que las temperaturas típicas en un tubo de cuarzo calentado por llama están en el orden de 800-900 °C, esto es adecuado para la descomposición del hidruro de selenio, pero en el caso de la arsina se encuentran inconsistencias debido a que si bien teóricamente la temperatura óptima para su descomposición está en ese rango, la arsina se puede atomizar en horno de grafito a 1700-1800 °C. Además la adición de oxígeno o aire al gas portador aumentaba la sensibilidad y se encontró que para llamas extremadamente ricas en combustible, llamas hidrógeno-oxígeno dentro del atomizador de cuarzo sin calentar (FIT), con una relación adecuada de H:O también aumentaba la sensibilidad (Agterdenbos y Bax, 1986).

Por lo tanto existen varias evidencias que indican que el mecanismo de la ecuación Ec 3.3.2 (17) es altamente improbable.

Oxidación del hidruro

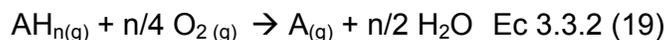
La constante de equilibrio de la ecuación Ec 3.3.2 (16) fue calculada para la atomización de arsina y los resultados mostraron que tal descomposición ocurría en el rango de 1200-1500 °C. Sin embargo en la práctica, la

atomización ocurre a 700 °C, esto sugiere que la ecuación Ec 3.3.2 (16) no explica la atomización de arsina. (Agterdenbos y Bax, 1986)

Agterdenbos y Bax asumieron que el oxígeno en el gas portador oxida los hidruros a átomos según:



Esta teoría fue apoyada por otros autores para los hidruros de Sb y otros elementos, por lo que la ecuación general sería (Narsito *et al.*, 1990):



Por lo tanto, el rol del oxígeno sería oxidar al hidruro del analito a su átomo según la ecuación Ec 3.3.2 (19), y el exceso de oxígeno produciría un decaimiento de la señal probablemente debido a la siguiente reacción:



La función del hidrógeno es prevenir la formación del óxido, y finalmente ambos gases formarán radicales libres, los que probablemente también participen en la oxidación de la arsina en este ejemplo.

En condiciones analíticas normales el requerimiento de oxígeno puede ser alcanzado por el aire disuelto en las disoluciones de medida.

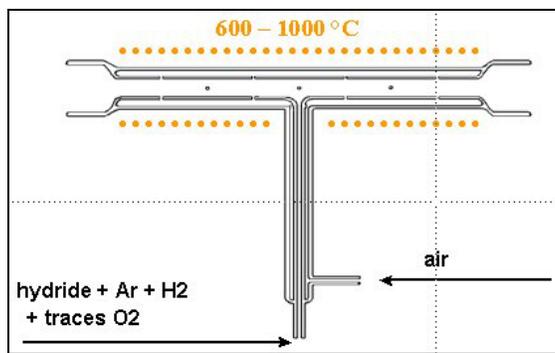


Figura 55- Diseño de celda de cuarzo con entrada de aire.

Mecanismo con radicales libres

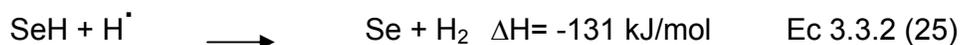
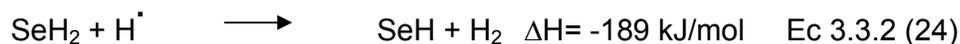
El efecto del oxígeno en la atomización de los hidruros de As y Sb en tubo calentado de cuarzo o también llamada celda de cuarzo fue reportado por primera vez por Goulden *et al.* Estos autores reportaron que se podía obtener un incremento en la sensibilidad si se agregaba oxígeno al gas portador (Ramesh y Riyazuddin, 2005).

Se propuso que la atomización es llevada adelante por las colisiones de hidruro del analito con radicales libre de hidrógeno. El hidrógeno generado por la descomposición ácida del tetrahidrobórato, o agregado a las mezclas de reacción, es la fuente de átomos de hidrógeno, y es producida en la zona de difusión de la llama de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

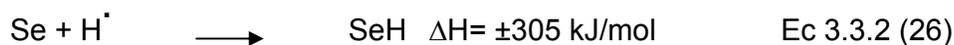


Fue establecido que la constante de equilibrio de la reacción de la ecuación 3.3.2 (23) es muy alta y que la concentración de hidrógeno es mucho mayor que la de agua.

Dědina postula entonces que la atomización para el caso de selenio era vía dos pasos con la predominancia de radicales H^\cdot según:



Y finalmente recombinación:



A medida que aumenta el peso atómico (As-Sb-Bi), se necesita menor cantidad de radicales libres para la atomización.

Dědina *et al.*, estudiaron extensamente el mecanismo de atomización de AsH_3 y SeH_2 en varios tipos de tubos de cuarzo como atomizadores y especuló con que el mecanismo de atomización con radicales parecía ser idéntico en todos los tubos que probó, y además que la atomización se daba solo en una pequeña parte del volumen del tubo.

Una nube de radicales H se forma en la zona caliente del atomizador por medio de la reacción de hidrógeno y oxígeno. La ubicación exacta de la nube de radicales es determinada por el perfil de temperatura dentro del atomizador, por el flujo y composición del gas de purga y el diseño del atomizador (Welz y Sperling, 1999)

Recientemente también se ha estudiado la generación de hidruros empleando tubos metálicos en lugar de los tradicionales de cuarzo, además de la ventaja inherente a utilizar un tubo que no se quiebra como el cuarzo, los autores postulan que al introducir directamente el hidruro en el tubo metálico con un tubo capilar la sensibilidad aumenta considerablemente, pero no explican si el mecanismo de atomización transcurre por otras vías (Figueiredo *et al.*, 2007, Zezzi Arruda y Costa Figueiredo, 2009).

Para concluir podemos resumir este tipo de atomización de la siguiente manera (Ramesh y Riyazuddin, 2005):

- 1- el hidrógeno es esencial y tiene un rol activo en la atomización de hidruros gaseosos y su pasaje al estado elemental, en tubos de cuarzo calentados a temperaturas del entorno de los 1000 °C.
- 2- el oxígeno es sostén o apoyo para que esto ocurra en presencia de hidrógeno cuando la celda de cuarzo está a temperaturas más bajas
- 3- se puede obtener máxima sensibilidad solo en un ambiente “limpio” de una celda acondicionada con ácido fluorhídrico (en el manual de usuario PerkinElmer[®] (PerkinElmer MHS15 user guide, 2000, p.4-8), se recomienda para mantenimiento y mejor desempeño de las celdas de cuarzo sumergirlas en HF como etapa previa de acondicionamiento).

4- en ausencia de hidrógeno la arsina se descompone pero no se atomiza en la celda de cuarzo, esto sirve como prueba de esta hipótesis.

Por tanto basados en estas afirmaciones los autores han propuesto que la atomización de los hidruros volátiles en una celda se debería a colisiones con los radicales libres de hidrógeno según:



Como sucede con los mecanismos de generación de hidruros, la atomización es también un tema de controversia. Existen publicaciones científicas desde los años 80 que reportan pruebas y ejemplos de uno u otro mecanismo. El review de Ramesh y Riyazuddin es una prueba de que aún en 2005 continuaban las pruebas a favor de uno u otro mecanismo.

3.3.3. Espectrometría de absorción molecular visible

La espectrometría de absorción molecular en la región ultravioleta-visible (UV-visible), es una técnica analítica clásica bien conocida, aplicable para la determinación de casi todas las especies químicas.

Por ello, muchos laboratorios están equipados con instrumentos adecuados y la operación de los mismos es normalmente bastante simple. Más aún, los métodos que utilizan esta técnica pueden sin mayor esfuerzo ser adaptados a análisis automatizados o semi-automatizados.

En esta tesis se aplicó esta técnica en la determinación cuantitativa de disoluciones de iones de metales de transición y compuestos orgánicos con dobles enlaces conjugados.

Los métodos basados en esta técnica han sido usados por muchos años para el análisis de trazas de elementos. En consecuencia, estos métodos y cualquier interferencia se conocen bien. La formación de colores visibles o la emisión de fluorescencia (por excitación) luego de reacción química con los agentes complejantes adecuados (la mayoría orgánicos) se describe en una gran cantidad de publicaciones utilizando técnicas de Análisis en Flujo (Lista *et al.*, 1999, Yuanqian *et al.*, 2002, Zenki *et al.*, 2004).

La espectrometría ultravioleta-visible o UV-Vis utiliza la radiación en los rangos visible y adyacentes (el ultravioleta (UV) cercano y el infrarrojo (IR) cercano del espectro electromagnético). En esta región, las moléculas experimentan

transiciones electrónicas, la espectrometría de absorción mide la absorción de la radiación correspondiente a las transiciones desde el estado fundamental al estado excitado.

Las disoluciones de iones de metales de transición y complejos de estos analitos, absorben bandas amplias de radiación visible en al menos uno de sus estados de oxidación y como resultado son coloreadas. Esto es debido a que los electrones en los átomos del ión metálico se pueden excitar desde un estado electrónico a otro. La absorción abarca transiciones entre orbitales *d* semillenos con energías que dependen de los ligandos enlazados con los iones metálicos. Las diferencias de energía entre los orbitales *d* dependen de la posición del elemento en la tabla periódica, de su estado de oxidación y de la naturaleza del ligando enlazado, esto determinará la posición del pico de absorción correspondiente y por lo tanto el color que tendrá la disolución (Skoog *et al.*, 2005).

En esta tesis se trabajó con este tipo de disoluciones en la determinación de cobre y zinc.

También se estudió en esta tesis otra aplicación en la que se midió la absorbancia de compuestos orgánicos (determinación de nitrato y nitrito).

La absorción de radiación por moléculas orgánicas en la región de longitud de onda entre 180 y 780 nm resulta de la interacción de los fotones y electrones que participan de manera directa en la formación de enlaces, o que se localizan en torno a átomos como los de oxígeno, azufre, nitrógeno y halógenos (Skoog *et al.*, 2005).

Especialmente aquellos compuestos con un alto grado de conjugación, absorben radiación en las regiones del espectro electromagnético visible o ultravioleta, los grupos funcionales orgánicos no saturados que absorben en esta región se denominan cromóforos. Los disolventes para estas determinaciones son a menudo el agua para los compuestos solubles en agua, o el etanol para compuestos orgánicos solubles (Skoog *et al.*, 2005).

Para explicar como se realizan las determinaciones cuantitativas utilizando esta técnica comenzaremos con un poco de historia. Entre las primeras investigaciones sobre la relación existente entre las potencias de radiación incidente y transmitida, se destacan los experimentos de Pierre Bouguer (1729) y de Johann Heindrich Lambert (1760). Estos dos científicos efectuaron observaciones independientes y verificaron que las que las propiedades asociadas al proceso de absorción de radiación pueden ser enunciadas en dos leyes fundamentales:

- La potencia del haz de radiación (monocromática) transmitida por un cuerpo homogéneo es proporcional a la potencia de luz incidente.
- La potencia del haz de radiación (monocromática) transmitida disminuye exponencialmente con el aumento del espesor de la capa del cuerpo homogéneo.

En 1852, August Beer estudió la influencia de la concentración de soluciones con color sobre la transmisión de radiación. La conclusión a la que llegó fue

que el valor de absorbancia (A) para una determinada sustancia es proporcional a su concentración.

Por tanto, la espectrometría UV-visible puede usarse para determinar la concentración de una disolución. Para ello es necesario saber como cambia la absorbancia con la concentración. Esto se puede obtener a partir de referencias (las tablas de absortividad molar) o, determinándolo a partir de una curva de calibración.

La presencia de un analito da una respuesta que puede ser proporcional a la concentración y su concentración puede estimarse utilizando siguiente ecuación (Ley de Beer):

$$A = abc \quad \text{Ec. 3.3.3 (1)}$$

Donde A es la absorbancia medida en un espectrofotómetro, a es la absortividad ($L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$), b el camino óptico (cm) y c es la concentración ($g \cdot L^{-1}$).

Es una ley límite, se cumple solo para disoluciones diluidas.

Considerando esta ley, el modelo de regresión de la curva de calibración (gráfico de la absorbancia del analito patrón en función de la concentración del mismo en la disolución medida) será una recta del tipo $A = k \cdot C$, donde k = pendiente de la curva de calibración (sensibilidad de método).

La ley de Beer también se aplica a medios que contengan más de una sustancia absorbente. Siempre que no haya interacción entre las distintas especies, la absorbancia total para un sistema multicomponente será:

$$A_{\text{total de la mezcla}} = A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n = a_1bc_1 + a_2bc_2 + a_3bc_3 + \dots + a_nbc_n \quad \text{Ec. 3.3.3 (2)}$$

Los subíndices se refieren a diferentes componentes absorbentes en la disolución mezcla (Skoog *et al.*, 2005).

La representación gráfica de la absorbancia en función de la longitud de onda se denomina espectro. El espectro de una sustancia se puede obtener directamente con los espectrofotómetros más modernos, o bien pueden registrarse los datos de una sola longitud de onda con los instrumentos más simples.

Una vez conocido el espectro de absorción de la sustancia, se selecciona para medidas cuantitativas un máximo de absorción adecuado para las determinaciones analíticas. Este criterio asegura el cumplimiento de la ley de Beer en esas condiciones ya que pequeños cambios en la longitud de onda (radiación policromática) afectarán en menor medida si las medidas se realizan en un máximo de absorción. Sin embargo en sistemas complejos de varios componentes puede ser necesario aplicar otros criterios para seleccionar la longitud de onda de medida.

Las longitudes de onda de los picos de absorción pueden correlacionarse con los tipos de enlace en una determinada molécula, y son valiosos para determinar los grupos funcionales dentro de la molécula. La naturaleza del disolvente, el pH de la disolución, la temperatura, la concentración de electrolitos, y la presencia de sustancias interferentes pueden influir en los espectros de absorción de los compuestos, así como las variaciones en el ancho de banda efectivo del espectrofotómetro.

La medida de la absorción molecular es una técnica poco selectiva, pero por medio de la selección apropiada de agentes enmascarantes en combinación

con el reactivo de formación de color, puede ser empleada selectivamente y de este modo permitir la medida específica de ciertos elementos.

A pesar de que en general los límites de detección son altos para la determinación de trazas (por ejemplo, determinación de los contenidos normales de Cd o Hg en leche), existen métodos basados en espectrometría de absorción molecular como métodos de referencia.

3.3.3.1. Métodos de desarrollo de color

En esta sección se explicaran los métodos utilizados para la determinación de cobre, zinc, nitrato y nitritos, basados en reacciones que producen un compuesto coloreado capaz de absorber radiación en la zona visible del espectro.

Determinación de Cu y Zn

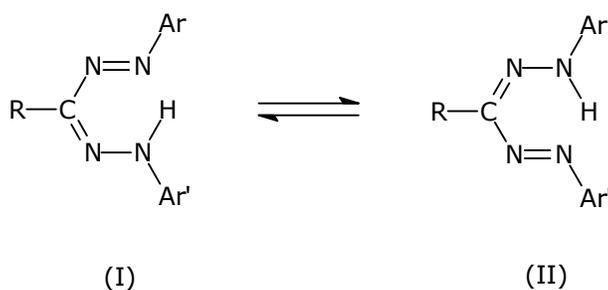
Ya en el año 1954, Yoe y Rush comprobaron que el compuesto *zincón* (1-2-(hidroxi-5-sulfofenil)-5-(2-carboxifenilformazano) forma un precipitado azul en presencia de zinc, reaccionando también con cobre, cobalto y níquel. La reacción es rápida en presencia de una solución alcalina del reactivo (Cadore, 1986).

El uso del reactivo *zincón* permite la determinación de los metales zinc y cobre, uno en presencia del otro, debido a la diferencia de estabilidad de los complejos de estos metales en relación al pH. El complejo de zinc es estable en el intervalo de pH 8.5 a 9.5, en tanto que el de cobre lo es a pH de 5.0 a 9.5.

La estabilidad del reactivo es un tema a tener en cuenta. Una solución de reactivo preparada con NaOH es estable por una semana. Si se conserva en heladera, este período aumenta pudiendo alcanzar unos 30 días, sin diferencia significativa en el valor de la absorbancia medida, sin embargo esto dependerá de la concentración del reactivo. Es conveniente almacenar disoluciones

concentradas *stock* y realizar la dilución final al momento de realizar las determinaciones analíticas. Otra manera de aumentar el periodo de estabilidad (conservación) es disolver el zincón en etanol en lugar de hacerlo en disolución de NaOH.

El zincón es un derivado de los compuestos de formazano, presenta un pico de absorción máximo en 470 nm. Estos compuestos se preparan por el acople de compuestos de diazonio con aldehídoarilhidrazona. Pueden ser representados por las siguientes estructuras tautoméricas:



El átomo de hidrógeno de la amina está enlazado alternadamente a dos átomos de nitrógeno. Estudios posteriores mostraron que la tautomería podía ser atribuida a una estructura de coordinación interna, formada por el enlace del hidrógeno con un átomo de nitrógeno según se muestra en la figura 56.

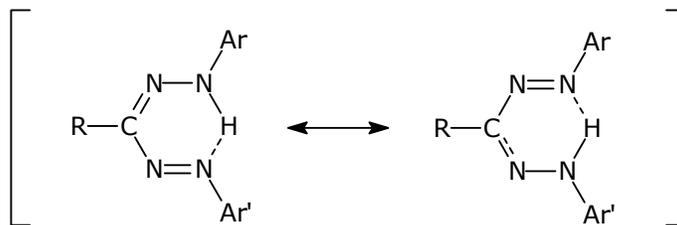
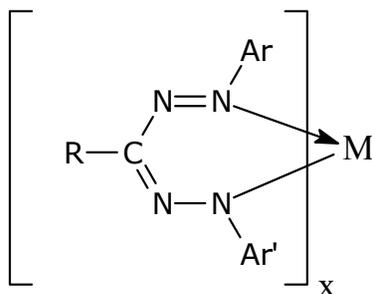


Figura 56- Tautomería de zincón

El cambio del átomo de hidrógeno de la amina por un equivalente de metal da lugar a una serie de derivados metálicos preparados a partir de compuestos de formazano, evidenciando la estructura de quelato de estos compuestos:



Dónde M = metal, x = número de coordinación

El zincón se presenta generalmente en la forma de sal monosódica ($C_{20}H_{15}N_4NaO_6S$), que posee tres hidrógenos ácidos: uno carboxílico (-COOH), uno fenólico (-OH) y un grupo de amina secundaria (=NH).

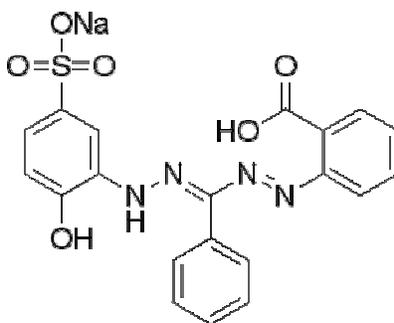
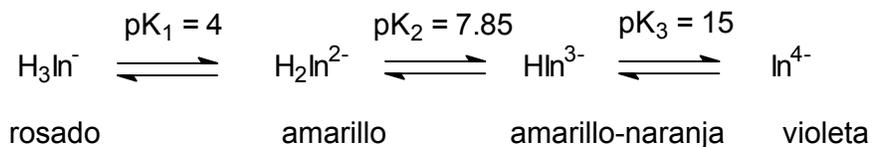


Figura 57- Estructura de la molécula de Zincón.

Debido a que es un reactivo inestable es difícil utilizarlo como indicador ácido-base. A pesar de eso, fue hecho un estudio de las constantes de equilibrio del zincón. Las etapas de ionización del reactivo son (Cadore, 1986):



El hidrógeno carboxílico se pierde a pH próximo a 4. A pH más ácido el reactivo se descompone fácilmente y deben utilizarse estrategias para mantenerlo en solución como por ejemplo el agregado de etanol. Las especies H_2In^{2-} y HIn^{3-} corresponden al intervalo de pH de 5.9 a 10.0. La forma violeta, cuando el indicador está totalmente ionizado, se obtiene sólo en medio 10 M de NaOH (Cadore, 1986).

El complejo Zn-zincón puede ser representado estructuralmente por una de las dos fórmulas representadas en la figura 58. En (a) se presenta el enlace del zinc por electrovalencia, por la sustitución del H del grupo carboxilo y el de la amina secundaria; en (b) el enlace se da a través del grupo fenólico, sustituyendo el H del grupo hidroxilo y de la amina secundaria. El metal completa el anillo por medio de un enlace covalente coordinado en ambos casos. Estructuras semejantes representan el complejo Cu-zincón.

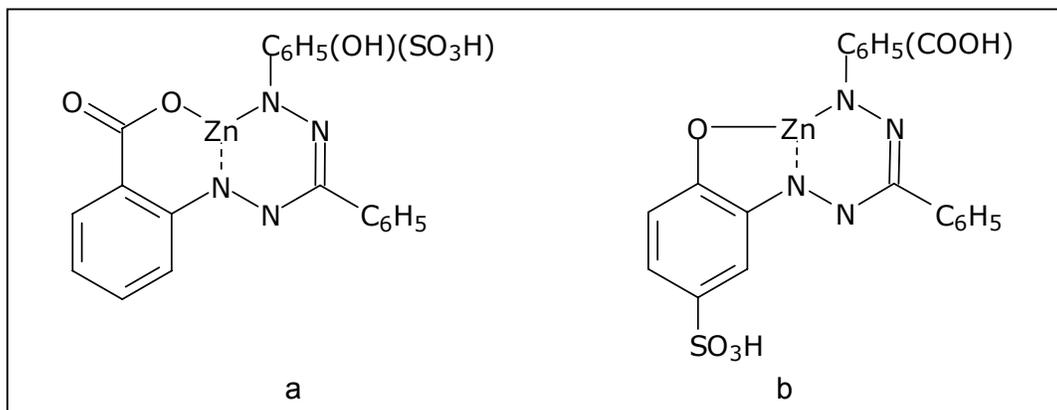


Figura 58- Estructuras de los complejos Zn-zincón.

A partir del trabajo de Yoe y Rush en 1954 diversas publicaciones han aparecido utilizando el reactivo zincón para la determinación de zinc, cobre y otros metales (Richter *et al.*, 2002; Leelasattarathkul, *et al.*, 2006, 2007).

Como el zincón no es un reactivo específico para zinc o cobre, es necesaria la separación de los iones que interfieren, generalmente mediante el uso de una resina de intercambio iónico o utilizando agentes enmascarantes que formen complejos más estables con el metal interferente.

La interferencia del Cu es uno de los mayores problemas cuando se determina zinc con zincón, debido a las semejanzas en la naturaleza química de estos dos elementos.

Sin embargo es posible la determinación de Cu(II) a pH 5 dado que a ese pH el complejo Cu (II)-zincón es estable y la determinación de Cu (II) y Zn (II) a pH 9. Si además agrega citrato de sodio en la preparación de las soluciones *buffer* es posible enmascarar el complejo Cu(II)-zincón a pH 9 casi completamente,

así como otros metales constituyentes de la matriz que podrían interferir (Richter *et al.*, 1997).

Determinación de nitrito

Los métodos espectroscópicos son los más usados para la determinación de nitrato y nitrito debido a sus excelentes límites de detección. Entre las posibles técnicas se encuentran la espectrometría UV-visible, quimioluminiscencia, fluorimetría, espectrometría Raman entre otras (Moorcroft *et al.*, 2001).

Las técnicas de HPLC y análisis por inyección en flujo han sido exitosamente acopladas con el método de Griess y utilizadas para la determinación de nitrato y nitrito en diversas matrices (fluidos biológicos, alimentos, aguas residuales entre otras) (Moorcroft *et al.*, 2001).

El método clásico de Griess para la determinación de nitrito, fue utilizado en esta tesis para la determinación de nitrato y nitrito. Involucra la formación de un cromóforo mediante la diazotación de la sulfanilamida con ácido nitroso, seguido de una copulación con una amina bicíclica (Marczenko y Balcerzak, 2000, pp 307).

Método de Griess modificado

En medio ácido, el nitrito reacciona con aminas aromáticas primarias para formar sales de diazonio. La sal luego se acopla con un compuesto aromático

adecuado que contenga un grupo amino o hidroxilo, para dar un azo compuesto coloreado el cual es la base para el método espectrofotométrico.

En el método de *Griess* (1879), el anión nitrito, el ácido sulfanílico y 1-naftilamina reaccionan de la siguiente manera:

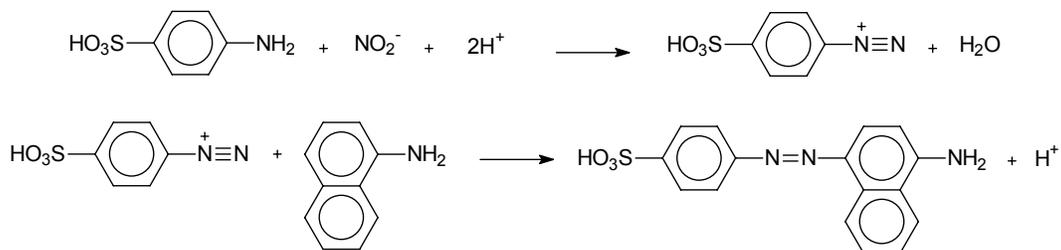


Figura 59- Reacciones en el método de *Griess*.

El método de *Griess* es altamente sensible. La absorptividad molar a $\lambda_{\text{máx}} = 520$ nm es $4.0 \cdot 10^4$ y la absorptividad específica 2.8 ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$).

La solución en la cual el nitrito se desea determinar no debe contener oxidantes, reductores o sustancias coloreadas. Ni urea ni aminas alifáticas deberían estar presente dado que pueden reaccionar con nitrito para liberar N_2 . Los iones Cu (II) catalizan la descomposición de la sal de diazonio, dando lugar a resultados bajos (Clesceri *et al.*, 1998, pp. 4.113).

Métodos para la determinación de nitrato.

La mayoría de los métodos espectrofotométricos para determinar nitrato se basan en 1) nitración u oxidación de reactivos orgánicos apropiados para formar compuestos coloreados, o 2) reducción del nitrato a nitrito o amoníaco con la subsecuente determinación de estas especies.

Para la determinación de nitratos y nitritos en leche se realiza un tratamiento con agua caliente, precipitación de la grasa y proteína y filtración. Posteriormente se realiza la reducción de una porción del filtrado del nitrato a nitrito, por medio de una columna de cadmio. En alícuotas del filtrado no reducido se realiza un desarrollo de color, por adición de sulfanilamida y clorhidrato de N-1-Naftiletilendiamina para la determinación de nitrito, la misma reacción se desarrolla sobre una alícuota del filtrado (reducido) que ha pasado por la columna de cadmio para la determinación de nitrito total. La medición de absorbancia se realiza a 538 nm (IDF 189-1: ISO 14676-1, 2001(E)).

También se puede realizar esta determinación mediante técnicas en flujo como se describe en la norma vigente IDF: ISO para la determinación de nitratos y nitritos en leche, y como se describe en APHA 4500-NO₃ F (Clesceri *et al.*, 1998, pp. 4.112 - 4.119).

3.4. Herramientas de software

El equipamiento moderno y los sistemas automatizados están basados en el uso de microprocesadores y componentes electrónicos. Para llevar adelante las determinaciones analíticas desarrolladas en esta tesis fue necesaria la interconexión de instrumentos y computadoras.

Software utilizado

Los lenguajes de programación utilizados en las determinaciones de esta tesis fueron QuickBASIC 4.0 y VisualBasic 6.0.

QuickBASIC es un descendiente del lenguaje BASIC desarrollado por Microsoft Corporation para uso con el sistema operativo MS-DOS. Este lenguaje incluye todas las sentencias y funciones de BASIC pero es más avanzado permitiendo la programación acelerada en el desarrollo de programas. QuickBASIC combina la sencillez del lenguaje BASIC original pero sin la necesidad de los números de línea, se controla a través de menús e incluye muchos atajos cuando se adquiere experiencia. Es un programa estructurado e incluye un editor de pantalla completa que permite desplazarse con facilidad dentro del entorno de programación (Nameroff, 1990). La primera versión de este programa se publicó en 1985. El programa cuenta con un compilador de manera que una vez finalizada la programación el programa se convierte en una versión ejecutable que el usuario puede hacer funcionar desde el DOS.

Los programas desarrollados junto con el Dr. Moisés Knochen, permitieron controlar válvulas solenoide y válvulas inyectoras. El analista simplemente ingresando parámetros de operación como tiempo de carga de muestra, tiempo de adquisición de datos, tiempo de limpieza y número de repeticiones analíticas en un menú ponía a funcionar una secuencia de análisis. Así los sistemas funcionaron totalmente automatizados, y la única intervención del analista era cambiar la muestra, iniciar y terminar el programa. Finalmente un reporte del trabajo realizado podía ser impreso para así completar la rutina de análisis.

Microsoft® Visual Basic® es una herramienta de diseño de aplicaciones para Windows, éstas se desarrollan en gran parte a partir del diseño de una interfase gráfica (Russo y Echols, 1999). En una aplicación de Visual Basic, el programa está formado por una parte de código puro, y otras partes asociadas a los objetos que forman la interfase gráfica. Es un término medio entre la programación tradicional, formada por una sucesión lineal de código estructurado, y la programación orientada a objetos, combinando ambas cosas.

Crear un programa en Visual Basic implica varios pasos:

- Creación de una interfase de usuario como vía de comunicación hombre-máquina, creación de formularios.
- Definición de las propiedades de los controles -objetos- colocados en los formularios, estas propiedades determinarán cómo son los controles y para qué sirven.
- Generación del código del programa.

En este trabajo fueron utilizados programas en Visual Basic 6.0. En las figuras 60 y 61 se muestra la vista de pantalla de alguno de los programas utilizados para control y adquisición de datos.

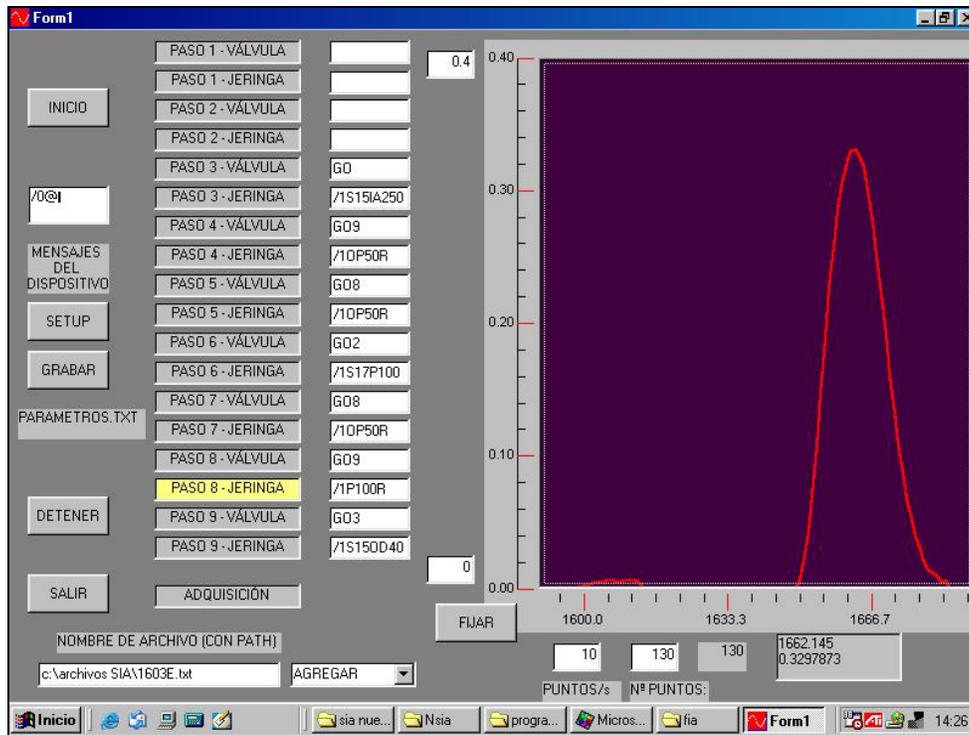


Figura 60- Vista de impresión de pantalla de *software* de adquisición de datos utilizado para la determinación de cobre y zinc.

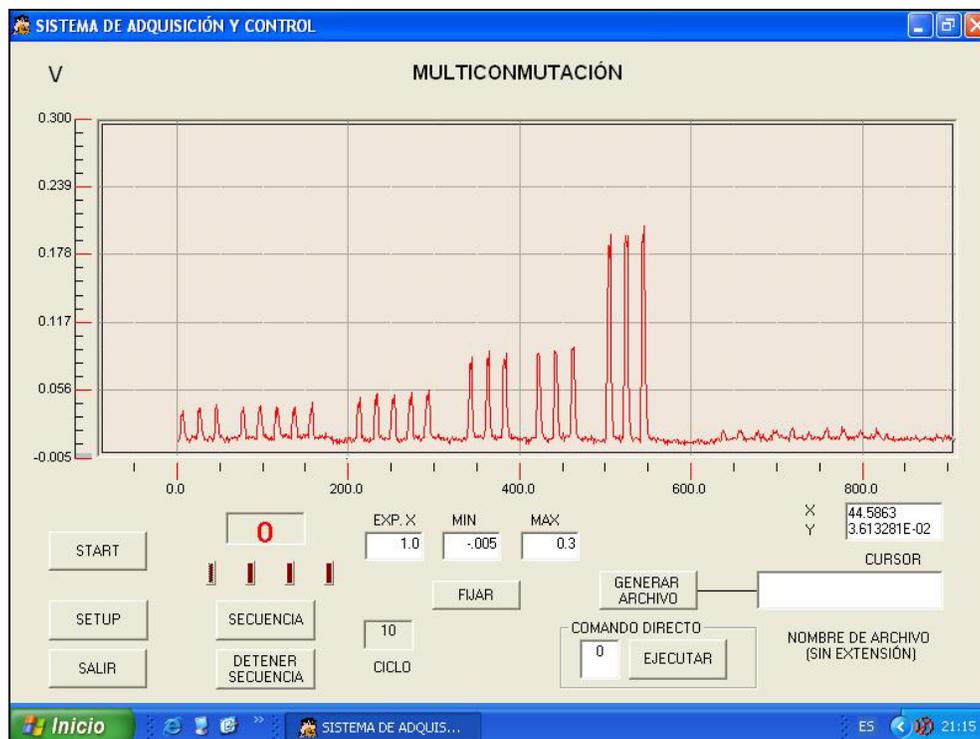


Figura 61- Vista de impresión de pantalla de *software* de adquisición de datos utilizado para la determinación de selenio.

3.5. Aseguramiento de la calidad

El requisito imprescindible de toda medida analítica es ser consistente, fiable y exacta. El aseguramiento de la calidad es un sistema de actividades cuyo propósito es proveer a quien produce el proceso o al cliente o usuario de un producto o a un servicio, la certeza de que el mismo cuenta con estándares de calidad con un cierto nivel de confianza (Taylor, 1987).

Esta sección pretende dar una referencia rápida sobre temas relacionados con el aseguramiento de la calidad, en particular como se valida una metodología analítica y temas conexos.

El proceso destinado a confirmar que el método o procedimiento analítico empleado para un ensayo es apropiado para el fin al cual es destinado se denomina validación (Inczédy *et al.*, 1998). Otra definición un poco más completa de validación indica que es el proceso de verificar que un método es adecuado para un propósito determinado (“fit for purpose”), y que puede resolver un problema analítico particular (Wenclawiak, Koch y Hadjicostas, 2004).

La validación de métodos analíticos y calificación de equipos son requisitos en los ambientes regulados. Ejecutados correctamente mejoran la fiabilidad, consistencia y exactitud de los datos analíticos (Huber, 2007).

El concepto de validación es bien conocido en laboratorios de análisis, un buen químico analítico siempre debe validar los métodos analíticos y calificar sus equipos antes de utilizarlos para análisis de rutina.

Las actividades de validación incluyen el proceso analítico completo, desde el muestreo, preparación de muestras, el análisis propiamente dicho y el reporte de resultados. De la misma manera la calificación de un equipo debe abarcar toda su vida útil desde el diseño, implementación, instalación y operación (Huber, 2007).

En el ámbito de la investigación muchas veces no se es tan riguroso en seguir guías para validación y registro de resultados en forma estricta, sin embargo tratándose de una tesis de a la Química Analítica, estos aspectos no pueden ser dejados de lado.

La validación de un método solo puede ocurrir después que éste ha sido creado y optimizado, la etapa previa de optimización requiere muchas veces el mayor esfuerzo y tiempo, sin embargo no es un proceso aislado de la validación ya que muchas veces la optimización y validación se superponen en algún momento.

Además, la validación no es solamente evaluar que se cumplan determinados requisitos (cifras de mérito) sino también la adecuación del nuevo método propuesto a la aplicación buscada, saber cuales son las limitaciones que tiene e identificar las variables de influencia que rigen en proceso.

Todos los trabajos desarrollados en el marco de esta tesis, fueron validados de forma rigurosa, los experimentos de optimización armados según criterios del diseño experimental y en todos los casos se obtuvo un reporte impreso de los resultados primarios.

Es importante destacar que la validación debe ser un equilibrio entre los costos, los riesgos, las posibilidades técnicas y la obtención de la información relevante para que el ensayo pueda resolver un problema analítico y ser adecuado al uso, obteniendo en definitiva la satisfacción del cliente.

Los instrumentos utilizados pasaron las pruebas de calificación necesarias para considerarlos aptos para su uso en las condiciones que fueron utilizados en los diferentes trabajos desarrollados.

En el presente trabajo se presentan métodos alternativos a los actualmente usados como métodos oficiales o de referencia, para la determinación de cobre, zinc, selenio, nitrato y nitrito por tanto éstos nuevos métodos deben ser validados en forma completa.

Cuando se habla de método de referencia debe indicarse que según IUPAC se define como: aquel método que tiene poca inexactitud estimada relativa al uso para el que es propuesto. La exactitud de un método de referencia debe ser demostrada a través de comparación directa con un método definitivo o con un material de referencia primario. (Inczédy *et al.*, 1998)

Otro concepto importante involucrado en el aseguramiento de la calidad de un proceso analítico es el concepto de trazabilidad. La trazabilidad se define según IUPAC como la propiedad de un resultado o medida tal que ésta puede ser relacionada a patrones apropiados, generalmente internacionales o nacionales a través de una cadena continua de comparaciones (Inczédy *et al.*, 1998).

Para comenzar a desarrollar el tema validación consideremos que se deben tener en cuenta al menos tres grandes aspectos:

- Establecimiento de las condiciones por cumplir (por ejemplo si el límite de detección debe estar por debajo de cierto valor)
- Determinación de los parámetros estadísticos del procedimiento (por ejemplo, cómo evaluar precisión).
- Evaluación de los resultados de la validación por comparación de los parámetros estadísticos obtenidos con las condiciones de trabajo y decisión sobre la validez del procedimiento para el propósito establecido.

En el caso de validación completa se considera como cifras de mérito a evaluar las siguientes: (Holcombe, 1998)

- Intervalo lineal y de trabajo
- Sensibilidad
- Límite de detección y límite de cuantificación
- Veracidad (sesgo)
- Repetibilidad
- Reproducibilidad
- Exactitud (veracidad y precisión)
- Selectividad/Especificidad
- Robustez
- Incertidumbre

En algún caso particular fue necesario realizar validación parcial, esos casos serán explicados en los ítems correspondientes del desarrollo experimental.

Antes de comenzar una validación es fundamental una correcta planificación del trabajo para poder evaluar cuestiones como:

¿Cómo evaluar el desempeño del método?

¿Cuántos experimentos realizar?

¿Qué número de pruebas realizar para poder realizar estimaciones estadísticas?

¿Cuáles son los parámetros de desempeño críticos?

¿Cómo definir criterios de desempeño?

- Intervalo lineal y de trabajo

La linealidad define la capacidad del método para obtener respuestas analíticas directamente proporcionales a la concentración del analito, en un rango de concentraciones definido. El intervalo de concentraciones del analito de interés dentro del cual los valores de la magnitud medida son proporcionales a la concentración del analito, se define como el intervalo lineal (Inczédy *et al.*, 1998).

El intervalo de las concentraciones analíticas sobre las cuales el método va a ser aplicado es el intervalo de trabajo. Se refiere al intervalo de concentraciones en las disoluciones medidas realmente, no a las muestras originales.

La función matemática de calibración $y=f(x)$ se obtiene mediante el ajuste de los datos experimentales a un modelo matemático adecuado.

La función de calibración más conveniente es la lineal:

$$Y = aX + b$$

$$a = \frac{N \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{N \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad \mathbf{b = Y - aX}$$

Y = señal medida o respuesta

X = variable independiente

a = pendiente

b = ordenada

La calibración analítica es muy importante en el análisis químico. Los métodos instrumentales no son absolutos, generalmente dependen de la comparación de la señal de una muestra de concentración desconocida contra la de otra de concentración conocida (material de referencia o patrones).

El modelo lineal sin ordenada en el origen es el modelo que explica el comportamiento analítico, sin embargo utilizar modelos lineales con ordenada en el origen tienen mejor ajuste matemático. Debe verificarse la significancia de la ordena mediante algún test de hipótesis para evaluar si es diferente de cero.

La función de evaluación es la inversa de la función de calibración, y a partir de la misma es que se calculan las concentraciones en las muestras que contienen un determinado analito que se está estudiando (Inczédy *et al.*, 1998).

Función de evaluación

$$\mathbf{X = (Y-b)/a}$$

El proceso analítico debe realizarse sobre el blanco y patrones o muestras fortificadas a diferentes niveles de concentración. Es conveniente realizar la determinación por lo menos a 6 niveles de concentración más el blanco para construir una curva de calibración, dicha curva se construye graficando la respuesta de la medición (eje y) en función de la concentración (eje x).

Posteriormente se debe realizar una inspección visual para identificar el intervalo lineal aproximado y los límites inferiores y superiores del intervalo de trabajo, o rango de trabajo.

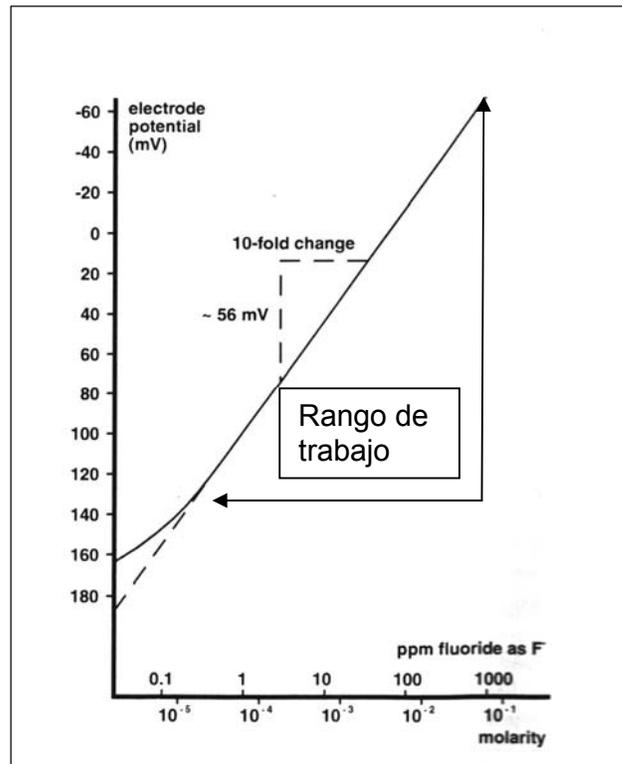


Figura 62 – Ejemplo de selección del rango de trabajo.

Para validar el modelo lineal se pueden aplicar métodos matemáticos y/visuales.

El método más frecuentemente utilizado para estimar los coeficientes de un modelo de regresión es el de mínimos cuadrados (Ramis, 2001). Un ensayo estadístico que suele usarse es el test de *lack-of-fit* (LOF) este test permite detectar la falta de ajuste y si las suposiciones del modelo son correctas.

- Sensibilidad

Primero debe quedar claro que sensibilidad y límite de detección son cosas diferentes. Según IUPAC, sensibilidad instrumental es el cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio en el estímulo, análogamente se denomina sensibilidad de calibración de un método a la pendiente de la curva de calibración (Inczédy *et al.*, 1998).

- Límite de detección y límite de cuantificación

Según IUPAC el límite de detección es el mínimo valor de la variable independiente que puede ser detectado con un nivel de incertidumbre, o sea la mínima concentración de un analito o sustancia en una muestra, la cual puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada bajo las condiciones en que se lleva a cabo el método (Inczédy *et al.*, 1998).

$$Y_L = \bar{Y}_{BL} + kS_{BL}$$

\bar{Y}_{BL} = Media de las mediciones del blanco Las medidas del blanco, que presentan dispersión, las podemos considerar pertenecientes a una población normal.

k= Factor numérico de acuerdo al nivel de confianza deseado

S_{BL}= estimador de desviación estándar de las mediciones del blanco

“**Y_L** “se refiere a la señal más pequeña de una magnitud medida que puede distinguirse de la señal de fondo a un nivel de confianza específico. El valor de concentración que deriva de **Y_L** para un método analítico definido es el límite de detección (surge de la función de evaluación).

El analista entonces debe enfrentar dos situaciones:

1. Falsos positivos: declarar la presencia de un analito, cuando en realidad está ausente. Error tipo I o tipo α .
2. Falsos negativos: declarar ausencia de un analito, cuando en realidad está presente. Error tipo II o tipo β .

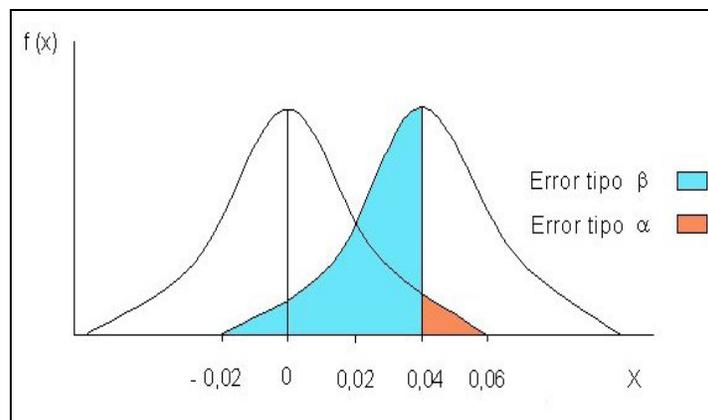


Figura 63- Errores tipo α y tipo β

Para calcular el límite de detección se sugiere realizar la determinación sobre 10 blancos de muestra independientes medidos una vez cada uno, esto solo es útil cuando la medida del blanco da una desviación estándar diferente de cero (Holcombe, 1998).

Cuando la desviación estándar del blanco no puede determinarse, como alternativa se sugiere medir 10 blancos de muestra independientes fortificados con la menor cantidad de analito aceptable, medidos una vez cada uno (Holcombe, 1998). Luego de obtener estas medidas se calcula la desviación estándar y se expresa el límite de detección como la concentración correspondiente a 3s (3 veces la desviación estándar) de la medida promedio del blanco o de la medida de la disolución de mínima concentración de analito según corresponda el caso.

La media y la desviación estándar del blanco son dependientes de la matriz del blanco, consecuentemente, el límite de detección, será dependiente de la matriz.

El límite de cuantificación es la concentración mínima del analito en una muestra que puede determinarse con un nivel de incertidumbre aceptable, bajo las condiciones de operación establecidas.

“Es una característica de desempeño que señala la habilidad de un proceso de medición química, para cuantificar adecuadamente” (Inczédy *et al.*, 1998).

$$Y_Q = \bar{Y}_{BL} + kS_{BL}$$

$$\bar{Y}_{BL} = \text{Media de las mediciones del blanco}$$

S_{BL} = desviación estándar del blanco

k= factor numérico de acuerdo a la desviación estándar relativa (DER) (verificar DER) permitida o admitida como especificación en el ensayo.

Si $k=10$ la DER máxima permitida es 10%

Si $k= 6$ la DER máxima permitida es 16.7%

Si $k= 5$ la DER máxima permitida es 20%

Como ocurre con el límite de detección en este caso también existen diferentes alternativas para obtener este valor. Análogamente al cálculo del límite de detección se sugiere realizar la determinación sobre 10 blancos independientes medidos una vez cada uno, calcular la desviación estándar de estas medidas multiplicarla por el valor de k asignado (habitualmente 10) y obtener el valor de concentración correspondiente (Holcombe, 1998). O también se puede fortificar alícuotas del blanco de muestra a varios niveles de concentración cercanos al límite de detección, (esto implica preparar por ejemplo 10 disoluciones a cada nivel de concentración y medir una vez cada uno) y luego calcular la desviación estándar a cada nivel de concentración. Graficar desviación estándar (s) en función de la concentración y asignar el valor de límite de cuantificación según inspección visual (Holcombe, 1998).

Cabe destacar que el límite de cuantificación normalmente forma parte del estudio para determinar el intervalo de trabajo. Éste no deberá determinarse por extrapolación por debajo de la concentración más baja del blanco fortificado. Estos cálculos son útiles también para tener idea de la precisión a este nivel de concentración.

- Exactitud y veracidad

La exactitud se define como la proximidad de concordancia entre un valor medido de la magnitud y un valor verdadero del mensurando (por ejemplo concentración de selenio medida en leche en polvo y valor verdadero de concentración de selenio en leche polvo).

El concepto exactitud no se refiere a un número sino que dice que una medida es más exacta cuando ofrece una incertidumbre de medida más pequeña.

Existe la distinción entre exactitud y veracidad, siendo la veracidad definida por IUPAC en 1998 como la proximidad de concordancia entre el promedio del valor obtenido de una larga serie de pruebas y el valor verdadero (Inczédy *et al.*, 1998). Sin embargo en el reporte técnico de IUPAC del año 2002 (Thompson *et al.*, 2002), si bien se nombra a la exactitud como un parámetro a ser evaluado en la validación, se refiere siempre a veracidad, y define el término como la proximidad de concordancia entre el valor obtenido de la determinación analítica y el valor de referencia aceptado para lo que se está queriendo determinar.

La veracidad se evalúa cuantitativamente con el sesgo (bias), el mismo se obtiene de aplicar un método de referencia para determinar la concentración de un analito en un material de referencia y comparar ese valor obtenido con el valor asignado de ese analito en ese material de referencia, ambos valores se comparan estadísticamente (Thompson *et al.*, 2002).

Un material de referencia es definido por IUPAC como el material o sustancia cuyas propiedades son lo suficientemente homogéneas y bien establecidas tal que puede ser usado para calibración de un aparato, para imponer un método de medida, o para asignar valores a materiales (Inczédy *et al.*, 1998). Cuando el material cuenta con certificado que establece el valor de un analito con su incertidumbre asociada, el cual fue determinado con un procedimiento que establece la trazabilidad del valor a un valor exacto, se le llama material de referencia certificado. Además un material de referencia certificado debe cumplir ciertos requisitos como ser homogeneidad (en el certificado del material se especifica cual es la mínima toma en peso o volumen que se debe realizar para garantizar homogeneidad) y estabilidad con el tiempo y en condiciones de transporte.

Existen algunos organismos que fabrican material de referencia como NIST (National Institute of Standards and Technology), IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements, de la Unión Europea), IAEA (Internacional Atomic Energy Agency) que cuenta con prestigio reconocido.

El material de referencia certificado que se seleccione para una determinada validación, debe ser lo más parecido posible a la matriz que se está analizando, en este trabajo se contó con material de referencia leche descremada en polvo y fórmula infantil (NIST 1549 Non-fat milk powder y NIST 1846 Infant Formula respectivamente).

Para evaluar la veracidad y por lo tanto la exactitud, se puede medir el blanco y el material de referencia usando un método candidato, la guía Eurachem

sugiere hacerlo 10 veces (este número puede variar dependerá de cada caso particular), se sustrae el valor promedio del blanco al valor promedio del analito del material de referencia y se compara el valor verdadero aceptado para el material de referencia y el valor obtenido (Holcombe 1998). Esta comparación como se indicó anteriormente da una idea del sesgo del método y se deben aplicar pruebas de hipótesis estadísticas como soporte para sacar conclusiones.

Otra forma de evaluar la veracidad, es medir el blanco y el material de referencia o el material de ensayo, usando el método candidato y un método independiente (preferentemente primario, que pueda ser considerado método de referencia) por ejemplo 5 o 10 veces. Al valor promedio del analito en el material de referencia o prueba se le sustrae el promedio del valor del blanco y se comparan los resultados obtenidos por ambos métodos. Esto da una idea del sesgo del método candidato respecto al método independiente o primario. Debido a que él método independiente o primario puede tener su propio sesgo no se puede tener una medición absoluta de la exactitud (si se trata de un método primario idealmente no tiene sesgo) (Holcombe, 1998).

Es bastante común cuando se propone un nuevo método analítico para alguna determinación que ya tiene un método considerado oficial o de referencia, que éste método candidato se compare con aquel que viene siendo utilizado como método de referencia.

A modo de ejemplo, existen publicaciones oficiales para determinación de cobre y zinc en leche en polvo (Bueno, 1996), en esta tesis para estos dos

analitos se proponen nuevos métodos alternativos de determinación y los resultados se compararon con los obtenidos por los métodos oficiales.

No hay que olvidar que todo método oficial cuando se ejecuta en un determinado laboratorio por primera vez, debe al menos pasar por una instancia de validación parcial. Por eso algunas veces cuando no se cuenta con material de referencia adecuado y es necesario validar un método analítico aunque sea un método oficial, se recurre a las recuperaciones por adición del analito en estudio.

