



Tesis de Maestría en Química

“Desarrollo de métodos analíticos utilizando tratamientos asistidos con ondas de ultrasonido para ser aplicados en la evaluación de la inocuidad de frutas y hortalizas, desde el punto de vista del contenido de contaminantes inorgánicos”

Química Mónica Pereira Berrutti

Directores de Tesis:

Dra. Mariela Pistón

Dra. Florencia Tissot

Dr. Facundo Ibáñez

Química Analítica – DEC

Facultad de Química

Universidad de la República



CARRERA DE POSGRADO	Maestría en Química		
ESTUDIANTE	NOMBRE: Mónica Cecilia Pereira Berrutti	C.I. 4862341-4	
DEFENSA:	LUGAR Facultad de Química	FECHA 11/03/2021	HORA 10:00
TÍTULO DE TESIS:	Desarrollo de métodos analíticos utilizando tratamientos asistidos con ondas de ultrasonido para ser aplicados en la evaluación de la inocuidad de frutas y hortalizas, desde el punto de vista del contenido de contaminantes inorgánicos		
DICTAMEN ¹	JUICIO Excelente	NOTA 12	

FUNDAMENTACIÓN:

El Tribunal habiendo analizado la tesis en profundidad considera:

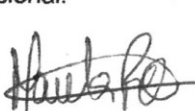
La presentación fue realizada en forma adecuada, clara, ajustada a los tiempos, desarrollando los ítems con la profundidad y detalle necesarios, con excelente apoyo audiovisual.

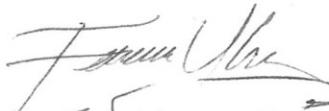
Con relación a la defensa, demostró amplia solvencia, respondiendo adecuadamente a las preguntas del tribunal, así como profundizando en los comentarios.

Quedó demostrado su alto dominio de los temas de la tesis, el interés y entusiasmo en abordar la temática desde diferentes perspectivas.

Se destaca el potencial de los resultados del estudio para realizar futuras investigaciones y su impacto en el sistema productivo nacional.

DIRECTORES DE TESIS
(nombres y firmas)


NANCÍA PISTÓN


FACUNDO IBÁÑEZ


FLORENCIA TISSOT

TRIBUNAL
(nombres y firmas)

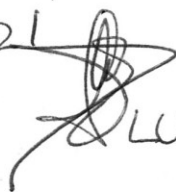

DANIEL VÁZQUEZ


NELLY MANÁ


MARIELA MEDINA

¹ La Tesis podrá resultar

a) Aprobada con dictamen fundado: satisfactoria (6), muy satisfactoria (9) o excelente (12)
b) Rechazada con dictamen fundado.

11/3/21

LUCÍA VAZTÍA

Agradecimientos

A mis directores, Dra. Mariela Pistón, Dra. Florencia Tissot y Dr. Facundo Ibáñez por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis, por su orientación y confianza. Por ponerse más de una vez la túnica y trabajar par a par conmigo en el laboratorio.

A Florencia por su generosidad en compartir sus conocimientos y experiencia, por las largas charlas para trasmitirme que podía con este trabajo, que tenía todo para llevarlo adelante.

A Mariela por en plena pandemia ponerse la túnica, orientarme y ayudarme en todo para terminar la parte experimental. Estar pendiente siempre, para que no se me pasara ningún detalle.

Al Prof. Ricardo Faccio del Área Física and Centro NanoMat, DETEMA, Facultad de Química, por su colaboración en las medidas mediante microscopía Confocal.

A mi familia, por ser la mejor que me pudo tocar, y en especial a mi hermana que me dio al tesoro máspreciado, y entender que necesitaba tiempo para el desarrollo de esta tesis.

A mis amigas de la vida, que son mi segunda familia, y no tienen más que admiración por lo que hago, que siempre son capaces de sacarte una sonrisa y hacen que cada prueba superada sea un gran triunfo.

En especial a mi gran amiga y colega Anita, que siempre estuvo ahí cuando parecía todo inalcanzable, gracias por sus consejos y por trasmitir tanta confianza en uno mismo.

A mis compañeros de trabajo, por siempre confiar en mí, y darme la energía en momentos que necesitaba días de 36 horas.

A Natalia y Edgardo por darme la flexibilidad para poder llevar a cabo esta tesis, sin esto no hubiese sido posible poder concretarla.

A todo el grupo de Química Analítica, por hacerme sentir durante estos dos años parte del equipo, por los consejos, en más de una oportunidad por compartir sus conocimientos.

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

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII beca de Maestría-POS_FSA_2018_1_1008124), Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) proyecto Innovagro FSA_I_2017_1_140199, y al Mercado Modelo.

¡A todos muchas gracias!

Tabla de contenido

Agradecimientos	2
Tabla de contenido	3
Listado de tablas.....	5
Listado de figuras	5
Listado de Abreviaturas	7
RESUMEN.....	8
ABSTRACT	9
1.1 Introducción general	11
1.2 Seguridad e Inocuidad alimentaria.....	12
1.3 Frutas y hortalizas seleccionadas	16
1.4 Determinación de elementos traza potencialmente tóxicos.....	20
1.4.1 Preparación de muestras	20
MÉTODO A- Digestión asistida con microondas.....	23
MÉTODO B- Extracción asistida con ondas de ultrasonido.....	25
1.4.2 Técnicas instrumentales	28
Espectrometría de Absorción Atómica	29
Espectrometría de absorción atómica electrotérmica.....	30
Uso de modificadores químicos	34
Espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP OES) 35	
1.4.3 Optimización de metodologías analíticas	38
1.4.4 Validación	41
2.1 Justificación	48
3.1 Objetivo general.....	51
3.2 Objetivos específicos	51
4.1 Reactivos.....	53
4.2 Instrumentos	54
4.3 Muestras y muestreo	54
4.4 Preparación de muestras	57
4.4.1 Extracción asistida por microondas- Método A.....	57
4.4.2 Extracción asistida por ondas de ultrasonido – Método B	58
4.5 Determinaciones analíticas mediante ETAAS (Cd y Pb)	61
4.6 Condiciones de atomización y pirolisis.....	62
4.6.1 Condiciones de atomización y pirolisis para el Método A	62
4.6.2 Condiciones de atomización y pirolisis para el Método B	63
4.7 Determinación analítica de arsénico mediante HG-MIP OES.....	64
4.8 Microscopía Confocal	68

5.1 Extracción asistida con microondas-MÉTODO A	70
5.1.1 Desarrollo y optimización de las condiciones de digestión	70
5.1.2 Optimización de programas de temperatura mediante ETAAS	71
5.1.3 Optimización de la determinación de As mediante HG-MIP OES.....	74
5.1.4 Validación	75
5.1.5 Análisis de muestras seleccionadas.....	79
5.2 Extracción asistida con ondas de ultrasonido- METODO B.....	83
5.2.1 Optimización de las condiciones experimentales para las determinaciones de Cd, Pb y As	83
5.2.2 Optimización de programas de temperatura mediante ETAAS	83
PLOMO.....	83
CADMIO	85
5.2.3 Optimización de la determinación de As mediante HG-MIP OES.....	88
5.2.4 Optimización de las condiciones de extracción.	88
5.2.5 Microscopía Confocal.....	92
5.2.5 Validación	95
5.2.6 Análisis de muestras seleccionadas y comparación de métodos	97
6.1 Conclusiones	101
6.2 Perspectivas	102
REFERENCIAS	103
Anexo I- Publicaciones y presentaciones.....	107

Listado de tablas

TABLA 4. 1-VALORES DE REFERENCIAS DE MRC	53
TABLA 4. 2-PROGRAMAS DE TEMPERATURAS DE ATOMIZACIÓN Y PIROLISIS- MÉTODO A	63
TABLA 4. 3-PRUEBAS DE MODIFICADORES DE MATRIZ	63
TABLA 4. 4-PROGRAMA DE TEMPERATURA OPTIMIZADO DE ATOMIZACIÓN Y PIROLISIS PARA EL MÉTODO B	64
TABLA 5. 1-CIFRAS DE MÉRITO DE VALIDACIÓN	76
TABLA 5. 2-T DE STUDENT EXPERIMENTALES.....	77
TABLA 5. 3-RESULTADOS DE LECHUGA	80
TABLA 5. 4-RESULTADOS DE MANZANA	80
TABLA 5. 5-RESULTADOS MUESTRAS DE TOMATE.....	81
TABLA 5. 6-RESULTADOS MUESTRAS DE TOMATE.....	81
TABLA 5. 7-DISEÑO CENTRAL COMPUESTO (ADAPTADO MASSART ET AL., 1997)	89
TABLA 5. 8-RESULTADOS DE DISEÑO EXPERIMENTAL	89
TABLA 5. 9-RESULTADOS DE VALIDACIÓN	96
TABLA 5. 10- T EXPERIMENTALES.....	97
TABLA 5. 11-COMPARACIÓN DE RESULTADOS.....	98

