



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Desarrollo de métodos alineados con la Química Analítica Verde para la determinación de cobre, manganeso y selenio en muestras de agua y agrícola-ganaderas mediante técnicas de espectrometría atómica.

Javier Rómulo Silva Silva

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Doctor

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Mayo 2024

Desarrollo de métodos alineados con la Química Analítica Verde para la determinación de cobre, manganeso y selenio en muestras de agua y agrícola-ganaderas mediante técnicas de espectrometría atómica.

Tribunal:

Dra. Marianela Savio

Dra. Lucía Pareja

Dra. Gianella Facchin

Prof. Titular Dra. Mariela Mónica Pistón Pedreira, Directora

**Desarrollo de métodos alineados con la Química Analítica Verde
para la determinación de cobre, manganeso y selenio en muestras
de agua y agrícola-ganaderas mediante técnicas de espectrometría
atómica.**

Javier Rómulo Silva Silva

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

2024

Directora de Tesis y Académica: Prof. Titular Dra. Mariela Mónica Pistón
Pedreira



ACTA DEFENSA DE TESIS

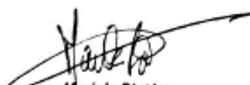
V 02.
2022/11/03

CARRERA DE POSGRADO	Doctorado en Química		
ESTUDIANTE	NOMBRE: JAVIER RÓMULO SILVA SILVA	C.I. 3846710-3	
DEFENSA	LUGAR Salón del Claustro - Facultad de Química	FECHA 13/05/204	HORA 9:30
TÍTULO DE TESIS	Desarrollo de métodos alineados con la Química Analítica Verde para la determinación de cobre, manganeso y selenio en muestras de agua y agrícola-ganaderas mediante técnicas de espectrometría atómica.		
DICTAMEN ¹	CALIFICACIÓN Excelente	NOTA 12	

JUSTIFICACIÓN

El trabajo escrito es de muy buena calidad con objetivos meticulosamente definidos y han sido alcanzados con éxito, cumpliendo con lo establecido y presentando resultados originales de interés para el sector agrícola ganadero, así como también para la investigación académica. El candidato comunicó claramente sus ideas y presentó los resultados de una forma comprensible y concisa. La presentación estuvo bien estructurada y articulada lo que facilitó la comprensión y una evaluación exhaustiva de la investigación en el tiempo asignado para la presentación. Además respondió en forma solvente las preguntas realizadas por el tribunal. El trabajo de doctorado dio origen a varias presentaciones en congresos, algunas de ellas en formato oral y dos publicaciones en revistas arbitradas demostrando la calidad de los resultados.

DIRECTORES DE TESIS
(nombres y firmas)



Mariela Pistón

TRIBUNAL
(nombres y firmas)



Mariana Savio



Lucía Pareja



Gianella Facchin

¹ La Tesis podrá resultar:

- a) Aprobada con las siguientes calificaciones (notas): Excelente (10, 11 ó 12); Muy Bueno (8 ó 9); Bueno (5, 6 ó 7); Aceptable (3 ó 4).
- b) Reprobada con las siguientes calificaciones: Insuficiente (1 ó 2); Muy Insuficiente (0).



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

Área Química

ACTA. En Montevideo a los trece días del mes de mayo de 2024, se reúne en Facultad de Química el Tribunal que entendió en la defensa de tesis de Doctorado en Química que postula el Quím. **Javier Rómulo Silva Silva**, cuyo título es *“Desarrollo de métodos alineados con la Química Analítica Verde para la determinación de cobre, manganeso y selenio en muestras de agua y agrícola-ganaderas mediante técnicas de espectrometría atómica”*.

Asisten todos sus integrantes: Dras. Marianela Savio, Gianella Facchin y Lucía Pareja, y Mariela Pistón (Directora de tesis y académica).

El Tribunal habiendo analizado la tesis en profundidad considera:

El trabajo escrito es de muy buena calidad con objetivos meticulosamente definidos y han sido alcanzados con éxito, cumpliendo con lo establecido y presentando resultados originales de interés para el sector agrícola ganadero, así como también para la investigación académica.

El candidato comunicó claramente sus ideas y presentó los resultados de una forma comprensible y concisa. La presentación estuvo bien estructurada y articulada lo que facilitó la comprensión y una evaluación exhaustiva de la investigación en el tiempo asignado para la presentación. Además respondió en forma solvente las preguntas realizadas por el tribunal. El trabajo de doctorado dio origen a varias presentaciones en congresos, algunas de ellas en formato oral y dos publicaciones en revistas arbitradas demostrando la calidad de los resultados.

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

Marianela Savio

Lucía Pareja

Gianella Facchin

Mariela Pistón

ÁREA QUÍMICA

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

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

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

Correo electrónico: presupuestoquimica@pedeciba.edu.uy – gabig@fq.edu.uy

Resumen

En nuestro país, el sector agropecuario representa en el 6-7% del producto bruto interno (PBI). En particular, el sector ganadero es el principal sector exportador. La ganadería tanto bovina como ovina es una de las actividades económicamente más importantes. La importancia y rol de los minerales en la salud animal, y en particular de los denominados microelementos (Co, Cu, Mn, Zn y Se entre otros) es bien conocida, debido a que tanto su deficiencia como exceso está relacionado con cuadros de enfermedad. El agua y los alimentos (pasturas y reservas forrajeras) suministrados al ganado, son las principales fuentes de minerales para el ganado. Debido a lo anterior, las determinaciones analíticas de micronutrientes como el caso del cobre (Cu), manganeso (Mn) y selenio (Se) en este tipo de matrices es de relevancia. Al disponer de una plataforma analítica confiable para monitoreo y evaluación, es posible tomar acciones como es el caso de la suplementación, y de esta forma prevenir o revertir afectaciones a la sanidad y productivas y por ende económicas.

Usualmente la determinación de Cu, Mn y Se en este tipo de matrices se realiza mediante espectrometrías de absorción o de emisión atómica acoplada a masas con plasma acoplado inductivamente, técnicas que requieren instrumental e insumos de alto costo y tiempos de análisis considerables. Además, para el caso de los alimentos es necesario realizar previamente una mineralización para llevar las muestras a formas líquidas y eliminar materia orgánica, generalmente utilizando una digestión asistida por microondas con ácidos minerales.

Con la finalidad de abordar nuevos métodos analíticos desde la Química Analítica Verde (QAV) y Química Analítica Blanca (QAB), en esta tesis se desarrolló un sistema novedoso y original de preconcentración en línea acoplado a emisión atómica con plasma de nitrógeno (FI-MP AES), para la determinación simultánea de Cu y Mn en muestras de agua, utilizando una minicolumna empacada con un biosorbente (*Agave sisalana*). Se demostró que no hay necesidad de impregnar el mismo con un reactivo adicional como reporta la literatura hasta el momento. Para el caso del alimento para ganado se desarrolló una metodología mediante espectrometría de fluorescencia de rayos X

dispersiva en energía (EDXRF), no destructiva, con medidas directas en estado sólido, sin pretratamiento de las muestras.

Por otra parte, se validó una estrategia de introducción de muestras mediante el acople de la generación de hidruros (HG) con MP AES para realizar la determinación de Se en alimento para ganado. Esta metodología ha sido poco reportada y es original para esta aplicación.

La totalidad de las metodologías desarrolladas, que constituyen una plataforma analítica robusta, fueron validadas siguiendo las recomendaciones de la Guía Eurachem - *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*.

Desde que se propuso el concepto de QAV, en la bibliografía se han propuesto o desarrollado gran variedad de herramientas o métricas estandarizadas que permiten evaluar el “verdor” o “Greenness” de una metodología analítica. En el presente trabajo de tesis se seleccionaron *Analytical Eco-Scale*, AGREE y GAPI para este abordaje, adicionalmente se realizaron evaluaciones desde un enfoque holístico como el que propone la QAB y se compraron los mismos con los métodos estándar de referencia.

Utilizando MP AES (junto a técnicas acopladas) y EDXRF fue posible el desarrollo de nuevos métodos analíticos para determinar de forma rápida y/o sencilla Cu, Mn y Se en las matrices propuestas demostrando de esta forma una reducción sensible de los costos, y tiempos de análisis y estando en acuerdo con los principios de la QAV y QAB.

Palabras clave: preconcentración en línea; elementos traza; preparación de muestras; alimento para ganado; Espectrometría atómica; Química Analítica Verde

Abstract

In our country, the agriculture, and the livestock activity represent 6-7% of the gross domestic product (GDP), being livestock the main contribution to export. Both cattle and sheep farming are one of the most economically important activities. The importance and role of minerals in animal health, particularly the so-called microelements (Co, Cu, Mn, Zn and Se among others) are well known, because both their deficiency and excess are related to disease patterns. Water and feedstuff (pasture and forage reserves) supplied to livestock are the main sources of minerals in their diet. Therefore, analytical determinations of micronutrients such as copper (Cu), manganese (Mn) and selenium (Se) in this type of matrices are relevant. Having a reliable analytical platform for monitoring purposes and evaluation of the nutritional status, it is possible to take actions such as supplementation, to prevent or reverse health, productive and therefore economic effects.

Usually the determination of Cu, Mn and Se in this matrices is carried out using atomic absorption or emission spectrometry with inductively coupled plasma, techniques that require high-cost instruments, supplies and require long time for the analysis. Furthermore, for food samples, it is necessary to previously carry out mineralization to bring the samples to a liquid form and eliminate the organic matter. Generally, a microwave-assisted digestion with mineral acids is performed to achieve this goal.

Aiming to addressing of new analytical methods with a Green Analytical Chemistry (GAC) and White Analytical Chemistry (WAC) approach, this thesis developed a novel and original online preconcentration system coupled to atomic emission using a nitrogen plasma (FI-MP AES), for the simultaneous determination of Cu and Mn in water samples, using a minicolumn packed with a biosorbent (*Agave sisalana*). It was demonstrated that there was no need to impregnate the sisal fiber with an additional reagent as reported in the literature until now. In the case of livestock feed, a methodology was developed using energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF), a non-destructive technique that allowed direct determinations in solid samples, without any

classical pretreatment

Furthermore, a sample introduction strategy was validated by coupling hydride generation (HG) with MP AES to perform the determination of Se in livestock feed. This methodology has been rarely reported and is original for this application.

All the developed methodologies, constitute a robust analytical platform, were validated according the recommendations of the Eurachem Guide – “The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics”.

Since the concept of GAC was proposed, a several tools or standardized metrics have been proposed or developed in the literature that allow the evaluation of the greenness of an analytical method. In this thesis, Analytical Eco-Scale, AGREE and GAPI were selected for this approach. Additionally, an holistic approach was included such as that proposed by the WAC and they were used to compare the new methods with the standard ones.

Using MP AES (together with coupled techniques) and EDXRF, it was possible to develop new analytical methods for a fast and/or easily determination of Cu, Mn and Se in the proposed matrices, demonstrating a significant reduction in costs and time and being in good agreement with the principles of the GAC and WAC.

Keywords: online preconcentration; trace elements; sample preparation; cattle feed; atomic spectrometry; Green Analytical Chemistry

Agradecimientos

A mi directora de tesis, Dra. Mariela Pistón, por aceptar ser mi tutora, compartir sus conocimientos e incentivar y alentarme a que volviera a Química Analítica.

Al Dr. Moisés Knochen, con quien me inicié en la investigación.

A los miembros del tribunal, Dras. Marianela Savio, Lucía Pareja y Gianella Facchin, por aceptar evaluar mi trabajo y por sus contribuciones al mismo.

A mis compañeros de Química Analítica y Toxicología por contribuir a que ir a trabajar sea un disfrute.

Al Dr. Ricardo Faccio del Área Física del DETEMA- Facultad de Química, por permitir la utilización de la prensa neumática.

Al Q.F. Juan Rodríguez por la colaboración en la escritura del software en Python y al Qco. Guillermo Roth por el diseño e impresión de las piezas 3D.

Al Centro de Formación Integrada (CEFI) por el espacio de trabajo donde está emplazado el equipo EDXRF.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) por la financiación del proyecto de iniciación titulado “Desarrollo de un método analítico para la determinación de cobre y manganeso en muestras agrícola-ganaderas mediante técnicas acopladas con espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP-OES)” (CSIC 2049 ejecutado entre los años 2020-2022) y por el financiamiento para la adquisición del equipo EDXRF.

A PEDECIBA-Química por el apoyo económico.

A la empresa CONAPROLE, en particular a María Teresa Siri y Andrés Sosa, por la posibilidad de utilizar el equipo ICP-MS en sus instalaciones.

A mis amigos, quienes siempre están presentes tanto en las buenas como en las malas.

A mi familia, quienes siempre me apoyan en mis decisiones y confían en mi capacidad. En especial a Valeria y a mis padres quienes me incentivan día a día.

A mis hijos, Mateo y Martina, quienes me impulsan diariamente a seguir adelante.

Tabla de contenidos

Resumen.....	vii
Abstract	ix
Agradecimientos	xi
Lista de Tablas.....	xv
Lista de Figuras	xvi
Lista de Abreviaturas	xviii
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes	1
1.2 Matrices y Analitos	3
1.3 Tratamiento de muestra.....	6
1.4 Preconcentración	8
1.5 Espectrometría de emisión y absorción atómica	10
1.5.1 Espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas	10
1.5.2 Espectrometría de absorción atómica.....	13
1.6 Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)	15
1.7 Espectrometría de fluorescencia de rayos X dispersiva en energía (EDXRF)	15
1.8 Validación.....	22
1.9 Abordaje de metodologías desde la Química Analítica Verde	28
CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	33
2.1 Justificación	33
2.2 Objetivo general	34
2.3 Objetivos específicos	35
CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL	36
3.1 Reactivos y Materiales	36
3.2 Instrumentos	37
3.3 Muestreo y Operaciones Preliminares	38
3.4 Tratamiento de muestras asistido mediante radiación microondas (MW) y ondas de ultrasonido (US)	39
3.5 Sistema FI-MP AES utilizando fibra de sisal (<i>Agave sisalana</i>) como biosorbente, para el análisis de Cu y Mn.....	41
3.6 Determinación de Se en alimento para ganado mediante HG-MP AES.....	48
3.6.1 Pretratamiento – Reducción química	50
3.6.2 Reducción en línea y desarrollo	51

3.7 Análisis no destructivo: Determinación de Cu y Mn en alimento para ganado, mediante EDXRF.....	52
3.8 Herramientas métricas para el abordaje según la Química Analítica Verde.....	55
3.8.1 Eco escala - <i>Analytical Eco-Scale</i>	56
3.8.2 AGREE y AGREEprep.....	58
3.8.3 Índice Verde de Procedimiento Analítico (GAPI).....	61
3.8.4 Química Analítica Blanca	62
3.8.5 Índice Azul del Grado de Aplicabilidad.....	64
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
4.1 Tratamientos de muestras.....	67
4.1.1 Validación – tratamiento asistido mediante radiación microondas (MW)	67
4.1.2 Optimización – tratamiento asistido mediante ondas de ultrasonido (US).....	68
4.2 Sistema FI-MP AES.....	70
4.2.1 Optimización y validación del sistema - fibra de sisal (<i>Agave sisalana</i>).....	72
4.2.2 Aplicación a muestras de agua	83
4.2.3 Optimización y validación del sistema - fibra de sisal (<i>Agave sisalana</i>) impregnada con AFB	85
4.2.4 Comparación de ambos sistemas FI-MP AES propuestos.....	88
4.3 Determinación de Se en alimento para ganado mediante HG-MP AES.....	89
4.3.1 Desarrollo y validación.....	89
4.3.2 Aplicación a muestras de alimento.....	91
4.4 Análisis de Cu y Mn en alimento para ganado mediante EDXRF.....	93
4.4.1 Desarrollo y validación.....	93
4.4.2 Aplicación a muestras de alimento para ganado para la determinación de Cu y Mn	98
4.5 Comparación desde el punto de vista de la Química Analítica Verde y el enfoque holístico de la Química Analítica Blanca.....	101
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	117
CAPÍTULO 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120
CAPÍTULO 7. ANEXOS Y APÉNDICES.....	128
ANEXO I Procedimientos de muestreo.....	128
ANEXO II Líneas de Código del software de control del sistema FI-MP AES.....	129
ANEXO III Reportes AGREE, AGREEprep y GAPI	130
ANEXO IV Reportes BAGI.....	139
APÉNDICE I Trabajos presentados en eventos científicos	142

APÉNDICE II Artículos publicados en revistas referadas..... 150

Lista de Tablas

- Tabla 1** Criterios de validación
- Tabla 2** Los 12 Principios de la Química Verde
- Tabla 3** 12 Principios de la Química Analítica Verde
- Tabla 4** Ciclo de preconcentración y elución, por triplicado
- Tabla 5** Parámetros instrumentales
- Tabla 6** Parámetros instrumentales del acople HG-MP AES
- Tabla 7** Puntos de penalización para el cálculo según Analytical Eco-Scale
- Tabla 8** Principios Evaluados con AGREE
- Tabla 9** 12 Principios de la Química Analítica Blanca
- Tabla 10** Criterios de BAGI y escala de evaluación
- Tabla 11** Condiciones y resultados del diseño experimental
- Tabla 12** Condiciones del segundo diseño experimental
- Tabla 13** Condiciones operativas del MP AES
- Tabla 14** Diseño central compuesto
- Tabla 15** Cifras de mérito sistema FI-MP AES
- Tabla 16** Condiciones de operación para las determinaciones mediante ETAAS
- Tabla 17** Comparación de los niveles de Cu y Mn en muestras de agua (método desarrollado vs ETAAS)
- Tabla 18** Cifras de mérito sistema FI-MP AES, fibra impregnada
- Tabla 19** Cifras de mérito, determinación de Se mediante HG-MP AES
- Tabla 20** Parámetros instrumentales del ICP-MS
- Tabla 21** Información de los elementos monitoreados
- Tabla 22** Comparación de los resultados de Se obtenidos mediante ICP-MS y HG-MP AES
- Tabla 23** Tabla comparativa de las cifras de mérito para diferentes técnicas analíticas para la determinación de Se
- Tabla 24** Resultados de la evaluación de los métodos de ajuste
- Tabla 25** Resumen de los parámetros operativos
- Tabla 26** Cifras de mérito de la metodología mediante EDXRF
- Tabla 27** Resumen de los parámetros operativos del método EDXRF para Cu
- Tabla 28** Cifras de mérito de la metodología mediante EDXRF para Cu
- Tabla 29** Comparación de los niveles de Cu y Mn en muestras de alimento para ganado
- Tabla 30** Resultado de evaluación mediante Eco-Scale- metodología ETAAS
- Tabla 31** Resultado de evaluación mediante Eco-Scale- metodología FI-MP AES
- Tabla 32** Resultado de evaluación mediante Eco-Scale- metodología Digestión+FAAS
- Tabla 33** Resultado de evaluación mediante Eco-Scale- metodología EDXRF
- Tabla 34** Resultado de evaluación mediante Eco-Scale- metodología ICP-MS
- Tabla 35** Resultado de evaluación mediante Eco-Scale- metodología HG-MP AES

Lista de Figuras

- Figura 1** a) Heno/Fardo; b) Ensilaje; c) Henilaje/Silopack
- Figura 2** Diagrama de la cavidad de Hammer y los campos magnético y eléctrico (Adaptado de Williams, y otros, 2019)
- Figura 3** Representación esquemática del sistema de detección de un instrumento MP AES (Adaptado de Williams, y otros, 2019)
- Figura 4** Equipo de espectrometría atómica con plasma inducido por microondas (Agilent MP AES 4210)
- Figura 5** Diagrama de un tubo de grafito
- Figura 6** Diagrama de representación del proceso de fluorescencia de rayos X (Extraído de Shimadzu Corporation, 2021)
- Figura 7** Diseño básico de un espectrómetro de: a) WDXRF; B) EDXRF
- Figura 8** Espectrómetro de fluorescencia de rayos X dispersiva en energía, Shimadzu EDX7200 (Adaptado de Shimadzu Corporation, 2021)
- Figura 9** Esquema constructivo del Shimadzu EDX7200
- Figura 10** Efecto de un filtro primario en la señal
- Figura 11** Ecuación de Sherman
- Figura 12** Ecuación de Rousseau
- Figura 13** Trompeta de Horwitz (Adaptado de Horwitz & Albert, 2006).
- Figura 14** Número de publicaciones por año
- Figura 15** Muestras de fardos secos y molidos
- Figura 16** Digestor asistido por radiación microondas, CEM Mars 6
- Figura 17** Muestra luego de la digestión asistida por MW
- Figura 18** Sistema FI para la preconcentración en línea acoplada a MP AES
- Figura 19** Minicolumna empacada con fibra de sisal
- Figura 20** Minicolumna empacada con: a) cáscara de arroz; b) ceniza de cáscara de arroz
- Figura 21** Posición de la válvula inyectora a) carga, b) elución
- Figura 22** Minicolumna, a) sin impregnar; b) impregnada con AFB
- Figura 23** Cámara MSIS (Adaptado de Agilent Technologies, 2016)
- Figura 24** Configuración de operación de la cámara MSIS (Adaptado de Agilent Technologies, 2016)
- Figura 25** Fotografía del proceso de reducción química previa a la determinación
- Figura 26** Esquema general para la determinación de Se mediante HG-MP AES
- Figura 27** Proceso de confección de pellets
- Figura 28** Pantalla del software de control PCEDX-Pro
- Figura 29** Celda estándar para medidas de EDXRF
- Figura 30** Esquema general para medidas mediante EDXRF
- Figura 31** Ejemplo de pictograma obtenido mediante AGREE
- Figura 32** Ejemplo de pictograma obtenido mediante AGREEprep
- Figura 33** Ejemplo de pentágonos obtenidos mediante GAPI
- Figura 34** Ejemplo del resultado obtenido mediante QAB
- Figura 35** Ejemplo de pictograma obtenido mediante BAGI
- Figura 36** Muestras ubicadas en el cuadrante de mayor eficiencia de cavitación
- Figura 37** Flujoograma para Cu y Mn - cáscara de arroz
- Figura 38** Efecto del tiempo de preconcentración

- Figura 39** Sistema FI- MP AES construido
- Figura 40** Registro de la señal correspondiente a un estándar de 2 mg L⁻¹ de Cu y Mn
- Figura 41** Optimización del Flujo del nebulizador
- Figura 42** Optimización de la Posición de lectura
- Figura 43** Registro de la señal sincronizada para Cu y Mn
- Figura 44** Incidencia del caudal
- Figura 45** Superficies de respuesta obtenidas para el Cu
- Figura 46** Sistema de preconcentración acoplado a FAAS y señal obtenida
- Figura 47** Evolución en el diseño y construcción de la minicolumna
- Figura 48** Espectrómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica Perkin Elmer HGA900
- Figura 49** Efecto del tiempo de preconcentración
- Figura 50** Efecto del pH en la etapa de preconcentración
- Figura 51** Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente, Shimadzu ICPMS-2030 LF
- Figura 52** Porción de espectro de fluorescencia de rayos X de una muestra
- Figura 53** Regiones del espectro de fluorescencia de rayos X obtenido para Cu y Mn en una muestra
- Figura 54** Resultado de evaluación mediante AGREE a) ETAAS, b) FI-MP AES
- Figura 55** Resultado de evaluación mediante QAB para los métodos ETAAS y FI- MP AES
- Figura 56** Resultado de evaluación mediante BAGI a) ETAAS, b) FI-MP AES
- Figura 57** Resultado de evaluación mediante AGREE a) Digestión mediante MW y FAAS, b) EDXRF
- Figura 58** Resultado de evaluación mediante AGREEprep a) Digestión mediante MW y FAAS, b) EDXRF
- Figura 59** Resultado de evaluación mediante QAB para los métodos FAAS y EDXRF
- Figura 60** Resultado de evaluación mediante BAGI a) Digestión mediante MW y FAAS, b) EDXRF
- Figura 61** Resultado de evaluación mediante AGREE a) ICP-MS, b) HG-MP AES
- Figura 62** Resultado de evaluación mediante GAPI a) ICP-MS, b) HG MP AES
- Figura 63** Resultado de evaluación mediante QAB para los métodos ICP-MS y HG-MP AES
- Figura 64** Resultado de evaluación mediante BAGI a) ICP-MS, b) HG-MP AES

Lista de Abreviaturas

AFB – Fluoruro de alizarina azul

BAGI - Índice del azul del grado de aplicabilidad

CRM- Material de referencia certificado

Cu - Cobre

EDXRF – Fluorescencia de rayos X de energía dispersiva

EPE – Ensilaje planta entera

ETAAS – Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica

FAAS - Espectrometría de absorción atómica de llama

FAR - Fardo

FE- Factor de enriquecimiento

FI – Inyección en flujo

GAPI – Índice verde de procedimiento analítico

HCl – Ácido Clorhídrico

HG – Generación de hidruros

HNO₃ - Ácido Nítrico

ICP-MS – Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo

LC-Límite de cuantificación

LD- Límite de detección

MCFA- Análisis en flujo multiconmutado

Mn- Manganese

MP AES – Espectrometría de emisión atómica por plasma de microondas

NaOH – Hidróxido de Sodio

PLA - Planta

QAB – Química Analítica Blanca

QAV – Química Analítica Verde

RAI - Raigras

Se - Selenio

SIP - Silopack

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

En nuestro país, el sector agropecuario representa en el 6-7% del producto bruto interno (PBI). En particular, el sector ganadero es el principal sector exportador, generando ingresos por US\$3614 millones en 2021 (Uruguay XXI, 2022). La ganadería tanto bovina como ovina es una de las actividades económicamente más importantes, en particular, nuestro país se encuentra en el séptimo lugar en el mundo en cuanto a exportaciones de carne bovina y décimo octavo de carne ovina (Uruguay XXI, 2020).

El agua y los alimentos suministrados al ganado son la principal fuente de aporte de minerales, por lo tanto, disponer de información de su contenido en el agua y los diferentes tipos de alimento (pasturas, granos, raciones y reservas forrajeras) es de suma relevancia (Ungerfeld, 1998; NRC, 2001; Carriquiry Ebbeler & Frade Peralta, 2017). La importancia y rol de los minerales en la salud animal, y en particular de los denominados microelementos (Co, Cu, Mn, Zn y Se entre otros) es bien conocida, debido a que tanto su deficiencia como exceso está relacionado con cuadros de enfermedad. Desempeñan numerosas y variadas funciones en el organismo de los animales como ser, formar parte del esqueleto y participar en el transporte del oxígeno. Por tal razón el organismo requiere ciertas cantidades mínimas de cada uno de los minerales esenciales. Por debajo ocurrirá una deficiencia o carencia afectando la sanidad del animal. A su vez, un exceso de dichas cantidades puede ser tóxico, produciendo también efectos negativos en la sanidad del animal (Rodríguez & Banchemo, 2007). Los perjuicios económicos y productivos ocasionados por las deficiencias o carencias de los minerales han sido demostrada, así como la necesidad de la suplementación mineral para revertir la deficiencia (Carriquiry Ebbeler, 2017). A modo de contextualización, en nuestro país hay un stock de 11,83 millones de animales (Uruguay XXI, 2022). Todo lo anterior explica el permanente interés en conocer cada vez con mayor profundidad, el rol, requerimientos, toxicidad,

biodisponibilidad y biotransformación de cada uno de estos microelementos, debido a las repercusiones productivas y económicas asociadas.

Debido a esto, las determinaciones analíticas de elementos como selenio (Se), cobre (Cu) y manganeso (Mn) en agua, pasturas y reservas forrajeras para el ganado son de relevancia. Al disponer de información certera es posible tomar acciones, en caso de ser necesario, como es el caso de la suplementación con premezclas o con soluciones inyectables y de esta forma prevenir o revertir posibles perjuicios productivos y por ende, económicos.

Ante los bajos niveles de concentración esperados de estos elementos en el agua y los alimentos para el ganado, las determinaciones analíticas usualmente se realizan mediante técnicas de espectrometría atómica, como puede ser la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) o la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Además, en el caso de matrices complejas como puede ser una pastura, es necesario realizar un pretratamiento o tratamiento de muestra para utilizar estas técnicas debido a que requieren muestras líquidas. Estos tratamientos pueden implicar una o varias etapas, según el caso, pero generalmente se basan en calcinaciones o procesos de digestión por vía húmeda. Esta última utiliza ácidos, bases o agentes oxidantes de forma de asegurar la destrucción de la materia orgánica, y se puede realizar en un bloque digestor o asistida por microondas. Sin embargo, estas técnicas requieren de instrumental e insumos de alto costo y considerable tiempo de análisis.

Una posible estrategia a explorar para obtener resultados fiables, rápidos, económicos y en mejor consonancia con los principios de la Química Analítica Verde es utilizar la técnica de espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (MP AES) y la espectrometría de fluorescencia de rayos X de energía dispersiva (EDXRF). Ambas técnicas fueron empleadas exitosamente en este trabajo como se desarrollará más adelante.

1.2 Matrices y Analitos

En los sistemas de producción ganaderos con alimentación a base de pasturas, como el caso de nuestro país, la producción de pasto (gramíneas y leguminosas) es estacional, se produce un exceso de pastura durante la primavera y el otoño y deficiencia de esta en el invierno. Las reservas forrajeras permiten aprovechar el exceso de pasto producido para utilizarlo en el invierno. El objetivo de la elaboración de reservas forrajeras es conservar el alimento minimizando las pérdidas nutricionales. De esta forma, se logra optimizar la oferta de alimento a lo largo del tiempo y aumentar la carga animal, obteniendo la mayor producción por hectárea. Los principales tipos de reservas son henos/fardos, ensilajes y henilajes (Irigoyen, 2009).

Pastura/Pasto: alimento vegetal, planta herbácea, que crece en el suelo de los campos y es destinado a la alimentación de animales. Dentro del campo natural (pasturas naturales) se incluyen especies como *Paspalum dilatatum*, *Paspalum notatum* y *Adesmia bicolor*. De igual forma las pasturas cultivadas como *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea* y *Lotus corniculatus* a modo de ejemplo.

Henos/Fardos: producto del proceso de henificación. La henificación consiste en un rápido secado del forraje hasta valores inferiores al 15%. En esta condición de humedad se interrumpen los procesos biológicos de las plantas (fotosíntesis y respiración celular) que producen la pérdida de calidad nutricional del forraje. De esta forma se logra conservar el forraje minimizando las pérdidas nutricionales (**Figura 1**) (Uset & Lazzaro, 2009; Irigoyen, 2009).

Ensilaje: metodología de conservación de pasturas o granos, en la cual se produce una fermentación láctica, en medio anaeróbico. Como consecuencia de la fermentación se obtiene un descenso del pH a valores cercanos a 4, con lo cual se inhibe la actividad microbiana encargada de la degradación del material vegetal. A grandes rasgos existen dos tipos de ensilaje, ensilaje planta entera (EPE) y ensilaje grano húmedo (EGH). En nuestro país en forma mayoritaria se emplea EPE de maíz y/o EGH de sorgo (**Figura 1**) (Chalkling, 2007).

Henilaje/Silopack: metodología de conservación de forrajes, proceso

intermedio entre la henificación y el ensilaje. Consiste en cortar el forraje y una vez que alcanza un contenido de humedad de entre 40 y 60% enfardarlo. Luego de enfardado se envuelve en un *film* de polietileno (**Figura 1**) (Irigoyen, 2009).



Figura 1 a) Heno/Fardo; b) Ensilaje; c) Henilaje/Silopack

El agua suministrada al ganado es un nutriente fundamental, cumple funciones vitales como ser regular la temperatura corporal, reproducción crecimiento y lactación. Además, es utilizada como el vehículo para incorporar varios minerales a la dieta de los animales. Su calidad debe ser monitoreada para asegurar una alimentación adecuada y la buena salud del ganado (NRC, 2001; Carrasco-Letelier, Giannitti, & Caffarena, 2016; La Manna, Clariget, Juarena, & Giorello, 2023). En el ganado vacuno existe una relación directa entre el consumo de materia seca (alimento) y el agua. La falta de agua de calidad ocasiona un menor consumo de alimento provocando menor producción de leche y/o menor ganancia corporal produciendo en ambos casos pérdidas productivas y económicas (La Manna, Clariget, Juarena, & Giorello, 2023).

Los minerales denominados esenciales y que por lo tanto deben estar presentes en los alimentos suministrados al ganado son entre otros, el calcio (Ca), cobre (Cu), fósforo (P), manganeso (Mn), selenio, (Se), sodio (Na), y zinc (Zn).

Para el trabajo de tesis, se seleccionaron el Cu, Mn y Se, debido a antecedentes de deficiencia en nuestro país o por considerarse de interés (Torre, y otros, 2005; Brune, y otros, 2013).

Particularmente, el Se es un mineral esencial para los animales, debido a que se encuentra involucrado en múltiples procesos fisiológicos, asociados con la reproducción y la prevención de enfermedades al formar parte estructural de las selenoenzimas, como la glutathionperoxidasa o la peroxidasa tiroidea, entre otras.

Su carencia determina problemas de fertilidad o reproducción, elevada mortalidad de las crías, menor ganancia de peso y menor productividad (Carriquiry Ebbeler, 2017). En el caso de los rumiantes la carencia es más evidente debido a que procesos asociados a los microorganismos del rumen generan una menor absorción de Se en comparación con animales monogástricos (Hefnway & Pérez, 2008). El *National Research Council* establece un requerimiento nutricional de Se de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de alimento en base seca para el ganado lechero (NRC, 2001). En Uruguay, desde hace tiempo se están realizando relevamientos de contenido de Se en carnes y este contenido está directamente relacionado con la dieta del animal (Cabrera, Ramos, Saadum, & Brito, 2010; Pistón, y otros, 2020). Debido a su importante rol en los sistemas biológicos, frecuentemente las dietas para el ganado son suplementadas con Se, pero su consumo en exceso puede ocasionar enfermedades como la selenosis u otros desordenes clínicos (Yonghua, Wuyi, Kunli, & Hairong, 2008; Raisbeck, 2020)

El Cu es un mineral necesario para varios procesos biológicos como ser la respiración celular, la formación de huesos, adecuada función cardíaca, el desarrollo del tejido conectivo, mielinización de la médula espinal, queratinización y pigmentación de los tejidos. Los animales que sufren deficiencia de Cu pueden presentar algunos de los siguientes signos clínicos: pelo hirsuto, dificultades en el parto, infertilidad temporal, terneros nacidos con raquitismo, crecimiento lento, falla cardíaca, anemia y diarrea severa (Carriquiry Ebbeler, 2017). La mayor parte de las deficiencias de Cu en el ganado están asociadas o condicionadas por factores de la dieta. Las pasturas de nuestro país poseen una media de $6,8 \text{ mg kg}^{-1}$ expresado en base seca, de acuerdo con datos bibliográficos (Ungerfeld, 1998). El *National Research Council* establece que solamente entre el 1 y 5% del Cu aportado por la dieta es absorbido por los animales rumiantes adultos (NRC, 2001). Existen antecedentes en los cuales se reporta la deficiencia de Cu en pasturas uruguayas (Torre, y otros, 2005; Brune, y otros, 2013).

El Mn es un importante mineral, co-factor de muchas enzimas participantes de procesos variados, como ser la síntesis de mucopolisacáridos, la síntesis de

colesterol y la gluconeogénesis. Además, está presente en las células y tejidos animales y es necesario para el desarrollo normal de los huesos y procesos reproductivos. La deficiencia de Mn se evidencia por signos clínicos como: crecimiento lento, desórdenes nerviosos en recién nacidos, y función reproductiva alterada. De acuerdo con lo reportado en bibliografía, el contenido medio de pasturas de nuestro país es de 223 mg kg^{-1} expresado en base seca (Ungerfeld, 1998). El *National Research Council* estableció en 1996 un requerimiento de Mn de entre 20 y 40 mg/kg de alimento en base seca para el ganado vacuno, dependiendo de la categoría de este (NRC, 2001).

1.3 Tratamiento de muestra

Dentro del proceso analítico, junto con el muestreo, la etapa de tratamiento de muestra es una de las más críticas. Tiene por objetivo convertir la muestra a una forma adecuada para que la especie química de interés (analito) pueda ser determinada. Debido a que la mayoría de las técnicas utilizadas para la determinación de metales y semimetales requieren que el analito se encuentre en una disolución, la muestra debe ser sometida a ciertos tratamientos (procesos físicos y químicos) con esta finalidad. En el caso de muestras complejas, por ejemplo, con gran contenido de materia orgánica, un desafío es disponer de un método que logre liberar de forma cuantitativa los analitos de la matriz (Krug & Piovezani Rocha, 2019). Con esta finalidad generalmente se emplean tratamientos drásticos que utilizan calentamiento y agentes oxidantes (por ejemplo, ácidos concentrados) de forma de lograr la destrucción de la materia orgánica mediante la oxidación total de la misma (Arruda, 2006). Actualmente es frecuente llevar a cabo la digestión de la muestra mediante procesos asistidos por radiación microondas (Bakircioglu, Bakircioglu Kurtulus, & Ucar, 2011; Bizzi, y otros, 2014; Deshwal, Gómez-Mascaraque, Fenelon, & Huppertz, 2023). Las microondas, son radiación correspondiente al espectro electromagnético que va desde 300 a 300000 MHz. Los digestores de microondas empleados en los laboratorios utilizan una frecuencia de 2450 MHz, trabajando en una potencia de operación de 400 a 1800 W. La interacción de la radiación microondas con la materia (muestra y solvente) provoca los fenómenos de migración iónica y

rotación de dipolos. Estos fenómenos conllevan un movimiento molecular el cual contribuye al calentamiento del vaso de reacción. Dicho calentamiento, junto con la acción de los agentes oxidantes empleados, favorece la descomposición/oxidación de la materia orgánica. Algunas de las ventajas inherentes a la digestión asistida por microondas en vasos cerrados son la reducción del riesgo de pérdida de analitos volátiles, y del riesgo de contaminación. Actualmente los equipos disponibles comercialmente permiten el control de temperatura y presión en cada uno de los vasos provocando una mejora en la reproducibilidad de los tratamientos.

Otra posibilidad de tratamiento de muestra es realizar una extracción y de esta forma separar al analito de la matriz. La extracción asistida con ondas de ultrasonido (US) es una posibilidad. En la misma mediante la aplicación de ondas de ultrasonido se favorece la extracción del analito a través del fenómeno de cavitación. Cuando un líquido es irradiado con ondas de US se produce el fenómeno de cavitación (creación, expansión y destrucción de burbujas) en la superficie de la matriz, el cual produce erosión de la superficie y ruptura de partículas favoreciendo de esta forma la extracción del analito (Priego-Capote & Luque de Castro, 2004; Machado, Faccio, & Pistón, 2019). Comercialmente se encuentran disponibles dos tipos de instrumentación aplicable en la extracción asistida mediante US: las sondas y los baños de ultrasonido. Ambos trabajan a una frecuencia fija de 20 kHz para las sondas y 40 kHz para los baños. La literatura reporta varios trabajos en los que se demuestra la aplicación y eficiencia de las ondas de ultrasonido en el tratamiento de muestras (Machado, Faccio, & Pistón, 2019; Pereira, Tissot, Faccio, Ibañez, & Pistón, 2021; Silva, Bühl, laquinta, & Pistón, 2023). La utilización de ondas de US como estrategia de tratamiento de muestra, acorta significativamente los tiempos de operación a pocos minutos, disminuye los requerimientos de solventes y energía utilizados, todo lo cual es ventajoso desde varios aspectos incluido el abordaje de la Química Analítica Verde (Bendicho, y otros, 2012; Machado, Faccio, & Pistón, 2019).

1.4 Preconcentración

Cuando es necesario alcanzar niveles de detectabilidad muy bajos y no se cuenta con instrumentos de alto costo, que son capaces de alcanzar muy bajos límites de detección, como ser los que acoplan técnicas atómicas con detector de masas (ICP-MS), se recurre a las estrategias de preconcentración para llegar a niveles de detección similares con instrumentos alternativos, menos costosos y disponibles en nuestro medio. La preconcentración es la concentración de los analitos de una disolución por retención de estos en un sólido. Involucra una matriz líquida en la que se encuentra la muestra y una fase sólida (sorbente). El líquido pasa a través de una columna o cartucho que contiene el sorbente y los analitos quedan retenidos. Estos luego son recuperados mediante la elución con un solvente apropiado. La preconcentración se realiza al efectuar la elución con un volumen menor de eluyente que el volumen de muestra que atravesó la columna. Las técnicas de preconcentración realizadas a microescala requieren una rigurosa optimización y conllevan la realización de múltiples experimentos para alcanzar resultados confiables y reproducibles. Una estrategia para alcanzar niveles de microescala con resultados confiables y reproducibles es realizar la preconcentración mediante análisis en flujo.

Dentro de las técnicas de análisis en flujo podemos mencionar análisis por inyección en flujo (FIA) y análisis por inyección secuencial (SIA) las cuales se destacan por las prestaciones que ofrecen y por ser las primeras en popularizarse. Posteriormente surgieron otras técnicas que emplean diferentes principios e instrumentación, como el Análisis en Flujo por Multiconmutación (MCFA), el Análisis Multijeringa (MSFA), el Análisis en Flujo por Multibombeo (MPFA), etc (Trojanowicz, 2000; Trojanowicz, 2008; Cerdá & Cerdá, 2009). Es posible implementar algunos tipos de preparación de muestra y/o preconcentración en línea o en flujo mediante el uso de una de dichas técnicas o de una combinación de éstas. La técnica FIA, consiste en la inyección de cierta cantidad de muestra (determinada mediante un *loop* o mediante tiempo) en una corriente de un *carrier* o reactivo. La muestra se dispersa en la corriente del *carrier*, formando un gradiente de concentración, hasta alcanzar el detector (Ruzicka & Hansen, 1975).

Llevar adelante una estrategia de preconcentración en línea implica fabricar en el laboratorio una minicolumna empacada con un sorbente sólido. En particular los materiales biológicos (biosorbentes) tienen la capacidad de acumular metales mediante rutas metabólicas o procesos fisicoquímicos (adsorción). De acuerdo con la bibliografía relevada, existen diferentes biosorbentes que presentan buena afinidad por los sorbatos cuando presentan gran número de sitios de unión como ser grupos carboxílicos, carbonilos y aminas entre otros. En comparación con los sorbentes comerciales, usualmente empleados, los biosorbentes presentan las ventajas de bajo costo, gran disponibilidad, materiales renovables e incluso la posibilidad de utilizar residuos de la agroindustria, características que contribuyen con los principios de la química analítica verde (Escudero, Ávila Maniero, Agostini, & Smichowski, 2016; Teixeira, Lemos, Melo Coelho, & Rocha, 2016). Residuos de la agroindustria como la cáscara de arroz y la ceniza de la cáscara de arroz se han utilizado como biosorbentes con fines de remediación (Bakircioglu, Bakircioglu, & Akman, 2003). La celulosa, lignocelulosa presente en la pared celular del material vegetal presenta grupos carboxílicos e hidroxilos razón por la cual materiales como la fibra de hilo sisal (*Agave sisalana*) se puede ensayar como biosorbente (Giri Dev, Venugopal, Kumar, Miranda, & Ramakrishna, 2010). En particular, la literatura reporta la aplicación de la fibra de sisal (*Agave sisalana*) junto con diferentes reactivos para la preconcentración de cobre o cadmio (de Souza Dias, Bonsucesso, Oliveira, & dos Santos, 2012; de Souza Días, y otros, 2013). No se encontraron reportes previos a la producción científica de esta tesis aplicado a Mn, ni utilizando la fibra de sisal sin derivatización o impregnación con algún reactivo químico adicional.

Como forma de evaluar la eficacia de la preconcentración, se define el Factor de Enriquecimiento (FE) como la relación entre la concentración del analito en el concentrado (eluido de la minicolumna) y en la solución original. En la práctica, esta forma de evaluación no es sencilla porque habitualmente la concentración del analito en la muestra se desconoce. Usualmente el FE se aproxima a la relación de las pendientes de las curvas de calibración lineal, antes y después de la preconcentración. Por lo tanto, la evaluación se basa en la mejora en la señal analítica y no en un incremento de la concentración. Sin embargo, si las condiciones analíticas, como por ejemplo la respuesta instrumental, se

mantienen incambiadas durante ambas calibraciones, la aproximación así obtenida se asemeja al FE real (Fang, 1993).

Al acoplar el análisis en flujo al MP AES es posible disminuir consumo de reactivos y muestra, minimizar la manipulación, entre otras ventajas inherentes al análisis en flujo.

Por otra parte, una estrategia también válida es el acoplamiento de sistemas de introducción de muestra mediante la generación de hidruros (HG), a equipos de espectrometría atómica. Las técnicas de introducción de muestra en fase gaseosa, como ser la generación de hidruros, se basan en la formación de un compuesto volátil. Implica la transformación del analito de la muestra líquida a la fase gaseosa mediante una reacción química. En el proceso ocurre la separación del analito de su matriz, lo cual tiene como resultado una sensibilidad mayor y una supresión de interferencias (Dědina & Tsalev, 1995). Esto fue desarrollado para la determinación de Se en las matrices en estudio acoplado a MP AES. En la actualidad existen muy pocos reportes de la utilización de la técnica HG-MP AES para la determinación de Se en matrices complejas, lo que lo hace un desafío original.

1.5 Espectrometría de emisión y absorción atómica

1.5.1 Espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas

En la espectroscopia de emisión atómica la muestra es atomizada y a continuación una fuente de excitación produce la excitación de los electrones desde el estado fundamental al estado excitado. Al decaer al estado fundamental (estado de menor energía) un fotón es emitido. Los fotones emitidos son medidos, la intensidad de energía emitida es proporcional a la concentración del analito en la muestra, por lo que es utilizada como señal analítica para realizar la medida. Las longitudes de onda de la emisión son características de cada elemento, permitiendo de esta forma determinar la identidad del analito. Dentro de las fuentes de excitación podemos mencionar la llama (excitación térmica),

arco eléctrico y el plasma. El plasma, conocido también como el cuarto estado de agregación de la materia, consta de una mezcla de gases, conductora de la corriente eléctrica, que contiene cationes y electrones de forma tal que la carga neta tiende a cero. Existen tres tipos de plasma: plasma de acoplamiento inductivo (ICP OES), plasma de corriente continua (DCP) y plasma inducido por microondas (MP AES) (Skoog, Holler, & Crouch, 2008).

En la técnica de MP AES, la interacción de un campo magnético de microondas de 2,45 GHz y un campo eléctrico, genera un plasma toroidal robusto (**Figura 2**), en el que se logra introducir la muestra en la zona central. El sistema de introducción de muestra consiste en un nebulizador, una cámara de nebulización y una antorcha estándar. Los equipos comerciales actualmente disponibles utilizan nitrógeno como gas para generar el plasma, alcanzando temperaturas de 5000 K aproximadamente, menores que en espectrometría de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP OES), obteniéndose espectros menos complejos que en ICP OES con predominancia de líneas atómicas (Ozbek & Akman, 2016; Williams, y otros, 2019). Al utilizar nitrógeno como gas, se disminuyen los costos de operación en comparación con el ICP OES y los equipos de MP AES, que utilizaban argón o helio (aunque la utilización de estos últimos era poco extendida). Además, el nitrógeno utilizado puede ser suministrado mediante un cilindro de gases o mediante un generador. El generador produce el nitrógeno a partir de aire, lo que implica muy bajos costos de operación y mayor seguridad al no utilizar cilindros de gases. Es una técnica que posee un amplio rango espectral, además la energía del plasma (permite excitar los electrones de casi la totalidad de elementos de la tabla periódica) y el detector *charge coupled device* (CCD), convierten al MP AES en una técnica multielemental, de análisis secuencial (**Figura 3**). En general la sensibilidad obtenida mediante MP AES, para un mismo elemento, es mejor que en la espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS), similar o comparable a un ICP OES, pero menor a la ICP-MS o ETAAS (Ozbek & Akman, 2016; Balaram, 2020; Fontoura, y otros, 2022). La principal desventaja de la técnica MP AES es la limitación en el requerimiento de sólidos totales disueltos (STD) en las disoluciones de las muestras, para evitar la obstrucción del nebulizador. La **Figura 4** muestra el equipo de MP AES utilizado en este

trabajo de tesis.