El uso de la recuperación (spiking/recovery) también es una alternativa posible para evaluar veracidad y sesgo cuando no se cuenta con materiales de referencia y no es posible realizar un método de referencia (por ejemplo por no contar con el instrumental requerido). En este contexto, recuperación se define como la cantidad de analito presente en la porción de la muestra o adicionado a ésta, que es cuantificada por un método de ensayo. Se realiza la determinación sobre el material o matriz sin el agregado de analito y con el agregado de una cantidad exactamente conocida del mismo (spiked), la diferencia entre ambos resultados es llamada recuperación sustituta (“surrogate recovery”) o marginal (“marginal recovery”) (Thompson *et al.*, 2002).

Realizar adiciones de analito y evaluar así recuperación es una práctica que puede ser cuestionada debido a que la adición del analito a una determinada matriz no garantiza que el mismo interactúe con matriz de la misma forma que cuando el analito es “nativo” en dicha matriz. El agregado del analito debería agregarse en la misma forma química que se encuentra en la matriz, esto no

siempre es posible y en el caso de matrices biológicas complejas casi imposible.

La fracción del analito adicionada a una muestra de prueba (fortificada o adicionada) antes del análisis que es determinada efectivamente por el método se calcula como (Holcombe, 1998):

$$\% R = \frac{C_f - C_{sf}}{C_a} \times 100$$

C_f = concentración del analito medida en la muestra fortificada

C_{sf} = concentración del analito medida en la muestra sin fortificar

C_a = concentración del analito adicionada (no medida por el método) en la muestra fortificada.

Si el porcentaje de recuperación no arroja un valor satisfactorio (se deberán realizar pruebas estadísticas para evaluar si el porcentaje de recuperación se aparta significativamente del 100% y evaluar la incertidumbre del método), indica que existe un sesgo afectando el método, o que la matriz tiene una influencia tal que existe algún efecto de ésta sobre el resultado final.

El efecto matriz consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otras sustancias que forman parte de la matriz, o sea que para una misma concentración de analito, la determinación en una muestra real y la de una disolución de patrón de analito puro no proporcionan igual respuesta. Si existe efecto matriz, otras estrategias como las adiciones estándar se deben utilizar, este tipo de estrategias se explicarán más adelante cuando se hable de selectividad e interferencias en particular del tipo multiplicativas (afectan la pendiente de la curva de calibración).

Cabe precisar que cuando la recuperación se realiza utilizando como valor conocido, el valor de referencia que aparece en el certificado de un material de referencia certificado, IUPAC recomienda llamarle “recuperación aparente”.

(Burns *et al.*, 2002).

- Precisión

Precisión se define según IUPAC como la proximidad de concordancia entre valores medidos obtenidos por mediciones repetidas de un mismo objeto, o de objetos similares, bajo condiciones especificadas. (Inczédy *et al.*, 1998)

La precisión se ve afectada por una serie de factores de influencia como ser el tiempo de análisis, las calibraciones, el operador, factores instrumentales, factores ambientales, entre otros.

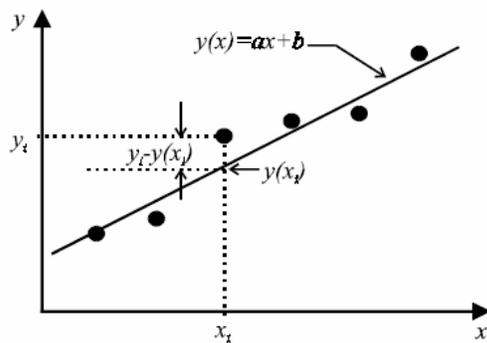
Cuando se evalúa la precisión se puede discriminar entre: precisión en condiciones de repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

En el caso de precisión en condiciones de repetibilidad se refiere a una medida realizada con el mismo operador, equipo, calibración de equipo y en un corto periodo de tiempo (una medida a continuación de otra). En el caso de la precisión intermedia al menos uno de los anteriores es diferente, en general se evalúa realizando las mismas medidas en varios días consecutivos manteniendo el equipo y el operador y las condiciones ambientales controladas. Cuando se determina al reproducibilidad todo es diferente (operador, equipo, laboratorio), o sea en un mismo laboratorio nunca se podrá

evaluar la reproducibilidad de un método. El ejemplo típico para esta situación son los ensayos interlaboratorio (Holcombe 1998).

La precisión se estima en términos de desviación estándar (s). También resulta útil calcular la desviación estándar relativa porcentual (s_r %).

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$



$$s_r (\%) = 100 \times \left(\frac{s}{\bar{x}} \right)$$

Tanto la repetibilidad como la reproducibilidad son dependientes de la concentración del analito, por tanto si es relevante debe establecerse la relación entre la precisión y la concentración de analito

Para calcular la precisión entonces se deben realizar medidas repetidas de material de referencia, blanco, patrones a diferentes niveles de concentración (las guías típicamente recomiendan 10 medidas según la guía Eurachem) y

calcular la desviación estándar en las condiciones especificadas. (Holcombe, 1998)

- Selectividad/Especificidad

En las recomendaciones de IUPAC del año 2001 el término se ha definido como “la extensión en la que un método puede utilizarse para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes con un comportamiento similar” (Vessman *et al.*, 2001).

Es común que en publicaciones científicas se confunda el término selectividad y especificidad, pero son cosas distintas.

“Una reacción o prueba específica es aquella que ocurre solo con la sustancia o analito de interés, mientras que selectivo es cuando ocurre con varias sustancias o analitos pero éste exhibe un grado de preferencia por la sustancia o analito de interés, muy pocas reacciones son específicas, pero muchas muestran selectividad” (Vessman *et al.*, 2001).

Específico es considerado como 100% selectivo, lo cual significa que no habrá interferencias. IUPAC en sus recomendaciones del año 2001 indica que el término especificidad ni siquiera debería utilizarse (Vessman, 2001).

Según la guía Eurachem (Holcombe, 1998), la selectividad es la capacidad de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes de la matriz de la muestra bajo condiciones de prueba establecidas. La guía también se refiere al concepto de confirmación de identidad o el establecimiento de que la señal producida en la etapa de

medición, la cual se atribuye al analito, se debe únicamente a él y no a la presencia de algo química o físicamente similar.

Pero más allá de todas estas definiciones la cuestión es qué hacer para evaluar selectividad y especificidad. Primero evaluar el tipo de técnica instrumental a utilizar para la determinación del analito en cuestión y estudiar cuales son las posibles interferencias inherentes al uso de esa técnica (absorción atómica, cromatografía) en función de los fenómenos físicos o químicos en los que se basa, de la misma manera evaluar luego los métodos a utilizar (desarrollos de color por ejemplo).

En lo posible es deseable poder comparar el método candidato con un método independiente y evaluar si producen resultados equivalentes. Para ello se grafica el valor obtenido por el método propuesto en función del valor obtenido por el método de referencia y si son equivalentes la pendiente debe ser 1 y la ordena en el origen debe ser 0. Para este tipo de estudios se necesita un número de muestras considerable (mínimo 15, con pocas muestras no es adecuado hacer este tipo de estudios) con valores de concentración del analito variados (en toda la zona del rango de trabajo) (Holcombe, 1998).

Otra estrategia puede ser analizar muestras conteniendo posibles interferencias en presencia del analito de interés, evaluar si se inhibe o realiza la cuantificación o detección del analito, esto sería fabricar muestras artificiales.

Una interferencia es aquella sustancia que causa error sistemático en la determinación, la interferencia puede distorsionar la señal del analito de interés.

Un ejemplo de esta situación se muestra en la figura 64, el error sistemático se traduce en una predicción errónea de la concentración de un analito.

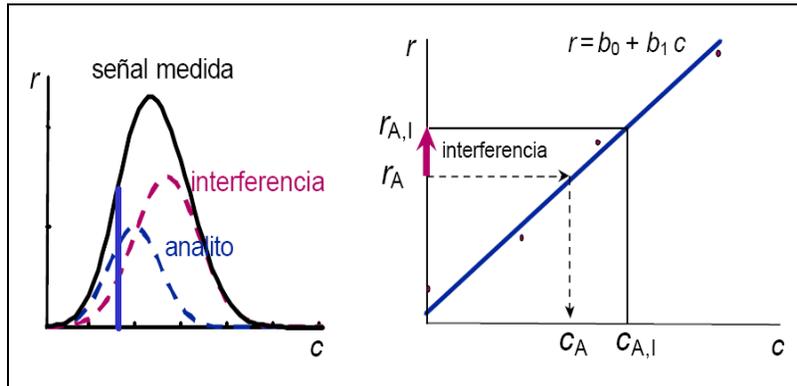


Figura 64 - Efecto de una interferencia en la señal instrumental medida (r) y en la posterior cuantificación del analito de interés. La diferencia ($c_{A,I} - c_A$) es el error sistemático (sesgo) en el resultado.

Otro tipo de interferencia son las provocadas por la matriz, llamadas efecto matriz. El efecto matriz provoca un error sistemático proporcional, es decir, dependiente de la concentración de analito en la muestra (interferencias multiplicativas), como se muestra en la figura 65, existe un cambio en la pendiente de la recta de calibración si se hace con patrones puros o con matriz adicionada de diferentes cantidades exactamente conocidas de analito.

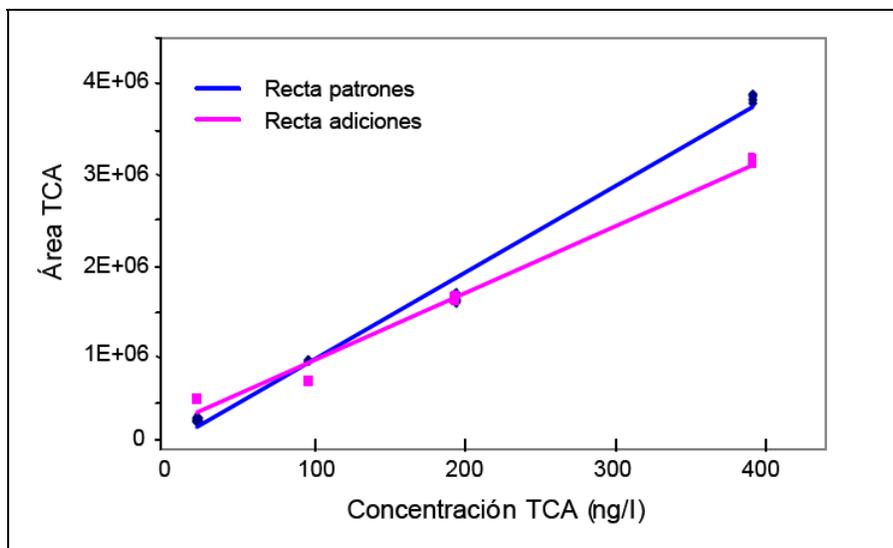


Figura 65- A modo de ejemplo comparación de pendientes que pone en evidencia un efecto matriz.

En el caso de verificar que existe este tipo de interferencia se debe buscar una estrategia para superar esta dificultad. Una posibilidad es construir siempre la recta de calibración tomando una muestra parecida a la muestra a analizar pero libre del analito de interés (blanco de muestra), y agregarle cantidades conocidas de analito para obtener disoluciones patrón. (Ramis, 2001).

Otra alternativa muy usada y que fue utilizada en este trabajo en el caso de la determinación de nitrato y nitrito en leche, es utilizar la técnica de adiciones estándar (Miller y Miller, 2002). Consiste en la adición de cantidades conocidas y crecientes de analito a la propia muestra a analizar, la lectura de las correspondientes lecturas instrumentales y posterior construcción de la recta de adiciones estándar. Luego se realiza la cuantificación del analito por extrapolación de la recta de calibración al punto del eje de abscisas donde la respuesta es cero, como se muestra en la figura 66.

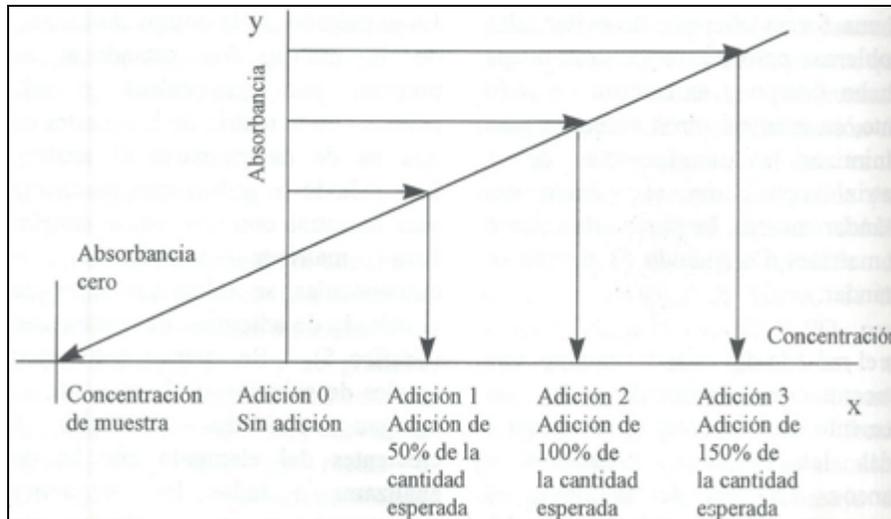


Figura 66 – Gráfico de calibración de adiciones estándar.

Esto tiene ciertas limitaciones, obviamente la curva de calibración debe ser lineal y el analito agregado debe ser la misma especie que contiene la matriz.

El gran inconveniente está en que para cada muestra debe construirse la curva de adiciones estándar lo que aumenta mucho el tiempo de análisis, el consumo de reactivos y muestras.

El químico analítico debe explorar las opciones de que dispone para conseguir la mejor selectividad, ya sea mediante la optimización de las condiciones experimentales, mediante la remoción directa de las interferencias o mediante análisis multivariante.

- Robustez

La robustez según IUPAC es una medida de la capacidad de un método analítico, de permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas, variaciones en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso de rutina. (Thompson *et al.*, 2002).

Para evaluar la robustez primero es necesario identificar las variables de influencia y luego establecer experimentos para observar el efecto sobre la exactitud y la precisión ocasionado por el cambio introducido.

Este estudio llevará a establecer condiciones definitivas de medición y establecerá evidencia de cuales serán las variables críticas a controlar.

Parte de los experimentos pueden considerarse dentro de la etapa de optimización del método candidato.

- Incertidumbre

La incertidumbre según IUPAC es el parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos la mensurando (Inczédy *et al.*, 1998).

La evaluación y estimación de la incertidumbre de las medidas analíticas es un gran tema, la estimación exhaustiva utilizando los modelos matemáticos adecuados es sin duda engorrosa. En el caso de la acreditación de ensayos de laboratorio es un requisito la estimación de la incertidumbre.

Está claro que un resultado sin una incertidumbre asociada no significa nada, solo es un número que da poca información si al menos no se hace una estimación de la precisión del método. Sin embargo existen formas simplificadas de expresar resultados evaluando aquella o aquellas fuentes de incertidumbre de mayor peso en el resultado final.

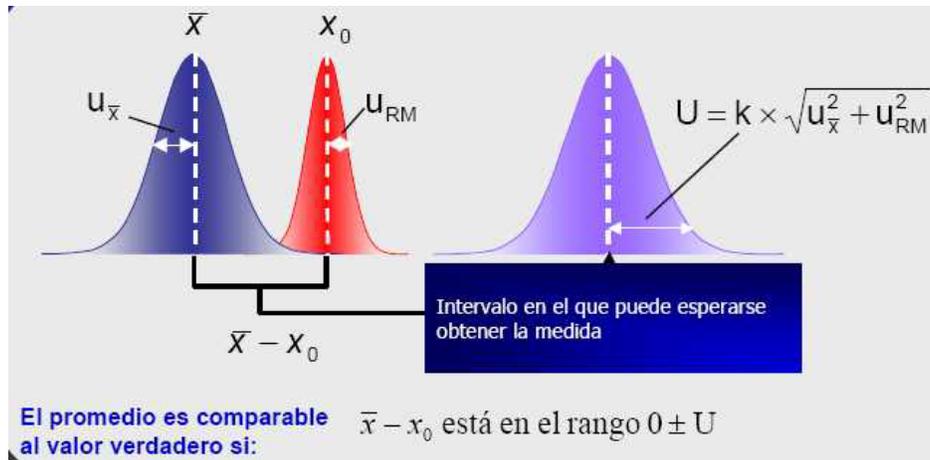


Figura 67 – Incertidumbre (U). (Modificado de Eglea, 2007)

Las etapas que llevan a la estimación de la incertidumbre son en términos generales:

- **Mensurando:** definir los modelos físicos y matemáticos que se usan para calcular la magnitud de mensurando (por ejemplo concentración de cobre en leche fluida, el analito es cobre, el mensurando es la concentración de cobre en leche fluida).
- **Magnitudes de influencia:** definir y organizar las magnitudes de influencia.
- **Cuantificación:** cuantificar magnitudes de influencia y su dispersión
- **Valor de mensurando:** obtener la mejor estimación del mensurando

→ Incertidumbre estándar combinada: combinar las contribuciones a la incertidumbre del mensurando

→ Incertidumbre expandida: determinar el intervalo que abarca el valor del mensurando con un cierto nivel de confianza.

→ Informe: expresar el resultado de la medición incluyendo su incertidumbre.

Una de las etapas críticas es identificar las variables de influencia, una vez identificadas es ilustrativo construir con esa información los llamados diagramas “causa-efecto” (Holcombe, 1998).

En esta tesis para todos los trabajos desarrollados se han identificado las variables de influencia de forma tal de expresar los resultados con una incertidumbre simplificada, en cada caso en particular se explicará como fue estimada.

Herramientas para la validación de métodos analíticos

→ Blancos: permiten evaluar que tanto de la señal medida puede ser atribuida al analito o a otras causas.

- Blancos de reactivos: disolución que contiene todos los reactivos involucrados en el proceso analítico. La señal analítica del analito puede ser corregida por el contenido del analito en los reactivos.

- Blancos de muestra: esencialmente son matrices sin el analito de interés. Son muy difíciles de obtener, pero son los que realmente darían una estimación de las interferencias que pueden existir.
- Muestras artificiales: muestras reales que sirven para evaluar el efecto de interferencias.
- Materiales fortificados: materiales o disoluciones que han sido fortificadas con el analito de interés. Hay que tener en cuenta el contenido natural del analito en el material y como está ligado en la matriz.
- Materiales de referencia: Material o sustancia en la cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneas y bien definidas como para ser utilizados en la calibración de aparatos, en la evaluación de un método de medición o para asignar valores a otros materiales (no es posible establecer su trazabilidad) (ISO Guide 30, 1992).
- Material de referencia certificado: va acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de la propiedad y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza. (ISO Guide 30, 1992).
- Estadística: es muy importante manejar al menos las herramientas básicas estadísticas como ser: medidas de tendencia central, medidas de dispersión, pruebas de hipótesis, gráficos, método de mínimos cuadrados, análisis de residuales y diseño experimental.

Pruebas de significación

Para decidir si la diferencia entre una cantidad medida y una cantidad conocida se puede justificar por errores aleatorios, puede aplicarse una prueba estadística denominada prueba de significación (Miller y Miller, 1993). En estas pruebas se comprueba la veracidad de una hipótesis nula. El término nulo se utiliza para indicar que no hay más diferencia, entre el valor observado y el valor conocido, que la que puede atribuirse a la variación aleatoria.

En esta tesis se utilizaron varias pruebas de significación en la evaluación de la veracidad según se detalla a continuación:

- Comparación de una media experimental con un valor conocido

En esta prueba suponiendo que la hipótesis nula es verdadera, se puede calcular la probabilidad de que la diferencia observada entre la media muestral \bar{x} y el valor verdadero μ se deba solamente a un error aleatorio.

Por lo general, la hipótesis nula se rechaza cuando la probabilidad de que la diferencia observada ocurra por azar es menor que 1 de cada 20 veces (es decir, 0.05 o 5%). En este caso se dice que la diferencia es significativa al nivel de 0.05.

Para decidir si la diferencia entre μ y \bar{x} es significativa se calcula un valor de t tal que: $t = (\bar{x} - \mu) \cdot \sqrt{n} / s$, n = tamaño de la muestra, s = desviación estándar, con los datos experimentales y se compara el valor absoluto del t calculado con un valor de t crítico (Miller y Miller 1993, pp. 40). El valor crítico surge de la tabla de distribución t , para dos colas. Esta prueba se utilizó para evaluar los resultados experimentales cuando se comparó la media de resultados

obtenidos con un valor teórico informado en un certificado de un material de referencia.

Otra forma de utilizar esta prueba fue realizar el cociente de un resultado obtenido mediante un método propuesto y uno considerado de referencia u oficial y comparar ese valor con el valor teórico 1. En este caso se verificó si dos métodos arrojaron resultados equivalentes.

En el caso de evaluar si la media de una serie de porcentajes de recuperación varió con respecto al valor ideal 100% también se utilizó esta prueba.

Análisis de trazas

El evitar la contaminación en el análisis de trazas es una tarea crítica. Dado el bajo nivel de las trazas inorgánicas en los alimentos (niveles del orden de microgramos o nanogramos) y la ubicua presencia de niveles significantes de estos elementos en envases, aire, reactivos, etc., el investigador debe mantener una actitud de “paranoia útil” al evaluar y eliminar fuentes potenciales de contaminación en cada paso del procedimiento (Wolf y Harnly, 1984).

Como regla general, las impurezas introducidas por los reactivos, los instrumentos y el aire del laboratorio tienen como resultado valores de blanco altos y altas variaciones para los mismos, y por lo tanto, primariamente afectan la repetibilidad y el límite de detección del análisis, mientras que la adsorción y la volatilización afectan la exactitud (Korenman, 1968). Deben adoptarse medidas especiales de limpieza en laboratorios donde se llevan a cabo análisis de trazas. El polvo en el aire del laboratorio contiene elementos tales como Si, Al, Fe, Ca, K, P, S y metales pesados como Pb, Cu y Ni, así como C orgánico.

Si no puede establecerse filtración de aire, es una buena práctica utilizar material contenedor debidamente tapado. Para reducir la presencia de metales como Fe, Cr, Ni y Mo, deberá evitarse el uso de materiales de construcción atacables por corrosión. Los mecheros a gas pueden también contaminar la atmósfera del laboratorio, especialmente introduciendo Cu y Zn.

Cubrir las mesas del laboratorio con polipropileno es beneficioso; es fácil de limpiar y contiene un bajo nivel de elementos contaminantes. Es altamente recomendable, y en algunos casos es requisito mínimo, el uso de una cabina de flujo laminar con filtros de aire HEPA, los cuales remueven el 99.97 % del material particulado de menos de 0.3 μm de diámetro. Sin embargo no todos los laboratorios están equipados con cabinas de flujo laminar por lo que hay que extremar las precauciones en la limpieza de la sala de trabajo (Kratochvil, 2003, Knapp y Shramel, 2003).

Para la limpieza del material de vidrio, es efectivo para remover contaminantes, el guardar el material de vidrio en un contenedor grande conteniendo ácido fuerte (HCl o HNO_3 al 10% (v/v)) mientras no sean usados en el trabajo analítico. Para enjuagar, debería usarse agua bidestilada de alta calidad o deionizada.

En el análisis de trazas, debe prestarse el mayor cuidado y atención en los reactivos usados, dado que el grado de pureza en la obtención varía mucho de un reactivo a otro, y de un elemento a otro. Los niveles de los contaminantes más comúnmente encontrados Si, Mg, Al, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu y Pb pueden, mediante procedimientos adecuados, reducirse a alrededor de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y para

otros elementos menos comunes pueden alcanzarse niveles aún menores. Los reactivos de alta pureza disponibles comercialmente (por ejemplo, suprapur), aún cuando están altamente purificados, no son necesariamente puros en lo que respecta a todos los elementos, dado que el control de impurezas está usualmente restringido sólo a unos pocos elementos y también porque la introducción de impurezas a partir de los recipientes que los contienen procede incontroladamente. La única manera de asegurar la pureza de un reactivo es por análisis regular y evaluación de las señales de los blancos. Para la purificación de reactivos se utilizan procedimientos tales como destilación por debajo del punto de ebullición (sub-boiling), coprecipitación, extracción líquido-líquido, y adsorción.

El almacenamiento y la estabilidad de disoluciones patrón muy diluidas es un gran problema. Los fenómenos de adsorción y absorción pueden influir sobre los patrones, los cuales dependen en gran medida del valor de pH de la disolución. Es por tanto recomendable (en la mayoría de los casos) acidificar las disoluciones patrón por ejemplo utilizando HNO_3 0.5 M) (Zief and Mitchell, 1976, FAO, 2009).

Es aconsejable mantener las disoluciones patrón como disoluciones stock relativamente concentradas y diluirlas usando pipetas calibradas y matraces calibrados o al menos verificados, inmediatamente antes de su uso, las diluciones se pueden hacer también por peso, siempre y cuando se cuente en el laboratorio con una balanza que cuente con certificado de calibración que

avale un correcto funcionamiento y que cumple con las especificaciones correspondientes.

Las superficies de todo el matraz o elemento contenedor deberían enjuagarse con la solución mediante agitación por algunas horas con una porción de la solución, descartando luego dicha porción y llenándolo con una segunda porción para almacenamiento y uso. Es una buena práctica mantener siempre el mismo recipiente para la misma concentración de la misma disolución, dado que éstos están así permanentemente equilibrados.

Debería hacerse especial hincapié en las técnicas de dilución para trabajar en lo posible libre de contaminación, todas las operaciones deben ser bien ejecutadas y bien controladas para la correcta preparación de las disoluciones estándar diluidas.

4. Objetivos

→ Investigar la aplicación de diversas técnicas de análisis en flujo al análisis de la leche y sus derivados con el objetivo de automatizar total o parcialmente dichas determinaciones.

→ Diseñar y optimizar sistemas en flujo abarcando diversas técnicas, FIA, SIA y MCFA y evaluar cuál tiene mejor rendimiento según la aplicación buscada y el concepto de adecuación al uso.

→ Obtener nuevos datos sobre la composición de leche uruguaya.

→ Desarrollar y controlar mediante computador y *software* la adquisición de los datos y generar programas sencillos que permitan automatización del análisis.

→ Desarrollar y optimizar métodos rápidos y simples de preparación de muestra para leche y sus derivados (en particular leche en polvo y leche fluida).

5. Desarrollo

5.1. Determinación simultánea de cobre y zinc en leche en polvo y fórmulas infantiles utilizando diferentes técnicas de análisis en flujo

5.1.1. Antecedentes y consideraciones preliminares

La importancia de los elementos cobre y zinc para el ser humano así como la relevancia de la determinación de los niveles de los mismos en la leche ya fue discutido en las secciones 3.1.3 y 3.1.4.

Estos analitos han sido determinados utilizando diferentes técnicas analíticas en diversas matrices. En particular en leche las determinaciones se han realizado mediante Espectrometría de Absorción Atómica con llama según lo indican los métodos de referencia. Los organismos reconocidos internacionalmente que publicaron estos métodos son la Federación Internacional Láctea (IDF) y la *Association of Official Analytical Chemists*, (AOAC) (Bueno, 1996). Estos métodos también se han aplicado en trabajos publicados de investigación (Ferrer *et al.*, 2001).

La AOAC recomienda también realizar las determinaciones de cobre y zinc mediante Espectrometría de Emisión Atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) (Bueno, 1996). Las determinaciones mediante esta técnica también se reportan en publicaciones científicas utilizando tanto ICP-OES como ICP-MS (Chiao-Yu y Shiu-Jen, 2002, Nóbrega *et al.*, 1997).

Las técnicas de Absorción y Emisión Atómica si bien son rápidas implican disponer en el laboratorio de equipamiento costoso.

Existen alternativas que realizan estas determinaciones mediante espectrometría molecular visible, donde solo se requiere un espectrómetro UV-visible. Este es un instrumento mucho más económico y que en general es muy común encontrarlo en los laboratorios de análisis.

Numerosas reacciones que involucran la formación de compuestos coloreados han sido estudiadas para la determinación de cobre en diversas matrices. En general todos ellos son poco selectivos (Marczenko y Balcerzak, 2000, pp 177). En el caso del zinc no son tantas las alternativas, es difícil encontrar un reactivo selectivo para su determinación y mucho menos específico (Marczenko y Balcerzak, 2000, pp 466).

Debido a la gran cantidad de interferencias que presentan estos métodos es necesario la separación previa de cobre y zinc de la matriz para su determinación o utilizar agentes enmascarantes. Otro inconveniente es que cobre y zinc se encuentran juntos en la naturaleza y los reactivos de desarrollo de color no son selectivos. Esto lleva a que para la determinación simultánea se hayan buscado diferentes estrategias para poder determinar cobre en presencia de zinc sin que se interfieran mutuamente (Cadore, 1986, Ruedas-Rama, *et al.*, 2006).

El Análisis por Inyección en Flujo (FIA) y por Inyección Secuencial (SIA) han sido utilizados ampliamente para la determinación de metales en diversas matrices. Estas técnicas permiten además acoplar reacciones en fase sólida ya sea para la separación de los metales o para la preconcentración de los mismos (ver sección 3.2.2).

La determinación simultánea de cobre y zinc mediante técnicas de Análisis en Flujo ha sido reportada utilizando un reactivo orgánico conocido como zincón (2-carboxi-2'hidroxi-5'sulfoformacilbenceno). Los fundamentos de las reacciones entre cobre - zincón y zinc -zincón han sido desarrollados en detalle en la sección 3.3.3.1.

Esta es una reacción muy estudiada y aplicada. La determinación está basada en la variación de la estabilidad de los complejos formados por el zincón y los metales a diferentes pH y posterior detección espectrofotométrica del producto de reacción (Richter *et al.*, 1997, Shpigun *et al.*, 2006).

Recientemente se han incorporado al Análisis en Flujo nuevas estrategias que involucran la formación de los complejos metal-zincón en fase sólida (inmovilización en fase sólida). La detección del complejo se realiza en la fase sólida (*Bead Injection, Bis Fia*) (Richter *et al.*, 2002, Ruedas-Rama *et al.*, 2005).

En esta tesis se realizó la determinación simultánea de cobre y zinc utilizando un sistema FIA con y sin preconcentración en línea utilizando el reactivo zincón. El antecedente más similar es el trabajo de Richter *et al.* del año 1997, este grupo realizó la determinación simultánea de cobre y zinc en aleaciones y

aguas. No se han encontrado antecedentes de la aplicación a la determinación simultánea de estos analitos en leche.

En esta tesis también se desarrolló un sistema SIA para la determinación de zinc en leche. Los antecedentes más similares que utilizan SIA para la determinación de zinc encontrados son los trabajos de van Staden y Tlowana y Leelasattarathkul *et al.* (van Staden y Tlowara, 2002, Leelasattarathkul *et al.*, 2006). Van Staden y Tlowara no utilizan el reactivo zincón como agente complejante y su trabajo se refiere a la determinación de zinc en fertilizantes utilizando un sistema SIA. Leelasattarathkul *et al.* utilizan un sistema SIA modificado y realizan la determinación de cobre en aguas naturales y efluentes industriales.

No se han encontrado antecedentes de la aplicación de SIA a la determinación de zinc en leche de la forma que se propone en este trabajo.

5.1.2. Desarrollo de un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA)

5.1.2.1. Materiales, métodos e instrumentación

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Para la formación de complejos se utilizó sal disódica de zincón p.a para determinación espectrofotométrica de Cu y Zn. Se prepararon disoluciones patrón *stock* de 1000 mg.L⁻¹ a partir de zinc y cobre metálicos.

Se utilizó agua purificada (ASTM Tipo I), obtenida de un purificador Millipore (São Paulo, Brasil) Simplicity 185 alimentado con agua destilada en destilador de vidrio.

Las disoluciones de calibración se prepararon diariamente realizando las diluciones correspondientes a partir de la disolución *stock* de 1000 mg.L⁻¹.

El reactivo cromogénico zincón se preparó pesando 0.050 g del sólido que se disolvieron en 100 mL de NaOH 0.1 % (m/v) y posteriormente se completó a 200 mL con agua purificada (0.025 % (m/v)). La concentración de zincón fue 0.025% (m/v) para las determinaciones de zinc y 0.006 % (m/v) para las determinaciones de cobre. Este último se preparó por dilución del anterior con agua purificada (1/4).

Este reactivo se preparó diariamente y se mantuvo en recipiente de vidrio color ámbar durante la jornada de trabajo.

Se preparó una disolución *buffer* pH 9 (Clark y Lubs) con agregado de citrato que actuó como agente enmascarante. Para su preparación se agregó en un recipiente con agitación continua 21.3 mL de NaOH 0.5 mol.L⁻¹ a 50 mL de ácido bórico 0.2 mol.L⁻¹ en cloruro de potasio 0.2 mol.L⁻¹ junto con 16 g de citrato de sodio que se disolvieron en esta mezcla. Una vez disuelto el sólido se completó a 200 mL con agua purificada.

El *buffer* pH 5 también se preparó con el agregado del agente enmascarante. Se agregó en un recipiente con agitación continua ácido acético concentrado gota a gota (hasta pH final 5) a 140 mL de una disolución de acetato de sodio 0.2 mol.L⁻¹ junto con 10 g de citrato de sodio. Se completó a 200 mL con etanol 99.5 % (v/v). El pH aparente se midió con un electrodo combinado de pH conectado a un pHímetro (Corning 120). Este *buffer* se preparó con 30% de etanol debido a que el reactivo zincón precipita a pH 5 sin la presencia de etanol.

Las disoluciones para evaluar interferencias se prepararon por dilución a partir de disoluciones *stock* de 1000 mg.L⁻¹ de hierro (DILUTE-IT®, J.T. Baker), magnesio (a partir de barra metálica 99.99%, Sigma) y calcio (a partir de CaCO₃, Merck).

Todo el material de vidrio y porcelana se trató con ácido nítrico 10% (v/v), para su descontaminación y antes de usarlo se lavó exhaustivamente con agua destilada.

Para el sistema con preconcentración se construyó una columna con tubo flexible de Tygon de 0.38 mm de diámetro interno y 4 cm de largo. En los extremos se colocó lana de vidrio y se unió al sistema en flujo mediante conectores roscados. La columna se rellenó con una resina quelante comercial Chelex - 100 (BioRad®) 50-100 mesh. Para la elución se utilizó HNO_3 1 mol.L⁻¹. El pH de la muestra se ajustó con un buffer de pH 6.3 (acetato de sodio 0.5 mol.L⁻¹). Este *buffer* cumplió también la función de mantener la resina en una forma sódica a este pH.

Para el sistema en flujo se utilizó una bomba peristáltica Gilson (Villiers-le-Bel, Francia) Minipuls 2, con tubos de Tygon. Todas las conexiones y las bobinas de mezclado de tipo doble helicoidal fueron construidos con tubos de Teflon PFA de 0.8 mm de diámetro interno.

Para inyectar la muestra se utilizó una válvula Valco Cheminert de 6 puertos con actuador microeléctrico, controlada con un PC mediante un programa escrito en lenguaje QuickBasic 4.0 bajo DOS 6.0, vía un puerto serial RS232.

Para el sistema con preconcentración se utilizó una válvula Valco Cheminert de 10 puertos con actuador microeléctrico, que se controló de igual forma que la de 6 puertos.

Las medidas se realizaron con un espectrómetro UV-Vis Hewlett Packard HP 8453 a 612 nm con celda de flujo de 200 μL (1 cm de camino óptico). Este instrumento realizó la adquisición de datos que luego se procesaron utilizando planillas electrónicas *Excel* (Microsoft).

La mineralización de las muestras se realizó según el método oficial AOAC 985.35 (Bueno, 1996). Este método, basado en espectrometría de absorción atómica de llama (AAS) se tomó como método de referencia para la validación. Para las medidas se utilizó un espectrómetro de absorción atómica PerkinElmer (Norwalk, CT, USA) modelo 5000, provisto de un quemador de 10 cm (llama aire-acetileno).

Otros instrumentos utilizados fueron: balanza analítica (Precisa XB 220 A, mínima división 0.1 mg), agitador magnético (Thermolyne modelo Nuova), mufla (Atec modelo HFA10).

Método

Un único sistema en flujo permitió la determinación de Cu(II) a pH 5 (30% en etanol) dado que a ese pH solo el complejo Cu (II)-zincón es estable, y la determinación de Zn (II) a pH 9, agregando un agente enmascarante (citrato de sodio) a las disoluciones *buffer*. En la sección 3.3.3.1 se explicó el fundamento de este método con detalle y las reacciones involucradas en el mismo.

5.1.2.2. Diseño del sistema en flujo y optimización

Sistema sin preconcentración

Se diseñó un sistema FIA de 3 líneas con dos confluencias. La muestra se inyectó mediante una válvula de inyección de 6 puertos.

La longitud de onda de trabajo seleccionada fue la del máximo de absorción del complejo metal-zincón a 612 nm.

En la figura 68 se muestra un esquema del sistema construido.

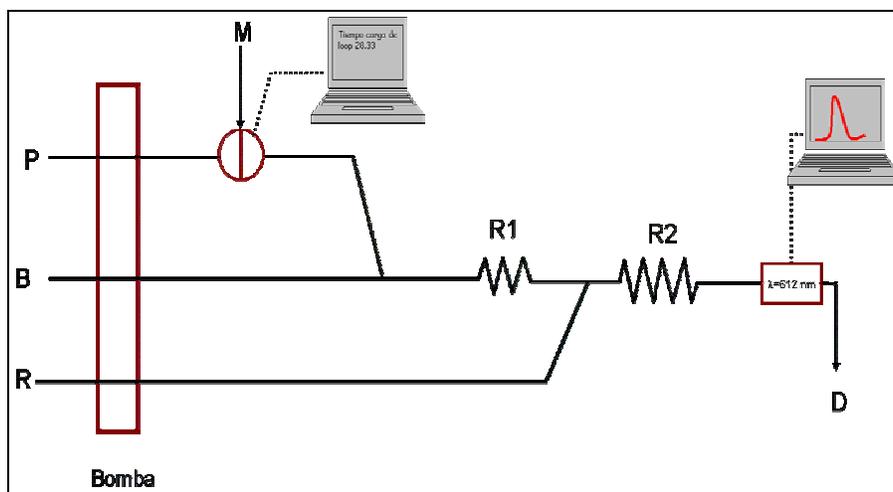


Figura 68 – Esquema del sistema FIA para determinación de cobre y zinc.

Bomba: bomba peristáltica; P: portador, agua destilada (1.4 mL/min); B: *buffer* de reacción (1.7 mL/min); R: reactivo para desarrollo de color, zincón; (1.7 mL/min); M: muestra (450 μ L); R1: bobina de mezclado helicoidal de 50 cm; R2: bobina de mezclado helicoidal de 100 cm; D: descarte.

El programa que controló la operación del sistema presentó en pantalla un menú de parámetros. En el mismo se ingresó el tiempo de carga del loop de muestra de 90 cm y el tiempo de inyección y adquisición de datos. Una vez que se completó el tiempo de carga del loop (válvula en la posición de carga) se dio la orden vía *software* para pasar a la posición de elución. Una vez que transcurrió este tiempo la secuencia comenzó de nuevo. En el menú se pudo ingresar el número de repeticiones analíticas a realizar.

Cuando se cambió de muestra o de disolución patrón se ejecutó una secuencia de “purga” también desde el software para limpieza del sistema. Esto es necesario para evitar el efecto *carry over*.

En la figura 69 se muestra una fotografía del sistema FIA. A la derecha de la foto se observa la computadora que controló la válvula de inyección y a la izquierda el espectrómetro UV-vis. Este instrumento además de ser el sistema de detección realizó la adquisición de datos. En la figura 70 se observa con más detalle el sistema en flujo.

El reactivo zincón tiene un intenso color rojo y el producto de reacción metal-zincón tiene un color violeta también intenso. Debido a esto se pudo observar visualmente como fue el proceso de mezcla en las bobinas de retención. También fue útil para seleccionar el largo de los tubos para construir el sistema. Se utilizó una bobina de mezcla de 50 cm para la mezcla del *buffer* con la muestra en la corriente de portador (agua purificada y desgaseada). Luego de la segunda confluencia fue necesaria una bobina de mayor longitud (100 cm) para el correcto mezclado del reactivo de color y la mezcla de muestra y *buffer* en la corriente de portador.



Figura 69- Fotografía del sistema automatizado para determinación de cobre y zinc.

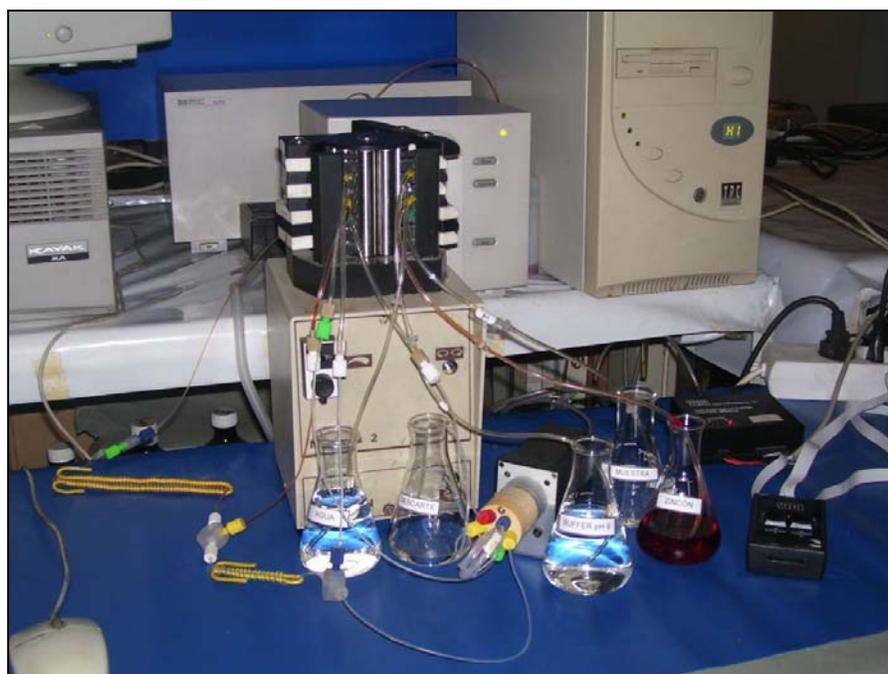


Figura 70- Fotografía del sistema FIA para determinación de cobre y zinc.

Se muestran a continuación los espectros de blancos de zincón y complejos Cu-zincón y Zn-zincón a pH 5 y 9 con y sin agente enmascarante.

Para la obtención de estos espectros se ejecutó la secuencia de análisis del sistema FIA y se detuvo el flujo en el instante en que la muestra llegó a la celda de flujo. En ese instante se obtuvo el espectro del compuesto formado contenido en la celda de flujo. Luego de obtenido el espectro se impulsó el flujo hacia el descarte.

En la figura 71 se observa el espectro de un blanco (reactivo zincón 0.025% (m/v)) y los complejos formados a partir de dos disoluciones patrón de cobre y zinc de igual concentración. Se verificó que a pH 5 el complejo Zn-zincón no fue estable. Además en la figura 71 se muestra el espectro de una disolución con agregado de Ca, Mg y Fe en concentraciones similares a las que se encuentran en la leche ("interferencias"). Se verificó que ninguno de los potenciales interferentes formó complejo estable con el reactivo zincón.

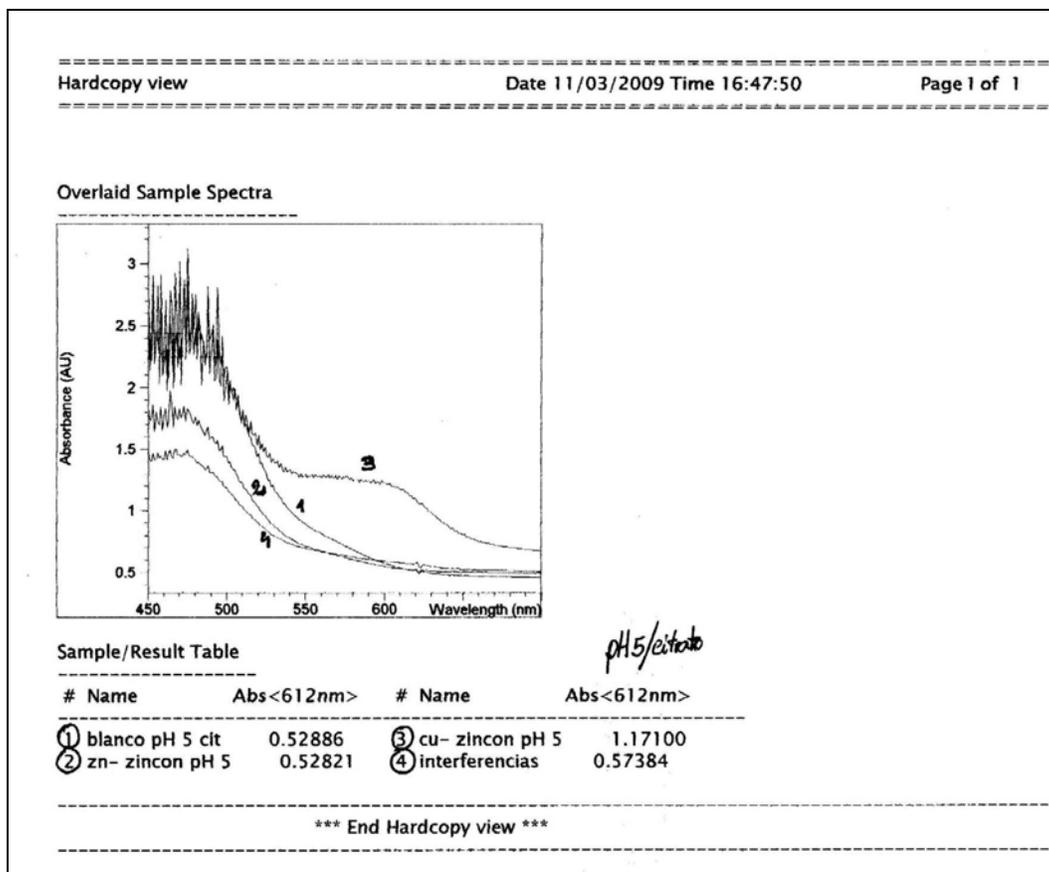


Figura 71- Espectros de blanco de reactivo zincón y complejos metal-zincón a pH 5 con citrato.

1 - Blanco de reactivo zincón a pH 5/citrato/etanol

2 - No se formó el complejo Zn-zincón a partir de una disolución de zinc 10 mg.L⁻¹ a pH 5/citrato/etanol. A 612 nm el espectro prácticamente coincidió con el del blanco.

3 - Complejo Cu-zincón formado a partir de una disolución de cobre de 10 mg.L⁻¹ a pH 5/citrato/etanol. Se observó un máximo a 612 nm característico de los complejos metal-zincón. A esta longitud de onda se pudo determinar cobre en presencia de zinc y de otros metales.

4 - No se formó ningún complejo a partir de la disolución de interferentes a pH 5/citrato/etanol. Esta disolución contuvo posibles interferentes que se encuentran en la matriz leche (Ca 1.4 g.L⁻¹, Mg 120 mg.L⁻¹, Fe 10 mg.L⁻¹).

En la figura 72 se muestran los espectros de la disolución blanco de zincón 0.025% (m/v) y de los complejos Zn-zincón y Cu-zincón a pH 9 sin agregado de citrato. La concentración de las disoluciones de Cu y Zn para ambos fue 10 mg.L⁻¹. Se observó que a 612 nm ambos complejos presentaron casi igual absorbancia.

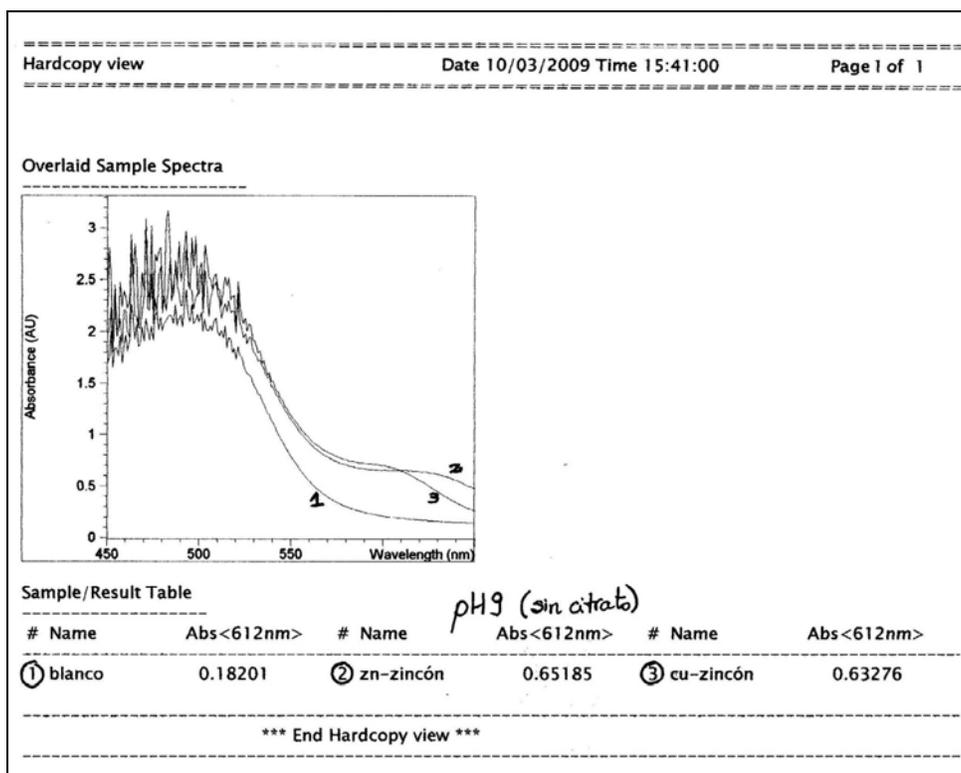


Figura 72- Espectros de blanco de reactivo zincón y complejos metal-zincón a pH 9 sin agregado de citrato.

1 - Blanco de reactivo zincón a pH 9.

2 - Complejo Zn-zincón formado a partir de una disolución de zinc de 10 mg.L^{-1} y zincón a pH 9. A 612 nm presentó casi igual absorbancia que el complejo Cu-zincón.

3 - Complejo Cu-zincón zincón formado a partir de una disolución de cobre de 10 mg.L^{-1} a pH 9. A a 612 nm presentó casi igual absorbancia que el complejo Zn-zincón.

Cabe mencionar que el espectro de la disolución "interferencias" presentó una absorbancia mayor a 2 a 612nm en estas condiciones.

En la figura 73 se muestran los espectros de los mismos compuestos que en la figura 72 pero el buffer contiene agente enmascarante, citrato.

Se observó que el complejo Cu-zincón no se formó y tampoco se formaron complejos a partir de la disolución de interferencias. El efecto del enmascarante citrato permitió la determinación de zinc en presencia de cobre y otros posibles metales interferentes a pH 9.

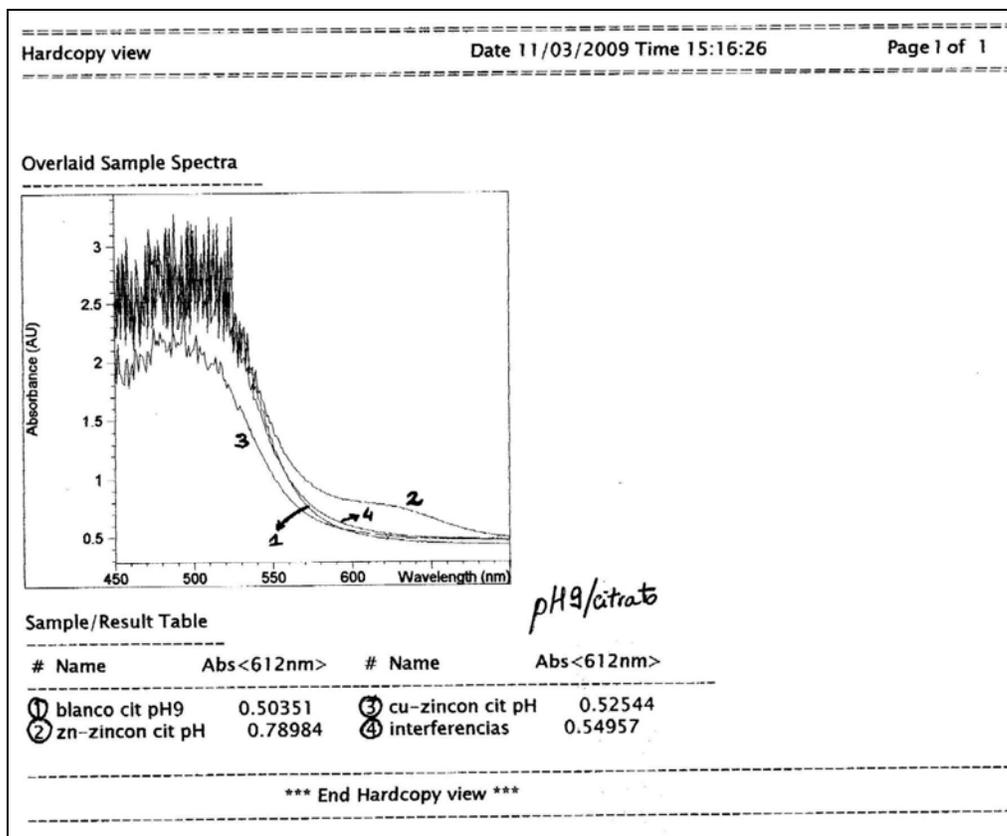


Figura 73- Espectros de blanco de reactivo zincón y complejos metal-zincón a pH 9 con con citrato.

1 - Blanco de reactivo zincón a pH 9/citrato.

2 - Complejo Zn-zincón a partir de una disolución de zinc 10 mg.L^{-1} a pH 9/citrato. A 612 nm se pudo determinar zinc en presencia de cobre y otros metales.