Listado de figuras

FIGURA 1. 1- ZONAS DE MAYOR PRODUCCIÓN DE FRUTAS Y HORTALIZAS EN URUGUAY (ADAPTADA SEGÚN DATOS OBTENIDOS DE HTTPS://WWW.GUB.UY/MINISTERIO-GANADERIA-AGRICULTURA-PESCA/TEMATICA/DIEA)	16
FIGURA 1. 3- FENÓMENO DE CAVITACIÓN, ADAPTADO DE BENDICHO ET AL., 2012.....	26
FIGURA 1. 4-FENÓMENO DE CAVITACIÓN, ADAPTADO DE BENDICHO ET AL., 2012.....	26
FIGURA 1. 5-ESQUEMA DE LÁMPARA DE CÁTODO HUECO, EXTRAÍDO DE SKOOG ET AL., 2008	30
FIGURA 1. 6-TUBO DE GRAFITO, ADAPTADA DE SKOOG ET AL., 2008	31
FIGURA 1. 7-ESQUEMA DE ESPECTRÓMETRO DE ABSORCIÓN ATÓMICA ELECTROTÉRMICA CON CORRECCIÓN DE FONDO POR EFECTO ZEEMAN, EXTRAÍDA DE SKOOG ET AL., 2008	34
FIGURA 1. 8-REPRESENTACIÓN DE LA CAVIDAD RESONANTE (DE HAMMER) UTILIZADA EN EL EQUIPO COMERCIAL MIP OES AGILENT TECHNOLOGIES (MODELO 4210). LAS FLECHAS MUESTRAN LA DIRECCIÓN DEL CAMPO MAGNÉTICO (AZUL) Y EL CAMPO ELÉCTRICO (ROJO) (ADAPTADA DE WILLIAMS ET.AL, 2019 CON PERMISO DE AGILENT TECHNOLOGIES).....	37
FIGURA 1. 9-ADAPTADO DE HTTPS://DOCPLAYER.ES/39027572-NUEVAS-TECNICAS-EXCLUSIVAS-E-INNOVADORAS-DE-AGILENT-EN-ANALISIS-ELEMENTAL.HTML (AGILENT TECHNOLOGIES).....	38
FIGURA 1. 10-SUPERFICIE DE RESPUESTA ADAPTADA DE MILLER, 2005	40
FIGURA 1. 11-DISEÑO CENTRAL COMPUESTO, ADAPTADO DE MASSART ET AL. 1997	41
FIGURA 4. 1-MUESTREO DE TOMATE EN EL MERCADO MODELO.....	55
FIGURA 4. 2 PRETRATAMIENTO REALIZADO EN INSTALACIONES DE INIA	56
FIGURA 4. 3-MUESTRAS PARA ANÁLISIS	56
FIGURA 4. 4-MICROONDAS CEM	57

FIGURA 4. 5-MUESTRAS DIGERIDAS EN MICROONDAS.....	58
FIGURA 4. 6-SONDA DE ULTRASONIDO SONICS VIBRACELL VC505	59
FIGURA 4. 7-TRATAMIENTO ASISTIDO CON ULTRASONIDO CON Sonda (A), MUESTRA LUEGO DE CENTRIFUGAR, SÓLIDO Y SOBRENADANTE (B) Y ASPECTO DE LAS EXTRACCIONES LUEGO DEL TRATAMIENTO SEGÚN LAS CONDICIONES DEL DISEÑO EXPERIMENTAL (C) .	60
FIGURA 4. 8-ESPECTRÓMETRO THERMO SCIENTIFIC ICE-3500	61
FIGURA 4. 9-ESPECTRÓMETRO DE EMISIÓN ATÓMICA AGILENT 4210.....	65
FIGURA 4. 10-CÁMARA DE REACCIÓN (MSIS)	65
FIGURA 4. 11-CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA EN FLUJO PARA LA GENERACIÓN DE HIDRURO (ADAPTADA DE MANUAL DE AGILENT TECHNOLOGIES).....	66
FIGURA 4. 12-MECANISMO DE PRE-REDUCCIÓN DE ARSÉNICO	67
FIGURA 4. 13-PREREDUCCIÓN PARA DETERMINACIÓN DE AS (A): TRATAMIENTO CON HCL Y CALOR-(B): MUESTRAS PREVIO A TRASVASE-(C): MUESTRAS LUEGO DEL AGREGADO DE KI Y REPOSO DE 1 HORA	68
FIGURA 5. 1-CURVA DE PIROLISIS Pb EN LECHUGA (ETAPA 1- SELECCIÓN MODIFICADOR DE MATRIZ)	73
FIGURA 5. 2-CURVA DE ATOMIZACIÓN Pb EN LECHUGA (ETAPA 1- SELECCIÓN MODIFICADOR DE MATRIZ)	73
FIGURA 5. 3-CAMPANA DE HORWITZ ADAPTADA DE MILLER 1993	78
FIGURA 5. 4-CURVA DE ATOMIZACIÓN Y PIROLISIS EN LECHUGA.....	84
FIGURA 5. 5-CURVA DE ATOMIZACIÓN Y PIROLISIS EN ZANAHORIA.....	84
FIGURA 5. 6-CURVA DE ATOMIZACIÓN Y PIROLISIS EN MANZANA.....	85
FIGURA 5. 7-CURVA DE ATOMIZACIÓN Y PIROLISIS EN TOMATE.....	85
FIGURA 5. 8-CURVA DE ATOMIZACIÓN Y PIROLISIS EN LECHUGA.....	86
FIGURA 5. 9-CURVA DE ATOMIZACIÓN Y PIROLISIS EN ZANAHORIA.....	86
FIGURA 5. 10-CURVA DE ATOMIZACIÓN Y PIROLISIS CADMIO EN MANZANA	87
FIGURA 5. 11-CURVA DE ATOMIZACIÓN Y PIROLISIS CADMIO EN TOMATE.....	87
FIGURA 5. 12-SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA Cd	90
FIGURA 5. 13-SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA Pb.....	91
FIGURA 5. 14-SUPERFICIE DE RESPUESTA PARA AS.....	91
FIGURA 5. 15-IMÁGENES CONFOCALES DE RESIDUOS DE MRC (NIST 1570A) SIN TRATAMIENTO -CONTROL- (A, B); LUEGO DE 5-MIN DE SONICADO (C, D); LUEGO DE 15-MIN DE SONICADO (E, F) Y LUEGO DE 20-MIN DE SONICADO (G, H). LAS BARRAS DE LA ESCALA SON 100 AND 10 μ M, RESPECTIVAMENTE	94

Listado de Abreviaturas

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*

As: Arsénico

Cd: Cadmio

DER: Desviación estándar relativa

DIEA: Dirección Nacional de Estadísticas Agropecuarias

ETAAS: Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica

FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FAAS: Espectrometría de absorción atómica de llama

HG-MIP OES: Espectrometría de emisión atómica inducido por microondas acoplado a Generación de Hidruros

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

ISO: *International Standardization Organisation*

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LD: Límite de detección

LMR: Límite máximo permitido

LQ: Límite de cuantificación

MECA: Metodología de evaluación de cadenas agroalimentarias.

OMS: Organización Mundial de la Salud

Pb: Plomo

RESUMEN

La inocuidad de los alimentos engloba diferentes acciones con el objetivo de garantizar la máxima seguridad posible de los mismos. Casi la totalidad de las frutas y algunas hortalizas pueden ser consumidas sin necesidad de cocción, pero pueden contener contaminantes que llegan al producto en cualquier punto, desde su cultivo, cosecha, y hasta en la cadena de procesamiento que la lleva al consumidor final.

Con el objetivo de monitorear los contaminantes inorgánicos, arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb) de forma rápida, confiable y con métodos analíticos en acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde, se desarrollaron y validaron dos metodologías para la extracción simultánea de estos elementos. Un método asistido con microondas, en un solo paso y utilizando ácido diluido. Y un método asistido por ondas de ultrasonido y ácido diluido. Se aplicaron los métodos validados para la determinación de estos elementos a cuatro productos: zanahoria, lechuga, manzana y tomate.

Los parámetros de desempeño de las metodologías validadas indicaron que ambas resultaron adecuadas para monitorear estos contaminantes en los referidos alimentos tomando como referencia la reglamentación vigente. Es importante destacar que los límites de detección obtenidos con el método asistido con ondas de ultrasonido fueron uno o dos órdenes de magnitud más bajos que los alcanzados con el método asistido con microondas, lo que la convierte a la extracción asistida por ondas de ultrasonido en una técnica simple y muy eficiente para los fines propuestos.

Todas las muestras analizadas arrojaron resultados comparables por ambos métodos, y los niveles de Cd, Pb y As en todas ellas estuvieron por debajo de la concentración máxima permitida (LMR), establecida por el Reglamento Técnico MERCOSUR y el *Codex Alimentarius*.

Ambas metodologías pueden ser aplicadas a estudios de inocuidad, esto es de relevancia y deja disponible una plataforma analítica al servicio del sector productivo y organismos de contralor nacional.

Palabras clave: inocuidad alimentaria, vegetales, plomo, cadmio, arsénico, microondas, ondas de ultrasonido, química analítica verde.

ABSTRACT

Food safety encompasses different actions in order to guarantee maximum security. Almost all of the fruits and some vegetables can be consumed raw, but they can contain contaminants that reach the product at any point, from its cultivation, harvest, and even in the processing chain, that takes it to the final consumer.