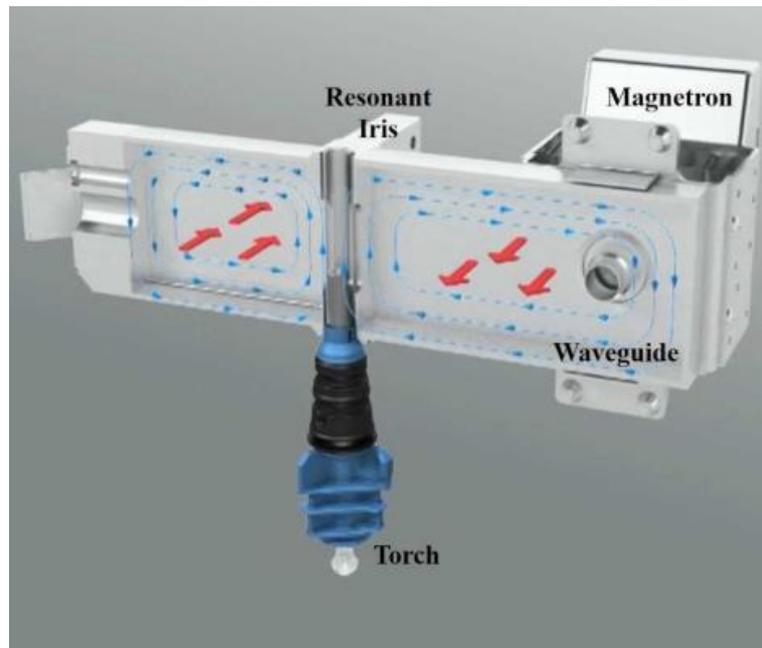


Figura 2 Diagrama de la cavidad de Hammer y los campos magnético y eléctrico (Adaptado de Williams, y otros, 2019)

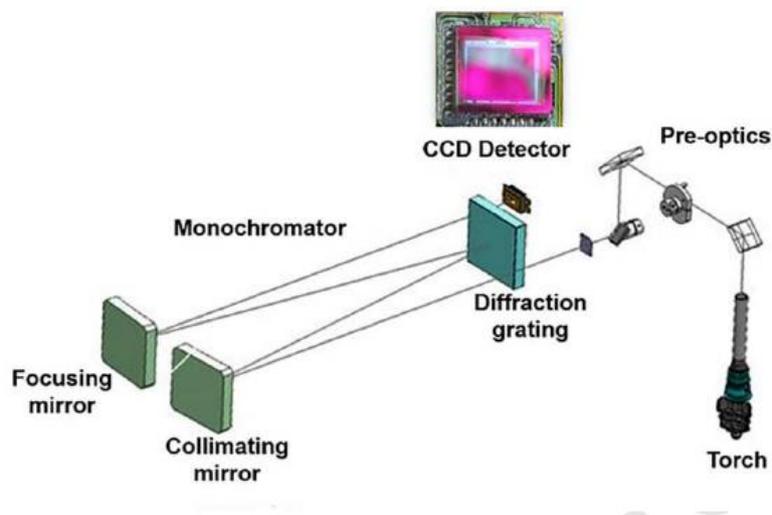


Figura 3 Representación esquemática del sistema de detección de un instrumento MP AES (Adaptado de Williams, y otros, 2019)



Figura 4 Equipo de espectrometría atómica con plasma inducido por microondas (Agilent MP AES 4210)

1.5.2 Espectrometría de absorción atómica

La espectrometría de absorción atómica es una técnica elemental, en la cual mediante un tratamiento térmico adecuado se convierten los componentes de la muestra en átomos e iones gaseosos. En estado gaseoso, los átomos son capaces de absorber radiación de las longitudes de onda características de las transiciones electrónicas del estado fundamental a estados excitados. Las longitudes de onda se relacionan con la identidad del átomo, mientras que la absorción de la radiación se relaciona con la cantidad del elemento presente. De esta forma es posible realizar determinaciones cualitativas y cuantitativas de los elementos presentes en una muestra (Beatty & Kerber, 1993; Skoog, Holler, & Crouch, 2018).

Al proceso por el cual una disolución de la muestra se convierte vapor atómico, se lo conoce como atomización. Existen dos tipos de atomizadores, continuos y discretos. En los continuos, la muestra se introduce en el atomizador a una velocidad constante, tal es el caso de la atomización con llama, que da lugar a la espectrometría de absorción atómica por llama (FAAS). En el caso de los atomizadores discretos, solamente se introduce cierta cantidad de muestra, como sucede en la espectrometría de absorción atómica mediante atomización electrotérmica (ETAAS) (Skoog & Leary, 1995).

En la técnica FAAS, una solución de la muestra se nebuliza por el flujo de un gas oxidante mezclado con un gas combustible, hasta alcanzar la llama donde ocurre la atomización. La llama debe poseer suficiente energía para volatilizar y atomizar la muestra. La composición química de la llama es de relevancia. Por tal motivo es necesario optimizar el tipo de gases y el flujo y proporción de cada uno a utilizar en las determinaciones. Las llamas más utilizadas en la actualidad son una mezcla acetileno/aire y acetileno/óxido nitroso. En términos generales la técnica FAAS es sencilla, de bajo costo y permite determinar analitos en el orden de mg kg^{-1} (Skoog & Leary, 1995; Skoog, Holler, & Crouch, 2018).

La técnica de ETAAS consiste en colocar en tubo de grafito (**Figura 5**), cierta cantidad de muestra (entre 10 a 50 μL) y luego calentar el mismo eléctricamente. Para el calentamiento se utiliza un programa, el cual implica un aumento de la temperatura a lo largo de las diferentes etapas. Básicamente un programa de temperatura consta de tres etapas: secado, calcinación o pirolisis y atomización. En la calcinación se elimina la materia orgánica presente en la muestra. Por último, la temperatura alcanza 2000-3000 $^{\circ}\text{C}$ de forma de atomizar el analito, de forma rápida y confinada en el interior del tubo de grafito, en el camino óptico (etapa de atomización). Estas características confieren elevada sensibilidad a la técnica ETAAS, permitiendo realizar determinaciones en el orden de $\mu\text{g kg}^{-1}$. Entre otros parámetros a optimizar son críticos el volumen de muestra y el programa de temperatura (Beaty & Kerber, 1993; Skoog, Holler, & Crouch, 2018).

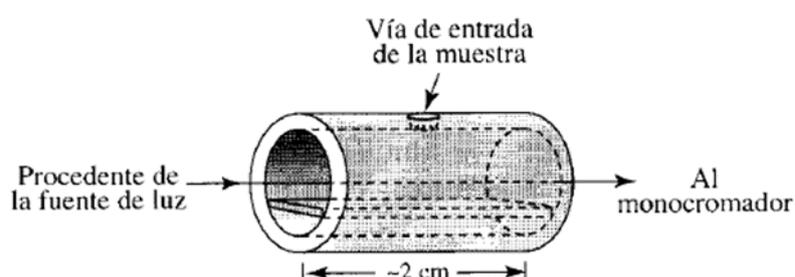


Figura 5 Diagrama de un tubo de grafito (Extraído de Rubinson & Rubinson, 2001)

1.6 Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS)

En la actualidad, la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) es una técnica ampliamente utilizada para el análisis elemental, debido a ciertas ventajas, como ser: bajos límites de detección, rapidez, amplios rangos de trabajo y análisis multielemental. En ICP-MS la muestra o una disolución de la misma es nebulizada y luego en la antorcha del ICP se producen átomos e iones. En el espectrómetro de masas los iones positivos se separan del resto y luego en el analizador de masas son separados en base a su relación masa/carga. La eficiencia en el proceso de ionización (debido a la alta temperatura del plasma, 10000 K) así como también la resolución de analizador de masas son las razones de los bajos límites de detección usualmente alcanzados en ICP-MS. El analizador de masas más comúnmente empleado en ICP-MS es un cuadrupolo. Debido a que el ICP opera a presión atmosférica y el MS trabaja a alto vacío, una de las partes más críticas es la interface o acoplador de vacío diferencial (Skoog, Holler, & Crouch, 2008; Skoog, Holler, & Crouch, 2018).

Considerando que esta técnica se utilizó solo para una comparación, gracias a la posibilidad de que una empresa privada facilitó el acceso, no se profundizará en aspectos teóricos de la misma en este documento.

1.7 Espectrometría de fluorescencia de rayos X dispersiva en energía (EDXRF)

Los rayos X corresponden a radiación electromagnética, de longitud de onda corta, comprendida entre los 10^{-5} A° a 100 A°, producida cuando se desaceleran los electrones de alta energía o por transiciones de los electrones de orbitales internos a un átomo (Skoog, Holler, & Crouch, 2018).

La espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF) es una técnica analítica no destructiva, que se utiliza para analizar la composición elemental de muestras sólidas, líquidas o gaseosas. La técnica se basa en irradiar la muestra con un

haz de rayos X proveniente de un tubo de rayos X o una fuente radiactiva y analizar los espectros de emisión de fluorescencia proveniente de los átomos de la muestra. Al incidir sobre un átomo un haz de rayos X se produce la salida o eyección de un electrón cercano al núcleo. La vacante resultante es “ocupada” por un electrón de una capa superior (mayor energía), la mencionada diferencia de energía entre los niveles corresponde con la emisión de fluorescencia de rayos X (**Figura 6**). Los rayos X de emisión de fluorescencia poseen una longitud de onda y energía característica de cada elemento, en consecuencia, es posible realizar un análisis cualitativo. A su vez la intensidad de la emisión es función de la concentración por lo que un análisis cuantitativo también es posible (Skoog, Holler, & Crouch, Principios de Análisis Instrumental, 2018).

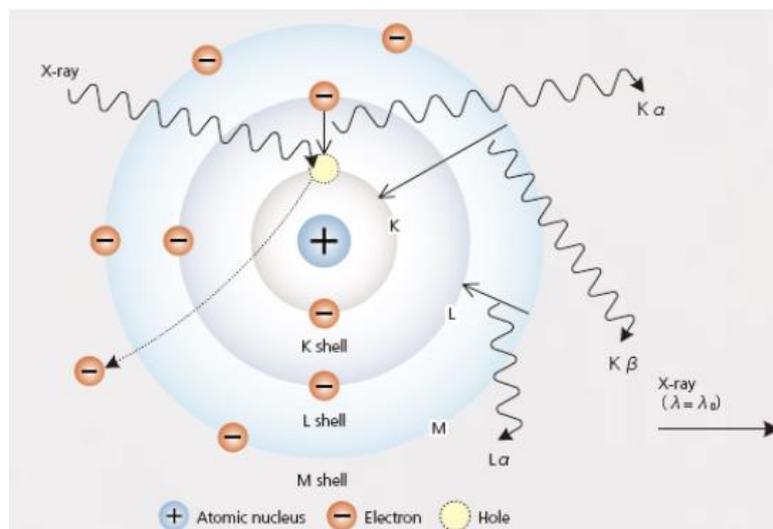


Figura 6 Diagrama de representación del proceso de fluorescencia de rayos X (Extraído de Shimadzu Corporation, 2021)

La técnica de XRF posee ciertas características de interés en análisis químico:

- Posibilidad de realizar el análisis directamente al estado sólido (no destructivo)
- Análisis multielemental
- Alta frecuencia analítica (rapidez)
- Amplio rango dinámico
- Bajo costo por determinación

La principal desventaja es la sensibilidad, que para muchas aplicaciones puede

no ser adecuada (Marguí, Queralt, & Hidalgo, 2009). Todas estas características indican la versatilidad de la técnica, la cual es de aplicación o utilidad en variados campos como la industria química, metalúrgica y geología entre otros (Černohorský, Pouzar, & Jakubec, 2006; Li, y otros, 2020; Lagerström & Ytreberg, 2021).

Un espectrómetro de XRF consta principalmente de 4 componentes principales: una fuente de excitación (tubos de rayos X o fuente radiactiva), un sistema de dispersión, un sistema de detección y un sistema de procesamiento de datos o señales. En base al sistema de dispersión comercialmente se encuentran disponibles dos tipos de instrumentos, según si discriminan la longitud de onda o la energía, dando lugar de esta forma a la espectrometría de fluorescencia de rayos X dispersiva en longitud de onda (WDXRF) y la espectrometría de fluorescencia de rayos X dispersiva en energía (EDXRF) (Jenkins, 1999; Skoog, Holler, & Crouch, 2018; Revenko & Pashkova, 2023). Mientras los instrumentos dispersivos de longitud de onda pueden ser de un solo canal (secuencia) o multicanal (simultáneo), son de gran tamaño y costo elevado, los instrumentos dispersivos en energía son sencillos (ausencia de partes móviles), menor tamaño y costo (**Figura 7**). Los instrumentos de EDXRF tienen menor resolución frente a los WDXRF (Jenkins, 1999; Skoog, Holler, & Crouch, 2018).

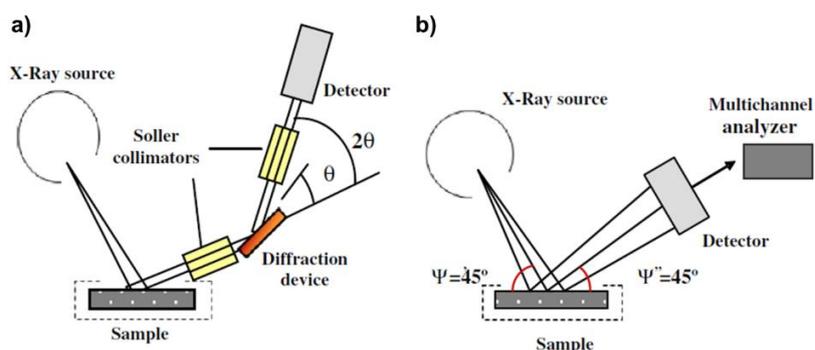


Figura 7 Diseño básico de un espectrómetro de: a) WDXRF; B) EDXRF (Adaptado de Marguí, Queralt, & Hidalgo, 2009).

En el presente trabajo de tesis se utilizó un EDXRF de la marca Shimadzu, modelo EDX7200, el cual se muestra en la **Figura 8**. El mismo consta de una fuente de Rodio, 5 filtros primarios, 4 colimadores (1, 3, 5 y 10 mm) y un detector de Si (*Silicon drift detector*, SDD), capaz de realizar determinaciones de

elementos desde el Na al U (**Figura 9**).



Figura 8 Espectrómetro de fluorescencia de rayos X dispersiva en energía, Shimadzu EDX7200 (Adaptado de Shimadzu Corporation, 2021)

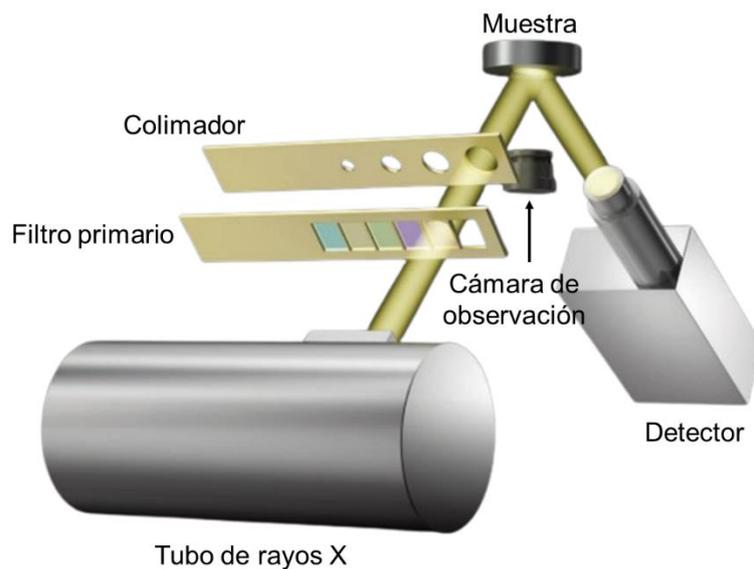


Figura 9 Esquema constructivo del Shimadzu EDX7200 (Adaptado de Shimadzu Corporation, 2021)

La función de los filtros primarios es mejorar la sensibilidad en la detección, al disminuir la incidencia de la radiación de fondo y las líneas características del tubo de rayos X, tal como se evidencia en la **Figura 10**.

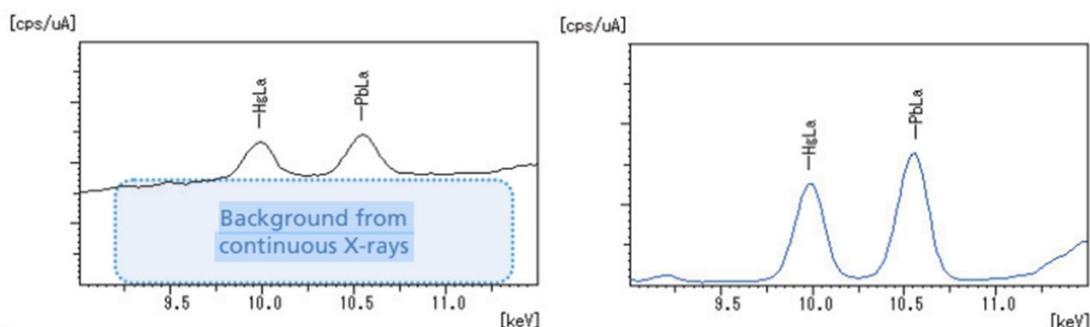


Figura 10 Efecto de un filtro primario en la señal
(Extraído de Shimadzu Corporation, 2021)

Análisis cuantitativo

En la mayoría de los métodos instrumentales, cuando se lleva a cabo un análisis cuantitativo es necesario realizar una curva de calibración, de igual forma en el caso de EDXRF. Sin embargo, en varias aplicaciones no es posible o es dificultoso encontrar cierta cantidad de materiales de referencia certificados y en concentraciones diferentes de los analitos de forma de poder confeccionar la curva de calibración. Para estos casos existen ciertas estrategias a seguir de forma de poder llevar a cabo la cuantificación. La primera estrategia es confeccionar en el laboratorio estándares, utilizando los elementos o compuestos puros y cierta forma de igualar o simular la matriz. En muestras vegetales una posibilidad es utilizar celulosa para simular la matriz y añadir los analitos en las concentraciones necesarias (Marguí, Hidalgo, & Queralt, 2005; Marguí, Queralt, & Hidalgo, 2009; Berzaghi, Lotto, Mancinelli, & Benozzo, 2018). Otra posible estrategia es utilizar métodos de cuantificación basados en algoritmos matemáticos como es el caso del método de cuantificación mediante parámetros fundamentales (FP). El método mencionado, permite obtener una calibración para todos los elementos de la tabla periódica, sin la necesidad de utilizar estándares, y de esta forma poder realizar la cuantificación de los analitos. Se basa en la teoría de la emisión de fluorescencia de rayos X, relacionando de forma teórica las intensidades de rayos X medidos y la concentración de los elementos en la muestra. La relación teórica se fundamenta en parámetros de la física de los rayos X y en parámetros atómicos (Beckhoff, Kanngießner, Langhoff, Wedell, & Wolff, 2006; Volker, 2007). Los cuales se engloban en los llamados parámetros fundamentales, entre los cuales se

incluyen entre otros:

- Parámetros instrumentales o de geometría (ángulo de incidencia y ángulo de observación)
- Parámetros del tubo de rayos X (voltaje, corriente y espesor de la ventana)
- Parámetros de la muestra (número atómico, coeficiente de absorción de masa, rendimiento de fluorescencia, probabilidad de transición electrónica y concentración)

Sherman en 1955 y Rousseau en 1984 entre otros científicos, establecieron las ecuaciones con las cuales se desarrollaron los algoritmos matemáticos de cuantificación mediante el método de parámetros fundamentales (FP) (Sherman, 1955; Rousseau, 1984; Beckhoff, Kanngießner, Langhoff, Wedell, & Wolff, 2006; Volker, 2007), las cuales se presentan en la **Figura 11** y **Figura 12**.

Sherman: Relación teórica entre la concentración y la magnitud medida

$$I_i(\lambda_i) = g_i \cdot C_i \int_{\lambda_0}^{\lambda_i^{ed}} \frac{I_0(\lambda) \mu_i(\lambda)}{\mu'_s(\lambda) + \mu''_s(\lambda_i)} \left[1 + \sum_j C_j \cdot \delta_{ij}(\lambda) \right] d\lambda$$

- i índice del analito.
- $I_i(\lambda_i)$ Intensidad de emisión del analito i .
- λ_0 longitud de onda incidente mínima.
- λ_i^{ed} barrera de absorción del analito.
- g_i Constante de proporcionalidad (depende del instrumento).
- C_i Concentración del elemento (%).
- $I_0(\lambda)$ Intensidad de excitación (fuente).
- $\mu_i(\lambda)$ coeficiente de absorción de masa del analito i .
- $\mu'_s(\lambda) = \sum_n C_n \mu_n(\lambda) Csc\theta'$ Coef de abs de masa efectivo en la λ de excitación. θ' ángulo de incidencia.
- $\mu''_s(\lambda_i) = \sum_n C_n \mu_n(\lambda_i) Csc\theta''$ Coef de abs de masa efectivo en la λ_i de emisión. θ'' ángulo de observación.
- $\delta_{ij}(\lambda) = \frac{1}{2} D_j(\lambda) D_i(\lambda) \frac{r_j^{-1}}{r_j} \omega_j p_j \lambda_j \frac{\mu_j(\lambda_j)}{\mu_i(\lambda)} P_{ij}(\lambda)$
 - D_j es = 1 si la radiación incidente puede ser absorbida por la especie j , es = 0 en otros casos.
 - D_i es = 1 si la emisión del componente j puede excitar al analito, es = 0 en otros casos.
 - ω_j rendimiento de la fluorescencia.
 - p_j probabilidad de que la línea λ_j sea emitida.
 - $P_{ij} = \frac{1}{\mu'_s(\lambda)} \ln \left[1 + \frac{\mu'_s(\lambda)}{\mu_s(\lambda_j)} \right] + \frac{1}{\mu''_s(\lambda_i)} \ln \left[1 + \frac{\mu''_s(\lambda_i)}{\mu_s(\lambda_i)} \right]$

Figura 11 Ecuación de Sherman

(Extraído de material de capacitación comercial empresa Jenck, 2023)

Rousseau: desarrollo el algoritmo de FP. Calcula la intensidad como relación a la intensidad emitida por el elemento puro:

$$R_i = C_i \frac{1 + \sum_j \varepsilon_{ij} C_j}{1 + \sum_j \alpha_{ij} C_j}$$

$$\varepsilon_{ij} = \frac{\sum_k W_i(\lambda_k) \delta_{ij}(\lambda_k)}{\sum_k W_i(\lambda_k)}$$

$$\alpha_{ij} = \frac{\sum_k W_i(\lambda_k) \beta_{ij}(\lambda_k)}{\sum_k W_i(\lambda_k)}$$

$$\delta_{ij}(\lambda) = \frac{1}{2} D_j(\lambda) D_i(\lambda) \frac{r_j - 1}{r_j} \omega_j p_j \lambda_j \frac{\mu_j(\lambda_j)}{\mu_i(\lambda)} P_{ij}(\lambda)$$

$$W_i(\lambda_k) = \frac{\mu_i(\lambda_k) I_0(\lambda_k) \Delta \lambda_k}{\mu_i^* [1 + \sum_j C_j \beta_{ij}(\lambda_k)]}$$

$$\beta_{ij}(\lambda_k) = \frac{\mu_j^* - \mu_i^*}{\mu_i^*}$$

- δ_{ij} depende de: la presencia de elementos de matriz, rendimiento de fluorescencia, probabilidad de emisión y regla de selección.
- $W_i(\lambda_k)$ depende de la fuente y de las concentraciones.
- Todas dependen del coeficiente de absorción de masas y este a su vez depende de las concentraciones de todas las especies.

Figura 12 Ecuación de Rousseau

(Extraído de material de capacitación comercial empresa Jenck, 2023)

Preparación de muestras

Como se mencionó anteriormente una de las características o ventajas de las técnicas XRF es la posibilidad de realizar análisis directamente sobre muestras sólidas, lo que implica una preparación de muestras sencilla con una reducción considerable en el tiempo y en el uso de reactivos. Además, en el caso de muestras sólidas homogéneas y con superficies planas es posible realizar la determinación sin ninguna preparación de muestra, como es el caso del análisis directo de metales y aleaciones. Sin embargo, para la mayoría de los materiales sólidos se requiere un tratamiento previo de la muestra para hacerlos homogéneos y obtener resultados reproducibles. Comúnmente, este procedimiento se basa en triturar o moler los materiales hasta obtener un polvo fino, para luego confeccionar un *pellet*, procedimiento sencillo y rápido (Marguí, Queralt, & Hidalgo, 2009). Este fue el procedimiento de preparación de muestras llevado a cabo para el tipo de muestras con las que se trabajó durante la tesis. Otro procedimiento de preparación de muestras comúnmente utilizado en muestras muy heterogéneas, como puede ser el caso de muestras geológicas,

es la elaboración de discos fundidos. El procedimiento consiste en colocar en un crisol la muestra molida con un exceso de fundente, típicamente tetraborato de sodio o litio y llevar la mezcla a alta temperatura durante cierto tiempo, luego del cual se vierte el “vidrio” fundido en un molde. De esta forma se obtiene un disco o perla el cual es adecuado para la medida en el espectrómetro. La temperatura, tiempo y relación muestra/fundente son aspectos para optimizar para cada tipo de muestra. Las desventajas de este procedimiento son el costo de los reactivos, el tiempo y la dilución realizada a la muestra (Beckhoff, Kanngießner, Langhoff, Wedell, & Wolff, 2006).

1.8 Validación

Si el resultado de un análisis no genera confianza en el destinatario de este, entonces es mejor no realizar el análisis. Cuando se solicita un análisis a un laboratorio, se supone que el laboratorio tiene conocimientos técnicos adecuados para llevar a cabo el mismo. La confianza en un resultado analítico y por ende en el ensayo llevado a cabo, radican en la validación del método analítico utilizado para responder el problema.

La validación de una metodología analítica tiene por finalidad, demostrar que un método analítico genera resultados confiables bajo las condiciones de trabajo del laboratorio. Se han propuesto varias definiciones para la validación de métodos analíticos, entre ellas se encuentran la indicada en el del Vocabulario Internacional de Metrología (VIM), la de la Unión Internacional de Química Pura (IUPAC) y la de la Guía Eurachem.

De acuerdo con el VIM la validación se define como “verificación, donde los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto” (CEM, 2012). Para la IUPAC, la validación es confirmar mediante el aporte de evidencia objetiva que se cumplen los requisitos establecidos para una aplicación particular. Es decir, la aptitud de un método analítico para su uso con un propósito analítico particular, cuyo procedimiento es aplicable a un tipo específico de material y a una relación de concentración de analito (IUPAC, 2023). En tanto la Guía Eurachem entiende como validación al proceso en el cual se demuestra que un método analítico es

adecuado para el uso previsto (Magnusson & Örnemark, 2014). Estas definiciones de validación tienen en común el concepto de aptitud o adecuación al uso. Según la IUPAC, la adecuación al uso es el grado en el cual los datos producidos por un proceso de medición habilitan a un usuario a tomar decisiones técnicas y administrativamente correctas para un propósito indicado. La adecuación de un método analítico puede evaluarse mediante ciertos parámetros, conocidos como parámetros de desempeño o cifras de mérito.

A continuación, se mencionan las cifras de mérito (o parámetros de desempeño) usualmente evaluadas y las formas recomendadas o sugeridas para estimarlas de acuerdo con la Guía Eurachem (Magnusson & Örnemark, 2014).

- El intervalo de trabajo o rango dinámico es “el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable”. El extremo inferior del intervalo de trabajo se encuentra determinado por el límite de cuantificación (LC). Usualmente se busca trabajar en un rango lineal. Para determinar el modelo de mejor ajuste se suele utilizar algunas de las siguientes herramientas (en conjunto o solas): inspección visual, coeficiente de determinación, estudio de los residuos y pruebas de bondad de ajuste, entre otras.
- Límite de detección (LD): es la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado.

Uno de los criterios que aún se utilizan es el de 3s que se estima de la siguiente forma:

$LD = 3s/m$ (siendo s la desviación estándar de 10 réplicas de un blanco y m la pendiente de la curva de calibración)

- Límite de cuantificación (LC): es la concentración más baja del analito que puede ser cuantificada por el método a un nivel de confianza especificado. De acuerdo al criterio de 10s se estima de la siguiente forma. Por encima del LC es posible informar con confianza un resultado junto con su incertidumbre.

$LC = 10s/m$ (siendo s la desviación estándar de 10 réplicas de un blanco y m la pendiente de la curva de calibración)

Otro abordaje, ampliamente utilizado en espectroscopia, de la definición del LD es aportado por Thomsen, al establecer la relación entre la radiación espectral de fondo y el límite de detección. Esta relación bastante intuitiva indica que a mayor radiación espectral de fondo mayor LD, por lo cual es necesario definir la concentración equivalente al fondo (BEC) y la relación señal/fondo (SBR), las cuales se definen como:

$$SBR = \frac{I_{\text{Estándar}} - I_{\text{Blanco}}}{I_{\text{Blanco}}} \quad BEC = \frac{C_{\text{Estándar}}}{SBR}$$

siendo $C_{\text{Estándar}}$ la concentración del punto más alto de la curva de calibración e $I_{\text{Estándar}}$ e I_{Blanco} , las señales del estándar y blanco respectivamente (Thomsen, 2012). En base a lo anterior, el LD y LC quedan definidos de la siguiente forma:

$$LD = \frac{3 * RSD_{\text{Blanco}} * BEC}{100} \quad LC = 3,3 * LD$$

- La precisión es una medida de que tan cercanos son los resultados entre sí, o sea es un indicador de la dispersión de los resultados obtenidos aplicando un determinado método analítico. Por lo general se expresa mediante la desviación estándar o desviación estándar relativa porcentual (%RSD), calculada a partir de los resultados obtenidos mediante la realización de mediciones repetidas sobre un material adecuado, en condiciones especificadas. De acuerdo a las condiciones especificadas se pueden distinguir tres tipos de niveles de precisión (repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad). La repetibilidad es el menor nivel de variación en las condiciones, representa la variación en los resultados cuando las mediciones se llevan a cabo por el mismo analista, en el mismo equipo y en un corto plazo de tiempo. En contraposición, la reproducibilidad corresponde a la máxima variación de las condiciones. Es la variación de los resultados cuando las mediciones son llevadas en laboratorios diferentes. En el medio se encuentra la precisión intermedia,

la misma corresponde a medidas realizadas en un mismo laboratorio, pero con variaciones de las condiciones mayores a la repetibilidad (Magnusson & Örnemark, 2014). La desviación estándar es función de la concentración medida, por lo tanto, para establecer si un valor de %RSD es aceptable es necesario considerar la concentración. Una forma de estimar este valor aceptable en función de la concentración es utilizar la ecuación de Horwitz, comúnmente conocida como “Trompeta de Horwitz”, por su forma (**Figura 13**) la cual es una ecuación empírica.

$$\text{RSD} = \pm 2^{1-0,5\log C}$$

Dicha ecuación permite estimar el valor de %RSD adecuado para una concentración dada (Horwitz & Albert, 2006).

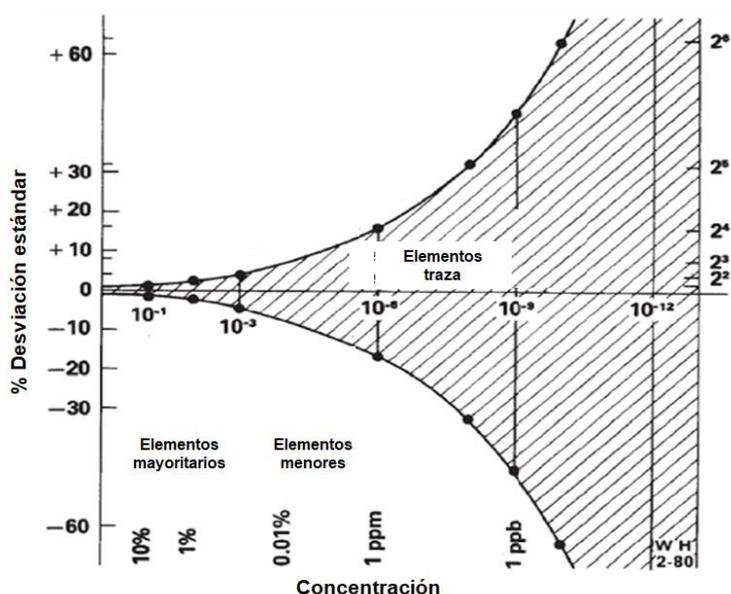


Figura 13 Trompeta de Horwitz (Adaptado de Horwitz & Albert, 2006).

- La veracidad es la expresión de la cercanía o proximidad de los resultados obtenidos al aplicar el método analítico, infinitas veces, con un valor de referencia. Como no es posible realizar infinitas medidas, la veracidad se estima mediante el cálculo del sesgo o expresando el mismo en términos relativos en porcentaje (%R, porcentaje de recuperación) (CEM, 2012).

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

Para poder calcular el porcentaje de recuperación y estimar de esta forma la veracidad es necesario disponer de un “valor de referencia”. El mismo se puede obtener utilizando un material de referencia (RM) o un material de referencia certificado (CRM).

De acuerdo con el Vocabulario Internacional de Metrología (VIM), un material de referencia (RM) es un “material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso en una medición o en un examen de propiedades cualitativas”. Ahora bien, un material de referencia certificado (CRM) es un “material de referencia acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos” (CEM, 2012), es decir un CRM es un material, que ha sido ampliamente caracterizado utilizando procedimientos validados, acompañado de un certificado donde se establece el valor de la propiedad junto con su incertidumbre asociada.

En ciertos casos no es posible disponer de un CRM o RM o los existentes son incompatibles con alguna etapa de la metodología analítica, en este caso, la veracidad se puede estimar mediante ensayos de recuperación sobre muestras adicionadas. Un ensayo de recuperación sobre una muestra adicionada comprende adicionar a una muestra, una cantidad conocida de analito. Luego mediante la concentración obtenida de la muestra adicionada y la muestra sin adicionar, calcular el porcentaje de recuperación (%R), para lo cual el valor de referencia se considera como la cantidad adicionada, exactamente conocida. Los ensayos de recuperación sobre muestras adicionadas presentan la desventaja que no siempre el agregado o adición del analito se realiza en la misma forma química que se encuentra en las muestras (Magnusson & Örnemark, 2014).

- La selectividad de un método analítico es definida por el VIM y la IUPAC como “la propiedad de un sistema de medida, empleando un especificado,

por la que el sistema proporciona valores medidos para uno o varios mensurandos, que son independientes de otros mensurandos o de otras magnitudes existentes en el fenómeno, cuerpo o sustancia en estudio” (CEM, 2012; IUPAC, 2023). En general un método analítico consta de una etapa de medición, en la cual no se mide directamente la concentración del analito, en cambio se mide una propiedad específica, ejemplo la intensidad de la luz. Por lo tanto, es de relevancia establecer que la propiedad medida se debe solo al analito y no a algo química o físicamente similar, causando así un sesgo en el resultado de medición. La selectividad de un método puede ser evaluada estudiando su habilidad de medir el analito comparando con otros métodos independientes, para lo cual se puede utilizar un CRM o RM de una matriz similar y representativa de las muestras a analizar. (Magnusson & Örnemark, 2014).

- Según el VIM, la exactitud se define como la “proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando (CEM, 2012). En la práctica, la exactitud se evalúa a través de los errores sistemáticos y aleatorio, los cuales se estiman mediante la veracidad y la precisión respectivamente (Magnusson & Örnemark, 2014).
- “La incertidumbre es un intervalo asociado con un resultado de medida que expresa el intervalo de valores que razonablemente pueden atribuirse a la cantidad que se está midiendo” (Magnusson & Örnemark, 2014). La incertidumbre es un parámetro que define un intervalo dentro del cual se espera que se encuentre, con una cierta probabilidad, la cantidad medida, teniendo en cuenta todas las posibles fuentes de error. Estrictamente, la incertidumbre no es un parámetro de desempeño de un método analítico, es un parámetro del resultado, el cual le confiere calidad al mismo.

Existen además guías de referencia para análisis de determinadas matrices, como por ejemplo la AOAC: *Guidelines for Standard Method Performance Requirements*, guía de aplicación a las matrices relacionadas en este trabajo (AOAC, 2019). Este compendio de métodos estándar para análisis de alimentos

contiene requerimientos de aseguramiento de la calidad y validación que fueron utilizados en este trabajo como referencias.

La misma establece las siguientes especificaciones esperadas para los parámetros precisión (repetibilidad) y veracidad a los niveles de concentración de analito comprendidos en el trabajo.

Tabla 1 Criterios de validación

Nivel Concentración	Precisión (%RSD)	Veracidad (%R)
100 mg kg ⁻¹	5,3	90-107
10 mg kg ⁻¹	7,3	
1 mg kg ⁻¹	11	80-110
100 µg kg ⁻¹	15	
10 µg kg ⁻¹	21	60-115
1 µg kg ⁻¹	30	40-120

(Adaptado de AOAC, 2019)

Otra posibilidad para establecer un criterio de aceptación o especificación relativa a la precisión es utilizar la ecuación de Horwitz antes mencionada.

1.9 Abordaje de metodologías desde la Química Analítica Verde

En las últimas décadas se ha observado en todo el mundo una creciente preocupación por la preservación del ambiente. La sociedad actual tiene una alta conciencia y responsabilidad con la dimensión ambiental de las actividades humanas. En particular, la industria química y los análisis de laboratorio son actividades antropogénicas contaminantes del ambiente y que implican también riesgos para la salud de quienes realizan los análisis.

En 1998 Anastas y Warner definieron el concepto de Química Verde (QV) y formularon los 12 principios de la Química Verde (**Tabla 2**), como recomendaciones, sugerencias y directrices para la comunidad científica de forma de lograr procesos químicos más ecológicos, enfocándose en aspectos como la economía del átomo y procesos catalíticos (Anastas & Warner, 1998).

Tabla 2 Los 12 Principios de la Química Verde

Principio	
1	Prevención de residuos
2	Economía de átomos
3	Síntesis de sustancias químicas menos peligrosas
4	Diseño de productos químicos más seguros
5	Solventes y auxiliares más seguros
6	Diseño para la eficiencia energética
7	Uso de materias primas renovables
8	Reducir derivados
9	Catálisis
10	Diseño para la degradación
11	Análisis en tiempo real para la prevención de la contaminación
12	Minimizar el potencial de accidentes

(Adaptado de Anastas & Warner, 1998)

Tiempo después surgió la Química Analítica Verde (QAV) como una rama específica de la QV, debido principalmente a que en las directrices de la QV solamente unos pocos principios poseen relación con la Química Analítica y solamente uno de ellos de forma directa. (Análisis en tiempo real para la prevención de la contaminación). Por esta razón en 2013 Galuszka et al, establecieron los 12 Principios de la Química Analítica Verde (QAV), proporcionando un marco de directrices más adecuado para el ámbito de la Química Analítica (Gałuszka, Migaszewski, & Namieśnik, 2013). La QAV tiene como objetivo minimizar el impacto ambiental negativo de los análisis químicos abordando y evaluando aspectos críticos como la generación de desechos tóxicos, el uso de solventes y reactivos peligroso tanto para la salud humana como para el ambiente. La **Tabla 3** muestra los 12 principios de la QAV establecidos por Galuszka y colaboradores.

Tabla 3 12 Principios de la Química Analítica Verde

Principio	
1	Aplicación de técnicas analíticas directas de forma de evitar el tratamiento de muestra
2	Utilización de tamaño reducido y número mínimo de muestras
3	De ser posible realización de medidas <i>in situ</i>
4	Integración de operaciones y procesos analíticos para el ahorro de energía y reducción del uso de reactivos
5	Selección de métodos automatizados y miniaturizados
6	Derivatización debe ser evitada
7	En lo posible disminuir la generación de residuos y gestionar correctamente los mismos
8	Preferentemente utilizar métodos multiparamétricos o multielementales
9	Minimizar el uso de energía
10	De ser posible utilizar reactivos de fuentes renovables
11	Eliminar o reemplazar reactivos tóxicos
12	Garantizar la seguridad del analista

(Adaptado de Gałuszka, Migaszewski, & Namieśnik, 2013)

Como forma de evaluar y armonizar el cumplimiento de los métodos analíticos con los principios de la QAV, en la literatura se reportan varias herramientas o métricas, algunas aplicables exclusivamente a ciertos tipos de metodologías analíticas mientras que otras son de aplicación general (Sajid & Płotka-Wasyłka, 2022). Las mismas se basan en la evaluación de los principios de diferentes formas. El primer enfoque propuesto en la literatura fue el Índice Nacional de Métodos Ambientales (NEMI, por su sigla en inglés) que derivaba de respuestas SI/NO a cuatro de los criterios (Keith, Gron, & Young, 2007). En 2012 Galuska et al propuso la herramienta métrica Analytical Eco-Scale, la cual asigna puntos de penalización (PP) a los diferentes criterios, los cuales se restan sobre un ideal de 100 puntos (Gałuszka, Konieczka, Migaszewski, & Namieśnik, 2012). Recientemente y como forma de generar resultados más completos y detallados se han generado y reportado en la literatura diferentes herramientas métricas como ser el índice de Procedimiento Analítico Verde GAPI y ComplexGAPI (Płotka-Wasyłka, 2018; Płotka-Wasyłka & Wojnowski, 2021) el Analytical

Greenness Metric Approach (AGREE Y AGREEprep) (Pena-Pereira, Wojnowski, & Tobiszewski, 2020; Wojnowski, Tobiszewski, Pena-Pereira, & Psillakis, 2022) y el hexágono CALIFICAMET (Ballester-Caudet et al, 2019). Con estas herramientas métricas se obtienen pictogramas en los cuales es fácil de leer e interpretar el “Greenness” o grado de cumplimiento de la metodología analítica con los principios de la QAV (Sajid & Płotka-Wasyłka, 2022). El interés de la comunidad científica en la temática de la Química Analítica Verde es notorio, tal como se evidencia en el creciente número de publicaciones sobre esta temática en los últimos años en la base de datos Scopus (**Figura 14**).

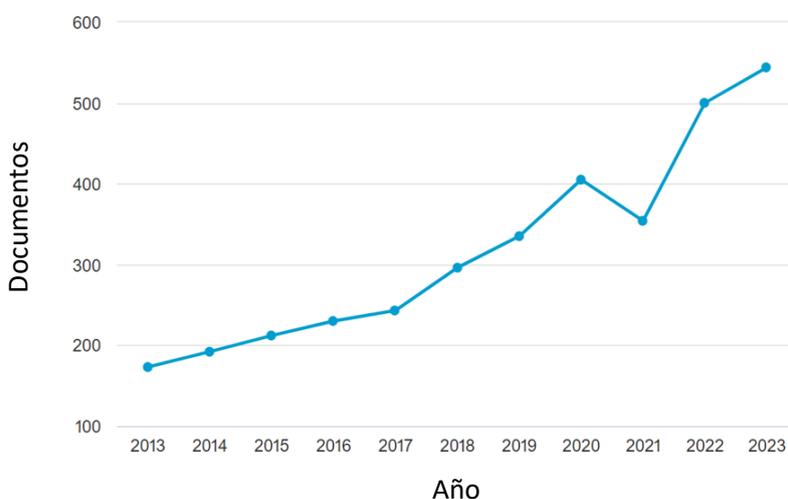


Figura 14 Número de publicaciones por año
(Extraído del portal Scopus <https://www.scopus.com>)

Adicionalmente la División V de Química Analítica de la IUPAC, presentó en 2021 el Proyecto (2021-015-2-500) “*Greenness of Official Standard Sample Preparation Methods*” como forma de contribuir mediante la Química Analítica Verde (QAV) con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030 de las Naciones Unidas (IUPAC , 2021). Nuevamente queda demostrado la relevancia y actualidad del aporte de la Química Analítica Verde en el desarrollo de nuevos métodos analíticos y de las herramientas de evaluación del *Greenness*.

La QAV se enfoca en el *Greenness* de una metodología analítica, pero no evalúa aspectos como la eficiencia analítica y aplicabilidad. Es por esta razón que surge

la Química Analítica Blanca, propuesta por Nowak et al en 2021, la cual realiza una evaluación holística de una metodología considerando aspectos ecológicos, eficiencia y aplicabilidad (Nowak, Wietecha-Posłuszny, & Pawliszyn, 2021).

Recientemente, en 2023 se reporta el desarrollo y aplicación de una nueva herramienta métrica, *Blue applicability grade index* (BAGI), para evaluar otro aspecto de importancia de una metodología analítica como es la practicidad. BAGI o Índice Azul del Grado de Aplicabilidad es una nueva métrica, complementaria con la QAV (Manousi, Wojnowski, Płotka-Wasyłkac, & Samanidou, 2023).

En base a lo anterior, en este trabajo de tesis se encuentra el punto 3.8 dedicado a explicar las herramientas métricas empleadas para realizar el abordaje de la Química Analítica Verde y la Química Analítica Blanca para los métodos analíticos utilizados. Conjuntamente en el mismo punto se presenta y explica la herramienta BAGI, que fue utilizada como una métrica complementaria para realizar una evaluación global y brindar un aporte adicional al trabajo de tesis.

CAPÍTULO 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 Justificación

En el contexto ganadero uruguayo coexisten principalmente dos sistemas productivos, que difieren en la forma de alimentación del ganado bovino. Un primer sistema es el denominado engorde a corral o *feedlot*. Entendiéndose como *feedlot* aquel sistema productivo en el cual el animal es engordado en corrales, suministrándole una alimentación balanceada y con estricto control sanitario. En cambio, el 90% del rodeo vacuno es alimentado con pasturas y reservas forrajeras en los momentos en que las mismas son escasas (Montes Narbondo & Carriquiry Mendiola, 2022). En animales alimentados con pasturas naturales es sabido que solo este alimento no es suficiente para cubrir las necesidades nutricionales del ganado bovino, pero para el caso de las reservas forrajeras es poca y desactualizada la información que hay al respecto o sobre lo que sucede con el contenido de minerales durante los procesos de enfardado o ensilado (Ungerfeld, 1998). Debido a lo anterior, las determinaciones analíticas de micronutrientes es de relevancia. Se tomaron para este trabajo tres elementos esenciales, cobre (Cu), manganeso (Mn) y selenio (Se) en pasturas y reservas forrajeras y agua destinada al consumo del ganado, como monitores y para los posibles desarrollos a realizar en el periodo de un posgrado en Química Analítica. Al disponer de información actualizada y confiable, en caso de detectarse la necesidad, será posible tomar acciones, como es el caso de suplementación con premezclas o con soluciones inyectables.

Hipótesis propuestas

El trabajo plantea como desafío analítico desarrollar metodologías para la determinación de Cu, Mn y Se en matrices vegetales complejas y diversas entre sí, así como también en aguas. Considerando que estos elementos pueden estar en concentraciones de trazas, se propuso verificar si:

- mediante el acoplamiento de sistemas de tratamiento de muestra y/o preconcentración en línea utilizando biosorbentes, alcanzaran los niveles

de sensibilidad requeridos para la cuantificación mediante MP AES. Evitando de esta forma la necesidad del uso de equipamiento de alto costo aún no disponible en la Universidad de la República (Udelar). La técnica MP AES, trabaja solamente con nitrógeno obtenido de un generador a partir de aire suministrado por un compresor por lo que es la técnica atómica para medidas en forma líquida de menor costo de operación y mantenimiento actualmente disponible.

- mediante la utilización de una técnica no destructiva, como ser EDXRF se podría lograr la determinación de estos mismos analitos, en el alimento para ganado, directamente al estado sólido minimizando las etapas de preparación de muestras.

Se postula que ambas estrategias se alinearán mucho más con varios de los 12 principios de la Química Analítica Verde (QAV) que cualquier otra metodología clásica, tomando como referencia la descripción simplificada del acrónimo propuesto por Galuzka et al. "SIGNIFICANCE" (Galuzka, et al 2013), incluso de mejor forma que las metodologías denominadas "*gold techniques*". Esto será demostrado mediante el estudio exhaustivo, discusión y evaluación de varias herramientas métricas a lo largo del trabajo.

2.2 Objetivo general

- Diseñar métodos analíticos de extracción en fase sólida para la determinación de Cu y Mn en pasturas destinadas a alimento para ganado y aguas mediante preconcentración en línea y/o análisis en pequeña escala en *batch* utilizando biosorbentes.

Estos desarrollos tienen como objetivo explorar la eficiencia del uso de estos materiales para la preconcentración de metales con posterior determinación ya sea mediante acoplamiento de un sistema en flujo a espectrometría de emisión atómica (MP AES) o mediante análisis directo de la fase sólida mediante fluorescencia de rayos X (EDXRF).

- Validar un método analítico para la determinación de Se en alimento para ganado mediante el acople HG.
- Verificar la alineación con la Química Analítica Verde de los métodos desarrollados utilizando diferentes métricas (Eco escala y diseño de pictogramas) así como también una evaluación holística desde la Química Analítica Blanca.

2.3 Objetivos específicos

- Desarrollar una metodología analítica para la determinación de Cu y Mn mediante preconcentración o pretratamiento en línea y detección mediante MP AES.
- Desarrollar metodologías analíticas que trabajen al estado sólido para la determinación de Cu y Mn mediante EDXRF.
- Desarrollar una metodología analítica para la determinación de Se en alimento para el ganado mediante HG-MP AES.
- Validar las metodologías analíticas desarrolladas según parámetros sugeridos por guías internacionales.
- Evaluar cuantitativamente el desempeño de los métodos desarrollados desde el concepto de la Química Analítica Verde y Blanca. Adicionalmente a los objetivos iniciales, y ajustando al estado del arte en el uso de métricas, se evaluaron también otras herramientas recientemente publicadas para enriquecer el trabajo y contribuir a una discusión más completa.

CAPÍTULO 3. PARTE EXPERIMENTAL

En el presente capítulo se indican los reactivos, materiales e instrumentos utilizados a lo largo de la tesis para alcanzar los objetivos planteados. Además, se describen detalladamente los procedimientos analíticos utilizados para el pretratamiento y tratamiento de muestra, las diferentes metodologías analíticas desarrolladas y validadas, así como también la evaluación de estas desde el abordaje de la Química Analítica Verde y el enfoque holístico de la Química Analítica Blanca.