3 - Complejo Cu-zincón formado a partir de una disolución de cobre de 10 mg.L^{-1} a pH 9/citrato. A 612 nm presentó casi igual absorbancia que el blanco.

4 - No se formó ningún complejo a partir de la disolución de interferentes a pH 9/citrato. La misma contuvo posibles interferentes que se encuentran en la matriz leche ($\text{Ca } 1.4 \text{ g.L}^{-1}$, $\text{Mg } 120 \text{ mg.L}^{-1}$, $\text{Fe } 10 \text{ mg.L}^{-1}$).

Sistema con preconcentración

En las figuras 74 y 75 se muestra el esquema del sistema FIA diseñado con la posibilidad de realizar preconcentración en la posición carga y elución respectivamente. Se utilizó en este caso una válvula de inyección de 10 puertos.

En la figura se observa que la minicolumna se colocó entre las posiciones 9 y 6 de la válvula inyectora. La misma fue construida con tubo flexible de Tygon de 0.38 mm de diámetro interno y 4 cm de largo. Debido a que la resina utilizada presentó un cambio de volumen importante al variar el pH no se la pudo colocar dentro en un tubo rígido.

En la figura 74 se muestra un esquema que explica como se realizó la carga de la muestra. En color rojo se representa la circulación del flujo en la etapa de preconcentración. Esta etapa fue realizada durante un tiempo que determinó el volumen de muestra (carga por tiempo). El tiempo de preconcentración se ingresó en el menú del *software* desarrollado.

Mediante una confluencia se agregó un *buffer* acetato (acetato de sodio 0.5 mol.L⁻¹, pH 6.3). Este *buffer* sirvió para ajustar el pH de la muestra y para regenerar la columna. Entre muestra y muestra se hizo circular por la columna agua y *buffer* acetato, de esta manera la columna se regeneró a su forma sódica. Mientras esto ocurrió se cargó el loop de eluyente con un volumen de 450 µL de HNO₃ 1 mol.L⁻¹, línea azul. Simultáneamente circuló por el resto del sistema el portador (agua purificada), zincón 0.025% (m/v) y *buffer* pH 5 o 9 (ambos con agregado de citrato) según el analito a determinar, línea verde.

En la 75 se muestra el funcionamiento cuando se cambió válvula a la posición de inyección de muestra (elución). Este cambio de posición se realizó en forma automática una vez completado el tiempo de preconcentración ingresado en el menú. En la posición de elución la muestra y el eluyente se impulsaron junto con el portador hacia las zonas de confluencia. Allí se encontraron con el *buffer* de reacción y el reactivo de color y continuaron hacia el detector. Cabe mencionar que la elución se realizó en sentido inverso a la preconcentración (elución reversa).

El tiempo de elución y adquisición de datos se ingresó también en el menú del programa. Una vez completados los tiempos de preconcentración y elución la secuencia se repitió tantas veces como repeticiones analíticas se indicó en el menú del programa.

Luego de una inyección la resina quedó en su forma ácida por lo que debió regenerarse para la siguiente inyección. Para ello se ejecutó una secuencia de "lavado" desde el programa. Se colocó agua purificada en la posición de la muestra y se ejecutó dicha secuencia. Esto hizo circular agua y buffer acetado por la columna durante 30 s. (válvula en la posición de inyección).

Luego de esta etapa se continuó con la siguiente inyección.

Figura 74- Sistema FIA con preconcentración, posición de carga.

Figura 75 -Sistema FIA con preconcentración, posición de inyección.

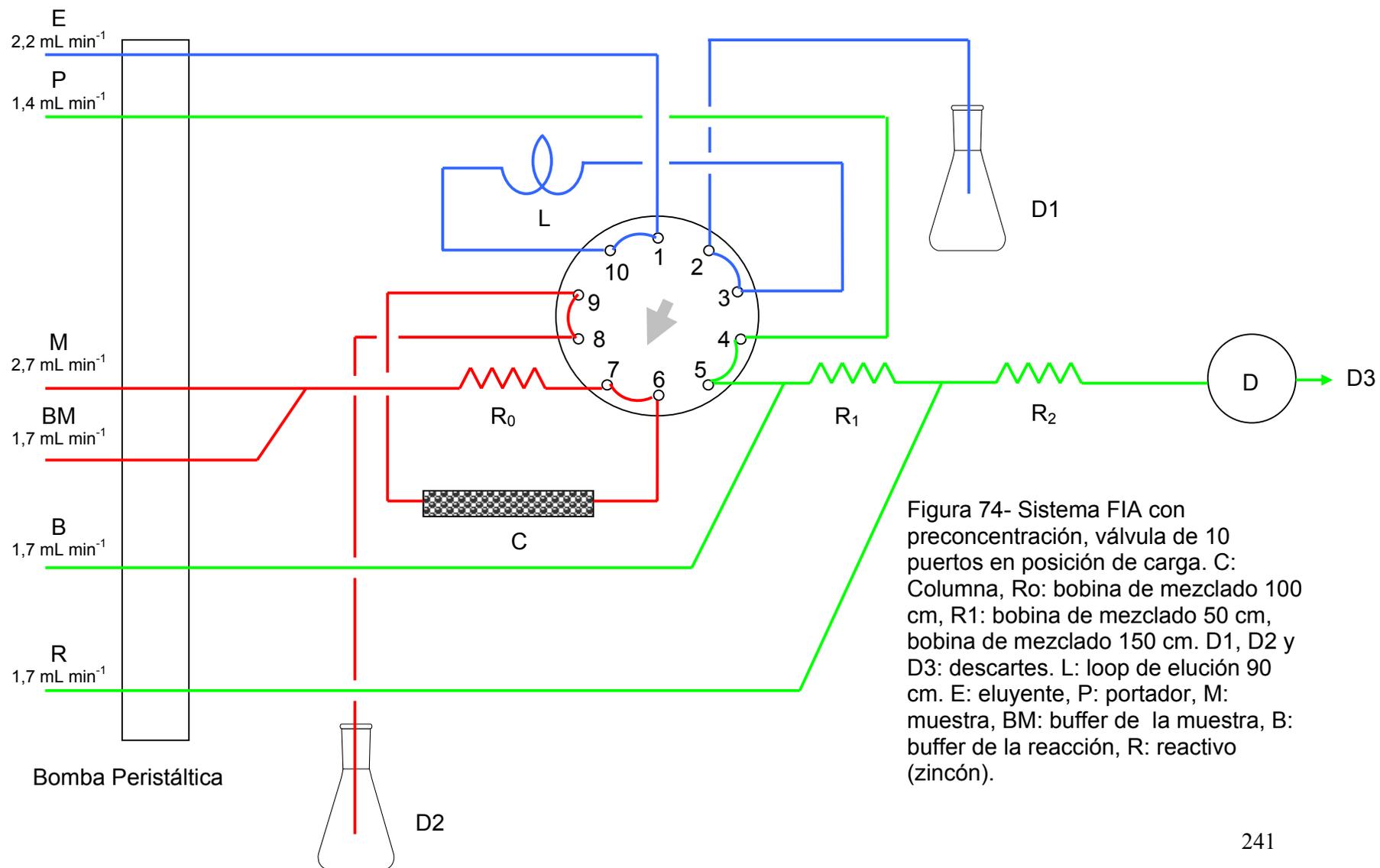
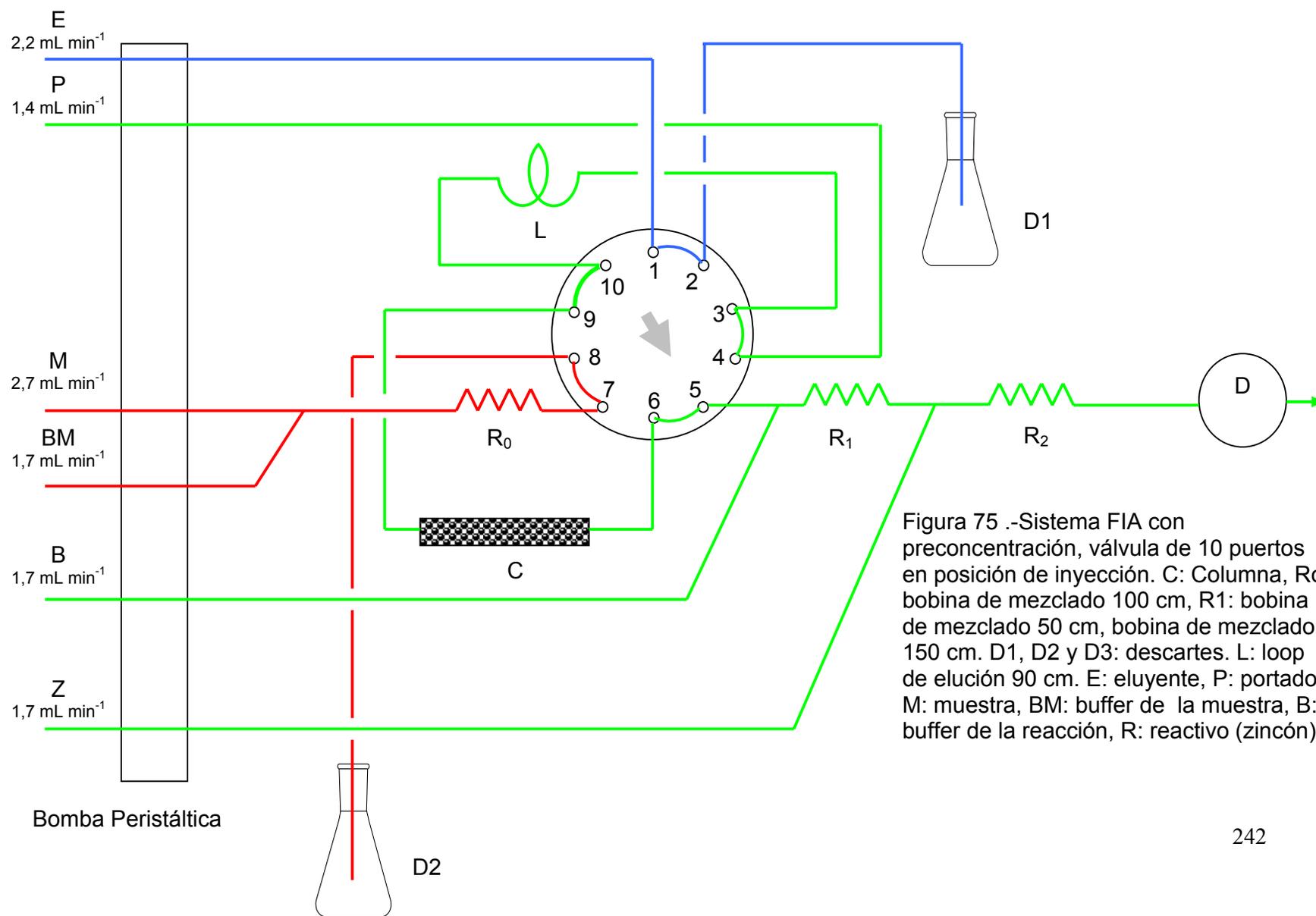


Figura 74- Sistema FIA con preconcentración, válvula de 10 puertos en posición de carga. C: Columna, R₀: bobina de mezclado 100 cm, R₁: bobina de mezclado 50 cm, bobina de mezclado 150 cm. D1, D2 y D3: descartes. L: loop de elución 90 cm. E: eluyente, P: portador, M: muestra, BM: buffer de la muestra, B: buffer de la reacción, R: reactivo (zincón).



La columna construida se rellenó con una resina quelante del tipo iminodiacetato, Chelex[®] 100, 50-100 mesh.

Esta resina tiene alta afinidad por cobre, hierro y otros metales divalentes en especial los metales de transición (BioRad, 2000).

La resina Chelex[®] 100 es un copolímero estireno divinilbenceno con iones iminodiacetato ligados que actúan como grupos quelato al unir metales polivalentes (BioRad, 2000).

Se clasifica como una resina de intercambio débilmente ácida debido a que contiene grupos ácido carboxílico. Sin embargo difiere de las resinas de intercambio comunes debido a su alta selectividad por metales.

En la figura 76 se muestran el cambio en la estructura de la resina al aumentar el pH.

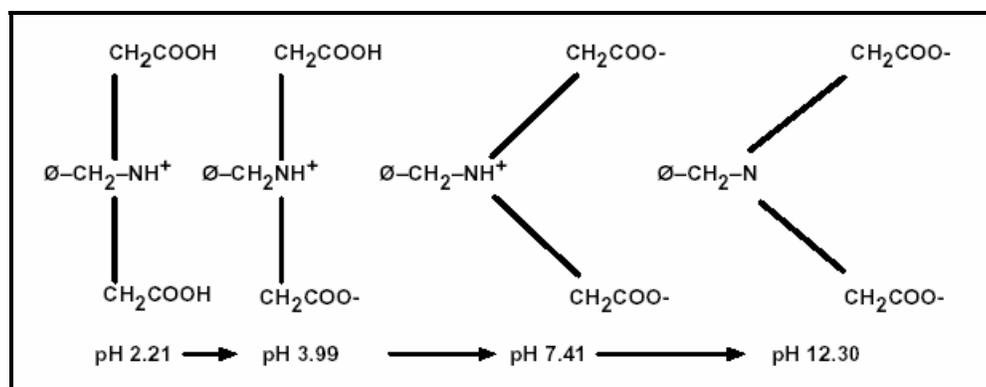


Figura 76- Variación de la estructura de la resina Chelex al aumentar el pH (Extraído de BioRad, 2000).

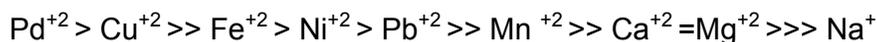
La selectividad de la resina por los metales corresponde con la que tiene el ácido iminodiacético. Se muestra en la figura 77 una lista de factores de selectividad para varios metales.

Hg⁺²	1060	Fe⁺²	0.130
Cu⁺²	126	Mn⁺²	0.024
UO⁺²	5.70	Ba⁺²	0.016
Ni⁺²	4.40	Ca⁺²	0.013
Pb⁺²	3.88	Sr⁺²	0.013
Zn⁺²	1.00	Mg⁺²	0.009
Co⁺²	0.615	Na⁺¹	0.0000001
Cd⁺²	0.390		

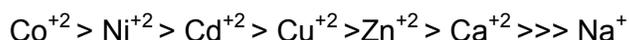
Figura 77- Selectividad para iones divalentes tomando como referencia al zinc (valor 1.00), corresponde a la selectividad de un ácido iminodiacético. (Extraído de BioRad, 2000).

La selectividad dependerá del sistema en particular del pH, fuerza iónica y presencia de otras especies que puedan formar complejos con la resina.

Selectividad para iones divalentes a pH 5 (*buffer* acetato):



Selectividad para iones divalentes a pH 9:



Se ensayaron diferentes tiempos de preconcentración y varios niveles de concentración de eluyente (HNO₃). Para cada uno de los experimentos ensayados se evaluó el factor de enriquecimiento. Ninguna de las pruebas realizadas superó el factor 4.

Condiciones de operación del sistema:

Analito	pH de reacción	Tp (min)	Citrato (mol.L ⁻¹)	Zincón % (m/v)
Cu	5	1.5	0.3	0.006
Zn	9	1.5	0.3	0.25

En estas condiciones el eluyente fue HNO₃ 1 mol.L⁻¹, Tp = tiempo de preconcentración.

Caudales de las líneas del sistema con preconcentración: portador (agua purificada), 1.4 mL/min; buffer de reacción: 1.7 mL/min; Zincón 1.7 mL/min.

La preconcentración se realizó a un caudal de 2.7 mL/min y la elución a 2.3 mL/min.

La frecuencia de muestreo en estas condiciones fue de 26 hora⁻¹.

5.1.2.3. Preparación de las muestras

La elección del método de mineralización correcto debe hacerse considerando el elemento a ser determinado, la técnica analítica a ser aplicada y la matriz. Un prerequisite para todos los procedimientos de digestión es la correcta limpieza de los recipientes de digestión y trabajar con las precauciones correspondientes como ya se explicó en la sección 3.5.

En esta sección se explica en forma general como se realizó el muestreo de leche en polvo (común, formulas infantiles y material de referencia certificado). La manipulación aquí detallada fue la misma en todos los casos en los que se trabajó con muestras sólidas en todo el trabajo experimental de esta tesis.

Las etapas de recolección, pretratamiento y descomposición de la muestra son cruciales en el proceso analítico. En lo posible es deseable el mínimo de manipulación de la muestra y trabajar en ambientes limpios para reducir el riesgo de contaminación. Todas las recomendaciones indicadas en la sección 3.5 dedicada al aseguramiento de la calidad deben tenerse en cuenta sobre todo a la hora de la determinación de trazas.

Las muestras de leche en polvo utilizadas para todo el trabajo de esta tesis fueron proporcionadas por una empresa láctea nacional. Las mismas llegaron al laboratorio en bolsas de polietileno, y se mantuvieron almacenadas en lugar seco y al resguardo de la luz. Cada muestra fue representativa de un lote de leche en

polvo de la empresa. Una vez que ingresaron en el laboratorio se les asignó un código interno para identificación.

Las fórmulas infantiles se compraron en farmacias locales, las mismas llegaron al laboratorio en su envase original. Una vez abierto el envase siempre que se retiró muestra se volvió a cerrar bien y se guardaron en lugar seco al resguardo de la luz. También se les asignó un código interno.

El muestreo es sin duda una etapa muy importante debido a que los errores que puedan cometerse en esta etapa pueden comprometer seriamente los resultados obtenidos. Sobre todo tratándose de elementos que están en bajas concentraciones como cobre y zinc y a nivel de trazas como el selenio.

Los alimentos no son homogéneos, por lo tanto el tamaño de muestra debe seleccionarse cuidadosamente a fin de obtener una muestra representativa.

En el caso de la leche en polvo y fórmulas infantiles se realizó siempre una homogeneización en bolsa plástica cerrada mediante agitación. Luego se realizó un muestreo tomando diferentes porciones al azar del total hasta formar una submuestra de unos 50 g aproximadamente. Se volvió a homogeneizar en bolsa plástica. De esta submuestra húmeda se realizaron las tomas para realizar el ensayo de humedad según el método oficial IDF 26A: 1993. Este ensayo se realizó en estufa (W.C. Heraeus Hanau), a 102 ± 2 °C, el instrumento se calificó previamente.

Se realizó la determinación de humedad a todas las muestras sólidas utilizadas para alguna determinación incluyendo el material de referencia certificado (los

datos se muestran en el Anexo I). Todos los resultados que se informan en esta tesis se expresaron en base seca a menos que se especifique lo contrario.

Los utensillos y materiales usados se descontaminaron antes de ponerse en contacto con las muestras.

Uno de los métodos más usados para la mineralización y puesta en disolución de las muestras de alimentos es la calcinación. La mineralización puede realizarse entonces por vía seca (calcinación) o por vía húmeda con agentes oxidantes.

La calcinación (vía seca) es simple, generalmente entre 2 y 10 g de muestra se colocan en un recipiente de porcelana o platino. Luego de secado preliminar, la muestra se calcina en una mufla a una temperatura de 450-500°C. Esta temperatura resulta adecuada para la mayoría de las aplicaciones. Una vez que la calcinación es completa (se observan cenizas blancas), el residuo puede disolverse en HCl o HNO₃ diluido y se lleva al volumen final que corresponda (Bueno, 1996).

Las principales ventajas de la calcinación seca radican en que ella no requiere reactivos y que puede ser aplicada a cantidades relativamente grandes de muestra. La mayor desventaja que presenta es que puede conllevar a la pérdida de ciertos elementos por volatilización, o por adsorción sobre las paredes del crisol.

Para la determinación de cobre y zinc, se calcinaron 10 g de leche en polvo en crisoles de porcelana debidamente descontaminados. La calcinación se llevó a cabo en una mufla a 550 °C durante 10 hs. El residuo se humectó con unas 10 gotas de HNO₃ concentrado y se llevó a volumen final 100 mL con agua purificada

(ASTM Tipo I). La disolución proveniente de la digestión se dividió en dos porciones. Una de ellas se destinó para la determinación según el método de referencia AOAC (Bueno, 1996) mediante espectrometría de absorción atómica de llama y la otra para la determinación utilizando el sistema FIA.

La porción utilizada para la determinación con el sistema FIA tenía un pH próximo a cero por lo que fue necesario neutralizarla antes de que ingresara al sistema.

La neutralización se llevó a cabo agregando gota a gota una disolución de NaOH 1 mol.L⁻¹ hasta alcanzar pH=6 medido con un electrodo combinado de pH conectado a un pHímetro (Corning 120).

5.1.2.4. Resultados y discusión

El sistema de preconcentración en flujo permitió explorar muchas de las dificultades que implica desarrollar un sistema de este tipo.

El factor de enriquecimiento obtenido fue 4, lo que no representó una ventaja significativa respecto al sistema FIA sin preconcentración.

La frecuencia de muestreo fue 26 hora^{-1} .

En las figuras 78, 79 y 80 se muestran algunos registros correspondientes a señales obtenidas utilizando el sistema con preconcentración

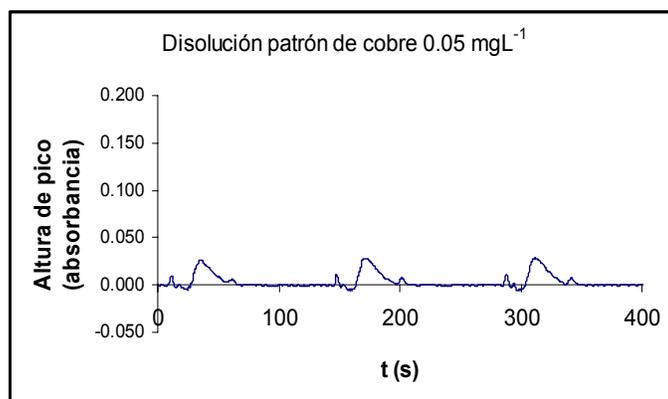


Figura 78- Registro de señales correspondientes a una disolución patrón de cobre 0.05 mgL^{-1} luego de la preconcentración.

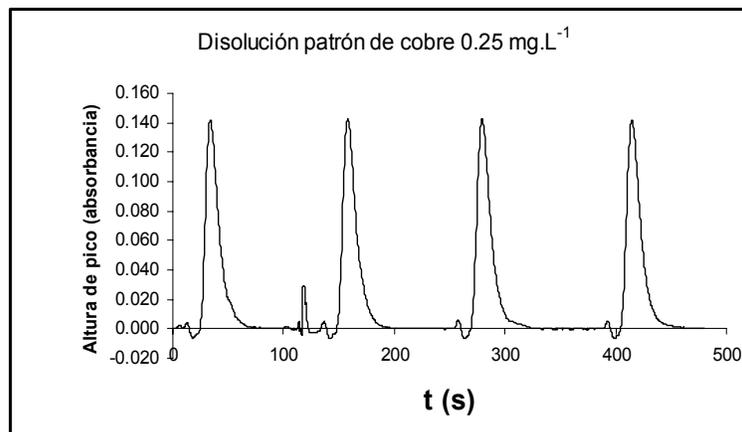


Figura 79- Registro de señales correspondientes a una disolución patrón de cobre 0.25 mgL⁻¹ luego de la preconcentración.

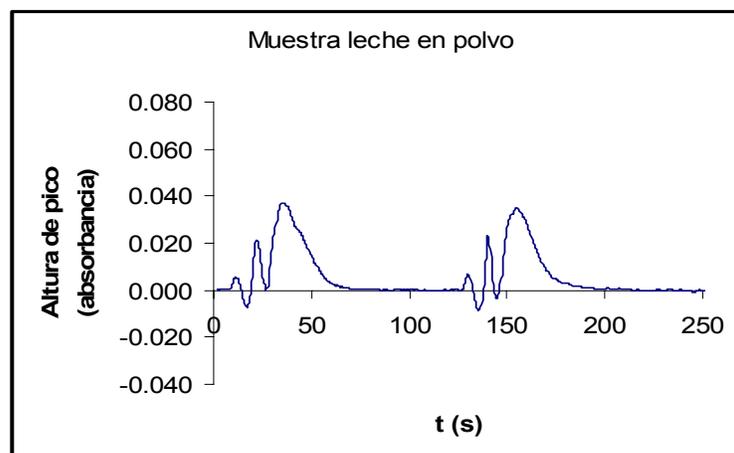


Figura 80 - Registro de señales correspondientes a una disolución digerida de leche en polvo comercial, luego de la preconcentración.

Antes de la salida del pico se observa claramente el efecto Schlieren (ver sección 3.2.3). Esto sucedió debido a la diferencia entre los índices de refracción de la muestra y el eluyente. No fue posible aumentar la concentración del eluyente pues el efecto provocó una interferencia importante, distorcionando la forma de los picos.

Los resultados obtenidos de concentración de cobre y zinc fueron más de un 20% mayor que los obtenidos por el método oficial. Esto hizo pensar que el efecto de las interferencias no se logró cancelar completamente.

El trabajo con este sistema resultó muy ejemplificante de las dificultades que presenta la preconcentración en línea.

5.1.2.4.1. Validación

Todos los conceptos explicados en la sección 3.5 se aplicaron para la validación.

La validación completa se realizó para el sistema sin preconcentración.

Para evaluar la linealidad se midió un blanco y 7 disoluciones patrón para zinc y 5 disoluciones patrón para cobre. Las disoluciones patrón se inyectaron por triplicado y las muestras por quintuplicado.

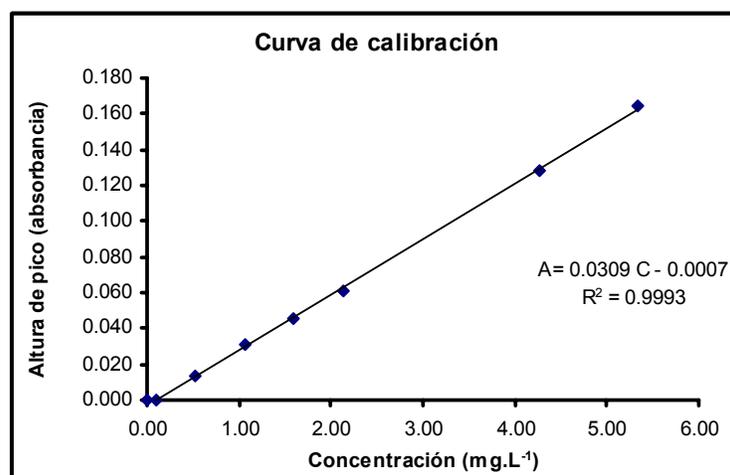


Figura 81 - Curva de calibración para la determinación de zinc a pH 9. A: altura de pico, C: concentración.

En la figura 82 se muestran registros correspondientes a medidas de algunas disoluciones patrón de zinc y muestras de leche en polvo.

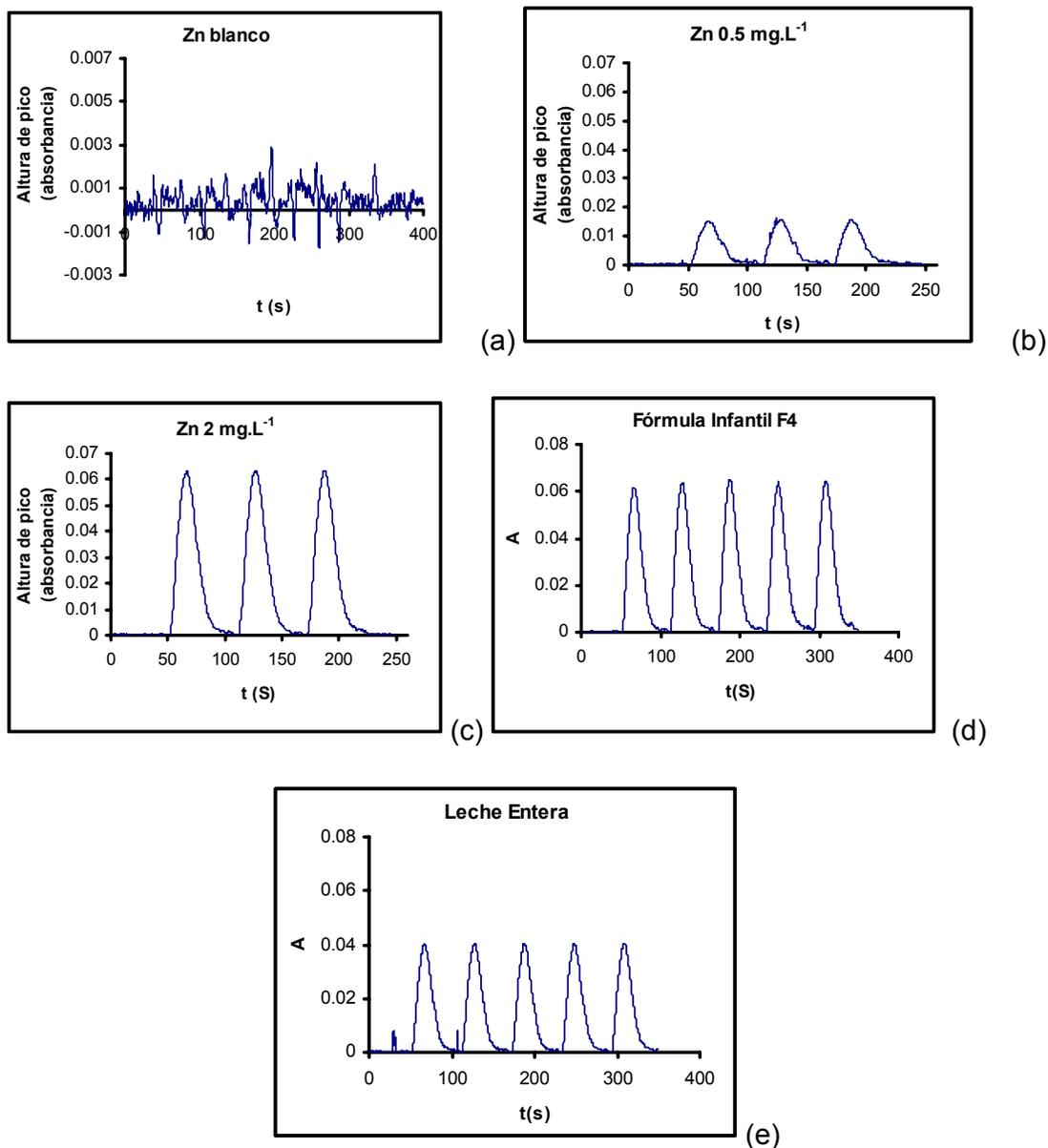


Figura 82- Registro de señales (a, b y c) patrones de zinc medidos a pH 9 en presencia de citrato, (d y e) muestras de leche en polvo.

En la figura 83 se muestra un registro correspondiente a la medida de una disolución que se preparó para evaluar el efecto de los concomitantes. Las medidas se realizaron en las condiciones de determinación de zinc.

Esta disolución contenía posibles interferentes que se encuentran en la matriz leche en el nivel de concentración que existen en las muestras de leche (hierro 10 mg.L^{-1} , magnesio 120 mg.L^{-1} y calcio 1.4 g.L^{-1}). Los datos de concentración de hierro, calcio y magnesio en leche surgen de la composición de la misma y de los valores certificados de dichos analitos en el material de referencia.

La concentración de metales presentes en esta disolución de interferentes calculada a partir de estas señales fue menor al límite de cuantificación del método. Por lo que se consideró adecuada la cantidad de agente enmascarante utilizada para las determinaciones.

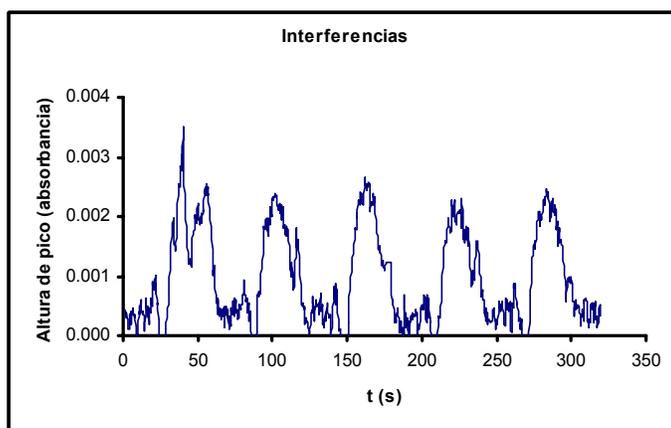


Figura 83 - Registro de señales correspondientes a una disolución con interferentes.

En la figura 84 se muestra la curva de calibración obtenida para la determinación de cobre a pH 5 y en la figura 85 algunos registros de las medidas. En particular en la figura 85 (b) se muestra las señales obtenidas para una disolución patrón de zinc de 10 mg.L^{-1} medida en las condiciones establecidas para cobre. Como puede verse estas señales no difieren de las señales de blanco. Esto confirmó del

hecho de que el complejo Zn-zincón no es estable en las condiciones de medida de cobre por lo que no generó ninguna interferencia.

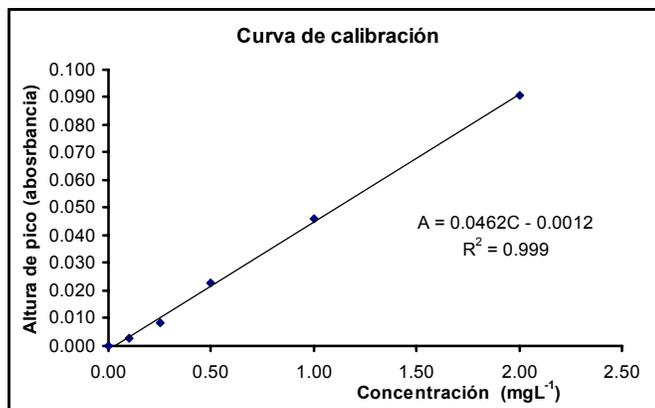


Figura 84- Curva de calibración para la determinación de cobre a pH 5 con citrato/etanol. A: altura de pico, C: concentración

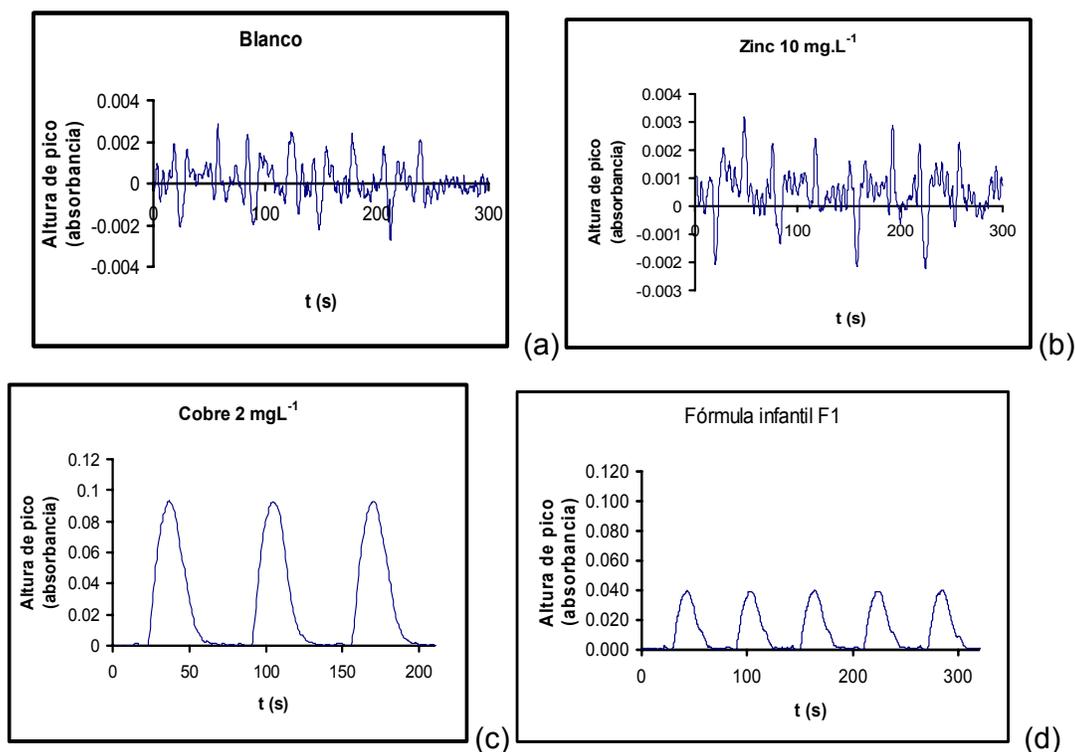


Figura 85- Registro de señales (a) blanco, (b) patrón de zinc (10 mgL⁻¹), (c) patrón de cobre (2 mgL⁻¹) y (d) muestra de leche en polvo todas las disoluciones medidas a pH 5.

La precisión instrumental se obtuvo a partir de la dispersión de inyecciones repetidas en condiciones de repetibilidad (n=5). La precisión del método se obtuvo a partir de los resultados obtenidos de 5 determinaciones independientes realizadas a cada uno de los materiales de referencia certificados.

Los límites de detección y cuantificación se estimaron a partir de la desviación estándar de las determinaciones del blanco (3s y 10s respectivamente, n=10) y refiriéndola a la curva de calibración.

5.1.2.4.2. Cifras de mérito

En la tabla 4 se muestran algunas de las cifras de mérito obtenidas en la validación.

Tabla 4 - Cifras de mérito para la determinación de cobre y zinc utilizando un sistema FIA.

Parámetro	Cobre	Zinc
Límite de Detección (mg.L^{-1}) 3σ blanco/pendiente curva de calibración (n=10)	0.010	0.032
Límite de Cuantificación (mg.L^{-1}) 10σ blanco/pendiente curva de calibración (n=10)	0.032	0.107
Rango lineal	0.03 - 2 mg.L^{-1} ($r>0.998$)	0.1 - 10 mg.L^{-1} ($r>0.998$)
Precisión sr(%)	3.1	1.8
Frecuencia de muestreo (hora^{-1})	60	60

En la tabla 5 se muestra los resultados obtenidos para 6 muestras de leche en polvo. Estas fueron representativas de fórmulas infantiles comerciales y leche en polvo entera y descremada. Se compararon los resultados obtenidos mediante el método propuesto con los obtenidos por el método oficial y se evaluó la precisión del nuevo método (se informa en la tabla 4).

Tabla 5 - Resultados de las determinaciones de cobre y zinc en muestras de leche en polvo utilizando un sistema FIA.

MUESTRA	Analito	AAS Concentración (mg/100 g)	FIA Concentración (mg/100 g)	Cociente (FIA/AAS)	sr % (n=5)
Fórmula Infantil A	Cu	0.393	0.365	0.93	2.4
	Zn	3.78	3.89	1.03	1.5
Fórmula Infantil B	Cu	0.377	0.359	0.95	3.1
	Zn	4.00	4.16	1.04	1.8
Fórmula Infantil para niños de 0 a 6 meses	Cu	0.361	0.370	1.02	1.2
	Zn	4.59	4.58	0.98	0.3
Fórmula Infantil para niños de 6 a 12 meses	Cu	0.333	0.318	0.95	2.8
	Zn	3.88	3.87	0.98	0.9
Leche en polvo descremada	Cu	0.134	0.137	1.02	1.7
	Zn	3.20	3.25	1.01	2.2
Leche en polvo entera	Cu	0.094	0.098	1.04	1.1
	Zn	2.55	2.65	1.04	0.5

En la tabla 6 se muestra el resultado de la evaluación estadística de los resultados obtenidos por ambos métodos. Se realizó el cociente entre el valor medio obtenido por el método FIA y el valor medio obtenido por el método oficial (media de 5 determinaciones independientes en ambos métodos). El resultado de ese cociente se comparó estadísticamente con el valor teórico 1 mediante una prueba de significancia “t” de *Student* (Miller y Miller, 1993, pp 38).

Tabla 6- Resultados de la evaluación de veracidad de las determinaciones de cobre y zinc en muestras de leche en polvo utilizando un sistema FIA.

Veracidad	Cobre	Zinc
$t - \text{crítico } (\alpha=0.05, 5)$	2.57	2.57
$t - \text{experimental } (\alpha=0.05)$	-0.58	1.9
$\mu_F/\mu_R = Q$, promedio (para n muestras) de los cocientes entre el valor obtenido por el método FIA y el valor obtenido por el método de referencia. $H_0: Q = 1, H_A: Q \neq 1$		

El valor de t -experimental (valor absoluto) fue menor que el valor de t -crítico por lo que se concluye que ambos métodos arrojaron resultados equivalentes.

Tabla 7 - Comparación de algunos parámetros de validación para el sistema FIA con y sin preconcentración.

Sin preconcentración		Con preconcentración	
<u>cobre</u>	<u>zinc</u>	<u>cobre</u>	<u>zinc</u>
Linealidad 0.03 - 2 mg/L ($r>0.998$)	Linealidad 0.1 - 10 mg/L ($r>0.998$)	Linealidad 0.03 - 0.25 mg/L ($r>0.99$)	Linealidad 0.1 - 1 mg/L ($r>0.995$)
s_r (%), n=5 3.1	s_r (%), n=5 1.5	s_r (%), n=5 4.4	s_r (%), n=5 4.2

Nota del autor:

Los resultados obtenidos del diseño y validación del sistema en flujo FIA para la determinación de cobre y zinc en leche en polvo y fórmulas infantiles fueron difundidos según se detalla a continuación:

- “Determinación simultánea de cobre y zinc en leche en polvo y Fórmulas Infantiles mediante un sistema por inyección en flujo.” II Congreso Iberoamericano y IV Congreso Argentino de Química Analítica, realizado del 27 al 30 de agosto de 2007 en Buenos Aires, Argentina (se presentó un póster).

Las constancias correspondientes aparecen en el Anexo II.

5.1.2.5. Conclusiones

El sistema FIA desarrollado fue adecuado para la determinación simultánea de cobre y zinc en muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles. El mismo arrojó resultados equivalentes al método de referencia con mayor productividad. Por lo tanto puede proponerse como método alternativo al método AOAC.

Para la determinación de cobre y zinc en leche en polvo y fórmulas infantiles no fue necesario realizar pre-concentración ya que una cantidad razonable de muestra preparada contenía niveles cuantificables de ambos analitos.

El sistema FIA con preconcentración logró factores de enriquecimiento de 4 para cobre y zinc lo cual es adecuado para proponer la determinación de estos analitos en leche fluida como continuación a este trabajo. Sin embargo es un factor pobre comparado con lo reportado en la literatura. Algunos autores reportan que con sistemas similares lograron disminuir el límite de detección 100 veces (Richter *et al.*, 1997). Este es un desafío interesante para continuar el trabajo.

El sistema en flujo automatizado resultó más económico que el método oficial. Esto es debido a que utilizó equipos más baratos que un espectrómetro de absorción atómica y los costos de mantenimiento fueron menores. Sin duda la puesta en funcionamiento de un sistema en flujo como el que se propone tiene una inversión inicial importante, pero los beneficios de la automatización a corto plazo pueden amortizar dicha inversión.

5.1.3. Desarrollo de un sistema por Inyección Secuencial en Flujo (SIA)

5.1.3.1. Materiales, métodos e instrumentación

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Para la formación de complejos se utilizó sal disódica de zincón p.a para determinación espectrofotométrica de Cu y Zn. Se prepararon disoluciones patrón *stock* de 1000 mg.L⁻¹ a partir de zinc y cobre metálicos. Se utilizó agua purificada (ASTM Tipo I), obtenida de un purificador Millipore (São Paulo, Brasil) Simplicity 185 alimentado con agua destilada en destilador de vidrio.

Las disoluciones de calibración se prepararon diariamente realizando las diluciones correspondientes a partir de la disolución *stock* de 1000 mg.L⁻¹.

El reactivo cromogénico zincón se preparó pesando 0.050 g del sólido que se disolvieron en 100 mL de NaOH 0.1 % (m/v) y posteriormente se completó a 200 mL con agua purificada (0.025 % (m/v)). Este reactivo se preparó diariamente y se guardó en frasco de vidrio ámbar durante la jornada de trabajo.

Se preparó una disolución *buffer* pH 9 (Clark y Lubs) con agregado de citrato que actuó como agente enmascarante. Para su preparación se agregó en un recipiente con agitación continua 21.3 mL de NaOH 0.5 mol.L⁻¹ a 50 mL de ácido bórico 0.2 mol.L⁻¹ en cloruro de potasio 0.2 mol.L⁻¹ junto con 8 g de citrato de sodio que se disolvieron en esta mezcla. Una vez disuelto el sólido se completó a 200 mL con agua purificada.

El *buffer* pH 5 también se preparó con el agregado del agente enmascarante. Este se preparó agregando en un recipiente con agitación continua ácido acético concentrado gota a gota (hasta pH final 5) a 140 mL una disolución de acetato de sodio 0.2 mol.L^{-1} junto con 10 g de citrato de sodio. Se completó a 200 mL con etanol 99.5% (v/v). El pH se midió con un electrodo combinado de pH conectado a un pHímetro (Corning 120). Este *buffer* se preparó con 30% de etanol. Sin el agregado de etanol el reactivo zincón precipitó dentro de los tubos del sistema cuando se realizaron las determinaciones de cobre a pH 5.

Las disoluciones para evaluar interferencias se prepararon por dilución a partir de disoluciones *stock* de 1000 mg.L^{-1} de hierro (DILUTE-IT®, J.T. Baker), magnesio (a partir de barra metálica 99.99%, Sigma) y calcio (a partir de CaCO_3 , Merck).

Todo el material de vidrio y porcelana se trató con ácido nítrico 10% (v/v), para su descontaminación y antes de usarlo se lavó exhaustivamente con agua destilada.

Para el sistema SIA se utilizó una bomba de jeringa controlada por microprocesador (Cavro, Sunnyvale, CA, USA, modelo XP-3000), con un contenedor de 2.5 mL (capacidad de la jeringa). Se utilizó además una válvula selectora Valco Cheminert (Houston, TX, USA) de 10 puertos con actuador microeléctrico.

Las medidas se realizaron con un espectrómetro visible Beckman B con celda de flujo de $80 \mu\text{L}$ (1 cm de camino óptico). El mismo estaba dotado de electrónica

modificada y de una salida analógica (3V a plena escala) proporcional a la intensidad luminosa detectada. Por este motivo en el programa desarrollado se previó el ajuste de 0%T (corriente oscura) y el de 100%T que se realizó al comienzo del trabajo.

Todas las conexiones y las bobinas de mezclado de tipo doble helicoidal fueron construidos con tubos de Teflon PFA de 0.8 mm de diámetro interno.

Se realizó el control del sistema y la adquisición de datos con un PC (Pentium III-600 MHz) con dos puertos seriales y dotado de una interfase analógica-digital (A/D) de 12 bits (Measurement Computing CIO-DAS08Jr) y un programa compilado en Visual Basic 6.

El programa permitió controlar la bomba de jeringa y la válvula selectora mediante los puertos seriales RS232 y capturó los datos analógicos provenientes del espectrofotómetro. Estos datos fueron escalados, transformados en absorbancia y mostrados en pantalla en tiempo real. Los datos se guardaron en archivos de formato ASCII en el disco duro.

Para el procesamiento de datos se utilizó el programa *Peak Simple* (SRI, Torrance, CA, USA) (medida de altura de pico, suavizado, corrección de línea de base). Se imprimió un reporte impreso en cada jornada de trabajo.

La mineralización de las muestras se realizó según el método oficial AOAC 985.35 (Bueno, 1996). Este método, basado en espectrometría de absorción atómica de llama (AAS) se tomó como método de referencia para la validación.

Para las medidas se utilizó un espectrómetro de absorción atómica PerkinElmer (Norwalk, CT, USA) modelo 5000, provisto de un quemador de 10 cm (llama aire-acetileno).

Otros instrumentos utilizados fueron: balanza analítica (Precisa XB 220 A, mínima división 0.1 mg), agitador magnético (Thermolyne modelo Nuova), mufla (Atec modelo HFA10).

La figura 87 muestra la impresión de pantalla del software desarrollado para la adquisición de datos.

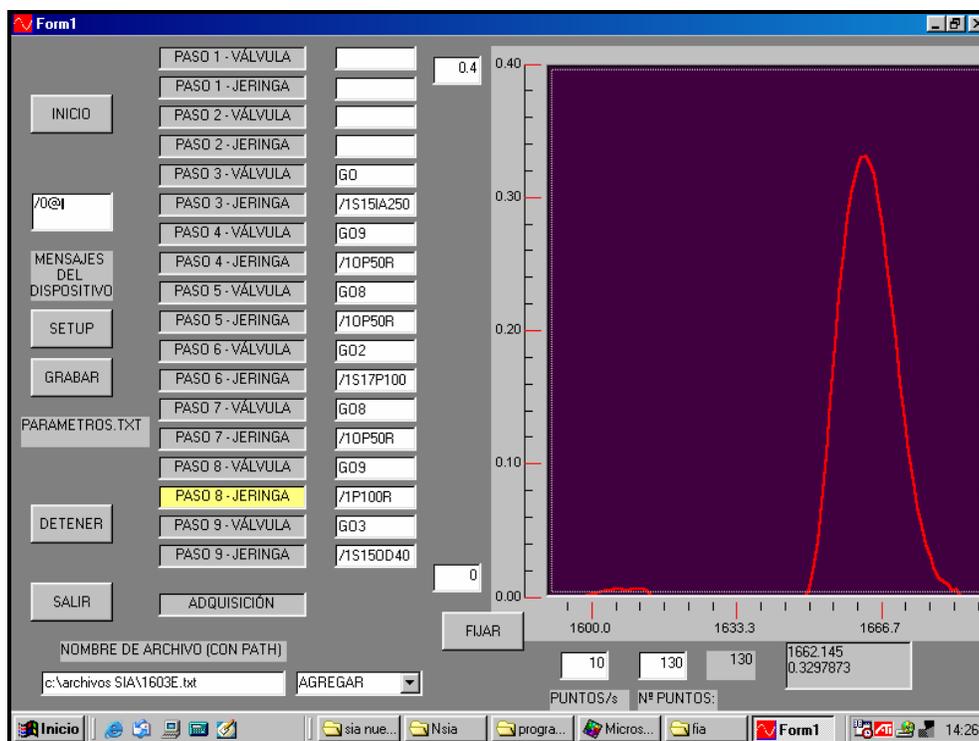


Figura 87 – Vista de impresión de pantalla del programa para ejecución de la secuencia de análisis, adquisición de datos y registro para determinación de zinc.

En la figura 88 se muestra una fotografía de la bomba de jeringa cargada y lista para impulsar el contenido de la bobina de retención hacia el sistema de detección.

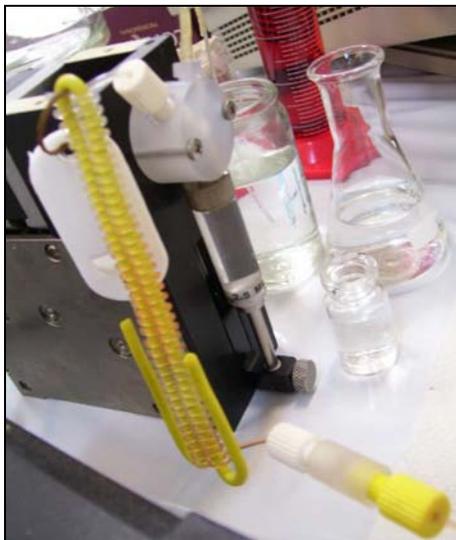


Figura 88- Fotografía de parte del sistema en funcionamiento.

Las determinaciones se realizaron a 612 nm según lo ya establecido cuando se utilizó el sistema en flujo FIA.

La concentración de la disolución de zincón continuó siendo misma que resultó adecuada cuando se trabajó con el sistema FIA.

Se estudiaron varias secuencias para la determinación de zinc. Todas ellas basadas en la estrategia de armar un “*sandwich*” con la muestra, o sea encerrarla entre segmentos de reactivo y *buffer* en este caso. Los fundamentos del funcionamiento de un sistema en flujo SIA fueron explicados en detalle en la sección 3.2.5.

Tomando como punto de partida las condiciones óptimas obtenidas para el sistema FIA y las consideraciones teóricas se ensayaron varias secuencias.

El criterio para decidir cuál de ellas era más adecuada fue evaluar la forma de pico, la sensibilidad y la precisión instrumental en condiciones de repetibilidad.

La secuencia que presentó mejor desempeño fue la que se detalla a continuación:

Paso 1: Se aspiró agua (portador) hacia el contenedor de la bomba de jeringa, 2.1 mL.

Paso 2: Se aspiró reactivo (zincón) hacia la bobina de retención, 40 μ L.

Paso 3: Se aspiró *buffer* pH 9 hacia la bobina de retención, 40 μ L.

Paso 4: Se aspiró muestra hacia la bobina de retención, 80 μ L.

Paso 5: Se aspiró *buffer* pH 9 hacia la bobina de retención, 40 μ L.

Paso 6: Se aspiró reactivo (zincón) la bobina de retención, 40 μ L.

Paso 7: Se invirtió la dirección de flujo y el contenido de la bobina de retención avanzó una distancia equivalente a desplazar 0.3 mL con la bomba de jeringa. A continuación retrocedió la misma distancia, esto se repitió 3 veces (mezclado por avance y retroceso del flujo).

Paso 8: Se invirtió la dirección de flujo y se dispensó el contenido de la bobina de retención (HC), hacia el sistema de detección a través de una bobina de mezclado (R1) impulsado por el portador.

De esta manera en la bobina de retención se tenían los siguientes segmentos:



En la figura 89 se puede observar la disposición tipo “*sandwich*” de la muestra mezclada con *buffer* rodeada del reactivo de desarrollo de color.



Figura 89- Disposición tipo “sandwich” en la reacción de zinc con zincón.