To monitor inorganic pollutants, arsenic (As), cadmium (Cd) and lead (Pb) quickly, reliably and in accordance with the principles of Green Analytical Chemistry, an analytical method was developed and validated for simultaneous extraction of these elements using a microwave and an ultrasound-assisted procedures for sample preparation, in a single step and using diluted acid. The validated analytical methods were applied in four products: carrot, lettuce, apple, and tomato.

The figures of merit of these methodologies indicated that both were adequate to monitor the referred elements in food considering the current regulation. It is important to highlight that the detection limits obtained with the ultrasound-assisted method was one or two orders of magnitude lower than those achieved with the microwave-assisted one, which makes this strategy of extraction an effective technique for this purpose.

Both sample preparation methods yielded comparable results and the levels of Cd, Pb and As in all samples were below the maximum allowed concentration established by the MERCOSUR Technical Regulation and the *Codex Alimentarius*.

These kind of studies applied to food safety are relevant and in this case, an analytical platform is now available for the productive sector and national control agencies.

Keywords: food safety, vegetables, lead, cadmium, arsenic, green analytical chemistry, ultrasonication-assisted extraction.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción general

El concepto de inocuidad de los alimentos comprende diferentes acciones con el fin de garantizar seguridad al consumirlos y es fundamental para la salud pública, siendo un factor muy relevante en su comercialización. Las políticas y actividades que se implementen deben abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción hasta el consumidor final.

Los brotes epidémicos de enfermedades provocadas por alimentos pueden afectar a la población, generar alarmas y reducir la confianza de los consumidores, disminuyendo la demanda, generando pérdidas en toda la cadena de valor.

Casi la totalidad de las frutas y algunas hortalizas pueden consumirse sin necesidad de cocción, pero pueden contener contaminantes que ingresan al producto en cualquier punto, desde su cultivo, cosecha, y hasta en la cadena de procesamiento que la lleva al consumidor final. Si bien estos alimentos son una fuente importante de micronutrientes esenciales, existe una creciente preocupación de los consumidores y las autoridades por garantizar la inocuidad de los mismos. En particular, la acumulación de metales y semimetales potencialmente tóxicos en alimentos de consumo humano y animal son cruciales para definir el concepto de calidad del alimento (Islam et al., 2016; Rehman et al., 2016, 2017). Debido a esto las determinaciones analíticas de elementos como arsénico (As), cadmio (Cd), y plomo (Pb) en diversas matrices alimentarias han tomado vital importancia para asegurar y monitorear la inocuidad de los alimentos.

La contaminación producida por elementos inorgánicos en alimentos de origen vegetal no puede ser removida sugiriendo a los consumidores, por ejemplo, lavar o tratar el alimento de determinada forma, ya que los elementos se vuelven parte constitucional de los tejidos. Es importante considerar que estos alimentos cuando son consumidos crudos aumentan el riesgo hacia el consumidor, ya que muchas veces con la cocción se puede producir lixiviación de estos contaminantes, disminuyendo así su contenido (Mengel et al., 2001; Burlo et al., 1999).

Para este trabajo de tesis, se seleccionaron frutas y hortalizas de consumo masivo en nuestro país, que presentan mayor riesgo de contener elevados niveles de los contaminantes inorgánicos antes mencionados, ya sea por su contacto directo con el suelo o por su capacidad concentradora. En este sentido y con el objetivo de

monitorear los contaminantes inorgánicos antes mencionados, de forma rápida y confiable se desarrollaron y validaron dos métodos analíticos, para la determinación de As, Cd, y Pb en lechuga, manzana, tomate y zanahoria.

El principal objetivo fue desarrollar una plataforma analítica como una herramienta práctica tanto para el sector productivo, y también para organismos de contralor, para el monitoreo de la inocuidad de alimentos desde el punto de vista de contaminantes inorgánicos en nuestro país. Por otro lado, esta herramienta que se deja disponible puede ser utilizada como un inicio para ampliar el monitoreo a otras matrices, ya sea en otras frutas u hortalizas, productos farmacéuticos de origen vegetal, alimentos industrializados, etc.

Como un punto importante hay que destacar que los desarrollos de esta tesis estuvieron en acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde. Se buscó el desarrollo de un método que permita la determinación de los tres contaminantes inorgánicos bajo esta premisa. La Química Verde establece dentro de sus 12 principios fundamentales, entre otras cosas, la reducción de las emisiones contaminantes y el consumo de energía, minimizando los riesgos a la salud y al medio ambiente, reduciendo la generación de desechos para prevenir la contaminación (Armenta et al., 2018). Además de estos principios, para la Química Analítica Verde, se incorporan parámetros complementarios relacionados con la calidad de los resultados a ser estudiados (Armenta et al., 2018).

La FAO busca promover la inocuidad de los alimentos y evitar enfermedades de origen alimentario, resguardando a los consumidores y promoviendo prácticas justas en el comercio de alimentos, mediante la adopción de las normativas del *Codex Alimentarius* (FAO, 2020).

El *Codex Alimentarius* es la compilación de todas las normas, códigos de comportamientos, directrices y recomendaciones de la Comisión del *Codex Alimentarius*. Dicha comisión es el más alto organismo internacional en materia de normas de alimentación y es un organismo subsidiario de la FAO y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (FAO, 2020).

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos, para satisfacer sus necesidades alimenticias a fin de llevar una vida activa y sana. (FAO, 2020)

La inocuidad alimentaria, está definida por el *Codex Alimentarius* como la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso al que se destinan. El enfoque abarca la cadena alimentaria y se basa en la respuesta estratégica a un conjunto de problemas y necesidades de todos los sectores relacionados con los alimentos. Esta estrategia incluye, la adopción universal de un enfoque basado en los riesgos, el énfasis en la prevención de la contaminación de los alimentos en su origen, y la adopción de un enfoque integral relativo a la inocuidad de los alimentos, que abarque toda la cadena alimentaria, desde la granja hasta la mesa (FAO, 2011).

La inocuidad es fundamental para la salud pública y un factor muy relevante en la comercialización de los alimentos. Engloba diferentes acciones con el objetivo de garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos. Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deben de abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo. El control de los alimentos busca garantizar que todos los alimentos, durante su producción, manipulación, almacenamiento, elaboración y distribución, sean inocuos, sanos y aptos para el consumo humano. Para garantizar la misma y proteger a los consumidores es imprescindible que haya sistemas nacionales de control que sean eficaces, con una base oficial y de carácter obligatorio.

La acumulación de elementos inorgánicos potencialmente tóxicos en alimentos de consumo humano y animal son cruciales para definir el concepto de calidad del alimento (Islam et al., 2016; Rehman et al., 2016, 2017). Debido a esto las determinaciones analíticas de As, Cd, y Pb en diversas matrices alimentarias han tomado vital importancia para asegurar y monitorear la inocuidad de los alimentos.

Estas determinaciones se deben realizar en laboratorios analíticos que cuenten con metodologías validadas, den resultados de forma rápida

y confiable para cumplir con los requerimientos, y así liberar los productos al mercado local o para la exportación.

Las fuentes que producen la contaminación pueden estar asociadas a la actividad antropogénica o pueden ser de origen natural. Una de las principales causas posibles de contaminación es el tipo de agua empleada para el riego. La calidad del agua contribuye en gran medida a la inocuidad final del producto que se consume (Allende y Monaghan, 2015).

Entre las posibles fuentes de contaminación con As de frutas y hortalizas en nuestro país se encuentran las aguas subterráneas, en caso de que éstas se utilicen para riego. En Uruguay hay estudios que demuestran que las aguas de determinados acuíferos presentan niveles de As superiores a los admitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) y no se cuenta con información reportada respecto a los suelos (Mañay et al., 2013, Mañay et al., 2019). Por lo tanto, evaluar los niveles de As en frutas y hortalizas es relevante desde el punto de vista toxicológico.

El As inorgánico está clasificado como carcinógeno humano conocido, por IARC (*International Agency for Research on Cancer*) como categoría 1 (ATSDR, 2007). La exposición crónica al As es un problema médico muy extendido y afecta a más de cien millones de personas en todo el mundo. Sus principales manifestaciones tóxicas son a nivel dermatológico como melanodermia, leucodermia y/o queratosis palmo-plantar, evolucionando hacia patologías más graves que pueden relacionarse a distintos tipos de cáncer en piel y en órganos internos (esófago, estómago, hígado, colon, pulmón y vejiga) (Selinus, O., 2004; WHO, 2008).

En el caso de Cd se sabe que éste llega a los suelos y aguas debido al uso indiscriminado de fertilizantes fosfatados. Estos contienen Cd como un producto secundario en su fabricación, y se acumula en los suelos, pudiendo ser absorbido por los vegetales y por lo tanto incorporado en los alimentos (Lasat, 2002; McLaughlin et al., 1995).

La IARC ha determinado que el Cd es carcinogénico en seres humanos (ATSDR, 2007).