3.1 Reactivos y Materiales

- Agua ultrapura de resistividad 18,2 MΩ cm (ASTM Tipo I)
- Ácido alizarin-3-metiliminodiacético (Sigma Aldrich, USA)
- Ácido clorhídrico concentrado (37% v/v, Merck, Alemania)
- Ácido nítrico concentrado (67% v/v, Merck, Alemania)
- Argón de alta pureza 99,998% (Linde, Uruguay)
- Acetileno de alta pureza 99,8% (Linde, Uruguay)
- Cáscara de arroz
- Ceniza de cáscara de arroz
- Conectores o *fittings* para sistemas en flujo
- Fibra de hilo sisal (*Agave sisalana*)
- Filtro de PTFE, tamaño de poro de 0,45 μm (Merck, Alemania)
- Hidróxido de sodio (Merck, Alemania)
- Lámpara de cátodo hueco marca Lumina® de Cu (Perkin Elmer, USA)
- Lámpara de cátodo hueco marca Perkin Elmer de Mn (Perkin Elmer, USA)
- Material de referencia certificado Agua, MRC.INO.101(LATU, Uruguay)
- Material de referencia certificado *Apple Leaves*, SRM 1515 (NIST, USA)
- Material de referencia certificado *Brachiaria Brizantha cv (Marandu)*, RM-Agro E1001a (Embrapa, Brasil)
- Material de referencia certificado *Rice Flour* SRM 1568a (NIST, USA)
- Material de referencia certificado *Wheat Flour* SRM 1567a (NIST, USA)

- Material de vidrio de laboratorio
- Soluciones stock para absorción atómica de 1000 mg L⁻¹ de Cobre (Fluka, BCBF5847V, Suiza) y Manganeso (Fluka, BCBB3936, Suiza)
- Soluciones stock para absorción atómica de 1000 mg L⁻¹ de Selenio (Carlo Erba, T105255F, Alemania)
- Tubos de grafito recubiertos pirolíticamente con plataforma de L'Vov (Perkin Elmer, USA)
- Tubos de polipropileno de 15 y 50 mL Tipo Falcon®
- Tubos de bomba peristáltica Tygon®
- Tubo de Teflón de 0,8 mm diámetro interno

El trabajar con elementos a niveles de concentración de trazas, implica mantener un especial control y cuidado de la contaminación, de forma de evitar una alteración de la concentración del analito durante el proceso analítico. Las principales fuentes de contaminación son el ambiente, los materiales de trabajo y los reactivos utilizados. En el caso de los materiales utilizados, los mismos fueron descontaminados con ácido nítrico 10% v/v previamente al uso. Todos los reactivos utilizados fueron calidad pura para análisis o superior. El agua ultrapura utilizada como disolvente fue ASTM Tipo I. De acuerdo con la *American Society for Testing and Materials* (ASTM), el agua Tipo I es la categoría de mayor pureza, recomendada para análisis de trazas y preparación de disoluciones patrón. Entre otras características, el agua ASTM Tipo I debe cumplir resistividad eléctrica a 25 °C de 18 MΩ.cm, máximo de 50 mg L⁻¹ de carbono orgánico total, máximo de cloruros de 1 µg L⁻¹, máximo de sodio de 1 µg L⁻¹ y un valor máximo de sílice total de 3 µg L⁻¹ (ASTM, 2018).

3.2 Instrumentos

- Agitador magnético con plancha calefactora Thermolyne Nuova (Merck, Alemania)
- Agitador magnético con plancha calefactora Wisd MSH-20A (Daihan Scientific Co. Ltd, Corea)
- Balanza Analítica Shimadzu AUX 220 (Shimadzu, Japón)

- Balanza Auxiliar Radwag WYB 2000 (Radwag, Polonia)
- Baño de ultrasonido Cole-Palmer 8893 (Cole-Palmer, USA)
- Bomba Peristáltica Rainin Dynamax RP-1 (Rainin, USA)
- Centrífuga Unico PowerSpin™ (Unico, USA)
- Digestor por Radiación Microondas CEM Mars 6 equipado con 12 vasos Easy Prep Plus® (CEM, USA)
- Electrodo de vidrio (pHmetro) Orion Versastar (Thermo Scientific, USA)
- Espectrómetro de Emisión Atómica con Plasma Inducido por Microondas Agilent MP AES 4210, con autosampler SPS 4 (Agilent, USA)
- Espectrómetro de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica Perkin Elmer HGA 900 (Perkin Elmer, USA)
- Espectrómetro de Absorción Atómica de Llama Perkin Elmer Analyst 200 (Perkin Elmer, USA)
- Espectrómetro de Fluorescencia de Rayos X de Energía Dispersiva Shimadzu EDX 7200 (Shimadzu, Japón)
- Espectrómetro de masas con acoplamiento inductivo Shimadzu ICPMS-2030 LF (Shimadzu, Japón)
- Estufa de secado
- Molino de cuchillas
- Prensa neumática de laboratorio
- Sistema de purificación de agua Millipore™ DirectQ3 UV (Millipore™, Alemania)
- Válvula inyectora 6 puertos con módulo electrónico de control (Valco Cheminert Instrument Co Inc, USA)

3.3 Muestreo y Operaciones Preliminares

Las diversas muestras de material vegetal (alimento para ganado) fueron obtenidas de productores agrícola-ganaderos de diferentes zonas del país. El proceso de muestreo fue realizado por cada productor siguiendo ciertos lineamientos descritos en el **ANEXO I**. Una vez en el laboratorio de Química Analítica se les realizó una correcta identificación y clasificación de forma de poder obtener trazabilidad. Luego fueron cortadas en pequeños segmentos,

utilizando una tijera de cerámica. Posteriormente se realizó el secado de las mismas en estufa a 60 °C hasta peso constante, para obtener el producto seco y el determinar el contenido de humedad. Las muestras secas fueron molidas con molino de cuchillas y almacenadas en tubos de polipropileno a temperatura ambiente en desecador (**Figura 15**). Los análisis se realizaron sobre las muestras secas.



Figura 15 Muestras de fardos secos y molidos

Para el caso de las muestras de agua, las mismas se obtuvieron de diferentes regiones de Uruguay incluyendo agua de pozo (6), agua de lluvia (1) y agua de red (1). El pH inicial de las muestras recolectadas osciló entre 5 y 8 y se almacenaron entre 2 y 8 °C en botellas de plástico sin el agregado de aditivos conservantes hasta el análisis. En caso de contener material en suspensión, la muestra fue filtrada mediante membrana de PTFE, de 0,45 μm antes del análisis. En todos los casos el pH se ajustó con una solución de hidróxido de sodio diluido (0,1 mol L⁻¹) o ácido clorhídrico diluido (0,1 mol L⁻¹), según corresponda. El volumen final se estableció gravimétricamente luego de cada ajuste.

3.4 Tratamiento de muestras asistido mediante radiación microondas (MW) y ondas de ultrasonido (US)

Antes de poder llevar adelante la determinación de Cu, Mn y Se en pasturas y reservas forrajeras, es necesario realizar un tratamiento que nos permita contener los analitos de interés en una fase líquida, compatible con la

determinación mediante MP AES y otras técnicas de espectrometría atómica. Estos tratamientos se pueden realizar ya sea asistido mediante radiación microondas o bien asistido por ondas de ultrasonido (Nóbrega, Trevizan, Labuto, & Nogueira, 2002; Bendicho et al, 2012).

Tratamiento asistido mediante radiación microondas (MW)

Se realizó una digestión asistida por microondas utilizando un Digestor CEM Mars 6[®] (**Figura 16**). Para el procedimiento se pesaron 0,5 g de muestra (seca y molida) en vasos de reacción *EasyPrep Plus*[®], luego se agregaron 10 mL de HNO₃ 4,5 mol L⁻¹. El programa de temperatura utilizado, *Plant Material*, es un programa tipo *OneTouch* propietario de la firma CEM. El mismo consiste en las siguientes etapas: calentamiento hasta 200 °C durante 15 min, manteniendo a 200 °C por 15 min, enfriamiento hasta temperatura ambiente (potencia 400–1800 W). Se realizaron blancos de reactivos de forma simultánea con las muestras.

La utilización de ácidos diluidos en la preparación de muestras asistidas mediante radiación microondas ha sido reportada con anterioridad por nuestro grupo de investigación. (Machado, Dol, Rodríguez-Arce, Cesio, & Pistón, 2016; Pistón, y otros, 2020; Rodríguez, Silva, laquinta, & Pistón, 2023).



Figura 16 Digestor asistido por radiación microondas, CEM Mars 6

Una vez finalizada la digestión asistida por microondas, se realizó el trasvase cuantitativo y se completó a un volumen final de 50,00 mL con agua ultrapura,

en esta etapa se ajustó el pH en caso de ser necesario. Esta disolución es la que se utilizó para las determinaciones (**Figura 17**).



Figura 17 Muestra luego de la digestión asistida por MW

Tratamiento asistido mediante ondas de ultrasonido (US)

Se realizó una extracción asistida por ondas de ultrasonido utilizando un baño de ultrasonido Cole Palmer 8893 y ácido nítrico diluido. Se pesaron 0,35 g de material de referencia certificado en un Erlenmeyer de vidrio de 25 mL, se colocaron 10 mL de ácido nítrico diluido y se realizó el tratamiento de ultrasonido. Luego se centrifugó a 1903 g por 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se le realizó una dilución al tercio de forma de adecuar el contenido de sólidos disueltos a los requerimientos del MP AES.

3.5 Sistema FI-MP AES utilizando fibra de sisal (*Agave sisalana*) como biosorbente, para el análisis de Cu y Mn

Sistema FI-MP AES utilizando fibra de sisal (*Agave sisalana*)

Se diseñó, construyó y optimizó un sistema de inyección en flujo (FI) para la preconcentración en línea y posterior determinación de Cu y Mn mediante espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (MP AES). El sistema consta de los siguientes componentes: una bomba peristáltica (Rainin Dynamx RP-1), tubos de Tygon, una válvula inyectora de 6 puertos con controlador electrónico (Valco Cheminert Instrument Co Inc), conectores de

Teflón PFA (0,8 mm diámetro interno). En la válvula inyectora se colocó una minicolumna de construcción en el laboratorio, empacada con fibra de sisal. En la **Figura 18** se presenta un esquema del sistema FI. El sistema es controlado por computadora mediante software creado en el laboratorio, escrito en Python™. El software controla la válvula inyectora, a través de un puerto serial (RS232), operando de forma automática durante las etapas de preconcentración y elución.

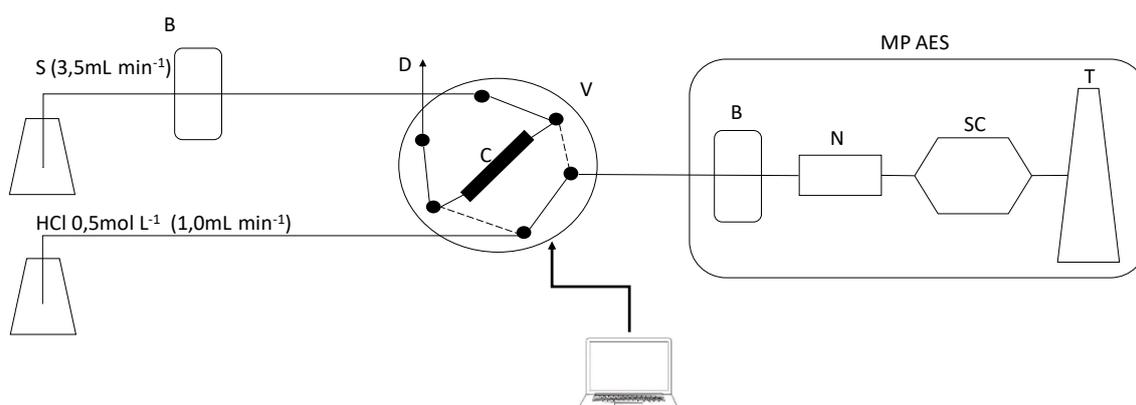


Figura 18 Sistema FI para la preconcentración en línea acoplada a MP AES (Extraído de Silva & Pistón, 2021)

B: bomba peristáltica; **V:** válvula inyectora de 6 puertos; **C:** minicolumna; **D:** descartador; **S:** muestra o estándar; **HCl:** ácido clorhídrico como eluyente; **N:** nebulizador; **SC:** cámara de nebulización and **T:** antorcha. Las líneas punteadas representan la posición durante la etapa de elución y las líneas continuas representan la etapa de preconcentración.

Como forma de compatibilizar el caudal de elución con el de de ingreso de muestra al MP AES, el sistema controla la elución mediante la bomba peristáltica incluida en el equipo.

Minicolumna de preconcentración

La minicolumna fue diseñada y construida en el laboratorio, mediante el empaquetado de un tubo de vidrio de 5 cm de longitud y 2,2 mm de diámetro interno, con 100 mg de fibra de sisal. De forma de evitar pérdida del material sorbente, se colocó una frita en los extremos de la minicolumna. El soporte fue

realizado mediante impresión 3D. La **Figura 19** muestra una imagen de la minicolumna.



Figura 19 Minicolumna empacada con fibra de sisal

La fibra de sisal (*Agave sisalana*) fue adquirida en un comercio de plaza, como Hilo sisal. Antes de empacar la minicolumna, la fibra fue tratada, según lo reportado previamente por dos Santos et al. El tratamiento consiste en un primer lavado con HNO₃ 10% v/v, y luego lavados sucesivos con agua ultrapura hasta un pH neutro, para luego secarla en estufa a 60 °C durante 12 horas (dos Santos, et al 2011b).

Adicionalmente, utilizando las mismas características constructivas (dimensiones, soporte, etc), que la utilizada para la minicolumna de fibra de sisal se contruyó una columna con cáscara de arroz como sorbente y otra con ceniza de cáscara de arroz (**Figura 20**). A la cáscara de arroz, suministrada por una industria arrocera de plaza, se le realizó el mismo tratamiento que a la fibra de sisal. La ceniza de cáscara de arroz utilizada se obtuvo a partir del residuo que se genera de la combustión controlada de la cáscara de arroz en una planta generadora de energía eléctrica y vapor de Uruguay. La muestra fue provista por dicha empresa en bolsa cerrada.

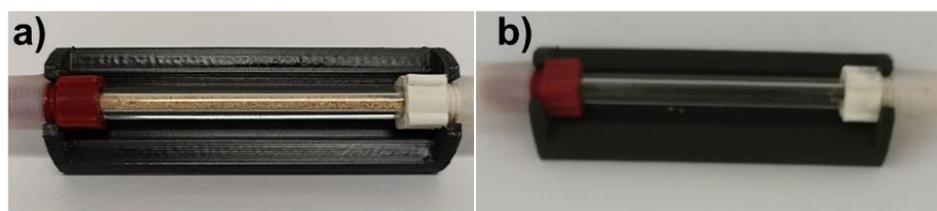


Figura 20 Minicolumna empacada con: a) cáscara de arroz; b) ceniza de cáscara de arroz

Optimización y procedimiento

Acoplar la preconcentración en línea con detección mediante una técnica de emisión atómica como MP AES, requiere una rigurosa sincronización entre la etapa de elución y la detección. Lo anterior es esencial para obtener datos precisos. El espectrómetro MP AES Agilent 4210 opera mediante un monocromador secuencial, modificando las condiciones de lectura para cada analito secuencialmente, demorando unos segundos entre cada medida, esto no implica un problema para análisis multielemental en modo *batch* o convencional. Ahora bien, al acoplar un sistema en flujo es necesario trabajar en modo *Time scan*, con lo cual los segundos que conlleva las modificaciones de las condiciones de lectura para cada analito causa imprecisión en los datos obtenidos. Como forma de mejorar el comportamiento relativo a la precisión y poder realizar determinaciones simultáneas, con lo cual se mejora la frecuencia de muestreo, se realizaron dos modificaciones en las condiciones de trabajo. Por un lado, se sincronizó la adquisición de datos del MP AES con la etapa de preconcentración mediante la utilización de software escrito en el laboratorio en lenguaje Python®, el cual se programó con el apoyo del Q.F. Juan C. Rodríguez (el **ANEXO II** muestra las líneas de código). Además, se disminuyó al mínimo posible la “pérdida” de tiempo entre las medidas.

La optimización de las condiciones operativas del sistema de preconcentración en línea y posterior determinación simultánea de Cu y Mn mediante MP AES (FI-MP AES) utilizando una minicolumna empacada con fibra de sisal comenzó con la evaluación de la incidencia del caudal de la línea de muestra o estándar en la señal analítica obtenida. A continuación mediante un diseño experimental multivariado del tipo central compuesto simplificado de tres variables a tres niveles (Massart, et al 1997) se evaluó la influencia de las variables: tiempo de preconcentración, pH y concentración de eluyente. En todos los casos el parámetro seleccionado para la evaluación fue la altura de pico (intensidad de la señal). En base al diseño experimental, las condiciones óptimas son: tiempo de preconcentración igual a 90 s, pH 5,5 y concentración de eluyente igual a 0,5 mol L⁻¹.

La preconcentración en línea para la posterior determinación simultánea de Cu y Mn consiste en una primera etapa de preconcentración de la muestra o estándar en la minicolumna por un lapso de 90 segundos. Luego mediante la conmutación de la válvula, controlada por software, por otros 90 segundos el eluyente (HCl 0,5 mol L⁻¹) libera los analitos y transporta los mismos hacia el MP AES (**Tabla 4 y Figura 21**). El software controla además el número de repeticiones de todo el proceso analítico para cada muestra o estándar. De esta forma se puede considerar un sistema automatizado para la preconcentración de muestra e introducción al plasma.

Tabla 4 Ciclo de preconcentración y elución, por triplicado

Posición de la válvula	Lapso tiempo (s)	Operación
carga	90	retención de analitos
elución	90	elución
carga	90	retención de analitos
elución	90	elución
carga	90	retención de analitos
elución	90	elución

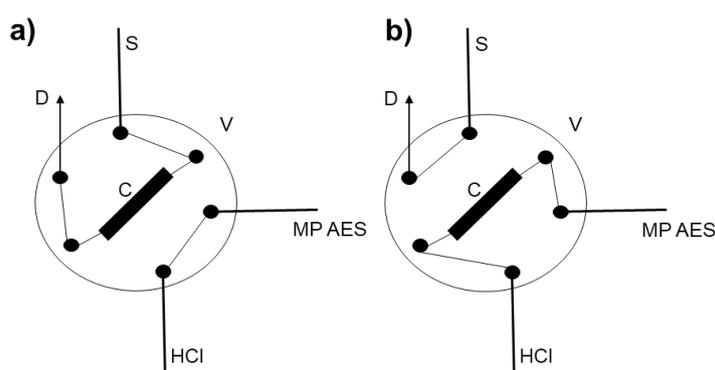


Figura 21 Posición de la válvula inyectora a) carga, b) elución

V: válvula inyectora de 6 puertos; **C:** minicolumna; **D:** descarte; **S:** muestra o estándar; **HCl:** ácido clorhídrico como eluyente.

Las determinaciones analíticas se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro de emisión atómica de plasma inducido por microondas Agilent 4210 con una

antorcha estándar, nebulizador inerte OneNeb2 y una cámara de nebulización ciclónica de vidrio. El instrumento opera con nitrógeno obtenido mediante un generador de nitrógeno Agilent 4107, el cual funciona con un compresor de aire Dürr Technik. Las condiciones de operación del plasma fueron flujo de gas 20 L min⁻¹ y el flujo de gas auxiliar 1,5 L min⁻¹. Los parámetros instrumentales se resumen en la **Tabla 5**, así como también el flujo de nebulización y la posición de lecturas, los cuales fueron optimizados utilizando una solución de 2 mg L⁻¹ de Cu y Mn. Las señales analíticas se obtuvieron en modo *Time scan* a 324,75 y 403,08 nm, para Cu y Mn respectivamente. Los datos generados se exportaron en formato csv y fueron procesados mediante la utilización del software Peak Simple™ (SRI, USA). El software dispone de herramientas de procesamiento de señal como suavizado, corrección de la línea de base y medición de la altura de pico (señal analítica).

Tabla 5 Parámetros instrumentales

Parámetro Instrumental	
Frecuencia de microondas (MHz)	2450
Potencia aplicada al plasma (Kw)	1,0
Tiempo de estabilización (s)	0
Corrección de fondo	Auto
Tiempo de lectura (s)	1
Replicados	3
Número de pixeles	3
Velocidad bomba MP AES (rpm)	35
Sistema de introducción de muestra	
Tiempo de toma de muestra (s)	0
Flujo de nebulización (L min ⁻¹)	0,9
Posición de lectura	10 (Cu); -10 (Mn)

Sistema FI-MP AES utilizando fibra de sisal (*Agave sisalana*) impregnada con AFB

de Souza Dias, et al reportan la utilización de la fibra de sisal (*Agave sisalana*) impregnada con fluoruro de alizarina azul (AFB) para la preconcentración en

batch de Cu (de Souza Dias, Bonsucesso, Oliveira, & dos Santos, 2012). En base a lo anterior se evaluó la posibilidad de emplear el sistema FI-MP AES desarrollado (**Figura 18**), pero utilizando una minicolumna empacada con fibra de sisal impregnada con AFB para la preconcentración en flujo y posterior determinación simultánea de Cu y Mn.

Minicolumna de preconcentración impregnada con AFB

Se construyó una minicolumna empacada con fibra de sisal (*Agave sisalana*), de iguales características a las descritas con anterioridad y se impregnó la fibra siguiendo los lineamientos reportados por de Souza Dias y colaboradores. La impregnación consistió en pasar a través de la columna una solución de AFB 0,01%, a un flujo de 10 mL min^{-1} durante 10 minutos luego de lo cual son llevados a cabo sucesivos lavados con soluciones $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ NaOH y $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ HNO₃ y finalmente enjuagues con agua ultrapura (de Souza Dias, Bonsucesso, Oliveira, & dos Santos, 2012). En la **Figura 22** se evidencia la impregnación del biosorbente.



Figura 22 Minicolumna, a) sin impregnar; b) impregnada con AFB

Optimización y procedimiento

Las determinaciones analíticas del sistema FI-MP AES que utiliza la fibra de sisal impregnada con AFB fueron realizadas en el equipo Agilent MP AES 4210 operando mediante las mismas condiciones del plasma y parámetros instrumentales (**Tabla 5**) con anterioridad mencionados para el sistema que utiliza la fibra sin impregnar. Las consideraciones antes realizadas para acoplar

de forma efectiva la preconcentración en línea con la detección mediante MP AES son igualmente válidas para este sistema. El procesamiento de datos se realizó utilizando las mismas herramientas informáticas.

La optimización de las condiciones operativas del sistema (tiempo de preconcentración y pH) se realizó a través de dos ensayos, mediante la utilización de una solución estándar de Cu y Mn, evaluando la altura de la señal analítica que se obtiene.

3.6 Determinación de Se en alimento para ganado mediante HG-MP AES

La determinación de Se en alimento para ganado se realizó mediante la técnica de generación de hidruros acoplada a espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (HG-MP AES), a la longitud de onda de 196,026 nm. Se utilizó un espectrómetro Agilent 4210 equipado con una antorcha estándar y cámara de nebulización multimodo (MSIS[®], Agilent) para la generación *in situ* del hidruro volátil y separación del mismo. En la **Figura 23** se presenta un esquema e imagen de la cámara utilizada.

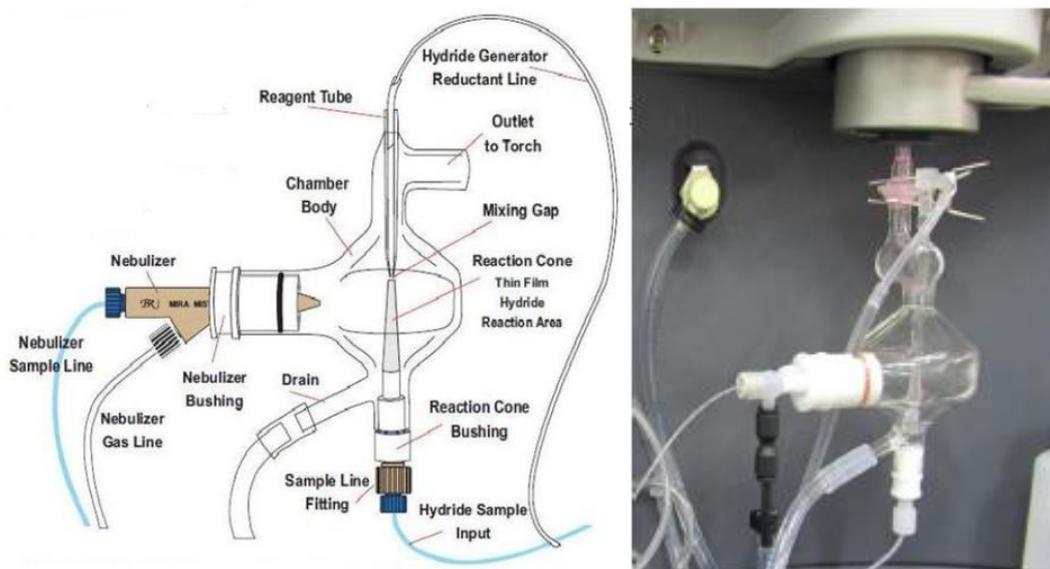


Figura 23 Cámara MSIS (Adaptado de Agilent Technologies, 2016)

Para la configuración de operación de la cámara MSIS se siguieron las recomendaciones del fabricante, así como también las optimizadas por Mikheev

et al (Mikheev, y otros, 2017) (Agilent Technologies, 2016). La **Figura 24** presenta un esquema de dicha configuración.

Los parámetros instrumentales se resumen en la **Tabla 6**, así como también el flujo de nebulización y la posición de lecturas, los cuales fueron optimizados utilizando una solución de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se.

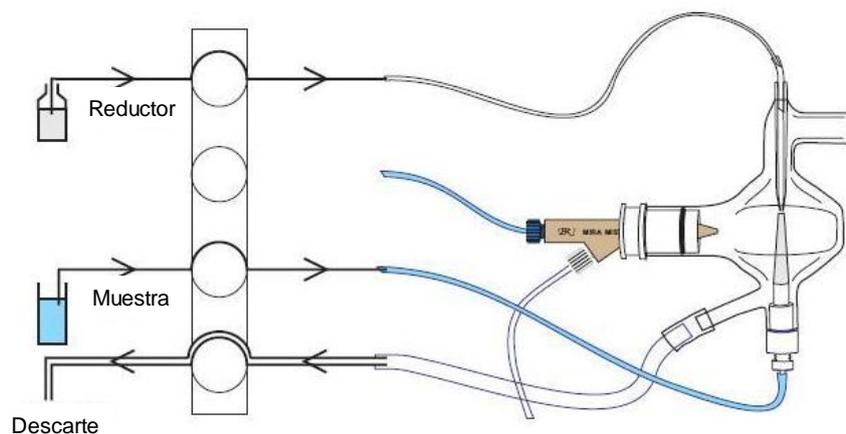


Figura 24 Configuración de operación de la cámara MSIS (Adaptado de Agilent Technologies, 2016)

Tabla 6 Parámetros instrumentales del acople HG-MP AES

Parámetro Instrumental	
Frecuencia de microondas (MHz)	2450
Potencia aplicada al plasma (Kw)	1,0
Tiempo de estabilización (s)	15
Corrección de fondo	Auto
Tiempo de lectura (s)	10
Replicados	3
Número de pixeles	3
Velocidad bomba MP AES (rpm)	30
Sistema de introducción de muestra	
Tiempo de toma de muestra (s)	5
Flujo de nebulización (L min ⁻¹)	0,9
Posición de lectura	-70

Previamente a la determinación se realizó una digestión asistida por microondas de igual manera que la descrita en el punto 3.4, con la diferencia que el volumen final fue de 15,00 mL.

3.6.1 Pretratamiento – Reducción química

Luego de culminada la digestión y previo a realizar la determinación analítica, se llevó a cabo una reducción química a efectos de convertir cuantitativamente todo el Se al estado de oxidación IV, para posteriormente formar el hidruro correspondiente. Lo anterior es debido a que el Se (IV) forma el H₂Se, no así el Se (VI) el cual es no reactivo (D'Uliv et al, 2011). Para llevar adelante la reducción química se tomaron 10 mL del digesto y se agregó HCl 37% (m/v) en una relación muestra/ ácido 1:1, en un Erlenmeyer de 50 mL. El Erlenmeyer junto con la mezcla se llevó a calentamiento en plancha calefactora durante 1 hora (a ebullición controlada) o hasta reducir el volumen a menos de 10 mL. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se llevó a un volumen de 10 mL con agua ultrapura, de forma tal de no agregar en el proceso una etapa de dilución adicional. El proceso antes mencionado fue realizado a las muestras, los estándares y así como también a los blancos (**Figura 25**).

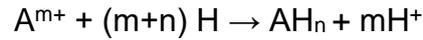
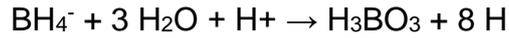


Figura 25 Fotografía del proceso de reducción química previa a la determinación

3.6.2 Reducción en línea y desarrollo

El siguiente paso para la determinación de Se mediante HG-MP AES es la generación del hidruro volátil de Se (H_2Se) utilizando borohidruro de sodio (NaBH_4) como reductor. La generación de hidruros se puede llevar a cabo en *batch*, o de manera alternativa, mecanizada o incluso automatizada empleando diferentes técnicas de flujo. Una forma simple de generar el hidruro en flujo es mediante análisis en flujo continuo, empleando una bomba peristáltica multicanal. La cámara multimodo MSIS junto con la bomba peristáltica del MP AES Agilent 4210 (**Figura 24**), permiten la determinación de Se mediante HG-MP AES en flujo continuo. La cámara MSIS cumple la función de reactor para generar el hidruro y a su vez oficia de separador de fases, de forma de separar el hidruro volátil (fase gaseosa) y transportar el mismo hasta la antorcha mediante del flujo de nitrógeno (gas *carrier*). En base a las recomendaciones del fabricante, así como también las optimizadas por Mikheev et al, como reductor se utilizó NaBH_4 2% (m/v) disuelto en NaOH 0,5 % (m/v) (Mikheev, y otros, 2017) (Agilent Technologies, 2016).

La reacción de formación de hidruros mediante la reducción con tetrahidroborato usualmente es llevada a cabo en medio de ácido clorhídrico. El hidrógeno atómico formado en la reacción de descomposición del BH_4^- reduce al analito al hidruro correspondiente según las siguientes reacciones generales (Dědina & Tsalev, 1995).



La **Figura 26** esquematiza el procedimiento general llevado a cabo para la determinación de Se mediante HG-MP AES.

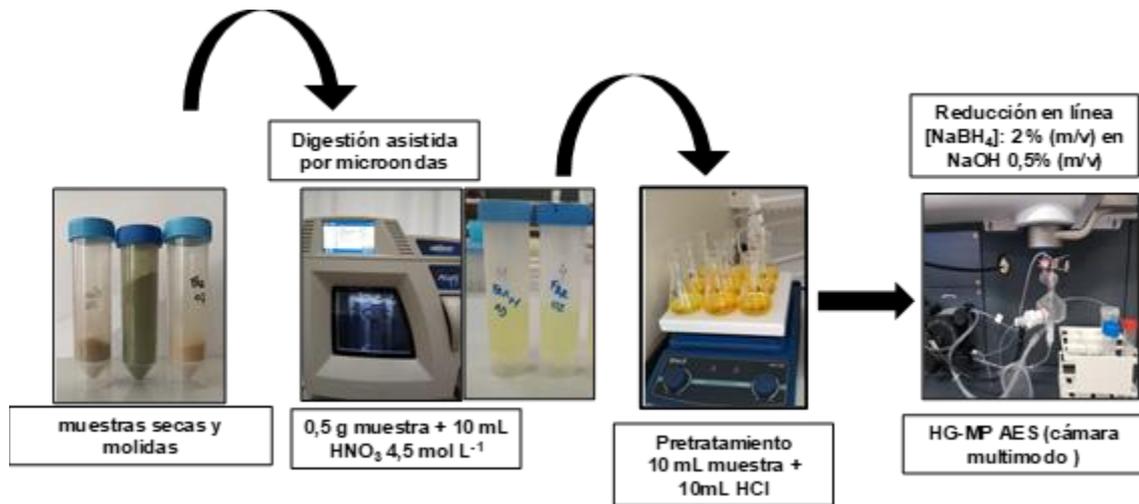


Figura 26 Esquema general para la determinación de Se mediante HG-MP AES

3.7 Análisis no destructivo: Determinación de Cu y Mn en alimento para ganado, mediante EDXRF

Tal como se mencionó antes en el punto 1.7, la EDXRF es una técnica espectroscópica no destructiva, multielemental, que permite la determinación cualitativa y cuantitativa de la composición elemental en forma directa sobre muestras sólidas. En base a esto se evaluó la aplicación de esta técnica para la determinación de Cu y Mn en muestras de pasturas y reservas forrajeras como una alternativa de análisis rápido, sencillo y sin pretratamiento de muestra, lo cual puede contribuir al abordaje de la QAV.

Las muestras secas y molidas se prensaron utilizando una prensa neumática de laboratorio de 20 bars, generando de esta forma *pellets* de 13 mm de diámetro, tal como se muestra en la **Figura 27**. Las determinaciones analíticas fueron realizadas en un espectrómetro EDXRF Shimadzu EDX-7200, equipado con una

fuelle de Rodio, irradiando las muestras a 50 kV, en atmósfera de aire, film de polipropileno, colimador de 5 o 10 mm, tiempo de medida 100 o 200 segundos y línea $K\alpha$, parámetros que se configuran en el software, como se evidencia en la **Figura 28** y una celda estándar de 31,6 mm (**Figura 29**). El método de parámetros fundamentales (FP), mediante el cual se realizó la cuantificación es un método semicuantitativo que es fuertemente afectado por la señal de fondo originaria de la matriz. Debido a esto, para realizar determinaciones cuantitativas de Cu y Mn se ajustó el método de parámetros fundamentales mediante la utilización de CRM de *Brachiaria Brizantha cv* (Marandu).



Figura 27 Proceso de confección de *pellets*

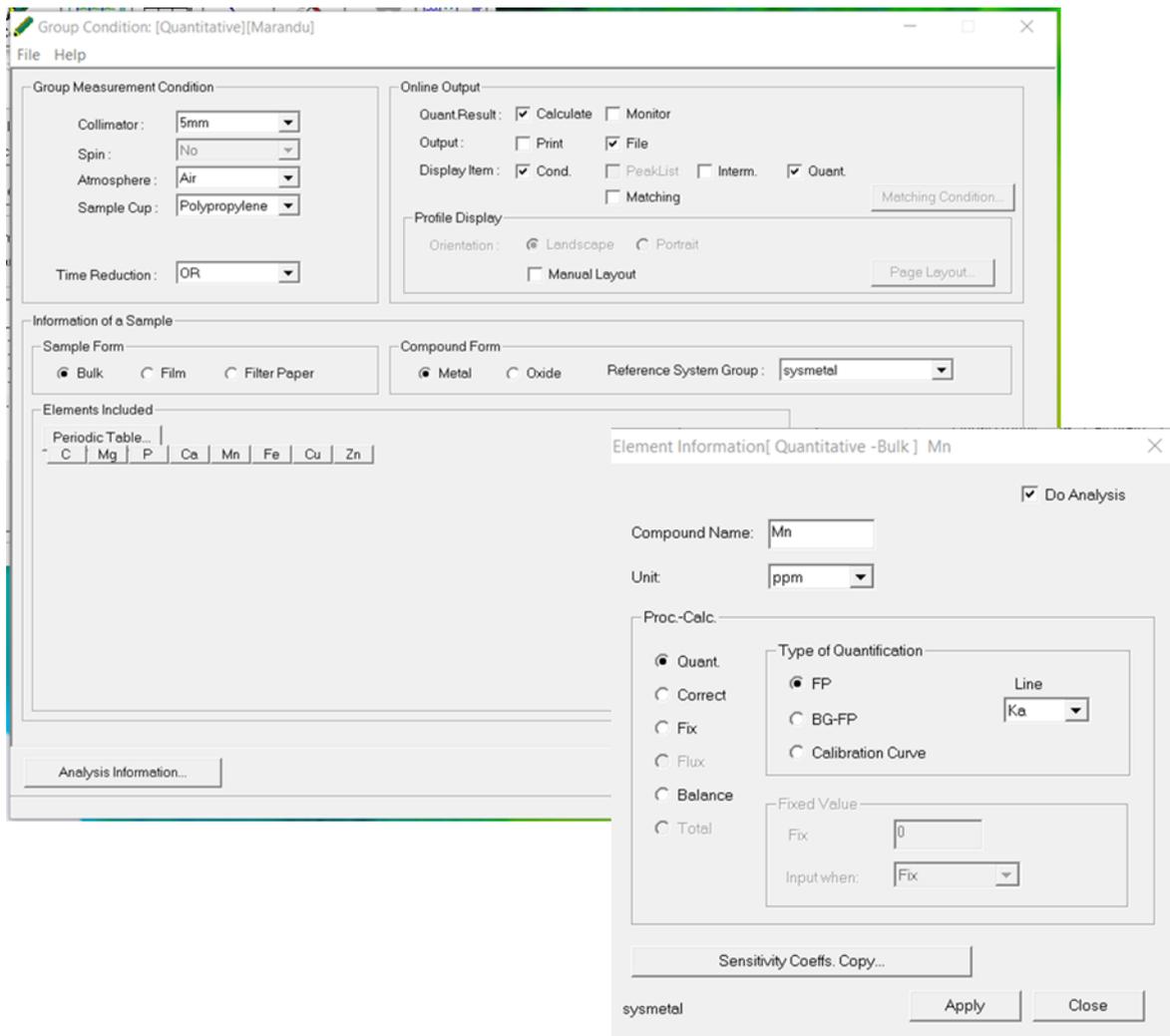


Figura 28 Pantalla del software de control PCE DX-Pro



Figura 29 Celda estándar para medidas de EDXRF

En la **Figura 30** se presenta el procedimiento general que se utilizó para realizar la determinación mediante EDXRF en muestras de pasturas y reservas forrajeras.

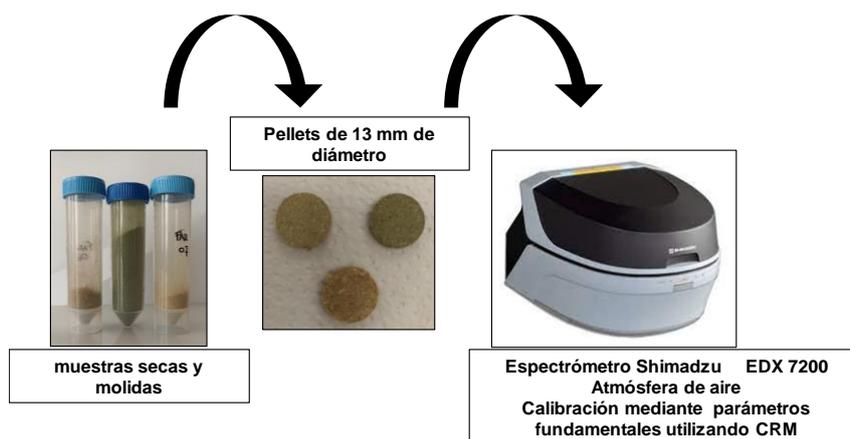


Figura 30 Esquema general para medidas mediante EDXRF

3.8 Herramientas métricas para el abordaje según la Química Analítica Verde

Desde que se propuso el concepto de desarrollar métodos analíticos para trabajar en acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde se han reportado una gran variedad de herramientas o métricas que permiten evaluar el “Greenness” de una metodología analítica. En el presente trabajo de tesis se seleccionaron *Analytical Eco-Scale* y AGREE. La selección se basó en 2 aspectos. Primeramente, ambas herramientas son de aplicación general a todo tipo de metodologías analíticas. Además, ambas son ampliamente utilizadas tal como se demuestra con la cantidad de artículos presentes en el portal Scopus (*Analytical Eco-Scale* (2024): 91; AGREE (2024): 52). De forma de generar una discusión crítica, GAPI se aplicó de forma evaluar la discrepancia observada en un caso en los resultados obtenidos entre *Analytical Eco-Scale* y AGREE.

Conjuntamente se aplicó el concepto de Química Analítica Blanca (QAB), concepto propuesto recientemente por Nowak et al, el cual posibilita un enfoque más integral u holístico de evaluación de una metodología analítica (Nowak, Wietecha-Posłuszny, & Pawliszyn, 2021).

Como forma de realizar una evaluación global de las metodologías analíticas propuestas y como un aporte adicional para la discusión crítica, se incorporó al presente trabajo de tesis, la herramienta BAGI recientemente publicada. (Manousi, Wojnowski, Płotka-Wasyłkac, & Samanidou, 2023)

3.8.1 Eco escala - *Analytical Eco-Scale*

En el año 2012, Galuszka y colaboradores propusieron lo que para esa época fue una nueva herramienta de evaluación del “verdor” o “*Greenness*” de una metodología analítica (*Analytical Eco-Scale*). La misma se basa en la asignación de puntos de penalización a ciertos parámetros de la metodología analítica que se encuentran en desacuerdo con los principios del ideal verde de una metodología. Los criterios de penalización dependen de factores como: peligrosidad y cantidad de reactivo, cantidad de muestra, consumo energético y generación de residuos entre otros. El concepto de *Analytical Eco-Scale* es que un análisis verde ideal posee un puntaje de 100, por ende, al comparar dos metodologías, la de mayor puntaje es la que se encuentra en mayor consonancia con los principios de la Química Analítica Verde (QAV) (Galuszka, Konieczka, Migaszewski, & Namieśnik, 2012).

Una vez realizada la asignación de puntos de penalización, los mismos se suman y se realiza el siguiente cálculo.

$$\textit{Analytical Eco-Scale} = 100 - \text{Puntos de penalización (PP) totales}$$

El puntaje obtenido se compara con la escala mencionada a continuación:

>75 representa una metodología analítica verde excelente

>50 representa una metodología analítica verde aceptable

<50 representa una metodología analítica inadecuada

En el caso de reactivos o solventes la asignación de los puntos de penalización (PP) se basa en el Sistema Global Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA). En dicho sistema los peligros de un producto químico son identificados mediante un pictograma acompañado con la palabra Peligro o Advertencia, dependiendo de la severidad del peligro. En base a lo anterior los puntos de penalización (PP) se asignan, en base a los puntajes establecidos en la **Tabla 7**, con la siguiente ecuación:

Reactivo o Solvente $PP = N^{\circ}$ de pictogramas * Nivel de riesgo (Peligro o Advertencia) * Cantidad de sustancia.

La asignación de los puntos de penalización (PP) para los residuos contempla tanto la cantidad de residuo generado, así como también el tratamiento necesario para la correcta gestión de este.

Tabla 7 Puntos de penalización para el cálculo según *Analytical Eco-Scale*

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

Los PP se asignan a cada una de las categorías de peligro de cada reactivo. Cada reactivo puede tener más de un peligro, por lo que el valor sub-total de PP de un reactivo puede ser mayor a 2. (Adaptado de Gałuszka, Konieczka, Migaszewski, & Namieśnik, 2012).

3.8.2 AGREE y AGREEprep

Analytical Greenness Metric Approach (AGREE) es una herramienta métrica, sencilla de evaluación del “Greenness” de una metodología analítica, propuesta por Pena-Pereira et al. La misma asigna un valor en la escala 0-1 a cada uno de los 12 principios de la Química Analítica Verde (SIGNIFICANCE). Como resultado se obtiene un pictograma que indica la puntuación final del desempeño verde de la metodología analítica. La puntuación se muestra en el centro de un pictograma, si este valor es cercano a uno, entonces el color es verde oscuro y el método es más verde, tal como se ejemplifica en la **Figura 31** (Pena-Pereira, Wojnowski, & Tobiszewski, 2020). La **Tabla 8** indica los puntos evaluados en AGREE.

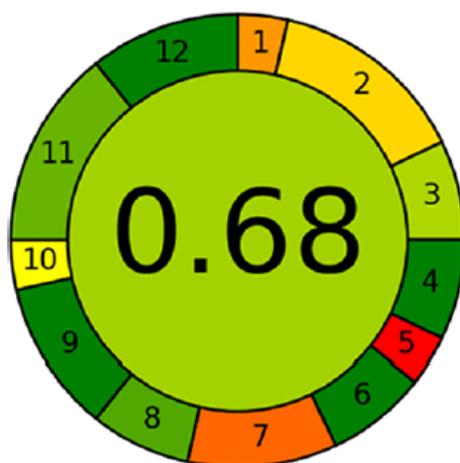


Figura 31 Ejemplo de pictograma obtenido mediante AGREE (Extraído de Pena-Pereira, Wojnowski, & Tobiszewski, 2020).

Tabla 8 Principios Evaluados con AGREE

	Principio
1	Procedimiento de muestreo
2	Cantidad de muestra
3	Posicionamiento del dispositivo
4	Número de etapas de pretratamiento de muestra
5	Automatización/Miniaturización
6	Agente Derivatizante
7	Descartes
8	Frecuencia analítica
9	Consumo energético
10	Origen de los reactivos
11	Toxicidad
12	Seguridad personal

(Adaptado de Pena-Pereira, Wojnowski, & Tobiszewski, 2020).

Como herramienta métrica para evaluar el “*Greenness*” de una metodología analítica, AGREE presenta ciertas ventajas las cuales se mencionan a continuación:

- Integral: incorpora la evaluación de los 12 principios de QAV
- Intuitiva: mediante el número y color central del pictograma es fácil de realizar la interpretación, permitiendo además identificar las fortalezas y debilidades de la metodología
- Rápida: mediante un software de acceso web es posible realizar la evaluación en unos pocos minutos
- Subjetiva, requiere de experiencia y conocimiento por parte del usuario

Ahora bien, en un proceso analítico, la etapa de preparación de muestras es un paso crítico, esencial para separar o preconcentrar el analito, eliminar o minimizar interferencias de la matriz, y compatibilizar el estado de agregación de la muestra con la técnica de medición, entre otros objetivos. Así mismo la etapa de preparación de muestra ha sido identificada como la etapa más crítica y relevante desde el punto de vista de la QAV, principalmente debido a entre otras la utilización de solventes, reactivos y gran consumo energético que implica la

etapa en cuestión en el proceso analítico (Armenta, Garrigues, Esteve-Turrillas, & de la Guardia, 2019; Tobiszewski, Mechlińska, Zygmunt, & Namieśnik, 2009; Namieśnik & Szefer, 2008; Koel, 2016). Por esta razón el primer principio de la QAV sugiere evitar la preparación de muestras y anteponer el uso de técnicas analíticas directas. Actualmente es posible realizar medidas directas en campo o *in situ* mediante Raman, espectrometría de infrarrojo cercano (NIR) o espectrometría de fluorescencia de rayos X de energía dispersiva (EDXRF), utilizando equipamiento portátil. Sin embargo, es limitada la posibilidad de utilizar técnicas directas de medición en todos los campos de aplicación de la Química Analítica. Debido a lo anterior la etapa de preparación de muestras implica grandes desafíos para afrontar el abordaje de la QAV. Usualmente el abordaje de la QAV o evaluación de los métodos de preparación de muestras se realiza mediante alguna de las métricas con anterioridad mencionadas (basadas en los 12 principios de la QAV), lo que conlleva a resultados inadecuados debido a los parámetros que influyen en el “*Greenness*” de la preparación de muestras. En particular la etapa de preparación de muestra tiene de acuerdo con el principio N°1 de la QAV connotaciones negativas (Aplicación de técnicas analíticas directas de forma de evitar el tratamiento de muestra). Por tal motivo Wojnowski et al propusieron en 2022 la herramienta métrica AGREEprep que permite el abordaje de la QAV con foco en la etapa de preparación de muestras. La misma se basa en la evaluación de 10 principios mediante una escala de 0-1. Al igual que para AGREE, en AGREEprep se obtiene un pictograma que indica en el centro la puntuación final correspondiente al “*Greenness*” de la preparación de muestras de la metodología analítica, si este valor es cercano a uno, entonces el color es verde oscuro y el método es más verde, como se muestra en la **Figura 32** (Wojnowski, Tobiszewski, Pena-Pereira, & Psillakis, 2022). A continuación, se enumeran los 10 principios que se evalúan con AGREEprep.

1. Favorecer la preparación de muestras *in situ*
2. Utilizar disolventes y reactivos más seguros
3. Apuntar a materiales sostenibles, reutilizables y renovables
4. Minimizar el desperdicio
5. Minimizar las cantidades de muestra, productos químicos y materiales
6. Maximizar el rendimiento de las muestras

7. Integrar pasos y promover la automatización
8. Minimizar el consumo de energía
9. Elegir la configuración de análisis post-preparación de muestra más verde posible
10. Garantizar procedimientos seguros para el operador

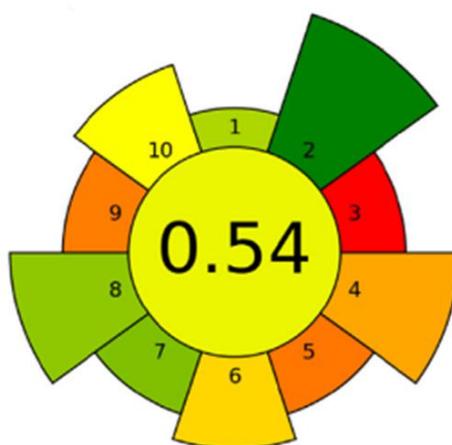


Figura 32 Ejemplo de pictograma obtenido mediante AGREEprep (Extraído de Wojnowski, Tobiszewski, Pena-Pereira, & Psillakis, 2022).

De igual forma que para AGREE, la evaluación mediante AGREEprep se puede realizar utilizando un software, el cual facilita tanto el ingreso de datos como la interpretación de los resultados.

3.8.3 Índice Verde de Procedimiento Analítico (GAPI)

El Índice Verde de Procedimiento Analítico (del inglés GAPI) es una herramienta métrica más de evaluación del “verdor” o “*Greenness*” de una metodología analítica. El resultado de la evaluación se presenta mediante una imagen compuesta de 5 pentágonos los cuales mediante color verde, amarillo o rojo permiten evaluar o cuantificar el impacto ambiental de la metodología analítica. Cada uno de los 5 pentágonos evalúa un aspecto diferente de la metodología analítica, como ser la preparación de muestras, reactivos y consumibles, muestreo, conservación y transporte, instrumentación y tipo de método (**Figura 33**). De esta forma es posible conocer cuál de las etapas de la metodología es la más crítica desde el punto de vista de la QAV (Płotka-Wasyłka J., 2018).