Se probaron otras secuencias aumentando el tamaño de la muestra. Esta variación se tradujo en señales con dobles y triples picos. Esto no pudo mejorarse aún aumentando el tamaño de las bobinas para favorecer el mezclado.

Aumentar el volumen de *buffer* o reactivo generó señales de blanco muy altas y con picos de forma irregular incluso desdoblados.

Una vez que se decidió trabajar con la secuencia descrita se evaluó la influencia de otras variables.

Se estudió la influencia del pH y la concentración de citrato que se le agregó al *buffer* en su preparación. Para ello se realizó un experimento multivariante del tipo central compuesto de 5 niveles y dos variables (Massart *et al.*, 1997, pp 711).

En las figuras 90 y 91 se muestra la representación gráfica mediante superficies de respuesta del experimento. En la figura 90 se graficó la influencia del pH y concentración de citrato expresada en mol.L⁻¹ en función de la sensibilidad. Se buscó el valor óptimo de pH y concentración de citrato con máxima sensibilidad.

En la figura 91 se muestra la superficie de respuesta para las mismas variables

pero usando la precisión instrumental como variable dependiente. Se consideró óptimo aquél valor que presentó mínima dispersión (s_r , %).

Teniendo en cuenta ambos criterios las coordenadas óptimas fueron: pH 9 y concentración de citrato 0.1 mol.L^{-1} .

Cuando las curvas de calibración se realizaron sin agregado de citrato al *buffer* la sensibilidad aumentó. Sin embargo el efecto de las interferencias que presentó la matriz debido a la presencia de cobre y otros metales no se canceló. Como se demostró en la sección 5.1 la utilización de citrato como agente enmascarante fue imprescindible.

Se verificó que, trabajando en las condiciones óptimas, la misma disolución de interferentes que se preparó para la validación del sistema FIA produjo señales a nivel de las del blanco.

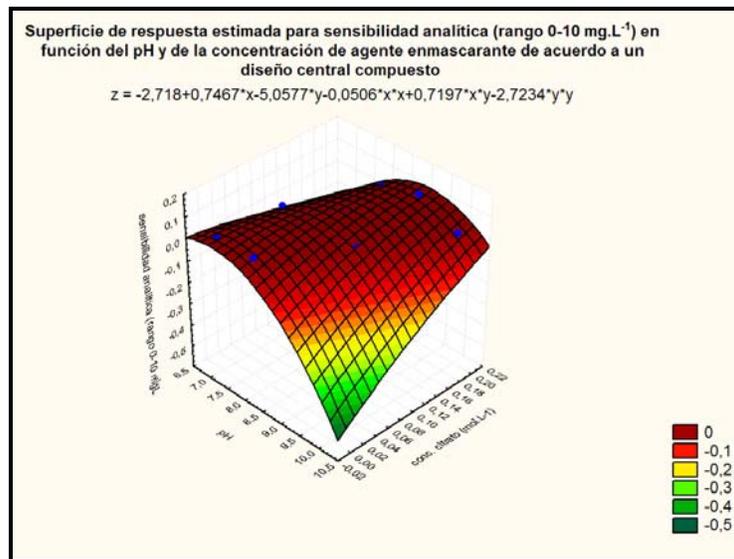


Figura 90- Superficie de respuesta para sensibilidad en función de pH-concentración de citrato.

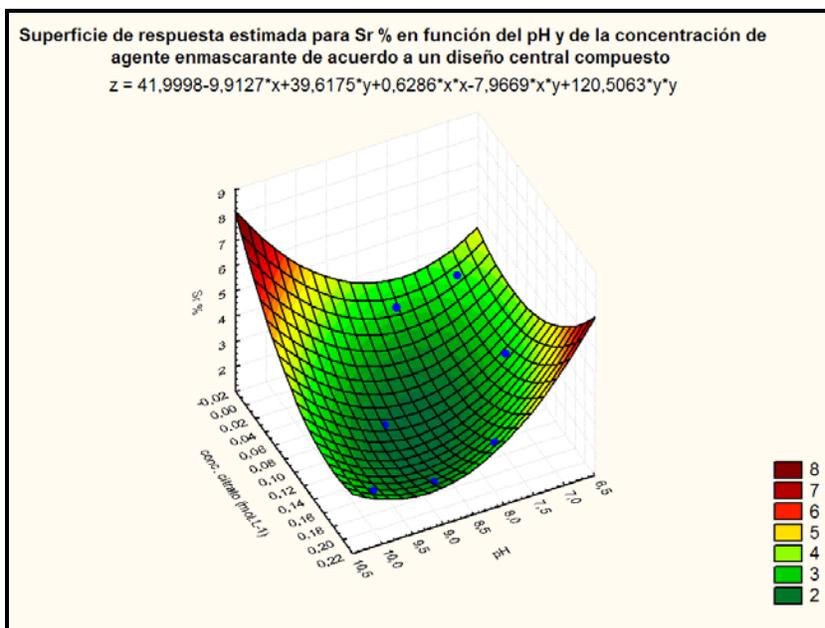


Figura 91- Superficie de respuesta para s_r (%) en función de pH-concentración de citrato.

También se estudió la influencia del tamaño de las bobinas de retención y mezclado. Se evaluó la altura y forma de pico del blanco y de un patrón de zinc de 4 mg.L^{-1} . La concentración de este patrón coincidió aproximadamente con el punto medio del rango lineal. La forma de pico se consideró aceptable cuando no se observó deformado o desdoblado en doble pico

La mayor altura de pico del patrón con una señal de blanco aceptable y con adecuada forma de pico se obtuvo cuando se utilizó una bobina de retención de 100 cm y una de mezclado de 150 cm. Los resultados se muestran en la 8.

Tabla 8- Estudio de la influencia del tamaño de las bobinas de retención y mezclado.

Bobina de retención (HC: cm)	Bobina de mezclado (R1: cm)	altura de pico del blanco	altura de pico de un patrón de 4 mg.L ⁻¹
100	150	0.074	0.159
100	50	0.081	0.147
100	100	0.084	0.155
100	200	0.062	0.089
100	25	0.100	0.133
100	250	0.060	0.072
150	200	0.062	0.091
150	100	0.055	0.092
150	150	0.067	0.135
150	50	0.076	0.140
150	25	0.086	0.145
150	250	0.070	0.083

Una vez que se encontraron las condiciones óptimas del sistema para la determinación de zinc se intentó determinar cobre. Para ello se cambió el *buffer* pH 9 por el *buffer* pH 5 (con citrato 0.15 mol.L⁻¹ y etanol) medio en el que el complejo cobre-zincón demostró ser estable. Pero como se comentó anteriormente los límites de detección y cuantificación no fueron aceptables para la aplicación propuesta.

5.1.3.3. Preparación de las muestras

Las muestras utilizadas para estas determinaciones fueron dos materiales de referencia certificados. Ambos fueron representativos la matriz leche en polvo y fórmula infantil de base láctea, NIST 1549, Non-Fat Milk Powder y NIST 1846 Infant Formula respectivamente.

El contenido informado en el certificado del material referencia de cobre y zinc fue:

NIST 1549 - Non-Fat Milk Powder		NIST 1846 - Infant Formula	
cobre (mg.kg ⁻¹)	zinc (mg.kg ⁻¹)	cobre (mg.kg ⁻¹)	zinc (mg.kg ⁻¹)
0.7±0.1	46.1±2.2	5.04±0.27	60.0±3.2

El muestreo y almacenamiento ya fue discutido en la sección 5.1.1.4. Según se indica en los certificados de los materiales de referencia, la mínima porción de muestra que debe tomarse para garantizar la homogeneidad y representatividad es 0.50 g para la leche descremada y 0.25 g para la fórmula infantil.

La mineralización por calcinación fue realizada según se explicó en la sección 5.1.1.4., excepto por la cantidad de muestra que en este caso fue de 2.5 g pesados exactamente.

Luego de la mineralización, las cenizas fueron humectadas con 5 gotas de HNO₃ y 2 mL de agua destilada y trasvasadas cuantitativamente a un matraz de 25 mL, se completó a volumen con agua purificada (ASTM Tipo I).

Los 25 mL de digesto fueron divididos en dos porciones, una para la determinación de zinc mediante el método de referencia AOAC (Bueno, 1996), y otro para realizar la determinación utilizando el sistema SIA.

La porción de muestra que se destinó para la determinación empleando el sistema SIA no necesitó ser neutralizada.

5.1.3.4. Resultados y discusión

Todos los conceptos explicados en la sección 3.5 se aplicaron para la validación.

Se realizó la validación completa para la determinación de zinc en muestras de leche en polvo y fórmulas infantiles.

5.1.3.4.1. Validación

Para evaluar la linealidad se midió un blanco y 6 disoluciones patrón en el rango de 1-10 mg.L⁻¹ (n=5). La representación gráfica se muestra en la figura 92.

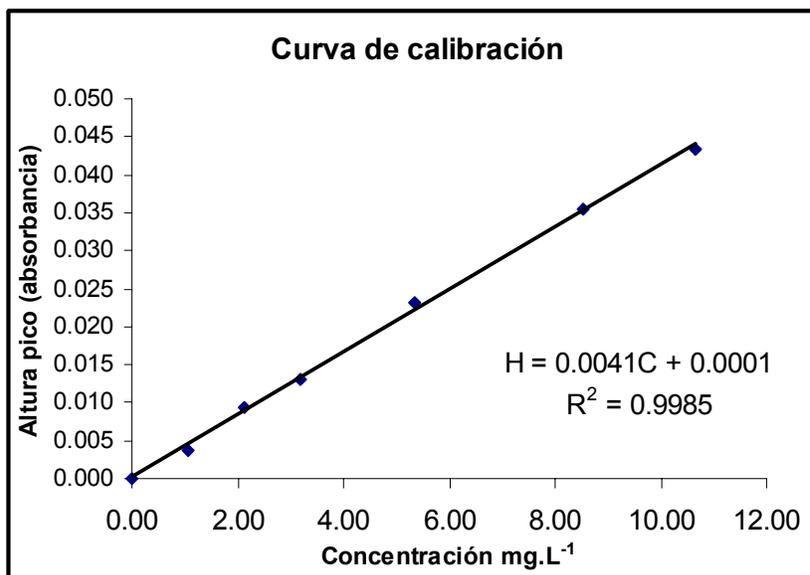


Figura 92- Curva de calibración para la determinación de zinc utilizando un sistema SIA. H: altura de pico, C: concentración.

En la figura 93 se muestra el registro de señales correspondientes a la curva de calibración hasta 3 mg.L⁻¹ y dos disoluciones con probables interferentes. La disolución de interferentes fue la misma que se preparó para evaluar interferentes en el sistema FIA. La misma contuvo Ca, Fe y Mg en concentraciones similares a las que se encuentran en la matriz leche. La disolución de cobre 2 mg.L⁻¹ se midió para verificar que dicho analito tampoco interfería en las medidas. Se observa en la figura 93 que ambas disoluciones arrojaron valores de altura de pico comparable con el blanco.

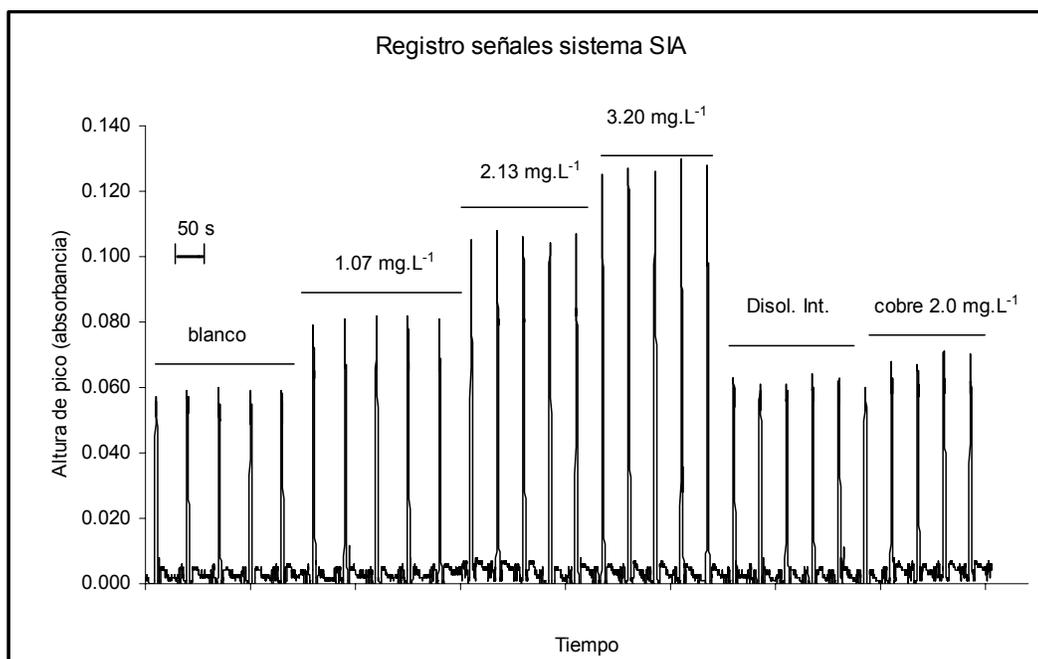


Figura 93- Curva de calibración para la determinación de zinc utilizando un sistema SIA, señales analíticas.

La recta de mejor ajuste surgió de tratamientos estadísticos y de la aplicación de un test de hipótesis (*lack of fit*). Los criterios aplicados ya fueron desarrollados en la sección 3.5.

La precisión instrumental se obtuvo a partir de la dispersión de inyecciones repetidas en condiciones de repetibilidad (sr%, n=5). La precisión del método se obtuvo a partir de los resultados obtenidos de 5 determinaciones independientes realizadas a cada uno de los materiales de referencia certificados.

Los límites de detección y cuantificación se estimaron a partir de la desviación estándar de las determinaciones del blanco (3s y 10s respectivamente, n=10) y refiriéndola a la curva de calibración.

Se estudió el posible efecto de interferencias producidas por la reacción de otros metales presentes en altas concentraciones en la matriz leche con zincón. El resultado indicó que en las condiciones optimizadas utilizando el agente enmascarante citrato no existen interferencias.

5.1.3.4.2. Cifras de mérito

En la tabla 9 se resumen los resultados de los parámetros de validación.

Tabla 9 – Resultados de la validación para la determinación de zinc utilizando un sistema SIA.

Parámetro	Resultado
Límite de detección en disolución (3σ .blanco/pendiente) (n=10)	0.130 mg.L ⁻¹
Límite de cuantificación en disolución (10σ .blanco/pendiente) (n=10)	0.433 mg.L ⁻¹
Rango lineal (mg.L ⁻¹)	0.4-10 ($r > 0.998$)
Frecuencia de muestreo (hora ⁻¹)	75
Precisión (s_r %)	<5
Precisión instrumental (s_r %)	<5
Consumo de muestra (mL)	0.10
Consumo de reactivos (zincón y <i>buffer</i>) (mL) determinación	0.2

Para evaluar la veracidad de la determinación en las matrices leche en polvo y fórmulas infantiles, los resultados obtenidos utilizando la técnica SIA fueron comparados con los obtenidos realizando el método de referencia AOAC.

Para ello se utilizó material de referencia certificado, NIST-1549 Non-fat milk powder y NIST-1846 Infant Formula.

Al nivel de confianza 95% (n=6 para NIST 1549 y n=5 para NIST 1846), se realizó una prueba de significación *t* según se explicó en la sección 3.5. Se realizó el cociente entre los valores obtenidos por el método SIA y el método oficial. El valor de dicho cociente se comparó estadísticamente con el valor teórico 1. Por otro lado se compararon los valores obtenidos de determinaciones independientes

utilizando SIA y el valor certificado de los materiales de referencia. El resultado de la prueba indicó que los resultados obtenidos por el método en flujo no difieren significativamente del obtenido utilizando el método de referencia ni del valor certificado. Las tablas 10, 11 y 12 muestran los resultados obtenidos.

Tabla 10- Evaluación de veracidad (NIST 1549).

Material de referencia leche descremada (NIST 1549 - Non-Fat Milk Powder)			
%humedad n=6		3.85	
Concentración calculada - SIA (mg/100g)	Concentración calculada AAS (mg/100g)	Cociente SIA/AAS	% R (aparente) SIA
4.447	4.417	1.01	96.5
4.812	4.679	1.03	104.4
4.728	4.652	1.02	102.6
4.671	4.726	0.99	101.3
5.031	4.819	1.04	109.1
4.588	4.570	1.00	99.5
sr (%) SIA	sr (%) AAS	Valor certificado: 4.61 ± 0.22 mg/100g	
4.23	2.98		

Tabla 11- Evaluación de veracidad (NIST 1846).

Material de referencia Fórmula Infantil (NIST 1846 - Infant Formula)			
%humedad n=5		1.59	
Concentración calculada - SIA (mg/100g)	Concentración calculada AAS (mg/100g)	Cociente SIA/AAS	% R (aparente) SIA
6.12	6.25	0.98	102.0
5.92	6.01	0.99	98.7
5.90	6.39	0.92	98.3
6.22	6.70	0.93	103.7
5.66	5.58	1.01	94.3
sr (%) SIA	sr (%) AAS	Valor certificado: 6.0 ± 0.32 mg/100g	
3.67	6.79		

Tabla 12 - Evaluación estadística de veracidad.

Veracidad					
Material de referencia leche descremada			Material de referencia fórmula infantil		
$t - \text{crítico}$ ($\alpha=0.05, 5$)	2.57	$ t \text{ exp} < t$ crítico los resultados obtenidos por ambas técnicas son equivalentes	$t - \text{crítico}$ ($\alpha=0.05, 4$)	2.78	$ t \text{ exp} < t$ crítico los resultados obtenidos por ambas técnicas son equivalentes
$t - \text{experimental}$ ($\alpha=0.05$)	1.83		$t - \text{experimental}$ ($\alpha=0.05$)	-1.96	
$\mu_{\text{SIA}}/\mu_{\text{R}} = Q$ cociente (para n muestras) entre el valor obtenido por el método SIA y el valor obtenido por el método de referencia. $H_0: Q = 1, H_A: Q \neq 1$			$\mu_{\text{SIA}}/\mu_{\text{R}} = Q$ cociente (para n muestras) entre el valor obtenido por el método SIA y el valor obtenido por el método de referencia. $H_0: Q = 1, H_A: Q \neq 1$		
Material de referencia leche descremada			Material de referencia fórmula infantil		
$t - \text{crítico}$ ($\alpha=0.05, 5$)	2.57	$ t \text{ exp} < t$ crítico ambos valores son equivalentes	$t - \text{crítico}$ ($\alpha=0.05, 4$)	2.78	$ t \text{ exp} < t$ crítico ambos valores son equivalentes
$t - \text{experimental}$ ($\alpha=0.05$)	1.26		$t - \text{experimental}$ ($\alpha=0.05$)	-0.37	
\bar{x}_{SIA} = promedio obtenido (para n muestras) se compara con el valor certificado (μ) $H_0: \bar{x} = \mu, H_A: \bar{x} \neq \mu$			\bar{x}_{SIA} = promedio obtenido (para n muestras) se compara con el valor certificado (μ) $H_0: \bar{x} = \mu, H_A: \bar{x} \neq \mu$		

5.1.3.5. Comparación de sistemas FIA-SIA

En la tabla 13 se comparan algunos parámetros que surgieron de la validación de la determinación de zinc en leche en polvo y fórmulas infantiles utilizando dos sistemas en flujo.

Tabla 13. Comparación de desempeño de un sistema en flujo FIA y uno SIA para la determinación de zinc en leche en polvo y fórmulas infantiles.

Parámetro	Resultado Sistema FIA	Resultado Sistema SIA
Límite de detección en disolución (3σ .blanco/pendiente) (mg.L^{-1})	0.032	0.130
Límite de cuantificación en disolución (10σ .blanco/pendiente) (mg.L^{-1})	0.107	0.433
Rango lineal (mg.L^{-1})	0.1-10 ($r>0.998$)	0.4-10 ($r>0.998$)
Frecuencia de muestreo hora ⁻¹	60	75
Precisión (s_r %)	<4	<5
Consumo de muestra (mL)	0.45	0.10
Consumo de reactivos (zincón y <i>buffer</i>) (mL) determinación	3.2	0.2

El sistema SIA presentó límites de detección y cuantificación mayores que FIA, pero igualmente adecuados para la aplicación.

Ambos sistemas son aptos para la determinación con desempeños semejantes en cuanto a linealidad, precisión y veracidad. Las ventajas del sistema SIA se revelan en cuanto a una mayor velocidad de muestreo y sobre todo el bajo consumo de reactivos (16 veces menor) y muestra. Además la cantidad de muestra que se calcinó para esta determinación fue mucho menor que para el sistema FIA (4 veces

menor). La disolución de muestra digerida no necesitó ser neutralizada antes de medirse.

Finalmente se puede concluir que ambos sistemas fueron exactos y eficientes para la determinación de zinc en leche. El sistema en flujo SIA mostró un desempeño equivalente al del sistema FIA siendo más rápido y consumiendo menor cantidad de muestra y reactivos.

Nota del autor:

La difusión de este trabajo está en proceso al momento de completar esta tesis según se detalla a continuación (las constancias correspondientes se muestran en el Anexo II):

- “Determinación de zinc en leche mediante análisis en flujo: estudio comparativo FIA - SIA”. 15º Encuentro Nacional de Química Analítica e 3º Congreso Iberoamericano de Química Analítica, a realizarse del 18 al 21 de octubre de 2009 en Salvador, Bahía, Brasil (trabajo aceptado).

5.1.3.6. Conclusiones y continuación del trabajo

Se diseñó y optimizó un sistema SIA para la determinación de zinc en leche vacuna en polvo y fórmulas infantiles. El mismo resultó exacto y eficiente para dicha determinación. El método propuesto arrojó resultados equivalentes a los obtenidos mediante el método oficial (AAS) con mayor productividad y menor costo.

Si bien el sistema demostró ser adecuado para la determinación de cobre, los límites de detección y cuantificación no fueron adecuados para esta determinación de este analito en leche. Esto indicó que se debería modificar el sistema. Como continuación del trabajo se propone modificar el sistema de forma tal que permita realizar preconcentración para la determinación de cobre. El nuevo sistema debería alcanzar un factor de enriquecimiento mínimo de 10 para esta aplicación.

Tanto el sistema de inyección en flujo (FIA) como el sistema con inyección secuencial (SIA), fueron adecuados y eficientes para la aplicación propuesta. El sistema en flujo SIA mostró un desempeño equivalente al del sistema FIA siendo más rápido y consumiendo menor cantidad de muestra y reactivos.

5.2. Determinación de nitrato y nitrito en leche en polvo y fórmulas infantiles mediante un sistema por Inyección Secuencial en Flujo (SIA)

5.2.1. Antecedentes y consideraciones preliminares

Pocos artículos científicos se han encontrado con métodos para la determinación de nitrato y nitrito en leche y derivados lácteos. Las técnicas de cromatografía (Tanaka *et al.*, 1981) y espectrofotométricas han sido propuestas para este fin ya hace algunos años (Bintoro, Cantin-Esnault y Alary, 1995).

Sin embargo numerosos trabajos reportan la determinación de nitrato y nitrito en muestras de aguas y algunas otras muestras medio ambientales utilizando técnicas en flujo (Oms, Cerdá y Cerdá, 1995, Lapa *et al.*, 2000, Kazemzadeh, Enfasi, 2001, Ahmed *et al.*, 2001, Brabcová, Rycchlovsky y Nemcová, 2003).

El antecedente más reciente encontrado reporta la determinación de nitrato y nitrito en muestras de leche y quesos utilizando un sistema de inyección secuencial (Reis Lima *et al.*, 2006). Este sistema es significativamente diferente al sistema propuesto pero utiliza los mismos principios de la reacción de *Griess* para la determinación.

El método oficial de la Federación Internacional Láctea (ISO Standard 14673-1:2001 / IDF *Standard* 189-1:2001, 2001) consiste en la determinación colorimétrica de nitrito, basada en el método de la reacción con diclorhidrato de N-(1-Naphtyl)etilendiamina y sulfanilamida. El nitrato es reducido a nitrito con una

columna de cadmio y posteriormente determinado utilizando la misma reacción colorimétrica, los fundamentos de esta reacción han sido explicados en el Capítulo 3, ítem 3.3.3.1. En la norma mencionada está prevista la posibilidad de utilizar un método automatizado (Parte 2) con flujo segmentado (SFA) y un sistema en flujo FIA (Parte 3).

A pesar de ser herramientas poderosas de automatización, y de presentar bajo consumo de reactivos comparado con el método tradicional ambos, SFA y FIA, aún requieren el pasaje continuo de reactivos. Estos reactivos se descartan entre inyección e inyección. Además estos sistemas requieren el uso de bombas peristálticas y tubos de bomba que deben ser reemplazados frecuentemente. SIA ha demostrado amplias ventajas como se explicó en la sección 3.2.4.

El método *batch* para la determinación de nitrato, utilizado por las normas oficiales ISO-IDF, es sumamente tedioso y lento no pudiéndose procesar más de 3 muestras por hora.

5.2.2. Materiales, métodos e instrumentación

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica.

Se utilizó agua purificada (ASTM Tipo I), obtenida de un purificador Millipore (São Paulo, Brasil) Simplicity 185 alimentado con agua destilada en destilador de vidrio.

Los reactivos fueron preparados según los procedimientos oficiales para la determinación de nitratos y nitritos en leche sin modificaciones (Panreac, 1999, pp 105).

Las disoluciones de trabajo de nitrato y nitrito fueron preparadas diariamente por dilución a partir de una disolución *stock* de 100 mg.L^{-1} $\text{NO}_3\text{-N}$ y $\text{NO}_2\text{-N}$ respectivamente, a partir de nitrato de potasio y nitrito de potasio. El contenido de nitrito de la disolución *stock* fue determinado volumétricamente.

El reactivo de color se preparó agregando a 160 mL de agua 20 mL de ácido fosfórico 85% (v/v) y 2 g de sulfanilamida hasta disolución. Luego se agregó 0.2 g de N-(1-naftil)-etilendiamina diclorhidrato y una vez disuelta se completó a 200 mL con agua purificada. La disolución fue estable hasta 1 mes conservada en frasco de vidrio ámbar y en heladera.

Tanto para la columna de Cd del dispositivo *batch* como para construir la minicolumna se utilizaron gránulos de cadmio cuyo tamaño de partícula fue 0.3-1.6 mm (Fluka, Buchs, Suiza). Los gránulos se cobraron con una disolución de sulfato de cobre (II) al 2 % (m/v).

Para regenerar ambas columnas se hizo pasar a través de ellas una disolución preparada con 5 mL de una disolución de ácido elilendiaminotetraacético sal

disódica 2- hidrato (EDTA) 3.4 % (m/v) y 2 mL de HCl 0.1 mol.L⁻¹ llevado a 100 mL con agua purificada.

Para el sistema SIA se utilizó una bomba de jeringa controlada por microprocesador (Cavro, Sunnyvale, CA, USA, modelo XP-3000), con un contenedor de 2.5 mL (capacidad de la jeringa). Se utilizó además una válvula selectora Valco Cheminert (Houston, TX, USA) de 10 puertos con actuador microeléctrico.

Las medidas se realizaron con un espectrómetro visible Beckman B con celda de flujo de 200 μ L (1 cm de camino óptico). El mismo estaba dotado de electrónica modificada y de una salida analógica (3V a plena escala) proporcional a la intensidad luminosa detectada.

Todas las conexiones y las bobinas de mezclado de tipo doble helicoidal fueron construidos con tubos de Teflon PFA de 0.8 mm de diámetro interno.

Se realizó el control del sistema y la adquisición de datos con un PC (Pentium III-600 MHz) con dos puertos seriales y dotado de una interfase analógica-digital (A/D) de 12 bits (Measurement Computing CIO-DAS08Jr) y un programa compilado en Visual Basic 6.

El programa permitió controlar la bomba de jeringa y la válvula selectora mediante los puertos seriales RS-232 y capturó los datos analógicos provenientes del espectrofotómetro. Estos datos fueron escalados, transformados en absorbancia y mostrados en pantalla en tiempo real. Los datos se guardaron en archivos de formato ASCII en el disco duro.

Para el procesamiento de datos se utilizó el programa *Peak Simple* (SRI, Torrance, CA, USA) (medida de altura de pico, suavizado, corrección de línea de base). Se imprimió un reporte impreso en cada jornada de trabajo.

El método oficial se realizó tal cual se indica en la norma ISO-IDF (ISO Standard 14673-1:2001 / IDF Standard 189-1:2001, 2001).

5.2.3. Diseño del sistema en flujo y optimización

En la figura 94 se muestra un esquema del sistema diseñado para la determinación de nitrato y nitrito en leche.

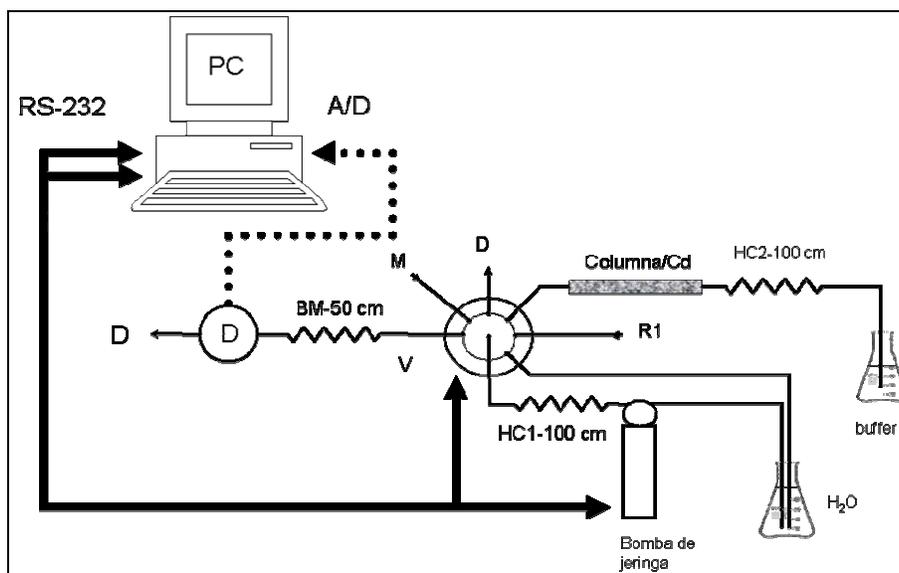


Figura 94 – Esquema del sistema SIA para determinación de nitrato y nitrito.

HC1 y HC2: bobinas de retención, BM: bobina de mezcla, M: muestra, R1: reactivo de desarrollo de color, D: descartes, V: válvula selectora.

El sistema se diseñó de manera de poder realizar las determinaciones de nitrato y nitrito de manera tal que cuando la muestra pasó a través de la columna de cadmio se realiza la determinación de $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$, y en el caso de solo mezclarse con el reactivo de desarrollo de color se determinó nitrito solamente. La concentración de nitrato puede por lo tanto determinarse realizando la diferencia entre $\text{NO}_3^- + \text{NO}_2^-$ y NO_2^- . La determinación colorimétrica de nitrito se realizó midiendo la absorbancia del producto de reacción del mismo con el reactivo N-(1-

Naftil)etilendiamina y sulfanilamida a 540 nm. El nitrato se redujo en línea a nitrito con una minicolumna de Cd y se determinó posteriormente nitrito como ya se explicó.

En las figuras 95 y 96 se muestran fotografías del sistema diseñado.



Figura 95– Fotografía del sistema SIA para determinación de nitrato y nitrito.

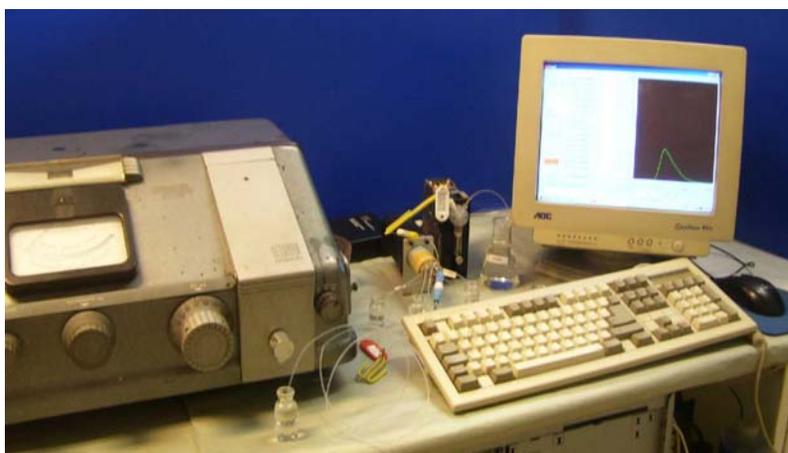


Figura 96 – Fotografía del sistema automatizado para determinación de nitrato y nitrito.

En la figura 97 se muestra el dispositivo construido para la determinación de nitrato y nitrito según el procedimiento oficial en *batch* (ISO Standard 14673-1:2001 / IDF Standard 189-1:2001, 2001).



Figura 97 – Fotografía del dispositivo batch utilizado para la determinación de nitrato y nitrito.

Los principios de funcionamiento de un sistema SIA ya se explicaron en detalle en la sección 3.2.5.

Para la determinación de nitrito se ejecutó vía software la siguiente secuencia:

Paso 1: Se aspiró agua hacia la bobina de retención (HC1), 2.1 mL.

Paso 2: Se aspiró reactivo para el desarrollo de color hacia la bobina de retención (HC1), 167 μL .

Paso 3: Se aspiró muestra hacia la bobina de retención (HC1), 83 μL .

Paso 4: Se aspiró reactivo para el desarrollo de color hacia la bobina de retención (HC1), 167 μL .

Paso 5: Se invirtió la dirección de flujo y se dispensó el contenido de la bobina retención (HC1), hacia el sistema de detección a través de una bobina de mezclado (C1).

De esta manera en la bobina de retención se tuvo:



Esta secuencia tipo “*sandwich*” resultó mejor que simplemente aspirar un segmento de muestra y reactivo ya que asegura un exceso local de reactivo. además de esta forma la muestra se mezcló mejor con el reactivo y se obtuvo mejor sensibilidad.

Tanto el tamaño de la muestra como el tamaño de los segmentos de reactivo se optimizaron evaluando la respuesta obtenida en altura de pico para la determinación de nitrito en un rango de concentraciones de 0.084 - 1.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ($\text{NO}_2\text{-N}$). Dicha respuesta se evaluó considerando la pendiente de la curva de calibración en este rango.

Luego de que se culminó la secuencia para la obtención de un pico fue posible mediante *software* programar la realización de varias repeticiones analíticas. Una vez que se completó la secuencia para un nivel de concentración se ejecutó una secuencia “cambio de muestra” de manera de evitar efecto memoria (*carry over*).

Para el diseño del sistema se realizó un exhaustivo trabajo para cronometrar los tiempos de ejecución de cada etapa y así definir los tamaños adecuados de la bobina de retención y largo de los tubos.

Para la determinación de nitrato + nitrito se ejecutó vía software la siguiente secuencia:

Paso 1: Se aspiró la muestra hacia la columna (C), 40 µL.

Paso 2: Se aspiraron 250 µL de agua y se los dispensó hacia la columna (C) para empujar la muestra y que la misma atravesara todo el largo de la columna de Cd hasta llegar a HC2. En este mismo paso se invirtió el sentido del flujo y se aspiró buffer del frasco al final de la columna (ver figura 94). De esta forma la muestra volvió a pasar por la columna de reducción. Este paso debió realizarse con una velocidad muy lenta de la jeringa para que el sistema no colapsara.

Paso 3: Se aspiró reactivo de desarrollo de color hacia la bobina de retención (HC1), 100 µL.

Paso 4: Se aspiró la muestra (con el nitrato presente ya reducido a nitrito) desde la posición de la columna hacia la bobina de retención HC1.

Paso 5: Se aspiró agua hacia el contenedor de la jeringa para luego impulsar el contenido de la bobina de retención hacia el detector.

Paso 6: Se dispensó el contenido de la bobina retención (HC1), hacia el sistema de detección a través de una bobina de mezclado (C1).

Mediante control con computador se pudo ejecutar la secuencia para la determinación de nitrito o la secuencia nitrato + nitrito.

La velocidad de la jeringa en cada paso de una secuencia también se optimizó en función de la respuesta obtenida y del comportamiento del sistema. Cuando la velocidad de la jeringa fue muy rápida en algunos casos el sistema colapsó debido a la sobrepresión que se generó. También fue fundamental el estudio de la velocidad con la que circuló el flujo a través de la columna debido al riesgo de obstrucción de la misma. Se tuvo especial cuidado en que no se generaran burbujas dentro del sistema.

Una secuencia tan compleja no habría podido desarrollarse si no se hubiera contado con una bomba de jeringa tan versátil. Las bombas de jeringa Cavro tienen la posibilidad de trabajar a diferentes velocidades de carga y dispensación y esto se pudo controlar vía *software*.

Se construyó una minicolumna de vidrio (largo 50 mm, diámetro interno 2.1 mm) empacada con gránulos de cadmio cuyo tamaño de partícula fue 0.3-1.6 mm (Fluka, Buchs, Suiza). Se muestra en la figura 98 una fotografía de la columna construída.



Figura 98. Minicolumna de Cd construída en el laboratorio.

Se programaron varias rutinas auxiliares de forma de realizar otras operaciones en línea como ser cobreado de la minicolumna y acondicionamiento.

El procedimiento para el cobreado y acondicionamiento fue el mismo que utilizó la norma oficial (ISO Standard 14673-1:2001 / IDF Standard 189-1:2001, 2001) pero llevadas a cabo por el sistema SIA en forma automática.

La eficiencia de reducción de la columna se testeó como parámetro de control de calidad de la determinación. La eficiencia de reducción se determinó como el cociente entre la absorbancia obtenida a partir de una disolución de $5 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_3\text{-N}$ y una disolución de igual concentración de $\text{NO}_2\text{-N}$. Cuando el resultado del cociente multiplicado por 100 fue menor a 90%, la columna se volvió a cobrear y a regenerar en línea.

5.2.4. Preparación de las muestras

El muestreo y almacenamiento ya fue discutido en la sección 5.1.2.3.

Las determinaciones analíticas se realizaron pesando una cantidad exacta de aproximadamente 10 g de muestra homogeneizada como se describe en el procedimiento oficial ISO-IDF (ISO Standard 14673-1:2001 / IDF Standard 189-1:2001, 2001). Se precipitaron las proteínas y grasa y posteriormente se filtró con un filtro de papel libre de nitrato. Para ello se pesaron exactamente 10 g de muestra de leche en polvo en un recipiente de vidrio y con agitación continua se agregaron 164 mL de agua purificada a 50-55 °C. Se agregó a continuación 6 mL de una disolución de sulfato de zinc hepta-hidratado 53.5 % (m/v), 6 mL de una disolución de hexaciano ferrato de potasio tri-hidrato 17.2 % (m/v) y 20 mL de una disolución *buffer* amoniacal pH 9.6 - 9.7. Luego de tres minutos de agitación se filtró con papel de filtro libre de nitrato.

El procedimiento para preparación de las muestras no presentó diferencias respecto al indicado en la citada norma.

El filtrado obtenido se dividió en dos porciones, una para la determinación de nitrato y nitrito por el método de referencia y la otra para la determinación mediante el método SIA propuesto.

5.2.5. Resultados y discusión

5.2.5.1. Validación

Todos los conceptos explicados en la sección 3.5 se aplicaron para la validación.

Para evaluar la linealidad se midió un blanco y 8 disoluciones patrón en el rango de 0.55 a 10 mg.L⁻¹ NO₃-N y 0.084 a 1.01 mg.L⁻¹ NO₂-N. Los gráficos de calibración se muestran en las figuras 99 y 100. En todos los casos las medidas se realizaron por quintuplicado de forma de evaluar también la precisión instrumental.

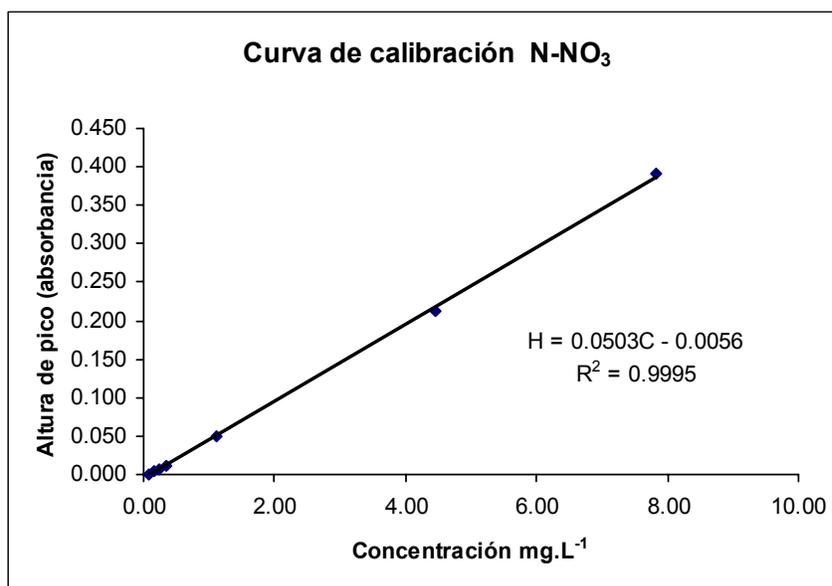


Figura 99 – Curva de calibración para la determinación de nitrato + nitrito.

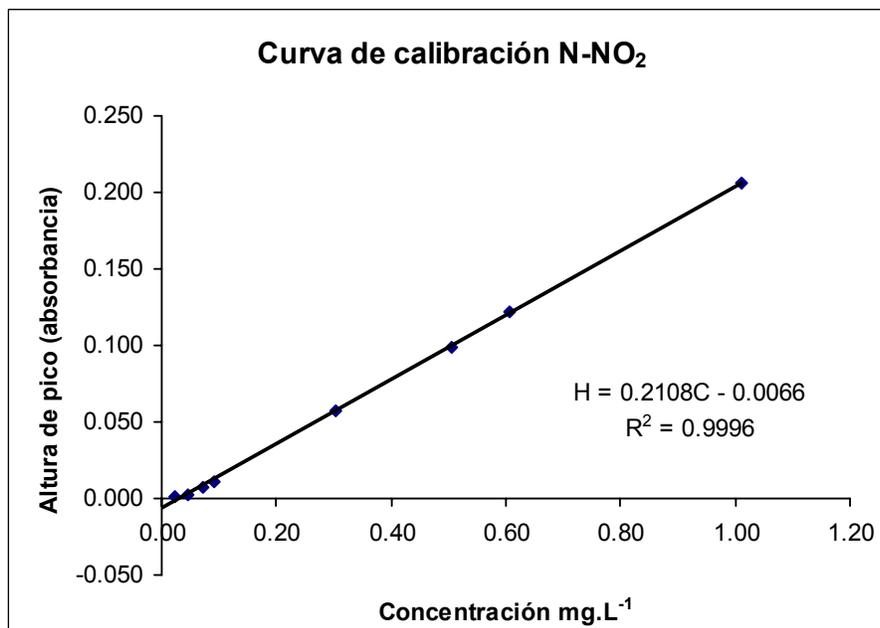


Figura 100 – Curva de calibración para la determinación de nitrito.

La recta de mejor ajuste surgió de tratamientos estadísticos y de la aplicación de un test de hipótesis (*lack of fit*). Los criterios aplicados ya fueron discutidos en la sección 3.5.

En las figuras 101 y 102 se muestra la respuesta no lineal a bajas concentraciones. Los límites de detección y cuantificación fueron estimados midiendo la dispersión del blanco (3s y 10s respectivamente) y refiriéndola a la curva de calibración.

El límite de cuantificación así calculado coincide con el comienzo del rango lineal.

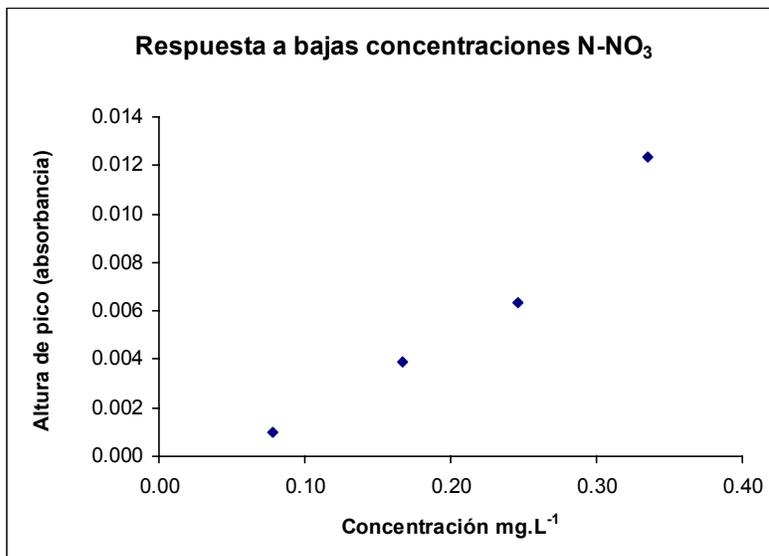


Figura 101- Estudio de la respuesta a bajas concentraciones para la determinación de nitrato + nitrito.

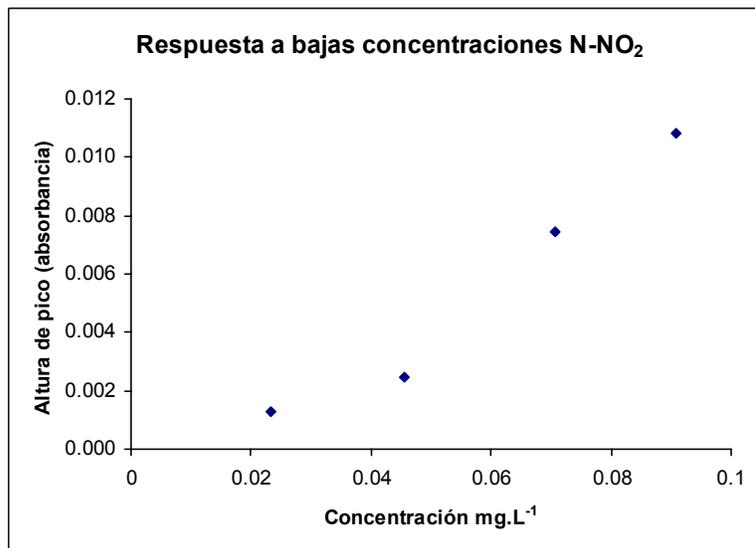


Figura 102- Estudio de la respuesta a bajas concentraciones para la determinación de nitrito.

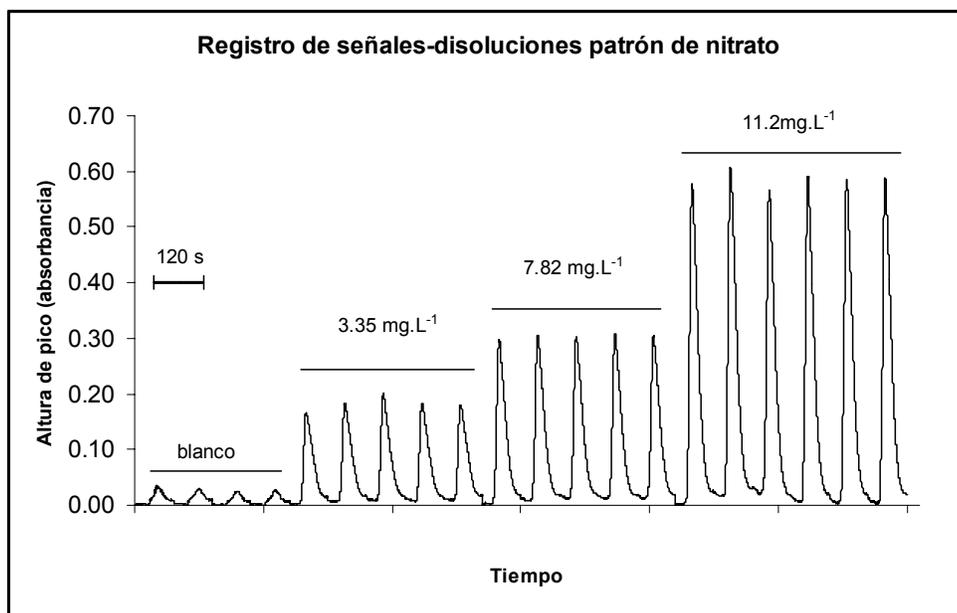


Figura 103- Registro de señales de una curva de calibración para la determinación de nitrato+nitrito (se midieron patrones que solo contenían nitrato). Las concentraciones se expresan en mg.L⁻¹ de nitrato como nitrógeno (NO₃-N).

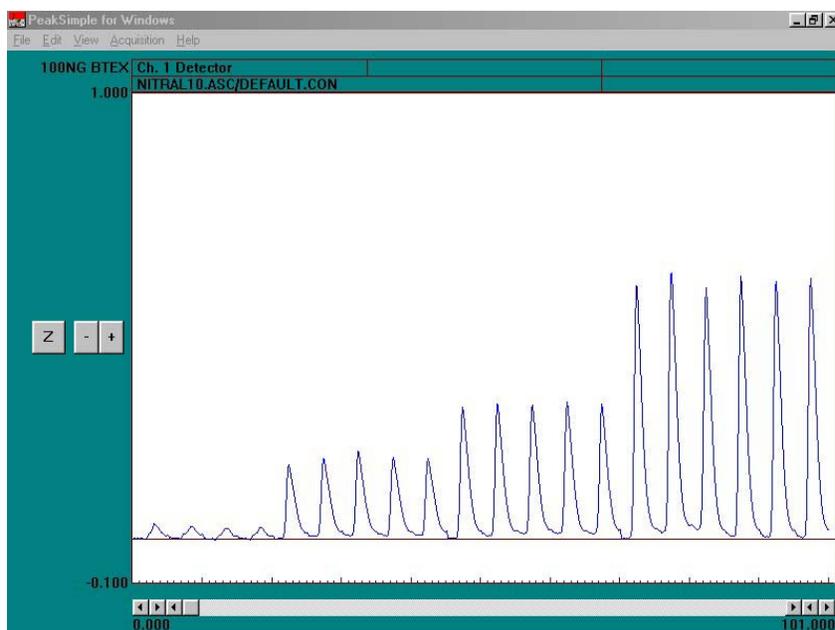


Figura 104 – Vista de impresión de pantalla de un registro de señales analíticas.

No se contó con material de referencia certificado que informara valor de nitrato en leche en polvo. Además como era esperable ninguna de las muestras contenía niveles de nitrato y nitrito detectables.

Por lo tanto para evaluar la veracidad del método propuesto se realizaron adiciones de nitrato y nitrito sobre las muestras (spiked samples). Se realizaron dos adiciones de disolución patrón de nitrato y nitrito a dos niveles de concentración. Las alícuotas agregadas fueron: nitrato, $C_1 = 3.35 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_3\text{-N}$, $C_2 = 5.58 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_3\text{-N}$ y nitrito, $C_1 = 0.10 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2\text{-N}$, $C_2 = 0.20 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2\text{-N}$. Estas adiciones fueron realizadas directamente a las muestras de leche, por lo que formaron parte de la misma desde el comienzo del proceso de preparación de muestra hasta la determinación analítica final. El nivel de concentraciones seleccionado se corresponde con niveles menores a aquellos que pueden afectar la salud humana. Esto es importante pues se busca que el método sea eficiente para detectar y cuantificar con exactitud dichos niveles.

Se calculó la recuperación (%) para el método SIA como: $[(S_2 - S_1) / (C_2 - C_1)] \times 100$. siendo C_1 y C_2 : concentraciones adicionadas, S_1 , S_2 : valores encontrados para muestras en el nivel de adición C_1 y C_2 respectivamente.

En la figura 105 se muestra el registro de señales analíticas correspondientes a patrones de calibración y una muestra sin adición (C_0) y con la doble adición (C_1 y C_2).

Este procedimiento también se realizó empleando el método de referencia en *batch*. Los resultados obtenidos por ambos métodos fueron comparados estadísticamente.

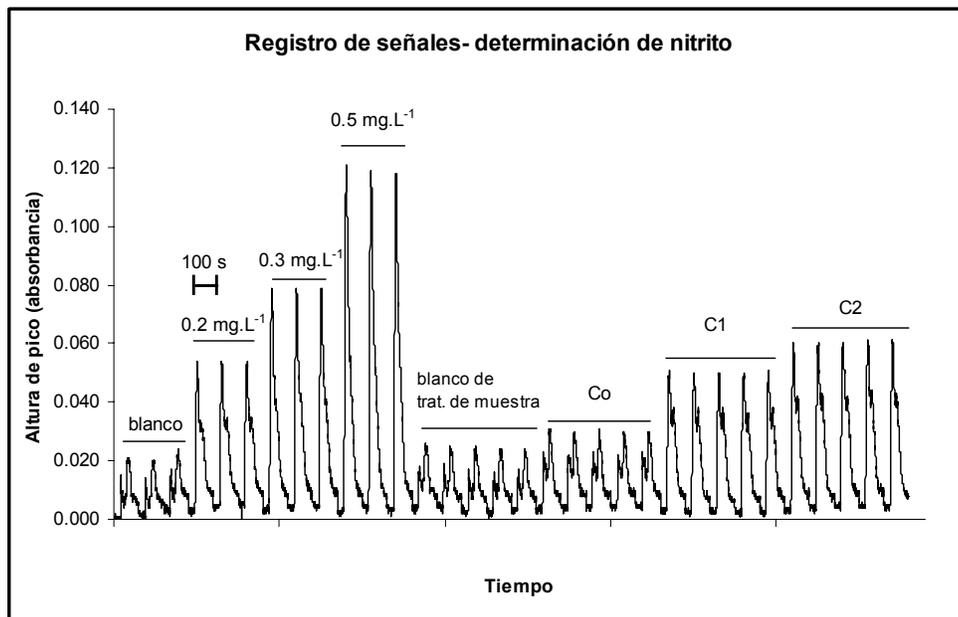


Figura 105 – Registro de señales analíticas para la determinación de nitrito. Patrones de calibración y una muestra con las respectivas adiciones. C₀: sin adición de patrón, C₁: adición de 0.10 mg.L⁻¹ NO₂-N, C₂: adición de 0.20 mg.L⁻¹ NO₂-N.