El Pb es uno de los contaminantes que se encuentra más ampliamente distribuido en la naturaleza, ya que se encuentra en el ambiente en forma natural. Sin embargo, la mayoría de los niveles altos en las distintas matrices ambientales, tienen origen a partir de actividades humanas. Puede entrar al ambiente a través de liberaciones desde minas de plomo y otros metales, y desde fábricas que manufacturan o utilizan plomo o alguno de sus compuestos. Este metal es liberado al aire atmosférico mediante la quema de carbón, petróleo o desechos (Renfrew, 2011, ATSDR, 2007).

Antes de que se prohibiera el uso de gasolinas con tetraetilo de plomo como antidetonante, la mayor parte del Pb liberado al aire provenía de los escapes de los automóviles, producto de la combustión de gasolinas (Renfrew, 2011).

El efecto tóxico en los organismos afecta principalmente al sistema nervioso, tanto en niños como en adultos (ATSDR, 2007). La IARC ha determinado que el plomo inorgánico es probablemente carcinogénico en seres humanos, y los compuestos orgánicos de plomo no son clasificables en cuanto a carcinogenicidad en seres humanos basado en evidencia inadecuada en estudios en seres humanos y en animales (ATSDR, 2007).

Por todo lo antes mencionado, la evaluación del contenido de estos elementos a niveles traza en los vegetales (debido a la captación por las raíces y translocación a otros órganos de la planta) es relevante desde el punto de vista toxicológico, teniendo en cuenta el riesgo asociado al consumo del alimento. En este sentido, el Reglamento MERCOSUR ha establecido límites máximos para As, Cd y Pb en distintas matrices de origen vegetal. En esta reglamentación se indica que para Cd el máximo admitido es de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ para hortalizas de hoja y $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ para frutas y demás hortalizas, para Pb es $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ para hortalizas de hoja y $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ para frutas y hortalizas y para As es $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ para frutas y hortalizas (MERCOSUR/GMC/RES. N° 12/11).

Es importante aclarar que estos valores establecidos en la reglamentación están referenciados a peso fresco del vegetal, es decir tal como es consumido cuando se lo ingiere crudo. Estos valores regionales están en acuerdo con los establecidos por el *Codex* (FAO, 2011).

1.3 Frutas y hortalizas seleccionadas

En la actualidad, los datos de la Dirección Nacional de Estadísticas Agropecuarias (DIEA) indican que el sector granjero ocupa casi el 2% de la superficie agropecuaria de Uruguay, con unas 23000 hectáreas dedicadas a la horticultura y concentradas en un 80% en el sur del país y un 20% en el litoral norte como se muestra en la Figura 1.1. La producción hortofrutícola aporta un 15% del valor bruto agropecuario, y se caracteriza por estar desarrollada casi en su totalidad por productores familiares (MGAP, 2020).



Figura 1. 1- Zonas de mayor producción de frutas y hortalizas en Uruguay (Adaptada según datos obtenidos de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/tematica/diea>)

Los consumidores buscan variedad en sus dietas y se ha creado conciencia sobre los beneficios para la salud de las frutas y verduras frescas. El consumo de frutas y hortalizas ha aumentado debido a un cambio en la cultura de la alimentación basada en el conocimiento, por ejemplo, del contenido de antioxidantes beneficiosos, y de que estos alimentos son una importante fuente de vitaminas, carbohidratos, minerales y fibras para la dieta humana (Chen et al., 2014). De especial de interés son las fuentes alimentarias ricas en vitaminas antioxidantes (vitaminas C, A y E), calcio, magnesio y potasio. Las verduras de hoja ocupan un

lugar importante en el equilibrio de las dietas. Por otro lado, se cree que las frutas y hortalizas de hoja no ocupan un mayor lugar como fuente de oligoelementos debido a su alto contenido de agua.

El consumo de frutas y hortalizas frescas puede estar asociado al consumo indirecto de elementos potencialmente tóxicos, en especial los elementos de estudio de esta tesis. Aunque el consumo sea en bajas concentraciones a lo largo del tiempo esto puede generar una exposición crónica con posibles efectos negativos para la salud humana (Aberoumand y Deokule, 2009).

Se ha reportado que el problema se está volviendo grave en todo el mundo, especialmente en los países en desarrollo. Considerando el nivel de avance tecnológico en el mundo en desarrollo, es necesario obtener datos precisos y fiables sobre las concentraciones de estos contaminantes en los alimentos de consumo habitual. Además, la composición elemental de los alimentos varía de un grupo a otro debido a su diferente naturaleza y matriz estructural, además de las condiciones ambientales en las que fue cultivado. Esto hace esencial analizar cada grupo de alimentos con métodos analíticos que proporcionen datos precisos y fiables (Akinyele y Shokunbi, 2015).

Las plantas han desarrollado mecanismos específicos para absorber, traslocar y acumular nutrientes, todos procesos mediados por proteínas con funciones de transporte. Esta absorción y posterior acumulación depende de varios factores como el pasaje de los elementos por las membranas de las células corticales de la raíz, el transporte desde estas células al xilema, raíz y tallos, la movilización de los elementos desde las hojas hacia semillas, tubérculos y frutas por medio del floema, entre otros (Lasat, 2002).

En general, el mecanismo de absorción es selectivo, las plantas adquieren preferentemente algunos iones sobre otros. La selectividad de absorción de iones depende de la estructura y propiedades de la membrana, y de los transportadores. Estas características permiten a los transportadores reconocer, unirse y mediar en el transporte transmembrana de iones específicos. Pero hay que tener en cuenta que esos mismos mecanismos pueden también incorporar elementos no esenciales, debido a que presentan un comportamiento electroquímico similar a los esenciales. Los transportadores transmembrana poseen un dominio de unión extracelular al que los iones se unen justo antes del transporte, y una estructura transmembrana que conecta los medios extracelular e intracelular. El dominio de unión es solo receptivo

a iones específicos y es responsable de la especificidad del transportador. La estructura transmembrana facilita la transferencia de iones ligados desde el espacio extracelular a través del ambiente hidrofóbico de la membrana en la célula (Lasat, 1999).

Los transportadores son específicos por ejemplo para iones divalentes, y pueden confundir a la hora de incorporar el elemento e incorporar un elemento tóxico para el ser humano (Lasat, 2002).

En el suelo, los metales están asociados con varias fracciones, como iones metálicos libres y complejos de metales solubles. También pueden encontrarse adsorbidos a constituyentes inorgánicos del mismo en sitios de intercambio iónico. Pueden estar unidos a la materia orgánica del suelo, o formando precipitados tales como óxidos, hidróxidos y carbonatos, y también se encuentran incrustados en la estructura de los minerales de silicato.

Para que ocurra la fijación en las plantas el contaminante debe de estar biodisponible, es decir listos para ser absorbidos por raíces. La biodisponibilidad depende de la solubilidad del metal en la solución del suelo y del pH de este (Lasat, 1999; Lasat, 2002).

Para este trabajo de tesis se seleccionaron frutas y hortalizas que pueden presentar riesgo de contener niveles mayores de As, Cd y Pb. Ya sea por su contacto directo con el suelo, por el agua que es utilizada para riego, o por la capacidad concentradora que puede tener la planta de elementos inorgánicos, ya reportada en algunos trabajos (Burló et al., 1999).

Se seleccionaron cuatro matrices vegetales de alto consumo en nuestro país: zanahoria, lechuga, manzana (con cáscara) y tomate (con cáscara) para llevar adelante este primer relevamiento de estado de situación.

La zanahoria (*Daucus carota*) es una hortaliza que durante todo su desarrollo mantiene contacto directo con el suelo. Desarrolla su raíz primaria central, nítida y dominante sobre las raíces laterales, que se engrosa total o parcialmente por acumulación de sustancias de reserva, pudiendo de esta forma absorber los elementos tóxicos por medio de los rizomas, además de la exposición que tiene frente al agua de riego (Zoppolo et al., 2008)

La lechuga (*Lactuca sativa*) es un vegetal de hoja verde que puede acumular metales pesados y As. Por el contacto directo con el suelo y con el agua

de riego los elementos se traslocan desde las raíces a las hojas (parte comestible). También la parte aérea puede absorber contaminación ambiental (Mengel et al., 2001).

Se seleccionó manzana (*Malus domestica*) además por ser una de las frutas más consumida en Uruguay, y un problema de inocuidad en este producto podría tener un alto impacto en la población considerando el volumen de consumo. Se consume muchas veces con el epicarpio o piel, lugar donde se pueden acumular elementos tóxicos que pueden estar asociados al uso de agroquímicos y/o al agua de riego (Zoppolo et al., 2008).

El tomate (*Solanum lycopersicum*) fue seleccionado debido a que se ha reportado que compuestos arsenicales son acumulados principalmente en las raíces de esta planta, mostrando una alta translocación hacia partes aéreas superiores (Burló et al., 1999). Considerando que en Uruguay los niveles de As en aguas de riego pueden superar los valores permitidos por la OMS, se selecciona esta hortaliza de alto consumo en el país para su evaluación.

Esta tesis se realizó en el marco de un proyecto nacional (Innovagro), por lo cual varios aspectos relacionados con el tipo de muestras y procesamiento estuvieron realizadas en conjunto con INIA y el Mercado Modelo.