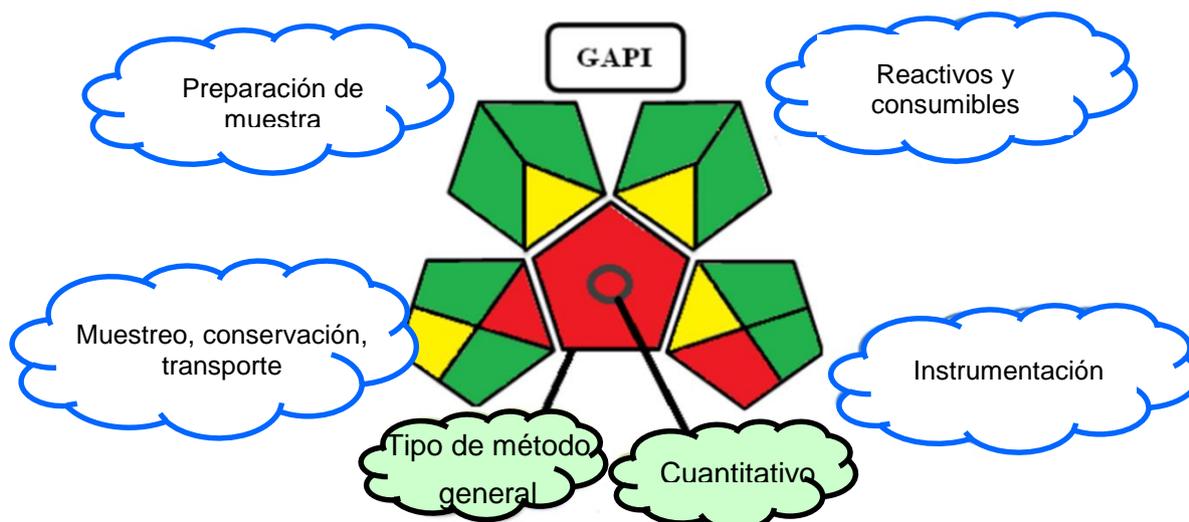


Figura 33 Ejemplo de pentágonos obtenidos mediante GAPI (Adaptado de Płotka-Wasyłka J., 2018).

3.8.4 Química Analítica Blanca

La QAV o el “Greenness” de una metodología analítica, nos indica el impacto sobre el medioambiente y la salud de las personas de una metodología analítica en particular, pero no hace referencia a su utilidad. Escaso sentido tiene evaluar el “Greenness” de una metodología analítica si la misma carece de utilidad. El concepto de Química Analítica Blanca (QAB) propuesto por Nowak et al, es una extensión de la Química Analítica Verde (QAV), propone los 12 principios de la QAB como principios alternativos a los 12 ya conocidos de la QAV. Además de los aspectos ecológicos (verde) la QAB tiene en consideración otros aspectos claves de un método analítico, criterios analíticos (rojo) y prácticos (azul). Según el modelo RGB de los colores, la mezcla de un haz de luz rojo, verde y azul da la impresión de color blanco, de acuerdo a lo anterior un método blanco muestra atributos analíticos, ecológicos y prácticos. La blancura se puede cuantificar basándose en la evaluación de 12 principios individuales. Para establecer los 12 principios de la QAB Nowak y colaboradores proponen 4 principios verdes (criterios ecológicos), 4 principios rojos (criterios de eficiencia analítica) y por último 4 principios azules (criterios económicos y prácticos). La evolución completa del método con las reglas propuestas se expresa mediante un parámetro cuantitativo denominado blancura, el cual es una medida de cómo se adapta el método analítico a la aplicación establecida. La QAB realiza una evaluación más holística del método analítico al incluir aspectos de funcionalidad

y calidad (Nowak, Wietecha-Postuszny, & Pawliszyn, 2021). En la **Tabla 9** muestran los 12 principios de QAB.

Tabla 9 12 Principios de la Química Analítica Blanca

Color	Principio
Verde	
V1	Toxicidad de los reactivos
V2	Número y cantidad de reactivos y descartes
V3	Consumo de Energía
V4	Impacto directo (seguridad, uso de animales, GMO)
Rojo	
R1	Alcance de aplicación
R2	LD y LC
R3	Precisión
R4	Veracidad
Azul	
A1	Costo –eficiencia
A2	Costo-tiempo
A3	Requerimientos
A4	Simplicidad operativa

(Adaptado de Nowak, Wietecha-Postuszny, & Pawliszyn, 2021).

En la **Figura 34** se presenta un resultado de una evaluación mediante QAB de forma de ejemplificar como se visualiza el mismo.

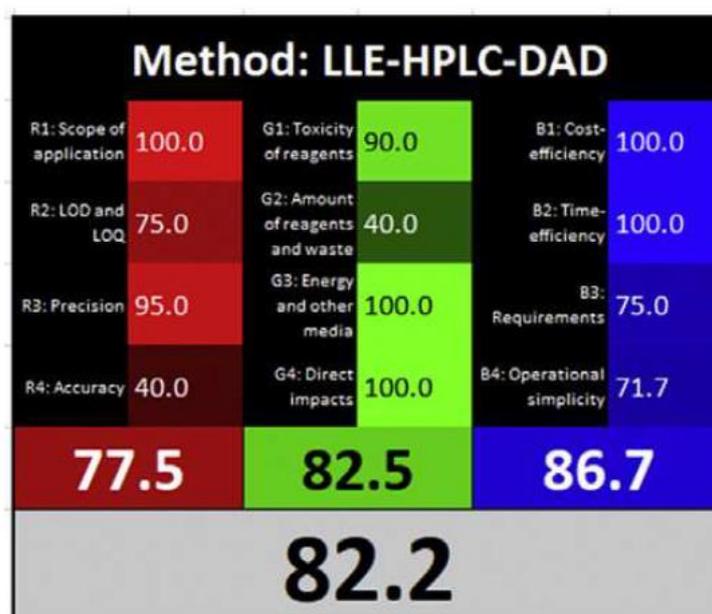


Figura 34 Ejemplo del resultado obtenido mediante QAB
(Extraído de Nowak, Wietecha-Posłuszny, & Pawliszyn, 2021).

3.8.5 Índice Azul del Grado de Aplicabilidad

El índice Azul del Grado de Aplicabilidad, (BAGI), es una herramienta métrica sencilla, propuesta en 2023 por Manousi et al para evaluar la practicidad de un método analítico. BAGI es una herramienta complementaria a las herramientas de evaluación del “Greenness”, con anterioridad mencionadas, se enfoca en el principio Azul de QAB, que está relacionado con aspectos prácticos o de aplicabilidad de una metodología analítica. BAGI se basa en la evaluación de 10 criterios, la cual da como respuesta un pictograma y una puntuación que describe la practicidad de un método analítico (**Figura 35**). Utiliza una escala de color azul, desde el azul oscuro al blanco (azul oscuro, azul, azul claro y blanco) para demostrar un cumplimiento alto o nulo del método analítico evaluado en relación a los 10 criterios de BAGI (Manousi, Wojnowski, Płotka-Wasyłkac, & Samanidou, 2023). En la **Tabla 10** se muestra los 10 criterios y la escala de evaluación de los mismos. Los criterios 1 a 3 se enfocan en las etapas de la determinación analítica, los criterios 4 y 5 se corresponden con la preparación de muestras, mientras que los criterios 6 a 10 evalúan ambas etapas.

Al igual que para otras herramientas métricas con anterioridad mencionadas, la evaluación mediante BAGI se puede realizar a través de software libre. El mismo facilita el ingreso de datos y genera el pictograma y la puntuación final mostrada en el centro del pictograma, proporcionado un medio para una sencilla evaluación e interpretación de los resultados. De esta forma, BAGI se puede utilizar para comparar el desempeño de diferentes métodos analíticos (el grado Azul), así como también para identificar fortalezas y debilidades, en lo relativo a la practicidad, de un método. Como criterio general, un método es considerado Azul o práctico si posee 60 o más puntos (Manousi, Wojnowski, Płotka-Wasyłkac, & Samanidou, 2023).



Figura 35 Ejemplo de pictograma obtenido mediante BAGI
(Extraído de Manousi, Wojnowski, Płotka-Wasyłkac, & Samanidou, 2023).

Tabla 10 Criterios de BAGI y escala de evaluación

Criterio	Azul oscuro	Azul	Azul claro	Blanco
1 Tipo de análisis	Cuantitativo y confirmatorio	Cuantitativo	<i>Screening</i>	Cualitativo
2 Análisis multi o unielemental	Multielemental >15 analitos	Multielemental 6-15 analitos	Multielemental 2-5 analitos	Un analito
3 Técnica analítica	Instrumentación simple/portátil	Instrumentación simple disponible comúnmente	Instrumentación sofisticada	Instrumentación no comúnmente disponible
4 Preparación de muestra simultánea	>95	13-95	2-12	1
5 Preparación de muestras	No requiere	Simple, de bajo costo	Miniaturizada	Preparación en varios pasos
6 Muestras por hora	>10	5-10	2-4	≤1
7 Reactivos y materiales	Reactivos comerciales disponibles usualmente	Reactivos comerciales no disponibles usualmente	Reactivos sintetizados en el laboratorio	Reactivos sintetizados en el laboratorio con equipamiento avanzado
8 Preconcentración	No requiere	Requiere	—	Preconcentración de varias etapas
9 Grado de automatización	Automatizado con tecnología novedosa	Semi-automatizado	Semi-automatizado con dispositivos no usuales	Análisis y tratamiento manual
10 Cantidad de muestra	≤100 µL (mg)	101-500 µL (mg)	501-1000 µL (mg)	>1000 µL (mg)

(Adaptado de Manousi, Wojnowski, Płotka-Wasyłkac, & Samanidou, 2023).

CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados relativos a la preconcentración en flujo de Cu y Mn que se presentan en este capítulo se obtuvieron en el marco de un proyecto financiado bajo mi responsabilidad por la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) modalidad Iniciación, convocatoria 2019, titulado *Desarrollo de un método analítico para la determinación de cobre y manganeso en muestras agrícola-ganaderas mediante técnicas acopladas con espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MP AES)*.

4.1 Tratamientos de muestras

4.1.1 Validación – tratamiento asistido mediante radiación microondas (MW)

Tal como se mencionó antes en el punto 3.4, el objetivo del tratamiento de muestras, en este caso asistido mediante radiación microondas, es contener los analitos en una fase líquida compatible con la técnica de determinación.

La digestión asistida por microondas fue evaluada mediante ensayos de recuperación sobre material de referencia certificado de material vegetal *Brachiaria Brizantha cv* (Marandu), RM-Agro E1001a o SRM 1567^a *Wheat Flour* (harina de trigo). La precisión se evaluó mediante el cálculo de la desviación estándar relativa porcentual (%RSD). Las determinaciones se realizaron mediante espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (MP AES) para Cu y Mn o HG-MP AES para el caso del Se.

En el caso del Cu y Mn se obtuvieron los siguientes resultados: Cu %R= 110 y Mn %R=107 (promedio, n=4). Para evaluar la precisión se calculó la desviación estándar relativa porcentual (%RSD, n=4) resultando los siguientes resultados %RSD=10 y 15% para el Cu y Mn respectivamente.

Para la veracidad, en el caso de la determinación de Se se obtuvo un %R=102

(promedio, n=4) y la precisión fue de %RSD= 2,6 (n=4).

Para todos los casos, los resultados que se obtuvieron son adecuados de acuerdo a los criterios establecidos por la AOAC (AOAC, 2019) y la “Trompeta de Horwith” (Horwitz & Albert, 2006).

4.1.2 Optimización – tratamiento asistido mediante ondas de ultrasonido (US)

En general y de acuerdo a la bibliografía, la utilización de US en el tratamiento de muestras no solo acorta los tiempos de operación, sino que disminuye el consumo energético y utiliza menor cantidad de solventes o reactivos, como por ejemplo ácidos minerales, características ventajosas para el abordaje de la QAV (Machado, Faccio, & Pistón, 2019; Bendicho et al, 2012). Además, la posibilidad de utilizar para la extracción, menor cantidad de ácido o en menor concentración, resultaría (en caso de ser necesario) en un ajuste de pH más sencillo.

En base a todo lo anterior, se decidió explorar la posibilidad de realizar un tratamiento de muestras asistido mediante US para la extracción simultánea de Cu y Mn presente en pasturas y reservas forrajeras. Se comenzó realizando un diseño experimental multivariado (Central compuesto de 2 variables y 3 niveles), de forma de evaluar la incidencia del tiempo de extracción y de la concentración de ácido nítrico utilizado (Massart, et al 1997). Los ensayos del diseño experimental se realizaron en un baño de ultrasonido Cole Palmer 8893, operando a 47 kHz, del cual se conoce con anterioridad las posiciones de mayor cavitación **Figura 36**, sobre CRM *Brachiaria Brizzantha* cv. El punto central corresponde con una concentración de HNO₃ 2,8 mol L⁻¹ (el cual se corresponde con la mitad de la concentración de ácido utilizado en los tratamientos asistidos mediante MW) y 15 min de tiempo de extracción. Para los ensayos se pesó 0,35 g de CRM en un Erlenmeyer de vidrio de 25 mL, se le colocó 10 mL de HNO₃ de la concentración correspondiente al diseño y se les realizó el tratamiento de US por el tiempo indicado en la **Tabla 11**, colocando los matraces de acuerdo a lo que se muestra en la **Figura 36**. Luego se centrifugó a 1903 g durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se le realizó una dilución al tercio, para adecuar el contenido de STD a los requerimientos del MP AES. Los resultados

se evaluaron de acuerdo al %R obtenido.



Figura 36 Muestras ubicadas en el cuadrante de mayor eficiencia de cavitación

Tabla 11 Condiciones y resultados del diseño experimental

Exp#	[HNO ₃] (mol L ⁻¹)	Tiempo de sonicado (min)	%R (Cu)	%R (Mn)
1	1,4	10	103	94
2	1,4	20	110	95
3	2,8	15	102	93
4	4,5	10	99	86
5	4,5	20	92	86

De los resultados obtenidos (**Tabla 11**) se desprende que con las primeras tres condiciones experimentales se obtienen %R adecuados. En base a esto se decidió continuar con las condiciones del experimento #1, debido a que es la condición que insume menos tiempo de sonicación y utiliza HNO₃ más diluido. En base a lo optimizado, el procedimiento de extracción es el siguiente:

Pesar 0,35 g de muestra seca y molida en un Erlenmeyer de 25 mL, agregar 10 mL de HNO₃ 1,4 mol L⁻¹, realizar la extracción durante 10 min, luego centrifugar a 1903 g por 10 min.

A partir de los resultados de %R obtenidos del diseño experimental anterior, se desprende que las condiciones óptimas son las menos drásticas en cuanto a la concentración de HNO₃. Por tal motivo se tomó la decisión de realizar un nuevo

diseño experimental de forma de evaluar si es posible disminuir aún más la concentración de HNO₃. Este segundo diseño planteó concentraciones de HNO₃ en el rango de 0,1 a 0,5 mol L⁻¹ (**Tabla 12**).

Tabla 12 Condiciones del segundo diseño experimental

Exp#	[HNO ₃] (mol L ⁻¹)	Tiempo de sonicado (min)
1	0,10	10
2	0,10	30
3	0,25	20
4	0,50	10
5	0,50	30

Con las condiciones del segundo diseño experimental, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios en cuanto al %R de Cu. Además, debido al contenido de carbono residual en las extracciones asistidas por US y su incompatibilidad con las determinaciones mediante MP AES, no se continuó trabajando con esta estrategia de tratamiento de muestras. Para posteriores ensayos se continuó trabajando con digestión asistida mediante MW como tratamiento de muestra.

Igualmente, el procedimiento de extracción asistida mediante US con las condiciones optimizadas (HNO₃ 1,4 mol L⁻¹ y 10 min de extracción) durante el primer diseño experimental (**Tabla 11**) se puede evaluar para ser utilizado en determinaciones analíticas realizadas mediante FAAS.

4.2 Sistema FI-MP AES

Utilizando a modo de *manifold* el sistema FI-MP AES diseñado y construido (**Figura 18**) o el sistema FI-FAAS, se ensayaron las minicolumnas con los tres biosorbentes seleccionados (fibra de sisal, cáscara de arroz y ceniza de cáscara de arroz).

La **Figura 37** representa el flujograma o registro de la señal que se obtiene para una solución estándar de 0,1 mg L⁻¹ de Cu y Mn, al utilizar el sistema FI-MP AES con la minicolumna de cáscara de arroz. En el mismo se observa por un lado

que los analitos quedan retenidos en el biosorbente y luego es posible eluir los mismos mediante HCl 0,5 mol L⁻¹. Además, al observar con detenimiento es posible notar que el tiempo necesario para un ciclo de elución es mayor en los últimos 3 picos. Una posible causa, es de índole mecánico o hidráulico, con el correr de los ciclos de carga/elución, la cáscara de arroz se fue hinchando lo cual dificulta el pasaje de la fase móvil a través de la minicolumna, aumentando de esta forma el tiempo de elución. Lo anterior se verificó al medir el caudal de la línea de elución y observar que el mismo disminuyó. Por este motivo no se continuó trabajando con la cáscara de arroz como biosorbente para el empaquetamiento de minicolumnas.

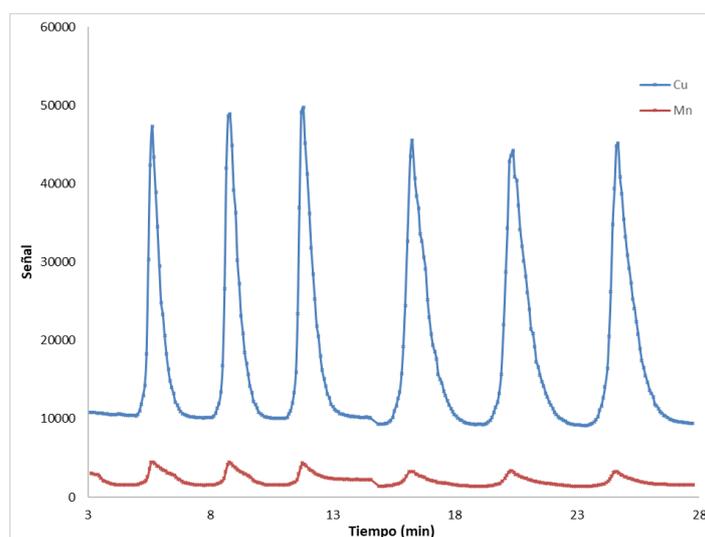


Figura 37 Flujograma para Cu y Mn - cáscara de arroz

Debido a la pequeña granulometría de la ceniza de la cáscara de arroz, la minicolumna construida con este sorbente, se ensayó mediante el sistema FI- FAAS, debido al riesgo de oclucionar el nebulizador del MP AES. Se comenzó evaluando la incidencia del tiempo de preconcentración, utilizando una solución estándar de 0,5 mg L⁻¹ de Cu y Mn. En la **Figura 38** se presentan los resultados obtenidos, razón por la cual se prosiguió trabajando con un tiempo de preconcentración igual a 90 s. Los estudios continuaron evaluando el efecto del pH, pero se observó que la respuesta o eficiencia de preconcentración disminuye luego de aproximadamente 20 ciclos de, lo cual se considera poco, razón por la cual se decide no continuar trabajando con este sorbente.

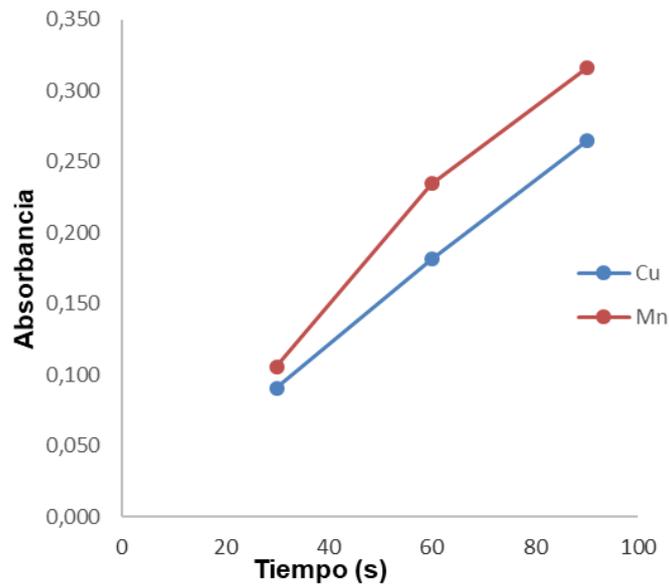


Figura 38 Efecto del tiempo de preconcentración

A continuación, para lo que resta del presente trabajo de tesis se continuó trabajando solamente con la fibra de sisal como biosorbente para el empaquetamiento de minicolumnas.

4.2.1 Optimización y validación del sistema - fibra de sisal (*Agave sisalana*)

Una vez diseñado y construido el sistema de preconcentración en flujo de Cu y Mn y posterior determinación mediante MP AES (FI-MP AES) (**Figura 39**) es necesario optimizar el mismo. Realizar el acoplamiento *in house* de diferentes técnicas implica estudiar en profundidad las características de cada una, de forma de lograr compatibilizar las mismas. En el caso del acople propuesto es esencial una rigurosa sincronización de la etapa de elución y la detección de forma de obtener datos precisos La **Figura 40** evidencia el comportamiento impreciso de la señal analítica que se obtiene para un estándar de Cu y Mn de 2 mg L^{-1} antes de sincronizar y optimizar las condiciones del acople.

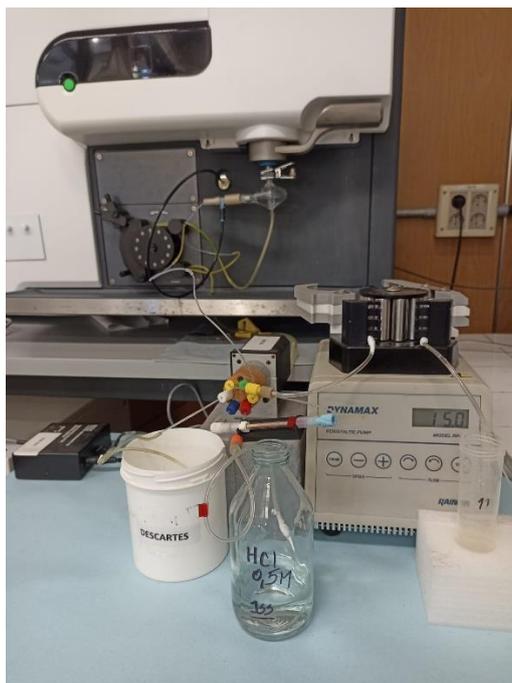


Figura 39 Sistema FI- MP AES construido

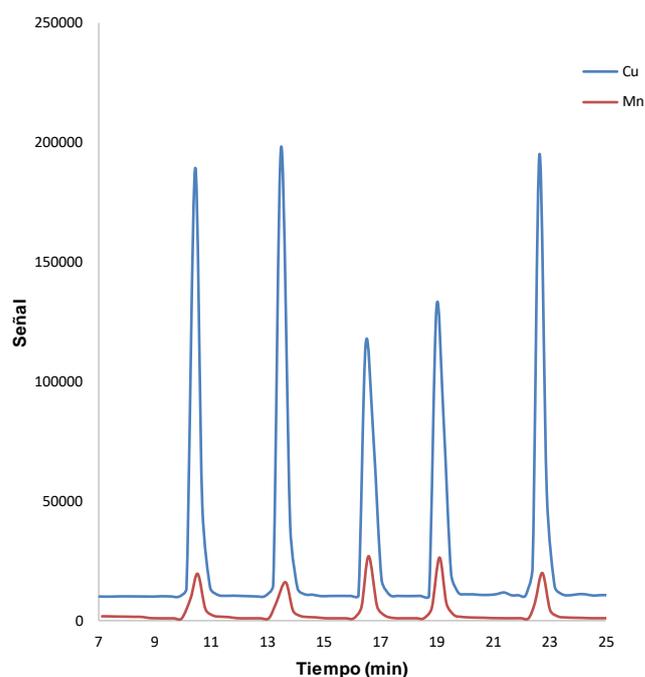


Figura 40 Registro de la señal correspondiente a un estándar de 2 mg L^{-1} de Cu y Mn

Para mejorar el comportamiento de la señal analítica en lo relativo a la precisión se realizaron modificaciones en la forma de trabajo, tal como se mencionó con anterioridad. Primero se realizó la sincronización mediante software de la etapa de elusión y la adquisición en modo *Time scan* del MP AES. Luego se optó por un compromiso en las condiciones óptimas operativas del MP AES y las

seleccionadas (**Tabla 13**), de forma de disminuir al mínimo posible el tiempo entre medidas, al ser el MP AES un equipo de adquisición de datos de forma secuencial. Para lo cual no se seleccionó trabajar en las condiciones óptimas de flujo del nebulizador sino en unas condiciones intermedias e iguales para ambos analitos de forma tal que no exista demora entre las medidas al no tener que modificarse las condiciones (**Figura 41** y **Figura 42**). De esta forma se logró compatibilizar las condiciones instrumentales con la determinación simultánea de ambos analitos mejorando notoriamente la precisión. Antes de la sincronización y optimización del acople la precisión, (%RSD) se encontraba cercano al 20% para ambos analitos (**Figura 40**), pero al solucionar las limitaciones mencionadas, la mejora fue de relevancia. Se alcanzan valores de %RSD mejores al 5% en muestras adicionadas a bajos niveles de concentración. La **Figura 43** muestra el registro de la señal simultánea para Cu y Mn en modo *Time scan* para tres estándares y tres muestras, cada uno por triplicado, evidenciando la mejora alcanzada en la precisión.

Tabla 13 Condiciones operativas del MP AES

	Condiciones óptimas de operación		Seleccionadas en el método propuesto	
	Cu	Mn	Cu	Mn
Posición de lectura	10	-10	10	-10
Flujo del nebulizador (L min ⁻¹)	0,65	0,95	0,90	0,90

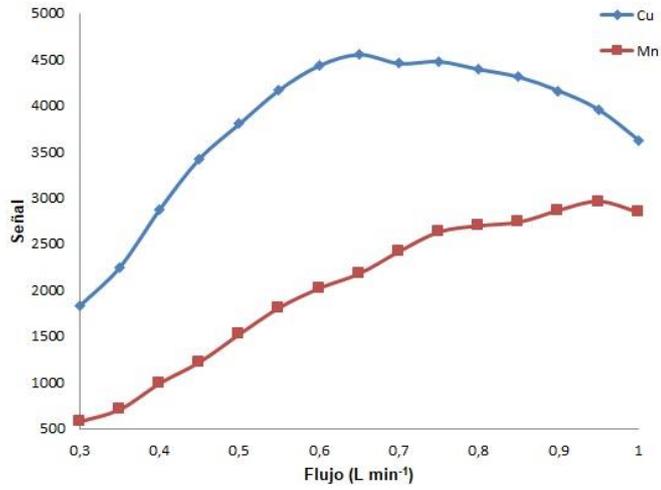


Figura 41 Optimización del Flujo del nebulizador

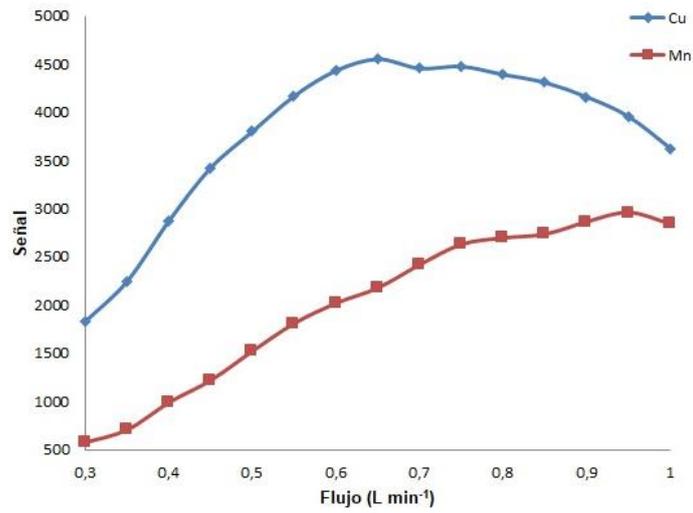


Figura 42 Optimización de la Posición de lectura

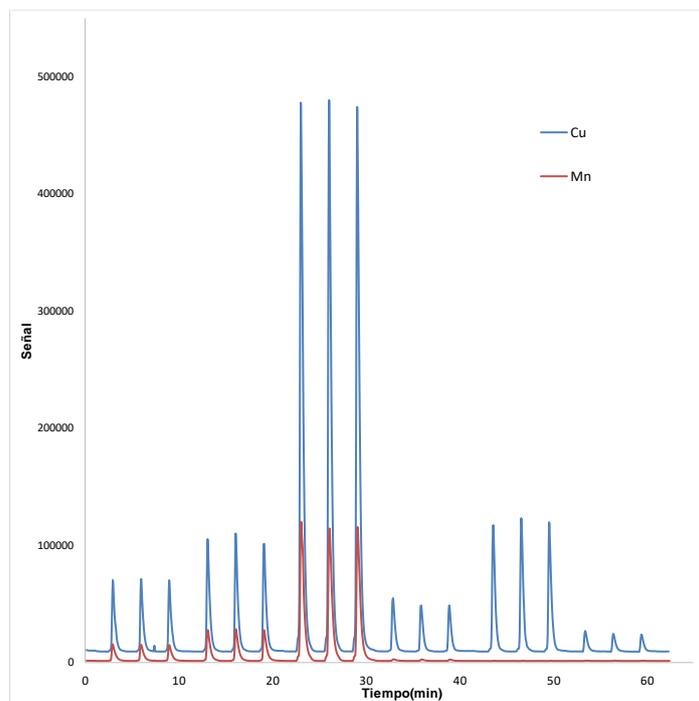


Figura 43 Registro de la señal sincronizada para Cu y Mn

La optimización de las condiciones de operación del sistema de preconcentración en flujo utilizando una minicolumna empacada con fibra de sisal comenzó evaluando la incidencia del caudal de la línea de muestra o estándar en la señal analítica, ensayando dos caudales diferentes ($1,1$ y $3,5 \text{ mL min}^{-1}$). Para lo cual se registra la señal analítica de una disolución estándar de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Cu y Mn. En los resultados se observa (**Figura 44**) que a un caudal de $3,5 \text{ mL min}^{-1}$ se obtiene un incremento de la señal, por lo que para posteriores ensayos se decidió utilizar este caudal. A continuación, se realizó un diseño experimental multivariado simplificado (central compuesto, tres variables, tres niveles) utilizando una solución estándar de Cu y Mn (5 mg L^{-1}) de forma de evaluar el efecto de la señal analítica de tres variables críticas (pH, tiempo de preconcentración y concentración del eluyente) (Massart, et al 1997). Cada experimento se realizó por triplicado. La **Tabla 14** presenta las condiciones experimentales del diseño.

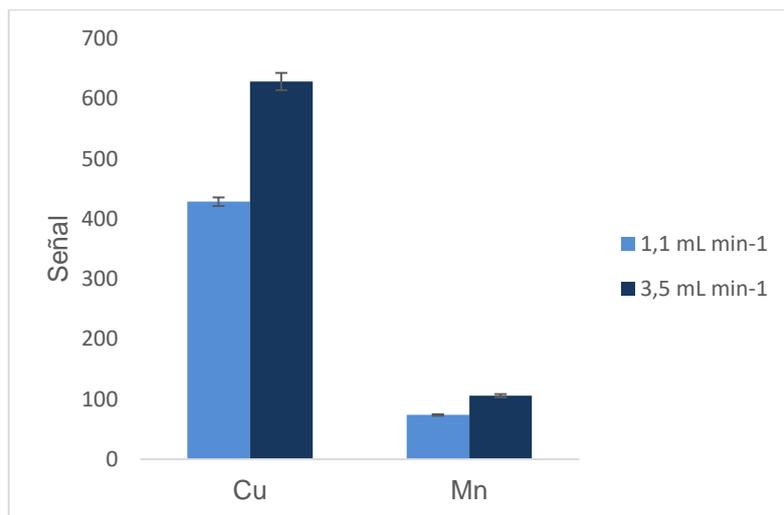


Figura 44 Incidencia del caudal

Tabla 14 Diseño central compuesto

Exp#	Tiempo de preconcentración (s)	pH	[HCl] (mol L ⁻¹)
1	30	4	0,2
2	30	4	0,5
3	30	6	0,2
4	30	6	0,5
5	60	5,5	0,3
6	90	4	0,2
7	90	4	0,5
8	90	6	0,2
9	90	6	0,5
10	90	5,5	0,3
11	90	5,5	0,5

En base a los resultados (**Figura 45**), las mejores condiciones en términos de respuestas analíticas se lograron para tiempo de preconcentración: 90 s, pH=5,5 y concentración de HCl=0,5 mol L⁻¹. Por lo tanto, estas condiciones (experimento 11) fueron las seleccionadas para los ensayos posteriores.

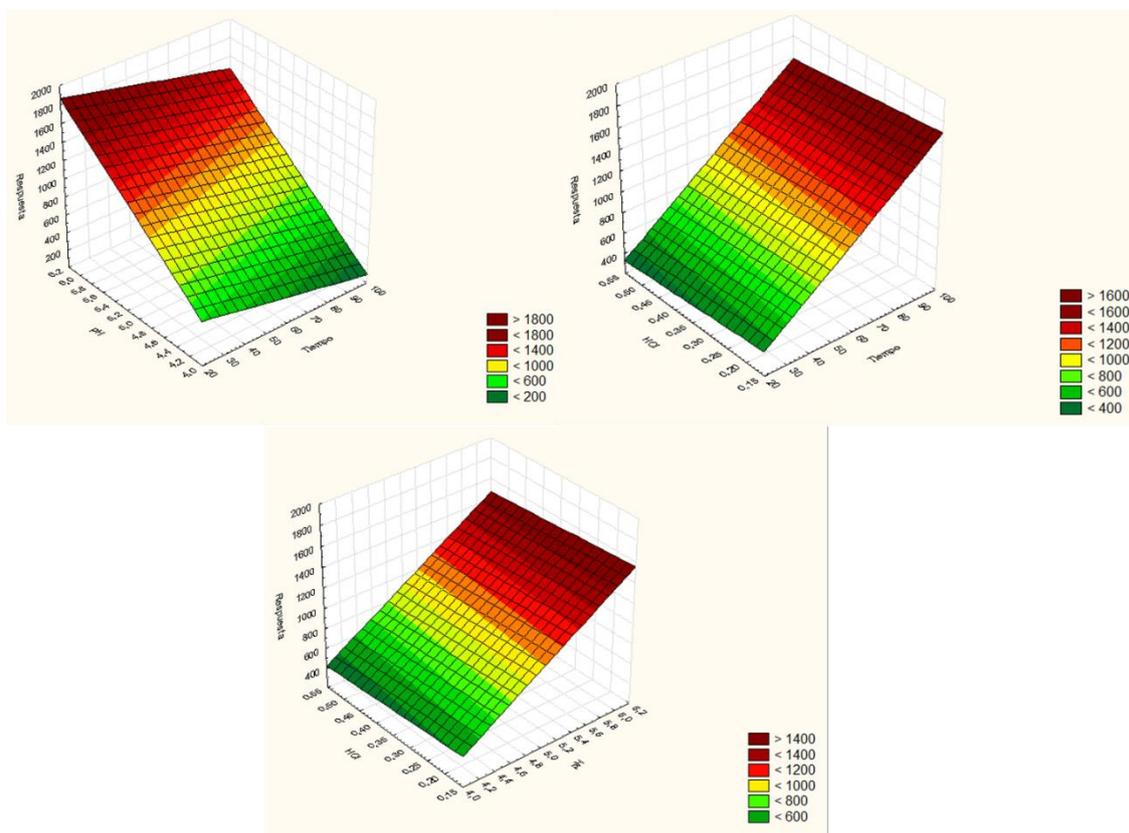


Figura 45 Superficies de respuesta obtenidas para el Cu (Realizadas utilizando el software Statistica)

Antes de poder aplicar el sistema FI-MP AES desarrollado a la determinación de Cu y Mn en muestras de pasturas y reservas forrajeras, es necesario lograr compatibilizar las condiciones ácidas del tratamiento de muestras (asistido por MW) con las condiciones optimizadas del sistema de preconcentración en flujo y determinación mediante MP AES. Lo anterior implica un ajuste de pH hasta un pH igual a 5,5 (valor con anterioridad optimizado). Se ensayaron diferentes formas de realizar el ajuste a pH=5,5 (hidróxido de sodio o buffers).

En una primera etapa se ajustó el pH de un digesto de CRM *Brachiaria Brizantha* cv mediante la utilización de hidróxido de sodio, luego de la cual se procedió a realizar la determinación utilizando el sistema en flujo propuesto. En el registro de la señal obtenida se observa la “ausencia” de señal analítica para el CRM tanto para el Cu como Mn. El comportamiento anterior se debe a mecanismos de competencia entre el Na^+ , el Cu^{2+} y el Mn^{2+} . De acuerdo con lo reportado en bibliografía, la afinidad del biosorbente es mayor por los cationes divalentes que por los monovalentes, por lo cual el Cu y Mn tendrían mayor

afinidad que el Na. En este caso la competencia no se da por un mecanismo de afinidad, sino por cantidad, al realizar el ajuste de pH con hidróxido de sodio, el sodio se encuentra en mayor proporción con relación a cobre y manganeso. En base a este comportamiento se prueba realizar el ajuste de pH con diferentes concentraciones de buffer acetato de amonio-ácido acético (pH =5,5). Con varias de las concentraciones de buffer utilizadas no se alcanza el pH necesario, por lo que los %R que se obtienen en el CRM no son adecuados de acuerdo a los criterios antes mencionados. Utilizar un buffer más concentrado de forma de alcanzar el ajuste de pH requerido implica superar el porcentaje de sólidos totales disueltos (STD) aceptables para una determinación mediante MP AES. Esta técnica analítica tiene una restricción en el contenido de STD de las disoluciones a medir, las mismas no deben exceder el máximo tolerable de 2% de STD, para no ocluir el sistema de nebulización. Para evidenciar si el inconveniente se encontraba en la etapa de ajuste de pH, en lugar de acoplar el sistema de preconcentración en flujo al MP AES, se lo acopló a espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS), de forma de que no exista la restricción del contenido máximo de STD. Mediante la utilización de un buffer acetato de amonio-ácido acético se logró ajustar el pH, el contenido de STD resultante fue de 13%. Los resultados obtenidos mediante el sistema FI-FAAS (**Figura 46**) fueron estadísticamente comparables con los obtenidos mediante determinaciones directas en FAAS, a través de una prueba *t* de *Student* (nivel de confianza 95%). La veracidad fue evaluada a través de ensayos de recuperación en CRM *Brachiaria Brizantha cv* o mediante muestras de alimento para ganado adicionadas, obteniendo los siguientes resultados 99% y 114% para el Cu y Mn respectivamente (promedio, n=3). Para muestras de reservas forrajeras se hallaron valores comprendidos entre 12-70 mg kg⁻¹ para Cu y 6-55 mg kg⁻¹ para Mn. Lo anterior demuestra que si no existiera la restricción del contenido de STD del MP AES es posible realizar la preconcentración en flujo y posterior determinación de Cu y Mn de muestras de alimento para el ganado, utilizando fibra de sisal (*Agave sisalana*) como biosorbente. No se continuó realizando determinaciones analíticas mediante esta estrategia de preconcentración con uso de ondas de ultrasonido como tratamiento previo y determinación mediante FAAS debido ya que no presentó las ventajas buscadas

al acoplar el sistema con el MP AES (determinación simultánea y menor costo de operación).

Las determinaciones de Cu y Mn mediante FAAS se realizaron en un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer Analyst 200, equipado con lámparas de cátodo hueco de la firma Perkin Elmer de Cu y Mn operando a 324,8 y 279,5 nm respectivamente, un quemador de 10 cm y una llama acetileno-aire.

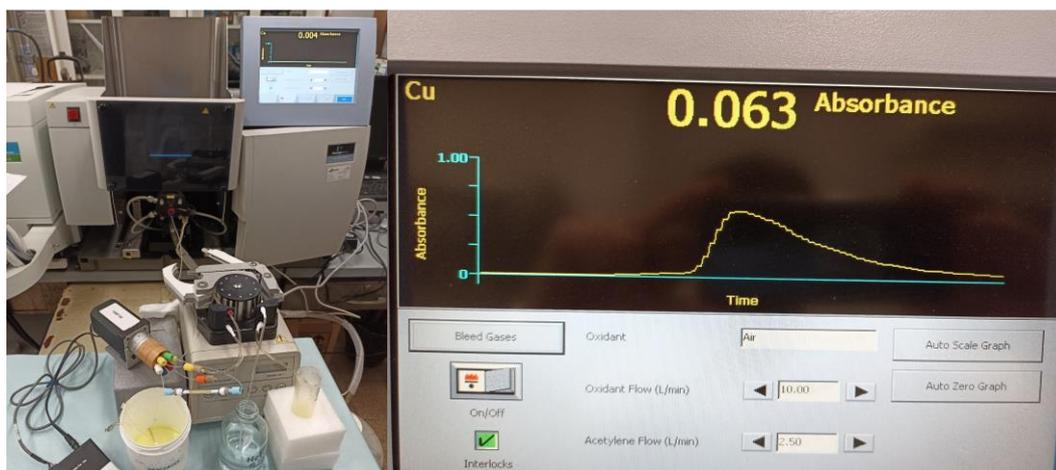


Figura 46 Sistema de preconcentración acoplado a FAAS y señal obtenida

En el caso de las muestras de agua, el pH inicial de las mismas se encontraba entre 5-8 y no se les agregó ningún aditivo conservante, por lo que el ajuste de pH se realizó utilizando HCl 0,1 mol L⁻¹ o NaOH 0,1 mol L⁻¹ sin que la restricción del contenido máximo de STD fuera un inconveniente.

La validación de la metodología analítica de preconcentración en línea y posterior determinación simultánea de Cu y Mn en muestras de agua, mediante espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (FI-MP AES) desarrollada fue realizada siguiendo las recomendaciones de la Guía Eurachem “*The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*” (Magnusson & Örnemark, 2014).

El rango lineal se estudió mediante la inspección visual y el coeficiente de determinación (R²). Los coeficientes de determinación obtenidos para las regresiones lineales fueron mayores a 0,99 para ambos analitos. El LD y LC fueron estimados para cada analito como 3s/pendiente y 10s/pendiente

respectivamente, donde s es la desviación estándar de 10 réplicas de un estándar de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ tanto para Cu como Mn. Se utilizó un estándar de baja concentración y no los blancos de curva de calibración debido a que los mismos no presentan señal analítica.

La precisión, en condiciones de repetibilidad, expresada como la desviación estándar relativa porcentual (%RSD) se evaluó utilizando un pool de tres muestras de agua adicionado a dos niveles tanto para Cu como Mn ($0,05$ y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$) y con una muestra que cuantificó Cu y Mn, en ambos casos se utilizó $n=6$. Para evaluar la veracidad se realizó un ensayo de recuperación (%R, valor obtenido/valor adicionado *100) sobre muestras adicionadas a dos niveles de concentración, $0,1$ y $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. No se utilizó material de referencia certificado de agua, debido a que se utiliza un medio ácido para preservar el mismo. Este medio ácido implica un ajuste de pH utilizando grandes cantidades de hidróxido de sodio los cuales son incompatibles con el requerimiento de sólidos totales disueltos menor al 2% que dispone el MP AES.

Además, de las cifras de méritos usualmente evaluadas en la validación de metodologías analíticas, cuando se trata de sistemas de preconcentración en flujo, como la metodología propuesta, existen dos cifras de mérito adicionales a evaluar, las cuales son de suma relevancia. Las mismas son el Factor de Enriquecimiento (FE) y la Frecuencia de Muestreo.

Otro aspecto para destacar del sistema FI-MP AES desarrollado para la preconcentración y posterior determinación simultánea de Cu y Mn, utilizando una minicolumna empacada con fibra de sisal fue que se pudieron realizar hasta 350 determinaciones sin la necesidad de reemplazo ni regeneración del empaquetamiento, lo cual contribuye notablemente a la disminución de los costos y aumenta la sencillez de la metodología propuesta.

La **Figura 47** muestra la evolución en el diseño y construcción de las minicolumnas empacadas con fibra de sisal a lo largo del trabajo de tesis, hasta lograr la minicolumna con la cual se realizaron las 350 determinaciones.



Figura 47 Evolución en el diseño y construcción de la minicolumna

En la **Tabla 15** se presenta las cifras de mérito evaluadas durante la validación de la metodología.

Tabla 15 Cifras de mérito sistema FI-MP AES

	Cu	Mn
Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	12-500	30-500
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,7	9,0
LC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12	30
Veracidad (%R)**	97	98
Precisión (%RSD, n=6)***	4,3	2,6
Precisión (%RSD, n=6)****	9	10
Factor de Enriquecimiento		30
Frecuencia de Muestreo (muestras h^{-1})		20
N° determinaciones sin necesidad de reemplazo		350

*rango estudiado; **promedio, n=6; ***utilizando muestras adicionadas; ****utilizando muestras reales; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación

Los resultados obtenidos durante la validación de la metodología FI-MP AES utilizando fibra de sisal (*Agave sisalana*) son adecuados para el monitoreo de Cu y Mn en aguas, tomando como criterios de adecuación los establecidos por la AOAC (AOAC, 2019), los valores considerados seguros para Cu y Mn de acuerdo al *National Research Council* (NRC, 2001) y los valores máximos permitidos de Cu y Mn en agua de acuerdo a la norma UNIT 833:2008 (UNIT, 2008) que fue adoptada por el Decreto 110/011 Modificación del Reglamento Bromatológico Nacional (IMPO, 2011).

4.2.2 Aplicación a muestras de agua

Una vez culminadas las etapas de optimización y validación correspondientes, se prosiguió a aplicar la metodología desarrollada (FI-MP AES) a muestras de agua de diferentes orígenes y comparar los resultados con los obtenidos mediante un método de referencia. Si bien son pocas las muestras de agua analizadas, la aplicabilidad como prueba de concepto fue verificada.

Como metodología de referencia para evaluación de veracidad y comparar resultados, se utilizó espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS), basada en APHA 3113B (APHA, 2012). Se utilizó un espectrómetro Perkin Elmer HGA 900 (**Figura 48**), con lámparas de cátodo hueco de la firma Perkin Elmer de Cu y Mn operando a 324,8 y 279,5 nm respectivamente. La atomización se realizó sobre una plataforma de L'Vov de grafito pirolítico sólido insertada en un tubo de grafito pirolítico estándar. Los programas de temperatura utilizados para estas determinaciones se muestran en la **Tabla 16**, no se requirió la utilización de modificador de matriz.



Figura 48 Espectrómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica
Perkin Elmer HGA900

Tabla 16 Condiciones de operación para las determinaciones mediante ETAAS

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (s)	Rampa (°C s ⁻¹)	Flujo de Ar (mL min ⁻¹)
Secado	110	1	30	250
Secado	130	15	20	250
Pirólisis	1100 ^(Cu) /1050 ^(Mn)	10	20	250
Atomización	2300 ^(Cu) /2100 ^(Mn)	0	5	0
Limpieza	2600	1	5	250

Se llevó a cabo una prueba t de Student para comparar de forma estadística los resultados obtenidos al aplicar la metodología FI-MP AES propuesta con los obtenidos mediante ETAAS. Los resultados de la prueba estadística se presentan en la **Tabla 17**. Para las muestras que presentan valores cuantificables, los valores de $t_{\text{experimental}}$ fueron menores que el $t_{\text{teórico}}$, lo cual indicó que para un nivel de confianza del 95% las concentraciones no difieren significativamente de las obtenidas mediante el método de referencia.

En los resultados de Mn obtenidos para las muestras de agua se observa que las mismas exceden el máximo sugerido de 0,05 mg L⁻¹ propuesto por el *National Research Council*. En el caso del Cu esto no sucede ya que la totalidad de las muestras analizadas se encuentran por debajo de 1 mg L⁻¹, nivel máximo sugerido por la misma entidad (NRC, 2001).

Al comparar el desempeño analítico de la metodología propuesta con la metodología de referencia, se puede mencionar que el rango lineal es 10 veces mayor que el obtenido mediante ETAAS, al utilizar esta metodología con fines de comparación (50 y 15 µg L⁻¹ para Cu y Mn respectivamente). En cambio, los límites de detección y cuantificación que se obtuvieron mediante ETAAS son más bajos.

Tabla 17 Comparación de los niveles de Cu y Mn en muestras de agua (método desarrollado vs ETAAS)

Muestra	FI-MP AES ($\mu\text{g L}^{-1}$)		ETAAS ($\mu\text{g L}^{-1}$)		valor <i>t</i>	
	Cu	Mn	Cu	Mn	Cu	Mn
Agua de pozo1	93±9	ND	82±1	<LC	2,44	--
Agua de pozo2	79±3	ND	81±1	<LC	1,50	--
Agua de pozo3	108±4	175±9	114±2	161±1	-1,07	2,2
Agua de pozo4	124±11	ND	113±1	<LC	2,03	--
Agua de pozo5	61±5	ND	55±2	<LC	1,14	--
Agua de pozo6	35,4±2,4	57,5±1,3	39,5±5,0	56,9±1,0	-0,44	0,37
Agua de red	106 ±1	ND	105±1	<LC	0,68	--
Agua de lluvia	ND	ND	<LC	<LC	---	---

Promedio \pm desviación estándar (n=5) Prueba *t* teórico de *student* (0,05;4) =2,78; LC (ETAAS)= 4,5 y 1,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ para Cu y Mn respectivamente

4.2.3 Optimización y validación del sistema - fibra de sisal (*Agave sisalana*) impregnada con AFB

El sistema FI-MP AES construido para la preconcentración en flujo y posterior determinación simultánea de Cu y Mn fue evaluado utilizando una minicolumna empacada con fibra de sisal impregnada con AFB. Dos experimentos fueron llevados a cabo utilizando una solución estándar de 0,2 mg L⁻¹ de Cu y Mn, para estudiar la influencia del tiempo de preconcentración y el pH en la señal analítica.