5.2.5.2. Cifras de mérito

Tabla 14. Resultados de la validación para la determinación de nitrato y nitrito

	Nitrato	Nitrito
Parámetro	Nitrato (NO ₃ -N)	Nitrito (NO ₂ -N)
Límites, disolución		
LD (mg.L ⁻¹), (3 σ/m, n = 10)	0.17	0.025
LC (mg.L ⁻¹), (10 σ/m, n= 10)	0.55	0.084
Límites, muestras reales		
LD (mg.kg ⁻¹), (3 σ/m , n = 5)	0.32	0.05
LC (mg.kg ⁻¹), (10 σ/m, n = 5)	1.08	0.17
Precisión (s _r (%), n= 5)	1.5 – 3.0	0.8 – 1.6
Rango lineal (mg.L ⁻¹)	0.55 -10.0 (r ² >0.999)	0.084 - 1.01 (r ² >0.999)
Frecuencia de muestreo (hora ⁻¹)	30	80

LD = límite de detección, LC = límite de cuantificación, m = sensibilidad (pendiente de la curva de calibración). LD and LC calculados para muestras reales.

A cada muestra se le realizó el procedimiento de preparación según la norma oficial IDF ya citada por triplicado. El análisis de cada muestra consistió en la determinación de nitrato y nitrito en las tres fracciones Co, C₁ y C₂ como ya se explicó.

Tabla 15 - Determinación de nitrato y nitrito: veracidad

(a) Veracidad: experimentos de recuperación				
Muestra	Analito	Método Oficial	SIA	SIA Recuperación (%)
		Concentración encontrada para el nivel de adición C_2 (mg.L ⁻¹)		
Fórmula Infantil A	Nitrato	5.555	5.573	99.8
	Nitrito	0.203	0.208	105.9
Fórmula Infantil B	Nitrato	5.430	5.617	100.6
	Nitrito	0.202	0.209	103.7
Fórmula Infantil para niños de 0 a 6 meses	Nitrato	5.520	5.533	93.8
	Nitrito	0.201	0.186	92.0
Fórmula Infantil para niños de 6 a 12 meses	Nitrato	5.416	5.380	96.3
	Nitrito	0.199	0.210	104.3
Leche en polvo descremada	Nitrato	5.620	5.800	100.6
	Nitrito	0.200	0.191	94.6
Leche en polvo	Nitrato	5.632	5.643	106.9
	Nitrito	0.211	0.219	108.5

(a) Experimentos de Recuperación para muestras comerciales llevados a cabo luego de la adición (*spike*) de cada uno de los analitos.

Recuperación (%) para el método SIA calculado como: $[(S_2 - S_1) / (C_2 - C_1)] \times 100$. **R**: media de recuperación para las muestras. C_1 , C_2 : concentraciones adicionadas. Nitrato, $C_1 = 3.35 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_3\text{-N}$, $C_2 = 5.58 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_3\text{-N}$. Nitrito, $C_1 = 0.10 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2\text{-N}$, $C_2 = 0.20 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NO}_2\text{-N}$. S_1 , S_2 , valores encontrados para muestras en el nivel de adición C_1 y C_2 respectivamente.

Tabla 16 - Determinación de nitrato y nitrito: veracidad prueba de significancia "t"

Prueba t para recuperaciones (Miller y Miller, 1993, pp 44)		
H ₀ : R = 100%		
H _A : R ≠ 100%		
Parámetro	Nitrato (NO ₃ -N)	Nitrito (NO ₂ -N)
t - crítico (α = 0.05, n = 5)	2.57	2.57
t - experimental (α = 0.05, n = 5)	-0.19	0.55
(b) Veracidad: comparación con el método de referencia: prueba t para las diferencias (Miller y Miller, 1993, pp 44)		
H ₀ : d = 0		
H _A : d ≠ 0		
Parámetro	Nitrato (NO ₃ -N)	Nitrito (NO ₂ -N)
t - crítico (α=0.05, n = 5)	2.57	2.57
t - experimental (α=0.05, n = 5)	-1.57	-0.21

(b) Resultados de la prueba "t" de *Student* donde se compara la media de los valores obtenidos por el método propuesto y el de referencia ISO-IDF (ISO *Standard* 14673-1:2001 / IDF *Standard* 189-1:2001, 2001) para el nivel de adición C₂. *d*: diferencia entre promedio de los resultados obtenidos por el método SIA y él de referencia para todas la muestras ensayadas.

5.2.6. Conclusiones

Se diseñó y validó un método para la determinación de nitrato y nitrito en leche en polvo vacuna y fórmulas infantiles.

El mismo fue eficiente y rápido para dicha aplicación y permitió realizar en línea la regeneración y cobreado de la minicolumna. El método desarrollado arrojó resultados equivalentes al método oficial.

La determinación de nitrato y nitrito en leche utilizando la técnica en flujo SIA presentó las ventajas de un sistema automatizado. El mismo presentó mayor productividad que el método oficial además del menor consumo de reactivos y muestra con la consiguiente generación de menor cantidad de residuos químicos.

Nota del autor:

Los resultados obtenidos del diseño y validación del sistema en flujo SIA para la determinación de nitrato y nitrito en leche en polvo y fórmulas infantiles fueron difundidos según se detalla a continuación:

- “Determination of nitrate and nitrite in milk powder and infant formula using a sequential injection analysis (sia) system”. 14° Encontro Nacional de Química Analítica realizado del 7 al 11 de octubre de 2007 en João Pessoa, San Pablo, Brasil (se presentó un póster).

El resumen y facsímil del póster se muestran en el Anexo II.

5.3. Determinación de selenio total en leche en polvo y fórmulas infantiles utilizando diferentes técnicas de análisis en flujo

5.3.1. Antecedentes y consideraciones preliminares.

En las secciones 3.1.5 y 3.1.7 se explicó la importancia de la determinación de selenio en leche y en fórmulas infantiles. En esta sección se hará mayor hincapié en las técnicas utilizadas para su determinación y en los antecedentes de mineralización de muestras de leche para este fin.

Existen varias técnicas adecuadas para la determinación de selenio total. Las cuatro más importantes para la determinación en leche son: activación neutrónica (Instrumental Neutron Activation Analysis, INAA), espectrofluorimetría (del inglés SPF), cromatografía de gases (CG) y absorción atómica (AAS) (Alaejos y Díaz Romero, 1994).

La activación neutrónica no es una técnica que pueda aplicarse en cualquier laboratorio, en general es usada para las determinaciones de selenio en materiales de referencia certificados como un método alternativo y para controles interlaboratorio. Tiene la ventaja de ser una técnica no destructiva pero los límites de detección suelen ser mayores que para otras técnicas (Alaejos y Díaz Romero, 1994, Foster y Sumar 1995).

La espectrofluorimetría es recomendada en el boletín de la Federación Internacional de Productos Lácteos (IDF) como método oficial (*Bulletin of the*

Internacional Dairy Federation N° 278/1992), y en la edición de AOAC 1996 también se establece como método de referencia (Ihnat, 1996), por lo que ha sido bien estudiado. El método se basa en la medida de fluorescencia del piazselenol derivado del selenito. Este compuesto se forma a partir de selenito y DAN (2,3-diaminonaftaleno). El límite de detección es del orden de $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, lo que es adecuado para estas determinaciones, pero involucra, una etapa de pre-reducción y extracción del complejo en un disolvente orgánico así como instrumental especial (Alaejos y Díaz Romero, 1994, Foster y Sumar 1995).

Otro método que involucra la formación de piazselenol utiliza DAB (3,3-diaminobenzidina), este método tiene también etapas de extracción y solamente la etapa de desarrollo de color tarda unos 50 minutos. (Marczenko y Balcerzak, 2000, pp380).

Como ejemplo de determinación de selenio mediante cromatografía de gases se puede citar el método basado en la complejación selectiva de selenio para formar el piazselenol. Éste se extrae hacia una fase orgánica antes de inyectarse en el cromatógrafo. Se utiliza en este caso un detector de captura electrónica (Foster y Sumar, 1995).

También se puede realizar la determinación mediante la técnica de HPLC utilizando un detector de fluorescencia. Los métodos cromatográficos son una interesante alternativa para realizar estudios de especiación de selenio en leche.

La determinación de selenio total en leche a niveles de trazas y ultratrazas se realiza frecuentemente mediante espectrometría de absorción atómica

electrotérmica (ET-AAS) (Aleixo y Nóbrega, 2003, Paiva de Oliveira *et al.*, 2005, Solá-Larrañaga, Navarro-Blasco, 2009). Otra técnica popular es la espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS) (Dědina, 1999, Mindak y Dolan, 1999, Muñiz-Naveiro, 2005). Esta técnica es adecuada y además presenta algunas ventajas importantes, entre ellas el hecho de ser una técnica que involucra la separación del analito de la matriz lo que reduce el número de interferencias que puede presentar.

La generación de hidruros se puede acoplar a la fluorescencia atómica (HG-AFS), cuando se requieren límites de detección muy bajos, sin embargo no es una técnica disponible en muchos laboratorios.

Como ya se explicó en la sección 3.3.2 la generación de hidruros puede realizarse en *batch* o automatizarse empleando diferentes sistemas en flujo.

Los sistemas en flujo continuo han sido utilizados ampliamente y existen varios modelos comerciales con accesorios para la generación de hidruros desde hace ya más de 20 años (Danby y Shaw, 1990, Van Dael y Barclay, 2006, PerkinElmer, 2000 y 2009).

La automatización mediante la técnica de inyección en flujo (FIA), es también útil y fue utilizada para este propósito, se han publicado varios artículos que reportan el acoplamiento de FIA a la generación de hidruros con excelentes resultados (FIA-HGAAS) (Muñiz-Naveiro *et al.*, 2005, Zhang y Adeloju, 2008).

También se han acoplado las técnicas de flujo continuo y FIA al sistema de detección de fluorescencia atómica (FIA-AFS) (Cava-Montesinos *et al.*, 2004, Mazej *et al.*, 2004, Muñiz-Naveiro, 2006).

En menor extensión aparecen algunos trabajos que acoplan sistemas en flujo a espectrometría atómica de emisión (HG-ICP-OES) (Moyano *et al.*, 1997, Etxebarria *et al.*, 2005).

La gran mayoría de los trabajos publicados presentan métodos para la determinación de selenio total y las especies selenito y selenato. Muy pocos trabajos reportan la determinación de compuestos orgánicos de selenio (Pyrzyńska, 1998).

En esta tesis se evaluó el desempeño de tres sistemas en flujo (CF, FIA, MCFA) en forma cronológica de manera de ir investigando las ventajas que las técnicas en flujo más modernas podían proporcionar. Esto simuló en cierta forma la evolución histórica de las técnicas, aunque hoy en día todas ellas se siguen utilizando.

Todos los sistemas en flujo se acoplaron a la detección mediante absorción atómica con generación de hidruros, lo que permitió la determinación de selenio como Se(IV) que es la especie que puede detectarse como SeH₂. El Se(IV) provino de una reducción cuantitativa del selenio total inorgánico presente en la matriz luego de la mineralización.

El análisis en flujo multiconmutado (MCFA) es una técnica emergente basada en redes construidas en torno a válvulas solenoide como ya se explicó en la sección 3.2.3. El antecedente más parecido fue reportado por Ródenas-Torralba *et al.* quienes diseñaron un sistema multiconmutado para la determinación de telurio en leche pero lo acoplaron a detección mediante fluorescencia atómica (Ródenas-Torralba *et al.*, 2004).

También Cerdá *et al.* han publicado un trabajo que menciona el uso de sistemas multiconmutados para la determinación de arsénico con generación de hidruros mediante absorción atómica, pero se trata de sistemas combinados con otra técnica denominada de multijeringa (Cerdá *et al.*, 2007).

No fueron encontrados otros antecedentes sobre sistemas multiconmutados para esta aplicación en particular.

La preparación de la muestra es crucial en esta aplicación. Numerosos trabajos proponen diferentes tratamientos de preparación para leche fluida y leche en polvo.

Muchos de esos tratamientos utilizaron ácido perclórico (Foster y Sumar, 1995, Bohrer *et al.*, 2007) dado que los resultados evaluados como recuperación de selenio fueron muy buenos. Sin embargo el uso del ácido perclórico es riesgoso y tiene un uso restringido en muchos laboratorios por lo que otras alternativas se han desarrollado para la mineralización.

Diversas mezclas que involucran $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ o $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$ o $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ han sido utilizadas con éxito para la mineralización de leche fluida y en polvo ya sea en sistemas abiertos o utilizando microondas (Mindak y Dolan 1999, Mazej *et al.*, 2004, Ródenas-Torralba, 2004, Muñiz-Naveiro, 2006).

Todos los tratamientos que utilizan HNO_3 y otros agentes oxidantes dejan el selenio como Se(VI). Debido a esto la determinación que se realiza es la de selenio total. Por lo tanto posteriormente se debe realizar otro tratamiento (pre-reducción) para reducir el Se(VI) a Se(IV) que es la especie que puede detectarse

mediante HG-AAS (o HG-AFS) ya que luego de la preparación de la muestra no es posible determinar Se(IV).

Varias alternativas se encuentran en la literatura para la etapa de pre-reducción, las más comunes utilizan HCl y calentamiento de las muestras en un rango de temperaturas de 70 a 100°C durante 20 - 40 min, algunos de estos procedimientos son descritos en métodos de referencia (Danby y Shaw, 1990, Clesceri *et al.*, 1998, p. 3-59, Mazej *et al.*, 2004, PerkinElmer, 2009).

El uso de HNO₃ concentrado en las mineralizaciones trae otros inconvenientes debido a que en la etapa de pre-reducción se forma nitrito que es una importante fuente de interferencia en la determinación analítica de especies que forman hidruros.

El nitrito puede formar óxidos de nitrógeno que causan una supresión de la señal generada por el hidruro de selenio al reaccionar con éste (se explicó este tipo de interferencia en la sección 3.3.2). Para vencer esta interferencia se ha propuesto el uso de varios compuestos entre ellos sulfanilamida, ácido sulfámico y urea (Cutter, 1983, Lopes Nunes *et al.*, 2005, Bohrer *et al.*, 2007, Muñiz-Naveiro *et al.*, 2006). En particular Lopes Nunes *et al.* compararon el efecto de varios de estos compuestos evaluando cuanto decaía la señal del hidruro de selenio en presencia de nitrito y óxidos de nitrógeno volátiles. Estos autores reportaron que el ácido sulfámico fue el reactivo más eficiente para vencer esta interferencia (Lopes Nunes *et al.*, 2005).

Más recientemente se han reportado tratamientos de muestra sencillos y rápidos que producen una emulsión (*slurry samples*). El tratamiento involucra el agregado

de algún ácido (o agua regia) a la porción de muestra, un agente antiespumante y posterior aplicación de ultrasonido. La emulsión resultante luego pasa a la etapa de pre-reducción (Viñas *et al.*, 1999, Ródenas-Torrealba *et al.*, 2004, Cava-Montesinos *et al.*, 2004).

No se esperaba se pusieran en evidencia interferencias debidas a la presencia de metales de transición en la matriz leche. Esto es debido a las bajas concentraciones de los potenciales interferentes, este hecho ha sido confirmado en la literatura (Pierce y Brown, 1976, Brown *et al.* 1981, Foster y Sumar, 1996, Mindak y Dolan, 1999).

5.3.2. Desarrollo de un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA)

5.3.2.1. Materiales, métodos e instrumentación

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. El reductor fue tetrahidrobórato de sodio (calidad para generación de hidruros) Fluka.

Diariamente se preparó una disolución de NaBH_4 cuya concentración dependía de la que etapa del proceso de optimización en que se estuviera (varió en un rango de 0.2 a 1 % (m/v)) en NaOH 0.05% (m/v).

Se utilizó agua purificada (ASTM Tipo I), obtenida de un purificador Millipore (São Paulo, Brasil) Simplicity 185 alimentado con agua destilada en destilador de vidrio.

La disolución patrón *stock* de selenio de concentración 1000 mg.L^{-1} se preparó a partir de selenio metal (Aldrich, 99.99%), disuelto en ácido nítrico y se llevó a volumen final con ácido clorhídrico al 10% (v/v). Se preparó diariamente una disolución intermedia (0.8 mg.L^{-1}) realizando diluciones sucesivas a partir del patrón *stock* con ácido clorhídrico 1.5% (v/v). Todas las disoluciones de calibración se prepararon a partir de la disolución intermedia.

Para el sistema en flujo se utilizó una bomba peristáltica multicanal Gilson (Villiers-le-Bel, Francia) Minipuls 2, con tubos de Tygon o Viton dependiendo el reactivo que circule por ellos. Para HCl se utilizó tubos de Viton para el resto tubos de Tygon.

Para inyección de la muestra en el sistema FIA se utilizó una válvula Valco Cheminert de 6 puertos con actuador microeléctrico, controlada con un PC

mediante un programa escrito en lenguaje QuickBasic 4.0 bajo DOS 6.0, vía puerto serial RS232.

Todas las conexiones y las bobinas de mezclado de tipo doble helicoidal fueron construidas con tubos de Teflon PFA de 0.8 mm de diámetro interno.

Se trabajó con dos separadores gas-líquido de vidrio del tipo hidrostático en forma de U, uno fue construido en el taller de vidrio de la Facultad de Química (se muestra en la figura 48 de la sección 3.3.2). El otro era parte de un sistema automático generador de hidruros comercial (GBC modelo HG3000, se muestra en la figura 49 de la sección 3.3.2).

Como gas portador se utilizó nitrógeno (seco y purificado mediante una trampa combinada con Drierite/ tamiz molecular)

Las medidas se realizaron en un espectrómetro de absorción atómica Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA) modelo 5000, provisto de un quemador de 10 cm (llama aire-acetileno) y una celda de atomización de cuarzo en forma de T (Precision Glassblowing, Centennial, CO, USA), y se operó a 196.0 nm longitud de onda correspondiente a la línea analítica de selenio. La fuente utilizada fue una lámpara de cátodo hueco de emisión intensificada Photron tipo "Superlamp" (Narre Warren, Australia) que fue utilizada siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La adquisición de datos se realizó conectado a una salida analógica del espectrómetro un registrador Cole Parmer® mediante un conector (1 V a plena escala). El registro de datos se realizó en papel durante la primera etapa del trabajo. Posteriormente la señal analítica (absorbancia), se obtuvo de dicha salida

analógica del espectrómetro mediante un conector (1 V a plena escala) y se digitalizó vía una interfase analógica-digital Measurement Computing, (Norton, MA, USA) de 12 bits (modelo USB 1208LS) conectada a un puerto USB y operó a una frecuencia de muestreo de 1 s^{-1} .

Otros instrumentos utilizados fueron: balanza analítica (Precisa XB 220 A, mínima división 0.1 mg) y placa calefactora con agitador magnético (Thermolyne modelo Nuova).

Calibración

En el trabajo de rutina las disoluciones de calibración se prepararon en el rango de 2.0 a $10.0 \mu\text{g.L}^{-1}$. Se realizó una toma exacta de alícuotas de la disolución intermedia de 0.1, 0.2, 0.3 y 0.4 mL. A cada una de las tomas se le agregó en erlenmeyer 20 mL de agua y 10 mL de ácido clorhídrico concentrado. Cuando se realizó la validación se prepararon disoluciones en el rango de 2.0 a $50.0 \mu\text{g.L}^{-1}$. La mezcla se calentó en una placa calefactora durante 1 hora a ebullición controlada para completar la reducción de Se(VI) a Se(IV). Luego de este paso de pre-reducción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se completó el volumen a 30 mL con agua (pre-reducción según APHA, Clesceri *et al.*, 1998, p. 3-59).

Para la validación se utilizó material de referencia certificado de leche descremada (NIST 1549, Non-Fat Milk Powder) y fórmula infantil (NIST 1846 Infant Formula).

Todo el material de vidrio se trató con ácido nítrico 10% (v/v), para su descontaminación y antes de usarlo se lavó exhaustivamente con agua destilada.

5.3.2.2. Diseño de los sistemas en flujo y optimización

Sistema en flujo continuo

El primer sistema construido fue un sistema de flujo continuo, similar a los sistemas comerciales. El esquema del mismo se muestra en la figura 106, donde una bomba peristáltica impulsó el flujo de tres líneas (muestra, NaBH_4 y HCl). La muestra ácida (fue tratada con HCl en la etapa pre-reducción, fuera del sistema en línea) se mezcló con una corriente de flujo constante de HCl mediante una confluencia en forma de “T”, posteriormente se mezcló con una corriente de flujo constante de NaBH_4 en un segundo punto de confluencia también en forma de “T”. El líquido avanzó y pasó por una bobina de mezclado doble helicoidal, lo que favoreció el mezclado. Como a esta altura se generaban muchas burbujas debido a la descomposición de NaBH_4 , se produjo un flujo segmentado.

La bobina de mezclado retrasó la llegada de la muestra al atomizador, esto fue conveniente para dar tiempo suficiente a la liberación del hidruro.

El gas portador utilizado fue nitrógeno y la corriente del mismo fue introducida a favor de la corriente de flujo luego de la bobina de mezclado.

El líquido y el gas se separaron en el separador gas-líquido en forma de U, dando lugar a dos flujos de salida, el del hidruro gaseoso con hidrógeno y el gas portador fluyendo hacia el atomizador/detector, y el del efluente líquido que iba hacia un descarte.

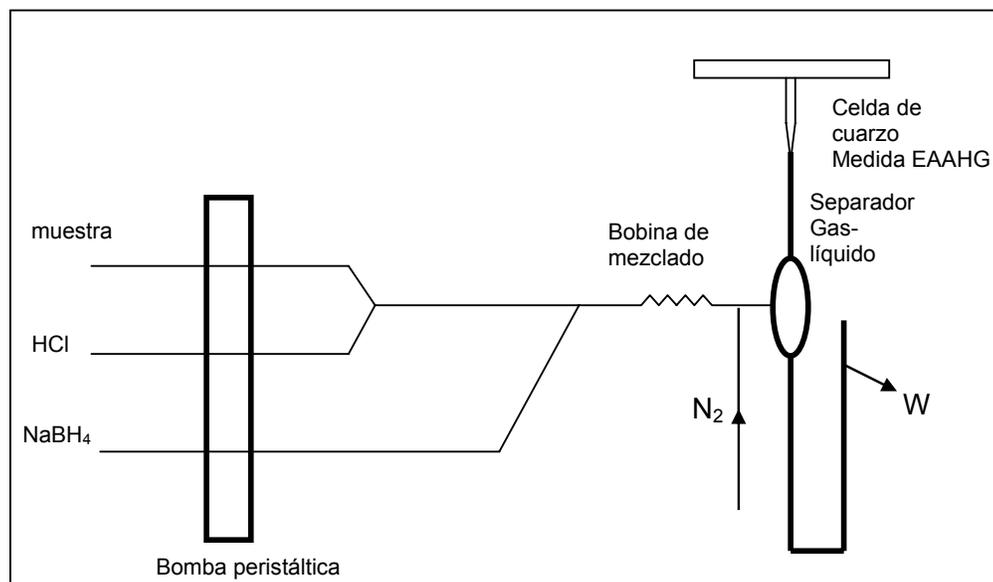


Figura 106- Esquema del sistema en flujo continuo para la determinación de selenio (EAAHG= Espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros, W= descarte).

Este fue el primer sistema en flujo con separación-gas líquido diseñado en nuestro laboratorio. Por lo tanto los caudales y concentraciones de HCl y NaBH₄ se fueron probando tomando como referencia los manuales de los sistemas continuos comerciales (Danby y Shaw, 1990, Hageman, 2002, PerkinElmer, 2009).

Estas pruebas permitieron adquirir experiencia en el comportamiento y desempeño de este tipo de sistemas, pero el sistema de flujo continuo no llegó a operar bajo condiciones totalmente optimizadas.

Las condiciones experimentales ensayadas se resumen en la tabla 17, donde el parámetro evaluado para determinar las condiciones óptimas fue la altura de pico (absorbancia) de la señal generada a partir de una disolución de selenio de 8 μgL^{-1} y la forma del pico observada.

Tabla 17- Resumen de las condiciones ensayadas en el sistema de flujo continuo. En todos los experimentos el flujo de HCl y el de NaBH₄ fue 1 mL/min.

Experimento	Largo del reactor de mezclado (cm)	Flujo de gas portador (mL/min)	Flujo de muestra (mL/min)	Concentración de NaBH ₄ (% (m/v))	Concentración de HCl (% (v/v))	Absorbancia disolución Se(IV) 8 (μg.L ⁻¹) (n=3)
1	50	200	9.1	0.5	30	0.050
2	100	200	9.1	0.5	30	0.050
3	50	200	4.4	0.5	30	0.030
4	100	200	4.4	0.5	30	0.030
5	50	200	9.1	1	30	0.045
6	50	70	9.1	0.5	30	Picos muy anchos

Como se observa en la tabla 17 las condiciones del experimento 1 y 2 fueron las mejores.

Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando el separador gas líquido de vidrio en forma de U diseñado en el laboratorio. En la figura 107 se muestra dicho dispositivo con las dimensiones reales.

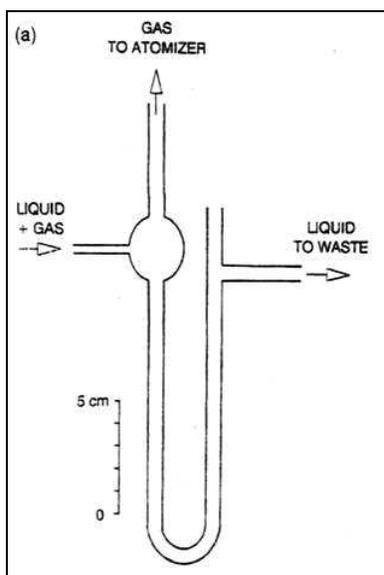


Figura 107- Separador gas-líquido. Se muestra una escala que indica las dimensiones reales.

No se continuó trabajando con este sistema debido a que no tenía ninguna innovación respecto a los sistemas en flujo continuo comerciales y consumía mucha cantidad de muestra y reactivos. Sin embargo sirvió como punto de partida para diseñar un sistema FIA, ya que las condiciones del experimento 1 antes mencionados (tabla 17) fueron datos importantes para comenzar a trabajar con un nuevo diseño. No se utilizó una bobina de mezclado de 100 cm como indica el experimento 2 ya que no había ganancia en la sensibilidad y aumentaba la dispersión.

Sistema de inyección en flujo (FIA)

La figura 108 muestra el esquema del sistema FIA diseñado. En este tipo de sistema la muestra se introduce en la corriente de flujo de un portador mediante una válvula inyectora de dos posiciones. La forma de funcionamiento de éstas válvulas y como se introduce el volumen de muestra (loop) al sistema fue explicado en la sección 3.2.2.

La válvula inyectora (Valco Cheminert) de 6-puertos con actuador microeléctrico se controló con un PC mediante un programa escrito en lenguaje QuickBasic 4.0 bajo DOS 6.0, vía puerto serial RS232. De esta forma se programó el tiempo de carga del loop y posterior inyección de la muestra cambiando la posición de la válvula en forma automática. Una vez que terminó de registrarse la señal analítica (señal transitoria en forma de pico) y que había retorno a la línea de base comenzó nuevamente el ciclo, el número de inyecciones consecutivas que se quisieran realizar también se ingresó en el menú del programa.

La señal analítica (absorbancia), se obtuvo de una salida analógica del espectrómetro y digitalizada vía una interfase analógica-digital que operó a una frecuencia de muestreo de 1 s^{-1} .

Para la adquisición de datos se desarrolló un programa compilado en Visual Basic 6.0 (Microsoft) usando el programa Softwire 3.1 (Measurement Computing). Los datos se guardaron en archivos formato ASCII y posteriormente se utilizó el programa Peak Simple (SRI, Torrance, CA, USA), para procesar los datos (medida de altura de pico, suavizado, corrección de línea de base) que se imprimieron para su almacenamiento.

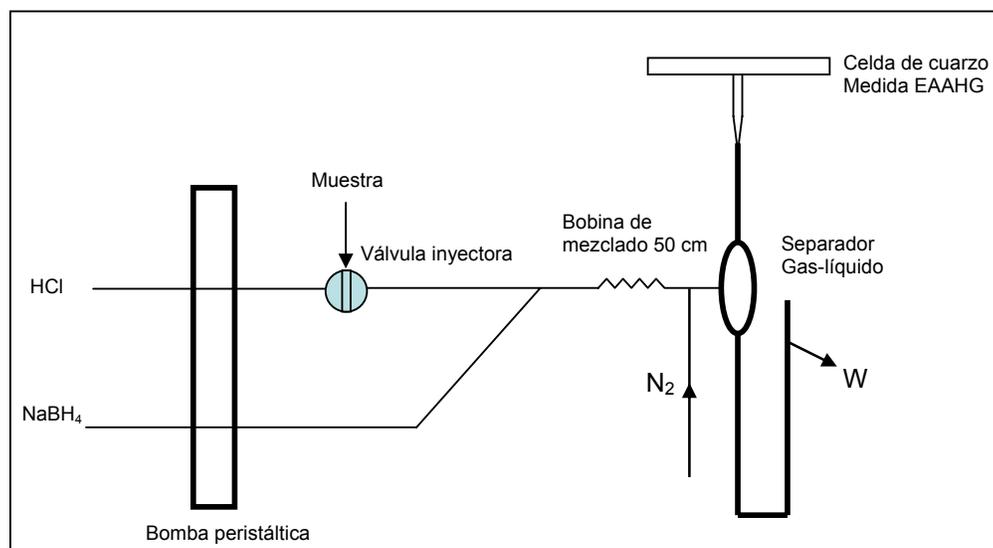


Figura 108- Sistema FIA para la determinación de selenio. (EAAHG= Espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros, W= descarte).

Este sistema comenzó trabajando con las siguientes condiciones experimentales ya probadas para el sistema de flujo continuo que resultaron aceptables:

Flujo de HCl: 1 mL/min

Flujo de NaBH₄: 1 mL/min

Flujo de N₂: 200 mL/min

Concentración de HCl: 30 % (v/v)

Concentración de NaBH₄: 0.5 % (v/v)

Bobina de mezclado: 50 cm (i.d: 0.8 mm)

El loop de muestra fue de 100 cm (i.d: 0.8 mm), por lo tanto en volumen de muestra fue de 500 µL.

Se continuó trabajando con un patrón de 8 µg.L⁻¹ de Se(IV) (proveniente del tratamiento de pre-reducción) para poder comparar las respuestas (altura de pico (absorbancia)) obtenidas respecto al sistema en flujo continuo. El resultado fue que la absorbancia en estas condiciones experimentales cayó 5 veces (absorbancia= 0.010).

Aún con baja sensibilidad se realizó una curva de calibración en el rango de 0-30 µg.L⁻¹, con 5 niveles de concentración, obteniéndose una linealidad aceptable según inspección visual ($r > 0.99$) y un s_r (%) mejor que 7.

El uso de ácidos en el laboratorio es un tema delicado, los vapores ácidos afectan no solo al operador sino al ambiente. En nuestro caso pesar de haber utilizado siempre los extractores de aire, los equipos y material de laboratorio comenzaron a mostrar señales de corrosión. Esto llevó a buscar alternativas para disminuir la concentración del ácido usado como portador cuando se comenzó con la optimización rigurosa.

Para la optimización se planificaron experimentos multivariantes (central compuesto), (Massart *et al.*, 1997, pp 711) y algunos experimentos univariantes (pocos experimentos para obtener conclusiones rápidas).

En la tabla 18 se muestra la influencia del caudal de portador (HCl), agente reductor (NaBH₄) y largo de la bobina de mezclado, sobre la altura de pico (absorbancia) de una disolución de Se(IV) de concentración 50 µg.L⁻¹. En este experimento las variables que se mantuvieron fijas fueron: concentración de NaBH₄ 0.2% (m/v) concentración de HCl 10% (v/v), loop 100 cm (500 µL de muestra), flujo de nitrógeno 200 mL/min.

Las concentraciones de HCl y NaBH₄ se cambiaron respecto al sistema en flujo continuo, considerando las condiciones indicadas por el método de referencia manual de APHA (Clesceri *et al.*, 1998, p. 3-59) ya que económicamente eran más convenientes, y el sistema comenzaba la etapa de optimización por lo que solo eran condiciones de partida que luego fueron optimizadas.

Tabla 18. Estudio de influencia de variables del sistema FIA. Diseño multivariante.

Experimento	Flujo HCl (mL/min)	Flujo NaBH ₄ (mL/min)	Largo bobina de mezclado (cm)	Absorbancia disolución Se(IV) 50 µg.L ⁻¹ (n=3)
1	1.3	1.7	150	0.044
2	2.9	3.6	150	0.069
3	3.5	4.5	50	0.076
4	1.3	1.7	100	0.047
5	2.9	3.6	100	0.069
6	2.2	2.8	100	0.062
7	3.5	4.5	100	0.072

De acuerdo a los resultados de la tabla 18, el experimento 3 determinó que las mejores condiciones fueron: bobina de mezclado 50 cm, flujo de portador 3.5 mL/min y flujo de reductor 4.5 mL/min.

Para completar la optimización final se planificó un diseño experimental central compuesto de 4 variables y 3 niveles.

En la tabla 19 se muestran los 3 niveles de las variables a estudiar, en este experimento se mantuvo un reactor de 50 cm, flujo de nitrógeno 200 mL/min, y volumen de muestra 500 μ L.

Tabla 19- Variables y niveles para el diseño de optimización del sistema FIA.

Variable	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Flujo HCl (mL/min)	1.3	2.8	5.9
Flujo NaBH ₄ (mL/min)	1.7	3.7	4.5
Conc. HCl %(v/v)	5	15	30
Concentración de NaBH ₄ % (m/v)	0.1	0.2	0.5

En la tabla 20 se muestran los resultados de los 17 experimentos del diseño propuesto. El experimento número 10 resultó ser el óptimo, esto significó una disminución muy significativa de la concentración de HCl y de NaBH₄ respecto a las condiciones iniciales.

Tabla 20- Diseño experimental compuesto, 4 variables y 3 niveles.

Experimento	Flujo HCl (mL/min)	Flujo NaBH ₄ (mL/min)	Conc. HCl % (v/v)	Concentración de NaBH ₄ (% (m/v)) en NaOH 0.05%	Absorbancia disolución Se(IV) 50 µg.L ⁻¹ (n=3)
1	1.3	1.7	5	0.1	0.076
2	1.3	1.7	5	0.5	0.069
3	1.3	1.7	30	0.1	0.081
4	1.3	1.7	30	0.5	0.070
5	1.3	4.5	5	0.1	0.065
6	1.3	4.5	5	0.5	0.043
7	1.3	4.5	30	0.1	0.066
8	1.3	4.5	30	0.5	0.044
9	2.8	3.7	15	0.2	0.167
10	5.9	1.7	5	0.1	0.222
11	5.9	1.7	5	0.5	0.208
12	5.9	1.7	30	0.1	0.205
13	5.9	1.7	30	0.5	0.200
14	5.9	4.5	5	0.1	0.162
15	5.9	4.5	5	0.5	0.112
16	5.9	4.5	30	0.1	0.170
17	5.9	4.5	30	0.5	0.115

Una vez alcanzadas las condiciones óptimas de trabajo, la frecuencia de muestreo fue 70 hora⁻¹.

5.3.2.3. Preparación de las muestras

Todo lo explicado en la sección 5.1.2.3 respecto al muestreo, manipulación y conservación de la leche en polvo y fórmulas infantiles se aplicó también para la determinación de selenio. El material de referencia certificado fue manipulado de misma manera que se indicó en las secciones 5.1.2.3 y 5.2.4.

Para la determinación de selenio no es viable realizar una calcinación vía seca, (el selenio es un elemento volátil y se perdería en el tratamiento a altas temperaturas), por lo que solo se consideraron las alternativas de mineralización vía húmeda.

La preparación de la muestra también debió ser optimizada. Dicha optimización comenzó cuando las determinaciones de selenio se estaban realizando con el sistema en flujo FIA, y se completó cuando ya estaba funcionando un sistema en flujo multiconmutado (MCFA). Por este motivo y como se discutirá en la sección 5.3.2.5, se realizaron diferentes tratamientos de muestra hasta obtener resultados satisfactorios que se describirán en esa sección. Pero el procedimiento final utilizado para determinación de selenio en todas las muestras se describirá en la sección 5.3.3.3.

La preparación de la muestra debe ser cuidadosa. La materia orgánica es una interferencia importante en la determinación analítica y en la preparación de la muestra hay riesgo de pérdidas de analito.

Las primeras pruebas consistieron en mineralizar muestras de material de referencia leche descremada (NIST 1549, Non-Fat Milk Powder).

Se digirieron 2 g de la muestra en placa calefactora a 120°C (digestión abierta), con agregado de 9 mL de HNO₃ concentrado y 11 mL de H₂O₂ 30% (v/v), durante 2 horas hasta clarificación. A los 20 mL de digesto se le realizó el procedimiento de pre-reducción de la misma forma que con los patrones (ver sección 5.3.1.2). La recuperación aparente que se obtuvo, considerando como 100% el valor certificado del material de referencia, fue 44%.

Como se discutirá más adelante esto llevó a proponer otra forma de preparación de la muestra.

En la búsqueda de tratamientos de preparación de muestra rápidos, simples y con menor riesgo de contaminación se comenzaron a realizar pruebas de digestión con microondas (Kingston y Haswell, 1997).

El primer procedimiento empleado para mineralizar leche en polvo utilizando un microondas doméstico consistió en pesar exactamente 1g de muestra de leche en polvo en un vial de Teflon de 60 mL con tapa rosca de Teflon PFA (Savillex®, Minnetonka, MN, USA), se agregó 1 mL de HNO₃ concentrado, el vial se tapó pero solo con una vuelta de rosca. Se calentó 1 minuto a 30% de la potencia máxima del horno de microondas doméstico (Ariston modelo MO991B). Luego de transcurrido el minuto (1 ciclo), se abrió el microondas, se destapó el vial y se agregó nuevamente 1 mL de HNO₃, se tapó nuevamente con una sola vuelta de rosca y se repitió el procedimiento anterior hasta completar 4 ciclos. Posteriormente se realizaron 4 ciclos iguales a los anteriores pero con el agregado de 1 mL de H₂O₂ 30% (v/v) en vez de HNO₃. Luego de terminado el

último ciclo, se dejó enfriar el digesto obtenido que fue una disolución clara, sin turbidez y se realizó la pre-reducción como se indicó en la sección 5.3.2.1. Para evitar interferencias debidas a los óxidos de nitrógeno remanentes se realizaron pruebas agregando ácido sulfámico 10% (v/v) según se reporta en la literatura (se discute en la sección 5.3.2.4).

Este procedimiento fue aplicado al material de referencia fórmula infantil (NIST 1846 Infant Formula) con muy buenos resultados.

5.3.2.4. Resultados y discusión

5.3.2.4.1. Validación

Para la validación se aplicaron los conceptos explicados en la sección 3.5.

Los límites de detección y cuantificación no se calcularon a partir de la desviación estándar del blanco, sino de la desviación estándar de una disolución patrón de 2 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Se (IV).

Dos tipos de blanco fueron evaluados, uno estaba constituido por todos los reactivos involucrados en la pre-reducción en las mismas proporciones que se utilizan en esta etapa. El otro tipo de blanco surgió de la mineralización. El mismo estuvo constituido por todos los reactivos que se utilizaron en la mineralización de las muestras en las mismas proporciones y fue sometido al procedimiento de mineralización y al de pre-reducción.

La linealidad se verificó de 2 a 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Para ello como se indicó en la sección 3.5 se siguieron las recomendaciones de la guía Eurachem (Holcombe, 1998).

En la figura 109 se muestra un registro donde se observan las señales correspondientes a una curva de calibración donde cada concentración se midió por triplicado, y señales correspondientes a una muestra de leche en polvo material de referencia.

Una vez que se estableció el rango lineal, en el trabajo de rutina se realizó una curva de calibración de 2 a 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ya que la concentración de selenio en las muestras luego de procesadas se encontró en ese rango.

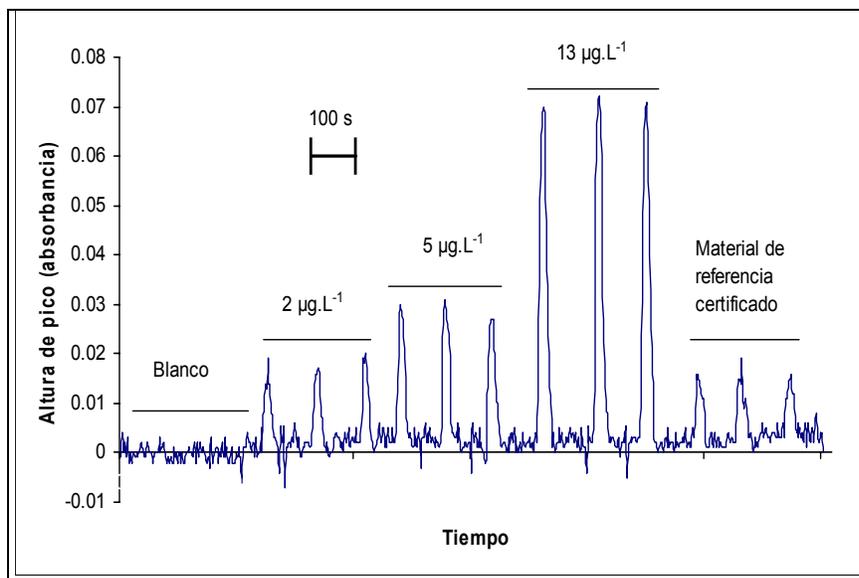


Figura 109- Registro correspondiente a curva de calibración y muestras.

Para estimar la precisión del método se realizó 5 veces la determinación de selenio sobre el material de referencia fórmula infantil (NIST 1846) y se calculó el s_r (%) en condiciones de precisión intermedia (definido en la sección 3.5). También se estimó la precisión instrumental (inyecciones repetidas, $n=10$) en condiciones de repetibilidad y de precisión intermedia.

La veracidad se evaluó realizando 5 determinaciones independientes sobre material de referencia certificado y luego comparando el valor obtenido utilizando el método propuesto con el valor certificado. Se compararon ambos valores mediante un test de hipótesis (prueba “ t ”, a un nivel de confianza del 95%), (Miller y Miller, 1993, pp.40).

5.3.2.4.2. Cifras de mérito

En la tabla 21 se muestran los resultados de la validación para la determinación de selenio mediante un sistema FIA.

Tabla 21- Cifras de mérito (FIA).

Parámetro	Resultado obtenido
Límite de detección (<i>calculado como 3σ sol. $2 \mu\text{g.L}^{-1}$/pend. calibración, $n=10$</i>)	$0.59 \mu\text{g.L}^{-1}$
Límite de cuantificación (<i>calculado como 10σ sol. $2 \mu\text{g.L}^{-1}$/pend. calibración, $n=10$</i>)	$1.95 \mu\text{g.L}^{-1}$
Linealidad ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	2 - 50 ($R^2=0.9996$)
Precisión s_r (%) ($n=5$)	<10
Frecuencia de muestreo hora ⁻¹	70

Valores obtenidos
 $\mu\text{g}/100\text{g}$ (base seca)
 NIST 1846 (Infant Formula)

8.297

7.753

8.221

9.271

7.634

Media = 8.235

s_r (%) = 7.9

Veracidad ($n=5$)	Valor informado en certificado* $8 \mu\text{g}/100 \text{g}$
t – crítico ($\alpha=0.05$, 4)	2.78
t - experimental ($\alpha=0.05$)	0.81

Como fue discutido en la sección 3.5 se realizó una prueba de significancia t para comparar los valores obtenidos con el valor certificado (Miller y Miller, 1993, pp 40) al 95% de confianza: $H_0: R = 8$, $H_A: R \neq 8$. t -experimental $<$ t -crítico, se aceptó H_0 (R = valor informado en el certificado)

* Valor informado como se muestra a continuación en el certificado de referencia.

Table 6. Information Concentration Values for Manganese and Selenium^(a)

	Mass Fraction (mg/kg)	$\mu\text{g}/100 \text{ kcal}$
Manganese	0.4	7
Selenium	0.08	1

^(a) Information values for manganese and selenium are the equally weighted means of results from the analysis by the USDA, the NFPA FIACS interlaboratory comparison exercise, and laboratories listed in Appendix A. The information values have also been converted to express concentrations relative to 100 kcal. Analytical methodology information is provided in Appendix C.

Discusión

Diseño del sistema y optimización

Utilizando el sistema en flujo continuo se verificó que la reacción de reducción se lleva a cabo cuando se mezcla un exceso de volumen de muestra acidificada con BH_4^- de modo tal que la mezcla de reacción sea ácida.

El reductor NaBH_4 se preparó diariamente en NaOH 0.05% (m/v), si se preparaba con menor concentración de NaOH se observó que la disolución tenía muchas burbujas lo cual es debido a la descomposición del NaBH_4 . Esto no ocurrió si el NaBH_4 se preparaba en disolución de NaOH de concentraciones entre 0.05 y 1%, en este medio el reactivo fue más estable. Sin embargo cuando se preparó el reactivo con NaOH 1%(m/v) comenzaban a aparecer señales de blanco medibles, por lo que 0.05% fue la concentración que se usó en todo el trabajo.

La pre-reducción con HCl no se realizó en línea, la muestra se introdujo en el sistema en flujo ya pre-reducida. El selenio puede perderse durante la pre-reducción debido a la formación de cloruros volátiles por lo que sería ventajoso que este procedimiento se pudiera incorporar al sistema en flujo como posible continuación del trabajo. A pesar de esto los resultados fueron satisfactorios por lo que si existieron pérdidas de este tipo no fueron significativas.

La muestra ácida ingresó al sistema y encontró una corriente de portador también ácida, la acidez de la corriente del portador debió ser optimizada.

Al comienzo se trabajó con un portador muy ácido (HCl 30% (v/v)) siguiendo las recomendaciones de algunos manuales de equipos que venden sistemas en flujo continuo para la generación de hidruros. Pero como la muestra ya ingresaba en medio ácido fue razonable pensar se podía disminuir la acidez del portador.

La optimización en los experimentos anteriores demostró que se podía trabajar con HCl 5%(v/v) sin pérdidas significativas de sensibilidad y precisión. Esto fue muy favorable para el ambiente de trabajo, y sin dudas generó mucho menos residuos ácidos.

Sin embargo no fueron buenos los resultados cuando se trabajó con HCl de menor concentración debido a que dentro del sistema comenzó a observarse la formación de burbujas, los tubos comenzaron a tener mucha presión en su interior y se zafaban las conexiones. Además el separador gas-líquido comenzó a mostrar problemas para “sifonar” lo que traía como consecuencia que el líquido se pasaba a la celda de cuarzo (atomizador).

En el caso del sistema de flujo continuo el suministro de hidruro era constante, cuando se alcanzó el estado estacionario, se obtuvo una meseta como señal.

Según la ecuación 3.3.2 (15), si el flujo de suministro de hidruro es constante una vez que alcanza el estado estacionario, el volumen muerto del separador gas-líquido solo influye en los bordes ascendentes y descendentes de la señal, no en la meseta.

Sin embargo cuando se pasó a trabajar con un sistema de inyección en flujo (FIA) existía un suministro de hidruro dado por el volumen inyectado de muestra (loop de muestra). El volumen muerto tanto del separador gas-líquido como del atomizador tenía un impacto en la forma del pico debido a la dispersión que allí ocurre. El sistema de flujo FIA operando en condiciones semejantes al sistema continuo (flujo de reductor, flujo de HCl, flujo de gas portador y misma concentración de patrón), con un volumen de muestra tal que en el sistema continuo se hubiera alcanzado el estado estacionario mostró una sensibilidad 5 veces menor.

Esto obligó a que, para sistemas FIA el volumen de muestra debiera ser aumentado para mejorar la sensibilidad. Así mismo debía asegurarse el exceso de NaBH_4 .

El laboratorio contaba con otro separador de vidrio gas-líquido comercial (figura 49) cuyos volúmenes muertos eran mucho menores que en el separador en forma de U. Este separador se probó pero sin buenos resultados, no se logró optimizar un sistema FIA para trabajar con este separador. Por este motivo el separador en forma de U mostrado en la figura 48 fue elegido para continuar el trabajo.

El flujo de gas portador es muy importante en la generación de hidruros pues influye en el transporte del hidruro hacia el atomizador, esta variable también se optimizó.

Preparación de las muestras

Los tratamientos que involucraron calentamiento en placa calefactora resultaron complicados debido a las proyecciones que ocurrían. Además llegar a obtener digestos que fueran disoluciones límpidas llevó en alguna oportunidad hasta 9 horas.

Los primeros resultados obtenidos indicaron que o la mineralización era ineficiente o existían otras interferencias que hacían que las recuperaciones aparentes fueran bajas.

Estos inconvenientes llevaron a que se probara con un sistema cerrado, donde se pudiera trabajar con aumento de temperatura y presión, y de esta forma obtener una digestión más rápida. Sin embargo este cambio no resultó sencillo al no disponer de un sistema comercial para digestión con microondas que pueda trabajar a presión. Se debió trabajar con pequeñas cantidades de muestra y eso podía hacer que luego no se alcanzaran niveles cuantificables de selenio en las disoluciones. Las pruebas realizadas en esta etapa para realizar medidas utilizando el sistema FIA fueron parcialmente optimizadas, el procedimiento totalmente optimizado concluyó simultáneamente con el diseño en flujo multiconmutado y será detallado más adelante.

Una vez establecida la mínima masa que debía ser mineralizada para luego poder cuantificar el analito, se probó una digestión con microondas doméstico.

En este tipo de sistemas cerrados (viales de 60 mL) sometidos a presión y temperatura lo adecuado es realizar el tratamiento a muestras que no superen los 0.5 g, por razones de seguridad y para que la destrucción de la materia orgánica sea completa.

La gran desventaja fue que también por razones de seguridad (evitar explosiones) no se pudo tapar herméticamente los viales de Teflon, sino solo con una vuelta de rosca. Esto hizo que prácticamente se trabajara a presión atmosférica, de todas formas un cierto aumento de la presión existió, pero igualmente existía el riesgo de que la mineralización no fuera completa.

Este procedimiento de digestión llevó unos 20 minutos lo que resultó una muy buena alternativa a la digestión en placa calefactora, con menor riesgo de contaminación y proyecciones. Las disoluciones así mineralizadas fueron totalmente límpidas.

Por otro lado el remanente de ácido nítrico que quedó luego de la mineralización produjo una interferencia que se tradujo en recuperaciones aparentes bajas. Teniendo en cuenta el trabajo de Lopes Nunes *et al.* se probó el agregado de ácido sulfámico y urea. Cuando se utilizó urea la señal del blanco fue alta y las recuperaciones no mejoraron, con ácido sulfámico en disolución al 10% (m/v) se obtuvieron señales de blanco no significativas y recuperaciones cercanas al 100% por lo que se decidió utilizar este reactivo en el resto del trabajo.

La cantidad de muestra que se pudo procesar en las condiciones del laboratorio en horno de microondas no superó los 0.5 g por lo que los volúmenes de reactivos debieron ser optimizados (evaluando las recuperaciones aparentes sobre el material de referencia certificado) de manera que la concentración final de selenio en la disolución luego de la pre-reducción fuera cuantificable.

Validación

Los límites de detección y cuantificación se calcularon en este caso midiendo una disolución de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de Se(IV). Esto se debió a que no se pudo medir la altura de pico correspondiente ya que la señal del blanco no fue significativamente distinta del ruido instrumental.

Uno de los objetivos de esta tesis fue obtener datos de los niveles de selenio total en leche, y para ello encontrar el sistema en flujo más adecuado. Como experiencia de aprendizaje sobre los sistemas en flujo con separación gas-líquido se diseñaron los sistemas CF y FIA. Pero nuestra experiencia de otras aplicaciones ya implementadas en nuestro laboratorio, indicaba que sistemas MCFA y/o SIA mostrarían ventajas importantes frente a estos sistemas que si bien eran adecuados, consumían mucha muestra y reactivos y no eran muy rápidos. Por este motivo se decidió comenzar con el desarrollo de un sistema en flujo multiconmutado buscando confirmar aquellas ventajas ya explicadas en la sección 3.2.3.

5.3.2.5. Conclusiones

El sistema en flujo continuo diseñado permitió generar experiencia y comprender como influyen las variables en la generación de hidruros, en particular en la generación del hidruro de selenio.

Se optimizó un procedimiento de preparación de muestra sencillo y rápido con microondas adecuado para leche en polvo.

El sistema FIA fue optimizado y parcialmente validado, resultando adecuado (exacto y rápido) para la determinación de selenio total en leche en polvo.

5.3.3. Desarrollo de un sistema por Inyección en Flujo Multiconmutado (MCFA).

5.3.3.1. Materiales, métodos e instrumentación

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. El reductor fue tetrahidroborato de sodio (calidad para generación de hidruros) Fluka.

Diariamente se preparó una disolución de NaBH_4 cuya concentración dependía de la etapa del proceso de optimación en que se estuviera (varió en un rango de 0.2 a 1 % (m/v)) en NaOH 0.05% (m/v).