El Mercado Modelo, es la institución donde se concentra la comercialización de las frutas y hortalizas del país, es un eslabón fundamental en la cadena agroalimentaria.

Para lograr un desarrollo agrícola sostenible se requiere información de calidad y la implementación eficaz y eficiente de los proyectos. Los sistemas alimentarios comienzan con la planificación de la preproducción y continúan desde la producción y el manejo de postcosecha hasta la comercialización y el consumo final. En cada eslabón de la cadena agroalimentaria se encuentra una variedad de personas y de instituciones, cuyas decisiones influyen en la cantidad, la calidad y el valor del producto. Cuando quienes toman las decisiones implementan proyectos de desarrollo agrícola sin estar conscientes de la realidad de cada eslabón de la cadena del producto, se halla una solución parcial a un problema que pronto se convierte en un proyecto fallido.

1.4 Determinación de elementos traza potencialmente tóxicos

1.4.1 Preparación de muestras

Para la determinación de elementos traza mediante espectrometría atómica en alimentos, se requiere de una etapa previa de preparación de las muestras, para poder llevarlas a una forma líquida compatible con la introducción a los instrumentos de medida. Estos tratamientos generalmente son digestiones vía húmeda o vía seca (calcinación total) para obtener los minerales en una disolución. La mayoría de estos procedimientos requieren de un tiempo considerable de análisis, volúmenes elevados de ácidos minerales concentrados y alto consumo de energía, lo que contribuye a impactar negativamente al medio ambiente y a los analistas con emisiones de vapores y residuos tóxicos.

Los métodos estándar para análisis de alimentos se recopilan en un libro publicado y revisado periódicamente por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC-Internacional). Para la determinación de As, Cd y Pb diversos tratamientos clásicos de reconocida exactitud y robustez se recomiendan allí.

Uno de los métodos más usados hasta hace unas décadas es el tratamiento vía seca o calcinación total, que consiste básicamente en colocar entre 1 o 2 g de muestra seca en un crisol de porcelana, someter a aumento gradual de temperatura hasta alcanzar entre 400-600 °C, y mantener por períodos de 12 a 16 horas a esta temperatura. Posteriormente el residuo obtenido (cenizas) se disuelve en un ácido diluido. Por otro lado, también se utilizan tratamientos vía húmeda que consisten en el calentamiento a temperaturas que no superan los 130-200 °C en planchas calefactoras o digestores, utilizando ácidos concentrados, o mezclas de ellos, por tiempos que van de 2 a 4 horas (Akinyele y Shokunbi, 2015; Altundag y Tuzen, 2011; Latimer, 2016).

Más recientemente han tenido particular importancia los tratamientos vía húmeda, utilizando ondas electromagnéticas de la región de las microondas y recipientes a presión. Luego de la década de 1980, este desarrollo tecnológico fue uno de los hitos para cambiar las estrategias de preparación de muestras. Hoy en día esta tecnología se está aplicando no sólo en la química analítica, sino también en la síntesis orgánica, reacciones inorgánicas, preparación de catalizadores, etc. (Nóbrega et al., 2002).

Los tratamientos vía húmeda son particularmente útiles para determinaciones de bajas concentraciones de elementos no volátiles en varios tipos de muestras, pero alguno de los elementos como As puede perderse parcial o totalmente. Además, se pueden presentar problemas de disoluciones incompletas y precipitación de analitos insolubles (Akinyele y Shokunbi, 2015).

Generalmente cuando se obtiene una disolución límpida luego de una digestión se asume que la oxidación de la materia orgánica fue completa, pero no necesariamente es siempre así. Una oxidación incompleta de la materia orgánica puede generar luego interferencias en la determinación y afectar la misma, es lo que comúnmente se conoce como efecto matriz (Akinyele y Shokunbi, 2015).

Si bien en la literatura se reporta que la comparación de los métodos de digestión en vía seca, húmeda y por microondas no existe diferencias estadísticamente significativas en los resultados de la determinación de muchos minerales, los procedimientos de calcinación en seco y vía húmeda a presión atmosférica son lentos y requieren elevado consumo de energía y de volúmenes de ácidos concentrados (Altundag y Tuzen, 2011).

Hoy en día, debido a la aparición de digestores de microondas que permiten trabajar con varios recipientes en forma simultánea en sistemas cerrados a presión, los métodos clásicos, antes mencionados, se utilizan cada vez menos. Aún así los métodos AOAC los siguen recomendando.

Para el desarrollo de esta tesis, se planteó el uso de digestión asistida con microondas como un método de digestión total que fue tomado como de referencia para comparación de los resultados que se obtuvieron luego con desarrollos alternativos. Estos métodos alternativos se basaron en la extracción de los elementos de interés en condiciones más suaves y amigables con el ambiente con asistencia de ondas de ultrasonido.

El uso de ondas de ultrasonido como estrategia de extracción de elementos traza con ácidos diluidos a partir de matrices complejas (pulverizadas o en emulsiones) puede considerarse un tratamiento más amigable con los principios de la Química Analítica Verde (Aleixo et al., 2004).

Tiene la ventaja de que la energía empleada facilita y acelera procesos tales como disolución, fusión y lixiviación. El tratamiento de matrices alimenticias y ambientales sobre la base de los efectos de la cavitación (fenómeno que ocurre en un medio líquido al aplicar ultrasonido), se ha utilizado para el análisis de contaminantes biológicos y químicos en dichas muestras y ha recibido considerable atención en los últimos años (Collings et al., 2010). Además de reducir los tiempos de tratamiento, se puede estudiar la reducción del uso de ácidos concentrados.

A continuación, se describe en forma más detallada, el fundamento general de cada uno de los tratamientos de muestras utilizados en este trabajo.

Nota: A lo largo del texto, se mencionarán los procesos de preparación de las muestras para análisis como **Método A** y **Método B** para nombrar la digestión asistida con microondas y la extracción asistida por ultrasonido respectivamente.

MÉTODO A- Digestión asistida con microondas

En las últimas décadas se reportan muchas aplicaciones que involucraban el uso de digestiones asistidas por microondas para la preparación de muestras. Las publicaciones crecieron de forma exponencial. En principio, se utilizaban hornos de microondas de uso doméstico para realizar el tratamiento de muestras. Actualmente existen hornos de microondas analíticos (digestores) y las descomposiciones y tratamientos de muestras en dichos equipos se extendieron ampliamente en los laboratorios.

Las radiaciones de microondas son radiaciones electromagnéticas portadoras de energía, cubren la franja de frecuencias del espectro electromagnético que van desde 300 a 300000 MHz (Krug, 2008). Cuando un material se somete a la radiación de microondas, éste la absorbe y puede sufrir un aumento considerable en su temperatura debido, principalmente, a la interacción de la radiación electromagnética con los iones disueltos y con el solvente, en nuestro caso disolución de un ácido. Esta interacción provoca los fenómenos de migración iónica y rotación de dipolos, procesos que también contribuyen al calentamiento del material al cual se está sometiendo a las microondas. Esta forma de calentamiento de la muestra en un medio líquido (ácido o mezcla de ácidos) junto con la posibilidad de trabajar a mayor temperatura debido a que los recipientes están a presión, es lo que hace tan exitosa esta estrategia (Krug, 2008).

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

La radiación producida por el magnetrón es transportada a través de una guía de ondas hacia la cavidad (horno), donde es dispersada por un distribuidor metálico en direcciones específicas, que permiten una mayor irradiación en la zona próxima al centro de la cavidad. La bandeja rotatoria permite exponer la muestra a una radiación homogénea. El magnetrón consiste en la combinación de un ánodo, un cátodo y una serie de cavidades de resonancia, todo organizado en una geometría cilíndrica. Entre el ánodo y el cátodo se aplica un potencial constante y se produce un campo magnético axial producido por un imán permanente o un electroimán. La presencia de un fuerte campo magnético provoca que los electrones

sigan trayectorias en espiral hacia afuera. La energía de los electrones se convierte en energía de radiofrecuencia en las cavidades de resonancia. Las ondas generadas pasan por la guía de ondas y llegan a la cavidad. Todos los instrumentos poseen magnetrones que generan microondas con una frecuencia fija de 2450 MHz. La eficiencia de conversión de energía eléctrica consumida es del 60 a 70% para hornos convencionales (entre 600 y 1400 W). La eficiencia en la producción de microondas se ve afectada principalmente por el sobrecalentamiento del magnetrón, ya que la energía que no es absorbida puede volver hacia atrás por la guía y provocar sobrecalentamiento de este. Para evitar esto, existe un circulador que desvía las ondas reflejadas hacia una cavidad donde la energía es disipada sin provocar daños (Krug, 2008).

Los recipientes empleados para la descomposición deben ser transparentes a las microondas, de forma que la radiación sea absorbida solamente por la disolución del medio de reacción. Los materiales más empleados son PTFE (teflón ®) y PFA (perfluoroalcoxi) entre otros. Dichos recipientes poseen volúmenes internos que varían de 25 a 120 mL y pueden estar equipados con sensores de presión y temperatura individuales o colectivos. Hoy en día existen recipientes de altísima resistencia, que pueden resistir presiones mayores a 150 bar (Krug, 2008).