La **Figura 49** muestra los resultados alcanzados al ensayar diferentes tiempos de preconcentración (30, 60 y 90 s). De los mismos se desprende que con

tiempos mayores de preconcentración se logran mayores señales analíticas, tanto para Cu como para Mn. No se ensayaron tiempos de preconcentración mayores a 90 s debido a que resultaría en la disminución de la frecuencia de muestreo afectando negativamente la practicidad del análisis.

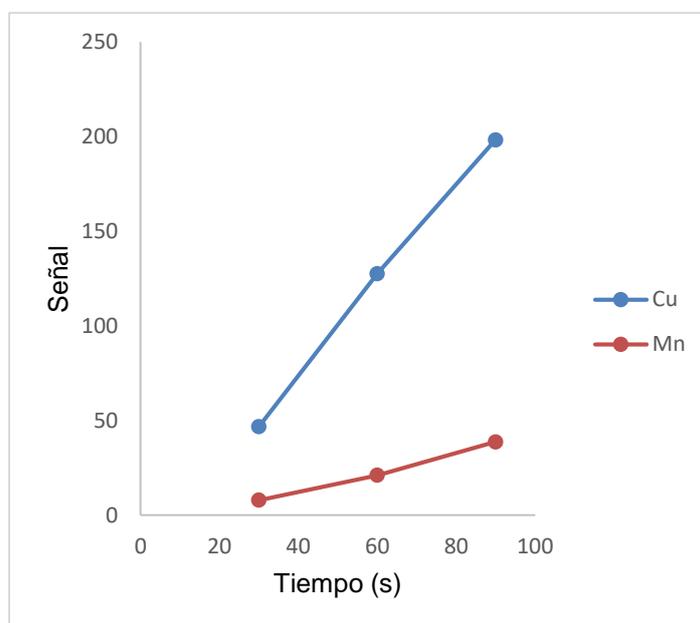


Figura 49 Efecto del tiempo de preconcentración

A continuación, utilizando un tiempo de preconcentración de 90 s, se evaluó el efecto del pH de preconcentración, evaluando la altura de la señal analítica, la **Figura 50** muestra los resultados obtenidos.

En base a los resultados que se alcanzaron al evaluar la influencia del tiempo de preconcentración y el pH, para posteriores ensayos se seleccionó un tiempo de preconcentración de 90 s y un pH igual a 5,5. Para las demás condiciones se utilizaron las seleccionadas para el sistema FI-MP AES que utiliza la fibra sin impregnar, es decir un caudal de línea de muestra o estándar de $3,5 \text{ mL min}^{-1}$ y concentración de HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

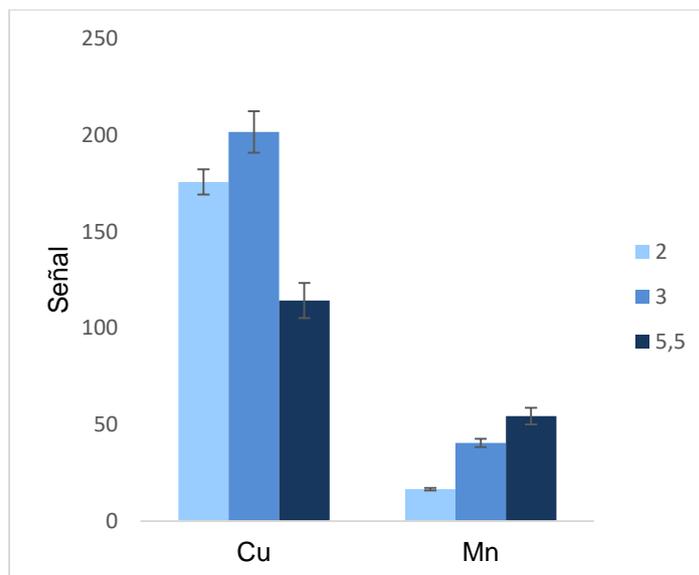


Figura 50 Efecto del pH en la etapa de preconcentración

La validación de la metodología analítica FI-MP AES utilizando fibra de sisal (*Agave sisalana*) impregnada con AFB fue llevada a cabo siguiendo los lineamientos de la Guía Eurachem (Magnusson & Örnemark, 2014), de igual forma que la metodología analítica con la fibra de sisal (*Agave sisalana*) sin impregnar. Las cifras de desempeño estudiadas fueron: rango lineal, límites de detección (LD), límite de cuantificación (LC), precisión y veracidad.

El rango lineal se estudió mediante la inspección visual y el coeficiente de determinación (R^2) de las curvas de calibración. Para ambos analitos los coeficientes de determinación de las regresiones lineales fueron mayores a 0,99.

El LD y LC fueron estimados para cada analito como la concentración correspondiente a 3 y 10 veces la desviación estándar de 10 réplicas de un estándar de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ tanto para Cu como Mn. Se utilizó un estándar de baja concentración y no los blancos de la curva de calibración debido a que los mismos no presentan señal.

La precisión expresada como la desviación estándar relativa porcentual (%RSD) se evaluó utilizando un pool de tres muestras de agua adicionada a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ tanto para Cu como Mn ($n=6$). La veracidad se evaluó mediante un ensayo de recuperación (%R, valor obtenido/valor adicionado *100) sobre muestras adicionadas a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ para Cu y Mn.

De igual manera que para el sistema FI-MP AES que utiliza la fibra de sisal (*Agave sisalana*) sin impregnar, en este caso se evaluó también el Factor de Enriquecimiento (FE), la frecuencia de muestreo y el número de determinaciones sin la necesidad de reemplazo del empaquetamiento.

Al evaluar los resultados obtenidos para ambos analitos (**Tabla 18**) con los criterios de adecuación anteriormente indicados, se evidencia que el rango lineal, LC y LD, precisión, FE y frecuencia de muestreo son adecuados, por lo que la preconcentración utilizando la fibra de sisal impregnada con AFB fue satisfactoria. Sin embargo, al evaluar la veracidad mediante ensayos de recuperación sobre muestras adicionadas, los resultados no son adecuados. En la literatura no se encontraron antecedentes de preconcentración de Mn en fibra de sisal impregnada con AFB.

Tabla 18 Cifras de mérito sistema FI-MP AES, fibra impregnada

	Cu	Mn
Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	12-500	33-500
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,8	9,8
LC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12	33
Veracidad (%R)**	77	27
Precisión (%RSD, n=6)***	2,1	3,1
Factor de Enriquecimiento		30
Frecuencia de Muestreo (muestras h^{-1})		20
Nºdeterminaciones sin necesidad de reemplazo		40

*rango estudiado; **promedio, n=6; ***utilizando muestras adicionadas; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación

4.2.4 Comparación de ambos sistemas FI-MP AES propuestos

Al comparar las cifras de mérito de las dos metodologías analíticas FI-MP AES propuestas, que utilizan fibra de sisal (**Tabla 15** y **Tabla 18**) se evidencia que la impregnación del biosorbente con AFB no conlleva a una mejora de la

performance analítica. Se observan diferencias en dos aspectos principalmente en los cuales el desempeño de la fibra sin impregnar es más adecuado tanto para Cu como para Mn (veracidad y número de determinaciones sin necesidad de reemplazo). En particular la fibra de sisal sin impregnar fue muy eficiente, 350 determinaciones sin necesidad de reemplazo frente a 40 determinaciones de la fibra impregnada.

Esto demuestra que el uso de la fibra de sisal sin la necesidad de impregnar la misma, con un reactivo adicional, es una posibilidad adecuada, novedosa para la preconcentración y posterior determinación de Cu y adicionalmente Mn mediante FI-MP AES con fines de monitoreo de ambos analitos en muestras de agua. Es importante destacar que los resultados obtenidos en esta parte de la tesis han sido publicados en revistas referadas (Silva & Pistón, 2021; Silva & Pistón, 2023).

4.3 Determinación de Se en alimento para ganado mediante HG-MP AES

4.3.1 Desarrollo y validación

La validación de la metodología analítica para la determinación de Se en muestras de pasturas y reservas forrajeras, mediante generación de hidruros acoplada a espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (HG-MP AES) desarrollada fue realizada siguiendo las recomendaciones de la Guía Eurachem "*The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*" (Magnusson & Örnemark, 2014). Las cifras de mérito evaluadas son: rango lineal, LD, LC, precisión y veracidad.

El rango lineal se estudió por triplicado mediante la inspección visual y el coeficiente de determinación (R^2). El coeficiente de determinación obtenido para la regresión lineal fue mayor a 0,99.

El LD y LC fueron estimados mediante BEC, según lo descrito en el punto 1.8, calculando la desviación estándar de 10 réplicas de un blanco de digestión

(Thomsen, 2012).

La precisión, en condiciones de repetibilidad, expresada como la desviación estándar relativa porcentual (%RSD) se evaluó, para un n=6, utilizando el CRM *Wheat Flour*.

La veracidad se evaluó mediante un ensayo de recuperación (%R, valor obtenido/valor certificado *100) sobre sobre CRM *Wheat Flour* (n=6), CRM Agua potable (n=2), CRM *Rice Flour* (n=2). No se utilizaron los materiales de referencias certificados de origen vegetal que se emplearon en el resto de la tesis (*Apple Leaves* NIST SRM1515 y *Brachiaria Brizantha cv Embrapa*) debido a que los mismos no declaran el contenido de Se. Igualmente, la totalidad de la metodología fue aplicada a dos materiales de referencia certificados de matrices complejas obteniendo resultados adecuados.

Tabla 19 Cifras de mérito, determinación de Se mediante HG-MP AES

	Se
Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)*	2,0-50
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,6 (18 $\mu\text{g kg}^{-1}$)
LC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,0 (59 $\mu\text{g kg}^{-1}$)
Veracidad (%R) (CRM <i>Wheat Flour</i>)**	101
Veracidad (%R) (CRM Agua)	106
Veracidad (%R) (CRM <i>Rice Flour</i>)	80
Precisión (%RSD, n=6)	4,9

*rango estudiado; **promedio, n=6; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación

Los resultados obtenidos durante la validación de la metodología HG-MP AES (**Tabla 19**) son adecuados para la determinación de Se en aguas y alimento para ganado, tomando como criterios de adecuación los establecidos por la AOAC (AOAC, 2019). Los valores considerados seguros para Se de acuerdo al *National Research Council* (NRC, 2001) y el valor máximo permitido de Se en agua de acuerdo a la norma UNIT 833:2008 (UNIT, 2008) que fue adoptada por el

Decreto 110/011 Modificación del Reglamento Bromatológico Nacional (IMPO, 2011).

4.3.2 Aplicación a muestras de alimento

Una vez culminada la etapa de validación correspondiente, se aplicó la metodología desarrollada para la determinación de Se (HG-MP AES) a dos *pools* de muestras de reservas forrajeras y se comparó los resultados con los obtenidos mediante el uso de una técnica considerada como “*gold technique*” (ICP-MS) que puede tomarse como de referencia.

Se utilizó un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente, Shimadzu ICPMS-2030 LF (**Figura 51**). Como estándar interno se usó una disolución de germanio. En la **Tabla 20** se indican los parámetros de operación del ICP-MS, mientras que en la **Tabla 21**, se presentan las masas de los diferentes elementos monitoreados.



Figura 51 Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente, Shimadzu ICPMS-2030 LF

Los resultados obtenidos mediante ICP-MS son valores menores que el límite de cuantificación de la metodología HG-MP AES, algo que era esperable. Si bien fueron pocas las muestras analizadas (aunque al usar pool eran representativas de la matriz), la aplicabilidad como prueba de concepto fue verificada, tal como se muestra en la **Tabla 22**.

Tabla 20 Parámetros instrumentales del ICP-MS

Parámetro Instrumental	
Potencia de radiofrecuencia ICP (W)	1200
Flujo de gas de plasma (L min ⁻¹)	9,0
Flujo de gas de auxiliar (L min ⁻¹)	1,10
Flujo de gas carrier (L min ⁻¹)	0,70
Flujo de He en la celda de colisión (mL min ⁻¹)	6,0
Replicados	3
Número de lecturas	10
Tiempo de integración (s)	2
Resta de blanco	Luego de corrección por estándar interno
Sistema de introducción de muestra	
Antorcha	<i>Minitorch</i>
Nebulizador	coaxial
Cámara	ciclónica

Tabla 21 Información de los elementos monitoreados

Elemento	Masa
Selenio	78
Germanio (Estándar Interno)	72

Tabla 22 Comparación de los resultados de Se obtenidos mediante ICP-MS y HG-MP AES

Muestra	ICP-MS ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	HG-MP AES ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
<i>Pool 1</i>	20	<LC
<i>Pool 2</i>	56	<LC

LC (HG-MP AES): $59 \mu\text{g kg}^{-1}$

Adicionalmente en la **Tabla 23** se comparan los límites de detección y cuantificación obtenidos con la metodología analítica propuesta y datos reportados en artículos publicados de nuestro grupo entre otros. Se puede

observar y destacar que los límites obtenidos en la metodología presentada en el trabajo de tesis son menores que los reportados por Mikheev et al. utilizando la misma técnica (Mikheev, y otros, 2017). A su vez son del mismo orden que los obtenidos mediante HG-AAS con la ventaja que el MP AES opera con nitrógeno y no utiliza acetileno, por lo que existen ventajas económicas y de seguridad al no ser necesario la utilización de un cilindro de gases. Los límites obtenidos mediante MCFA-HG-AAS son más bajos (comparables al ICP-MS), pero al trabajar a microescala es necesario la construcción de un sistema en flujo dedicado lo cual aumenta los costos.

Tabla 23 Tabla comparativa de las cifras de mérito para diferentes técnicas analíticas para la determinación de Se

	Este trabajo	HG-MP AES*	HG-AAS**	MCFA-HG-AAS**	ICP-MS
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,6	3	0,3	0,08	0,035
LC ($\mu\text{g L}^{-1}$)	2,0	10	1,0	0,27	0,12

(Datos extraídos de: * Mikheev, y otros, 2017; ** Pistón, Silva, Pérez-Zambra, Dol, & Knochen, 2012)

4.4 Análisis de Cu y Mn en alimento para ganado mediante EDXRF

4.4.1 Desarrollo y validación

El desarrollo comenzó con la evaluación de ciertos parámetros operativos que deben ser configurados al momento de la confección de un método analítico mediante EDXRF con calibración a través de parámetros fundamentales ajustado por matriz. Dichos parámetros son: atmósfera de trabajo, tamaño del colimador, tiempo de medida y la utilización o no de filtros primarios. La atmósfera de trabajo seleccionada fue aire (también puede ser helio) de forma de disminuir costos de trabajo, esto trae aparejado, de acuerdo con la bibliografía límites de detección más altos (Beckhoff, Kanngießner, Langhoff, Wedell, & Wolff, 2006). Los *pellets* que se elaboraron son de 13 mm de diámetro utilizando una prensa neumática disponible en el laboratorio de Física (DETEMA-FQ). Esta superficie posibilita trabajar con los 4 colimadores disponibles en el equipo (1, 3, 5 y 10 mm). De forma de poder irradiar la mayor superficie posible, para mejorar

la homogeneidad y por ende la precisión, sin correr el riesgo de irradiar fuera del *pellet* (debido a la proximidad de tamaño entre el *pellet* y el colimador de 10 mm), se seleccionó en una primera instancia, un tamaño de colimador de 5 mm tanto para Cu como Mn. En cuanto al tiempo de medida se seleccionó un tiempo estándar o recomendado por el equipo, igual a 100 segundos, para lograr un análisis rápido. A continuación, se realizó un espectro en modo barrido a una muestra, de forma de evidenciar la existencia o no de superposición de líneas. La **Figura 52** muestra el espectro obtenido donde se observa buena resolución o separación de las líneas $K\alpha$ del Cu y Mn. Paso siguiente se ensayó el material de referencia a utilizar para realizar el ajuste o corrección por matriz, del método de parámetros fundamentales, para lo cual se evaluaron dos materiales diferentes (*Apple Leaves* NIST SRM1515 y *Brachiaria Brizantha cv* Embrapa (Marandu)). El resultado que se evaluó fue el %R de Cu y Mn, al medir ambos CRM como muestra. De acuerdo con los resultados obtenidos, que se muestran en la **Tabla 24**, se seleccionó realizar el ajuste del método de cuantificación utilizando el CRM de *Brachiaria Brizantha cv*.

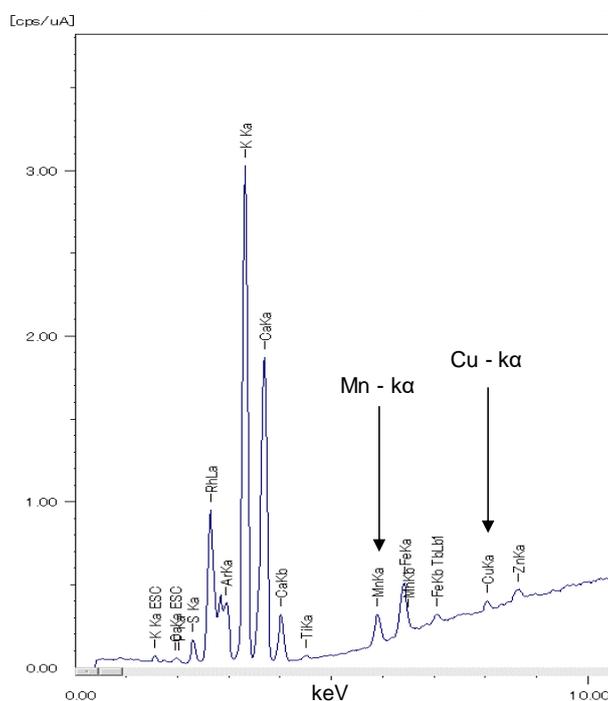


Figura 52 Porción de espectro de fluorescencia de rayos X de una muestra

Tabla 24 Resultados de la evaluación de los métodos de ajuste

	Ajuste con Marandu		Ajuste con <i>Apple Leaves</i>	
	CRM	CRM Apple	CRM	CRM Apple
	Marandu	Leaves	Marandu	Leaves
%R (Cu)	98	90	125	95
%R (Mn)	91	94	88	96

Condiciones de medida: atmósfera de aire, colimador de 5 mm, *film* de polipropileno y carbono como balance

En la **Tabla 25** se resumen los parámetros operativos del método EDXRF para la cuantificación mediante parámetros fundamentales.

Tabla 25 Resumen de los parámetros operativos

Método FP:	<i>Brachiaria Brizantha cv</i>		
Atmósfera:	Aire	Tiempo medida (s):	100
Film:	Polipropileno	Balance:	C
Colimador:	5 mm	Línea:	K α (Cu y Mn)

En la validación de la metodología mediante EDXRF para la determinación de Cu y Mn en alimento para ganado, se siguieron los lineamientos de la Guía Eurachem (Magnusson & Örnemark, 2014). Las cifras de desempeño evaluadas son: LD, LC, precisión y veracidad.

La precisión, en condiciones de precisión intermedia, expresada como la desviación estándar relativa porcentual (%RSD) se evaluó utilizando una muestra de alimento para ganado, tanto para Cu como Mn (n=6).

La veracidad se evaluó mediante ensayos de recuperación sobre CRM *Apple Leaves*, en cada corrida de análisis de muestras.

Debido a que no es posible obtener un blanco de matriz, para de esta forma mediante repeticiones estimar el LD y LC, según lo explicado en el punto 1.8,

para la estimación del LD y LC se prosiguió de la siguiente forma. Se seleccionó una muestra con la concentración más baja posible de Cu o Mn, se confeccionaron *pellets* de forma de disponer de n=10. A continuación se realizó la determinación de Cu y Mn con el método correspondiente. A los resultados se les calculó la desviación estándar, luego se aplicó la fórmula de cálculo que corresponde.

En el caso del Mn, los resultados obtenidos durante la validación de la metodología EDXRF, los cuales se presentan en la **Tabla 26**, son acordes para la determinación directa al estado sólido en pasturas y reservas forrajeras, tomando como criterios de adecuación los establecidos por la AOAC (AOAC, 2019) y los valores considerados seguros para Mn de acuerdo con el *National Research Council* (NRC, 2001).

Tabla 26 Cifras de mérito de la metodología mediante EDXRF

	Cu	Mn
LD (mg kg ⁻¹)	No determinado	2,6
LC (mg kg ⁻¹)	No determinado	8,7
Veracidad (%R)*	88	97
Precisión (%RSD, n=6)**	No determinado	5,5

*promedio (n= 4) utilizando CRM *Apple Leaves* SRM 1515 NIST; ** utilizando muestra real; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación

Paralelamente a la validación se aplicó el método desarrollado a muestras de alimento para ganado. Para el caso del Cu se observó que los resultados obtenidos de varias muestras diferían de los obtenidos mediante el método tradicional o de referencia. Este comportamiento se observó principalmente para muestras con una concentración de Cu del orden de 4 mg kg⁻¹, valor próximo al LC que se espera según la bibliografía consultada para este tipo de metodologías. Por esto se decidió optimizar y desarrollar un nuevo método para el Cu, de forma de disminuir el LC. La estrategia que se siguió para intentar disminuir el LC fue aumentar la intensidad de la señal que alcanza al detector, para tal fin se procedió de dos formas, por un lado, se aumentó a 10 mm el tamaño del colimador utilizado y por otro se utilizó un tiempo de medida mayor,

pasando a 200 segundos. Además, se incluyó en el método el uso de un filtro primario, de forma de disminuir la incidencia de la señal de fondo sobre línea correspondiente al Cu. La **Tabla 27** indica los parámetros operativos del método EDXRF desarrollado para la cuantificación directa al estado sólido de Cu en alimento para ganado.

Tabla 27 Resumen de los parámetros operativos del método EDXRF para Cu

Método FP:	<i>Brachiaria Brizantha cv</i>		
Atmósfera:	Aire	Tiempo medida (s):	200
Film:	Polipropileno	Balance:	C
Colimador:	10 mm	Línea:	K _α (Cu)
Filtro primario:	5 -13 keV		

Siguiendo los mismos lineamientos que para la metodología EDXRF con anterioridad desarrollada, se validó la segunda metodología desarrollada mediante EDXRF para la cuantificación de Cu en alimento para ganado. En la **Tabla 28** se exponen los resultados obtenidos, los cuales son acordes para la determinación directa al estado sólido, de Cu en pasturas y reservas forrajeras en base a los criterios antes establecidos.

Tabla 28 Cifras de mérito de la metodología mediante EDXRF para Cu

	Cu
LD (mg kg ⁻¹)	0,6
LC (mg kg ⁻¹)	1,9
Veracidad (%R)*	95
Precisión (%RSD, n=6)	3,7

*promedio (n= 4) utilizando CRM *Apple Leaves* SRM 1515 NIST; LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación

Es importante destacar que los límites de detección estimados durante la validación de los métodos propuestos para Cu y Mn mediante EDXRF son del mismo orden que los indicados en la ficha técnica del equipo (1 mg kg⁻¹), aunque estos últimos fueron estimados en condiciones más favorables. Los límites de

detección indicados en la ficha técnica son estimados en atmósfera de helio y para muestras simples (Shimadzu Corporation, 2021).

4.4.2 Aplicación a muestras de alimento para ganado para la determinación de Cu y Mn

Luego de las etapas de optimización y validación correspondientes, se continuó con la aplicación de las metodologías desarrolladas mediante EDXRF a muestras de alimento para ganado. Se compararon los resultados con los obtenidos mediante un método de referencia. La **Figura 53** presenta las regiones del espectro de fluorescencia de rayos X que se utiliza para la cuantificación de cada analito.

Como metodología de referencia se utilizó digestión asistida mediante radiación MW y determinación por espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS), adaptado de AOAC 999.10 (AOAC, 2019). La digestión asistida mediante MW se realizó en el digestor CEM Mar 6, equipado con vasos *EasyPrep Plus*[®]. Para la determinación analítica se utilizó un espectrómetro Perkin Elmer Analyst 200, con lámparas de cátodo hueco de la firma Perkin Elmer de Cu y Mn operando a 324,8 y 279,5 nm respectivamente, un quemador de 10 cm y una llama acetileno-aire.

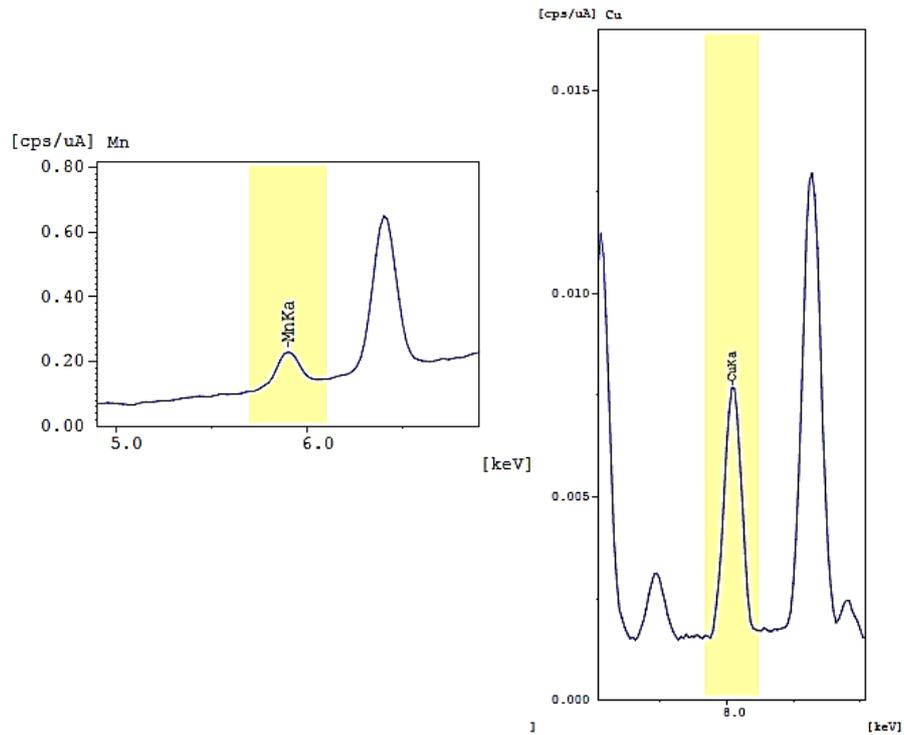


Figura 53 Regiones del espectro de fluorescencia de rayos X obtenido para Cu y Mn en una muestra

De forma de comparar estadísticamente los resultados obtenidos al aplicar las metodologías EDXRF propuestas con los obtenidos mediante FAAS, se llevó a cabo una prueba t de *Student*. Los resultados de la prueba estadística se exponen en la **Tabla 29**. Los valores de $t_{experimental}$ fueron menores que el $t_{teórico}$, lo cual indicó que para un nivel de confianza del 95% las concentraciones no difieren significativamente de las obtenidas mediante el método de referencia.

Tabla 29 Comparación de los niveles de Cu y Mn en muestras de alimento para ganado

Muestra	EDXRF (mg kg ⁻¹)		FAAS (mg kg ⁻¹)		valor <i>t</i>	
	Cu	Mn	Cu	Mn	Cu	Mn
FAR 1	3,94	110	4,50	97,0	-2,58	-1,39
FAR 2	4,99	23,9	4,33	25,0	3,99	-0,45
FAR 3	6,36	91,1	5,17	70,0	-1,92	3,10
EPE 1	6,34	74,8	6,30	73,9	0,07	0,06
SIP 1	6,50	50,6	6,05	60,1	0,51	-2,12
SIP 2	12,7	74,8	14,2	57,0	-1,22	-2,83
RAI 1	6,25	39,2	6,12	49,1	-1,94	-2,77
PLA 1	---	1524	---	1230	---	1,11
PLA 2	---	1497	---	1499	---	-0,01
PLA 3	---	1087	---	1202	---	-0,78

Promedio; Prueba *t* teórico de Student (0,05; 2) = 4,30; LD (FAAS)= 0,3 y 1,3 mg kg⁻¹ LC (FAAS)= 0,9 y 4,5 mg kg⁻¹ para Cu y Mn respectivamente

Si se comparan las metodologías propuestas con la metodología de referencia, se puede mencionar como principales ventajas la rapidez, sencillez, bajo costo y la no utilización de reactivos de las metodologías EDXRF frente a FAAS. En cambio, la metodología mediante FAAS posee LD y LC más bajos.

Para poder evaluar, desde el punto de vista nutricional el contenido de Cu y Mn en las muestras de alimento analizadas, se debería disponer de información relacionada con la categoría del animal y cuantos kilogramos de alimento consume por día.

En base a todo lo anteriormente indicado, se puede afirmar que las metodologías mediante EDXRF propuestas, utilizando calibración con parámetros fundamentales para la cuantificación de Cu y Mn en pasturas y reservas forrajeras, pueden ser una herramienta valiosa al momento de conocer el contenido de dichos micronutrientes lo cual puede contribuir a la decisión de suplementación o ajuste de dietas para el ganado.

4.5 Comparación desde el punto de vista de la Química Analítica Verde y el enfoque holístico de la Química Analítica Blanca

Para poder realizar el abordaje o comparación de las diferentes metodologías desarrolladas desde el punto de vista de la Química Analítica Verde y la Química Analítica Blanca, mediante las herramientas métricas antes descritas en el punto 3.8, se separó la evaluación por matrices (agua y alimento para ganado).

Matriz: Agua

Para el caso de la matriz agua, la evaluación se realizó mediante *Analytical Eco-Scale*, AGREE y la métrica de Química Analítica Blanca, por tratarse de una matriz que en este caso no precisó tratamiento de muestra. Se comparó la metodología FI-MP AES mediante preconcentración en una minicolumna empacada con fibra de sisal vs ETAAS (antes descrita) para la determinación de Cu y Mn.

El abordaje desde la Química Analítica Verde comenzó mediante el empleo de los criterios establecidos en la *Analytical Eco-Scale* y comparar de esta forma cuál de las metodologías se acerca más a los lineamientos de la QAV (Gałuszka, Konieczka, Migaszewski, & Namieśnik, 2012). En las **Tabla 30** y **Tabla 31** se presentan los resultados de la evaluación realizada para las metodologías FI-MP AES (desarrollada en la presente tesis) y ETAAS. De acuerdo con la *Analytical Eco-Scale* ambas metodologías tienen un desempeño verde excelente al obtener en la evaluación un puntaje mayor a 75, por lo que no se evidencian las ventajas inherentes a la utilización del MP AES (análisis multielemental y frecuencia analítica).

Tabla 30 Resultado de evaluación mediante *Eco-Scale*- metodología ETAAS

Reactivos	Puntos de penalización
Estándar Cu/Mn	3
Instrumentos	
ETAAS	1
Peligro ocupacional (vapores/gases)	3
Desechos	3(cantidad)+3(sin tratamiento)
SUMATORIA	13
100-13=87	Análisis Verde Excelente

Tabla 31 Resultado de evaluación mediante *Eco-Scale*- metodología FI-MP AES

Reactivos	Puntos de penalización
Estándar Cu/Mn	3
HCl 0,5 mol L ⁻¹	1(cantidad)*4(peligrosidad)
NaOH 0,1 mol L ⁻¹	1(cantidad)*4(peligrosidad)
Instrumentos	
MP AES	1
Bomba peristáltica	0
Válvula inyectora	0
Peligro ocupacional (vapores/gases)	3
Desechos	3(cantidad)+3(sin tratamiento)
SUMATORIA	21
100-21=79	Análisis Verde Excelente

A continuación, en la **Figura 54** se presentan los pictogramas de la evaluación realizada mediante AGREE. De los mismos se desprende que la metodología propuesta (FI-MP AES) posee un mayor “verdor” o *Greenness*, al poder observar un centro del pictograma de color verde y un puntaje de 0,67, mayor que el 0,5 obtenido para la metodología ETAAS (Pena-Pereira, Wojnowski, & Tobiszewski, 2020). Del análisis de cada uno de los criterios valorados se puede observar que los criterios 1, 3 y 8 son los responsables del mayor puntaje. Los criterios mencionados hacen referencia al posicionamiento del dispositivo y a la

frecuencia de muestreo/análisis simultáneo de varios analitos, evidenciando que la estrategia recorrida en el trabajo de tesis al utilizar MP AES y un sistema de análisis en flujo fue acertada desde el abordaje de la Química Analítica Verde y la métrica AGREE.

En este caso AGREE resultó ser una herramienta métrica más adecuada para evaluar o presentar el perfil *greenness* de las metodologías en estudio. Las ventajas inherentes a la utilización de MP AES, en la metodología propuesta en la tesis, no se evidencian con la herramienta *Analytical Eco-Scale*, tal como fue comentado antes.

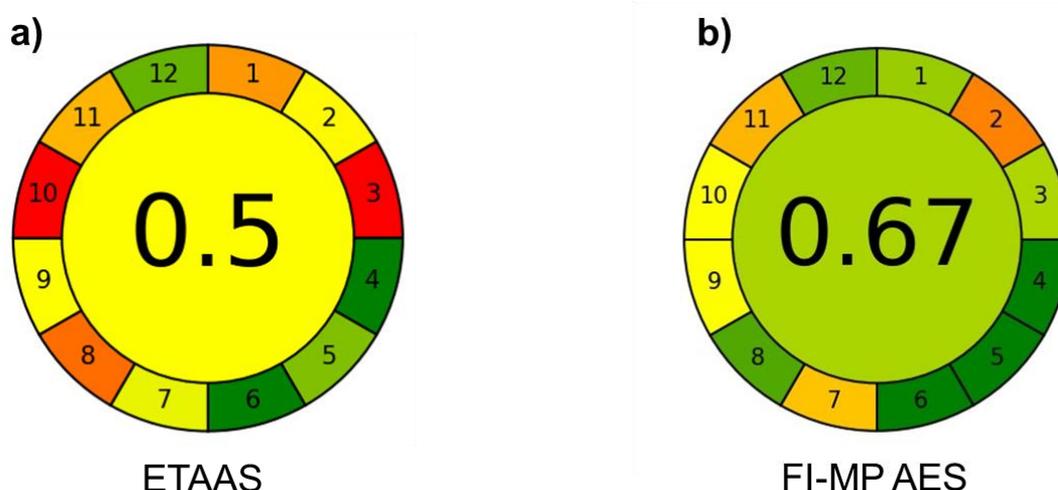


Figura 54 Resultado de evaluación mediante AGREE a) ETAAS, b) FI-MP AES

Como se explicó antes en el punto 3.8.4, la Química Analítica Blanca propone una herramienta para evaluar no sólo la preparación de muestras y la técnica empleada, como en los principios de la Química Analítica Verde, sino también, la eficiencia analítica, y criterios prácticos/económicos (Nowak, Wietecha-Postuszny, & Pawliszyn, 2021). La **Figura 55** presenta los resultados de la comparación del método FI-MP AES propuesto en este trabajo de tesis vs la metodología de referencia (ETAAS) desde el enfoque de la Química Analítica Blanca.

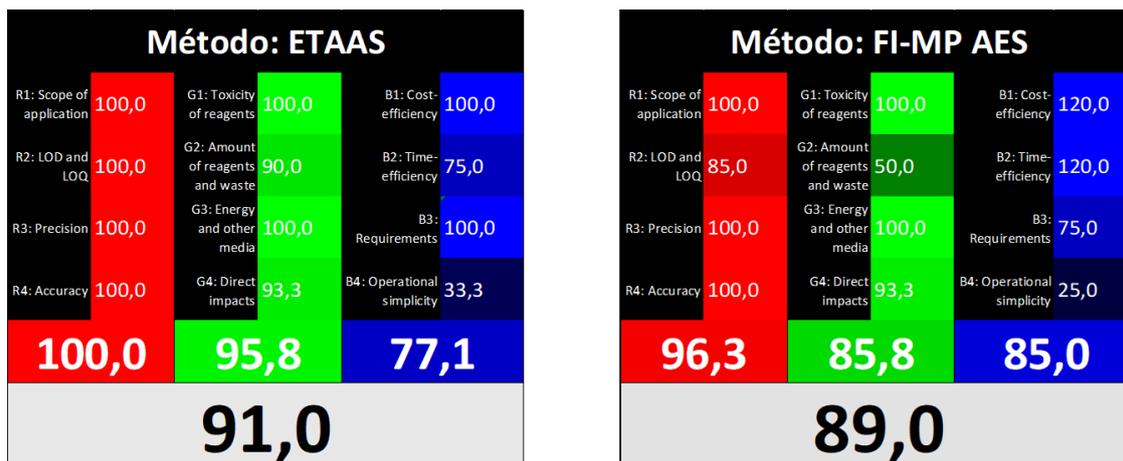


Figura 55 Resultado de evaluación mediante QAB para los métodos ETAAS y FI- MP AES

En términos generales la blancura de ambas metodologías es similar, al igual que la eficiencia analítica (rojo). Las diferencias, aunque no relevantes se encuentran en los aspectos verdes y de practicidad/económicos (azul), pero estas se compensan en la evaluación general. La razón de un mejor desempeño de la metodología propuesta, en el aspecto azul se debe a ventajas asociadas a la utilización del MP AES, las cuales disminuyen costos de operación (nitrógeno vs argón) y velocidad de análisis (multielemental vs unielemental). Ventajas que quedan enmascaradas en la evaluación o blancura general.

Al aplicar la herramienta BAGI a la metodología FI-MP AES desarrollada y a la metodología de referencia (ETAAS), se observa que ambas obtienen un puntaje mayor a 60 (**Figura 56**) con lo cual ambas se pueden considerar metodologías “prácticas” de acuerdo con lo establecido en bibliografía (Manousi, Wojnowski, Płotka-Wasyłkac, & Samanidou, 2023). Resultado que concuerda con la evaluación del aspecto azul del QAB. Igualmente se observan diferencias tanto en el puntaje como en el aspecto de los pictogramas, las cuales principalmente se deben a los criterios 2 y 4 de la herramienta. En el criterio 2 se pondera si la metodología es multielemental o no, mientras que en el criterio 4 la posibilidad de realizar la preparación de muestras de forma simultánea a varias muestras, aspectos ambos de relevancia en la practicidad de una metodología. Mientras que la metodología basada en ETAAS es unielemental y no requiere preparación de muestra, la metodología FI-MP AES es multielemental, pero requiere un

ajuste de pH el cual no es posible realizar de forma simultánea a varias muestras.

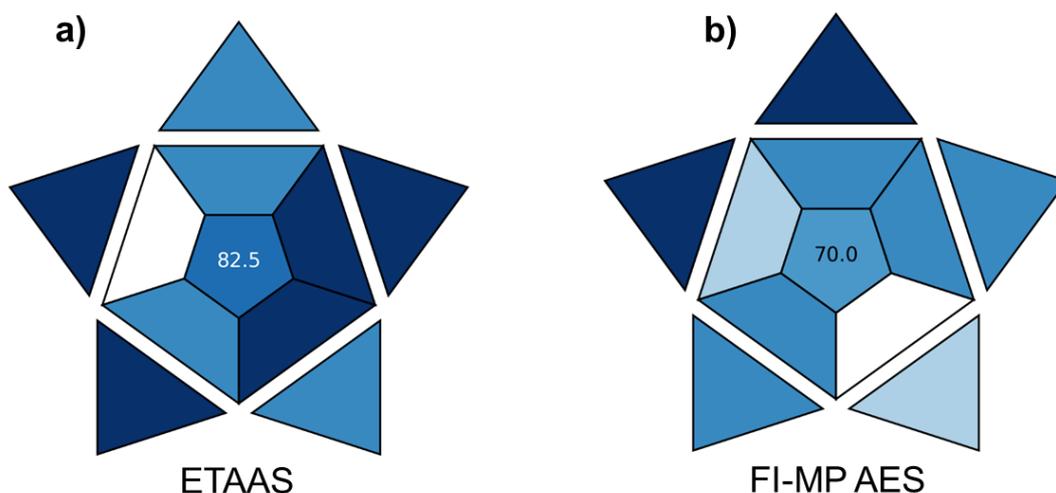


Figura 56 Resultado de evaluación mediante BAGI a) ETAAS, b) FI-MP AES

A través de la utilización de *Analytical Eco-Scale*, AGREE, QAB y BAGI se realizó una evaluación integral de varios aspectos de importancia de la metodología analítica propuesta en la tesis para la determinación de Cu y Mn en agua (FI- MP AES) y de la metodología de referencia. Solamente AGREE fue capaz de marcar diferencias entre las mismas, asociadas principalmente a la utilización de un sistema en flujo y MP AES.

Matriz: Alimento para ganado

Cobre y Manganeseo

En el caso de las pasturas y reservas forrajeras para la evaluación se utilizó *Analytical Eco-Scale*, AGREE y AGREEprep así como también QAB. Se comparon las metodologías propuestas mediante EDXRF vs Digestión asistida mediante MW y determinación mediante FAAS (basado en AOAC 999.10) para la determinación de Cu y Mn.

Mediante *Analytical Eco-Scale* se verificó el cumplimiento de los lineamientos de la QAV en las metodologías para la determinación de Cu y Mn en alimento para ganado, relacionadas con este trabajo de tesis. Las **Tabla 32** y **Tabla 33** muestran los resultados alcanzados. Mientras que la metodología propuesta

(EDXRF) obtuvo un puntaje mayor a 75, por lo que presentan un desempeño verde excelente, para la metodología de referencia (AOAC 999.10) el desempeño verde fue aceptable (Gałuszka, Konieczka, Migaszewski, & Namieśnik, 2012). En base a lo anterior, *Analytical Eco-Scale* permite remarcar las ventajas asociadas a la metodología EDXRF propuesta (sin pretratamiento de muestra y análisis multielemental) y mostrar como las mismas impactan en el perfil greenness.

Tabla 32 Resultado de evaluación mediante Eco-Scale- metodología Digestión+FAAS

Reactivos	Puntos de penalización
Estándar Cu/Mn	3
HNO ₃ 14 mol L ⁻¹	1(cantidad)*4(peligrosidad)
H ₂ O ₂	1(cantidad)*4(peligrosidad)
Acetileno	3
Instrumentos	
Digestor de MW	1
AAS	1
Peligro ocupacional (vapores/gases)	3
Desechos	5(cantidad)+3(sin tratamiento)
SUMATORIA	27
100-27=73	Análisis Verde Aceptable

Tabla 33 Resultado de evaluación mediante Eco-Scale- metodología EDXRF

Reactivos	Puntos de penalización
CRM Material Vegetal	0
Instrumentos	
EDXRF	0
Peligro ocupacional (vapores/gases)	0
Desechos	1(cantidad)+1(degradación)
SUMATORIA	2
100-2=98	Análisis Verde Excelente

En las **Figura 57** y **Figura 58** se muestran los pictogramas de las evaluaciones realizadas mediante AGREE y AGREEprep respectivamente. En el caso de los resultados obtenidos mediante la herramienta métrica AGREE, la metodología propuesta mediante EDXRF es más Greenness, de acuerdo al puntaje obtenido de 0,75 mayor a 0,4 y un centro del pictograma de color verde (Pena-Pereira, Wojnowski, & Tobiszewski, 2020). En los pictogramas las mayores diferencias se encuentran entre los criterios 7 y 12, debido principalmente a la ausencia de reactivos en las metodologías EDXRF propuestas. AGREEprep evidencia una mayor diferencia en el abordaje de la QAV entre las metodologías comparadas (0,65 vs 0,19 puntos), lo cual se encontraba dentro del resultado esperado. De acuerdo con lo explicado con anterioridad, AGREEprep se enfoca en la etapa de preparación de muestras, y es en esta etapa donde existen mayores diferencias entre las metodologías comparadas. Mientras la preparación de muestras para el análisis mediante EDXRF es sencillo y rápido (secado, molienda y prensado), la metodología clásica implica secado, molienda y digestión asistida mediante MW. Esta última etapa implica la utilización de reactivos, con los peligros asociados y mayor generación de residuos, aspectos responsables de las mayores diferencias en la evaluación.

Aunque ambas herramientas métricas evidencian una diferencia en el *greenness* de las metodologías comparadas, se considera que, en este caso AGREEprep es más adecuada para evaluar o presentar el perfil *greenness* de las metodologías en estudio. Esto debe a que las principales diferencias se encuentran en la preparación de muestras, tal como fue mencionado anteriormente.

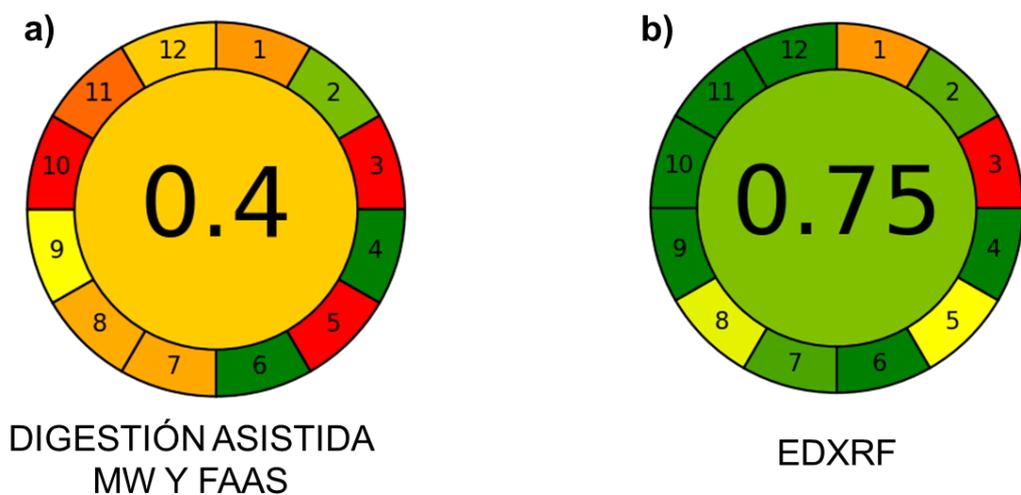


Figura 57 Resultado de evaluación mediante AGREE a) Digestión mediante MW y FAAS, b) EDXRF

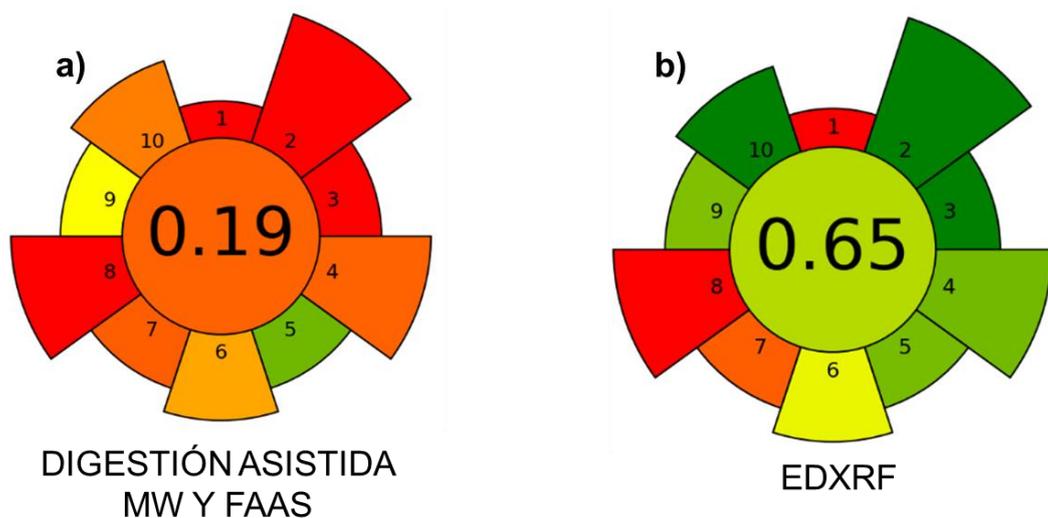


Figura 58 Resultado de evaluación mediante AGREEprep a) Digestión mediante MW y FAAS, b) EDXRF

En este caso los resultados obtenidos de las evaluaciones realizadas mediante *Analytical Eco-Scale*, AGREE y AGREEprep concuerdan en que el *greenness* de la metodología EDXRF propuesta es mayor que para la metodología de referencia. Todas las herramientas de QAV utilizadas logran remarcar el mejor ajuste a los lineamientos de la QAV al trabajar directamente al estado sólido.

De igual forma que para la matriz agua, la estrategia utilizada en el transcurso

de este trabajo de tesis para el desarrollo de una metodología mediante EDXRF para la determinación de Cu y Mn en alimento para ganado fue acertada desde el abordaje de la Química Analítica Verde de acuerdo a *Analytical Eco-Scale* y las métricas AGREE y AGREEprep, tal como se demostró recientemente.

Al realizar la evaluación y posterior comparación de la metodología propuesta EDXRF vs la metodología de referencia (FAAS), para la determinación de Cu y Mn en alimento para ganado, desde el enfoque holístico de la QAB se observan diferencias en los resultados de la evaluación, aunque las mismas no son de gran relevancia (**Figura 59**). En términos generales la blancura de ambas metodologías es similar. Las mayores diferencias se observan al evaluar por separado cada uno de los aspectos de la QAB. En este caso, en los aspectos verde y azul (practicidad/costo económico) es donde existen las mayores diferencias a favor de la metodología EDXRF. La razón de un mejor desempeño de la metodología propuesta, en el aspecto verde y azul se debe a ventajas asociadas a la posibilidad de realizar determinaciones directamente al estado sólido, característica inherente a la técnica de EDXRF. Al no ser necesario realizar una digestión asistida mediante MW (o un pretratamiento similar) las determinaciones se realizan en menor tiempo, sin consumo de reactivos y sin generación de residuos, todo lo cual influye en el aspecto verde y azul de la metodología.