Se utilizó agua purificada (ASTM Tipo I), obtenida de un purificador Millipore (São Paulo, Brasil) Simplicity 185 alimentado con agua destilada en destilador de vidrio.

Una disolución patrón *stock* de selenio (1000 mg.L^{-1}) se preparó a partir de selenio metal (Aldrich, 99.99%), disuelto en ácido nítrico y llevado a volumen final con ácido clorhídrico al 10% (v/v). Se preparó diariamente una disolución intermedia (0.8 mg.L^{-1}) realizando diluciones sucesivas a partir del patrón *stock* con ácido clorhídrico 1.5% (v/v). Todas las disoluciones de calibración fueron preparadas a partir de la disolución intermedia.

La calibración y la etapa de pre-reducción ya fueron descritas en la sección 5.3.2.1, no habiendo cambios con respecto a lo ya explicado en dicha sección.

Para la validación en la etapa de evaluación de la veracidad se utilizó material de referencia certificado leche descremada (NIST 1549, Non-Fat Milk Powder) y fórmula infantil (NIST 1846 Infant Formula).

Todo el material de vidrio se trató con ácido nítrico 10% (v/v), para su descontaminación y antes de usarlo se lavó exhaustivamente con agua destilada. Para el sistema en flujo se utilizó una bomba peristáltica multicanal Gilson (Villiers-le-Bel, Francia) Minipuls 2, con tubos de Tygon o Viton dependiendo el reactivo que circule por ellos. Para HCl se utilizó tubos de Viton y para el resto tubos de Tygon.

Todas la conexiones y las bobinas de mezclado de tipo doble helicoidal fueron construidos con tubos de Teflon PFA de 0.8 mm de diámetro interno.

Las válvulas solenoide utilizadas (12V) fueron de 3 vías (NResearch, West Caldwell, NJ, USA, modelo 161T031). Las mismas fueron controladas por medio de una interfase hecha en el laboratorio en base a un circuito integrado ULN-2803 que a su vez era controlada por un computador personal vía un puerto paralelo LPT1.

Como gas portador se utilizó nitrógeno (seco y purificado mediante una trampa combinada con Drierite/tamiz molecular).

Las medidas se realizaron en un espectrómetro de absorción atómica Perkin-Elmer (Norwalk, CT, USA) modelo 5000, provisto de un quemador de 10 cm (llama aire-acetileno) y una celda de atomización de cuarzo en forma de T (Precision Glassblowing, Centennial, CO, USA). Se operó a 196.0 nm longitud de onda correspondiente a la línea analítica de selenio. La fuente utilizada fue una lámpara de cátodo hueco Photron (Narre Warren, Australia) Superlamp, de emisión intensificada que se utilizó siguiendo las recomendaciones del fabricante. La señal analítica (absorbancia), se obtuvo de una salida analógica del espectrómetro mediante un conector (1 V a plena escala). La misma se digitalizó

vía una interfase analógica-digital Measurement Computing, (Norton, MA, USA) de 12 bits (modelo USB 1208LS) conectada a un puerto USB y operó a una frecuencia de muestreo de 1 s^{-1} .

Para la adquisición de datos y operación del sistema se desarrolló un programa compilado en *Visual Basic* 6.0 (Microsoft) usando el programa *Softwire* 3.1 (*Measurement Computing*). El programa controló los tiempos de activación de las válvulas solenoide utilizando parámetros que se ingresaban en un menú antes de comenzar el programa. En la sección 3.4 se explicó con más detalle el tipo de *software* usado y se muestra en la figura 110 una vista de impresión de pantalla del programa.

Los datos se guardaron en archivos formato ASCII y posteriormente utilizando el programa *Peak Simple* (SRI, Torrance, CA, USA), se procesaron los datos (medida de altura de pico, suavizado, corrección de línea de base). Finalmente se obtuvo un reporte impreso.

Otros instrumentos utilizados fueron: balanza analítica (Precisa XB 220 A, mínima división 0.1mg) y placa calefactora con agitador magnético (Thermolyne modelo Nuova).

Para la evaluación de interferencias se realizaron las diluciones correspondiente a partir de: disolución de cobre $1.000 \text{ g} \pm 0.002 \text{ g}$ (Titrisol[®], Merck), de hierro 1000 mg.L^{-1} (DILUT-IT[®], J.T.Baker) y de zinc 1000 mg.L^{-1} (preparada en el laboratorio a partir de granallas metálicas de zinc 99.99%, Sigma-Aldrich).

Las muestras de leche en polvo fueron proporcionadas por una empresa nacional de productos lácteos. Las muestras de fórmulas infantiles fueron adquiridas en el mercado local.

La leche fluida fue recolectada en tambos de Florida y Libertad en el mes de noviembre de 2008. Las mismas fueron provistas por la Facultad de Veterinaria a través del Departamento de Rumiantes a cargo del Dr. Luís Barros. Algunas muestras fueron compradas en el mercado local como ya se explicó en la sección 3.1.7.

5.3.3.2. Diseño de los sistemas en flujo y optimización

En la figura 111 se muestra la primera configuración diseñada. Este sistema contaba con 3 válvulas solenoide de 3 vías controladas desde un PC.

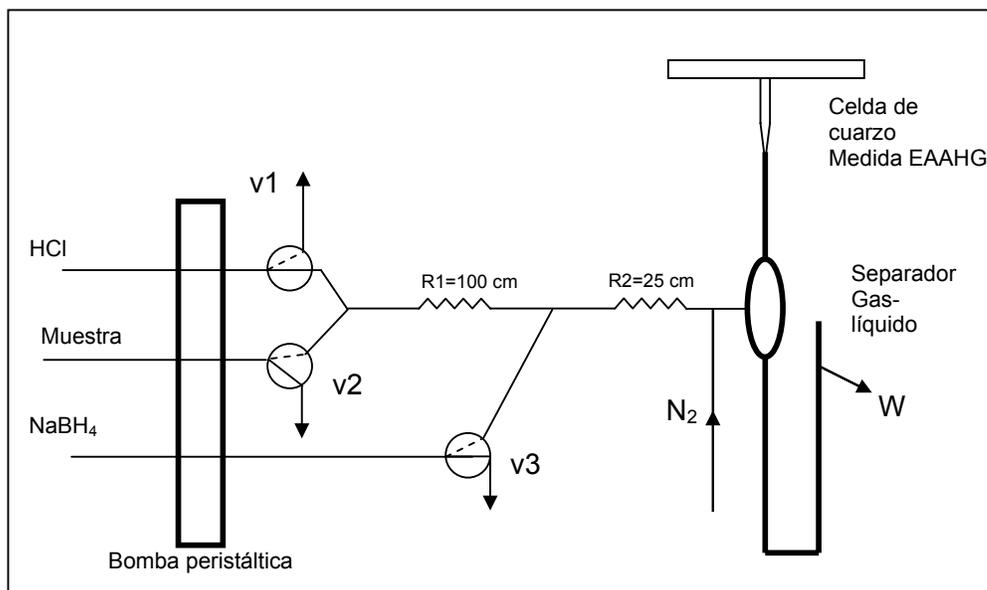


Figura 110- Sistema multiconmutado de 3 válvulas con dos confluencias.

En la figura 111 se muestra un diagrama simplificado que indica el sentido de las señales eléctricas desde el puerto paralelo del PC hacia el circuito ULN-2803 y finalmente hacia las válvulas solenoide.

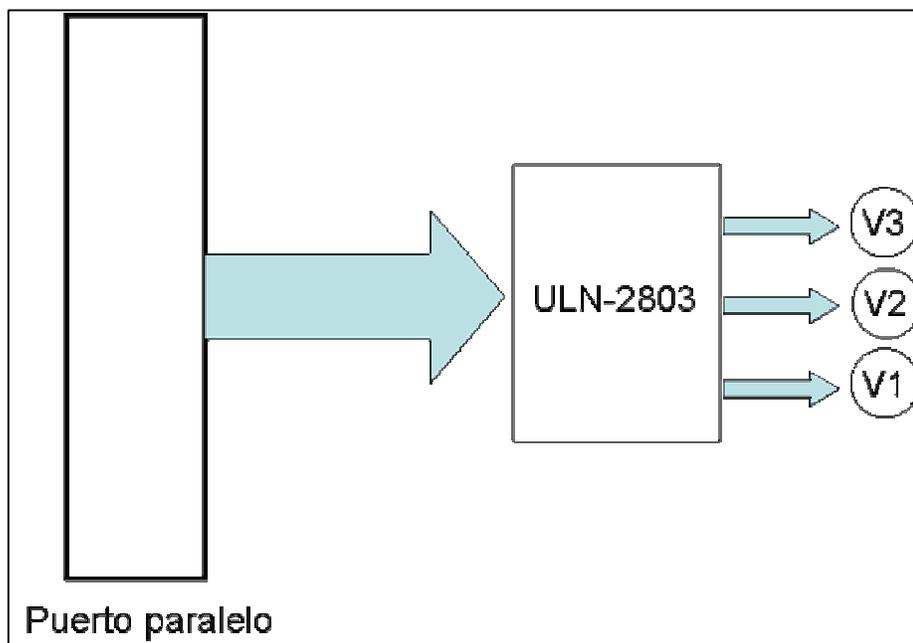


Figura 111- Esquema eléctrico, dirección de las señales. Puerto paralelo del computador, circuito ULN-2803, V1, V2, V3: válvulas solenoide.

Para evaluar el largo de los tramos del sistema en la etapa de diseño del mismo, se utilizaron disoluciones de colorantes de manera de poder visualizar el recorrido de la muestra a lo largo del sistema.

Las condiciones de partida surgieron del experimento de optimización que se mostró en la tabla 20, flujo HCl 5.9 mL/min y flujo de NaHB₄ 1.7 mL/min. El flujo de la línea de la muestra fue 8 mL/min. Se trabajó evaluando la respuesta a los cambios de una disolución de selenio de concentración 50 µg.L⁻¹ y se probaron diferentes secuencias de operación. Las secuencias (desde la A hasta la J) se modificaron cambiando solamente tiempos en el menú del programa diseñado en el laboratorio según se describe en la tabla 22. Este experimento se realizó para evaluar el comportamiento del sistema cuando se programaban secuencias con muestreo binario (ya explicado en la sección 3.2.4).

Tabla 22- Variación de secuencias de análisis en el *software*.

Secuencias prueba	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Duración del segmento v1 - HCl (s)	0.5	0.75	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Duración del segmento v2 - Muestra (s)	0.5	0.75	0.75	1	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Duración del segmento v3 - NaBH ₄ (s)	1	1	1	1	1	0.5	1	1	1.5	1.5
Nº de ciclos de muestreo	8	8	8	8	8	8	10	20	20	30
Nº de repeticiones analíticas	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Respuesta promedio (n=3)	0.020	0.050	0.043	0.082	0.095	0.095	0.094	0.093	0.100	0.101

Cabe destacar que cuando todas las válvulas permanecieron apagadas (estado normal) por el sistema circuló el portador HCl, mientras la muestra y el NaBH₄ se recirculaban. A modo de ejemplo se explica la secuencia A:

(antes de comenzar la secuencia todas las válvulas estaban apagadas)

Etapa 1: V1 y V2 se activaron durante 0.5 s (V1 + V2 encendidas): se interrumpió el pasaje de HCl y se insertó un segmento de muestra durante 0.5s (equivalente a 0.06 mL), el NaBH₄ se recirculaba.

Etapa 2: V1 y V2 se apagaron y se activó V3 durante 1s: volvió a circular HCl, y se insertó un segmento de NaBH₄ de 1 s (equivale a 0.03 mL), la muestra se recirculaba.

Las etapas 1 y 2 se repitieron consecutivamente 8 veces lo que completó una secuencia (parámetro “Nº de ciclos de muestreo”).

Etapa 3: todas la válvulas permanecieron apagadas (pasaje sólo de HCl) hasta que se registró la señal y se retornó a la línea de base.

La secuencia se repitió 3 veces en este caso (parámetro “N° de repeticiones analíticas”).

Posteriormente se realizó el procesamiento de los datos obteniéndose la altura de pico (absorbancia). Análogamente se pueden interpretar el resto de las secuencias.

Este tipo de experimentos se pudieron realizar en forma rápida variando solamente parámetros de *software*. Comparando los resultados obtenidos con el sistema FIA (teniendo en cuenta que las condiciones de flujo y volumen de muestra se mantuvieron similares) la sensibilidad fue mucho menor. Esto sucedió en todas las secuencias ensayadas (A hasta J).

Por este motivo se diseñó otro sistema buscando al menos igualar la sensibilidad obtenida por el sistema antes mencionado.

En la figura 113 se muestra el segundo diseño. El mismo consistía en una red de 3 válvulas solenoide con una confluencia en forma de cruz. En este sistema se probó también el muestreo binario. Como ejemplo de una de las secuencias ensayadas se muestra el diagrama de tiempos (su interpretación ya se explicó en la sección 3.2.3) de la figura 113. En esta nueva configuración, la estrategia consistió en insertar segmentos de muestra en una corriente de NaBH_4 interrumpiendo el pasaje de HCl durante la introducción de dicho segmento.

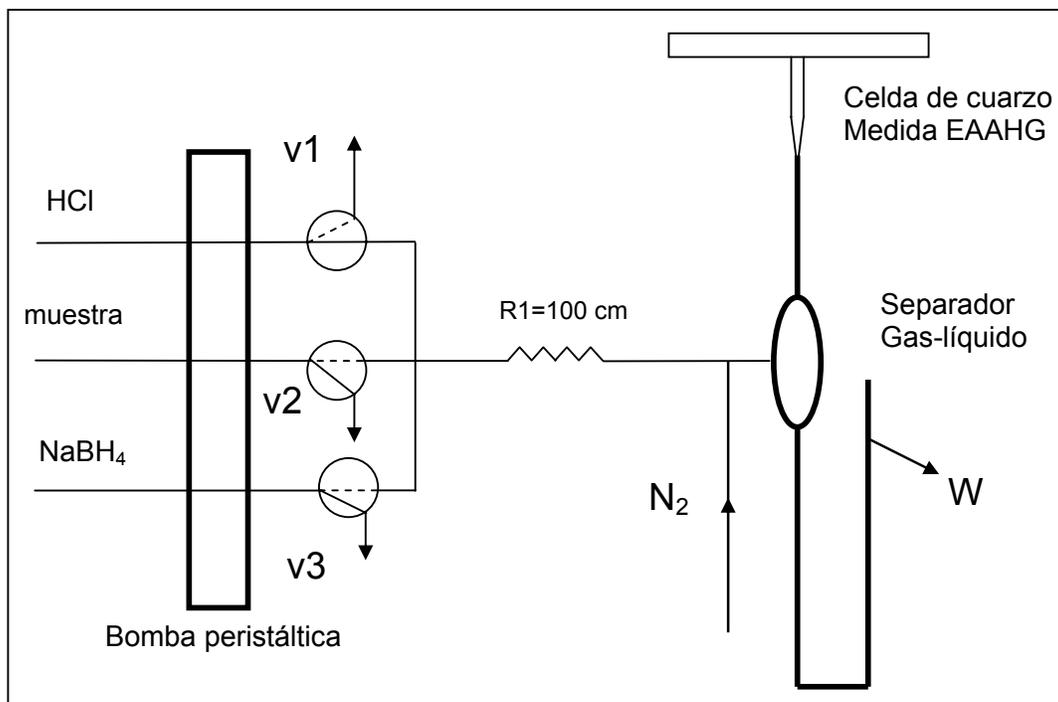
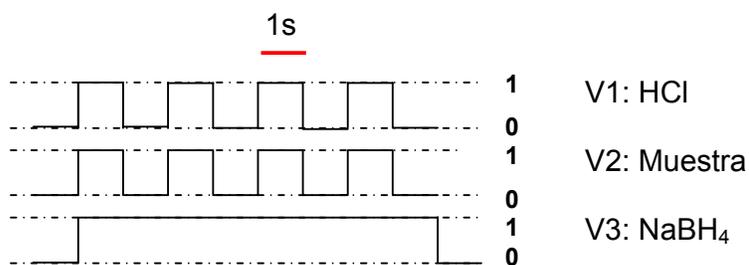


Figura 112 - Sistema multiconmutado de 3 válvulas con una confluencia en forma de cruz.

Diagrama de tiempos



Nivel 1= estado ON (válvula activa)

Nivel 0= estado OFF (válvula apagada)

Tabla 23- Secuencia de análisis, sistema con confluencia en cruz.

Secuencia	tiempo (s)
Duración del segmento v1 - HCl	1
Duración del segmento v2 - Muestra	1
Duración del segmento v3 - NaBH ₄	8
Nº de ciclos de muestreo	8
Nº de repeticiones analíticas	3

En la tabla 23 se muestra una secuencia ejecutada. Siempre antes de comenzar una secuencia todas las válvulas estaban apagadas (circulaba HCl por el sistema mientras la muestra y NaBH₄ se recirculaban).

Etapa 1: V1, V2 y V3 se activaron, (V1 + V2 + V3 encendidas): se interrumpió en pasaje de HCl 1 s y se insertó un segmento de muestra durante 1s (equivale a 0.12 mL) y un segmento de NaBH₄ de 8s (equivale a 0.23 mL).

Etapa 2: V1 y V2 se apagaron, mientras V3 continuaba encendida: volvía a circular HCl durante 1s y la muestra se recirculaba.

Las etapas 1 y 2 se repitieron consecutivamente 8 veces lo que completó una secuencia (parámetro “Nº de ciclos de muestreo”).

Etapa 3: todas las válvulas permanecían apagadas mientras se registraba la señal y se retornaba a la línea de base.

La secuencia completa se repitió 3 veces en este caso (parámetro “Nº de repeticiones analíticas”).

Las condiciones de flujo continuaron siendo las optimizadas anteriormente para HCl y NaBH₄ (5.9 mL/min y 1.7 mL/min respectivamente), pero fue necesario disminuir un poco el flujo de la muestra para evitar que se zafaran las conexiones por sobrepresión en el sistema (7.2 mL/min).

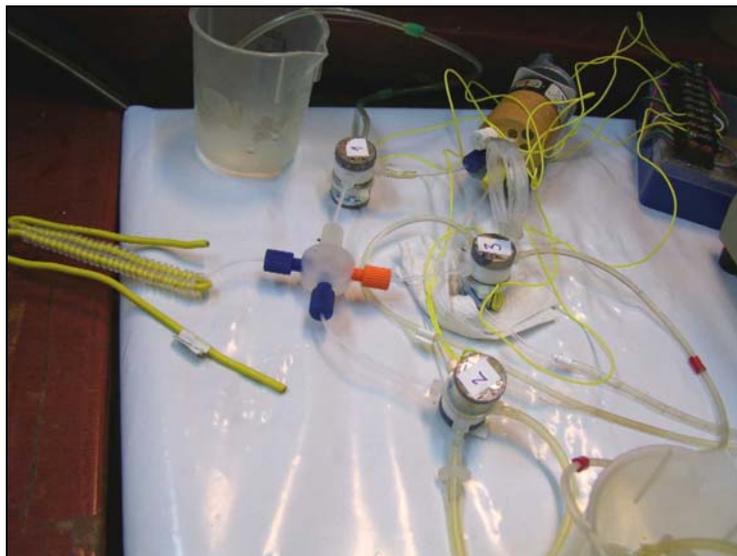


Figura 113- Fotografía del sistema de 3 válvulas con confluencia en forma de cruz.

Los resultados obtenidos mostraron una mejora en la señal para una concentración de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ alcanzándose valores de hasta 0.198 de absorbancia. Mientras que con la configuración anterior no se pudo superar el valor de 0.100 para la misma disolución aún insertando muestra durante más tiempo.

Sin embargo aún no resultaba satisfactorio el desempeño ya que los límites de detección eran muy altos.

En la figura 114 se muestra una tercera configuración que resultó ser la definitiva pues mostró el mejor desempeño.

La operación del sistema (ver figura 166 (a la derecha)) comenzó con la activación de V2 (NaBH_4) durante un período de 15 s. , 5 s después de la activación de V2, se activó V1 durante 5 s para introducir el segmento de muestra

(equivalente a 0.6 mL) y luego se apagó. Para asegurar que la disolución de NaBH_4 estuviera pasando antes, durante y después de la introducción del segmento de muestra es que V2 permaneció encendida 5 s más completando un período de 15 s (equivalente a 0.425 mL). Luego que V2 se apagó, se continuó con todas las válvulas apagadas durante un período adicional de 7 s. Esto permitió la adquisición de los datos correspondientes a la señal de medida y retorno a línea de base, para posteriormente comenzar una nueva secuencia. El tiempo total para completar un ciclo analítico fue de 22 s.

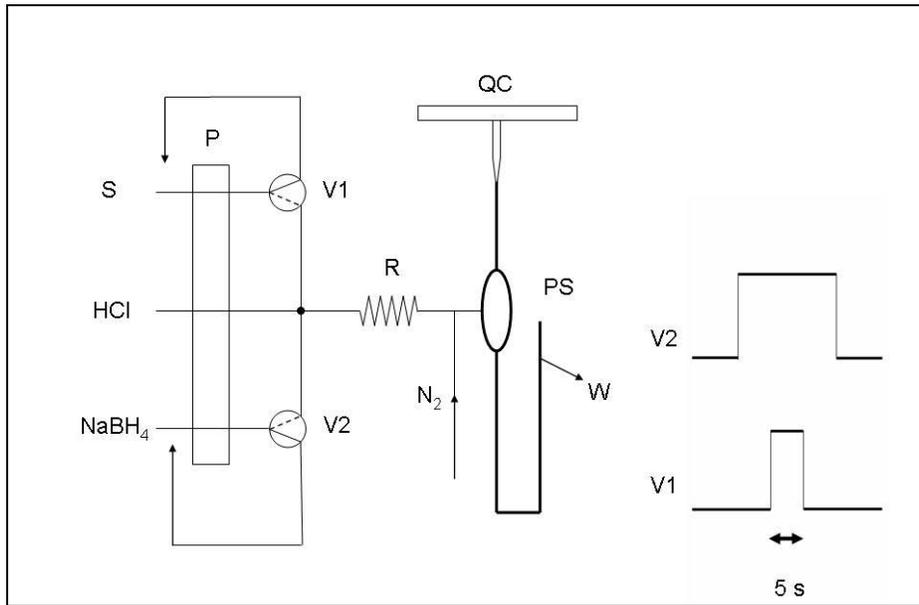


Figura 114- Sistema multiconmutado de 2 válvulas y confluencia en forma de cruz (a la izquierda) y diagrama de tiempos (a la derecha). S: muestra, R: reactor de mezcla de 50 cm, PS: separador de fases, QC: celda de cuarzo, W: descarte, P: bomba peristáltica



Figura 115- Fotografía del sistema en flujo con dos válvulas.



Figura 116- Fotografía del sistema en flujo acoplado al sistema de detección.

Las señales analíticas se presentaron en pantalla en tiempo real, posteriormente se escalaron y se guardaron en el disco duro del PC en formato ASCII. Los datos brutos se procesaron con el *software Peak Simple* (SRI, Torrance, CA, USA). Con este programa fue posible realizar el suavizado de la señal, corrección de línea de base, y medida de altura de pico. Finalmente podía obtenerse un reporte impreso.

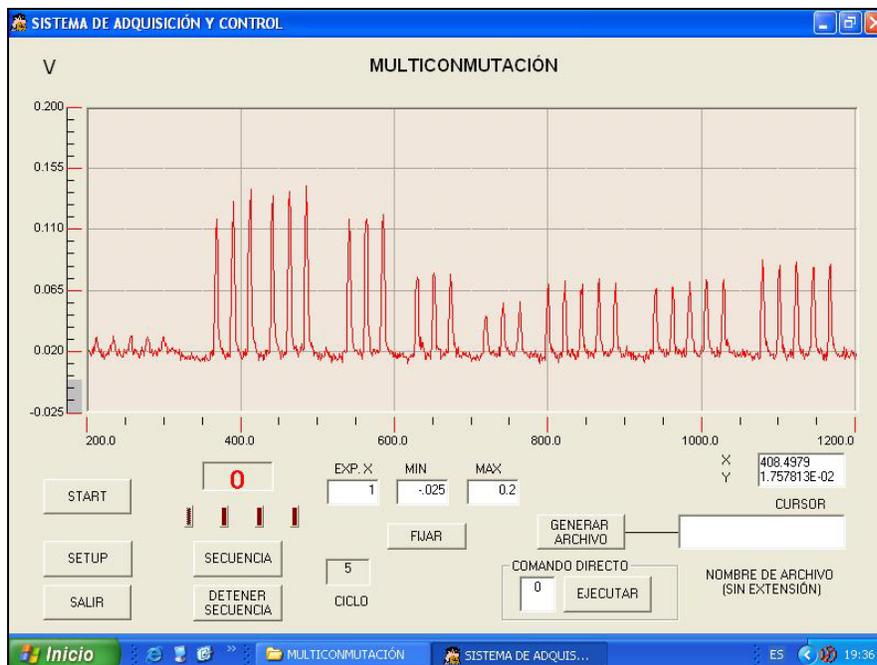


Figura 117- Impresión de pantalla del programa para control de secuencias y adquisición de datos.

Se estudió la influencia de 3 variables (concentración de HCl y NaBH₄ y largo de la bobina de mezclado) mediante un diseño experimental central compuesto de 3 niveles. La máxima sensibilidad (pendiente de la curva de calibración de rutina), con buena precisión y linealidad se observó cuando se utilizaba HCl 5%(v/v), NaBH₄ 0.5 %(m/v) y una bobina de mezclado de 100 cm.

Los flujos de HCl y NaBH₄ se mantuvieron según fueron optimizados en los sistemas en flujo diseñados anteriormente. En el caso del flujo de HCl fue necesario disminuirlo a 3.2 mL/min, debido a sobrepresiones que se generaban en el sistema. Este cambio no afectó la sensibilidad en forma significativa.

Finalmente las condiciones de flujo y concentración de ácido y reductor seleccionados fueron: HCl 5%(v/v), NaBH₄ 0.5 % (m/v) con flujos de 3.2 mL/min y 1.7 mL/min respectivamente.

El flujo de la muestra fue 7.2 mL/min y la bobina de mezcla de 100 cm.

También se realizó una prueba para evaluar si era factible cambiar el portador HCl por agua. Se compararon las pendientes de las curvas de calibración de rutina (sensibilidad) utilizando agua y HCl 5% (v/v) como portador. Los resultados se muestran en la figura 118.

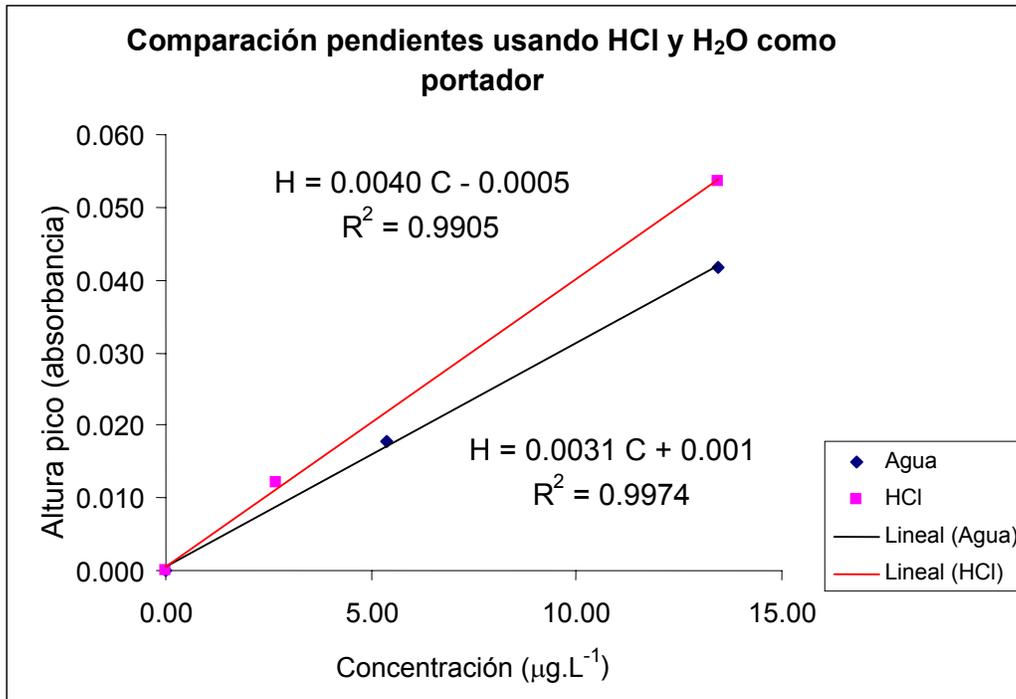


Figura 118 - Comparación de pendientes de la curva de calibración utilizando agua y HCl como portador. H: altura de pico, C concentración en µg.L⁻¹.

No solamente se observó la disminución de la sensibilidad cuando se utilizaba agua como portador, sino que dentro del sistema se formaron una gran cantidad de burbujas. Esto hizo que se zafaran las conexiones y se formó espuma en el separador gas-líquido. Incluso se observó que el líquido pasaba hacia la celda de atomización de cuarzo. Debido a esto se decidió continuar trabajando con HCl 5 % (v/v) como portador.

También se estudió la influencia del caudal del gas portador (nitrógeno).

En la tabla 24 se muestran los resultados de dicho experimento y en la figura 119 su representación gráfica. El flujo de gas portador óptimo fue 0.32 mL/min.

Tabla 24 -Influencia del caudal del gas portador.

Nitrógeno (L/min)	Absorbancia patrón 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$	s_r (%) n=3
0.22	0.074	12.3
0.32	0.077	0.8
0.48	0.072	3.7
0.81	0.050	4.2
1.0	0.050	4.2
1.3	0.049	5.9
1.6	0.047	2.5

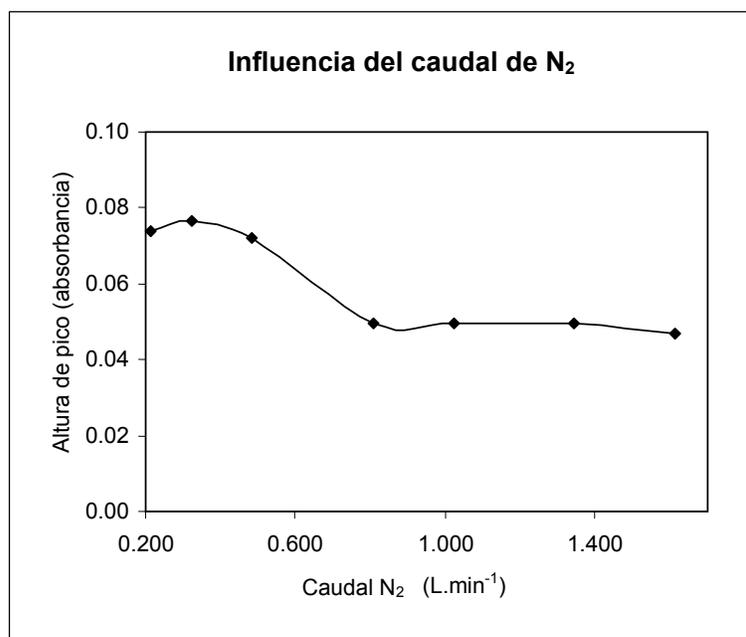


Figura 119- Influencia del caudal del gas portador.

El volumen de muestra se optimizó variando el tiempo de muestreo. La respuesta medida como absorbancia (altura de pico) de una disolución patrón varió en un rango de 0.061 a 0.106 cuando el volumen de muestra se varió en el rango de 0.24 a 0.60 mL, pero no mostró cambios significativos cuando se aumentó a 1.2 y a 2.4 mL. Se escogió un volumen de 0.6 mL (correspondiente a un tiempo de muestreo de 5 s) ya que permitía una alta frecuencia de muestreo, que en condiciones optimizadas alcanzó las 160 muestras por hora (160 hora^{-1}).

Para minimizar el efecto *carry over* se diseñó una secuencia de “purga” o limpieza del sistema que operó cuando se realizaba un cambio de disolución patrón o muestra. La misma se ejecutó desde el mismo programa diseñado para esta aplicación.

5.3.3.3. Preparación de las muestras

El muestreo y almacenamiento de las leches en polvo y fórmulas infantiles ya fue discutido en la sección 5.1.1.4

En la sección 5.3.1.4 se explicó como se fueron optimizando diferentes tratamientos para la preparación de las muestras para leche en polvo. El procedimiento definitivo se detalla a continuación.

Leche en polvo: preparación de la muestra

Cada vez que se realizó un análisis previamente se tomaron sub-muestras del polvo de diferentes sitios del recipiente que contenía el producto. Se homogeneizó por mezclado antes de hacer la toma en peso.

Se pesaron exactamente 0.50 g de leche en polvo comercial o material del referencia certificado en un vial de Teflon PFA (Savillex, Minnetonka, MN, USA) de capacidad 30 mL con tapa rosca. Luego se agregaron 6 mL de ácido nítrico concentrado. El vial se tapó pero solo con una vuelta de rosca y se colocó en un recipiente de polipropileno modificado (del tipo olla doméstica para cocinar en horno de microondas). Dicho recipiente se colocó en un microondas doméstico (Ariston modelo MO991B) y se calentó para proceder a la digestión de la muestra. El microondas utilizado se usó para digestión de cementos en trabajos anteriores por lo que se contó con un mapeo de energía realizado en dichos trabajos (Pignalosa, *et al.*, 2001). Esta información se utilizó para colocar el recipiente que contenía los viales con las muestras (olla de polipropileno) de forma de

aprovechar las zonas de mayor temperatura. La olla se modificó de forma de poder evacuar vapores ácidos generados durante la digestión. Para ello se le colocó un tubo flexible que condujo los vapores ácidos directo a un recipiente con hidróxido de sodio. De esta manera los vapores fueron allí neutralizados. El recipiente actuaba entonces como trampa para los mismos.

Se optimizó un programa con varias etapas para la digestión con microondas como se detalla a continuación:

Etapa 1 - Calentamiento durante 5 minutos a 30% del máximo de potencia.

Etapa 2 - Calentamiento durante 3 minutos a 40% del máximo de potencia.

Etapa 3 -Se retiró la olla del microondas y se dejó enfriar a temperatura ambiente, se abrió cada vial y se colocó 1 mL de peróxido de hidrógeno, se volvió a cerrar cada vial (con una sola vuelta de rosca pues cerrar completamente podía ocasionar una explosión) luego del agregado, se cerró la olla y se colocó nuevamente en el microondas.

Etapa 4 - Calentamiento durante 2 minutos a 40% del máximo de potencia.

Al finalizar el proceso se dejó enfriar la olla y luego se retiraron los viales de su interior (en la olla se podían colocar hasta 6 viales cada vez).

El contenido de los viales se inspeccionó visualmente, si se obtenía una disolución clara, límpida de color caramelo era un indicador de que la digestión procedió en forma adecuada. Si el digesto era turbio o con restos de materia grasa en suspensión, la digestión debía repetirse. Sin embargo luego de la optimización si se seguían los pasos ya descritos en forma cuidadosa el resultado era una correcta mineralización.

El contenido del vial posteriormente se transfirió cuantitativamente a un erlenmeyer de capacidad 50 mL. Este recipiente contenía 10 mL de una disolución de ácido sulfámico al 10% (m/v) y 10 mL de HCl concentrado. A continuación se realizó la pre-reducción calentado en placa calefactora hasta alcanzar ebullición suave durante 1 hora. Luego se dejó enfriar a temperatura ambiente y finalmente se completó, en los casos que fuera necesario por la evaporación, un volumen final de 20.0 mL con agua destilada.

Las muestras ya mineralizadas y pre-reducidas como de la forma descrita se introdujeron al sistema de medida. En ningún caso fue necesario un paso previo de filtración.

En todas las corridas se incorporaron 2 blancos de reactivos para evaluar la posible contaminación en la etapa de mineralización. Estos blancos también fueron sometidos al proceso de pre-reducción igual que las muestras y patrones.

El las figuras 120 y 121 se muestra la olla dentro del microondas doméstico y una vista de la disposición de los viales dentro de la misma.



Figura 120- Horno de microondas y olla para digestión de muestras de leche en polvo.



Figura 121- Disposición de los viales dentro de la olla para digestión de muestras de leche en polvo.

Leche fluida: preparación de la muestra

Las muestras de leche fluida obtenidas de tambos se guardaron en recipientes descontaminados de polipropileno con tapa a presión y en heladera a temperatura entre 4-7 °C. Antes de ser usadas para un análisis se retiraron de la heladera y se dejaron a temperatura ambiente hasta que la leche alcanzó dicha temperatura. Posteriormente se agitó el frasco para homogeneizar la muestra antes de tomar la alícuota para el análisis. En el caso de leches comerciales se compró en bolsitas en supermercados de Montevideo y se guardaron en heladera a 4-7 °C. Antes de ser usadas para el análisis se retiraron de la heladera y se dejaron a temperatura ambiente hasta que la leche alcanzó esta temperatura, luego se agitó para homogeneizar el contenido de la bolsa antes de tomar la alícuota para el análisis.

Una alícuota de 2.0 mL de leche fluida homogeneizada se mezcló en un erlenmeyer de 50 mL con 5 mL de *agua regia* (HCl/HNO₃ 3+1 en volumen), y se llevó a volumen 10.0 mL con agua destilada. Posteriormente se sonicó por 20 minutos en un equipo de ultrasonido (Cole Parmer® modelo 8890). Los erlenmeyers se taparon con un film para evitar las proyecciones ácidas durante los minutos de sonicación.

Luego de la etapa de sonicación se obtuvo una suspensión de color rojizo. A esta suspensión se le agregó a continuación 10 mL de ácido sulfámico al 10% (m/v), 0.5 mL de butanol que actuó como antiespumante y 10 mL de HCl concentrado. Se calentó en placa calefactora a ebullición lenta durante 1 hora y posteriormente se dejó enfriar (pre-reducción). El volumen final luego de este procedimiento fue

aproximadamente 19-20 mL, por lo que todos los digestos fueron llevados a 20 mL en caso de haber quedado con menor volumen.

Luego de todo el proceso de mineralización y pre-reducción no se obtuvo una disolución límpida sino una suspensión que no pudo ser introducida directamente en el sistema en flujo. Por lo tanto fue necesario filtrar. Para ello se utilizó una membrana de 25-mm de diámetro, 0.45- μm de PTFE descartable montada en una jeringa por la que se hizo pasar la muestra.

Se realizaron adiciones estándar a dos niveles de concentración para las determinaciones de selenio en leche fluida. Para ello de cada muestra de leche fluida se tomaron tres alícuotas de 2.0 mL y se colocaron en tres erlenmeyers. A una de ellas no se le adicionó patrón y se preparó tal cual se indicó anteriormente (C_0). A las otras dos porciones se les agregó 0.1 mL (C_1) y 0.15 mL (C_2) de la disolución estándar de selenio de $0.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (respectivamente para el primer y segundo nivel de adición). Las tres porciones se trataron con agua regia como ya se explicó. De esta forma se construyeron curvas de calibración de adiciones estándar. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada muestra.

5.3.3.4. Resultados y discusión

5.3.3.4.1. Validación

Todos los conceptos explicados en la sección 3.5 se aplicaron para la validación

Linealidad

Para evaluar la linealidad se midió un blanco y 8 disoluciones patrón en el rango de 1 - 27.5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (n=5 en todos los caso excepto para el nivel 1 y 10 donde n=10 para evaluar también precisión instrumental).

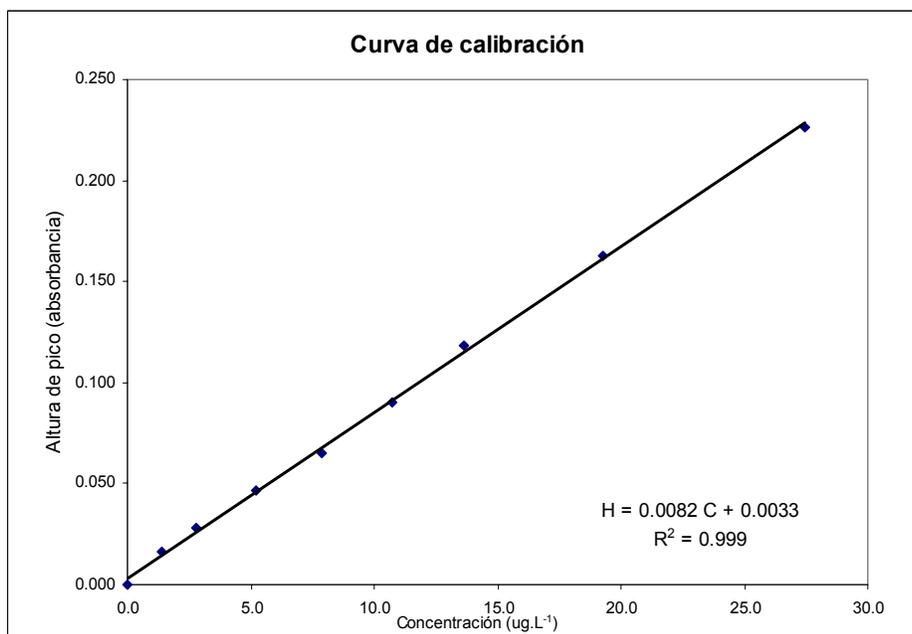


Figura 122- Curva de calibración para la determinación de selenio mediante MCFA-HGAAS. H: altura de pico, C: concentración.

En la figura 123 se muestra el registro correspondiente al estudio de linealidad y precisión instrumental.

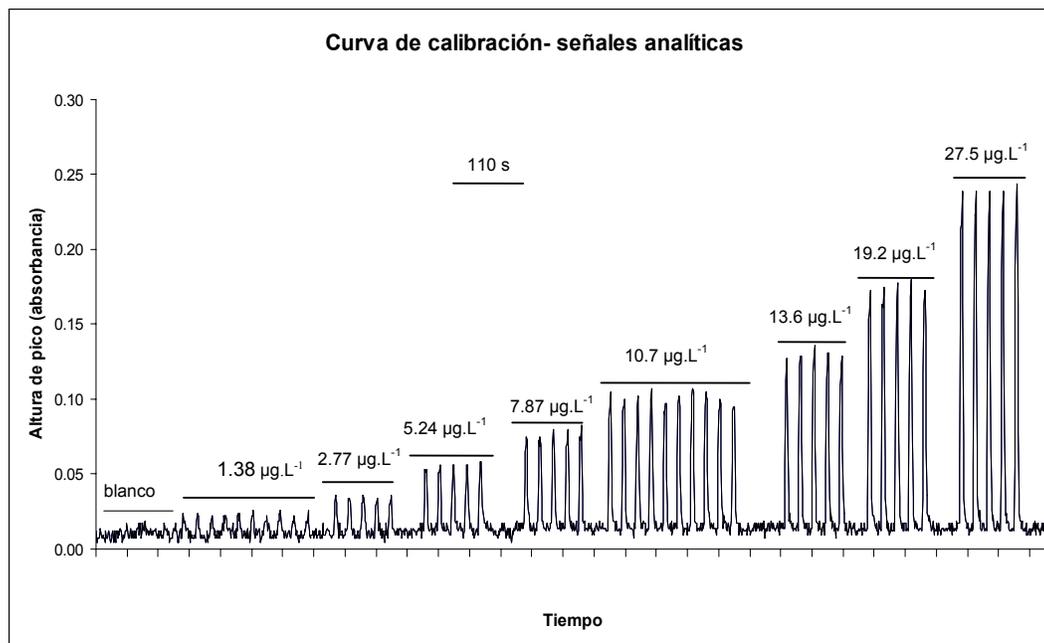


Figura 123- Registro de señales analíticas. Evaluación de linealidad y precisión. Se indica la escala de tiempos con un segmento equivalente a 110 s.

La curva de calibración de rutina abarcó un rango menor debido a que las concentraciones de selenio esperadas luego de la preparación de la muestra no superaron los 5 µg.L⁻¹. Por este motivo una curva de calibración de rutina de 1-10 µg.L⁻¹ resultó adecuada.

La recta de mejor ajuste surgió de tratamientos estadísticos y de la aplicación de un test de hipótesis (*lack of fit*). Los criterios aplicados ya fueron explicados en la sección 3.5.

Dependiendo del tiempo uso de la celda de cuarzo la pendiente de la curva de calibración varió hasta un 20 % de un día a otro.

De la validación surgió que el modelo de mejor ajuste fue $H = 0.0082 C + 0.0033$ (H= altura de pico, C= concentración en $\mu\text{g.L}^{-1}$).

La variación de la pendiente de la curva de calibración de rutina fue un parámetro utilizado para aseguramiento de la calidad y control para evaluar cuando sustituir la celda de cuarzo. El criterio adoptado fue: si la pendiente disminuía más de 20% respecto al valor 0.0082 no debía realizarse el análisis y la celda se acondicionaba o se reemplazaba.

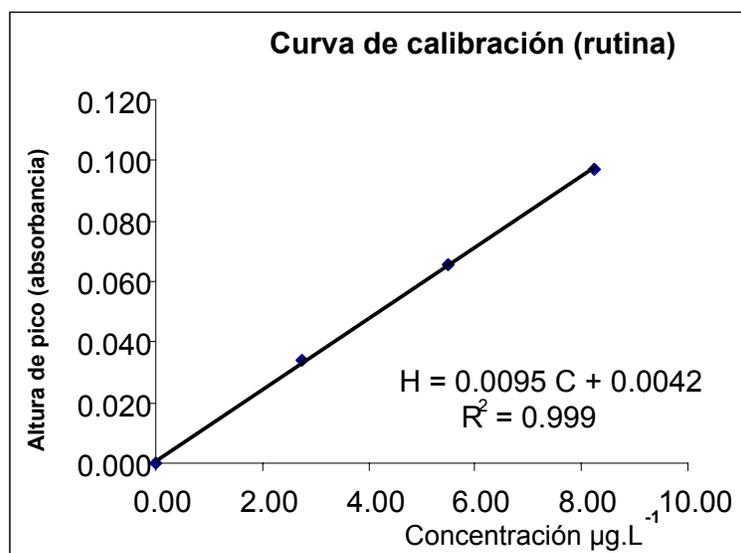


Figura 124 - Curva de calibración realizada en el trabajo de rutina para la determinación de selenio. H: altura de pico, C: concentración

Precisión

La precisión instrumental se evaluó calculando el s_r (%), para 10 repeticiones de la secuencia de análisis sobre una disolución patrón de $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ y de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$.

La precisión del método se evaluó realizando 5 determinaciones analíticas independientes sobre el material de referencia certificado (muestras sólidas) y sobre 7 determinaciones independientes utilizando el método de adiciones estándar para leche fluida. Estas determinaciones se realizaron en condiciones de repetibilidad intermedia.

Límites de detección y cuantificación

Los límites fueron estimados midiendo la dispersión del blanco (3s y 10s para límite de detección y cuantificación respectivamente, $n=10$) y refiriéndola a la curva de calibración. Debido a que el software utilizado no pudo informar el dato de altura de pico para las señales del blanco se trabajó directamente con los datos de los archivos ASCII generados por el programa de adquisición de datos. Del procesamiento de estos datos generados por la inyección de 10 disoluciones blancos se calculó la desviación estándar para calcular los límites de detección y cuantificación.

Veracidad

Para establecer la veracidad del método propuesto se utilizaron dos materiales de referencia certificados en el caso de la leche en polvo y fórmulas infantiles (NIST 1549 Non-fat milk powder y NIST 1846 Infant Formula). Estos materiales fueron

adecuados ya que coinciden con el tipo de muestras para las que se propone el método.

En el caso de la leche fluida no se contó con material de referencia certificado. Se decidió comenzar entonces evaluando la existencia de posibles interferencias multiplicativas comparando la pendiente de la curva de calibración directa con la pendiente de la curva de calibración de adiciones estándar. Como ya se explicó en la sección 5.3.3.3 se realizaron dos adiciones.

La comparación estadística de las pendientes indicó que en algunas muestras existía efecto matriz, por lo que se decidió aplicar el método de adiciones estándar para todas las muestras. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla tabla 25

Tabla 25- Comparación de pendientes de calibración de calibración directa y adiciones estándar. La diferencia se expresa con respecto a la calibración directa.

Pendiente (L.µg⁻¹) (adiciones estándar)	Pendiente (L.µg⁻¹) (calibración directa)	Diferencia %
0.0074	0.0089	-16.9
0.0077	0.0089	-13.5
0.0105	0.0089	18.0
0.0083	0.0089	-6.7
0.0093	0.0089	4.5
0.0072	0.0104	-30.8
0.0077	0.0104	-26.0

Interferencias

La influencia de los concomitantes afecta casi exclusivamente a la eficiencia de la generación del hidruro o la liberación del mismo. Los mismos se encuentran generalmente en exceso respecto a la concentración del analito. El proceso en el que interfieren es entonces de primer orden, esto significa que la interferencia no depende de la concentración del analito o de la relación analito/interferente, sino de la concentración en la que se encuentra el interferente en la matriz (Welz y Sperling, 1999).

A pesar de no existir evidencia de posibles interferencias debidas a la presencia de metales de transición se realizó de todas formas un experimento sencillo para confirmar este hecho.

Se muestra en la tabla 26 las concentraciones de tres potenciales interferentes en la matriz leche para la determinación de selenio mediante generación de hidruros. Hierro, cobre y zinc fueron considerados los tres de mayor relevancia en esta matriz.

Tabla 26 - Concentraciones de potenciales interferentes en las muestras analizadas según se indica en la literatura.

Analito	Leche fluida (mg.L ⁻¹) ^a	Leche en polvo (mg.kg ⁻¹) ^a	Material de referencia (Non – fat milk powder) (mg.kg ⁻¹) ^b	Fórmulas Infantiles comerciales (mg.kg ⁻¹) ^c	Material de referencia (Infant Formula) (mg.kg ⁻¹) ^b
cobre	0.07	0.9	0.7	3.1	5.04
zinc	4.5	45	46.1	46	60
hierro	0.1	1.0	1.78	89	63.1

^a valores obtenidos de la literatura (Flynn y Cashman, 1997), ^b valores informados en los certificados del material de referencia, ^c valores informados por el fabricante en el rótulo del producto.

En la tabla 27 se muestran las concentraciones de los mismos interferentes pero al nivel que se encuentran una vez que se completa toda la preparación de la muestra ya descrito. Son las concentraciones finales en las disoluciones de medida que ingresaron al sistema en flujo.

Tabla 27 - Concentraciones de potenciales interferentes en las disoluciones.

Analito	Leche fluida (mg.L ⁻¹)	Leche en polvo (mg.L ⁻¹)	Material de referencia (Non – fat milk powder) (mg.L ⁻¹)	Fórmulas Infantiles comerciales (mg.L ⁻¹)	Material de referencia (Infant Formula) (mg.L ⁻¹)
cobre	0.007	0.022	0.018	0.08	0.126
zinc	0.45	1.15	1.15	1.15	1.5
hierro	0.01	0.044	0.044	2.22	1.58

Se prepararon dos disoluciones patrón de Se(VI) (a partir de la disolución *stock* de Se 1000 mg.L⁻¹) de 1 y 10 µg.L⁻¹ con y sin agregado de los interferentes. Las concentraciones agregadas fueron aquellas que coincidían con la situación más desfavorable (similares a las de las fórmulas infantiles). Luego del agregado de las alícuotas de cada disolución *stock* de cobre, hierro y zinc correspondientes se realizó la pre-reducción como fue descrito en la sección 5.3.3.3.

El mismo experimento se realizó agregando 10 veces más la concentración de interferentes antes seleccionada. En todos los casos se preparó también un blanco con y sin agregado de interferentes.

En todos los casos la amplitud de la señal no varió en más de un 8% comparado con los patrones sin agregado de interferentes. Se consideró que esto era una variación no significativa teniendo en cuenta que la precisión instrumental estaba en el rango de 1.4 a 11.7%.

Las interferencias debidas al la presencia de óxidos de nitrógeno volátiles o nitrito se resolvieron con el agregado de ácido sulfámico 10% (v/v) a las muestras durante la etapa de pre-reducción.

Cuando se ha demostrado que el proceso analítico está en estado de control estadístico, la desviación estándar del proceso puede usarse para evaluar el intervalo de confianza para la media de n mediciones. Para demostrar que el proceso está bajo control estadístico se evaluó la pendiente de la curva de calibración diaria y la precisión.

Se realizó además una evaluación de las posibles fuentes de incetidumbre del método propuesto. Para ello se identificaron las fuentes posibles de incertidumbre a saber: preparación de los patrones (pureza del patrón, pesada, errores por preparación de diluciones), preparación de los reactivos (pureza de los reactivos, pesada, errores por preparación de diluciones), preparación de la muestra (pesada), proceso de medición (precisión instrumental, repetibilidad, medida de altura de pico, incertidumbre de adquisición de datos).

Las diluciones se prepararon por peso por lo que el error inherente a las pesadas estuvo relacionado con la incertidumbre informada en el certificado de calibración de la balanza. La incertidumbre en la pureza del patrón y reactivos fueron poco significativos frente otros factores.

La mayor fuente de incertidumbre surge de la repetibilidad del método. La misma fue del mismo orden de la incertidumbre informada en el certificado del material de referencia.

5.3.3.4.2. Cifras de mérito

En la tabla 28 se muestran los resultados de la validación.

Tabla 28- Cifras de mérito de la determinación de selenio mediante un sistema MCFA.