Se realizó un relevamiento bibliográfico de un gran número de trabajos que proponen el uso de microondas para el tratamiento de muestras y posterior cuantificación de elementos trazas, entre ellos se destacan (Altundag y Tuzen, 2011; Machado et al., 2016; Nóbrega et al., 2002; Ribeiro et al., 2017). Esto fue utilizado como antecedente en el inicio de esta tesis. Como se describirá más adelante, se han realizado variantes a los métodos reportados para análisis de alimentos lo cual condujo a que este trabajo también haya logrado aportes novedosos para este método, aunque no era uno de los objetivos específicos.

MÉTODO B- Extracción asistida con ondas de ultrasonido

El ultrasonido (onda mecánica) es una energía considerada “limpia” y eficiente que ha mejorado en términos de simplicidad muchos procedimientos de tratamiento de muestras. En la actualidad el conocimiento de aspectos ecológicos ha llevado a muchos químicos analíticos a revisar mejor determinados parámetros críticos en el desarrollo de nuevos métodos, como por ejemplo el tiempo de operación, la seguridad, la relación volumen/concentración de solventes y el consumo de energía (Bendicho et al., 2012).

El ultrasonido ha encontrado aplicaciones en muchos campos como, por ejemplo, remediación, síntesis orgánica, aplicaciones industriales, etc. Últimamente los procesadores ultrasónicos han sido reconocidos como herramientas eficientes en el laboratorio analítico para cumplir diferentes objetivos. Desde usos generales (por ejemplo, desgasificación y limpieza) hasta otros más específicos (por ejemplo, extracción, derivación, homogeneización, emulsión), el ultrasonido se puede implementar de muchas maneras para mejorar los procesos analíticos, sobre todo en muestras sólidas para acelerar las disoluciones y/o extracción de analitos de interés (Bendicho et al., 2012).

Existen numerosos trabajos científicos que reportan el uso de ondas de ultrasonido para la extracción de diversos elementos y compuestos en varias matrices, pero la aplicación de esta estrategia aún está lejos de su madurez en Química Analítica (Capelo, 2005). De hecho, no hay hoy en día ningún método en la AOAC que utilice ondas de ultrasonido (Latimer, 2016).

La interacción de las ondas de ultrasonido puede tener efectos diferentes según la matriz y cada una debe ser estudiada en forma individual, así mismo no todos los elementos se extraen de forma sencilla asistiendo la preparación solamente con ondas de ultrasonido, a veces se complementa con el uso de radiación ultravioleta (Machado et al., 2019).

El ultrasonido puede favorecer procesos como extracción, disolución y digestión cuando se aplica a muestras (polvos finos) que están dispersos en un medio líquido, como resultado de las condiciones derivadas de la cavitación (Figura 1.3). Por lo tanto, las altas temperaturas locales dentro de las burbujas de cavitación

pueden causar un aumento en la solubilidad de los analitos y la difusividad de disolventes dentro de las partículas sólidas.

La cavitación acústica es el punto clave para los procesos de Sonoquímica, y la capacidad de aumentar o reducir este efecto es uno de los principales retos para aplicaciones del uso de las ondas de ultrasonido en química (Bendicho et al., 2012).

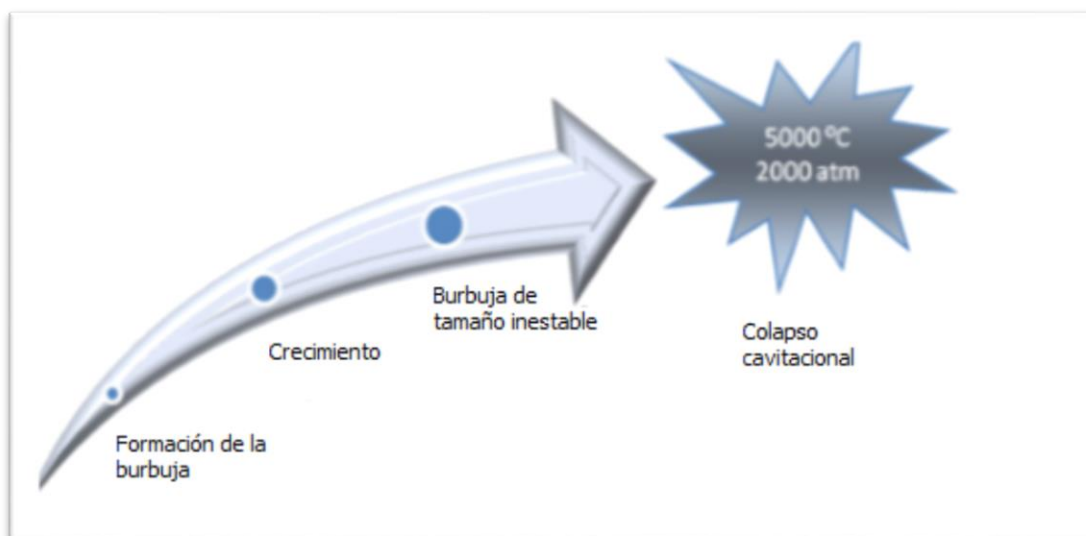


Figura 1. 2- Fenómeno de cavitación, adaptado de Bendicho et al., 2012

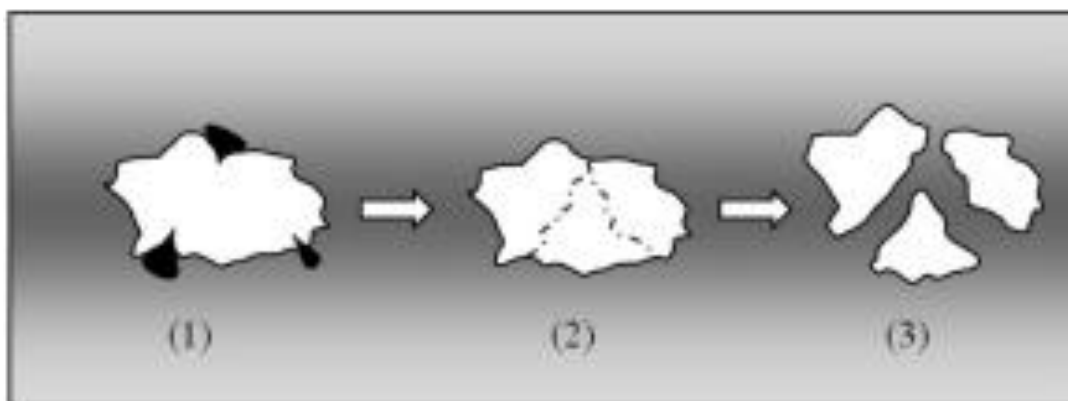


Figura 1. 3-Fenómeno de cavitación, adaptado de Bendicho et al., 2012

Las ondas de ultrasonido son ondas mecánicas que se propagan en medios materiales en ciclos consecutivos de compresión y rarefacción a frecuencias mayores a 16 kHz. Los sistemas generadores de ultrasonido de mayor potencia son aquellos que trabajan con frecuencias entre 20 y 100 kHz y pueden producir

agitación, cavitación en el medio líquido (generación de microflujos y microjets) y calentamiento. Las ondas de baja frecuencia presentan mayor potencia y de esta forma pueden interaccionar más fácilmente con la muestra a la cual se la expone. El fenómeno de cavitación es responsable de muchas de las características que nos interesan al momento del uso de ultrasonido en preparación de muestras. La cavitación depende de la tensión superficial, la temperatura y los gases disueltos en el medio líquido, así como de la frecuencia y amplitud de la onda que se propaga a través de la muestra. Las dimensiones de las burbujas aumentan y disminuyen en las consecutivas fases de rarefacción y compresión de la onda acústica que se propaga a través del medio líquido. Las burbujas deben colapsar para llegar a una dimensión dada (diámetro crítico) en un cierto ciclo de compresión de la onda acústica que se propaga a una determinada frecuencia, para que se considere de cavitación (Krug, 2008). El colapso de una burbuja de cavitación ocurre en la fase de compresión luego de que la misma alcanzó el diámetro crítico en la fase que lo antecede (rarefacción). La implosión eleva la temperatura y la presión a valores extremos de manera instantánea. El colapso de las burbujas formadas resulta en la producción de temperaturas de 5200 K en la fase gaseosa y 1900 K en la interfase con el medio líquido, y presiones instantáneas localizadas en la interfase entre la burbuja y el solvente de hasta 1000 atm al momento del colapso. Por este fenómeno podemos afirmar que cada burbuja se comporta como un generador microjets de hasta 400 ms^{-1} y es lo que genera la ruptura de enlaces químicos y facilita la extracción (Suslick, 1989; Suslick et al., 1999)

El tratamiento con ultrasonido de sistemas sólido-líquido resulta en la formación de burbujas de cavitación en las proximidades del sólido generando:

- degradación del material sólido por acción de microjets
- aumento de la actividad química a partir de especies presentes en el solvente por generación de radicales libres
- disminución del gradiente de concentración en las proximidades del material sólido por la producción de microflujos de materia en el medio y hasta incluso la fusión del sólido debido a las temperaturas alcanzadas en el colapso de las burbujas

Se puede trabajar con baños de ultrasonido o sondas de ultrasonido. Una sonda de ultrasonido tiene su transductor acoplado a una sonda de titanio, que se coloca directamente en contacto con la muestra. La misma proporciona al medio de extracción intensidades de ultrasonido de $50 - 500 \text{ Wcm}^{-2}$, operadas típicamente a 20 kHz y con intensidades entre 50 y 200 Wcm^{-2} . Al ser esas intensidades de potencia disipadas directamente sobre la suspensión de la muestra, aumenta la eficiencia para reducir el tamaño de partícula, se reduce el tiempo de extracción y la eficiencia de la extracción de los analitos de interés mejora (Capelo et al., 2005).