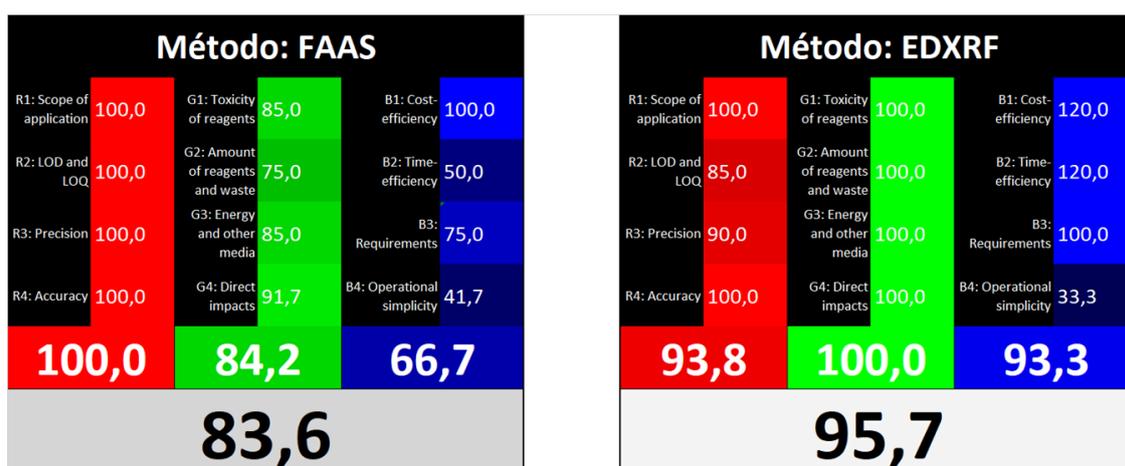


Figura 59 Resultado de evaluación mediante QAB para los métodos FAAS y EDXRF

La herramienta BAGI aplicada a las metodologías para el análisis de Cu y Mn en

pasturas y reservas forrajeras, indica que ambas pueden ser consideradas metodologías “prácticas”, al obtener un puntaje mayor o igual a 60, tal como se muestra en la **Figura 60** (Manousi, Wojnowski, Płotka-Wasyłkac, & Samanidou, 2023). La metodología propuesta (EDXRF) presenta un puntaje mayor principalmente debido a que es una metodología multielemental y la preparación de muestra necesaria es muy sencilla (secar, moler y prensar), aspectos que son evaluados en los criterios 2 y 5. De acuerdo a BAGI la metodología desarrollada en este trabajo de tesis para la determinación de Cu y Mn en alimento para ganado, mediante EDXRF posee una ventaja adicional frente a la metodología de referencia.

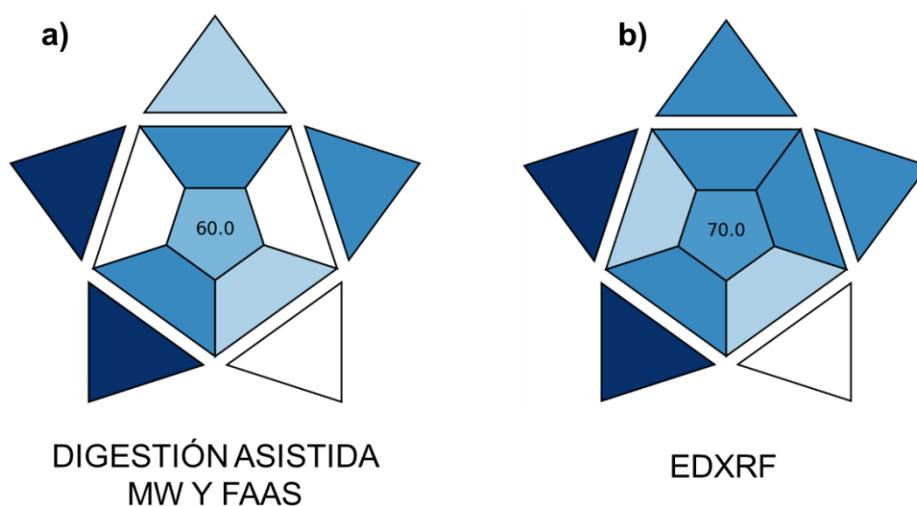


Figura 60 Resultado de evaluación mediante BAGI a) Digestión mediante MW y FAAS, b) EDXRF

Mediante la utilización de varias herramientas como ser *Analytical Eco-Scale*, AGREE, AGREEprep, QAB y BAGI fue posible realizar una evaluación integral de varios aspectos de la metodología EDXRF (propuesta en la tesis) para la determinación de Cu y Mn en pasturas y reservas forrajeras y comparar los resultados con los obtenidos para la metodología de referencia (FAAS). Todas las herramientas empleadas fueron capaces de evidenciar diferencias a favor de la metodología propuesta, indicando de esta forma que la estrategia utilizada al realizar determinaciones directamente al estado sólido fue acertada.

Selenio

En el caso del Se en alimento para ganado para la evaluación se utilizó *Analytical Eco-Scale*, AGREE, QAB así como también BAGI, comparando la determinación mediante HG-MP AES (metodología propuesta) vs ICP-MS (metodología de referencia).

La evaluación del Greenness de la metodología HG-MP AES y su comparación con la metodología de referencia comenzó aplicando *Analytical Eco-Scale* (Gałuszka, Konieczka, Migaszewski, & Namies´nik, 2012). En la **Tabla 34** y **Tabla 35** se presentan los resultados. De las mismas se desprende que ambas metodologías poseen un desempeño verde adecuado, aunque con ciertas diferencias en el concepto general. Las mismas se deben principalmente a la etapa de reducción necesaria en la metodología HG-MP AES, que implica reactivos y sus peligros asociados y la utilización de plancha calefactora (consumo energético).

Tabla 34 Resultado de evaluación mediante Eco-Scale- metodología ICP-MS

Reactivos	Puntos de penalización
Estándar Se	1(cantidad)*2(peligrosidad)
HNO ₃ 14 mol L ⁻¹	1(cantidad)*4(peligrosidad)
H ₂ O ₂	1(cantidad)*4(peligrosidad)
Instrumentos	
Digestor de MW	1
ICP-MS	1
Peligro ocupacional (vapores/gases)	3
Desechos	5(cantidad)+3(sin tratamiento)
SUMATORIA	23
100-23=77	Análisis Verde Excelente

Tabla 35 Resultado de evaluación mediante Eco-Scale- metodología HG-MP AES

Reactivos	Puntos de penalización
Estándar Se	1(cantidad)*2(peligrosidad)
HNO ₃ 14 mol L ⁻¹	1(cantidad)*4(peligrosidad)
HCl 12 mol L ⁻¹	1(cantidad)*(4(peligrosidad)+ 1(peligrosidad))
NaBH ₄	1(cantidad)*(8(peligrosidad)+ 1(peligrosidad))
Instrumentos	
Digestor de MW	1
MP AES	1
Plancha calefactora	2
Peligro ocupacional (vapores/gases)	3
Desechos	5(cantidad)+3(sin tratamiento)
SUMATORIA	35
100-35=65	Análisis Verde Aceptable

En la **Figura 61** se muestran los pictogramas obtenidos al aplicar la métrica AGREE a las metodologías para la determinación de Se en alimento para ganado (HG-MP AES y ICP-MS). En los mismos se puede apreciar que ninguna de las metodologías analíticas posee un *Greenness* adecuado, ya que el centro de los pictogramas no es verde en ninguno de los casos (Pena-Pereira, Wojnowski, & Tobiszewski, 2020). Esto se debe a aspectos relacionados con la necesidad de un tratamiento de muestra, en este caso digestión asistida mediante MW. Esta etapa del proceso de análisis implica tiempo, reactivos (peligros asociados), generalmente mayor generación de residuos y no posibilita realizar análisis in situ, aspectos todos negativos desde el punto de vista de la QAV. Igualmente, la diferencia en el puntaje que se aprecia, se debe a ciertas características de la técnica de ICP-MS, como ser la capacidad multielemental y rapidez de la misma. Además, la determinación mediante HG-MP AES implica una reducción previa, la cual insume tiempo y el uso de ácido clorhídrico concentrado.

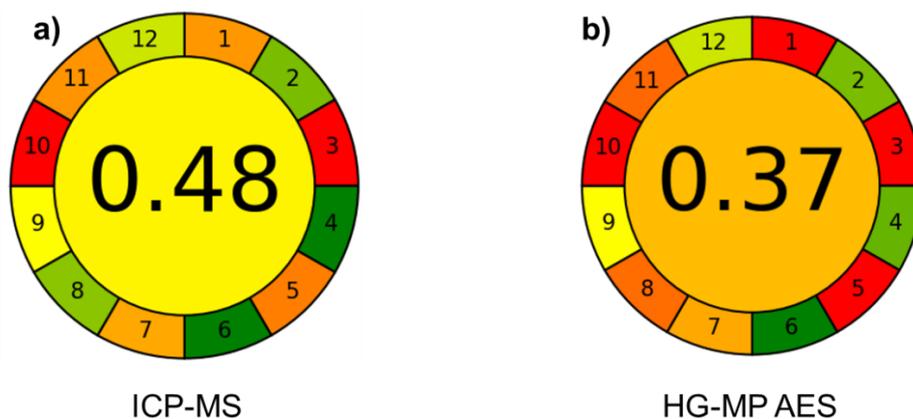


Figura 61 Resultado de evaluación mediante AGREE a) ICP-MS, b) HG-MP AES

Mientras que para *Analytical Eco-Scale*, ambas metodologías tienen un desempeño verde adecuado o excelente, para AGREE el desempeño verde es inadecuado en ambas metodologías, ya que el centro del pictograma no es de color verde. Esta discrepancia entre los resultados obtenidos mediante *Analytical Eco-Scale* y AGREE posiblemente se deba a ciertos ítems considerados por AGREE y no por *Analytical Eco-Scale*, como ser posibilidad de análisis *in situ* (portable) y análisis automatizado/miniaturizado. Ítems considerados en los criterios 1, 3 y 5 de AGREE, los cuales influyen negativamente en la evaluación realizada mediante AGREE y no son considerados en *Analytical Eco-Scale*. Debido a la discrepancia observada entre los resultados de la evaluación del *Greenness* al aplicar *Analytical Eco-Scale* y AGREE para las metodologías de determinación de Se en alimento para ganado, se decide aplicar una herramienta métrica adicional, GAPI (Płotka-Wasyłka J. , 2018). Se aplica GAPI y no ComplexGAPI debido que este último presenta criterios de evaluación adicionales enfocados en metodologías analíticas que constan de etapas previas al análisis, como puede ser la síntesis de un reactivo particular y ese no es el caso de las metodologías a evaluar (Płotka-Wasyłka & Wojnowski, 2021).

La **Figura 62** presenta los resultados de la evaluación mediante GAPI de las metodologías de determinación de Se en alimento para ganado. De acuerdo a GAPI ninguna de las metodologías posee un *Greenness* adecuado, tal como se muestra en gran parte de los pentágonos de color rojo. En términos generales los resultados obtenidos entre AGREE y GAPI son coherentes ya que para

ambos ninguna de las metodologías presenta un *Greenness* adecuado. Además, en GAPI es fácilmente detectable los puntos débiles de cada metodología en relación a la QAV. A modo de ejemplo, el pentágono central en ambos casos es de color rojo ya que ambas metodologías requieren una etapa de preparación de muestras como la digestión asistida mediante radiación MW, criterio evaluado o representado en este pentágono. La única diferencia se encuentra en el pentágono relacionado con la preparación de muestras debido a que la metodología HG-MP AES requiere de la etapa de reducción química previa.

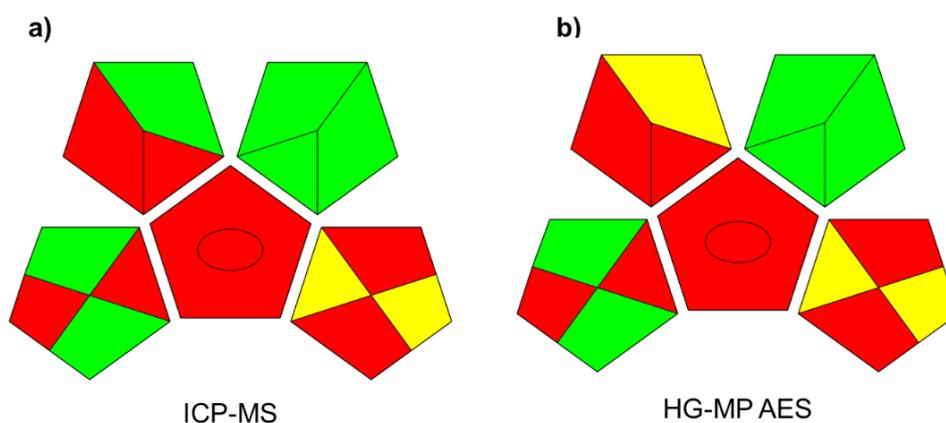


Figura 62 Resultado de evaluación mediante GAPI a) ICP-MS, b) HG MP AES

Al evaluar y comparar desde el enfoque holístico de la QAB, la metodología HG-MP AES (metodología propuesta) e ICP-MS (metodología de referencia), para la determinación de Se en pasturas y reservas forrajeras, se observan diferencias en los resultados de la evaluación. La blancura de la metodología de referencia (ICP-MS) es mayor en comparación a HG-MP AES. Las principales razones de las diferencias encontradas se deben al consumo de reactivos y tiempo de la reducción necesaria en la metodología propuesta, que influyen en los aspectos verde y azul de la evaluación (**Figura 63**) (Nowak, Wietecha-Postuszny, & Pawliszyn, 2021).

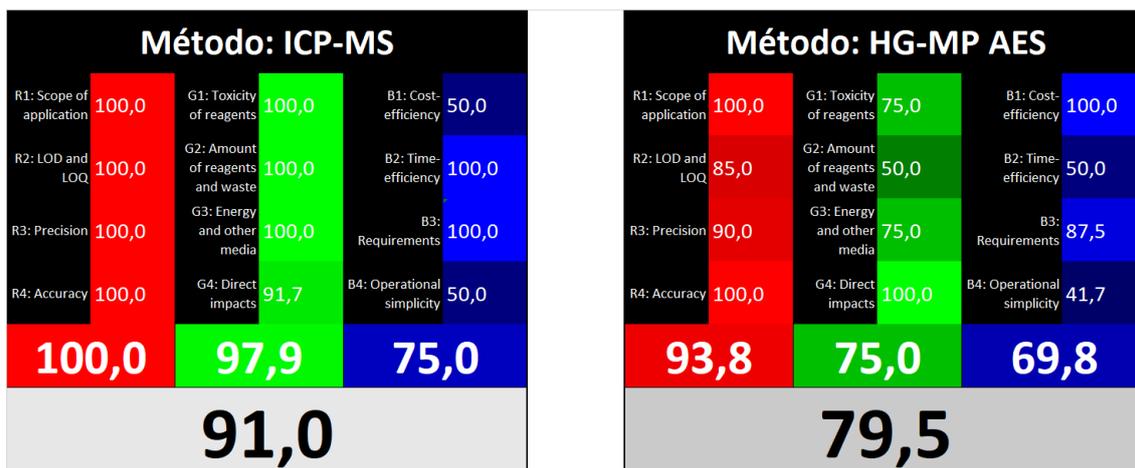


Figura 63 Resultado de evaluación mediante QAB para los métodos ICP-MS y HG-MP AES

Al evaluar y comparar la practicidad (aspecto azul) de la metodología HG-MP AES propuesta y la metodología de referencia (ICP-MS), mediante la aplicación de la herramienta BAGI, se observa que ambas obtienen un puntaje mayor o igual a 60 (**Figura 64**) con lo cual ambas se pueden considerar metodologías “prácticas” (Manousi, Wojnowski, Płotka-Wasyłkac, & Samanidou, 2023). Igualmente es posible observar diferencias tanto en el puntaje global como así también en el aspecto de los pictogramas obtenidos. Las razones de las diferencias son los criterios 1, 2 y 3 de la herramienta BAGI. En el criterio 1 se indica si la técnica es cualitativa, cuantitativa o confirmatoria, ICP-MS es confirmatoria, razón por lo cual se le asigna el máximo puntaje del criterio. En el criterio 2 se pondera si la metodología es multielemental como es el caso del ICP-MS o es unielemental como HG-MP AES. El criterio 3 hace alusión al costo del equipamiento, mediante la indicación de lo sofisticado del mismo.

En términos generales la evaluación realizada con BAGI se encuentra en concordancia con la realizada en el aspecto azul de QAB.

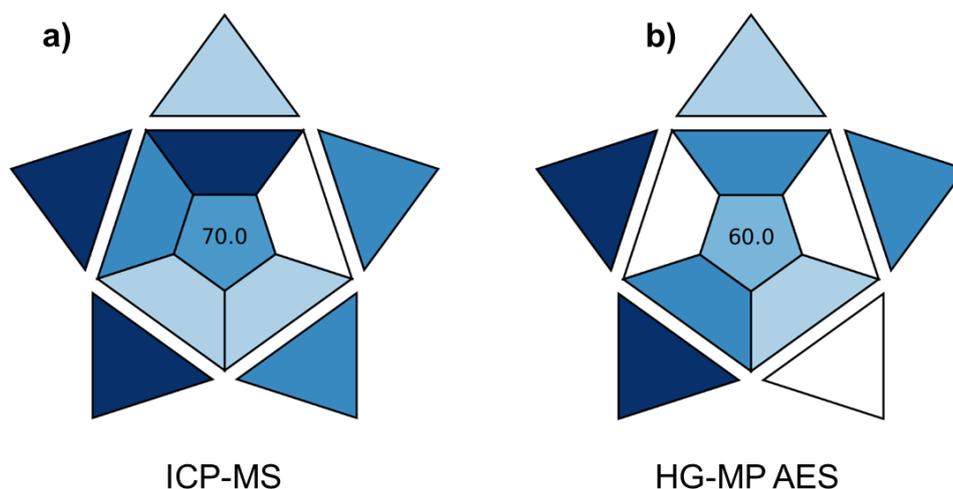


Figura 64 Resultado de evaluación mediante BAGI a) ICP-MS, b) HG-MP AES

Para todas las evaluaciones realizadas mediante AGREE y AGREEprep, el peso inherente de cada criterio en el resultado final fue establecido de acuerdo con los valores predefinidos por cada una de las herramientas métricas.

Desde mi perspectiva, todas las herramientas de QAV, QAB y BAGI, utilizadas presentan cierta subjetividad, por lo que requieren experiencia por parte del usuario al momento de aplicar y evaluar los resultados obtenidos. Nowak et al, realizaron evaluaciones globales del *Greenness* de técnicas cromatográficas empleando algoritmos matemáticos de forma de reducir la subjetividad de la evaluación (Nowak, Kościelniak, Tobiszewski, Ballester-Caudet, & Campíns-Falcó, 2020). Sin embargo, entiendo es necesario disponer de herramientas más sencillas de evaluación global e integral para afianzar y expandir la necesidad de realizar estudios de QAV y QAB. De esta forma poder contribuir con el Proyecto IUPAC (2021-015-2-500) “*Greenness of Official Standard Sample Preparation Methods*” así como también con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda 2030 de las Naciones Unidas para el Desarrollo Sostenible.

En los **ANEXOS III y IV** se presentan los Reportes de las evaluaciones realizadas mediante AGREE, AGREEprep, GAPI y BAGI para cada una de las metodologías analíticas.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

Se desarrolló un sistema novedoso mediante análisis en flujo para la preconcentración en línea y determinación simultánea de Cu y Mn en muestras de agua, mediante MP AES, empleando una minicolumna empacada con fibra de sisal (*Agave sisalana*) (FI-MP AES). El uso de fibra de sisal como biosorbente fue muy eficiente rindiendo hasta 350 determinaciones antes de requerir regeneración o sustitución del empaquetamiento. Además, no fue necesario ningún reactivo adicional para funcionalizar el biosorbente pasando a ser este hallazgo original frente a lo que indicaba la bibliografía hasta el momento. El método desarrollado y validado resultó sencillo y brindó resultados comparables estadísticamente con el método de referencia (ETAAS), por lo que es adecuado para fines de monitoreo de Cu y Mn en muestras de agua, de acuerdo a la legislación vigente.

Si bien no fue posible la aplicación del sistema FI-MP AES para la determinación de Cu y Mn en muestras de pasturas y reservas forrajeras debido a limitaciones instrumentales, se demostró que la fibra de sisal (*Agave sisalana*) es adecuada como biosorbente para la preconcentración de estos analitos en este tipo de muestras. Esto quedó demostrado utilizando espectrometría de absorción atómica de llama.

Mediante la técnica de EDXRF fue posible desarrollar y validar una metodología analítica para la determinación de Cu y Mn en alimento para ganado directamente sobre las muestras sólidas. Al poder trabajar directamente al estado sólido no fue necesario realizar tratamientos de muestra drásticos, como puede ser la digestión mediante MW. El uso de EDXRF disminuye tiempo de análisis, la utilización de reactivos peligrosos y generación de residuos. Además, se demostró que el método de parámetros fundamentales se puede utilizar para la cuantificación de los analitos sin la utilización de estándares externos. De esta forma queda disponible para el sector productivo un método sencillo, rápido y económico para la determinación de Cu y Mn en pasturas y reservas forrajeras,

el cual puede ser de utilidad al momento de la toma de decisiones relativas a la alimentación o sanidad del ganado.

Se desarrolló un método analítico la determinación de Se en alimento para ganado (pasturas y reservas forrajeras) mediante generación de hidruros acoplada a espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (HG-MP AES). Esta aplicación es original respecto a lo reportado en artículos científicos hasta el momento. Los resultados obtenidos con este método resultaron consistentes con los obtenidos mediante ICP-MS (*gold technique*).

La totalidad de los métodos analíticos propuestos en el presente trabajo de tesis fueron validados de forma satisfactoria según los lineamientos de las Guía Eurachem y con los criterios de validación sugeridos en la AOAC. En todos los casos los parámetros de desempeño resultaron adecuados para todas las propuestas presentadas.

Mediante diferentes herramientas de evaluación se determinó cuán verde (*greenness*) o blanco (*whiteness*) fueron los métodos desarrollados. Todas las propuestas desarrolladas en esta tesis se compararon con las metodologías de referencia utilizando estas herramientas de evaluación. Adicionalmente se aplicó BAGI de forma de evaluar la practicidad (aspecto azul) de todas las metodologías analíticas utilizadas. De esta forma fue posible realizar una evaluación exhaustiva y muy completa no solo del verdor de las metodologías sino una evaluación holística. En varios casos, las herramientas utilizadas dejaron en evidencia ventajas contundentes asociadas a la utilización de las técnicas instrumentales seleccionadas como ser MP AES y EDRXF. Igualmente es necesario que se desarrolle por parte de la comunidad científica una herramienta integral, sencilla y objetiva que posibilite este tipo de evaluaciones y así contribuir con los ODS de la Agenda 2030 de las Naciones Unidas.

Perspectivas

Debido a la importancia de la actividad agropecuaria para nuestro país, tal como fue mencionado con anterioridad, un futuro trabajo podría estar relacionado con la relación entre la concentración de un mineral en el suelo, y el contenido del

mismo en un cultivo (ejemplo Alfafa (*Medicago sativa*)) y su crecimiento. Para este trabajo las técnicas analíticas (MP AES y EDXRF) aplicadas durante la tesis serían de utilidad.

Dadas las ventajas expuestas relacionadas con la técnica de EDXRF y su posibilidad de trabajar directamente sobre muestras sólidas, sería interesante expandir la forma de trabajo, realizada durante la presente tesis, a otros alimentos para animales, ejemplo mascotas, así como también para frutas y hortalizas de consumo humano entre otras. Además, ampliar la cantidad de analitos a determinar en las matrices anteriormente mencionadas. Si bien es una técnica ampliamente utilizada para análisis elemental, no es considerada, por el momento, adecuada para análisis de elementos traza, esta tesis demuestra que tiene buen potencial que se puede seguir desafiando y explorando.

En base a la actualidad y relevancia de la Química Analítica Verde, otra perspectiva está relacionada con la búsqueda de una herramienta métrica o un conjunto de herramientas de forma de poder realizar una evaluación sencilla, objetiva, holística y global de una metodología analítica.

CAPÍTULO 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agilent Technologies. (2016). *Agilent Technologies*. Recuperado el 16 de 02 de 2024, de http://www.agilent.com/cs/library/training/public/Agilent_Maritime_Seminar_MPAES_Presentation.pdf
- Anastas, P., & Warner, J. (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*. Oxford: Oxford University Press.
- AOAC. (2019). *Official Methods Of Analysis of AOAC International* (21st edn. ed.).
- APHA, American Public Health Association. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22nd.
- Armenta, S., Garrigues, S., Esteve-Turrillas, F., & de la Guardia, M. (2019). Green extraction techniques in green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 248-253. doi:10.1016/j.trac.2019.03.016
- Arruda, M.A.Z. (2006). *Trends in Sample Preparation*. New York: Nova Science Publishers.
- ASTM, American Society for Testing and Materials. (2018). *D1193 Standard Specification for Reagent Water*.
- Bakircioglu, D., Bakircioglu Kurtulus, Y., & Ucar, G. (2011). Determination of some traces metal levels in cheese samples packaged in plastic and tin containers by ICP-OES after dry, wet and microwave digestion. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), 202-207. doi:10.1016/j.fct.2010.10.017
- Bakircioglu, Y., Bakircioglu, D., & Akman, S. (2003). Solid Phase Extraction of Bismuth and Chromium by Rice Husk. *Journal of Trace and Microprobe Techniques*, 467(21:3), 467-478. doi:10.1081/TMA-120023063
- Balaram, V. (2020). Microwave plasma atomic emission spectrometry (MP-AES) and its applications – A critical review. *Microchemical Journal*, 159. doi:10.1016/j.microc.2020.105483
- Ballester-Caudet, A., Campíns-Falcó, P., Pérez, B., Sancho, R., Lorente, M., Sastre, G., & González, C. (2019). A new tool for evaluating and/or selecting analytical methods: Summarizing the information in a hexagon. *Trends in Analytical Chemistry*, 118, 538-547. doi:10.1016/j.trac.2019.06.015
- Beaty, R., & Kerber, J. (1993). *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry* (Second ed.).
- Beckhoff, B., Kanngießner, B., Langhoff, N., Wedell, R., & Wolff, H. (2006). *Handbook of Practical X-Ray Fluorescence Analysis*. Springer.
- Bendicho, C., De La Calle, I., Pena, F., Costas, M., Cabaleiro, N., & Lavilla, I. (2012). Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 31, 50-60. doi:10.1016/j.trac.2011.06.018

- Berzaghi, P., Lotto, A., Mancinelli, M., & Benozzo, F. (2018). Rapid mineral determination in forages by X-ray fluorescence. *Journal of Dairy Science*, *101*(1), 1-4. doi:10.3168/jds.2018-14740
- Bizzi, C., Flores, E., Nóbrega, J., Oliveira, J., Schmidt, L., & Mortari, S. (2014). Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 332-338. doi:10.1039/c3ja50330e
- Brune, V., Pioda, C., Viera, I., Irigoyen, J., Dol, I., Facchin, G., . . . Torre, M. (2013). Grass as a biomonitor: impact of copper supplementation in the environment. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, *9*, 410-415.
- Cabrera, M., Ramos, A., Saadum, A., & Brito, G. (2010). Selenium, cooper, zinc, iron and manganese content of seven meats cuts from Hereford and Braford steers fed pasture in Uruguay. *Meat Science*, *84*(3), 518-528. doi:10.1016/j.meatsci.2009.10.007
- Carrasco-Letelier, L., Giannitti, F., & Caffarena, D. (2016). Calidad del agua para la producción animal. *Revista INIA*, 35-37.
- Carrquiry Ebbeler, R. (2017). Suplementación mineral selectiva (Parte 1). *Revista Plan Agropecuario*, 46-48.
- Carrquiry Ebbeler, R. (2017). Suplementación mineral selectiva (Parte2). *Revista Plan Agropecuario*, 42-44.
- Carrquiry Ebbeler, R., & Frade Peralta, S. (2017). Estudio de la nutrición mineral de bovinos sobre pasturas naturales del Uruguay. Información útil para definir y ajustar la suplementación mineral en los predios. *Revista Plan Agropecuario*, *164*, 30-32.
- CEM, Centro Español de Metrología. (2012). *Vocabulario Internacional de Metrología - Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados*. tercera ed. Recuperado el 17 de enero de 2024, de <https://www.cem.es/es/divulgacion/documentos/vocabulario-internacional-metrologia-vim-3a-edicion-2012-espanol>
- Cerdá, A., & Cerdá, V. (2009). *An introduction to flow analysis*. Sciware S.L.
- Černohorský, T., Pouzar, M., & Jakubec, K. (2006). ED XRF analysis of precious metallic alloys with the use of combined FP method. *Talanta*, *69*(3), 538-541. doi:10.1016/j.talanta.2005.11.002
- Chalkling, D. (2007). Revista INIA. *Serie Actividades de Difusión N°483 Ensilaje Grano Húmedo*. Recuperado el 01 de 04 de 2019, de http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/ad/ad_483.pdf
- Council, N. R. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. National Academy Press.
- D'Ulivo, A., Dědina, J., Mester, Z., Sturgeon, R., Wang, Q., & Welz, B. (2011). Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, *83*(6), 1283-1340. doi:doi:10.1351/PAC-REP-09-10-03
- de Souza Dias, F., Bonsucesso, J., Oliveira, L., & dos Santos, W. (2012). Preconcentration and determination of copper in tobacco leaves samples

- by using a minicolumn of sisal fiber (*Agave sisalana*) loaded with Alizarin fluorine blue by FAAS. *Talanta*, 89, 276-279. doi:10.1016/j.talanta.2011.12.027
- de Souza Días, F., Santana Bonsucesso, J., Suzart Alves, L., Correia da Silva Filho, D., Spínola Costa, A., & Lopes dos Santos, W. (2013). Development and optimization of analytical method for the determination of cadmium from mineral water samples by off-line. *Microchemical Journal*, 106, 363-367.
- Dědina, J., & Tsalev, D. (1995). *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*. Wiley.
- Deshwal, G., Gómez-Mascaraque, L., Fenelon, M., & Huppertz, T. (2023). Determination of Minerals in Soft and Hard Cheese Varieties by ICP-OES: A Comparison of Digestion Methods. *Molecules*, 28(10). doi:10.3390/molecules28103988
- dos Santos, W., Dias Cavalcante, D., Paranhos da Silva, E., das Virgens, C., & de Souza Dias, F. (2011). Biosorption of Pb(II) and Cd(II) ions by *Agave sisalana* (sisal fiber). *Microchemical Journal*, 97, 269-273. doi:10.1016/j.microc.2010.09.014
- Escudero, L., Ávila Maniero, M., Agostini, E., & Smichowski, P. (2016). Biological substrates: Green alternatives in trace elemental preconcentration and speciation analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 80, 531-546. doi:10.1016/j.trac.2016.04.002
- Fang, Z. (1993). *Flow Injection Separation and Preconcentration*. Weinheim: VCH.
- Fontoura, B., Cora Jofré, F., Williams, T., Savio, M., Donati, G., & Nóbrega, J. (2022). Is MIP-OES a suitable alternative to ICP-OES for trace element analysis? *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 37(5), 966-984. doi:10.1039/D1JA00375E
- Gałuszka, A., Konieczka, P., Migaszewski, Z., & Namieśnik, J. (2012). Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends in Analytical Chemistry*, 37. doi:10.1016/j.trac.2012.03.013
- Gałuszka, A., Migaszewski, Z., & Namieśnik, J. (2013). The 12 principles of Green analytical chemistry and the Significance mnemonic of Green analytical practices. *Trends in Analytical chemistry*, 50, 78-84.
- Giri Dev, V., Venugopal, J., Kumar, T., Miranda, L., & Ramakrishna, S. (2010). *Agave sisalana*, a biosorbent for the adsorption of Reactive Red 120 from aqueous solution. *The Journal of The Textile Institute*, 101, 414-422.
- Hefnway, A., & Pérez, J. (2008). Selenio y Salud Importancia, Deficiencia, Suplementación y Toxicidad. *Archivos de Ciencias Veterinarias e Zooloía da Unipar*, 11, 153-165.
- Horwitz, W., & Albert, R. (2006). The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 89(4), 1095-1109. doi:10.1093/jaoac/89.4.1095
- IMPO, Centro de Información Oficial. (2011). *Decreto 110/011 Modificación del Reglamento Bromatológico Nacional*. Recuperado el 12 de 12 de 2023, de <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/110-2011>

- Irigoyen, A. (2009). Rol de las reservas forrajeras en los sistemas ganaderos. *Revista Plan Agropecuario*, 46-52. Recuperado el 29 de 01 de 2024, de https://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R130/R_130_46.pdf
- IUPAC, International Union of Pure and Appl. Chem. (2021). *Project Details - IUPAC*. Recuperado el 28 de 02 de 2024, de <https://iupac.org/project/2021-015-2-500/>
- IUPAC, Unión Internacional de Química Pura y Aplic. (2023). *Compendium of Terminology in Analytical Chemistry*.
- Jenck. (2023). ¿Qué puedo hacer con un EDX y no lo sabía? *Material de Capacitación*.
- Jenkins, R. (1999). *X-Ray Fluorescence Spectrometry*. Wiley-Interscience.
- Keith, L., Gron, L., & Young, J. (2007). Green Analytical Methodologies. *Chemical Reviews*, 107(6), 2695-2708. doi:10.1021/cr068359e
- Koel, M. (2016). Do we need Green Analytical Chemistry? *Green Chemistry*, 18, 923-931. doi:10.1039/C5GC02156A
- Krug, F., & Piovezani Rocha, F. (2019). *Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar* (Segunda ed.). San Pablo: Sociedade Brasileira de Química.
- La Manna, A., Clariget, J., Juarena, M., & Giorello, D. (2023). Agua: el principal nutriente. *Revista INIA*, 26-30.
- Lagerström, M., & Ytreberg, E. (2021). Quantification of Cu and Zn in antifouling paint films by XRF. *Talanta*, 223. doi:10.1016/j.talanta.2020.121820
- Li, X., Yu, Z., Xu, J., Pan, Y., Bo, W., Liu, B., . . . Zhang, Q. (2020). The technique of high-pressure powder pressing with polyester film covering for XRF of geochemical samples. *X-Ray Spectrometry*, 1-11. doi:10.1002/xrs.3147
- Machado, I., Dol, I., Rodríguez-Arce, E., Cesio, M., & Pistón, M. (2016). Comparison of different sample treatments for the determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*). *Microchemical Journal*, 128, 128-133. doi:10.1016/j.microc.2016.04.016
- Machado, I., Faccio, R., & Pistón, M. (2019). Characterization of the effects involved in ultrasound-assisted extraction of trace elements from artichoke leaves and soybean seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 59. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.104752
- Machado, I., Faccio, R., & Pistón, M. (2019). Characterization of the effects involved in ultrasound-assisted extraction of trace elements from artichoke leaves and soybean seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 59. doi:10.1016/j.ultsonch.2019.104752
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods—A Laboratory Guide to Method Validation* (Second ed.). Obtenido de www.eurachem.org
- Manousi, N., Wojnowski, W., Płotka-Wasyłkac, J., & Samanidou, V. (2023). Blue applicability grade index (BAGI) and software: a new tool for the evaluation of method practicality. *Green Chemistry*, 25. doi:10.1039/d3gc02347h

- Marguí, E., Hidalgo, M., & Queralt, I. (2005). Multielemental fast analysis of vegetation samples by wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry: Possibilities and drawbacks. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60(9-10), 1363-1372. doi:10.1016/j.sab.2005.08.004
- Marguí, E., Queralt, I., & Hidalgo, M. (2009). Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(3). doi:10.1016/j.trac.2008.11.011
- Massart, D., Vandeginste, B., Buydens, L., De Jong, S., Lewi, P., & Smeyers-Verbeke, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Data Handling in Science and Technology* (Vol. 20A). Amsterdam: Elsevier Science.
- Mikheev, I., Karpukhina, E., Usol'tseva, L., Samarina, T., Volkov, D., & Proskurnin, M. (2017). Application of Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometry and Hydride Generation for Determination of Arsenic and Selenium in Mineral Water. *Inorganic Materials*, 53(14), 1422-1426. doi:10.1134/S0020168517140126
- Montes Narbondo, E., & Carriquiry Mendiola, E. (2022). Debemos prepararnos para faenar 3 millones de vacunos y lograr 770 mil toneladas de carne bovina. *Revista Plan Agropecuario*, 182, 32-34.
- Namieśnik, J., & Szefer, P. (2008). Preparing samples for analysis - The key to analytical success. *Ecological Chemistry and Engineering*, 15, 167-244. doi:10.1201/9781420082692-c19
- Nóbrega, J., Trevizan, L., Labuto, G., & Nogueira, A. (2002). Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. A review. *Spectrochimica Acta Part B*, 57, 1855-1876. doi:10.1016/S0584-8547(02)00172-6
- Nowak, P., Kościelniak, P., Tobiszewski, M., Ballester-Caudet, A., & Campíns-Falcó, P. (2020). Overview of the three multicriteria approaches applied to a global assessment of analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 133. doi:10.1016/j.trac.2020.116065
- Nowak, P., Wietecha-Posłuszny, R., & Pawliszyn, J. (2021). White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality. *Trends in Analytical Chemistry*, 138. doi:10.1016/j.trac.2021.116223
- NRC, National Research Council. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. National Academy Press.
- Ozbek, N., & Akman, S. (2016). Microwave plasma atomic emission spectrometric determination of Ca, K and Mg in various cheese varieties. *Food chemistry*, 192, 295-298. doi:10.1016/j.foodchem.2015.07.011
- Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., & Tobiszewski, M. (2020). AGREE-Analytical GREENess Metric Approach and Software. *Analytical Chemistry*, 92. doi:10.1021/acs.analchem.0c01887
- Pereira, M., Tissot, F., Faccio, R., Ibañez, F., & Pistón, M. (2021). A simple and economical ultrasound-assisted method for Cd and Pb extraction from

- fruits and vegetables for food safety assurance. *Results in Chemistry*, 3. doi:10.1016/j.rechem.2020.100089
- Pistón, M., Silva, J., Pérez-Zambra, R., Dol, I., & Knochen, M. (2012). Automated method for the determination of total arsenic and selenium in natural and drinking water by HG-AAS. *Environmental Geochemistry and Health*, 34, 273-278. doi:10.1007/s10653-011-9436-9
- Pistón, M., Silva, J., Suárez, A., Belluzzi, M., laquinta, F., Panizzolo, L., Ceminara, M. (2020). Estudio del Contenido de selenio en carne vacuna luego del proceso de cocción. *Innotec*, 19, 37-51.
- Pistón, M., Suárez, A., Bühl, V., Tissot, F., Silva, J., & Panizzolo, L. (2020). Influence of cooking processes on Cu, Fe, Mn, Ni, and Zn levels in beef cuts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 94. doi:10.1016/j.jfca.2020.103624
- Plotka-Wasyłka, J. (2018). A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. *Talanta*, 181, 204-209. doi:10.1016/j.talanta.2018.01.013
- Plotka-Wasyłka, J., & Wojnowski, W. (2021). Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. *Green Chemistry*, 23, 8657-8665. doi:10.1039/D1GC02318G
- Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. (2004). Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*, 23(9). doi:10.1016/j.trac.2004.06.006
- Raisbeck, M. (2020). Selenosis in Ruminants. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 36, 775-789.
- Revenko, A., & Pashkova, G. (2023). X-Ray Fluorescence Spectrometry: Current Status and Prospects o Development. *Journal of Analytical Chemistry*, 78(11), 1452-1468. doi:10.1134/S1061934823110072
- Rodríguez, A., & Banchemo, G. (2007). Deficiencia de Minerales en Rumiantes. *Revista INIA*, 11-15.
- Rodríguez, N., Silva, J., laquinta, F., & Pistón, M. (2023). Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de cadmio en cocoa en polvo y preparada con leche. Aplicación en productos del mercado local. *Innotec*, 25. doi:10.26461/25.0
- Rousseau, R. (1984). Fundamental algorithm between concentration and ontensity in XRF analysis 1 - Theory. *X-Ray Spectrometry*, 13(3), 115-120. doi:10.1002/xrs.1300130306
- Rubinson, K., & Rubinson, J. (2001). *Análisis Instrumental*. Madrid: Pearson Education.
- Ruzicka, J., & Hansen, H. (1975). Flow Injection Analysis Part I. A new concept of fast continuous Flow Analysis. *Analytica Chimica Acta*, 145-157.
- Sajid, M., & Plotka-Wasyłka, J. (2022). Green analytical chemistry metrics: A review. *Talanta*, 238. doi:10.1016/j.talanta.2021.123046
- Sherman, J. (1955). The theoretical derivation of fluorescent X-ray intensities from mixtures. *Spectrochimica Acta*, 7, 283-306. doi:10.1016/0371-1951(55)80041-0

- Shimadzu Corporation. (2021). *Brochure Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Spectrometer EDX 7200*. Recuperado el 16 de 02 de 2024, de https://www.shimadzu.eu/sites/shimadzu.seg/files/SEG-images/Products/EDX-7200/Overview/Brochure_EDX-7200_C142-E047.pdf
- Silva, J., & Pistón, M. (2023). Evaluation of Sisal Fiber as Biosorbent for online Preconcentration and Determination of Cu and Mn coupled to MP AES using the Analytical Greenness Metric Approach. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, 10(41), 73-79. doi:10.30744/brjac.2179-3425.TN-11-2023
- Silva, J., & Pistón, M. (2021). On-Line Preconcentration and Simultaneous Determination of Cu and Mn in Water Samples Using a Minicolumn Packed with Sisal Fiber by MIP OES. *Molecules*, 26. doi:10.3390/molecules26061662
- Silva, J., Bühl, V., laquinta, F., & Pistón, M. (2023). Should we think about green or white analytical chemistry? Case study: Accelerated sample preparation using an ultrasonic bath for the simultaneous determination of Mn and Fe in beef. *Heliyon*. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e20967
- Skoog, D., & Leary, J. (1995). *Análisis Instrumental* (Cuarta ed.).
- Skoog, D., Holler, F., & Crouch, S. (2008). *Principios de análisis instrumental*. México: Cengage Learning.
- Skoog, D., Holler, F., & Crouch, S. (2018). *Principios de Análisis Instrumental* (Séptima ed.). Cengage.
- Teixeira, L., Lemos, V., Melo Coelho, L., & Rocha, F. (2016). Applications of biosorbents in atomic spectrometry. *Applied Spectroscopy Reviews*, 51(1), 36-71.
- Thomsen, V. (2012). Spectral Background Radiation and the "Background Equivalent Concentration" in Elemental Spectrochemistry. *Spectroscopy*, 27(3).
- Tobiszewski, M., Mechlińska, A., Zygmunt, B., & Namieśnik, J. (2009). Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 943-951. doi:10.1016/j.trac.2009.06.001
- Torre, M., Viera, I., Facchin, G., Kremer, E., Baran, E., Porochin, T., . . . Fuentes, J. (2005). Incidence of hypocupraemia in cattle in northern Uruguay and its alleviation with an injected Cu–Phenylalanine complex. *Livestock Production Science*, 95, 49-56.
- Trojanowicz, M. (2000). *Flow injection Analysis Instrumentation and Applications*. World Scientific.
- Trojanowicz, M. (2008). *Advances in Flow Analysis*. Wiley-Vch.
- Ungerfeld., E. (1998). Factores que afectan el contenido de minerales en pasturas naturales y el estado nutricional de vacunos y ovinos en Uruguay. *Revista INIA*. Recuperado el 06 de Noviembre de 2023, de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/9495/1/Factores-que-afectan-el-contenido-UNGERFELD-1998.pdf>

- UNIT, Instituto Uruguayo de Normas Técnicas. (2008). *UNIT 833:2008 - Agua Potable Requisitos*.
- Uset, O., & Lazzaro, M. (2009). Informe Técnico INTA N°63 Reservas Forrajeras. Recuperado el 01 de 04 de 2019, de <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-reservas-forrajeras.pdf>
- Volker, T. (2007). Basic fundamental parameters in X-ray fuorescence. *Spectroscopy*, 22, 46-50.
- Williams, C., Jones, B., Donati, G., Amais, R., Fontoura, B., & Nóbrega, J. (2019). Recent developments in microwave-induced plasma optical emission spectrometry and applications of a commercial Hammer-cavity instrument. *Trends in Analytical Chemistry*, 116, 151-157. doi:10.1016/j.trac.2019.05.007
- Wojnowski, W., Tobiszewski, M., Pena-Pereira, F., & Psillakis, E. (2022). AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*, 149. doi:10.1016/j.trac.2022.116553
- XXI, U. (Octubre de 2020). *Uruguay XXI*. Recuperado el 06 de Noviembre de 2023, de Uruguay XXI: <https://www.uruguayxxi.gub.uy/uploads/informacion/38e9164aa995240bac0a959e37a8c16b438da067.pdf>
- XXI, U. (Octubre de 2022). *Uruguay XXI*. Recuperado el 29 de 01 de 2024, de Uruguay XXI: <http://www.uruguayxxi.gub.uy/uploads/informacion/b28305203e10f6d7bb3689eb619160dd922b2036.pdf>
- Yonghua, L., Wuyi, W., Kunli, L., & Hairong, L. (2008). Environmental behaviors of selenium in soil of typical selenosis area, China. *Journal of Environmental Sciences*, 859-864. doi:10.1016/S1001-0742(08)62138-5

CAPÍTULO 7. ANEXOS Y APÉNDICES

ANEXO I Procedimientos de muestreo

Pastura

- 1- Tomar 10 porciones de la pastura a muestrear, sin raíces y colocar en una bolsa de polietileno.
- 2- Cerrar la misma intentando quitar el aire.
- 3- Enviar de forma refrigerada

Fardo y Silopack

- 1- Tomar al menos 6 porciones del fardo o silopack a muestrear (a diferentes profundidades y en todas las caras).
- 2- Colocar en una bolsa de polietileno y cerrar la misma intentando quitar el aire.
- 3- Enviar de forma refrigerada

Ensilaje Planta Entera y Ensilaje Grano Húmedo

- 1- Tomar al menos 8 porciones del silobolsa a muestrear (a diferentes profundidades y en todas las caras).
- 2- Colocar las mismas en un balde limpio y mezclar.
- 3- Colocar en una bolsa de polietileno aproximadamente 500g, cerrar la misma intentando quitar el aire.
- 4- Enviar de forma refrigerada

ANEXO II Líneas de Código del software de control del sistema FI-MP AES

```
import serial
from time import sleep

s ='COM4'
comandoCarga = 'TO'
comandoElusion = 'TO'
tiempoCarga = 90
tiempoElusion = 90
veces = 3

def
ejecutarCiclo(s,comandoCarga,comandoElusion,tiempoCarga,tiempoElusion,ve
ces):
    for i in range(veces):
        enviar(s,comandoCarga,1)
        print('esperando '+str(tiempoCarga)+' s mientras carga')
        sleep(tiempoCarga)
        enviar(s,comandoElusion,1)
        print('esperando '+str(tiempoElusion)+' s mientras eluye')
        sleep(tiempoElusion)

def enviar(s,command,veces):
    ser = serial.Serial(s)
    for i in range(veces):
        end='\u000D'
        wr=command+end
        ser.write(wr.encode())
    ser.close()

ejecutarCiclo(s,comandoCarga,comandoElusion,tiempoCarga,tiempoElusion,ve
ces)
```

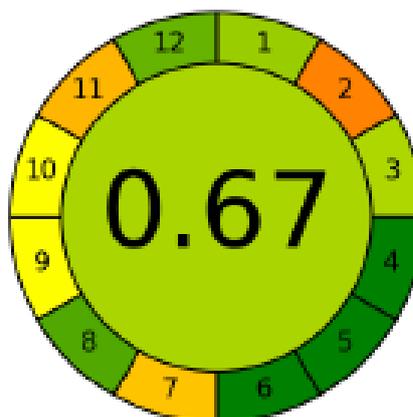
ANEXO III Reportes AGREE, AGREEprep y GAPI

Reportes AGREE

FI-MP AES – Agua

Analytical Greenness report sheet

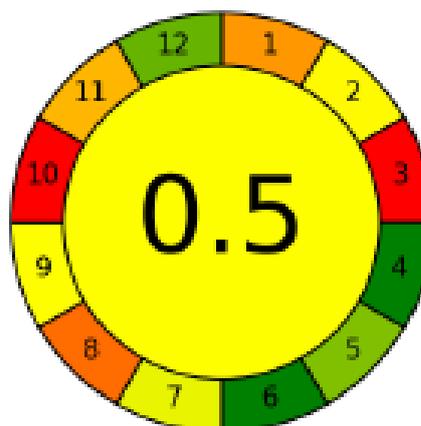
23/01/2024 12:15:05



Criteria	Score	Weight
1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment.	0.7	2
2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals.	0.26	2
3. If possible, measurements should be performed in situ.	0.66	2
4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents.	1.0	2
5. Automated and miniaturized methods should be selected.	1.0	2
6. Derivatization should be avoided.	1.0	2
7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided.	0.39	2
8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time.	0.84	2
9. The use of energy should be minimized.	0.5	2
10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred.	0.5	2
11. Toxic reagents should be eliminated or replaced.	0.36	2
12. Operator's safety should be increased.	0.8	2

Analytical Greenness report sheet

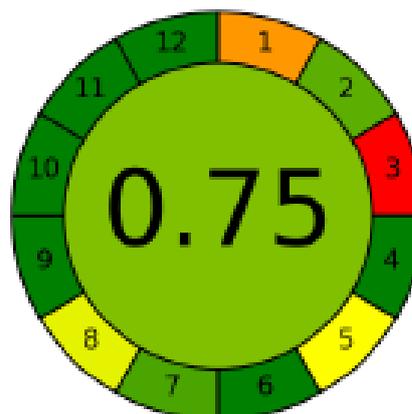
23/01/2024 12:18:22



Criteria	Score	Weight
1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment.	0.3	2
2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals.	0.49	2
3. If possible, measurements should be performed in situ.	0.0	2
4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents.	1.0	2
5. Automated and miniaturized methods should be selected.	0.75	2
6. Derivatization should be avoided.	1.0	2
7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided.	0.55	2
8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time.	0.22	2
9. The use of energy should be minimized.	0.5	2
10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred.	0.0	2
11. Toxic reagents should be eliminated or replaced.	0.36	2
12. Operator's safety should be increased.	0.8	2