Parámetro	Resultado obtenido
Límite de detección (<i>calculado como 3σ sol. blanco/pend. calibración, $n=10$</i>)	0.08 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en disolución, 0.8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en leche fluida, 3.2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ en muestras sólidas
Límite de cuantificación (<i>calculado como 10σ sol. blanco/pend. calibración, $n=10$</i>)	0.27 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en disolución, 2.7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en leche fluida, 10.8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ en muestras sólidas
Rango lineal ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	0.27 a 27 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ($r^2 = 0.999$)
Precisión s_r (%) ($n=5$)	<10 (rango de 4.2 a 9.3)
Precisión instrumental s_r (%) ($n=10$)	1.4 – 11.7
Frecuencia de muestreo (hora^{-1})	160

En la tabla 29 se muestran los resultados de la evaluación de veracidad. Se realizó una prueba de significación t según se explicó en la sección 3.5. La comparación estadística de los valores obtenidos y el valor informado en el certificado indicaron que ambos son equivalentes (valor absoluto t -experimental < t -crítico).

El método propuesto no presenta sesgo. Considerando la incertidumbre informada por el material de referencia NIST-1549 y la precisión obtenida con el método propuesto, el mismo se puede considerar exacto.

Tabla 29. Contenido de selenio total obtenido en los materiales de referencia certificados.

Material de referencia certificado	Valor certificado (mg kg ⁻¹)	Valor obtenido (media ± s) (mg kg ⁻¹) (n = 5)	t - experimental
NIST 1549 (Non-Fat Milk Powder)	0.11 ± 0.01	0.1065 ± 0.0045	-1.78
NIST 1846 (Infant Formula)	0.08 (*)	0.0807 ± 0.0075	0.21

Se compararon los resultados obtenidos mediante una prueba *-t* (Student) con el valor informado en el certificado del material de referencia (μ): $H_0: \bar{x} = \mu$, $H_A: \bar{x} \neq \mu$; s = desviación estándar; t -crítico (0.05, 4) = 2.78 (Miller y Miller, 1993, pp 40)

(*) Valor informado NIST (no informa incertidumbre, no es un valor certificado). Los resultados se expresan en base seca.

En la tabla 30 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación de veracidad para leche fluida. Se muestran los datos de concentración agregada y concentración obtenida para dos niveles de adición realizados como se explicó en la sección anterior. Para concluir se evaluó mediante una prueba de significación la diferencia entre el porcentaje de recuperación obtenido, a dos niveles de concentración y el valor teórico 100%.

Los resultados obtenidos indicaron que los porcentajes de recuperación obtenidos no difieren significativamente del valor 100%.

Tabla 30. Evaluación de veracidad para la determinación de selenio total en leche fluida.

NIVEL 1					
Muestra	Conc. agregada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Conc. hallada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	%R	Media (%)	s_r %
1	3.381	3.353	99.2	97.8	5.2
2	3.014	2.642	87.7		
3	3.111	3.111	100.0		
4	3.013	3.112	103.3		
5	3.676	3.676	100.0		
6	3.274	3.100	94.7		
7	3.338	3.338	100.0		
NIVEL 2					
Muestra	Conc. agregada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Conc. hallada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	%R	Media (%)	s_r %
1	6.514	6.529	100.2	102.2	5.3
2	5.928	6.117	103.2		
3	6.498	6.502	100.1		
4	6.991	6.599	94.4		
5	6.219	6.225	100.1		
6	6.045	6.468	107.0		
7	6.596	7.297	110.6		

Nota del autor:

El sistema en flujo multiconmutado fue validado también para la determinación de arsénico y selenio en agua de consumo humano. Si bien esto no formó parte de los objetivos de esta tesis nos pareció importante destacarlo ya que se demostró que el sistema puede utilizarse para la determinación de selenio en otras matrices y para determinar otros analitos.

Estas aplicaciones fueron difundidas según se detalla a continuación:

- “Método automatizado para la determinación de arsénico total en muestras de agua mediante HG-AAS”. 8vo Simposio Latinoamericano de Química Analítica Ambiental y Sanitaria, llevado a cabo del 16 al 20 de febrero del 2009 en San José, Costa Rica (se presentó un póster).
- “Automated method for total selenium determination in drinking water samples by HG-AAS”. 3rd Hemispherical Conference on Medical Geology, a realizarse del 13 al 16 de octubre de 2009 en Montevideo, Uruguay (trabajo aceptado).

En el anexo II se encuentran las constancias y resúmenes correspondientes.

Habiendo validado la metodología analítica se analizaron una serie de muestras de leche. Del total de las muestras analizadas 10 de ellas fueron de leche fluida. De estas muestras 4 fueron de un tambo de Florida y 4 de un tambo de Libertad. De cada tambo se extrajeron 10 muestras correspondientes a 10 vacas individuales. Tres de esas muestras fueron analizadas en forma individual y con las restantes 7 se realizó un *pool* ya que se consideraron muestras de la misma población. Los resultados se presentan en la tabla 31.

Expresión de resultados

Se analizaron 17 muestras de leche en polvo entera y 2 muestras de suero en polvo proporcionadas por una empresa láctea.

Los resultados obtenidos para leche en polvo y fórmulas infantiles se informaron en $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y se expresaron en base seca.

Los resultados de las muestras de leche en polvo se expresaron estimando la incertidumbre como la desviación estándar (s). Se realizaron las determinaciones independientes por triplicado y en los casos en que la precisión $s_r(\%)$ fue menor a 10 % se promediaron los valores obtenidos y se informó: promedio $\pm s$.

Este criterio surgió de considerar la precisión en condiciones de repetibilidad intermedia del método. Cuando el valor de $s_r\%$ fue mayor a 10% se realizó un tratamiento de datos para muestras muy pequeñas, sin promediar los valores (Ramis *et al.*, 2001). Para ello se estimó la desviación estándar (s^*) a partir del intervalo intercuartílico y el resultado se expresó como la mediana (mediana $\pm s^*$).

En algunos casos no fue posible realizar triplicados y se realizó la determinación por duplicado. En ese caso se informó el rango y la diferencia entre ambos valores (rango \pm diferencia entre duplicados). Los resultados se muestran en la tabla 32 y 33.

Además se determinó la concentración de selenio total en 6 fórmulas infantiles. En todos los casos se realizaron las determinaciones por triplicado. Debido a que en ningún caso la dispersión entre triplicados superó el valor de s_r % del método, los resultados se promediaron y se informaron con su desviación estándar (promedio \pm s).

En la tabla 34 se muestran las características (información de la rotulación) de las muestras disponibles en el mercado Uruguayo y en la tabla 35 los resultados obtenidos.

Las concentraciones de selenio total se expresaron en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para leche fluida. En todos los casos se realizaron las determinaciones por triplicado. Debido a que en ningún caso la dispersión entre triplicados superó el valor de s_r % del método, los resultados se promediaron y se informaron con su desviación estándar (promedio \pm s).

Como ya se discutió en la sección anterior se consideraron las fuentes de incertidumbre que tienen mayor contribución en el resultado final de las determinaciones analíticas.

La incertidumbre entonces se expresó en términos de desviación estándar, considerando las condiciones de repetibilidad intermedia. De esta manera se contempló el factor de mayor peso en la contribución a la incertidumbre total.

Tabla 31- Contenido de selenio en leche fluida.

Leche de tambo de Florida extraídas en diciembre del año 2008	código interno asignado	Concentración de de selenio \pm s ($\mu\text{g.L}^{-1}$) (n=3)
Vaca individual	2362	25.9 \pm 1.6
Vaca individual	1647	19.8 \pm 1.2
Vaca individual	2224	15.2 \pm 1.8
<i>pool</i>	2065,2420,925	16.1 \pm 1.0
Leche de tambo de Libertad extraídas en diciembre del año 2008	código interno asignado	Concentración de de selenio \pm s ($\mu\text{g.L}^{-1}$) (n=3)
Vaca individual	LA	20.1 \pm 1.2
Vaca individual	L2	19.9 \pm 1.6
Vaca individual	L3	14.3 \pm 1.0
<i>pool</i>	4,1,118	11.5 \pm 1.1
Leche comercial comprada en el mercado local	código interno asignado	Concentración de de selenio \pm s ($\mu\text{g.L}^{-1}$) (n=3)
Leche descremada Pili	LP	18.9 \pm 1.8
Leche entera Conaprole	LC	34.1 \pm 2.5
Rango ($\mu\text{g.L}^{-1}$)		11.5 - 34.07
Media ($\mu\text{g.L}^{-1}$)(n=10)		19.56

Resultados de la determinación de selenio total en 10 muestras de leche fluida uruguayas (mg.L^{-1}) utilizando un sistema en flujo multiconmutado con generación de hidruros. s: desviación estándar. El código interno asignado se refiere a una marca (caravana) que se le coloca al ganado para su identificación.

Si bien son pocas las muestras de leche fluida analizadas, los datos indicaron que estas muestras se encuentran dentro de la media mundial ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) según se comentó en la sección 3.1.5.

Tabla 32- Contenido de selenio en suero en polvo.

Muestra (código interno)	Concentración ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) \pm s	Observaciones
S1(n=3)	33.8 ± 6.1	(mediana \pm s*)
S2 (n=3)	35.3 ± 3.0	(promedio \pm s) sr (%) = 9.0

Resultados de la determinación de selenio total en 2 muestras de suero en polvo ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) utilizando un sistema en flujo multiconmutado con generación de hidruros. s: desviación estándar, s* = estimación de desviación estándar a partir del Intervalo intercuartílico. Los resultados de expresan en base seca.

Se analizaron solamente dos muestras de suero en polvo por lo que de los resultados obtenidos no se puede extraer ninguna conclusión significativa.

En las muestras de leche en polvo el rango varió de 31 a $130 \mu\text{g.kg}^{-1}$ lo cual estuvo acorde a los datos reportados en la literatura (ver sección 3.1.5).

Los resultados de muestran en la tabla 33.

Tabla 33- Contenido de selenio en leche en polvo entera.

Muestra (código interno)	Concentración ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) \pm s	Observaciones
L1 (n=2)	51 – 67	Mínimo-máximo
L2 (n=3)	71 \pm 6	s_r (%) = 8.3
L3 (n=2)	105 - 128	Mínimo-máximo
L4 (n=3)	80 \pm 5	(promedio \pm s) s_r (%) = 5.7
L5 (n=3)	33.8 \pm 6.0	(mediana \pm s*)
L6 (n=2)	55 - 80	Mínimo-máximo
L7 (n=3)	75 \pm 5	(promedio \pm s) s_r (%) = 6.9
L8 (n=3)	80 \pm 6	promedio \pm s s_r (%) = 7.8
L9 (n=3)	93 \pm 15	(mediana \pm s*)
L10 (n=3)	96 \pm 7	(promedio \pm s) s_r (%) = 7.3
L11 (n=3)	100 \pm 2	(promedio \pm s) s_r (%) = 2.2
L12 (n=3)	66 \pm 4	(promedio \pm s) s_r (%) = 6.7
L13 (n=3)	74 \pm 6	(promedio \pm s) s_r (%) = 7.6
L14 (n=3)	72 \pm 14	(mediana \pm s*)
L15 (n=3)	49.3 \pm 1.0	(promedio \pm s) s_r (%) = 2.0
L16 (n=3)	30.8 \pm 0.1	(promedio \pm s) s_r (%) = 0.5
L20 (n=3)	36 \pm 14	(mediana \pm s*)

Resultados de la determinación de selenio total en 17 muestras de leche en polvo uruguayas ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) utilizando un sistema en flujo multiconmutado con generación de hidruros. Cuando n=2 se informa el rango de valores (mínimo-máximo) obtenido.

s: desviación estándar, s* = estimación de desviación estándar a partir del Intervalo intercuartílico. Los resultados se expresan en base seca.

Tabla 34. Contenido de selenio en fórmulas infantiles

Se total ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Muestra					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Valor declarado	150	150	ND	ND	40	120
Valor obtenido \pm s	138 \pm 10	135 \pm 3	84 \pm 6	56 \pm 14	42 \pm 2	116 \pm 3
Apartamiento relativo (%)	8	10	--	--	4.8	3.3

Resultados de la determinación de selenio total en 6 muestras de fórmulas infantiles del mercado Uruguayo (mg.kg^{-1}) utilizando un sistema en flujo multiconmutado con generación de hidruros. ND: no declara (estas muestras contienen solo el selenio intrínseco de la base láctea) s: desviación estándar. Los resultados se expresan en base seca (n=3).

Tabla 35- Características de las formulaciones infantiles analizadas.

código interno	Características de la muestra según información del fabricante en la rotulación.
F3	Fórmula láctea en polvo con hierro para lactantes de inicio. Fabricado en Brasil Niños de 1 y 2 semanas: 13.2 g + 90 mL agua (6 veces por día) 7 meses en adelante: 30.8 g + 210 mL agua (3 a 4 veces al día) Se considera solo se alimentan con la fórmula infantil
F5	Fórmula láctea en polvo sin lactosa para lactantes, niños y adultos. Fabricado en Holanda Niños de 1 y 2 semanas: 13.3 g + 90 mL agua (6 veces por día) 7 meses en adelante: 30.8 g + 210 mL agua (3 a 4 veces al día) Se considera solo se alimentan con la fórmula infantil
F1	Fórmula láctea de inicio en polvo con hierro para lactantes (6-12 meses). Fabricado en Argentina Niños de 1 y 2 semanas: 13.5 g + 90 mL agua (6 veces por día) 7 meses en adelante: 30.8 g + 210 mL agua (4 veces al día) Se considera solo se alimentan con la fórmula infantil
F2	Formulación de continuación en polvo con hierro para lactantes. Fabricado en Argentina Niños de 6 meses: 14.3 g + 90 mL agua, 36.4g + 220mL agua (4 veces por día) 7 meses en adelante: 30.8 g + 220 mL agua (3 veces al día) Se considera solo se alimentan con la fórmula infantil
F6	Fórmula infantil con hierro. Fabricado en Irlanda Niños de hasta 1 mes: 12.9 g + 90 mL agua, (6 veces por día) 7 meses en adelante 25.68g + 240 mL agua (5 veces al día) Se considera solo se alimentan con la fórmula infantil
F4	Producto de Conaprole discontinuado

Nota del autor:

La difusión de este trabajo está en proceso al momento de completar esta tesis según se detalla a continuación (las constancias correspondientes se muestran en el Anexo II):

- “Determinación de Selenio total en leche y formulas infantiles mediante Análisis en Flujo multiconmutado con detección HG-AAS”. 15° Encontro Nacional de Química Analítica e 3° Congresso Iberoamericano de Química Analítica, a realizarse del 18 al 21 de octubre de 2009 en Salvador, Bahía, Brasil (trabajo aceptado).
- “Determination of total selenium by multicommutated-flow hydride generation atomic absorption spectrometry. Application to cow’s milk and infant formulae”. Artículo enviado el 18 de junio a la revista “Analytical Methods” (en etapa de evaluación).

5.3.3.5. Conclusiones

El sistema en flujo multiconmutado desarrollado fue exitoso para la determinación de selenio total mediante la generación del hidruro de selenio en muestras de leche vacuna fluida, en polvo y en fórmulas infantiles.

El método propuesto fue optimizado y validado resultando exacto para la aplicación propuesta. El sistema presentó las ventajas de un sistema automatizado que además consume poca muestra y reactivos con la consiguiente reducción de los residuos químicos generados.

Se trata de una técnica muy rápida y flexible ya que las modificaciones en los parámetros de operación pueden realizarse mediante *software* sin la necesidad de cambiar el sistema.

Se optimizó y validó un método de preparación de muestra sencillo y rápido.

Los resultados obtenidos indican que el contenido de selenio total en las muestras analizadas se encontró en concordancia con los datos reportados en la literatura. Las fórmulas infantiles sin agregado de selenio no satisfacen los requerimientos mínimos de nutrición para la población a la que están dirigidos. Por otro lado las que tienen agregado de selenio (selenito de sodio) apenas cumplen el requerimiento mínimo de ingesta diaria.

5.3.4. Consideraciones nutricionales respecto a los valores de selenio obtenidos en leche vacuna y fórmulas infantiles de Uruguay.

Según las recomendaciones de consumo de los fabricantes de las fórmulas infantiles y considerando que los niños solo reciben esa alimentación, el rango de ingesta de selenio diario es de 5 a 19 $\mu\text{g}/\text{día}$.

La ingesta diaria recomendada para niños de corta edad es del orden de los 20 $\mu\text{g}/\text{día}$ y la literatura indica que este tipo de productos deberían proveer de 10 a 45 $\mu\text{g}/\text{día}$ de selenio (Flynn y Cashman, 1997).

Los resultados obtenidos indican que las formulaciones infantiles que no contienen selenio agregado no cumplen con los requerimientos mínimos para la nutrición en cuanto a niveles de selenio. Siempre considerando que esta población solo se alimenta de este producto.

Las formulaciones que contienen agregado de selenio (como selenito de sodio) apenas llegan al valor mínimo para cubrir dichos requerimientos.

Cabe destacar que luego del proceso industrial de secado los componentes de la matriz leche se concentran un factor de 10 aproximadamente. La leche en polvo analizada fue leche entera común secada, por lo que los resultados de leche en polvo pueden ser considerados también para concluir sobre contenido de selenio en leche uruguaya.

En la figura 125 se muestra un diagrama de cajas resumiendo los resultados para las tres series de muestras analizadas.

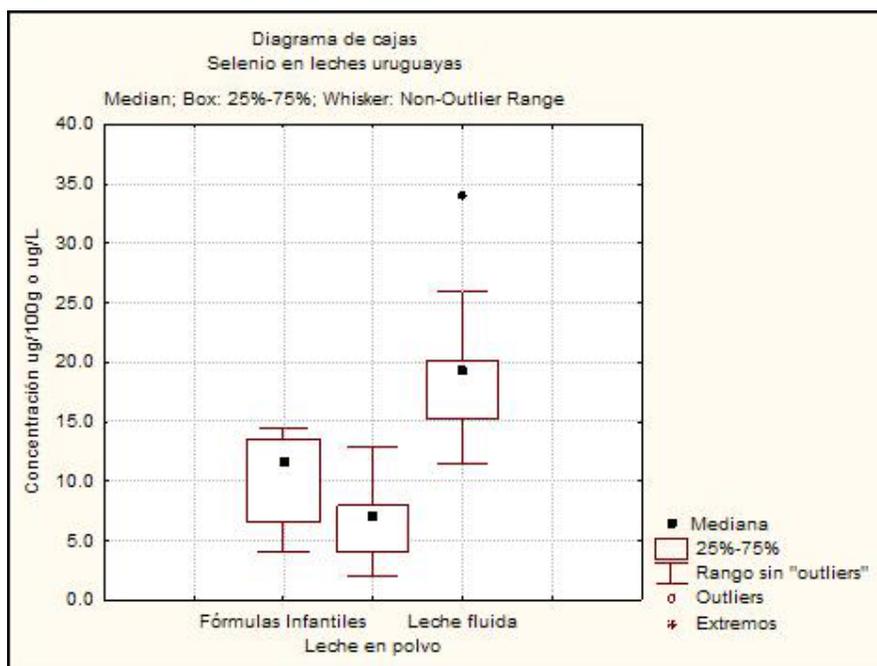


Figura 125 – Diagrama de cajas (contenido de selenio en leches uruguayas).

6. Conclusiones finales y perspectivas

El trabajo desarrollado en esta tesis ha cumplido con los objetivos propuestos.

Se diseñaron optimizaron y validaron sistemas en flujo para la determinación de cobre, zinc, nitrato, nitrito y selenio total en leche en polvo, leche fluida y fórmulas infantiles.

Los sistemas en flujo abarcaron diversas técnicas de Análisis en Flujo: flujo continuo (CF), inyección en flujo (FIA), inyección secuencial (SIA) y multicommutación (MCFA). Asimismo se realizaron algunas pruebas de preconcentración en línea con resultados auspiciosos para la determinación de cobre y zinc.

En todos los casos los sistemas funcionaron en forma automatizada controlados desde un PC.

En el caso de la determinación de cobre y zinc, el sistema FIA propuesto sin preconcentración fue adecuado para la determinación de dichos analitos en leche en polvo y fórmulas infantiles. El método propuesto arrojó resultados equivalentes a los obtenidos por el método de referencia.

Para la determinación de zinc también se desarrolló un sistema SIA que fué más rápido y consumió menor cantidad de muestra y reactivos que el sistema FIA.

Este método también arrojó resultados equivalentes a los obtenidos por el método oficial para leche en polvo y fórmulas infantiles.

Por lo tanto se concluye que el sistema SIA puede proponerse como método alternativo al método oficial. Esto surge no solo porque arrojó resultados equivalentes al método de referencia sino también porque resultó más productivo, rápido, económico y generó menor cantidad de residuos químicos.

Para la determinación de cobre el sistema FIA sin preconcentración puede ser propuesto como método alternativo al método oficial para la determinación en leche en polvo y fórmulas infantiles por las mismas razones expuestas anteriormente. Para realizar la determinación de cobre utilizando un sistema SIA debe modificarse el sistema propuesto en este trabajo. Una alternativa sería realizar preconcentración. Este desafío queda planteado para continuar el trabajo. Asimismo para determinación de cobre y zinc en leche fluida debe optimizarse un sistema que presente menores límites de detección y cuantificación. Para ello se propone como continuación el diseño de un sistema SIA con preconcentración para la determinación de cobre y zinc en leche fluida.

La determinación simultánea de nitrato y nitrito se realizó utilizando un sistema SIA con una reducción en línea de nitrato a nitrito. El sistema resultó adecuado para dicha determinación en leche en polvo y fórmulas infantiles arrojando resultados equivalentes al método de referencia con mayor productividad. Asimismo consumió menor cantidad de muestra, reactivos y generó menor cantidad de residuos químicos.

La determinación de nitrato y nitrito utilizando la reacción de *Griess* ha sido ampliamente estudiada. Muchos trabajos realizando estas determinaciones en flujo se han publicado pero solo unos pocos se refieren a la aplicación propuesta en esta tesis.

Para la determinación de selenio total en leche en polvo, leche fluida y fórmulas infantiles se desarrolló, optimizó y validó un sistema en flujo multiconmutado.

El mismo tal como se presenta en esta tesis y para la aplicación propuesta tiene un cierto grado de innovación en el área.

El método propuesto resultó adecuado para la aplicación propuesta y puede proponerse como método de rutina para determinación de selenio en leche fluida y en polvo. Además el sistema resultó adecuado para la determinación de selenio y arsénico en agua de consumo humano. Esto último fue más allá de los objetivos de esta tesis e indica que pueden realizarse determinaciones de Se en otras matrices.

También es importante destacar que el sistema puede utilizarse para realizar especiación de Se(IV) y Se(VI). Esto dependerá del tratamiento previo que reciba la muestra. Otra alternativa para futuros trabajos sería optimizar la preparación de las muestras de forma tal de poder llevar adelante ensayos de especiación.

Se obtuvieron datos sobre la concentración de selenio en leche de nuestro país. A partir de ellos se pudo concluir que las muestras analizadas contienen niveles de selenio comparables con la media mundial. Además se confirmó el hecho de que la leche y las fórmulas infantiles sin agregado de selenio que se encuentran en

nuestro mercado son fuentes pobres de selenio para la nutrición. Aunque en el caso de las fórmulas infantiles con adición de selenio sí se llega a cubrir los requerimientos para los lactantes y niños de corta edad que solo se alimentan de este producto.

Sería muy importante para fortalecer estas afirmaciones realizar la determinación en un mayor número de muestras, sobre todo en el caso de la leche fluida. En particular sería muy interesante para futuros proyectos vinculados al sector productivo realizar un muestreo en diversos puntos del país. Además realizar estos muestreos en diferentes épocas del año para cubrir la variabilidad estacional.

En este trabajo quedan documentados los datos obtenidos para ofrecer a la sociedad y para contribuir a completar las tablas nutricionales.

En cuanto a los sistemas de análisis en flujo diseñados se adquirió gran experiencia y se pudo investigar el desempeño de varias técnicas. Todas las técnicas resultaron exitosas para las aplicaciones propuestas, pero tanto SIA como multiconmutación son sin duda las más rápidas y flexibles.

En el caso de SIA resulta un técnica muy robusta, si el sistema se desmonta completamente y se vuelve a montar un tiempo después se puede esperar resultados equivalentes. En cambio si un sistema multiconmutado complejo se desmonta completamente y un tiempo después se vuelve a armar habrá que tener especial cuidado en armarlo exactamente igual al original. Pequeñas variaciones

por ejemplo en el largo de los tubos puede traducirse en resultados muy diferentes, esto se pudo comprobar en este trabajo.

Sin embargo un sistema multiconmutado resulta sencillo de automatizar y es muy flexible en cuanto a que una vez construido el sistema se pueden cambiar parámetros de operación desde el *software* sin modificar el sistema. Además de ser muy rápidos, difícilmente un sistema SIA pueda superar en esto a la multiconmutación.

A nivel personal considero que el trabajo realizado ha contribuido a mi formación para poder ser un investigador independiente. Así mismo se han dejado planteadas varias posibilidades de continuación para generar nuevos proyectos en el futuro.

7. Bibliografía

Agterdenbos, J., Bax, D. (1986). A study on the generation of hydrogen selenine and decomposition of tetrahydroborate in hydride-generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 188, 127-135.

Ahmed, M. J. Stalikas, C.D., Tzouwara-Karayanni, S. M., Karayannis, M. I. (1996). Simultaneous spectrophotometric determination of nitrite and nitrate by flow-injection analysis. *Talanta*, 43, 1009-1018.

Alaejos, M. S., Díaz Romero, C. (1995). Selenium concentration in milks. *Food Chemistry*, 52, 1-18.

Baran, E.J. (1990). La nueva Farmacoterapia Inorgánica. XI. Algunos Comentarios sobre la Bioquímica y la Farmacología del Selenio. *Acta Farm. Bonaerense*, 9(3), 175-182.

Bintoro, V. P., Cantin-Esnault, D., Alary, J. (1995). Validation of a Modified Spectrophotometric Method for the determination of nitrate in dry milk using 2-sec-Butylphenol. *The Analyst*, 120, 2747-2753.

Bohrer, D., Becker, E., Cícero do Nascimento, P., Dessuy, M., Machado de Carvalho, L.(2007). Comparision of graphite furnace and hydride generation atomic absorption spectrometry for the determination of selenium status in chicken meat. *Food Chemistry*, 104, 868-875.

Boqué, R. (2007). *La selectividad en análisis químico*. [Internet]. Disponible desde: <<http://www.quimica.urv.es/quimio/general/selectividad.pdf>> [Acceso 26 de mayo 2009].

Brabcová, M., Rycchlovsky, P., Nemcová, I. (2003). Determination of nitrites, nitrates and their mixtures using flow injection analysis with spectrophotometric detection. *Analytical Letters*, 36, 2303-2316.

Brindle, I.D. (2007). Vapour-generation analytical chemistry: from Marsh to multimode sample-introduction system. *Anal. Bional. Chem.* 388, 735-741.

Broekaert, J.A.C. y Boumans, P.W.J.M. (1987). Simple Introduction Techniques in ICP-AES. En: Boumans, P.W.J.M.(Ed). *Inductively Coupled Plasma Emission Spectroscopy* (pp. 296-370). New York: Wiley.

Broekaert, J.A.C. (2002). *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas*. New York: Wiley-VCH.

Brown, R. M. Jr., Fry, R. C., Moyers, J. L., Northway, S.J., Denton, M.B., Wilson, G.S. (1981). Interferences by Volatile Nitrogen Oxides and Transition-Metal Catalysis in the Preconcentration of Arsenic and Selenium as Hydrides. *Anal Chem.*, 53, 1560-1566.

Bueno M. P. (Ed.). (1996) AOAC. *Official methods of analysis. 985.35. Minerals in Ready-to-Feed Milk-Based. Infant Formula and Pet Food*. (Chapter 50, pp 14). Arlington, VA. USA: Association of Official Analytical Chemist.

Bueno M. P. (Ed.). (1996) AOAC. *Official methods of analysis*. 984.27. *Calcium, Copper, Iron, Magnesium, Manganese, Phosphorus, Potassium, Sodium and zinc in Infant Formula*. (Chapter 50, pp 15). Arlington, VA. USA: Association of Official Analytical Chemist.

Bulletin of the International Dairy Federation N° 278/1992. Copper. *Trace Elements in milk and milk products* (pp. 16-20). Brussels: IDF.

Burns, T.D., Danzer, K. y Townshend, A. (2002). Use of the terms “Recovery” and “Apparent Recovery” in analytical procedures. (IUPAC Recommendations 2002). *Pure Appl. Chem.* 74(11), 2201-2205

Bye, R. (1989). Generation of selenium hydride from alkaline solutions: a new concept of the hydride generation-atomic absorption technique. *Journal of Automatic Chemistry*, 11(4), 156-158.

Cadore, S. (1986). *Estudo da Determinação Espectrofotométrica de Zinco e Cobre com Zincon em Sistemas de Análise por Injeção em Fluxo*. Tese de Mestrado. (pp. 19-22) Campinas: Unicamp.

Caroli, S. (Ed.).(1996). *Element Speciation in Bioinorganic Chemistry*. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Catalá Icardo, M., Mateo García, J.V., Martínez Calatayud, J. (2002). Multiconmutation as a powerful new analytical tool. *Trends in analytical chemistry*, 21(5), 366-378.

Cava-Montesinos, P., Cervera, M.L., Pastor, A., de la Guardia, M. (2004). Determination of As, Sb, Se, Te, and Bi, in milk by slurry sampling hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*, 62, 175-184.

Cerdá, A., Oms, M.T., Corteza, R., Cerdà V. (1995). Evaluation of flow injection methods for ammonium determination in wastewater samples. *Analytica Chimica Acta*, 311, 165-173.

Cerdá, V., Forteza, R., Estela, J.M. (2007). Potential of multisyringe flow-based multiconmutated systems. *Analytica Chimica Acta*, 600, 35-45.

Cerdá, V. y Ramis, G. (1990). *An Introduction to Laboratory Automatic*. New York: Wiley.

Chan, W. y Hon, P. (1990). Bismuth(III) Hydride Generation, its Separation and the Determination of Bismuth(III) by Atomic Absorption Spectrometry Using Flow Injection. *The Analyst*, 115, 567-569.

Chao-Hsiang, W. y Ruzicka, J. (2001). Micro sequential injection: environmental monitoring of nitrogen and phosphate in water using a "Lab-on-Valve" system furnished with a microcolumn. *The Analyst*, 126, 1947-1952.

Chen, H., Brindle, I.D., Le, X. (1992). Prereduction of Arsenic (V) to Arsenic (III), Enhancement of the Signal, and Reduction of Interferences by L-Cysteine in the Determination of Arsenic by Hydride Generation. *Anal. Chem.*, 64, 667-672.

Chiao-Yu, H. y Jiang, S. (2002). Determination of Cr, Zn, Cd, and Pb in milk powder by slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 17, 688-692.

Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., Eaton, A.D. (Eds.) (1998). AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). *Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20th Ed.*

Cutter, G. A. (1983). Elimination of Nitrite Interference in the Determination of Selenium by Hydride Generation . *Analytica Chimica Acta*, 149, 391-394.

Danby, R., Shaw, S. (1990). GBC HG3000. *Automatic hydride generator. Operation Manual*. Victoria, Australia: GBC Scientific Equipment Pty Ltd.

Dědina, J. (1992). Quartz tube atomizers for hydride generation atomic absorption spectrometry: mechanism of selenium hydride atomization and fate of free atoms. *Spectrochimica Acta*, 5, 689-700.

Dědina, J. (1999). Flow methods in gas-liquid separations. En: Sanz-Medel A. (Ed.). *Flow Analysis with Atomic Spectrometric Detectors*. Ámsterdam: Elsevier Science B.V.

Dědina, J., Tsalev, D.L. (1995). *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. Great Britain: John Wiley & Sons Ltd.

Economou, A. (2005). Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment. *Trends in Analytical Chemistry*, 24(5), 416-425.

Eglea Gonzalez, F.J. (2007). *Trazabilidad de las medidas en Laboratorios de Ensayo*. [Internet] Disponible desde: <www.iat.es/simce/html/subidas/actividad/boletinsimceal08.pdf> [Acceso 26 de mayo 2009].

Etxebarria, N., Antolín, R., Borge, G., Posada, T., Raposo, J.C. (2005). Optimisation of flow-injection-hydride generation inductively coupled plasma spectrometric determination of selenium in electrolytic manganese. *Talanta*, 65, 1209-1214.

Fang, Z. (1993). *Flow Injection Separation and Preconcentration*. Weinheim: VCH.

Fang, Z, Ruzicka, J, Hansen, E.H. (1984). An efficient flow-injection system with on-line ion-exchange preconcentration for the determination of trace amounts of heavy metals by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 161, 23-39.

FAO. (2009). [Internet] *Food and Agricultural Organization*. Disponible desde: <<http://www.fao.org>>, <<http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/AH833S22.htm>> [Acceso 26 de mayo 2009].

FAO. (2000). [Internet] *Food and Agricultural Organization*. Disponible desde: <<http://www.fao.org>>, < faolex.fao.org/docs/texts/phi40803.doc> [Acceso 25 de mayo 2009].

Feres, M.A., Fortes, P.R., Zagatto, A.G., Santos, J.L.M., Lima, J. L.F.C. (2008). Multi-commutation in flow analysis: Recent developments and applications. *Analytica Chimica Acta*, 618, 1-17.

Fernández de la Campa, M. R., Segovia García, E., Valdés-Hevia y Temprano, M. C., Aizpún Fernández, B., Marchante Gayón, J. M. y Sanz-Medel, A. (1995). Effects of organized media on the generation of volatile species for atomic spectrometry. *Spectrochimica Acta*, 50B(4-7), 377-391.

Ferreira, K.S., Gomes, J.C., Chaves, J.B.P. (2005). Copper content of commonly consumed food in Brazil. *Food Chemistry*, 92, 29-32.

Ferrer, R. de, Weisstaub, P.A., López N., Ceriani Cernadas, J.M. (2001). Niveles de zinc en leche humana de término y pretérmino. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 51 (1), 33-36.

FIALab®. (2007). [Internet] FIALab. Disponible desde <
<http://www.flowinjection.com/>> [Acceso 31 de mayo 2009].

Figueiredo, E.C., Dědina, J, Zezzi Arruda, M.A. (2007). Metal furnace heated by flame as a hydride atomizer for atomic absorption spectrometry: Sb determination in environmental and pharmaceutical samples. *Talanta*, 73, 621-628.

Flynn, A. y Cashman, K. (1997). Nutritional aspects of minerals in bovine and human milks. En Fox, P.F. (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 3. Lactose, water, salts and vitamins*. (2da. ed.) (pp. 257-289). Great Britain: Chapman & Hall.

Food Standards Australia New Zealand. (2006). *A Risk Profile of Dairy Products in Australia. Proposal P296. Primary Production and Processing Standard for Dairy*. [Internet]<<http://www.foodstandards.gov.au/standardsdevelopment/proposals/proposalp296primaryp2806.cfm>> [Acceso 4 de junio 2009].

Fordyce, F. (2005). Selenium Deficiency and Toxicity in the Environment. En, Selinus, O., Alloway, B, Centeno, J.A, Finkelman, R. B., Fuge, R., Lindh, U., Smedley, P. (Eds). *Essentials of Medical Geology. Impacts of the Natural Environment on Public Health*. (pp. 373-415). M.A, USA: Elsevier Academic Press.

Foster, L. H. y Sumar, S. (1995). Methods of análisis used for the determination of selenium in milk and infant formulae: a review. *Food Chemistry*, 53, 453-466.

Foster, L. H. y Sumar, S. (1996). Hydride generation atomic absorption spectrometric (HG-AAS) determination of selenium in term and preterm infant formulae available in the United Kingdom. *Food Chemistry*, 55(3), 293-298.

Foster, L. H., Chaplin, M. F. y Sumar, S. (1998). The effect of heat treatment on intrinsic and fortified selenium levels in cow's milk. *Food Chemistry*, 62(1), 21-25.

Gervasio, A.P.G., Fortes, P.R., Meneses, S.R.P., Miranda, C.E.S., Zagatto, E.A.G. (2006). An improved flow-injection system for spectrophotometric determination of molybdenum and tungsten in tool steels. *Talanta*, 69,927-931.

GlobalFIA. (2001-2003). *FIA/SIA Tutorial*. [Internet] GlobalFIA, Inc. Disponible desde < <http://www.globalfia.com/tutorial.html> > [Acceso 31 de mayo 2009].

Hageman, P. L., Brown, Z. A., y Welsch, E. (2002). *Arsenic and selenium by flow injection or continuous flow-hydride generation-atomic absorption spectrometry*. [Internet]. Disponible desde:
< http://pubs.usgs.gov/of/2002/ofr-02-0223/L06AS24Se_M.pdf > [Acceso 19 de junio 2009]. U.S. Geological Survey Open-File Report 02-223, pp. L1-L7.

Higuchi, K., Motomizu, S. (1999). Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Nitrite and Nitrate in Biological Samples. *Analytical Sciences*, 15, 129-134.

Holcombe H. (Ed.) (1998). *The fitness for purpose of analytical methods. A laboratory guide to method validation and related topics*. [Internet], Eurachem Guide. Disponible desde: <<http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/>>
<<http://www.eurachem.org/guides/valid.pdf> > [Acceso 9 de mayo de 2009].

Holt, C. (1997). The milk salts and their interaction with casein. En Fox, P.F. (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 3. Lactose, water, salts and vitamins*. (2da. ed.) (pp. 233-254). Great Britain: Chapman & Hall.

Huber, L., (2007). *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. (2da ed.).New York: Informa Healthcare USA.Inc.

Ihnat, M. (Ed.). (1996) AOAC. *Official methods of analysis*. 974.15. *Selenium in Human and Pet Food*.(Chapter 9, pp 28-29) Arlington, VA. USA: Association of Official Analytical Chemst.

Inczédy *et al.*, J. Lengyel, T., Ure, A.M. (1998). *International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Analytical Nomenclature. Definitive Rules 1997*. 3ªEd, Oxford: IUPAC-Blackwell Science.

International Dairy Federation (2001(E)). 189-1: International Standard 14676-1. *Determination of Nitrate and Nitrite contents. Method by Cadmium Reduction and Photometry*. Bruselas: International Dairy Federation.

International Dairy Federation (1993) International Standard 26A. *Dried milk and dried cream. Determination of water content*. Bruselas: International Dairy Federation.

ISO Standard 14673-1:2001 / IDF Standard 189-1:2001 (2001). Milk and milk products - Determination of nitrate and nitrite: Method using cadmium reduction and spectrometry. *International Organization for Standardization*, Geneva, Switzerland. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.

Kantola, M., Vartianien, T. (2001). Changes in selenium, zinc, copper and cadmium contents in human milk during the time when selenium has been supplemented to fertilizers in Finland. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 15,11-17.

Kazemzadeh, A., Enfasi, A.A. (2001). Sequential flow injection spectrophotometric determination of nitrite and nitrate in various samples. *Analytica Chimica Acta*, 442, 319-326.

Kingston, H. M., Haswell, S.J.(Eds.) (1997). *Microwave-Enhanced Chemistry. Fundamentals, Sample Preparation and Applications*. Washington: American Chemical Society.

Knapp, G., Schramel, P. (2003). *Sources of analyte contamination and loss during the analytical process*. En Mester Z., Sturgeon, R. (Eds.) *Comprehensive Analytical Chemistry* vol. XLI. Sample Preparation for Trace Element Analysis. (pp. 23-42). Amsterdam: Elsevier B.V.

Knochen, M. (2003). *Desarrollo de sistemas automatizados para la determinación de analitos de interés farmacéutico mediante análisis por inyección en flujo (FIA)*. Tesis de doctorado, Universidad de la República.

Knochen, M. Pistón, M., Salvarrey, L., Dol, I. (2005). Multicommuted flow system for the determination of dextrose in parenteral and hemodialysis concentrate solutions. *J. Pharm. Biomed. Analysis*, 37 823-828.

Korenman, I.M., (1968). *Analytical Chemistry of low concentrations*. Jerusalem: S.Monzon.

Kotsonis, F.N., Burdock, A. G., Flamm, W.G. (1996). *Food Toxicology*. En Klaassen, C.D. (Eds). *Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons* (5ta. Ed.) (pp. 909). New York: McGraw-Hill.

Kratochvil, B. (2003). *Sampling and sample preservation for trace element analysis*. En Mester Z., Sturgeon, R. (Eds.) *Comprehensive Analytical Chemistry* vol. XLI. *Sample Preparation for Trace Element Analysis*. (pp. 1-21). Amsterdam: Elsevier B.V.

Laborda, F., Bolea, E., Baranguan, M.T., Castillo, J.R. (2002). Hydride generation in analytical chemistry and nascent hydrogen: when is it going to be over? *Spectrochimica Acta Part B*, 57, 797-802.

Lapa, R.A.S., Lima, J.L.F.C., Pinto, I.V.O.S. (2000). Sequential injection analysis based system for on-line monitoring of nitrite and nitrate in wastewater. *Analytical Sciences*, 16, 1157-1160.

Leelasattarakul, T., Liawruangrath, S., Rayanakorn, M., Oungpipat, W., Liawruangrath, B. (2006). The development of sequential injection analysis coupled with lab-on-valve for copper determination. *Talanta*, 70, 656-660.

Leelasattarakul, T., Liawruangrath, S., Rayanakorn, M., Oungpipat, W., Liawruangrath, B. (2007). Greener analytical method for the determination of copper(II) in wastewater by micro flow system with optical sensor. *Talanta*, 72, 126-131.

Lenahan, C.E., Neil, W.B., Lewis, S.W. (2002). Sequential injection analysis. *The Analyst*, 127, 997-1020.

Lima, L.F.C., Delerue-Matos y Vaz M.C.V.F. (2000). Enzymatic determination of choline in milk using a FIA system with potentiometric detection. *The Analyst*, 125, 1281-1284.

Lista, A.G. y Fernández Band, B. S. (1999). In-line Concentration on Chitosan and the Use of 2,2'-Dipyridyl-2-Pyridylhydrazone for the Flow-Injection Spectrophotometric Determination of Lead. *Analytical Sciences*, 15, 847-850.

Lopes Nunes, D., Pereira dos Santos, E., Barin, J. S., Mortari, S.R., Dressler, V.L., Flores, E.M.(2005). Interference of nitrite and nitrogen dioxide on mercury and selenium determination by chemical vapor generation atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta B*, 60, 731-736.

López García, I., Viñas, P., Campillo, N. (1996). Extending the dynamic range of flame atomic absorption spectrometry: a comparison of procedures for the determination of several elements in milk and mineral waters using on-line dilution. *Fresenius J. Anal. Chem*, 355, 57-64.

Marczenko, Z. y Balcerzak, M., (2000). *Separation, Preconcentration and Spectrophotometry in Inorganic Analysis*. Analytical Spectroscopy Library. Netherlands: Elsevier Science.

Martínez Calatayud, J. (1995). *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals. Automation in the Laboratory*. Great Britain: T.J. Press Ltd, Padstow.

Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*. Amsterdam: Elsevier Science B.V.

May, E.W., Rumble, J.Jr. (2003). *Certificate of Analysis. Standard Reference Material 1549. Non-Fat Milk Powder*. National Institute of Standards & Technology. Gaithersburg: NIST.

Mazej, D., Horvat, M., Barbone, F., Stibilj, V. (2004). Simple and Rapid Method for Determination of Selenium in Breast Milk by HG-AFS. *Microchimica Acta*, 147, 73-79.

Menezes Pedrozo, M. (2003). Cobre. En De Azeredo, F.A. y Da Matta Chasin, A.A. (Ed.). *Metais, Gerenciamento da Toxicidade* (pp. 143 -187). San Pablo: Editora Atheneu.

Mester, Z., Sturgeon, R. (2003). *Sample preparation for trace element analysis*. (vol. XLI). Netherlands: D. Barceló.

Miller, G. D., Jarvis, J. K. y Mcbean, L. D. (2000). *Handbook of Dairy Foods and Nutrition*, (2da ed.). Washington DC: CRC Press.

Miller, J. N., Miller, J. C., (1993). *Estadística para Química Analítica*. (2da Ed.). Wilmington, Delaware, E.U.A: Addison-Wesley Iberoamerican, S.A.

Miller, J. N., Miller, J. C., (2002). *Estadística y Quimiomería en Química Analítica*. Madrid: Prentice Hall.

Mindak, W.R. y Dolan, S.P. (1999). Determination of Arsenic and Selenium in Food using a Microwave Digestión-Dry Ash Preparation and Flow Injection Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 12, 111-122.

Ministerio de Trabajo y Seguridad Social. Instituto Nacional de Alimentación. Universidad de la República. Facultad de Química (2002). *Tabla de composición de alimentos de Uruguay*. [Internet] Disponible desde <<http://www.chasque.net/prensa/documentos/tabla.pdf>> [Acceso 30 de mayo 2009].

Moorcroft, M. J., Davis, J., Compton, R.G. (2001). Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta*, 54, 785-803.

Moyano, S., Gásquez, E., Marchevsky, E. Olsina, R., Martinez, L.D. (1997). The Determination of Se by Flow Injection Hydride Generation ICP-OES Using Anion Exchange for On-line Removal of Copper. *At. Spectrosc.*, 18, 152-155.

Muñiz-Naveiro, O., Domínguez-González, R., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera, P., Cocho, J.A., Fraga, J.M., (2006). Study of the bioavailability of selenium in cow's milk after a supplementation of cow feed with different forms of selenium. *Anal. Bional. Chem*, 385, 189-196.

Muñiz-Naveiro, O., Domínguez-González, R., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera, P., Cocho, J.A., Fraga, J.M., Goris Pereiras, A., López Santamariña, A., Martinez Ledesma, I., Valledor Puente, J., Fernández-Couto Gómez, L. (2005). Selenium Content and Distribution in Cow's Milk Supplemented with Two Dietary Selenium Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9817-9822.

Muñiz-Naveiro, O., Domínguez-González, R., Bermejo-Barrera, A., Cocho, J.A., Fraga, J.M., Bermejo-Barrera, P. (2005). Determination of total selenium and selenium distribution in the milk phases in commercial cow's milk by HG-AAS. *Anal. Bional. Chem*, 381, 1145-1151.

Nameroff, S. (1990). *QuickBASIC. Manual de Referencia*. Madrid: M^cGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.

Narsito, Agterdenbos J., Santosa S. J. (1990). Study of processes in the hydride generation atomic absorption spectrometry of antimony, arsenic and selenium. *Analytica Chimica Acta*, 237, 189-199.

Nobel, A. (2000) Bio-Rad Laboratories. *Chelex® 100 and Chelex 20 Chelating Ion Exchange Resin. Instruction Manual*. [Internet]. Disponible desde:

<http://www3.bio-rad.com/webmaster/pdfs/9184_Chelex.PDF> [Acceso 8 de junio 2009].

Nóbrega, J.A., Gélinas, Y., Krushevská, A. y Barnes, R.M. (1997). Direct Determination of Major and Trace Elements in Milk by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission and Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12, 1243-1246.

NResearch Inc. (2009). *Valves for Bio-Medical and Laboratory Applications* [Internet]. Disponible desde: <<http://www.nresearch.com/>> [Acceso 24 de junio 2009]. Copyright © 2009 Neptune Research & Development Inc.

Oliveira, C.C., Sartini, R.P., Reis, B.F., Zagatto, E.A.G. (1996). Multicommutation in flow analysis. Part 4. Computer-assisted splitting for spectrophotometric determination of copper and zinc in plants. *Analytica Chimica Acta*, 332, 173-178.

Olsen, S., Pessenda, C.R.L., Ruzicka, J., Hansen, E.H. (1983). Combination of Flow-Injection Analysis with Flame Atomic-absorption Spectrophotometry: Determination of Trace Amounts of Heavy Metals in Polluted Seawater. *The Analyst*, 108, 905-917.

Oms, M.T., Cerdá, A., Cerdá, V. (1995). Sequential injection analysis of nitrites and nitrates. *Analytica Chimica Acta*, 315, 321-330.

Paiva Oliveira, A., Gomes Neto, J.A., Araújo Nóbrega, J., Miranda Correira, P.R., Oliveira, P.V. (2005). Determination of selenium in nutritionally relevant foods by graphite furnace atomic absorption spectrometry using arsenic as internal standard. *Food Chemistry*, 93, 355-360.

Palmisano, F., Quinto, M., Rizzi, R. y Zambonin, P.G. (2001). Flow injection analysis of L-lactate in milk and yoghurt by on-line microdialysis and amperometric detector at a disposable biosensor. *The Analyst*, 126, 866-870.

Panreac (1999). *Analíticos en Alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Leche y productos lácteos*. [Internet] Disponible desde: <<http://www.panreac.com/new/esp/publicaciones/publicaciones01.htm>>. [Acceso 18 de junio 2009].

Pappa, C. E., Pappas, C. A., Surai, P. F. (2006). Selenium content in selected foods from Greek market and estimation of the daily intake. *Science of the Total Environment*, 372, 100-108.

Pérez-Olmos, R., Soto, J.C., Zárate, N., Araújo, A.N., Lima, J.L.F.C, Saraiva, M.L.M.F.S. (2005). *Food Chemistry*, 90,471-490.

PerkinElmer (2000). *MHS 15 Mercury Hydride System. User's Guide*. Connecticut: PerkinElmer, Inc.

PerkinElmer (2009). *Recommended Analytical Conditions and General Information for Flow Injection Mercury/Hydride Analyses Using the PerkinElmer FIAS-100/400. Technical Data Sheets*. [Internet]. Disponible desde: <<http://www.perkinelmer.com/search/Search.htm?Ntt=fias%20100-400&N=0>> [Acceso 18 de junio 2009]. PerkinElmer Inc. Copyright 1998 - 2009.

Pierce F. D., Brown, H. R. (1976). Inorganic Interference Study of Automated Arsenic and Selenium Determination with Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 48 (4), 693-695.

Pignalosa, G. (2001). *Desarrollo de métodos instrumentales para la determinación de trazas metálicas en lubricantes*. Tesis de Maestría. Universidad de la República.

Pignalosa G., Cabrera N., Mollo A., Portillo I., Rouco V., Vázquez L., (2001). Silicon determination in Portland cement by fluoride generation, using flame atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta B*, 56, 1995-1999.

Pignalosa, G., Knochen, M., Cabrera, N. (2004). Determination of Zinc-Based Additives in Lubricating Oils By Flow-Injection Analysis with Flame-AAS Detection Exploiting Injection with a Computer-Controlled Syringe. *Journal of Automated Methods & Management in Chemistry*, 25(1), 1-7.

Piñeiro-Avila, G., Salvador, A., de la Guardia, M. (1998). Non-enzymatic flow injection determination of cholesterol in sediments. *The Analyst*, 123, 2291-2295.

Pistón, M., Dol, I., Knochen, M. (2006) Multiparametric Flow System for the Automated Determination of Sodium, Potassium, Calcium, and Magnesium in Large-Volume Parenteral Solutions and Concentrated Hemodialysis Solutions. *J. Autom. Methods Manage. Chem.*, 1-6.

Pitzalis, E., Marcherpa, M. C., Onor, M., D'Ulivo. (2009). Mechanisms involved in stannane generation by aqueous tetrahydroborate (III). Role of acidity and L-cysteine. *Spectrochimica Acta Part B*, 64, 309-314.

Pyrzyńska, K. (1998). Speciation of Selenium Compounds. *The Japan Society for Analytical Chemistry*, 14, 479-483.

Qiu, D. (1995). Recent advances in fundamental studies of hydride generation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 14 (2),76-82.

Qiu, J., Wang, Q., Limin, Y.M., Huang, B. (2006). On-line pre-reduction of Se(IV) by thiourea for selenium speciation by hydride generation. *Spectrochimica Acta Part B*, 61, 803-809.

Ramesh Kumar, A., Riyazuddin, P. (2005). Mechanism of Volatile Hydride Formation and Their Atomization in Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Analytical Sciences*, 21, 1401-1409.

Ramis Ramos, G., García Álvarez-Coque, M.C.(2001). *Quimiometría*. Madrid: Editorial Síntesis, S.A.

Reis Lima, M.J., Fernandes, S.M.V., Rangel, A.O.S.S. (2006). Determination of nitrate and nitrite in dairy samples by sequential injection using an in-line cadmium-reducing column. *International Dairy Journal*, 16, 1442-1447.

Reis, B.F., Bergamín, H. (1993). Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise química por injeção em fluxo. *Química Nova*, 16(6), 570-573.

Reis, B.F., Giné, M.F., Zagatto, E.A.G., Lima, J.L.F.C., Lapa, R.A. (1994). Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. *Analytica Chimica Acta*, 293, 129-138.

Richter, P., Toral, M. I., Tapia, A.E., Fuenzalida, E., (1997). Flow Injection Photometric Determination of Zinc and Copper With Zincon Based on the Variation of the Stability of the Complexes With pH. *The Analyst*. 122, 1045-1048.

Richter, P., Toral, M.I., Castro, H. (2002). Solid Phase Spectrophotometric Determination of Copper in Water by Using Immobilized Zincon in a Sephadex A25 Resin. *Analytical Letters*, 35 (4), 635-646.

Rocha, F.R.P., Reis, B.F., Zagatto, E.A.G., Lima, J.L.F.C., Lapa, R.A., Santos, J.L.M. (2002). Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. *Analytica Chimica Acta*, 468, 119-131.

Ródenas-Torralba, E., Cava-Montesinos, P., Morales-Rubio, A., Cervera, M.L., de la Guardia, M. (2004). Multicommutation as an environmentally friendly analytical tool in the hydride generation atomic fluorescence determination of tellurium in milk. *Anal. Bioanal. Chem*, 379, 83-89.

Ruedas-Rama, M. J., Ruiz-Medina, A y Molina-Diaz, A. (2005). Resolution of biparametric mixtures using bead injection spectroscopic Flow-through renewable surface sensors. *Analytical Sciences*, 21, 1079-1084.