En el caso de tejidos vegetales, la alta presión que se produce durante la implosión de microburbujas mejora la penetrabilidad y el transporte del disolvente al interior de las células. Para muestras biológicas la ruptura celular se produce, con la posterior liberación de analitos encapsulados, además, la formación de radicales libres oxidantes en el líquido pueden colaborar con la oxidación de matrices orgánicas. La renovación de la superficie causada por la fragmentación de partículas permite que más analitos entren en contacto con el disolvente como se muestra en la Figura 1.4 (Bendicho et al., 2012; Machado et al., 2019).

Se han reportado varios estudios donde el uso de ultrasonido es utilizado para el tratamiento de muestras para la posterior determinación de elementos traza, mediante técnicas como espectrometría de absorción atómica de llama o electrotérmica (Aleixo et al., 2004; Bendicho et al., 2012; Machado et al., 2016, 2019; Priego-Capote y Luque de Castro, 2004; Ribeiro et al., 2017).

Se ha demostrado que este tratamiento es compatible con este tipo de técnicas. Los estudios han señalado que este tratamiento es altamente eficiente incluso con el uso de ácidos muy diluidos, por lo tanto, es un método de bajo costo y cuidadoso con el medio ambiente, ya que el uso HNO_3 a una concentración de sólo 3% v/v podría ser suficiente para la extracción cuantitativa de muchos elementos en numerosas variedades de muestras biológicas (Bendicho et al., 2012).

1.4.2 Técnicas instrumentales

Dentro de los métodos espectrométricos de análisis para identificar y cuantificar elementos presentes en distintas matrices, se encuentra la espectrometría de absorción y emisión atómica.

Espectrometría de Absorción Atómica

En la espectrometría atómica, los elementos presentes en una muestra se convierten en átomos o iones elementales en estado gaseoso por medio de un proceso denominado atomización. De esta manera se mide la absorción ultravioleta/visible, la emisión o la fluorescencia de las especies atómicas en el vapor (Skoog et al., 2008).

Cuando la radiación atraviesa una capa de un sólido, líquido o gas, es posible eliminar en forma selectiva ciertas frecuencias mediante absorción, un proceso en el cual la energía electromagnética se transfiere a los átomos, iones o moléculas que forman la muestra. La absorción impulsa a estas partículas desde su estado normal a temperatura ambiente, o estado fundamental, a uno o más estados excitados de energía superior. De acuerdo con la teoría cuántica, los átomos, moléculas e iones tienen sólo una cantidad limitada de niveles energéticos discretos. Para que haya absorción de radiación, la energía del fotón excitador debe corresponder exactamente con la diferencia de energía entre el estado fundamental y uno de los estados excitados de la especie absorbente. Como estas diferencias de energía son únicas para cada especie, el estudio de las frecuencias de radiación absorbida proporciona un medio para caracterizar los constituyentes de una muestra de materia. En particular, el paso de radiación ultravioleta/visible a través de un medio que consta de partículas monoatómicas, origina la absorción de sólo unas frecuencias muy bien determinadas. La sencillez relativa de dichos espectros se debe a la pequeña cantidad de posibles estados de energía de las partículas absorbentes (Skoog et al., 2008).

Esta técnica es muy selectiva, ya que el uso de fuentes de radiación específicas para cada elemento y la selección de la longitud de onda adecuada permiten la determinación cuantitativa de un elemento en presencia de otros. Se mide entonces la atenuación de la intensidad de la luz como resultado de la absorción, siendo la cantidad de radiación absorbida proporcional a la cantidad de átomos del elemento presente. Las fuentes más utilizadas en espectrometría de absorción atómica son las lámparas de cátodo hueco y las lámparas de descarga sin electrodos.

En una lámpara de cátodo hueco (Figura 1.5), el ánodo por lo general está constituido por una varilla de tungsteno y el cátodo es un cilindro hueco del elemento cuyo espectro se desea obtener. El ánodo y el cátodo están sellados en un cilindro de vidrio normalmente con neón o argón a baja presión (133,32 – 666,61 Pa). El extremo del cilindro de vidrio es una ventana de un material transparente a la radiación emitida.

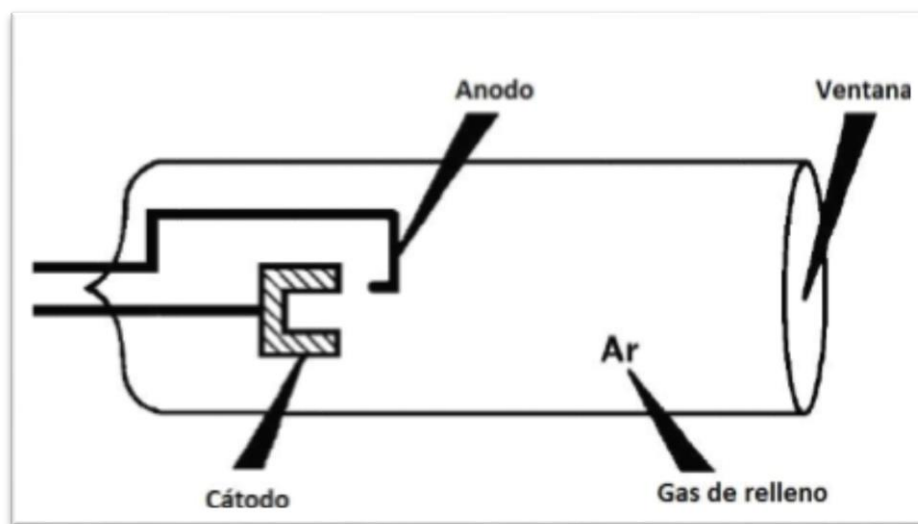


Figura 1. 4-Esquema de lámpara de cátodo hueco, extraído de Skoog et al., 2008

En espectrometría de absorción atómica existen diversos métodos para lograr la atomización del elemento de interés. La energía necesaria para el proceso de atomización puede ser generada por una llama, electrotérmicamente o por un plasma de acoplamiento inductivo.

En este trabajo de tesis se utilizó como técnica de detección de Cd y Pb la espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS).

Si bien la determinación de As en principio también puede realizarse mediante ETAAS, para este se trabajó con una técnica de emisión atómica que se describirá más adelante.

Espectrometría de absorción atómica electrotérmica

La técnica de ETAAS, utiliza energía eléctrica para lograr la atomización del elemento de interés en la muestra. Se basa en la absorción de la luz por parte de un elemento en estado atómico. La longitud de onda a la cual la luz es absorbida es específica de cada elemento. Se mide la atenuación de la intensidad de la luz

como resultado de la absorción, siendo la cantidad de radiación absorbida proporcional a la cantidad de átomos del elemento presente.

En estos sistemas, la atomización tiene lugar en un tubo cilíndrico de grafito abierto en ambos extremos (Figura 1.6) y que tiene un orificio central para la introducción de la muestra mediante un inyector automático. La señal característica es de tipo transitoria: al principio se observa un aumento de la absorbancia, que refleja la rápida atomización, y luego de un máximo, la señal decrece debido a la difusión de la nube atómica fuera del tubo de grafito.