Analytical Greenness report sheet

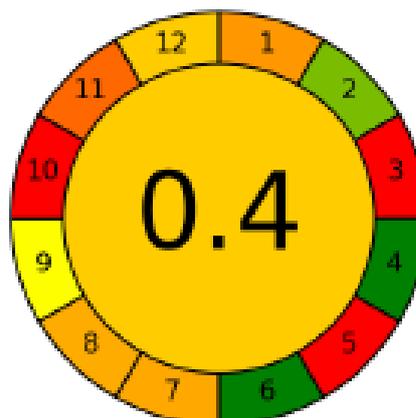
22/01/2024 11:28:16



Criteria	Score	Weight
1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment.	0.3	2
2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals.	0.82	2
3. If possible, measurements should be performed in situ.	0.0	2
4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents.	1.0	2
5. Automated and miniaturized methods should be selected.	0.5	2
6. Derivatization should be avoided.	1.0	2
7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided.	0.86	2
8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time.	0.55	2
9. The use of energy should be minimized.	1.0	2
10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred.	1.0	2
11. Toxic reagents should be eliminated or replaced.	1.0	2
12. Operator's safety should be increased.	1.0	2

Analytical Greenness report sheet

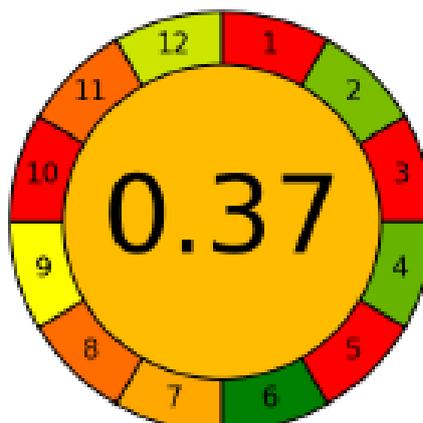
18/10/2023 10:42:05



Criteria	Score	Weight
1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment.	0.3	2
2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals.	0.76	2
3. If possible, measurements should be performed in situ.	0.0	2
4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents.	1.0	2
5. Automated and miniaturized methods should be selected.	0.0	2
6. Derivatization should be avoided.	1.0	2
7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided.	0.33	2
8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time.	0.34	2
9. The use of energy should be minimized.	0.5	2
10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred.	0.0	2
11. Toxic reagents should be eliminated or replaced.	0.2	2
12. Operator's safety should be increased.	0.4	2

Analytical Greenness report sheet

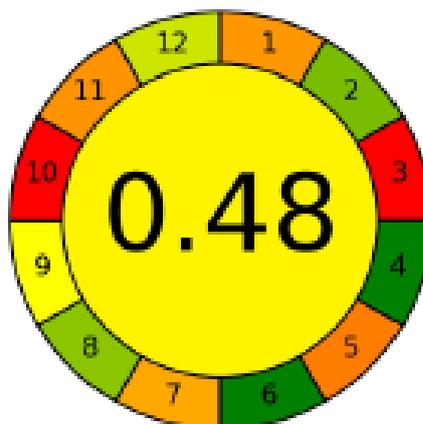
19/02/2024 16:07:14



Criteria	Score	Weight
1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment.	0.0	2
2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals.	0.75	2
3. If possible, measurements should be performed in situ.	0.0	2
4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents.	0.8	2
5. Automated and miniaturized methods should be selected.	0.0	2
6. Derivatization should be avoided.	1.0	2
7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided.	0.33	2
8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time.	0.22	2
9. The use of energy should be minimized.	0.5	2
10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred.	0.0	2
11. Toxic reagents should be eliminated or replaced.	0.2	2
12. Operator's safety should be increased.	0.6	2

Analytical Greenness report sheet

19/02/2024 16:14:14



Criteria	Score	Weight
1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment.	0.3	2
2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals.	0.76	2
3. If possible, measurements should be performed in situ.	0.0	2
4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents.	1.0	2
5. Automated and miniaturized methods should be selected.	0.25	2
6. Derivatization should be avoided.	1.0	2
7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided.	0.33	2
8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time.	0.73	2
9. The use of energy should be minimized.	0.5	2
10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred.	0.0	2
11. Toxic reagents should be eliminated or replaced.	0.29	2
12. Operator's safety should be increased.	0.6	2

Reportes AGREEprep

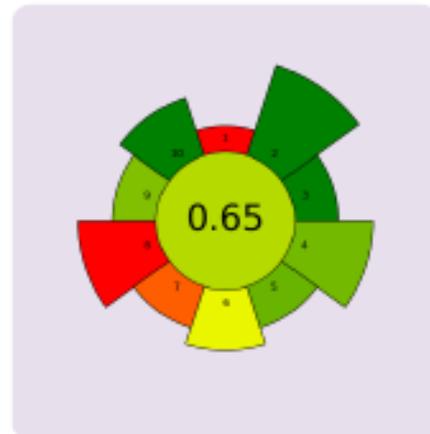
EDXRF – Cu y Mn Alimento para ganado

AGREEprep

Analytical Greenness Metric for Sample Preparation

23/01/2024 15:34:55

Report



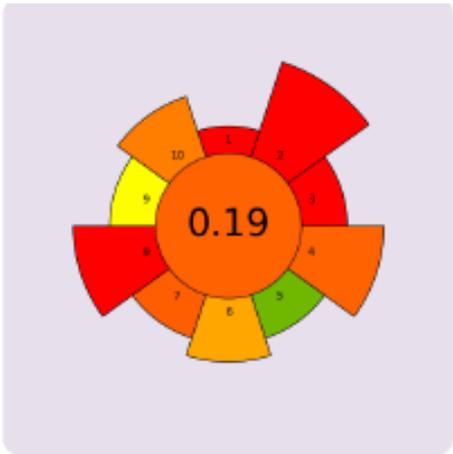
#	Criterion		Score	Weight
1.	Sample preparation placement	Ex situ	0.00	1
2.	Hazardous materials:	0 [g or mL]	1.00	5
3.	Sustainability, renewability, and reusability of materials:	Not set	1.00	2
4.	Waste:	0.4 [g or mL]	0.78	4
5.	Size economy of the sample	Mass or volume of the sample: 0.4 [g or mL]	0.80	2
6.	Sample throughput	30 [samples/h]	0.54	3
7.	Integration and automation	Sample prep. steps: 3 steps, Manual systems	0.19	2
8.	Energy consumption:	1170 [W]	0.00	4
9.	Post-sample preparation configuration for analysis:	Spectrophotometry, surface analysis techniques, voltammetry, potentiometry, etc.	0.75	2
10.	Operator's safety:	Not set	1.00	3

AGREEprep

Analytical Greenness Metric for Sample Preparation

23/01/2024 15:39:06

Report

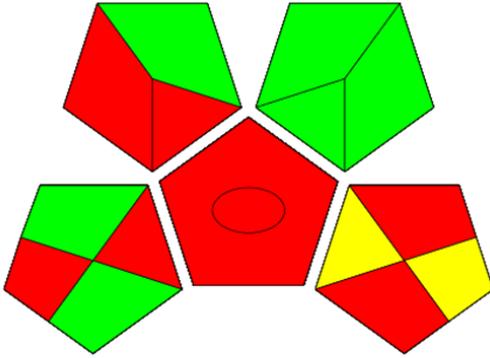


#	Criterion		Score	Weight
1.	Sample preparation placement:	Ex situ	0.00	1
2.	Hazardous materials:	10 [g or mL]	0.00	5
3.	Sustainability, renewability, and reusability of materials:	< 25% of reagents and materials are sustainable or renewable, but can only be used ONCE	0.00	2
4.	Waste:	15 [g or mL]	0.19	4
5.	Size economy of the sample	Mass or volume of the sample: 0.45 [g or mL]	0.78	2
6.	Sample throughput:	4 [samples/h]	0.33	3
7.	Integration and automation	Sample prep. steps: 3 steps, Manual systems	0.19	2
8.	Energy consumption:	1245 [W]	0.00	4
9.	Post-sample preparation configuration for analysis:	GC and HPLC with non-MS detection, atomic absorption spectroscopy, capillary electrophoresis, etc.	0.50	2
10.	Operator's safety:	3 hazards	0.25	3

Reportes GAPI

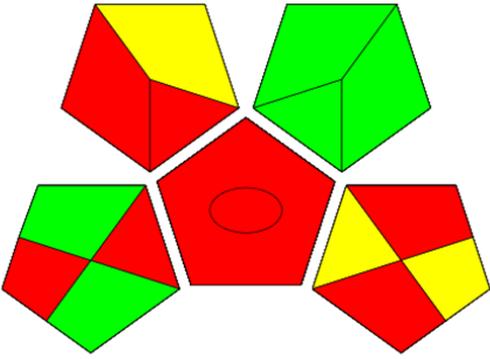
ICP-MS – Se Alimento para ganado

SAMPLE PREPARATION AND ANALYSIS	
Sample preparation	
1. Collection:	off-line ▼
2. Preservation:	None ▼
3. Transport:	Required ▼
4. Storage:	None ▼
5. Type of method:	Extraction required ▼
6. Scale of extraction:	Macro-extraction ▼
7. Solvents/reagents used:	Non-green solvents/re ▼
8. Additional treatments:	None ▼
Reagents and solvents	
9. Amount:	< 10 mL (< 10 g) ▼
10. Health hazard:	Slightly toxic, slight irri ▼
11. Safety hazard:	Highest NFPA flammal ▼
instrumentation	
12. Energy:	<= 1.5 kWh per sample ▼
13. Occupational hazard:	Emission of vapours to ▼
14. Waste:	1-10 mL (1-10 g) ▼
15. Waste treatment:	No treatment ▼
Method type	
Type of analysis:	Qualitative and quantit ▼



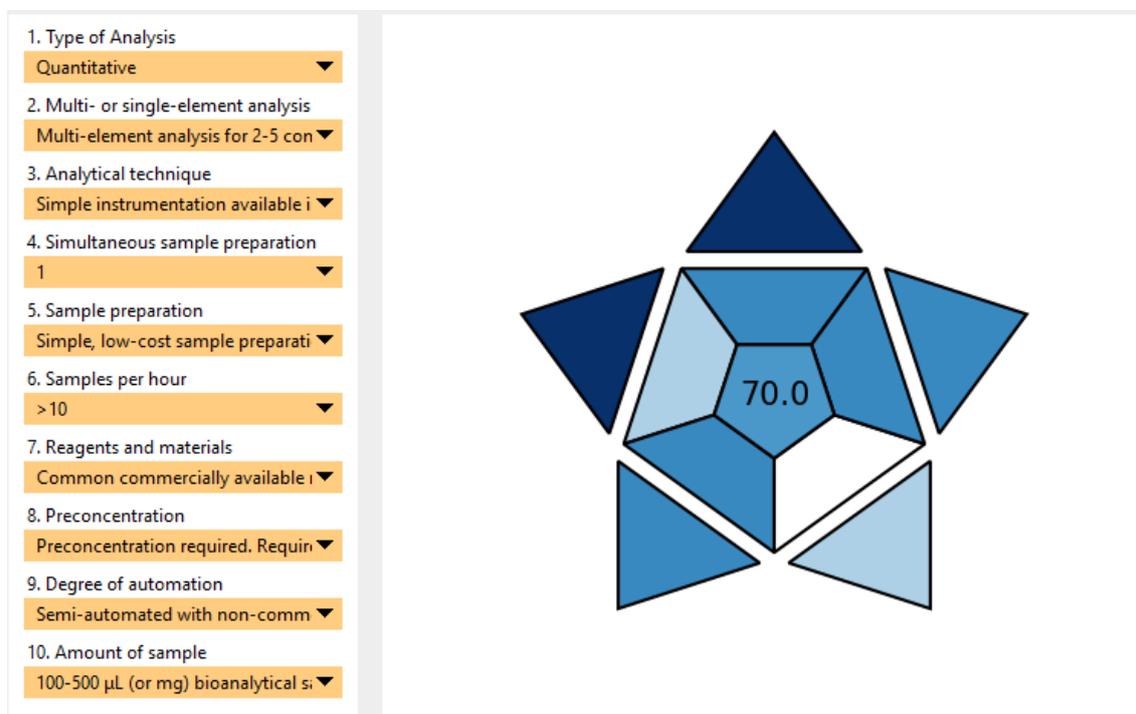
HG-MP AES – Se Alimento para ganado

SAMPLE PREPARATION AND ANALYSIS	
Sample preparation	
1. Collection:	off-line ▼
2. Preservation:	None ▼
3. Transport:	Required ▼
4. Storage:	None ▼
5. Type of method:	Extraction required ▼
6. Scale of extraction:	Macro-extraction ▼
7. Solvents/reagents used:	Non-green solvents/re ▼
8. Additional treatments:	Simple treatments ▼
Reagents and solvents	
9. Amount:	< 10 mL (< 10 g) ▼
10. Health hazard:	Slightly toxic, slight irri ▼
11. Safety hazard:	Highest NFPA flammal ▼
instrumentation	
12. Energy:	<= 1.5 kWh per sample ▼
13. Occupational hazard:	Emission of vapours to ▼
14. Waste:	1-10 mL (1-10 g) ▼
15. Waste treatment:	No treatment ▼
Method type	
Type of analysis:	Qualitative and quantit ▼

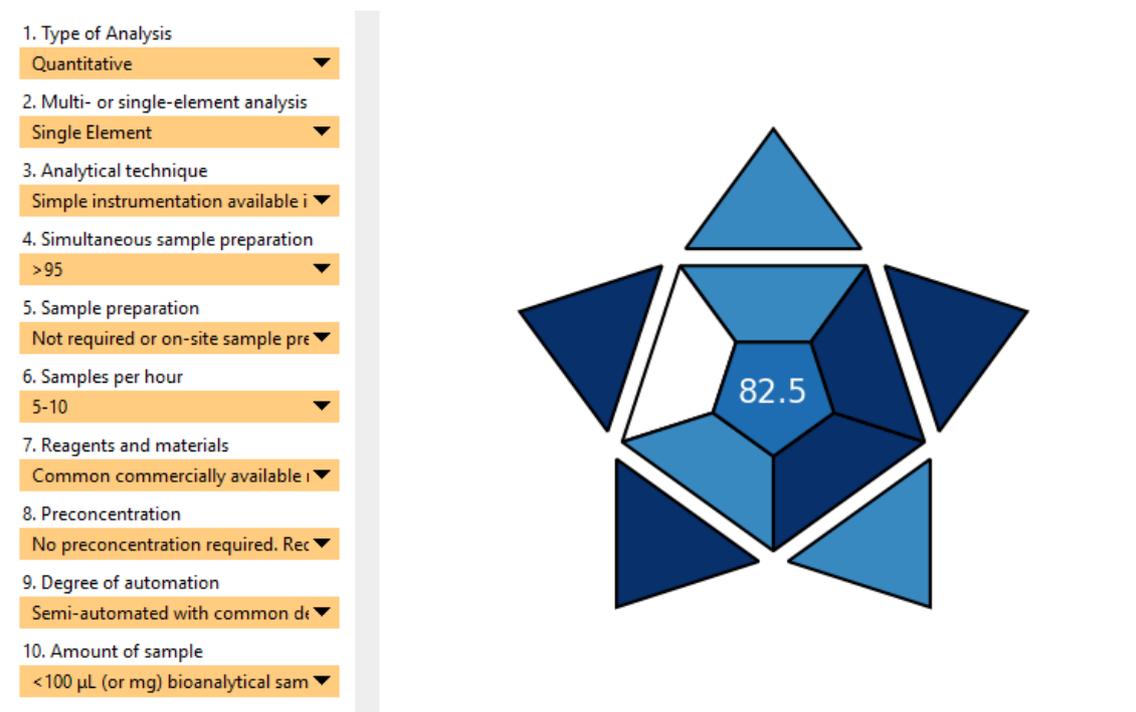


ANEXO IV Reportes BAGI

FI-MP AES – Agua

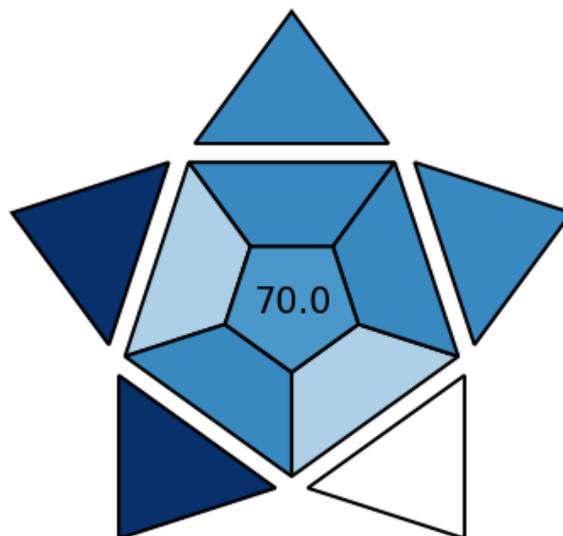


ETAAS – Agua



EDXRF – Cu y Mn Alimento para ganado

1. Type of Analysis
Quantitative ▼
2. Multi- or single-element analysis
Multi-element analysis for 2-5 con ▼
3. Analytical technique
Simple instrumentation available i ▼
4. Simultaneous sample preparation
2-12 ▼
5. Sample preparation
Simple, low-cost sample preparati ▼
6. Samples per hour
5-10 ▼
7. Reagents and materials
Common commercially available i ▼
8. Preconcentration
No preconcentration required. Rec ▼
9. Degree of automation
Manual treatment and analysis ▼
10. Amount of sample
100-500 μL (or mg) bioanalytical si ▼

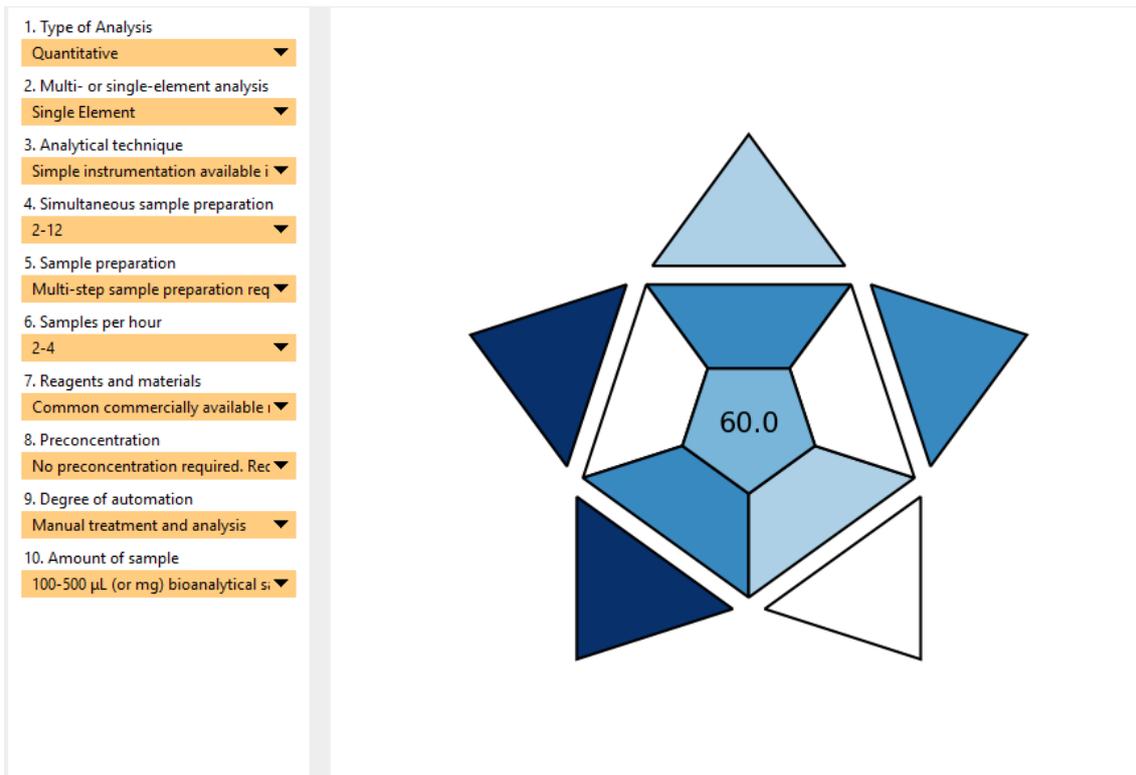


Digestión mediante MW + FAAS – Cu y Mn Alimento para ganado

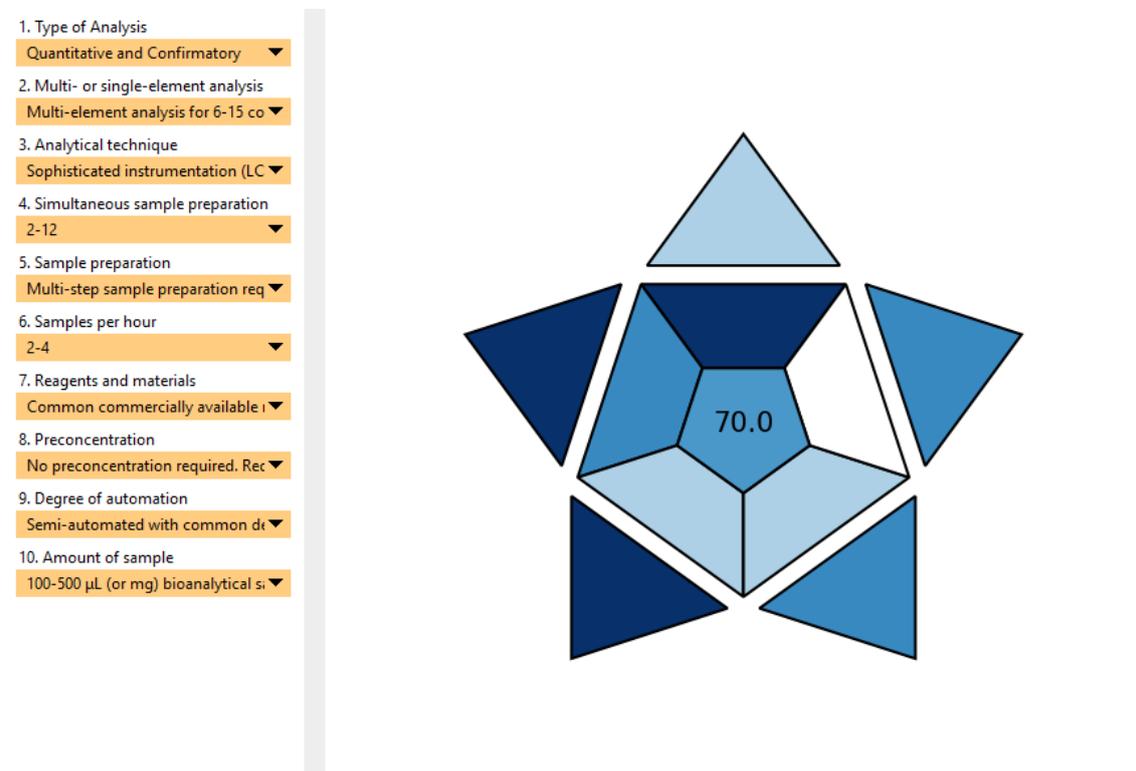
1. Type of Analysis
Quantitative ▼
2. Multi- or single-element analysis
Single Element ▼
3. Analytical technique
Simple instrumentation available i ▼
4. Simultaneous sample preparation
2-12 ▼
5. Sample preparation
Multi-step sample preparation req ▼
6. Samples per hour
2-4 ▼
7. Reagents and materials
Common commercially available i ▼
8. Preconcentration
No preconcentration required. Rec ▼
9. Degree of automation
Manual treatment and analysis ▼
10. Amount of sample
100-500 μL (or mg) bioanalytical si ▼



HG-MP AES – Se Alimento para ganado



ICP-MS – Se Alimento para ganado



APÉNDICE I Trabajos presentados en eventos científicos

2023- Presentación oral en el 8° Encuentro Nacional de Química realizado del 18 al 21 de octubre en Montevideo, Uruguay

“Desarrollo de métodos alineados con la Química Analítica Verde para la determinación de Cu y Mn en muestras agrícola-ganaderas” J. Silva, M. Pistón

2023- Presentación oral en el XII Congreso Argentino de Química Analítica, realizado del 12 al 15 de setiembre en San Juan, Argentina

“Análisis no destructivo mediante EDXRF de pasturas, reservas forrajeras y material foliar: Determinación de Mn y Zn” J. Silva, M. Belluzzi, V. Buhl, M. Pistón

2022- Presentación oral en el 7° Congreso Uruguayo de Química Analítica, realizado del 26 al 28 de octubre en Montevideo, Uruguay

“Fibra de hilo sisal como biosorbente para la preconcentración en línea y determinación de Cu and Mn acoplada a MP AES” J. Silva, M. Pistón

2021- Presentación de e-póster en el 7° Encuentro Nacional de Química realizado del 3 al 5 de noviembre en Montevideo, Uruguay

“Desarrollo de un método analítico para la preconcentración en línea y determinación simultánea de cobre y manganeso mediante espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP-OES)” J. Silva, M. Pistón

2019- Presentación de e-póster en el 6° Encuentro Nacional de Química realizado del 16 al 18 de octubre en Montevideo, Uruguay

“Desarrollo de un método analítico para la determinación de cobre, manganeso y selenio en reservas forrajeras mediante espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIPOES)” J. Silva, M. Pistón

8° Encuentro Nacional de Química

Desarrollo de métodos alineados con la Química Analítica Verde para la determinación de Cu y Mn en muestras agrícola-ganaderas

Javier Silva^{1,2*}, Mariela Pistón¹

1 Grupo de Análisis de Elementos Traza y Desarrollo de Estrategias Simples para Preparación de Muestras (GATPREM), Química Analítica, Facultad de Química, Udelar

2 Programa de Posgrados de la Facultad de Química, Facultad de Química, Udelar

jsilva@fq.edu.uy

La relación entre los minerales y la salud animal es conocida, tanto la deficiencia como el exceso está relacionado con enfermedades. El agua y los alimentos suministrados al ganado son las principales fuentes de aporte de minerales (Cu, Mn, etc), por lo tanto, es relevante disponer de información del contenido de estos ya que se han detectado problemas asociados a desbalances.

Usualmente la determinación de Cu y Mn en este tipo de matrices se realiza mediante espectrometrías de absorción atómica o emisión atómica acoplada a masas con plasma acoplado inductivamente, técnicas que requieren instrumental e insumos de alto costo y tiempos de análisis considerables. Además, para el caso de los alimentos es necesario realizar previamente una mineralización para llevar al estado líquido y eliminar materia orgánica, generalmente utilizando una digestión asistida por microondas con ácidos minerales.

Con la finalidad de abordar nuevos métodos analíticos desde la Química Analítica Verde (QAV) se desarrolló un sistema de preconcentración en línea acoplado a emisión atómica con un plasma de nitrógeno (MP AES), para la determinación simultánea de Cu y Mn en muestras de agua, utilizando una minicolumna empacada con un biosorbente. Para el caso de los alimentos se desarrolló una metodología mediante EDXRF al estado sólido, sin pretratamiento de muestra. Ambas metodologías fueron evaluadas desde el punto de vista de la QAV utilizando métricas estandarizadas

Con estos desarrollos, utilizando MP AES y EDXRF fue posible determinar de forma rápida y sencilla Cu y Mn en ambas matrices demostrando de esta forma una reducción sensible de los costos, y tiempos de análisis y estando en mejor acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde que con los métodos tradicionales de análisis.

A. E. Hefnway, J.T.Pérez. (2008) "Selenio y Salud animal" Importancia, Deficiencia, Suplementación y Toxicidad. Archivos de Ciências Veterinárias e Zoológica da Unipar, 11, 153 – 165.

A. Galuszka, Z. Migaszewski, J. Namiésnik. (2013) The 12 principles of Green analytical chemistry and the Significance mnemonic of Green analytical practices. Trends in Analytical chemistry, 50, 78 – 84.



Análisis no destructivo mediante EDXRF de pasturas, reservas forrajeras y material foliar: Determinación de Mn y Zn

Silva, Javier^{a,b}, Belluzzi Marcelo^{a,b}, Bühl, Valery^a, Pistón, Mariela^a

^aGrupo de Análisis de Elementos Traza y Desarrollo de Estrategias Simples para Preparación de Muestras (GATPREM), Química Analítica (DEC), Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

^bPrograma de Posgrados de la Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

* e-mail: jsilva@fq.edu.uy

El rol y la importancia de los minerales en la sanidad animal y sanidad foliar, y en particular de los denominados micronutrientes (Co, Cu, Mn, Zn y Se) es bien conocida, debido a que tanto su deficiencia como exceso están relacionados con cuadros de enfermedad tanto en animales como en vegetales. En el caso del ganado, los alimentos suministrados son la principal fuente de aporte de minerales, por lo tanto, disponer de información del contenido de estos en los diferentes tipos de alimento (pasturas, granos, raciones y reservas forrajeras) es de suma relevancia. Debido a lo anterior disponer de información sobre el contenido de minerales es de importancia ya que permite tomar acciones como ser la suplementación o fertilización.^{1,2}

Los métodos tradicionales que usualmente se llevan a cabo para la determinación analítica de elementos traza en matrices complejas como puede ser una pastura o cualquier material foliar requieren un pretratamiento de muestra, generalmente basado en digestiones vía húmeda con ácidos minerales, y frecuentemente con una digestión asistida por microondas. Posteriormente, la determinación se realiza mediante alguna técnica de espectrometría atómica.

Objetivo

Explorar la aplicación de la espectrometría de fluorescencia de rayos X dispersiva en energía (EDXRF) para la determinación de Mn y Zn en muestras de pasturas, reservas forrajeras y material foliar como una alternativa de análisis rápido sin pretratamiento de muestra.

EDXRF es una técnica espectroscópica no destructiva, multielemental que permite la determinación de la composición elemental cuali y cuantitativa de forma directa sobre la muestra sólida.

En una primera etapa, las muestras se secaron a 60°C por 48 horas y luego se realizó una molienda mediante un molino de cuchillos. Las muestras pulverizadas y secas se prensaron utilizando una prensa neumática de laboratorio de 20 bars generando pellets de 13 mm de diámetro. Las determinaciones analíticas fueron realizadas en un espectrómetro EDXRF Shimadzu EDX-7200, irradiando las muestras a 40 KeV con un colimador de 5 mm y en atmósfera de aire. La calibración (método de parámetros fundamentales) fue realizada utilizando material de referencia certificado de material vegetal (Embrapa – *Brachiaria Brizantha* cv).

Adicionalmente, la veracidad fue evaluada mediante ensayos de recuperación sobre material de referencia certificado *Apple Leaves* (NIST Standard Reference Material 1515), que se colocaba en cada corrida de análisis de muestras, obteniéndose resultados de entre 97-101 % y 93-105 % para el Mn y Zn respectivamente. El método fue aplicado a la determinación de Mn y Zn en 10 muestras vegetales y los resultados fueron estadísticamente comparables a los obtenidos mediante digestión asistida por microondas y posterior determinación mediante FAAS.

Conclusiones

Utilizando EDXRF fue posible determinar de forma rápida y sencilla Mn y Zn en muestras de origen vegetal, logrando de esta forma una reducción sensible de los costos, tiempos de análisis y estando en mejor acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde.

¹ Hefnawy, A.E.; Pérez, J.T., *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zootecia da Unlpar*, 11 (2008), 153-165.

² Zoppolo, R.; Fasolo, C., *Revista INIA*, 47 (2016), 27-30. <http://www.info.inia.uy/digital/bitstream/item/5337/1/Rev.INIA-2016-No47-p.27-30.pdf> (Acceso 1 de Junio de 2023).

Agradecimientos

Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y PEDECIBA-Química. Los autores agradecen el acceso al Centro de Formación Integrada (CeFI), Facultad de Química, Universidad de la República.

Fibra de hilo sisal como biosorbente para la preconcentración en línea y determinación de Cu and Mn acoplada a MP AES

Silva, Javier^{1,2}; Pistón, Mariela¹

¹Grupo de Análisis de Elementos Traza y Desarrollo de Estrategias Simples para Preparación de Muestras (GATPREM), Química Analítica (DEC), Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

²Programa de Posgrados de la Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

* Email: jsilva@fq.edu.uy

Los biosorbentes son materiales biológicos que pueden acumular sustancias mediante diferentes mecanismos, esta propiedad ha sido explotada para remover contaminantes del ambiente (ejemplo metales pesados). De igual forma los biosorbentes se pueden utilizar para empacar minicolumnas de preconcentración para la adsorción de elementos traza y de esta forma mejorar los límites de detección de algunas técnicas. La fibra de Sisal (*Agave sisalana*) ha demostrado buen desempeño en la preconcentración de Cu cuando es impregnada con fluoruro de alizarina azul (AFB) [1].

Objetivos

Explorar la aplicación de la fibra de hilo sisal como biosorbente para la preconcentración de Cu y Mn en muestras de agua. Además, comparar el desempeño utilizando el reactivo AFB y con las fibras naturales sin tratamiento de impregnación previo. Esta comparación surge de los buenos resultados que se han obtenido previamente y así demostrar que sería innecesario el uso de AFB para estos fines [2].

Metodología

Se presenta una comparación y discusión del desempeño de la fibra de sisal sin y con impregnación utilizando AFB. Se evaluaron los parámetros: límites de detección, precisión, número de determinaciones sin necesidad de reemplazar el empaquetamiento de la columna, pH y aspectos económicos.

Las determinaciones analíticas fueron llevadas a cabo mediante MP AES, técnica que presenta varias ventajas en comparación con espectrometría atómica de llama (FAAS), espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) o espectrometría de emisión atómica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) en términos económicos. Por otra parte esta técnica posee mejores límites de detección para el Cu y Mn que FAAS pero mayores que ETAAS o ICP. El sistema de preconcentración en línea desarrollado se muestra en la Figura 1.

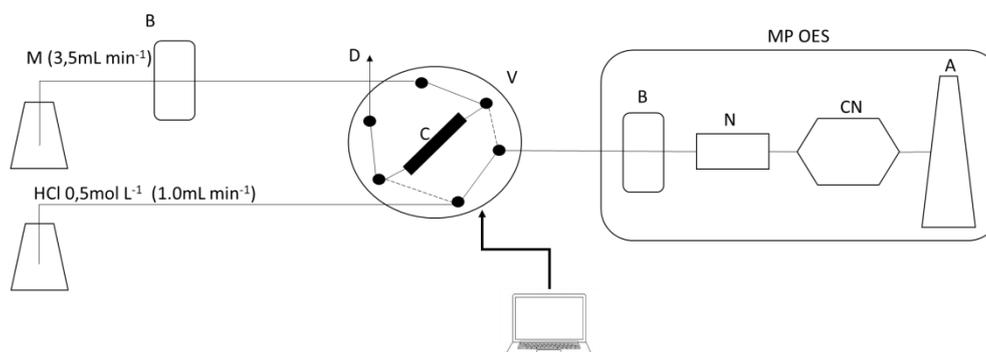


Figura 1. Sistema FIA para la preconcentración en línea acoplado a MP AES (Agilent 4210). **B:** bomba peristáltica; **V:** válvula inyectora de 6 puertos (controlada mediante software escrito en Python); **C:** minicolumna (100mg fibra de sisal dentro de un tubo de vidrio de 5cm de largo y 2,2 mm de diámetro interno); **D:** descarte; **M:** muestra o estándar; **HCl:** ácido clorhídrico como eluyente; **N:** nebulizador; **CN:** cámara de nebulización and **A:** antorcha.

Resultados

Tabla de resultados

	Cu		Mn	
	fibra de sisal	fibra de sisal impregnada con AFB	fibra de sisal	fibra de sisal impregnada con AFB
Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12 – 500	12-500*	30 – 500	33-500*
LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,7	3,8	9,0	9,8
LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12	12	30	33
Veracidad (%R) **	97	77	98	27
Precisión (%RSD, n=6) ***	4,3	2,1	2,6	3,1
Nºdeterminación sin reemplazo del empaquetamiento	350	40	350	40
Frecuencia de muestreo (muestras por hora)	30			

*rango estudiado; **promedio, n=6; ***muestras de agua adicionadas; ; LD: límite de detección; LQ: límite de cuantificación

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos la fibra de hilo sisal puede utilizarse para fines de preconcentración de Cu y Mn en aguas sin la necesidad de impregnarle un reactivo adicional. El desempeño del método fue satisfactorio y podría utilizarse para fines de monitoreo de estos elementos en agua. Resultando un biosorbente económico y promisorio para ensayar su utilidad en la preconcentración de estos u otros metales en otras matrices.

Referencias

- [1] F. de Souza Días, J. S. Bonsucesso, L. C. Oliveira, W. N. L. dos Santos, Talanta 89 (2012), 276–279.
[2] J. Silva, M. Pistón, Molecules 26 (2021), 1662

Agradecimientos

Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y PEDECIBA-Química, Juan Carlos Rodríguez, y Guillermo Roth por la impresión 3D de los conectores y su colaboración en la programación.

7° Encuentro Nacional de Química

Desarrollo de un método analítico para la preconcentración en línea y determinación simultánea de cobre y manganeso mediante espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP-OES)

Javier Silva^{1,2} y Mariela Pistón²

1-Programa de Posgrados de la Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

2-Grupo de Análisis de Elementos traza y desarrollo de estrategias simples para preparación de muestras (GATPREM), Área Química Analítica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

jsilva@fq.edu.uy

Un sistema de preconcentración en línea para la determinación simultánea de cobre y manganeso en muestras de agua se desarrolló y se acopló a un espectrómetro de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP OES). El sistema de inyección en flujo consta de una minicolumna empacada con fibra de hilo sisal (Agave sisalana). Se realizó un diseño experimental multivariado para evaluar la influencia del pH, el tiempo de preconcentración y la concentración de eluyente. Condiciones óptimas para la preparación de la muestra fueron de pH 5,5, tiempo de preconcentración de 90 s, y HCl 0,5 mol L⁻¹ como eluyente.

Las principales cifras de mérito fueron: límites de detección de 3,7 y 9,0 µg L⁻¹ para Cu y Mn, respectivamente. La precisión expresada como desviación estándar relativa fue mejor que el 10%. La veracidad fue evaluada mediante ensayos de recuperación con recuperaciones entre el 75 y el 125%. El factor de enriquecimiento fue 30 para ambos analitos. Estos resultados fueron adecuados para el análisis de muestras de agua.

El sistema de preconcentración se acopló y sincronizó con el nebulizador MIP OES para permitir la determinación simultánea de Cu y Mn como una nueva estrategia de introducción de muestras. La tasa de muestreo fue de 20 muestras/h. La fibra de hilo sisal resultó un biosorbente económico para la preconcentración de oligoelementos.

Agradecimientos: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y PEDECIBA-Química.

6° Encuentro Nacional de Química

Desarrollo de un método analítico para la determinación de cobre, manganeso y selenio en reservas forrajeras mediante espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP-OES)

Javier Silva y Mariela Pistón

*Grupo de Análisis de Elementos traza y desarrollo de estrategias simples para preparación de muestras (GATPREM), Área Química Analítica, Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
jsilva@fq.edu.uy*

Los alimentos, como las pasturas y reservas forrajeras, son una fuente importante de minerales en la dieta del ganado. Oligoelementos como el Cu, Mn y Se son de interés ya que son elementos esenciales y en el país ha habido antecedentes de deficiencias en pasturas [1]. Usualmente estas determinaciones se realizan mediante espectrometría de absorción atómica (AAS, GFAAS) o emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES). La técnica de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP-OES) es significativamente menos costosa en comparación con las técnicas clásicas, sin embargo, a pesar de las ventajas que presenta existen pocos métodos que la utilizan para determinaciones a nivel de trazas pues debe trabajarse en condiciones muy bien optimizadas y validadas para superar el desafío de alcanzar bajos límites de detección. El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de un método analítico para la determinación de Cu, Mn y Se, a nivel de trazas, en algunos tipos de reservas forrajeras mediante MIP-OES.

Las determinaciones analíticas fueron realizadas en un espectrómetro Agilent 4210 MIP-OES equipado con una antorcha estándar, cámara ciclónica convencional (para Cu y Mn) y cámara de nebulización multimodo (MSIS) para generación de hidruros (para Se). El tratamiento de las muestras desarrollado consistió en una digestión asistida por microondas: 0,5 g de muestra (seca y molida) y 10 mL de HNO₃ diluido (4,5 M). Una vez concluida la digestión las muestras fueron diluidas adecuadamente para la determinación simultánea de Cu y Mn. Para el caso de la determinación de selenio se realizó una pre-reducción con 5 mL de HCl 37% (m/v) en plancha calefactora durante 1 hora (relación muestra/ácido 1:1), La reducción en línea para la generación del hidruro fue realizada con NaBH₄ 2% (m/v) en NaOH 0,5 % (m/v).

Las condiciones operativas del espectrómetro fueron optimizadas de forma de obtener la mejor relación señal a ruido posible. Las cifras de mérito obtenidas fueron: para Cu, Mn y Se precisión de repetibilidad 10%, límites de detección (LD): 0,1; 0,04 y 0,06 mg kg⁻¹ para Cu, Mn y Se respectivamente. En todos los casos la veracidad fue evaluada mediante ensayos sobre materiales de referencia certificados de material foliar obteniéndose recuperaciones mayores al 70%, lo que es adecuado para análisis de trazas. Los niveles de los elementos estudiados en varias muestras de reservas forrajeras indican que el alimento contenía niveles adecuados de los mismos. Se seguirá trabajando con un mayor número de muestras para evaluación del alimento en forma más exhaustiva.

Los resultados obtenidos mediante MIP-OES fueron adecuados para el fin propuesto y se podrá extender a otras matrices vegetales para la determinación de Cu, Mn y Se. Se

continuará explorando las capacidades de esta técnica económica como herramienta analítica a disposición para el diagnóstico de la calidad del alimento para el ganado.

Agradecimientos: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y PEDECIBA-Química.

[1] Bruné, V.; Pioda, C.; et al. *Braz J of Anall Chem*, 2013, 9, 410 – 415.

APÉNDICE II Artículos publicados en revistas referadas

2023- Silva. J, Pistón. M. Evaluation of Sisal Fiber as Biosorbent for online Preconcentration and Determination of Cu and Mn coupled to MP AES using the Analytical Greenness Metric Approach. Brazilian Journal of Analytical Chemistry, 10(41), 73-79.

DOI: 10.30744/brjac.2179-3425.TN-11-2023

2021- Silva. J, Pistón. M. On line Preconcentration and Simultaneous Determination of Cu and Mn in Water Samples Using a Minicolumn Packed with Sisal Fiber by MIP OES. Molecules, 26.

DOI:10.3390/molecules26061662

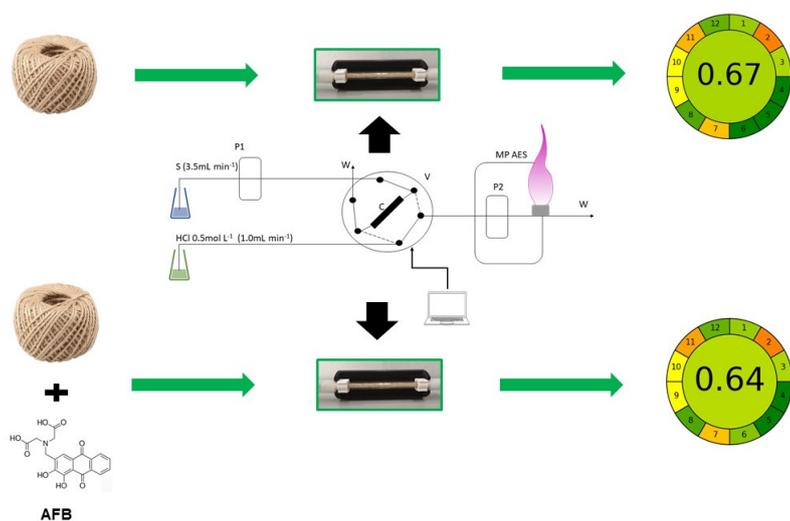
TECHNICAL NOTE

Evaluation of Sisal Fiber as Biosorbent for online Preconcentration and Determination of Cu and Mn coupled to MP AES using the Analytical Greenness Metric Approach

Javier Silva^{1,2}  , Mariela Pistón²  

¹Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Avda. Gral. Flores 2124, Montevideo 11200, Uruguay

²Grupo de Análisis de Elementos Traza y Desarrollo de Estrategias Simples para Preparación de Muestras (GATPREM), Química Analítica (DEC), Facultad de Química, Universidad de la República, Avda. Gral. Flores 2124, Montevideo 11200, Uruguay



Biosorbents can be used to pack minicolumns for the preconcentration of trace elements and thus improve the detection limits of some techniques. A biosorbent is efficient when presents binding sites as carbonyls, amines, and carboxylic groups, among others. Thus, natural materials as the sisal fiber (*Agave sisalana*) may be a good candidate. Sisal fiber demonstrated good performance for Cu preconcentration when it was impregnated with alizarine fluorine blue (AFB). However, very good results were reported for the first time by our group with this column, without the use of

additional reagents for both, Mn and Cu determinations in water samples by using microwave plasma atomic emission spectroscopy (MP AES). In this paper a comparison of the sisal fiber preparation with and without impregnation with AFB is presented and discussed in terms of the figures of merit, including precision, trueness, limits of detection and quantification. In addition to that, the number of determinations without the need of replacement of the solid phase was evaluated. Results demonstrated that the impregnation of sisal fiber with AFB does not leads to an improvement in the analytical performance. Analytical Greenness Metric Approach (AGREE) was used to evaluate the greenness of both methods and results obtained were similar. Despite this, the method without impregnation of the fiber has some remarkable advantages, that contributes to Green Analytical Chemistry (GAC), related to the lifetime of the sorbent, not considered in the AGREE tool.

Cite: Silva, J.; Pistón, M. Evaluation of Sisal Fiber as Biosorbent for online Preconcentration and Determination of Cu and Mn coupled to MP AES using the Analytical Greenness Metric Approach. *Braz. J. Anal. Chem.* (Forthcoming). <http://dx.doi.org/10.30744/brjac.2179-3425.TN-11-2023>

Submitted 14 February 2023, Resubmitted 20 April 2023, Accepted 27 April 2023, Available online May 2023.

Keywords: sisal fiber, preconcentration, MP AES, copper, manganese, water, minicolumn, AGREE

INTRODUCTION

Sorption is a physico-chemical process through which a substance binds to another, resulting in an accumulation or preconcentration of the sorbate in the sorbent. When the solid sorbent is the surface of a biological matrix, the process is called biosorption. Different biosorbents have good affinity for sorbates when they have a large number of binding sites such as carbonyls, carboxylic groups, and amines, among others. Compared with commercial sorbents, usually used, biosorbents are less expensive, and are renewable materials, even agro-industrial residues can be used for these purposes. All these characteristics are in good agreement with the principles of Green Analytical Chemistry (GAC).¹⁻⁵

Cellulose, lignocellulose which are present in the cell wall of plant material has hydroxyl and carboxylic groups, which are responsible for the use of materials such as sisal fiber, sorghum, among other plant materials. These materials can be used for remedial purposed and some applications in Analytical Chemistry.⁶⁻¹⁰ In addition, plant-based biosorbents stand out due to the simple pre-treatment needed prior to their use for analytical purposes.³

Several applications were reported using sisal fiber (*Agave sisalana*) for metal preconcentration; all of them impregnate the sisal fiber with different reagents.^{9,11} One of the most used is the sisal fiber derivatized with alizarine fluorine blue (AFB).⁹ However, in a previous work, we found very good results using the sisal fiber packed in a minicolumn without the use of additional reagents for the determination of manganese (Mn) and copper (Cu) in waters and subsequent simultaneous determination by microwave plasma atomic emission spectroscopy (FI-MP AES).¹²

Considering how important it is nowadays to develop greener and simpler analytical methods, a comparison was made between the performances of the method using sisal fiber without AFB derivatization and derivatized. For this purpose, Analytical Greenness Metric Approach (AGREE) was applied, this tool was selected because it shows through pictograms how greener and simpler a method is and it is easy to interpret.^{13,14} However, this tool have some limitations that were discussed.

Results showed that the use of sisal fiber without adding any external reagent was successfully applied for online preconcentration of Cu and Mn in waters.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Manganese and cooper standards were prepared using a 1000 mg L⁻¹ commercial solution (TraceCERT, Switzerland) by suitable dilutions with ultrapure water. Ultrapure water (18.2 MΩ.cm) was obtained from a purification equipment (DirectQ3 UV, Millipore, Darmstadt, Germany). A 0.01% (w/v) alizarine fluorine blue (AFB) solution was prepared by dissolving the solid (98%) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) in ultrapure water. Other reagents were of analytical grade. The glassware was kept overnight in a nitric acid solution (10% (v/v)) and after that rinsed with ultrapure water.