Russo, M. F. y Echols, M. M. (1999). *Automating Science and Engineering Laboratories with Visual Basic*. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Rutter, L. y Holland, M. (2002). Citing referentes: the Harvard system [Internet], Poole, Bournemouth University Academic Services. Disponible desde: <http://www.bournemouth.ac.uk/library/using/harvard_system.html> [Acceso 9 de mayo de 2009].

Ruzicka, J. (2000). Lab-on-valve: universal microflow analyzer based on sequential and bead injection. *The Analyst*, 125, 1053-1060.

Ruzicka, J., Marshall, G.D. (1990). Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta*, 237, 329-343.

Ruzicka, J. y Hansen, E. (1988). *Flow Injection Analysis*. (2da. ed). New York: Wiley.

Schamel P., Xu, L. (1991). Determination of arsenic, antimony, bismuth, selenium and tin in biological and environmental samples by continuous flow hydride generation ICP-AES without gas-liquid separator. *Fresenius J. Anal. Chem.* 340, 41-47.

Seiler, H.G. & Sigel, H. (Ed.). (1988). *Handbook on Toxicology of Inorganic Compounds*. New York: Marcel Dekker, Inc.

Shpigun, L.K., Shushenachev, P.M., Kamilova, P.M. (2006). Kinetic separation in flow injection spectrophotometry: Simultaneous determination of copper and zinc in a single run. *Analytica Chimica Acta*, 573-574, 360-365.

Silva, J. H., Quiroga, M.A., Auza, N. J. (2000). Selenio en el rumiante. Relaciones suelo, planta, animal. *Medicina Veterinaria*, 17(10), 229-245.

Silva, V.F., Lopes G. S., Nóbrega, J. A., Souza, G. B., Nogueira, A.R.A. (2001). Study of the protein-bound fraction of calcium, iron, magnesium and zinc in bovine milk. *Spectrochimica Acta*, part B, 56, 1909-1916.

Smith, R. L., Smith, T. M. (2001). *Ecología* (4ta. Ed.). Madrid: Addison Wesley Longman, Inc.

Smith, R. P. (1996). *Toxic Responses of the blood*. En Klaassen, C.D. (Eds). Casarett & Doull's Toxicology. The basic science of poisons (5ta. Ed.) (pp. 335). New York: McGraw-Hill.

Soares da Silva, E. (2003). *Zinco*. En De Azeredo, F.A. y Da Matta Chasin, A.A. (Ed.). *Metais, Gerenciamento da Toxicidade* (pp. 187-201). San Pablo: Editora Atheneu.

Solá-Larrañaga, C., Navarro-Blasco, I. (2009). Chemometric analysis of minerals and trace elements in raw cow milk from the community of Navarra, Spain. *Food Chemistry*, 112, 189-196.

Stockwell P. B. (1996). *Automatic Chemical Analysis*, 2ª Ed. London: Taylor and Francis.

Tanaka, A., Nose, N., Yamada, F., Saito, S., Watanabe, A. (1981). Determination of nitrite in human, cow and market milks by gas liquid chromatography with electron capture detection. *Journal of Chromatography*, 206, 531-540.

Taylor, K. J. (1987). *Quality Assurance of Chemical Measurements*. Florida: Lewis Publishers.

Thelwall, L.A.W. (1997). *Lactose: chemical derivatives*. En Fox, P.F. (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 3. Lactose, water, salts and vitamins*. (2da. ed.) (pp. 39-69). Great Britain: Chapman & Hall.

Thomson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. International Union of Pure and Applied Chemistry. Technical Report. *Pure Appl. Chem.*, 74(5), 835-855.

Tiglea, P., Mello De Capitani, E. (2003). *Selenio*. En De Azeredo, F.A. y Da Matta Chasin, A.A. (Ed.). *Metais, Gerenciamento da Toxicidade* (pp. 239 -262). San Pablo: Editora Atheneu.

Trojanowicz, M. (2000). *Flow Injection Analysis. Instrumentation and Applications*. Singapore: Word Scientific Publishing Co. Pte.Ltd.

Van Dael, P., Barclay, D.V. (2006). Geographical, seasonal and formula-specific variations in the selenium levels of infant formulae. *Food Chemistry*, 96, 512-518.

Van der Linden, W.E. (1994). Classification and definitions of analytical methods based on flowing media. International Union of Pure and Applied Chemistry. Recommendations 1994. *Pure Appl. Chem.*, 66(12), 2493-2500.

Van Staden, J.F. y Tlowana, S. I. (2002). On-line separation, simultaneous dilution and spectrophotometric determination of zinc in fertilisers with a sequential injection system and xylenol orange as complexing agent. *Talanta*, 58, 1115-1122.

Vessman, J., Stefan, R. I., Van Staden, J. F., Danzer, K., Lindner, W., Burns, D.T., Fajgelj, A y Müller, H. (2001). Selectivity in Analytica Chemistry. International Union of Pure and Applied Chemistry. Recommendations 2001. *Pure Appl. Chem.*, 73(8), 1381-1386.

Vidal de Aquino E., Jarbas J. R.R., Pasquini, C. (2006). A monosegmented-flow Karl Fischer titrator. *Talanta*, 71, 1288-1293.

Vidal, M. E. (2008). *Producción lechera: situación y perspectivas*. Anuario 2008-OPYPA. [Internet] Disponible desde <<http://www.mgap.gub.uy/opypa/ANUARIOS/Anuario08/>> [Acceso 30 de mayo 2009]

Vieira, J.A., Reis, B.F., Kronka, E.A.M., Paim, A.P.S., Giné, M.F. (1998). Multicommutation in flow analysis. Part 6. Binary sampling for wide concentration range turbidimetric determination of sulphate in plant digests. *Analytica Chimica Acta*, 366, 251-255.

Viñas, P., Pardo-Martinez, M., Hernández-Córdoba, M. (1999). Slurry atomization for the determination of arsenic in baby foods using electrothermal atomic absorption spectrometry and deuterium background correction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 14, 1215-1219.

Walstra y Jenness, P. y Jenness, R. (1987). *Química y Física Lactológica*. Zaragoza: Acribia.

Wang, J., Hansen, E.H. (2003). Sequential injection lab-on-valve: the third generation of flow injection analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(4), 225-231.

Wang, Y., Luo, J., Chen, H., Qiaohong, H., Gan, N., Tianhua, L.(2008). A microchip-based flow injection-amperometry system with mercaptopropionic acid modified electroless gold microelectrode for the selective determination of dopamine. *Analytica Chimica Acta*, 625, 180-187.

Welz, B, Sperling, M. (1999). *Atomic Absorption Spectrometry*. (3era ed.). Germany: Wiley-VCH.

Welz, B., He, Y., Sperling, M. (1993). Flow injection on-line acid digestion and pre-reduction-of arsenic for hydride generation atomic absorption spectrometry- A feasibility study. *Talanta*, 40(12), 1917-1926.

Wenclawiak, B., Koch, M., Hadjicostas, E. (Eds.).(2004). *Quality Assurance in Analytical Chemistry*. Germany: Springer.

Wise S.A., Waters, R. L. Jr. (2006). *Certificate of Analysis. Standard Reference Material 1846. Infant Formula*. National Institute of Standards & Technology. Gaithersburg: NIST.

Wolf, W.R. & Harnly, J.M. (1984). *Trace Element Analysis*. En: R.D King (Ed.), *Developments in Food Analysis Techniques* (2da ed.). (pp. 69-97). Elsevier Science Publishers.

Yamamoto, M., Takada, K., Kumamaru, T. (1987). Membrane Gas-Liquid Separator for Flow Injection Hydride-Generation Atomic Absorption Spectrometry. *Anal. Chem.* 59, 2446-2448.

Yassi, A., Kjellström, T., de Kok, T., Guidotti, T.L. (2001). *Basic Environmental Health*. New York: Oxford University Press.

Yebra, M.C., Moreno-Cid, A., Cespón, R., Cancela, S. (2004). Preparation of a soluble solid sample by a continuous ultrasound assisted dissolution system for the flow-injection atomic absorption spectrometric determination of iron in milk powder and infant formula. *Talanta*, 62, 403-406.

Yuanquian, L., Jingmei, H., Jingguo, Y., Bo, Z., Yuanqing, H. (2002). Multi-component analysis by flow injection-diode array detection-spectrophotometry using partial least squares calibration model for simultaneous determination of zinc, cadmium and lead. *Analytica Chimica Acta*, 461, 181-188.

Zagatto, E.A, Van Staden, J. F, Maniasso, R., Stefan, I., Marshall, G.F. (2002). Information essential for characterizing a flow-based analytical system. International Union of Pure and Applied Chemistry. Technical Report. *Pure Appl. Chem.*, 74(4), 585-592.

Zenki, M., Tanishita, A., Yokoyama, T. (2004). Repetitive determination of ascorbic acid using iron(III)-1,10-phenanthroline-peroxodisulfate system in a circulatory flow injection method.

Zezi Arruda, M.A., Costa Figueiredo, E. (2009). Atomic spectrometry based on metallic tube atomizers heated by flame: Innovative strategies from fundamentals analysis. *Spectrochimica Acta Part B*, en prensa.

Zhang, Y., Adeloju, S.B. (2008). Flow injection-hydride generation atomic absorption spectrometric determination of selenium, arsenic and bismuth. *Talanta*, 76, 724-730.

Zief, M., Mitchell, J.W., (1976). *Contamination Control in Trace Element Analysis*. USA: John Wiley & Sons, Inc.

Zingaro, R. A. and Cooper, C. W. (Ed.). (1974). *Selenium*. New York: Litton Educational Publishing, Inc.

8. Anexos

8.1. Anexo I

Determinación de humedad de las muestras de leche en polvo, fórmulas infantiles y material de referencia certificado.

Se determinó el porcentaje de humedad de las muestras sólidas según la norma IDF Standard 26A:1993. El valor obtenido del contenido de agua se consideró en la toma en peso de las muestras de forma tal de que el resultado final obtenido quedó expresado en base seca ($m_{\text{pesasa}} - m_{\text{agua}}$).

En la tabla A1 se muestran los resultados obtenidos. Las determinaciones se realizaron por duplicado.

Todas las masas expresadas en gramos			Estufa 102-104 °C controlada, 2hs hasta masa constante.				IDF 26A:1993				
Muestra	Crisol	crisol + muestra	1a pesada (2hs)	2a pesada (1 hora despues de la primera pesada)	dif masa 1-2	masa const	masa inicial	masa final	Humedad	% humedad	% humedad promedio
F6	12.0108	12.5057	12.4919	12.4917	-0.0002	SI	0.4949	0.4809	0.0140	2.91	2.91
	11.5302	12.1159	12.0995	12.0994	-0.0001	SI	0.5857	0.5692	0.0165	2.90	
F1	16.6926	17.2344	17.2114	17.2110	-0.0004	SI	0.5418	0.5184	0.0234	4.51	4.45
	16.2258	16.7965	16.7729	16.7725	-0.0004	SI	0.5707	0.5467	0.0240	4.39	
F2	3.9720	4.3225	4.3082	4.3080	-0.0002	SI	0.3505	0.3360	0.0145	4.32	4.27
	4.3045	4.5909	4.5792	4.5793	0.0001	SI	0.2864	0.2748	0.0116	4.22	
F3	16.6936	17.1496	17.1415	17.1410	-0.0005	SI	0.4560	0.4474	0.0086	1.92	1.87
	16.2264	16.7058	16.6977	16.6972	-0.0005	SI	0.4794	0.4708	0.0086	1.83	
F4	12.6449	13.1220	13.0949	13.0947	-0.0002	SI	0.4771	0.4498	0.0273	6.07	6.16
	14.5106	15.0598	15.0276	15.0275	-0.0001	SI	0.5492	0.5169	0.0323	6.25	
F5	11.5302	12.1285	12.1095	12.1096	0.0001	SI	0.5983	0.5794	0.0189	3.26	3.29
	11.2179	11.7573	11.7403	11.7400	-0.0003	SI	0.5394	0.5221	0.0173	3.31	
L1	12.0110	12.4856	12.4621	12.4621	0.0000	SI	0.4746	0.4511	0.0235	5.21	5.23
	11.3961	11.8477	11.8258	11.8252	-0.0006	SI	0.4516	0.4291	0.0225	5.24	
NIST 1549	12.7411	12.9291	12.9227	12.9222	-0.0005	SI	0.1880	0.1811	0.0069	3.81	3.85
	12.6455	12.8883	12.8798	12.8792	-0.0006	SI	0.2428	0.2337	0.0091	3.89	
L5	17.9957	18.5615	18.5305	18.5299	-0.0006	SI	0.5658	0.5342	0.0316	5.92	5.91
	16.5914	17.1626	17.1309	17.1308	-0.0001	SI	0.5712	0.5394	0.0318	5.90	
L7	11.5295	12.0374	12.0083	12.0081	-0.0002	SI	0.5079	0.4786	0.0293	6.12	6.15
	12.0102	12.5223	12.4927	12.4925	-0.0002	SI	0.5121	0.4823	0.0298	6.18	
L8	12.0106	12.5160	12.4957	12.4958	0.0001	SI	0.5054	0.4852	0.0202	4.16	4.18
	11.3956	11.9070	11.8865	11.8864	-0.0001	SI	0.5114	0.4908	0.0206	4.20	

Todas las masas expresadas en gramos			Estufa 102-104 °C controlada, 2hs hasta masa constante.					IDF 26A:1993				
Muestra	Crisol	crisol + muestra	1a pesada (2hs)	2a pesada (1 hora despues de la primera pesada)	dif masa 1-2	masa const	masa inicial	masa final	Humedad	% humedad	% humedad promedio	
NIST 1846	16.5915	17.0017	16.9956	16.9953	-0.0003	SI	0.4102	0.4038	0.0064	1.58	1.59	
	17.9956	18.4290	18.4226	18.4222	-0.0004	SI	0.4334	0.4266	0.0068	1.59		
L12	11.3953	11.8961	11.8739	11.8736	-0.0003	SI	0.5008	0.4783	0.0225	4.70	4.69	
	11.2173	11.7284	11.7060	11.7056	-0.0004	SI	0.5111	0.4883	0.0228	4.67		
L6	16.5910	17.0534	17.0295	17.0290	-0.0005	SI	0.4624	0.4380	0.0244	5.57	5.56	
	17.9946	18.5259	18.4982	18.4980	-0.0002	SI	0.5313	0.5034	0.0279	5.54		
S1	16.6943	17.1609	17.1435	17.1435	0.0000	SI	0.4666	0.4492	0.0174	3.87	3.82	
	16.2269	16.7337	16.7159	16.7153	-0.0006	SI	0.5068	0.4884	0.0184	3.77		
L2	11.5300	12.0432	12.0196	12.0190	-0.0006	SI	0.5132	0.4890	0.0242	4.95	4.86	
	12.0110	12.5134	12.4906	12.4905	-0.0001	SI	0.5024	0.4795	0.0229	4.78		
L3	11.3960	11.9082	11.8820	11.8818	-0.0002	SI	0.5122	0.4858	0.0264	5.43	5.39	
	11.2180	11.7237	11.6982	11.6980	-0.0002	SI	0.5057	0.4800	0.0257	5.35		
L14	12.6455	13.1065	13.0858	13.0852	-0.0006	SI	0.4610	0.4397	0.0213	4.84	4.76	
	14.5110	15.0268	15.0042	15.0038	-0.0004	SI	0.5158	0.4928	0.0230	4.67		
L15	16.9056	17.4497	17.4272	17.4268	-0.0004	SI	0.5441	0.5212	0.0229	4.39	4.46	
	12.7417	13.1717	13.1535	13.1531	-0.0004	SI	0.4300	0.4114	0.0186	4.52		
L16	11.5299	12.0406	12.0167	12.0162	-0.0005	SI	0.5107	0.4863	0.0244	5.02	5.06	
	12.0109	12.5188	12.4946	12.4941	-0.0005	SI	0.5079	0.4832	0.0247	5.11		
L4	11.3963	11.9653	11.9392	11.9389	-0.0003	SI	0.5690	0.5426	0.0264	4.87	4.82	
	11.2180	11.7308	11.7075	11.7074	-0.0001	SI	0.5128	0.4894	0.0234	4.78		
L9	12.6454	13.1158	13.0976	13.0974	-0.0002	SI	0.4704	0.4520	0.0184	4.07	3.89	
	14.5112	15.0184	15.0008	15.0003	-0.0005	SI	0.5072	0.4891	0.0181	3.70		
L10	16.9055	17.4441	17.4245	17.4242	-0.0003	SI	0.5386	0.5187	0.0199	3.84	4.07	
	12.7411	13.2065	13.1878	13.1873	-0.0005	SI	0.4654	0.4462	0.0192	4.30		

Todas las masas expresadas en gramos			Estufa 102-104 °C controlada, 2hs hasta masa constante.					IDF 26A:1993				
Muestra	Crisol	crisol + muestra	1a pesada (2hs)	2a pesada (1 hora despues de la primera pesada)	dif masa 1-2	masa const	masa inicial	masa final	Humedad	% humedad	% humedad promedio	
L11	16.5916	17.0726	17.0518	17.0512	-0.0006	SI	0.4810	0.4596	0.0214	4.66	4.68	
	16.9956	17.4570	17.4368	17.4363	-0.0005	SI	0.4614	0.4407	0.0207	4.70		
L13	16.6931	17.1452	17.1260	17.1258	-0.0002	SI	0.4521	0.4327	0.0194	4.48	4.46	
	16.2267	16.7669	16.7443	16.7440	-0.0003	SI	0.5402	0.5173	0.0229	4.43		
L20	11.5298	12.0165	11.9908	11.9903	-0.0005	SI	0.4867	0.4605	0.0262	5.69	5.64	
	12.0108	12.5120	12.4856	12.4855	-0.0001	SI	0.5012	0.4747	0.0265	5.58		
S2	11.3957	11.8607	11.8425	11.8423	-0.0002	SI	0.4650	0.4466	0.0184	4.12	4.77	
	11.2177	11.7180	11.6921	11.6923	0.0002	SI	0.5003	0.4746	0.0257	5.42		

8.2. Anexo II

Trabajos presentados

Como se indicó en las “Notas del autor” se presentan en este anexo las constancias de los trabajos presentados a partir de esta tesis.

The screenshot shows the ScholarOne Manuscripts submission confirmation page. At the top left, it says "ScholarOne Manuscripts" and at the top right, the URL "http://mc.manuscriptcentral.com/ay". The main header features "RSC Publishing Analytical Methods" with navigation links: "Edit Account | Instructions & Forms | Log Out | Get Help Now". Below this is the "SCHOLARONE Manuscripts" logo. A breadcrumb trail reads "Main Menu → Author Dashboard → Submission Confirmation". On the right, it states "You are logged in as Moisés Knochen". The central heading is "Submission Confirmation" with the message "Thank you for submitting your manuscript to *Analytical Methods* .". The submission details are as follows:

- Manuscript ID: AY-ART-06-2009-000079
- Title: DETERMINATION OF TOTAL SELENIUM BY MULTICOMMUTATED-FLOW HYDRIDE GENERATION ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY. APPLICATION TO COW'S MILK AND INFANT FORMULAE
- Authors: Pistón, Mariela; Silva, Javier; Pérez, Ramiro; Knochen, Moisés
- Date Submitted: 18-Jun-2009

At the bottom right, there are "Print" and "Return to Dashboard" icons. The footer contains the following text: "ScholarOne Manuscripts™ v4.1.3 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2009. All Rights Reserved. ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc. Terms and Conditions of Use - ScholarOne Privacy Policy - [Get Help Now](#)".



DETERMINATION OF NITRATE AND NITRITE IN MILK POWDER AND INFANT FORMULA USING A SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS (SIA) SYSTEM.

Mariela Pistón* (PG), Alicia Mollo (PQ), Jeanette Araujo (PQ) and Moisés Knochen (PQ)
mpiston@fq.edu.uy.

Universidad de la República. Facultad de Química. DEC - Cátedra de Química Analítica
Av. Gral. Flores 2124. 11800 Montevideo, Uruguay.

Keywords: SIA, milk, nitrate, nitrite.

Introduction

Nitrate may have a negative impact on health because it may be reduced to nitrite which is toxic and may cause methemoglobinemia, which presents symptoms of cyanosis and anoxia. Young children are more prone to this condition, thus it is important to control the levels of nitrate and nitrite in milk and infant formulas consumed by the children and infants during lactation period, specially those without breast-fed.

An automated system based on Sequential Injection Analysis (SIA) [1] was developed for the determination of nitrate and nitrite in these products for quality control purposes.

Experimental

Nitrite is determined by reaction with N-(1-Naphthyl)ethylenediamine and sulphanilamide and measurement of absorption at 540 nm. Nitrate is reduced on-line to nitrite in a Cd minicolumn and the nitrite determined colorimetrically as explained before. Control of the system and data acquisition were carried out from a personal computer fitted with an analogue-to-digital (A/D) interface card and a program compiled in Visual Basic 6. The system comprised a syringe pump, a 10-port selector valve, reactors and connectors made in 0.8-mm ID PFA tubing, a Cd reducing minicolumn and a flow cell installed in a spectrophotometer.

Previously to introduction to the SIA system, fat and protein in the samples were precipitated according to the official IDF method [2]. This method was also used as the reference method for validation.

Results and Discussion

The proposed method exhibits good linearity ($r^2 = 0.999$) and precision ($S_R \%$, $n = 5$) $< 3\%$. In the analysis of commercial samples, the agreement between the results provided by the proposed and the reference method was found to be appropriate for the purpose.

Sampling frequency was 30 samples/hour (nitrate) and 45 samples/hour (nitrite).

Conclusions

A successful application of a SIA system automated and controlled via software is presented. This technique presents multiple advantages as opposed to the tedious traditional methods of dairy product analysis.

Acknowledgements

UdelaR-CSIC and PEDECIBA (UNDP Project URU/97/016)

[1] Ruzicka, J., Marshall G. D. "Sequential Injection: A New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays". *Anal. Chim. Acta*, 237 (1990) 329.

[2] Dried milk. Determination of nitrate content. Screening method using cadmium reduction. Provisional international IDF standard 118:1984. International Dairy Federation Secretariat, Brussels, 1984.





DETERMINATION OF NITRATE AND NITRITE IN MILK POWDER AND INFANT FORMULA USING A SEQUENTIAL INJECTION ANALYSIS (SIA) SYSTEM.

Mariela Pistón* (PG), Alicia Mollo (PQ), Jeannette Araújo (PQ) and Moisés Knochen (PQ)
mpiston@fq.edu.uy.

Universidad de la República. Facultad de Química. DEC - Cátedra de Química Analítica
Av. Gral. Flores 2124. 11800 Montevideo, Uruguay.



INTRODUCTION

The objective of this work was the development of an automated system based on Sequential Injection Analysis (SIA) for the determination of nitrate and nitrite in milk and infant formulas for quality control purposes.

Nitrate may have a negative impact on health because it may be reduced to nitrite which is toxic. Young children are more prone to this condition, thus it is important to control the levels of nitrate and nitrite in milk and infant formulas consumed by the children and infants during lactation period, specially those without breast-feeding.

MATERIALS

Syringe pump, Cavro XP-3000
10-port selector valve, Valco Cheminert
Reactors and connectors made in 0.8-mm ID PFA tubing
Beckman B modified spectrophotometer with flow cell
IBM-compatible PC (Pentium III - 600 MHz) with 2 serial ports, fitted with a 12-bit analogue-to-digital (A/D) interface card (Measurement Computing CIO-DAS08Jr) and a program compiled in Visual Basic 6



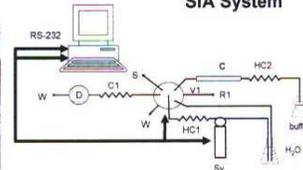
METHODS

Fat and protein in the samples were precipitated according to the official IDF method (118:1984).

Nitrite was determined by reaction with sulphanilamide and N-(1-Naphthyl) ethylenediamine and measurement of absorption at 540 nm.

Nitrate was reduced on-line to nitrite in a Cd/Cu minicolumn and the nitrite determined colorimetrically as above.

SIA System



C1: mixing coil (50 cm x 0.8 mm), HC1: 100 cm x 0.8 mm, HC2: 110 cm x 0.8 mm, S: sample, R1: chromogenic reagent, V1: selector valve, Sy: syringe pump (2.5 mL), D: detector, C: Cd/Cu minicolumn, W: waste

RESULTS

The contents of nitrate and nitrite in the samples were below the detection limit, thus the accuracy was evaluated with spiked samples. The results were also compared with the official IDF method.

Parameter	Nitrate (NO ₃ -N)	Nitrite (NO ₂ -N)
LOD (mg/L), (3 σ, n = 10)	0.17	0.025
LOQ (mg/L), (10 σ, n = 10)	0.55	0.084
Precision (sr(%), n=10)	< 2 %	< 2 %
Linearity range (mg/L)	0.55 -15.0 (r ² >0.999)	0.084 - 1.01 (r ² >0.999)
Sampling rate (samples/hour)	30	80
Accuracy		
Recovery assay		
	Nitrate	Nitrite
t - critical (α=0.05, 5)	2.57	2.57
t - experimental (α=0.05, 5)	-0.19	0.55
Results indicate that there is no significant difference between the mean recovery percentage and 100%.		
Method comparison		
	Nitrate	Nitrite
t - critical (α=0.05, 5)	2.23	2.45
t - experimental (α=0.05, 5)	0.34	0.16
Results indicate that there is no significant difference between the concentrations obtained with both methods.		

Sample	Analyte	Official IDF method (118:1984)	SIA	SIA Recovery (%)
		S ₁	S ₂	[(S ₂ -S ₁)/(C ₂ -C ₁)] x100
Infant Formula A	Nitrate (mg/L)	5.555	5.573	99.8
	Nitrite (mg/L)	0.203	0.208	105.9
Infant Formula B	Nitrate (mg/L)	5.430	5.617	100.6
	Nitrite (mg/L)	0.202	0.209	103.7
Infant Formula for children from 0 to 6 months	Nitrate (mg/L)	5.520	5.533	93.8
	Nitrite (mg/L)	0.201	0.186	92.0
Infant Formula for children from 6 to 12 months	Nitrate (mg/L)	5.416	5.380	96.3
	Nitrite (mg/L)	0.199	0.210	104.3
Non-fat milk powder	Nitrate (mg/L)	5.620	5.800	100.6
	Nitrite (mg/L)	0.200	0.191	94.6
Milk powder	Nitrate (mg/L)	5.632	5.643	106.9
	Nitrite (mg/L)	0.211	0.219	108.5
Found concentrations in spiked samples: S ₁ , S ₂ Added nitrate (mg NO ₃ -N/L) C ₁ = 3.36, C ₂ = 6.88; added nitrite (mg NO ₂ -N/L) C ₁ =0.10, C ₂ =0.20				

CONCLUSIONS

A successful application of a SIA system automated and controlled via software is presented. The results provided by the proposed and the reference method were found to be statistically equivalent. This method presents multiple advantages as opposed to the tedious traditional methods of dairy product analysis.

Acknowledgements The authors thank UdelaR – CSIC and PEDECIBA (UNDP Project URU/97/016) for economic support, Gramon-Bagó Uruguay and CONAPROLE for providing samples, and Ramiro Pérez and Cecilia Rimoldi for their collaboration in the experimental work.



H-Poster-26

DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE COBRE Y ZINC EN LECHE EN POLVO Y FÓRMULAS INFANTILES MEDIANTE UN SISTEMA DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA).

Pistón, M. y Knochen, M.

Universidad de la República – Facultad de Química – Cátedra de Química Analítica. Av. Gral. Flores 2124. Casilla de Correo 1157. CP 11800 Montevideo – Uruguay

Se propone la automatización en la determinación de cobre y zinc en leche en polvo y formulaciones infantiles de base láctea mediante un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) controlado desde un PC.

Se trata de una determinación simple basada en la variación de la estabilidad de los complejos formados entre el 2-carboxi-2'-hidroxi-5'-sulfoformazilbenzol (zincon) y los metales a diferentes pH y posterior detección espectrofotométrica a 612 nm.

Un único sistema en flujo permite la determinación de Cu(II) a pH 5 dado que a ese pH el complejo Cu (II)-zincon es estable, y la determinación de Zn (II) a pH 9, agregando un agente enmascarante (citrato de sodio) a las soluciones buffer. De este modo es posible enmascarar casi completamente el Cu(II) a pH 9, así como evitar la formación de complejos con otros metales constitutivos de la matriz. La mineralización de las muestras se realiza según el método AOAC 985.35 [1].

Este método, basado en espectrometría de absorción atómica de llama fue usado también como método de referencia para la validación.

En las muestras analizadas el apartamiento de los resultados entre ambos métodos fue menor al 5%.

Se verificó linealidad hasta 1 mg/L para Cu y hasta 10 mg/L para Zn, la precisión (RSD) en ambos casos fue mejor que 3%. La frecuencia de muestreo fue 60 muestras/hora.

El método automatizado propuesto es mucho más económico que los basados en espectrometría ICP o AAS y arrojó resultados equivalentes con una mayor productividad.

1. Official Methods 985.35. Minerals in Ready to Feed Milk Based Infant Formula and Pet Foods (Atomic Absorption Spectrophotometric Method). Infant Formula and Medical Diets, 50.1.14. 16th Ed. AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD (1996).
2. J. Ruzicka, E. Hansen. "Flow Injection Analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis". Anal. Chim. Acta 78 145-147 (1975).



DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE COBRE Y ZINC EN LECHE EN POLVO Y FÓRMULAS INFANTILES MEDIANTE UN SISTEMA DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

Mariela Pistón y Moisés Knochen
 Universidad de la República - Facultad de Química - Cátedra de Química Analítica.
 Av. Gral. Flores 2124. Casilla de Correo 1157. CP 11800 Montevideo - Uruguay

mpiston@fq.edu.uy

INTRODUCCIÓN

Muchos de los procesos vitales son dependientes de ciertos elementos esenciales y de su correcta distribución y balance en este sentido las formulaciones infantiles son alternativas para aportar a lactantes y niños de corta edad los nutrientes que necesita cuando la lactancia materna no pueda llevarse a cabo o resulta deficiente por diferentes razones.

Las determinaciones químico analíticas de cobre y zinc se realizan habitualmente empleando una variedad de técnicas y métodos clásicos, costosos y tediosos.

Se propone la automatización en la determinación de cobre y zinc en leche en polvo y formulaciones infantiles de base láctea mediante un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) controlado desde un PC.

MATERIALES

Bomba peristáltica Gilson Minipuls 2.

Válvula Valco Cheminert de 6-puertos con actuador microeléctrico, controlada con un PC mediante un programa escrito en lenguaje QuickBasic 4.0 bajo DOS 6.0, vía puerto serial RS232.

Espectrómetro Hewlett Packard HP 8453 UV-Vis con celda de flujo de 200 μ L.

Reactores helicoidales y tubos de PFA de 0.8 mm de diámetro interno.

Reactivos de calidad analítica para la preparación de buffers.

Los patrones se prepararon a partir de zinc y cobre metálicos.

Para la formación de complejos se utilizó sal disódica de zincón p.a para determinación espectrofotométrica de Cu y Zn.

MÉTODOS

Se trata de una determinación basada en la variación de la estabilidad de los complejos formados entre el 2-carboxi-2'-hidroxi-5-sulfoformazilbenzol (zincón) y los metales a diferentes pH y posterior detección espectrofotométrica a 612 nm.

Un único sistema en flujo permite la determinación de Cu(II) a pH 5 (30% en etanol) dado que a ese pH el complejo Cu (II)-zincón es estable, y la determinación de Zn (II) a pH 9, agregando un agente enmascarante (citrato de sodio 0,3 M) a las soluciones buffer.

De este modo es posible enmascarar casi completamente el Cu(II) a pH 9, así como evitar la formación de complejos con otros metales constitutivos de la matriz.

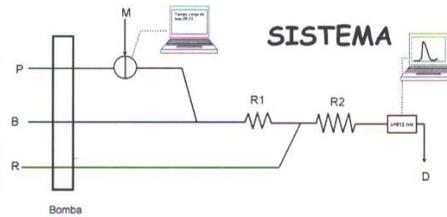
La mineralización de las muestras se realiza según el método AOAC 985.35.

Este método, basado en espectrometría de absorción atómica de llama (AAS) fue usado como método de referencia para la validación.

RESULTADOS

Las muestras analizadas representan las formulaciones infantiles de mayor consumo en el país, también fueron analizadas las leches en polvo comunes entera (LE) y descremada (LD). La precisión en todos los casos fue mejor que 3% ($S_r, \% n=5$). Los resultados del test - t indican que el método oficial (AAS) y el propuesto (FIA) son comparables.

MUESTRA	Análito	AAS Concentración (mg/100 g)	FIA Concentración (mg/100 g)	Cociente (FIA/AAS)	$S_r, \% (n=5)$
Fórmula Infantil A	Cu	0.393	0.365	0.93	2.4
	Zn	3.78	3.89	1.03	1.5
Fórmula Infantil B	Cu	0.377	0.359	0.95	3.1
	Zn	4.00	4.16	1.04	1.8
Fórmula Infantil para niños de 0 a 6 meses	Cu	0.361	0.370	1.02	1.2
	Zn	4.59	4.58	0.98	0.3
Fórmula Infantil para niños de 6 a 12 meses	Cu	0.333	0.318	0.95	2.8
	Zn	3.88	3.87	0.98	0.9
LD	Cu	0.134	0.137	1.02	1.7
	Zn	3.20	3.25	1.01	2.2
LE	Cu	0.094	0.098	1.04	1.1
	Zn	2.55	2.65	1.04	0.5



Bomba: bomba peristáltica; P: portador, agua destilada (1.4 mL/min); B: buffer de reacción (1.7mL/min); R: reactivo para desarrollo de color, zincón; (1.7mL/min); M: muestra (450 μ L); R1: reactor helicoidal de 50 cm; R2: reactor helicoidal de 100 cm; D: descarte.



Parámetro	Cobre	Zinc
LD (mg/L)	0.010	0.032
3 σ blanco/pendiente curva de calibración		
LQ (mg/L)	0.032	0.107
10 σ blanco/pendiente curva de calibración		
Rango lineal	0.03 - 1 mg/L (n=998)	0.1 - 10 mg/L (n=998)
Frecuencia de muestreo (muestras/hora)	60	60
Exactitud	Cobre	Zinc
t - crítica ($\alpha=0.05$)	2.57	2.57
t - experimental ($\alpha=0.05$)	-0.58	1.9

$\mu S/\mu R$ = promedio (para n muestras) de los cocientes entre el valor obtenido por el método FIA y el valor obtenido por el método de referencia.

CONCLUSIONES

El método automatizado propuesto requiere una menor inversión que los basados en espectrometría atómica y arrojó resultados equivalentes con una mayor productividad.

AGRADECIMIENTOS: UdelaR - CSIC, PEDECIBA - Química.

**8^{VO} SIMPOSIO LATINOAMERICANO DE
QUÍMICA ANALÍTICA AMBIENTAL Y
SANITARIA**

RESÚMENES

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
CENTRO DE ELECTROQUÍMICA Y ENERGÍA QUÍMICA
FACULTAD DE MICROBIOLOGÍA**

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE
COSTA RICA**

**RED PARA EL ANÁLISIS DE LA CALIDAD
AMBIENTAL EN AMÉRICA LATINA**

San José, Costa Rica
16-20 Febrero de 2009



RACAL



ITCR



IAEAC



UCR

Resúmenes

Carteles Métodos de Análisis

**CMA-7
MÉTODO AUTOMATIZADO PARA LA DETERMINACIÓN DE ARSÉNICO TOTAL
EN MUESTRAS DE AGUA MEDIANTE HG-AAS**

Mariela Pistón¹, Javier Silva, Ramiro Pérez, Moisés Knochen, Isabel Dol.

¹Universidad de la República. Facultad de Química. DEC - Cátedra de Química Analítica.
Tel: +598 2 9241808. mpiston@fq.edu.uy. Av. Gral. Flores 2124. 11800 Montevideo,
Uruguay.

El arsénico se presenta en la naturaleza en bajas concentraciones por lo que para su determinación se necesitan técnicas muy sensibles. Se trata de un elemento importante desde el punto de vista ambiental por su toxicidad para el ser humano tanto aguda como crónica.

Se propone un método automatizado para la determinación de arsénico en agua. Se emplea un sistema en flujo multiconmutado con detección mediante espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS).

El sistema emplea una bomba peristáltica y dos válvulas solenoide controladas desde un computador personal que realiza también la adquisición y procesamiento de los datos.

Las cifras de mérito fueron: LD $0.46 \mu\text{g L}^{-1}$, LQ $1.54 \mu\text{g L}^{-1}$, $s_{\text{R}}(\%) < 3\%$, rango lineal hasta $10 \mu\text{g L}^{-1}$, frecuencia de muestreo $60 \text{ muestras hora}^{-1}$, lo cual es adecuado para los requisitos de cuantificación según normas internacionales para agua de consumo humano. Se evaluó la exactitud mediante dos ensayos interlaboratorio utilizando muestras de agua siendo la recuperación aparente 96.0% y 98.8% . Comparado con el método manual (APHA 3114) el sistema consume 5 veces menos muestra y utiliza el agente reductor 5 veces más diluido con la consiguiente disminución en la generación de residuos contaminantes.



Método automatizado para la determinación de arsénico total en muestras de agua mediante HG-AAS

Mariela Pistón*, Javier Silva, Ramiro Pérez, Moisés Knochen, Isabel Dol
 Universidad de la República. Facultad de Química. DEC - Cátedra de Química Analítica
 mpiston@fq.edu.uy



Av. Gral. Flores 2124. 11800 Montevideo, Uruguay

Objetivo

Desarrollo de un método automatizado para la determinación de arsénico en muestras de agua de consumo humano, mediante un sistema en flujo multiconmutado y detección mediante espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS).

Sistema

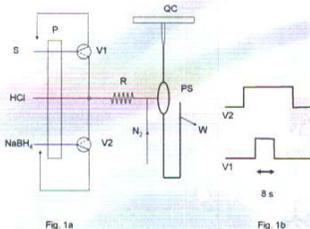


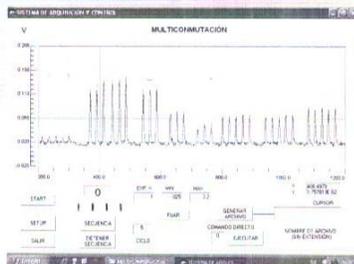
Fig. 1a: Esquema del sistema para la determinación de As mediante MCFH-HG-AAS.

P: bomba peristáltica. V1, V2: válvulas solenoide. R: bobina de reacción. PS: separador de fases. QC: celda de cuarzo. W: descarté. S: muestra, 7.2 mL min⁻¹. HCl: disolución al 5% (v/v), 3.2 mL min⁻¹. NaBH₄: disolución al 1.2% (m/v) en NaOH 0.05% (m/v), 1.7 mL min⁻¹. N₂ 0.32 L min⁻¹.

Fig. 1b: Secuencia de tiempos de activación de las válvulas solenoide V1 y V2 para un ciclo de medida.

Para el control del sistema y adquisición de los datos se desarrolló un programa en el laboratorio.

Se presenta la pantalla del computador con el sistema de adquisición de datos funcionando.

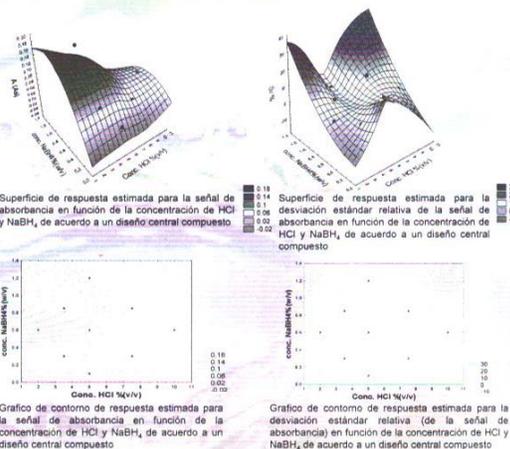


Referencias

F. Antonio de Azevedo, A. A. da Matta Chasin (editores), "Metais. Gerenciamento da Toxicidade", Atheneu, Sao Paulo, 2003.
 F. R. P. Rocha, B. F. Reis, E. A. G. Zagatto, J. L. F. C. Lima, R. A. S. Lapa, J. L. M. Santos, "Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends", Anal. Chim. Acta 468 (2002) 119.
 J. Dedina, D. L. Tsalev, "Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry", Wiley, Chichester, 1995.

Resultados

Se realizó la optimización mediante dos diseños centrales compuestos. Se demostró que las variables de influencia son: concentraciones de HCl y de NaBH₄.



Cifras de mérito	Frecuencia de muestreo 60 h ⁻¹	Frecuencia de muestreo 120 h ⁻¹	Método APHA 3114 (manual)
LD (µg L ⁻¹)	0.5	0.3	0.3
LC (µg L ⁻¹)	1.5	1.0	1.0
Sr muestra (%)	<3	<5	<6
Recuperación aparente material de referencia "Elementos Tóxicos en Agua" (CENAM) (%)	96	90	115
	98	90	109
Rango lineal (µg L ⁻¹)	0 – 10	0 – 10	El ajuste es cuadrático en el rango de trabajo requerido
R	0.9995	0.9999	
Consumo de muestra por determinación (mL)	2.5	1.0	10
Consumo de HCl concentrado por determinación (mL)	0.16	0.08	2.5
Consumo de NaBH ₄ por determinación (mg)	60	20	320

Conclusiones

El sistema automatizado propuesto es adecuado para la determinación de As en muestras de agua de consumo humano. Es rápido, presenta bajo consumo de reactivos y genera pocos desechos químicos.

Agradecimientos

UdeLaR, CSIC



PEDECIBA Química



Automated method for total selenium determination in drinking water samples by HG-AAS.

Javier Silva, Mariela Pistón, Ramiro Pérez, Isabel Dol and Moisés Knochen
Universidad de la República, Facultad de Química, DEC, Cátedra de Química Analítica
Av. Gral. Flores 2124. 11800 Montevideo, Uruguay.

e-mail: mpiston@fq.edu.uy

Keywords: total selenium, hydride generation, automation

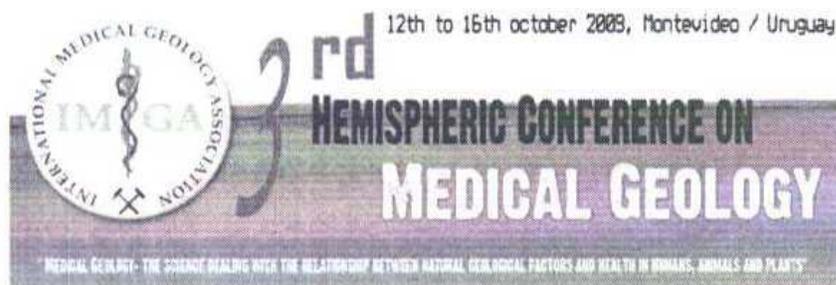
Selenium occurs in nature at low concentrations, therefore the analytical determination requires highly sensitive techniques. From the environmental point of view it is important because of its toxicity to humans due to the narrow range between dietary deficiency and toxic level.¹

An automated method for the determination of selenium in drinking water is proposed. It is based on a multicommutated flow system with detection by hydride generation - atomic absorption spectrometry (HG-AAS)². The system uses a peristaltic pump and two solenoid valves. A personal computer controls the valves and the acquisition and processing of the data.

Detection and quantification limits were $0.08 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.27 \mu\text{g L}^{-1}$ respectively, linear range was up to $27 \mu\text{g L}^{-1}$, sampling frequency was 160 hour^{-1} . The accuracy was evaluated by spiking various water samples, with recoveries in the range 95% -116%. Compared with the manual method (APHA 3114) the system consumes 15 times less sample and the reducing agent used is 6 times more diluted with the consequent reduction in the generation of pollutants and waste. As an additional advantage the system is very fast and efficient.

Bibliography:

1. O. Selinus, B. Alloway, J.A. Centeno, R.B. Finkelman, U. Lindh, P. Smedley, *Essentials of Medical Geology. Impacts of the Natural Environment on Public Health*. Elsevier, 2005.
2. J. Dedina, D. L. Tsalev, *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. Wiley, 1995.



Dear Dr. Pistón,

The Scientific Program Committee of the 3rd Hemispheric Conference on Medical Geology to be held in Montevideo, 12 -16 October 2009, is pleased to confirm the acceptance of your abstract (Ref no.28) with minor corrections entitled: Automated method for total selenium determination in drinking water samples by HG-AAS.

We attach the abstract evaluation by the ISC

In multi-authored abstracts, you are the only person being contacted and we request that you relay the above information to your co-authors.

As a pre-condition for scheduling your abstract into the Conference program, you are reminded that you must register and pay the conference registration fees if you have not already done so. The abstract's authors are able to pay our early registration fees before **15 July, 2009**. You will have to fill the observations field with the words "Abstract presenter" following with your condition (not members - members - students)

15^o ENQA e 3^o CIAQA 2009

Determinación de selenio total en leche y fórmulas infantiles mediante Análisis en Flujo Multiconmutado con detección HG-AAS

Mariela Pistón* (PG), Javier Silva (PG), Ramiro Pérez (IC), Moisés Knochen (PQ).

mpiston@fq.edu.uy

Universidad de la República, Facultad de Química, Cátedra de Química Analítica – DEC, Av. Gral. Flores 2124, 11800 Montevideo, Uruguay

Palabras clave: selenio, leche, automatización

Introducción

El rol que los elementos traza juegan en la salud y la nutrición, ha adquirido relevancia en los últimos tiempos. La correcta dosificación de selenio en la dieta es de suma importancia debido al estrecho rango entre la deficiencia y el nivel tóxico para el ser humano.¹

Los valores recomendados son del orden de 20 µg/día para niños menores de 3 años a 55 µg/día para adultos. Dichos requerimientos nutricionales pueden ser satisfechos por la alimentación y por la ingesta de agua. Tanto la leche como las fórmulas infantiles comerciales son de especial importancia por su contribución a la nutrición infantil.

Se presenta un sistema en flujo multiconmutado² para la determinación de selenio en leche fluida, leche en polvo y fórmulas infantiles con detección mediante espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros.

Resultados y Discusión

El sistema en flujo utiliza una bomba peristáltica y dos válvulas solenoide de 12 V de 3 vías. Esta últimas fueron controladas por una interfase construida en el laboratorio sobre un circuito integrado ULN-2803 que a su vez fue controlado por un computador, vía el puerto paralelo LPT1.

El volumen de muestra puede ser fácilmente modificado cambiando el tiempo de activación de una válvula solenoide, vía software, permitiendo trabajar con diferentes rangos de concentración.

Como portador se utilizó HCl 5% (v/v). Por cada determinación se consumen 0.6 mL de muestra y 1.2 mL de NaBH₄ 0.5% (m/v) en NaOH 0.05% (m/v).

Las muestras de leche en polvo y las fórmulas infantiles, fueron mineralizadas mediante digestión en microondas con HNO₃/H₂O₂. La leche fluida fue digerida agregando agua regia y sonicada 15 minutos. La prerreducción se realizó con HCl 30%(v/v) y se agregó ácido sulfámico para evitar la interferencia generada por los óxidos de nitrógeno remanentes de la mineralización.

15^o Encontro Nacional de Química Analítica e 3^o Congreso Iberoamericano de Química Analítica.

Tabla 1. Validación

Cifras de Mérito	Resultado
Precisión (s)	<10%
Rango Lineal	0.3 a 27 µg.L ⁻¹
Límite de detección leche en polvo-leche fluida (3σ/pendiente)	3.2 µg.kg ⁻¹ -0.8 µg.L ⁻¹
Límite de cuantificación leche en polvo-leche fluida (10σ/pendiente)	10.8 µg.kg ⁻¹ -2.7 µg.L ⁻¹
Frecuencia de muestreo	160 h ⁻¹

Para evaluar la exactitud para leche en polvo y fórmulas infantiles, se utilizó material de referencia certificado, NIST-1549 *Non-fat milk powder* y NIST-1846 *Infant Formula*. Al nivel de confianza 95% (n=5), se realizó un test *t* que indicó que los resultados obtenidos por el método en flujo no difieren significativamente del valor certificado. Para leche fluida se realizaron adiciones estándar obteniéndose una recuperación media de 95.8%.

El método fue aplicado para la determinación de 10 muestras de leche fluida de diverso origen, 17 muestras de leche en polvo y 6 muestras de fórmulas infantiles representativas del mercado Uruguayo.

Los valores obtenidos estuvieron en el rango de 11.5 - 34.1 µg L⁻¹ para leche fluida, 29 - 110 µg kg⁻¹ para leche en polvo y 29 - 110 µg kg⁻¹ para fórmulas infantiles comerciales.

Conclusiones

El sistema multiconmutado propuesto demostró ser adecuado para la determinación de selenio total en este tipo de muestras. Es un sistema rápido, consume poca muestra y reactivos y genera menos residuos químicos.

Agradecimientos

UdelaR-CSIC, PEDECIBA-Química

Selinus, O; Alloway, B; Centeno, J.A; Finkelman, R.B; Lindh, U; Smedley, P. *Essentials of Medical Geology. Impacts of the Natural Environment on Public Health*; Editora Elsevier, 2005

² Feres, M.A., Fortes, P.R., Zagatto, E.A.G., Santos, J.L.M., Lima, J. L.F.C. *Analytica Chimica Acta*, 2009,618, 1.

15^o ENQA e 3^o CIAQA 2009

Determinación de zinc en leche y estudio comparativo de dos sistemas de Análisis en Flujo.

Mariela Pistón* (PG), Carolina Pioda (IC), Moisés Knochen (PQ).

mpiston@fq.edu.uy

Cátedra de Química Analítica - DEC, Facultad de Química Universidad de la República, Av. Gral. Flores 2124, 11800. Montevideo – Uruguay

Palabras Clave: zinc, leche, análisis en flujo

Introducción

La determinación de zinc en alimentos es importante debido a que es un elemento esencial para el hombre.

Los métodos de análisis en flujo son ampliamente usados para el análisis de alimentos. El análisis en flujo con inyección secuencial (SIA) surgió en un principio para dar soluciones a algunas de las desventajas del análisis por inyección en flujo (FIA).¹ Se presenta una comparación entre el desempeño de un sistema FIA y un sistema SIA tomando como ejemplo la determinación de zinc en leche en polvo.

La determinación está basada en la formación de un complejo entre el 2-carboxi-2'-hidroxi-5'-sulfoformazilbenzol (zincón) y el zinc a pH 9 agregando un agente enmascarante para evitar interferencias y posterior detección espectrofotométrica a 612 nm.

Resultados y Discusión

Tabla 1. Cuadro comparativo

Parámetro	Resultado Sistema FIA	Resultado Sistema SIA
Límite de detección en disolución ($3\sigma_{\text{Blanco}}/\text{pendiente}$) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.032	0.130
Límite de cuantificación en disolución ($10\sigma_{\text{Blanco}}/\text{pendiente}$) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.107	0.433
Rango lineal ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,1-10 ($r>0.998$)	0,4-10 ($r>0.99$)
Frecuencia de muestreo h^{-1}	60	75
Precisión (sr %)	<4	<5
Consumo de muestra (mL)	0.45	0.10
Consumo de reactivos (zincón y tampón) (mL) determinación	3.2	0.2

Para evaluar la veracidad para leche en polvo y fórmulas infantiles, los resultados fueron comparados con los obtenidos mediante el método de referencia² AOAC mediante absorción atómica de llama, además se utilizó material de referencia certificado, NIST-1549 Non-fat milk powder y NIST-1846 Infant Formula.

Al nivel de confianza 95%(n=5), se realizó un test *t* que indicó que los resultados obtenidos por el método en flujo no difieren significativamente del obtenido utilizando el método oficial ni del valor certificado.

El sistema SIA presentó límites de detección y cuantificación mayores que FIA, pero son adecuados para la aplicación. Ambos sistemas son adecuados para la determinación con desempeños semejantes en cuanto a linealidad, precisión y veracidad. Las ventajas del sistema SIA se revelan en cuanto a una mayor velocidad de muestreo y sobre todo el bajo consumo de reactivos (16 veces menor) y muestra para alcanzar igual desempeño que el sistema FIA.

Conclusiones

Tanto el sistema de inyección en flujo (FIA) como el sistema con inyección secuencial (SIA), fueron exactos y eficientes para la determinación de zinc en leche. El sistema en flujo SIA mostró un desempeño equivalente al del sistema FIA siendo más rápido y consumiendo menor cantidad de muestra y reactivos.

Agradecimientos

UdelaR, CSIC, PEDECIBA-Química

¹ Economou, A., *Trends in Analytical Chemistry*, 2005, 24(5)416.

² Bueno M. P. (Ed.). AOAC. *Official methods of analysis*. 985.35. *Minerals in Ready-to-Feed Milk-Based, Infant Formula and Pet Food*. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemist. 1996.



Submissão

Submissão de Atividades



Você já submeteu 2 de 2 atividades permitidas.

Submeter ou Alterar Submissão do **cpf: 31523439**

Titulo	Tipo de Atividade	Área	Status	Comprovante/Carta
Determinación de selenio total en leche y fórmulas infantiles mediante Análisis en Flujo Multiconmutado con detección HG-AAS	TR	Química Analítica Aplicada a Alimentos	Selecionada	clique aqui
Determinación de zinc en leche mediante análisis en flujo: estudio comparativo FIA - SIA.	TR	Química Analítica Aplicada a Alimentos	Selecionada	clique aqui

Atualiza Dados do Proponente



**15º. ENQA – Encontro Nacional de Química Analítica e
3º CIAQA - Congresso Iberoamericano de Química Analítica**