FI-MP AES system

A flow injection (FI) manifold with the capability of online preconcentration was coupled to a MP AES for simultaneous determination of Mn and Cu. A minicolumn was placed in a 6-port valve packed with sisal fiber for the preconcentration of both analytes in water samples prior the determination by MP AES. Figure 1 represents the flow injection system. A 6-port injection valve with a microelectronic actuator-controlled module (two-position, Valco Cheminert Instrument VICI, Co Inc., CoH, USA) was employed. Liquids were propelled by a peristaltic pump (Rainin Dynamax RP-1, USA) with Tygon™ tubing. The valve was controlled by a personal computer (RS232 serial port). The injection valve control and the preconcentration and elution stages were performed automatically by a program written in Python™. The operation of the flow injection system consists of the preconcentration of sample for 90 s. Then the valve (V) commute and the eluent drags the analyte towards detection system. Connections were of Teflon™ PFA tubing (id 0.8 mm).¹²

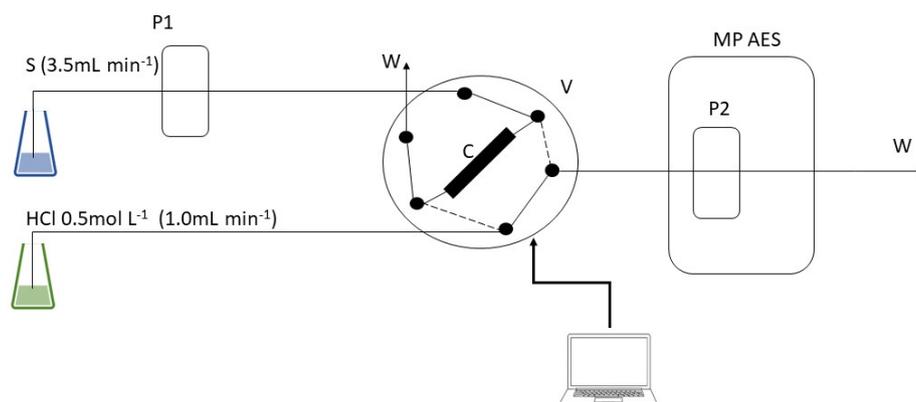


Figure 1. FI system coupled to MP AES. **P1** and **P2**: peristaltic pumps; **V**: injection valve; **W**: waste; **S**: standard or samples; **C**: minicolumn; **HCl**: hydrochloric acid (eluent); solid lines represent position during the preconcentration step and dotted lines represent the valve position during the elution.

Minicolumn

A minicolumn was designed using a glass tube of 2.2 mm internal diameter and 5 cm long and packed with 100 mg of the sisal fiber.¹² The sisal fiber was purchased in a local market (sisal thread) and was treated with HNO_3 (10% v/v), washed with ultrapure water, and dried in an oven at 60 °C during 12 h, as it was reported by the authors dos Santos et al.⁸ For comparison purposes the experiments were run using the biosorbent without derivatization and also with the sisal fiber impregnated with Alizarine Fluorine Blue (AFB) according to what was reported by de Souza Días et al.⁹ Briefly, the functionalization consisted of passing through the minicolumn (containing 100 mg of Sisal fiber) a 0.01% (w/v) AFB solution at a flow rate of 10 mL min⁻¹ during 10 minutes. After that a washing step with 1.0 mol L⁻¹ NaOH and 1.0 mol L⁻¹ HNO_3 solutions were carried out and finally rinsed with ultrapure water.

Instrument

The analytical determinations were performed using a MP AES spectrometer (MP AES, Agilent 4210, Santa Clara, CA, USA) equipped with a standard torch and a glass cyclonic spray chamber and a One Neb Serie2 nebulizer. Nitrogen was generated with an Agilent 4107 Nitrogen generator (Agilent, Santa Clara, CA, USA), using an air compressor (Dürr Technik, Bietigheim-Bissingen, Germany). Analytical signals were obtained using the analytical lines were 403.08 nm for Mn and 324.75 nm for Cu in Time Scan mode, and data exported as csv format were then processed through the software Peak Simple™ (SRI, CA, USA).

Instrumental parameters and operating conditions are shown in Table I. Operating conditions such as nebulizer flow and viewing position were optimized with a solution containing 2 mg L⁻¹ of both analytes.

Table I. Instrument parameters and operating conditions

Instrument parameter	
Microwave frequency (MHz)	2450
Applied plasma power (Kw)	1.0
Stabilization time (s)	0
Background correction	Auto
Reading time (s)	1
Sample introduction system	
Nebulizer flow (L min ⁻¹)	0.9
Viewing position	10 (Cu); -10 (Mn)

Optimization

The influence of the variables: preconcentration time and pH was evaluated in previous work for the system without AFB.¹² Considering the optimum parameters obtained before; the critical variables were also investigated for the method with sisal-AFB.

Method validation

The analytical procedure validation was performed following the recommendations of Eurachem Guide.¹⁵ The evaluated figures of merit for both methods were precision, linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and trueness.

RESULTS AND DISCUSSION

Optimization

The use of sisal fiber impregnated with AFB was reported by de Souza Dias et al, for the preconcentration of Cu but not for Mn.⁹ Herein, the developed FI-MP AES system was evaluated for the simultaneous determination of Mn and Cu. To study the influence of critical variables, two experiments were carried out using a 0.2 mg L^{-1} standard solution of Cu and Mn and preconcentration time and pH were evaluated. Figures 2 y 3 present experimental conditions and results.

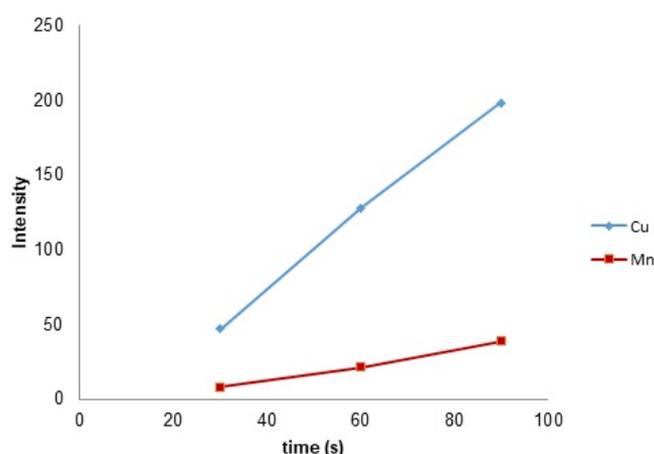


Figure 2. Effect of the preconcentration time.

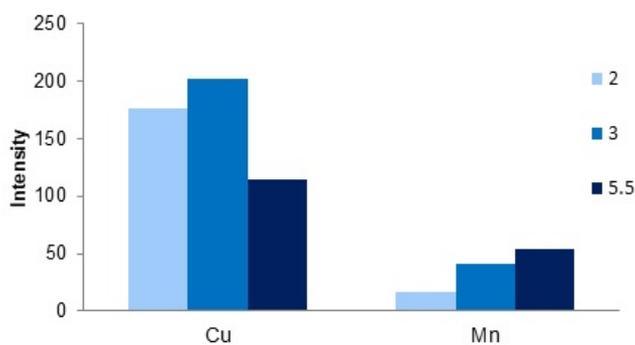


Figure 3. Effect of the pH in the preconcentration step.

For subsequent tests, a preconcentration time of 90 seconds and pH equal to 5.5 were selected as optimum conditions.

Method validation

Validation of the online preconcentration of Mn and Cu using sisal fiber impregnated with AFB and subsequent simultaneous determination by MP AES was carried out following the guidelines of the Eurachem Guide.¹⁵ Linearity was evaluated by visual inspection and the coefficient of determination (R^2) from the calibration curves. The determination coefficients obtained for the linear regressions were greater than 0.99 for both elements. Detection (LOD) and quantification (LOQ) limits were estimated as the analyte concentration corresponding to 3 and 10 times the standard deviation of a Cu and Mn standard solution of 0.05 mg L^{-1} . Spiked samples were analysed for the evaluation of the trueness. Well water samples were spiked at a level of 0.1 mg L^{-1} for Mn and Cu respectively and a recovery (%R) assay was performed. Precision was expressed as the relative standard deviation ($n=6$, RSD %).

In a previous work we reported the preconcentration and simultaneous determination of Mn and Cu (FI-MP AES) with a minicolumn packed with sisal fiber without impregnation.¹² Table II summarized the figures of merit of both FI-MP AES methods. The preconcentration of Mn using standard solutions with the sisal fiber impregnated with AFB was satisfactory to evaluate linearity and to estimate the RSD, LOD and LOQ. However, in the recovery test of the spiked well water samples, the results were not adequate. No antecedents about preconcentration of Mn with sisal-AFB were found. No further studies were done since the aim of this note is to present the advantages of a simple method without impregnation with AFB.

Table II. Performance comparison

	Cu		Mn	
	sisal fiber ¹²	sisal fiber with AFB	sisal fiber ¹²	sisal fiber with AFB
Linearity ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12 – 500	12-500*	30 – 500	33-500*
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3.7	3.8	9.0	9.8
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12	12	30	33
Trueness (%R) **	97	77	98	27
RSD % ***	4.3	2.1	2.6	3.1
Number of determinations without replacement of the packing	350	40	350	40
Sampling frequency (sample per hour)	20			

*Studied range; ** average, $n=6$; *** spiked samples ($n=6$); limit of detection (LOD); limit of quantification (LOQ).

When comparing the figures of merit, it was observed that the impregnation of the sisal fiber with AFB does not lead to an improvement in the analytical performance. This demonstrates that the use of the sisal fiber without the need of impregnation with an additional reagent is a suitable possibility for the online preconcentration of Cu and additionally Mn can be determined simultaneously by FI-MP AES.

Green Analytical Chemistry Evaluation

To evaluate the greenness of both FI-MP AES methods developed, the analytical greenness metric approach (AGREE) was used.¹³ AGREE is a metric tool that evaluates the 12 principles of the GAC (SIGNIFICANCE) on a scale (0 – 1). As a result of this, a pictogram is generated indicating a final score of the method. This score is shown in the center of the pictogram thus indicating the greenness of the method, if this value is close to 1 then the color is dark green being the method greener.

Results of application of the AGREE tool to the developed methods are shown in Figure 4. Both methods are similar in terms of greenness as can be seen in the corresponding pictograms. However, the method without impregnation of the fiber is simpler as it does not require an additional reagent. It also presents as advantages the possibility of performing simultaneous determination of Mn and Cu, and also as a remarkable difference in the number of determinations without the need of replacing the packing, 350 vs 40 determinations. Both advantages, not shown using the AGREE tool contributes to GAC. This kind of tools are very simple to use, but sometimes incomplete, this lead the researchers to have a critical point of view about new methods that includes a cost-benefit evaluation.

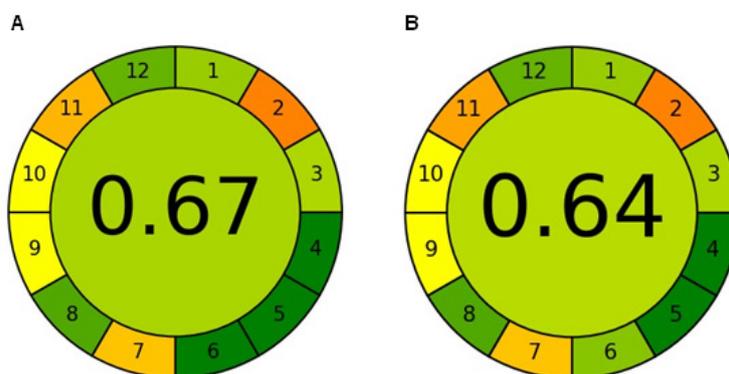


Figure 4. Results of AGREE analysis: (A) fiber without impregnation, (B) fiber impregnated with AFB.

CONCLUSIONS

A FI system coupled to MP AES was validated for the online preconcentration of Mn and Cu using a biosorbent. Considering the antecedents of impregnation of the sisal fiber with AFB, a comparison of the figures of merit of both methods was performed concluding that impregnating the sisal fiber with AFB does not lead to an improvement. The use of sisal fiber without the need to impregnate with a reagent turned out to be an efficient and very cheap biosorbent with up to 350 determinations, not requiring a replacement of the packing.

Applying the AGRRE tool, the greenness of both methods was evaluated. Based on the results of the study, both methods are aligned with the main principles of the GAC. Nevertheless, the use of the sisal fiber without any additional reagent showed to be more efficient which conducts to use these systematized “green” tools with a critical view.

Conflicts of interest

Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors thank the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) and PEDECIBA-Química, Juan Carlos Rodríguez, and Guillermo Roth for 3D impression of the connectors and their help in programing.

REFERENCES

- (1) Fomina, M.; Gadd, G. M. Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresour. Technol.* **2014**, *160*, 3-14. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.102>
- (2) Escudero, L. B.; Maniero, M. A.; Agostini, E.; Smichowski, P. N. Biological substrates: Green alternatives in trace elemental preconcentration and speciation analysis. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2016**, *80*, 531-546. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2016.04.002>

- (3) Teixeira, L. S. G., Lemos, V. A., Coelho, L. M.; Rocha, F. R. P. Applications of biosorbents in atomic spectrometry. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2016**, *51* (1), 36-72. <http://doi.10.1080/05704928.2015.1101698>
- (4) Maciel, E. V. S.; de Toffoli, A. L.; Sobieski Neto, E.; Nazario, C. E. D.; Lanças, F. M. New materials in sample preparation: Recent advances and future trends. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2019**, *119*, 115633. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115633>
- (5) Galuszka, A.; Migaszewski, Z.; Namiésnik, J. The 12 principles of Green analytical chemistry and the Significance mnemonic of Green analytical practices. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2013**, *50*, 78-84. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>
- (6) Anastopoulos, I.; Pashalidis, I.; Hosseini-Bandegharai, A.; Giannakoudakis, D. A.; Robalds, A.; Usman, M.; Escudero, L. B.; Zhou, Y.; Colmenares, J. C.; Núñez-Delgado, A.; Lima, E. C. Agricultural biomass/waste as adsorbents for toxic metal decontamination of aqueous solutions. *J. Mol. Liq.* **2019**, *295*, 111684. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2019.111684>
- (7) Días, F. S.; Meira, L. A.; Carneiro, C. N.; Dos Santos, L. F. M.; Guimarães, L. B.; Coelho, N. M. M.; Coelho, L. M.; Alves, V. N. Lignocellulosic materials as adsorbents in solid phase extraction for trace elements preconcentration. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2023**, *158*, 116891, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116891>
- (8) Dos Santos, W. N. L.; Cavalcante, D. D.; da Silva, E. G. P.; Das Virgens, C. F.; Dias, F. S. Biosorption of Pb(II) and Cd(II) ions by *Agave sisalana* (sisal fiber). *Microchem. J.* **2011**, *97* (2), 269-273. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.09.014>
- (9) Días, F. S.; Bonsucesso, J. S.; Oliveira, L. C.; Dos Santos, W. N. L. Preconcentration and determination of copper in tobacco leaves samples by using a minicolumn of sisal fiber (*Agave sisalana*) loaded with Alizarin fluorine blue by FAAS. *Talanta* **2012**, *89*, 276-279. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.027>
- (10) Uçar, G.; Bakircioglu, D.; Kurtulus, Y. B. Determination of metal ions in water and tea samples by flame-AAS after preconcentration using sorghum in nature form and chemically activated. *J. Anal. Chem.* **2014**, *69*, 420-425. <https://doi.org/10.1134/S1061934814050098>
- (11) Días, F. S.; Bonsucesso, J. S.; Alves, L. S.; Da Silva Filho, D. C.; Costa, A. C. S.; Dos Santos, W. N. L. Development and optimization of analytical method for the determination of cadmium from mineral water samples by off-line solid phase extraction system using sisal fiber loaded TAR by FAAS. *Microchem. J.* **2013**, *106*, 363-367. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.01.018>
- (12) Silva, J.; Pistón, M. On-Line Preconcentration and Simultaneous Determination of Cu and Mn in Water Samples Using a Minicolumn Packed with Sisal Fiber by MIP OES. *Molecules* **2021**, *26* (6), 1662. <http://doi.org/10.3390/molecules26061662>
- (13) Pena-Pereira, F.; Wojnowski, W.; Tobiszewski, M. AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 10076-10082. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>
- (14) Pena-Pereira, F.; Tobiszewski, M.; Wojnowski, W.; Psillakis, E. A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation. *Advances in Sample Preparation* **2022**, *3*, 100025. <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2022.100025>
- (15) Magnusson, B.; Örnemark, U. (Eds.) Eurachem Guide: *The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2nd ed. 2014). ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org

Article

On-Line Preconcentration and Simultaneous Determination of Cu and Mn in Water Samples Using a Minicolumn Packed with Sisal Fiber by MIP OES

Javier Silva ^{1,2}  and Mariela Pistón ^{2,*} 

¹ Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Avda. Gral. Flores 2124, Montevideo 11200, Uruguay; jsilva@fq.edu.uy

² Grupo de Análisis de Elementos Traza y Desarrollo de Estrategias Simples para Preparación de Muestras (GATPREM), Química Analítica (DEC), Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo 11200, Uruguay

* Correspondence: mpiston@fq.edu.uy

Abstract: An on-line preconcentration system for the simultaneous determination of Copper (Cu) and manganese (Mn) in water samples was developed and coupled to a microwave-induced plasma optical emission spectrometer (MIP OES). The flow injection system was designed with a minicolumn packed with sisal fiber (*Agave sisalana*). A multivariate experimental design was performed to evaluate the influence of pH, preconcentration time, and eluent concentration. Optimal conditions for sample preparation were pH 5.5, preconcentration time was 90 s, and HCl 0.5 mol L⁻¹ was the eluent. The main figures of merit were detection limits 3.7 and 9.0 µg L⁻¹ for Cu and Mn, respectively. Precision was expressed as a relative standard deviation better than 10%. Accuracy was evaluated via spiked recovery assays with recoveries between 75–125%. The enrichment factor was 30 for both analytes. These results were adequate for water samples analysis for monitoring purposes. The preconcentration system was coupled and synchronized with the MIP OES nebulizer to allow simultaneous determination of Cu and Mn as a novel sample introduction strategy. The sampling rate was 20 samples/h. Sisal fiber resulted an economical biosorbent for trace element preconcentration without extra derivatization steps and with an awfully time of use without replacement complying with the principles of green analytical methods.

Keywords: biosorbents; sisal fiber; MIP OES; water; preconcentration; trace element; sample preparation



Citation: Silva, J.; Pistón, M. On-Line Preconcentration and Simultaneous Determination of Cu and Mn in Water Samples Using a Minicolumn Packed with Sisal Fiber by MIP OES.

Molecules **2021**, *26*, 1662. <https://doi.org/10.3390/molecules26061662>

Academic Editor: Giorgio Marrubini

Received: 2 March 2021

Accepted: 15 March 2021

Published: 16 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The determination of trace elements in water samples is of interest both to help us understand more about the levels of essential elements, as well as those that are potentially toxic. Copper (Cu) and manganese (Mn) are expected to be found at low levels in natural waters (e.g., well water, rain, river, among other resources), but human activity is also responsible for finding these heavy metals in waters [1,2]. Both can also be present in drinking water due to the corrosion of pipes, the erosion of natural deposits and due to the use of products for purification [3,4]. The United States Environmental Protection Agency (US EPA) provides guidelines for communities on maximum allowable concentration levels (MCL) to avoid health and organoleptic problems due to the presence of these elements (e.g., unpleasant appearance, odor, or taste). The MCLs established for Cu and Mn in drinking water are 1 and 0.05 mg L⁻¹, respectively [5]. Atomic spectrometry techniques have been widely used for trace element determinations in water samples. Within these techniques, atomic emission is preferred since it allows for a multielement analysis. The use of inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP OES) and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) can achieve the ionization of elements with

a high efficiency, achieving low detection limits (ng L^{-1}), so they are the first choice when working at trace and ultra-trace levels [6]. As a disadvantage, they have a high investment cost, maintenance, and a high consumption of argon during operation. As an alternative to these expensive techniques, in recent decades, microwave-induced plasma atomic emission spectrometry (MIP OES) has emerged using a nitrogen plasma. MIP OES appears as a more economical and ecological technology since the plasma is maintained with nitrogen generated from an air compressor (“runs on air”); thus, the operating costs are considerably lower and the technique is considered environmentally friendly. On the other hand, the nitrogen plasma does not reach such high temperatures than the argon one, therefore detection limits are higher (μL^{-1}). This disadvantage is detrimental to its wider application in trace or ultra-trace element analysis [7].

An alternative to overcome this drawback is the introduction of the sample after an online preconcentration step. This can be accomplished by coupling an automated flow injection system (FIA) that allows to increase the amount of sample introduced into the MIP OES plasma and therefore increase the sensitivity. In addition, this strategy can avoid, in many cases, possible interferences produced by the matrix. FIA has several advantages when coupled to atomic spectrometry; however, to reach microscale working conditions with reliable and reproducible results, rigorous optimization is required [8–14].

Biosorbents are economic and ecological materials that have been successfully used for heavy metal remediation as adsorbents in wastewater [15]. These materials can accumulate metals through metabolic pathways or physicochemical processes. Several reports indicate that some biosorbents are efficient when they have many binding sites such as carboxylic groups, carbonyls, and amines, among others [15,16]. Lignocellulose present in the cell wall of plant material has carboxylic and hydroxyl groups; therefore, materials such as sisal fiber (*Agave sisalana*), algae, or chitinous materials have been tested as environmental pollution remediation agents [15,17]. Based on what has been reported about applications of these materials in bioremediation, it was proposed to test sisal fiber for preconcentration packing minicolumns. Few applications were published and all of them functionalize the sisal fiber with different reagents, for example using alizarin fluoride blue for copper or tiazolylazo-Resorsinol (TAR) for cadmium preconcentration, respectively [16,18]. Other studies used sisal fiber for off-line solid phase extraction of Cu, Mn, Ni, and Zn from diesel oil samples [19].

Compared with commercial solid-phase sorbents, biosorbents are renewable materials with the advantages of being low cost and easily available, characteristics that contribute to the principles of green chemistry [13,20,21].

The application of these greener techniques can be useful for water pollution monitoring and surveillance of the quality of the potable water supplied by distributing stations. This can contribute to the management of adequate water treatment technologies [22].

The goal of this work is the use of sisal fiber as biosorbent for preconcentration of Cu and Mn without need of functioning the material with other reagents using an online flow injection system with a minicolumn. The developed system was coupled to MIP OES after experimental conditions were optimized and validated for the determination of these elements in water samples. The preconcentration and sample introduction steps were automated allowing simultaneous measurement of both elements with good precision using hydrochloric acid 0.5 mol L^{-1} as eluent. Several water samples (well, rain, tap water) were analyzed, and the results were compared with those obtained using electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). The developed method result was simple and accurate, being a promising alternative for heavy metal determination using greener analytical techniques.

2. Results and Discussion

A flow injection system (FI) was coupled to a microwave induced plasma spectrometer (MIP OES) with an on-line preconcentration system for Cu and Mn determinations. A minicolumn packed with a biosorbent (sisal fiber) was placed in a 6-port valve preconcentration

of both elements in water samples to improve the detection limits using an automated process for this purpose. This development involved an optimization of the coupling conditions and the sample preparation step, and, finally, the validation and application to real samples.

2.1. Flow Injection System Coupled to MIP OES

Obtaining analytical data with good precision is essential when developing a new analytical method. Particularly when additional steps or modifications are made to conventional mode of operation of the instrument, this parameter must be carefully studied.

Coupling an on-line preconcentration flow system to an atomic emission technique such as MIP OES was a challenge because the elution step required to be synchronized with the detection system. Sample introduction, after elution from the minicolumn, into the nebulizer was a critical stage.

The MIP OES spectrometer (Agilent 4210, the latest model available) operates with a sequential monochromator, i.e., it modifies the reading conditions for each analyte moving the grating sequentially to each selected wavelength. Multielement analysis can be made with this technique in the conventional mode of operation since the grating movement occurs in a few seconds. However, this is a problem when a flow system is coupled because a real-time mode of measurement is required (time scan mode), and the time that the instrument needs to move the grating from a wavelength to another, for multielement analysis, caused severe imprecision. This data acquisition mode entails loss of time which negatively influences the accuracy when performing data acquisition in real-time.

Figure 1 shows the imprecise behavior of the analytical signals (peak height) when a standard solution of Cu and Mn (2 mg L^{-1}) was registered in quintuplicate.

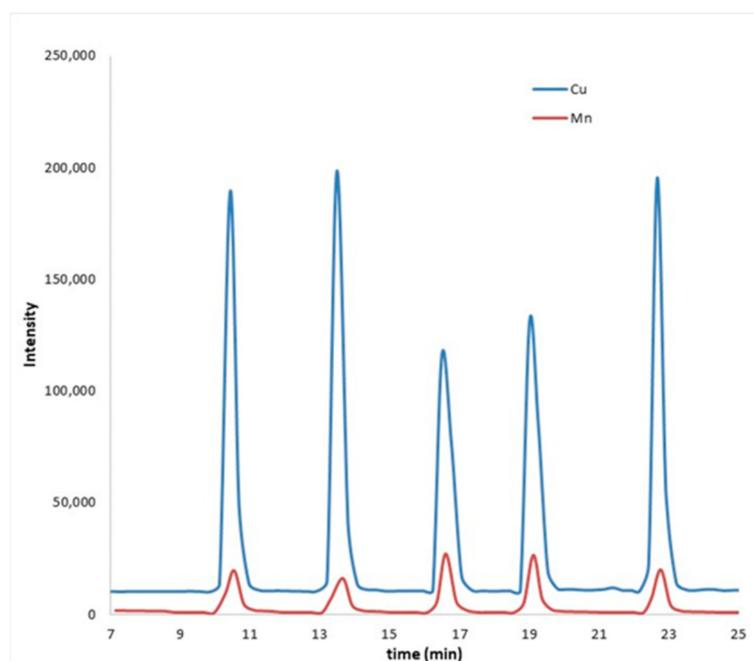


Figure 1. Recording of the signal corresponding to a standard solution (2 mg L^{-1}) of Cu (blue) and Mn (red).

Therefore, making the instrumental conditions for both analytes compatible with a simultaneous determination, reducing the loss of time, and thus improving the precision and increasing the sampling frequency was a challenge. To achieve this goal, the beginning of data acquisition was synchronized with the start of the preconcentration step using a program written in Python language. Furthermore, to minimize the loss of time between

measurements, a compromise was made with the operating conditions of the MIP OES, as shown in Table 1.

Table 1. Operating conditions microwave-induced plasma optical emission spectrometer (MIP OES).

	Selected by the Commercial Software ¹		Selected for This Method	
	Cu	Mn	Cu	Mn
Viewing position	10	−10	10	−10
Nebulizer flow (L min ^{−1})	0.65	0.95	0.9	0.9

¹ When the nebulizer flow changes conditions, due to default optimal values established by the manufacturers, the stabilization time needed causes imprecision.

2.2. Optimization

A multivariate experimental design (three-level central composite) was performed using a standard solution of Cu and Mn (5 mg L^{−1}) to optimize critical variables. The effects of pH, preconcentration time, and eluent concentration were evaluated. Each experiment was carried out in triplicate. The experimental conditions and the results are presented in Table 2.

Table 2. Central composite design (3-level, 3 variables).

Exp#	Preconcentration Time (s)	pH	(HCl) (mol L ^{−1})	Cu (Peak Height ¹)	Mn (Peak Height ¹)
1	30	4	0.2	674	127
2	30	4	0.5	589	114
3	30	6	0.2	401	99
4	30	6	0.5	363	93
5	60	5.5	0.3	1289	226
6	90	4	0.2	1872	277
7	90	4	0.5	1798	258
8	90	6	0.2	1079	223
9	90	6	0.5	1049	198
10	90	5.5	0.3	1854	298
11	90	5.5	0.5	1925	321

¹ Peak height values refer to intensity of the analytical signal (emission).

According to the results, the best conditions in terms of better analytical signal responses were achieved for preconcentration times: 90 s, pH: 5.5, and HCl concentration of 0.5 mol L^{−1}. Therefore, these conditions were selected for validation (experiment 11).

For each determination, sample consumption was less than 10 mL and 3 mL of 0.5 mol L^{−1} HCl for the elution step.

2.3. Validation

The analytical performance of the complete process, on-line preconcentration, and subsequent determination of Cu and Mn in water samples was evaluated in accordance with the Eurachem Guide recommendations. The detection and quantification limits were obtained according to the 3 s and 10 s criteria [23]. Trueness was evaluated using a spike-recovery assay; this was because available certified reference materials were preserved in an acid medium. This acidic medium implies a strong pH adjustment that involves a large amount of sodium hydroxide that had negative effects in the preconcentration step when it was tested. Adding more sodium hydroxide was also incompatible with the amount of total dissolved solids recommended for the MIP OES technique (up to 2%). Therefore, the spike-recovery (%R) assay was performed at two concentration levels, 0.1 and 0.2 mg L^{−1} for Cu and Mn, respectively.

Precision was expressed as relative standard deviation (RSD%) and was evaluated using a pool of three water samples spiked with 0.05 and 0.1 mg L^{−1} of Cu and Mn respectively (n = 6) and with samples that quantified Cu and Mn. Linearity was good for

both elements with determination coefficients (R^2) greater than 0.998. Table 3 summarizes the obtained figures of merit of the method validation.

Table 3. Figures of merit for the flow injection (FI) FI-MP OES method.

	Cu	Mn
Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12–500	30–500
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3.7	9.0
LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	12	30
Trueness (%R) *	96.5	98.0
Precision (%RSD, $n = 6$) **	4.3	2.6
Precision (%RSD, $n = 6$) ***	9	10

* mean \pm standard deviation, $n = 6$; ** using spiked samples; *** using real water samples. LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification.

These results are suitable for Cu and Mn monitoring purposes considering the MCL values for both metals in waters. Linear ranges were 10 times wider than those obtained using electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) when applied in this work for comparison of the samples results (50 and $15 \mu\text{g L}^{-1}$ for Cu and Mn respectively) and in previous works [24].

When precision was optimized before the synchronization of RSD (%) was close to 20% for both elements, the improvement was notable when this limitation was solved, achieving values of RSD better than 5% in spiked samples at low concentration levels (Table 3). Figure 2 shows the recording of the signal, simultaneously, for Cu and Mn, using the time scan mode for three standards and three samples each in triplicate. Thus, the improvement of the precision can be observed.

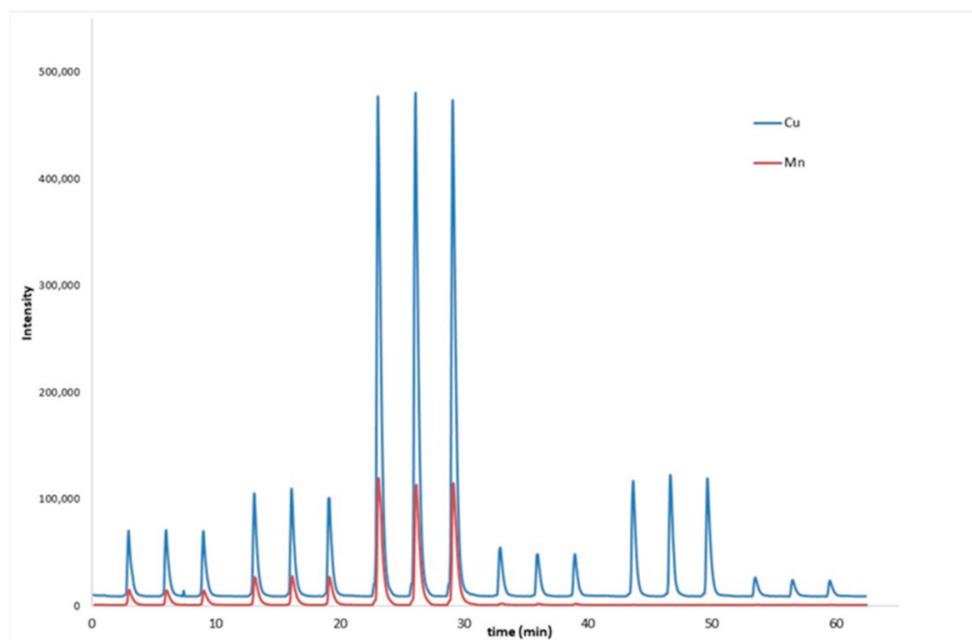


Figure 2. Recording of the signal corresponding to standards (0.05 , 0.1 , and 0.5 mg L^{-1}) and samples with synchronization. Cu (blue), Mn (red).

The enrichment factor (EF) is an important figure of merit for preconcentration systems. For both analytes this factor was 30 with a sampling frequency of about $20 \text{ samples h}^{-1}$ for the simultaneous determination of Cu and Mn. More than 350 determinations have been made in this work using the same package in the minicolumn without regeneration; no signal decay was observed. Another advantage of the FI system was the low consumption of reagents with the consequent low generation of waste.

LOD and LOQ were greater than those that achieved by ETAAS or ICP techniques. However, considering the MIP OES capabilities and the fit-for-purpose, these results can be considered adequate.

Commercial resins or sorbents are commonly used for preconcentration purposes, but compared to commercial sorbents, biosorbents have the advantages of being low cost and highly available renewable materials, attributes that make them a promising eco-alternative for preconcentration.

The validated FI-MIP OES method was applied for the determination of Cu and Mn in the water samples.

The obtained results were statistically compared with those obtained by electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS). Table 4 summarizes the results.

Table 4. Comparison of Cu and Mn levels in sample waters using ETAAS.

Sample	Developed Method ($\mu\text{g L}^{-1}$)		ETAAS ($\mu\text{g L}^{-1}$)		<i>t</i> Value	
	Cu	Mn	Cu	Mn	Cu	Mn
Well water 1	93 ± 9	ND	82 ± 1	<LOQ	2.44	–
Well water 2	79 ± 3	ND	81 ± 1	<LOQ	1.50	–
Well water 3	108 ± 4	175 ± 9	114 ± 2	161 ± 1	−1.07	2.2
Well water 4	124 ± 11	ND	113 ± 1	<LOQ	2.03	–
Well water 5	61 ± 5	ND	55 ± 2	<LOQ	1.14	–
Well water 6	35.4 ± 2.4	57.5 ± 1.3	39.5 ± 5.0	56.9 ± 1.0	−0.44	0.37
Tap water	106 ± 1	ND	105 ± 1	<LOQ	0.68	–
Rainwater	ND	ND	<LOQ	<LOQ	–	–

Mean ± standard deviation. Student's *t*-test (0.05, 4) = 2.78; LOQ (ETAAS) 4.5 and 1.4 $\mu\text{g L}^{-1}$ for Cu and Mn, respectively. ND: not detected.

The samples that presented quantifiable values of Cu and Mn were statistically comparable with the results obtained via ETAAS, a technique widely used for the determination of trace elements in water. Therefore, the proposed analytical method can be postulated as an alternative with several advantages in terms of green analytical chemistry.

3. Materials and Methods

3.1. Reagents and Instruments

Cooper and Mn calibration standards were prepared from a 1000 mg L^{−1} commercial solution (Fluka, Switzerland) by appropriate dilutions using ultrapure water and pH = 5.5 was adjusted with a diluted dissolution of NaOH (0.1 mol L^{−1}).

Purified water (resistivity 18.2 M Ω .cm) was obtained by a purification system (Millipore, DirectQ3 UV, Darmstadt, Germany). All other chemical reagents were of analytical grade. All glassware was soaked overnight in 10% (*v/v*) nitric acid and then rinsed with ultrapure water.

The flow injection (FI) manifold used for the on-line preconcentration consisted of the following components: a peristaltic pump (Rainin Dynamax RP-1, Emeryville, CA, USA) fitted with Tygon tubing and a 6-port injection valve (two-position) with a microelectronic actuator-controlled module (VICI, Valco Cheminert Instrument Co Inc., Houston, TX, USA), this valve was controlled by a personal computer via the RS232 serial port using the program Phyton™. Connections were made from Teflon PFA tubing (0.8 mm internal diameter). A scheme of the FI system is presented in Figure 3.

The system was operated using a program, created in our laboratory, and written in Phyton™ [25], a general purpose programming language. This program allowed us to control the injection valve and, therefore, the preconcentration and elution steps automatically.

Analytical determinations were carried out using a microwave-induced plasma optical emission spectrometer (MIP OES, Agilent 4210, Santa Clara, CA, USA) with a standard torch, an inert One Neb nebulizer, and a glass cyclonic spray chamber. The instrument works with nitrogen generated with an Agilent 4107 Nitrogen generator (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), which works with an air compressor model KK70 TA-200 K

(Dürr Technik, Bietigheim-Bissingen, Germany). The plasma operation conditions were gas flow fixed at 20 L min^{-1} and the auxiliary gas flow at 1.5 L min^{-1} .

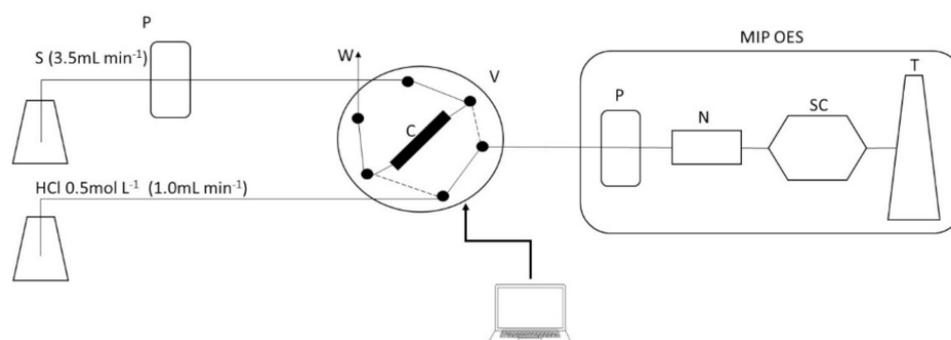


Figure 3. FI system for the on-line preconcentration coupled to MIP OES. P: peristaltic pump; V: 6-port injection valve; C: minicolumn; W: waste; S: sample or standard; HCl: hydrochloric acid for elution; N: nebulizer; SC: spray chamber; and T: torch. Dotted lines represent the valve position during the elution step and solid lines represent the position during the preconcentration step.

Analytical signals were obtained in Time Scan mode at 324.75 nm and 403.08 nm for Cu and Mn, respectively, generated data was exported in csv format, and processed using the Peak Simple™ software (SRI, Torrance, CA, USA). This software provided tools for signal smoothing, baseline correction, and peak-height (analytical signal) measurement.

For validation and comparison of the obtained results, real samples were also analyzed via electrothermal atomic absorption technique (ETAAS). A longitudinal heated, ETAAS spectrometer (Perkin Elmer HGA 900, Shelton, CT, USA) with hollow cathode lamps (Perkin Elmer, Shelton, CT, USA) of Cu and Mn operating at 324.8 nm and 279.51 nm, respectively, was used. Atomization took place on solid pyrolytic graphite L'vov platform inserted in standard pyrocoated graphite tubes. The programs used for these determinations are shown in Table 5, volume of injection was 0.050 mL, and no matrix modifier was required.

Table 5. Operation conditions for ETAAS determinations.

Stage	Temperature (°C)	Hold Time (s)	Ramp Rate (°C s ⁻¹)	Internal Ar Flow (mL min ⁻¹)
Drying	110	1	30	250
Drying	130	15	20	250
Pyrolysis	1100 ^(Cu) / 1050 ^(Mn)	10	20	250
Atomization	2300 ^(Cu) / 2100 ^(Mn)	0	5	0
Cleaning	2600	1	5	250

3.2. Preconcentration Minicolumn

A minicolumn was designed and constructed in the laboratory. It was prepared by packing 100 mg of sisal fiber (*Agave sisalana*) into a glass tube 5 cm long and 2.2 mm internal diameter. A picture of the packed column is shown in Figure 4, the connections were made by 3D impression. To avoid loss of packing during analysis, a frit was placed at each end of the column.



Figure 4. Minicolumn packed with sisal fiber.

Sisal fiber was obtained in a local market as sisal thread, before packing the minicolumn the fiber was treated as previously reported by dos Santos et al. [21]. The fibers were firstly washed with HNO₃ (10% *v/v*) and after that, washed successive times with ultrapure water. It was then placed in an oven at 60 °C for 12 h before packing the minicolumn [21].

The operation of the FI system for Cu and Mn simultaneous determination consisted of a preconcentration of the sample or standards in the minicolumn for 90 s. After that, by switching the valve (V) for another 90 s (dotted line in Figure 3), the eluent (HCl 0.5 mol L⁻¹) releases the analytes and carries them to the MIP OES. The HCl is propelled by a peristaltic pump included in the MIP OES spectrometer that introduce the sample directly into the nebulizer.

The preconcentration step (switch of the valve and timing) was controlled with a computer with a developed program using Python language. The software also controlled the number of repetitions of the whole process for each sample or standards. Thus, this can be considered an automated system for sample preparation and an introduction into the plasma.

3.3. Samples

Samples were selected to obtain different representative matrices to apply the developed method.

Water samples were obtained from different regions of Uruguay including six well waters, rainwater, and tap water. The initial pH of the collected samples ranged 5 to 8 and were stored between 2–8 °C in plastic bottles without adding extra preserves until analysis.

Prior to the analytical determinations, if samples presented material in suspension it was filtered through a 0.45 µm pore size membrane. This step was carried out only when necessary. In all cases, the pH was adjusted to 5.5 with a diluted sodium hydroxide solution (0.1 mol L⁻¹) or diluted hydrochloric acid (0.1 mol L⁻¹), as appropriate. The final volume was established gravimetrically after this addition.

3.4. Optimization and Validation

A multivariate experimental was performed to evaluate the influence of pH, preconcentration time and eluent concentration, by means of a three-level central composite design. Peak height was the response evaluated to obtain the optimal conditions for the preconcentration system [26].

The analytical methodology was validated in accordance with the recommendations established via the Eurachem Guide, obtaining the following figures of merit: linearity, detection/quantification limits (LOD and LOQ), precision, and trueness [23].

4. Conclusions

A novel on-line preconcentration flow system that uses a minicolumn packed with a biosorbent was developed. The analytical method succeeded in synchronizing the analytical signals of Cu and Mn to record real-time measurements via MIP OES with adequate precision. The use of sisal fiber as a biosorbent was very efficient with up to 350 determinations before requiring replacement and no additional reagent was required to functionalize it.

The figures of merit were adequate for Cu and Mn monitoring purposes in water samples according to international regulations. It was applied to several waters with results that were statistically comparable to those obtained using ETAAS. This development is original in analytical chemistry and has several advantages such as being economical and environmentally friendly.

Author Contributions: Conceptualization, J.S. and M.P.; Formal analysis, J.S.; Investigation, J.S. and M.P.; Methodology, J.S. and M.P.; Software, J.S.; Supervision, M.P.; Writing—original draft, M.P. and J.S.; Writing—review and editing, M.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: All the data is reported in this manuscript.

Acknowledgments: Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) and PEDECIBA-Química, Juan Carlos Rodríguez, and Guillermo Roth for 3D impression of the connectors and their help in programing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Not available.

References

1. Fernández, S.; Villanueva, U.; de Diego, A.; Arana, G.; Madariaga, J.M. Monitoring trace elements (Al, As, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni and Zn) in deep and surface waters of the estuary of the Nerbioi-Ibaizabal River (Bay of Biscay, Basque Country). *J. Mar. Syst.* **2008**, *72*, 332–341. [CrossRef]
2. Tzempelikou, E.; Zeri, C.; Iliakis, S.; Paraskevopoulou, V. Cd, Co, Cu, Ni, Pb, Zn in coastal and transitional waters of Greece and assessment of background concentrations: Results from 6 years implementation of the Water Framework Directive. *Sci. Total Environ.* **2021**, *774*, 145177. [CrossRef]
3. Alvarez-Bastida, C.; Martínez-Miranda, V.; Vázquez-Mejía, G.; Solache-Ríos, M.; Fonseca-Montes de Oca, G.; Trujillo-Flores, E. The corrosive nature of manganese in drinking water. *Sci. Total Environ.* **2013**, *447C*, 10–16. [CrossRef] [PubMed]
4. Zhang, S.; Tian, Y.; Guo, Y.; Shan, J.; Liu, R. Manganese release from corrosion products of cast iron pipes in drinking water distribution systems: Effect of water temperature, pH, alkalinity, SO_4^{2-} concentration and disinfectants. *Chemosphere* **2021**, *262*, 127904. [CrossRef] [PubMed]
5. United States Environmental Protection Agency. Secondary Drinking Water Regulations Guidance for Nuisance Chemicals EPA-816F10-079. Available online: <http://www.epa.gov/safewater> (accessed on 1 March 2021).
6. Thomas, R. *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners, (Practical Spectroscopy)*, 3rd ed.; Edición Kindle; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2013.
7. Williams, C.B.; Amais, R.S.; Fontoura, B.M.; Jones, B.T.; Nóbrega, J.A.; Donati, G.L. Recent developments in microwave-induced plasma optical emission spectrometry and applications of a commercial Hammer-cavity instrument. *Trends Anal. Chem.* **2019**, *116*, 151–157. [CrossRef]
8. Fang, Z. *Flow Injection Separation and Preconcentration*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 1993.
9. Liang, H.D.; Han, D.M. Multi-Walled Carbon Nanotubes as Sorbent for Flow Injection On-Line Microcolumn Preconcentration Coupled with Flame Atomic Absorption Spectrometry for Determination of Cadmium and Copper. *Anal. Lett.* **2006**, *39*, 2285–2295. [CrossRef]
10. Pistón, M.; Silva, J.; Pérez-Zambra, R.; Knochen, M. Determination of total selenium by multicommutated-flow hydride generation atomic absorption spectrometry. Application to cow's milk and infant formulae. *Anal. Methods* **2009**, *1*, 139–143. [CrossRef] [PubMed]
11. Pistón, M.; Silva, J.; Pérez-Zambra, R.; Dol, I.; Knochen, M. Automated method for determination of total arsenic and selenium in natural and drinking water by HG-AAS. *Environ. Geochem. Health* **2012**, *34*, 273–278. [CrossRef] [PubMed]
12. Pistón, M.; Knochen, M. Determination of total selenium in infant formulas. Comparison of the performance of FIA and MCFA flow systems. *Int. J. Anal. Chem.* **2012**, *1*–7. [CrossRef] [PubMed]
13. Teixeira, L.S.G.; Lemos, V.A.; Melo Coelho, L.; Rocha, F.R.P. Applications of biosorbents in atomic spectrometry. *Appl. Spectrosc. Rev.* **2016**, *51*, 36–72. [CrossRef]
14. Shih, T.T.; Chen, J.Y.; Luo, Y.T.; Lin, C.H.; Liu, Y.H.; Su, Y.A.; Chao, P.C.; Sun, Y.C. Development of a titanium dioxide-assisted preconcentration/on-site vapor-generation chip hyphenated with inductively coupled plasma-mass spectrometry for online determination of mercuric ions in urine samples. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1063*, 82–90. [CrossRef] [PubMed]
15. Hajeeth, T.; Vijayalakshmi, K.; Gomathi, T.; Sudha, P.N. Removal of Cu(II) and Ni(II) using cellulose and extracted from sisal fiber cellulose-g-acrylic acid copolymer. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *62*, 59–65. [CrossRef] [PubMed]
16. de Souza Dias, F.; Santana Bonsucesso, J.; Suzart Alves, L.; Correia da Silva Filho, D.; Spínola Costa, A.C.; Lopes dos Santos, W.N. Development and optimization of analytical method for the determination of cadmium from mineral water samples by off-line solid phase extraction system using sisal fiber loaded TAR by FAAS. *Microchem. J.* **2013**, *106*, 363–367. [CrossRef]
17. Giri Dev, V.R.; Venugopal, J.R.; Kumar, T.S.; Miranda, L.R.; Ramakrishna, S. Agave sisalana, a biosorbent for the adsorption of Reactive Red 120 from aqueous solution. *J. Text. Inst.* **2010**, *101*, 414–422. [CrossRef]
18. de Souza Dias, F.; Bonsucesso, J.S.; Oliveira, L.C.; dos Santos, W.N.L. Preconcentration and determination using of copper in tobacco leaves samples by minicolumn of sisal fiber (Agave sisalana) loaded with Alizarin fluorine blue by FAAS. *Talanta* **2012**, *89*, 276–279. [CrossRef] [PubMed]
19. Anjos, S.L.; Almeida, J.S.; Teixeira, L.S.G.; da Silva, A.C.M.; Santos, A.P.; Queiroz, A.F.S.; Ferreira, S.L.C.; Mattedi, S. Determination of Cu, Ni, Mn and Zn in diesel oil samples using energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry after solid phase extraction using sisal fiber. *Talanta* **2021**, *225*, 121910. [CrossRef] [PubMed]
20. Wang, J.; Chen, C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnol. Adv.* **2009**, *27*, 195–226. [CrossRef] [PubMed]

21. Dos Santos, V.C.G.; De Souza, J.V.T.M.; Tarley, C.R.T.; Caetano, J.; Cardoso Dragunski, D. Copper Ions Adsorption from Aqueous Medium Using the Biosorbent Sugarcane Bagasse In Natura and Chemically Modified. *Water Air Soil Pollut.* **2011**, *216*, 351–359. [[CrossRef](#)]
22. Saramasan, C.; Drăghici, S.; Daina, L. Identification, Communication and management of risks relating to drinking water pollution in Bihor County. *Environ. Res. Eng. Manag.* **2008**, *7*, 769–777. [[CrossRef](#)]
23. Magnusson, B.; Örnemark, U. *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods—A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd ed.; Eurachem: Torino, Italy, 2014; ISBN 978-91-87461-59-0.
24. Machado, I.; Mondutey, S.; Patorino, N.; Arce, V.; Pistón, M. A green analytical method for the determination of Cu, Fe, Mn, and Zn in wheat flour using total reflection X-ray fluorescence. *J. Anal. At. Spectrosc.* **2018**, *33*, 1264–1268. [[CrossRef](#)]
25. Welcome to Phytion. Available online: www.phytion.org (accessed on 1 March 2021).
26. Massart, M.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, L.M.C.; De Jong, S.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*; Elsevier Science: Amsterdam, The Netherlands, 1997.