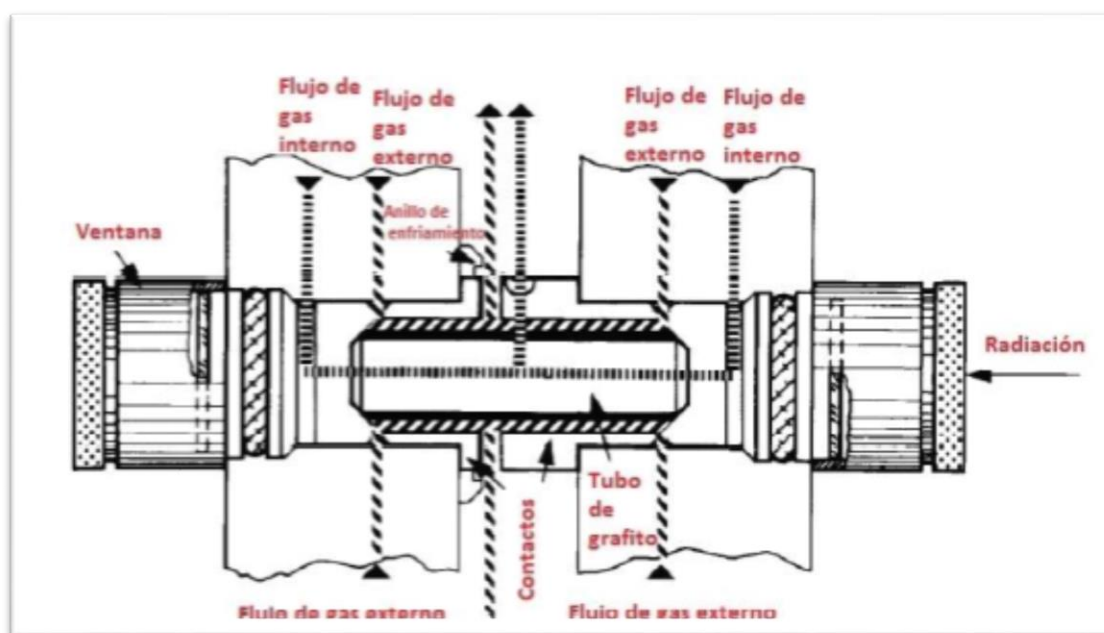


Figura 1. 5-Tubo de grafito, adaptada de Skoog et al., 2008

El grafito es un mal conductor de la electricidad, lo que causa que la diferencia de potencial eléctrico aplicada a los contactos haga que la corriente fluya a través del tubo provocando el calentamiento de éste y de la muestra. Este dispositivo está montado dentro de un compartimiento cerrado refrigerado con agua. Las ventanas de cuarzo a ambos lados permiten el pasaje del haz de radiación a través del tubo. El tubo es protegido de la oxidación por el oxígeno del aire por las ventanas y por una corriente externa de argón. Esta corriente no solo elimina el aire, sino que sirve también para desalojar los vapores generados a partir de la matriz de la muestra durante las dos primeras etapas de calentamiento. Es habitual que esta corriente interna sea interrumpida durante la atomización de forma de maximizar el tiempo de residencia de los átomos del analito en el tubo e incrementar la señal. Para

la realización de los análisis deben ajustarse condiciones como programa de temperaturas, flujo de gases (Ar) y control de espectrómetro (longitud de onda y corriente de la lámpara). Presenta mayor sensibilidad si se compara con la espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS), esto es debido a un mayor tiempo de residencia de las especies atomizadas en el camino óptico, así como también una mayor eficiencia en la introducción de la muestra, ya que todo el analito que se introduce en el tubo de grafito es atomizado.

La técnica involucra procesos fundamentales tales como la atomización de la muestra y la absorción de radiación por los átomos libres proveniente de una fuente. La muestra debe de ser sometida a una serie de etapas hasta llegar a la atomización (programa de temperaturas).

Las mismas comprenden:

- *Secado*: Esta etapa tiene como objetivo la evaporación del solvente y de los componentes más volátiles de la matriz. Luego que la muestra ha sido inyectada en el tubo de grafito, se calienta a una temperatura que dependerá del punto de ebullición del solvente utilizado. Para soluciones acuosas son comunes temperaturas de 100 - 120 °C. El calentamiento se realiza en general empleando una rampa de temperatura de forma que la evaporación sea lenta y se eviten proyecciones que resultarían en una baja precisión de los análisis realizados.
- *Pirolisis*: El calentamiento a una mayor temperatura en esta etapa tiene como propósito volatilizar los componentes orgánicos e inorgánicos de la matriz, evitando en lo posible la pérdida del analito. La temperatura seleccionada, depende tanto de las características del analito (punto de fusión y ebullición) como de la matriz. A veces, durante esta etapa, puede incorporarse un gas auxiliar para ayudar en la descomposición de la matriz. Si bien la mayor parte de la matriz puede ser eliminada, materiales refractarios como óxidos de metales pueden permanecer inalterados.
- *Atomización*: En esta etapa el horno es calentado rápidamente a altas temperaturas (1800 – 2800 °C) para terminar de volatilizar los residuos de la pirolisis y producir la nube atómica del analito. En este paso se mide la absorción de radiación emitida por la fuente por los átomos del analito. La

temperatura de atomización es propia de cada elemento. Cuanto mayor sea la separación de los elementos concomitantes del analito, mejor será la atomización y la determinación estará más libre de interferencias. Hay que tomar la precaución de no usar temperaturas excesivamente elevadas para no tener pérdidas de analito y para prolongar la vida útil de los tubos de grafito.

- *Limpieza:* Luego de la atomización el tubo de grafito debe ser calentado a una temperatura algo superior de forma de eliminar cualquier residuo de muestra antes de comenzar el próximo análisis.

Las condiciones de temperatura dependen del elemento y de la matriz en que se encuentre. Si se tiene que analizar el mismo elemento en matrices diferentes debe realizarse nuevamente la optimización.

Para la pirolisis usualmente es deseable utilizar la mayor temperatura que sea posible sin que ocurra la vaporización del analito. Durante este proceso generalmente se usa una velocidad de calentamiento moderada, entre 50-200°C/s. La optimización de la temperatura de pirolisis se realiza mediante la medida de la absorbancia de un patrón o muestra a una temperatura fija de atomización variando la temperatura de pirolisis. Por lo general se trata de utilizar temperaturas de al menos 1000 °C para minimizar interferencias. Para optimizar la temperatura de atomización se procede de forma análoga a la pirolisis, fijando su temperatura y variando la temperatura de atomización. Las temperaturas óptimas serán aquellas en las que se obtiene la mayor señal. Para una correcta visualización de los datos se construyen las curvas de pirolisis y atomización con los datos de absorbancias integradas (área de pico) en función de las temperaturas correspondientes.

En las técnicas de espectrometría de absorción atómica pueden presentarse dos tipos de interferencias: espectrales y no espectrales. Las interferencias no espectrales, también llamadas interferencias químicas, son aquellas que afectan la etapa de atomización por formación de compuestos refractarios, ionización entre otras. Las interferencias espectrales son aquellas en las que hay más especies absorbentes además del analito. La más común es la absorción de fondo, que surge de la eliminación incompleta de la matriz.

Particularmente en ETAAS, la absorción de fondo puede darse frecuentemente, y han surgido diferentes alternativas para corregirla. Una de las

correcciones más utilizadas es la corrección basada en el efecto Zeeman (Figura 1.7). El efecto Zeeman es el cambio de los niveles electrónicos de energía de un átomo cuando éste se expone a la acción de un campo magnético. El campo magnético interactúa con el analito desdoblando sus niveles de energía y produciendo un cambio en el espectro atómico del elemento: la señal de absorción única se desdobra en dos o más componentes simétricamente dispuestos en torno a la posición normal de absorción. Ahora bien, el espectro de absorción de fondo no es usualmente afectado por campos magnéticos.

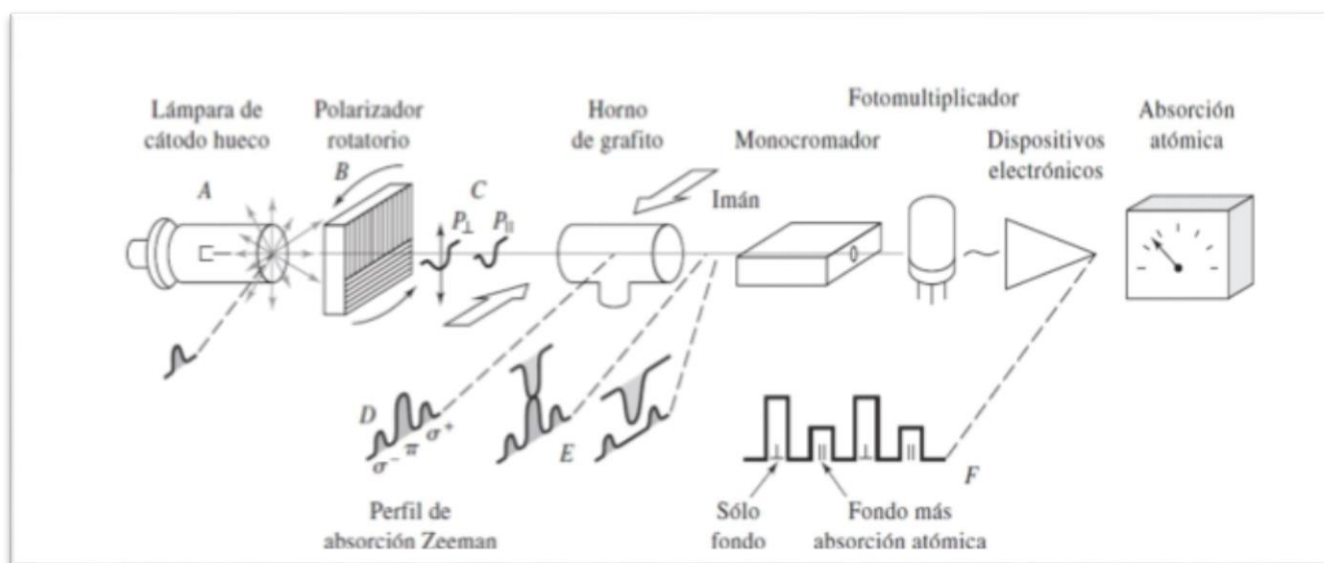


Figura 1. 6-Eschema de espectrómetro de absorción atómica electrotermica con corrección de fondo por efecto Zeeman, extraída de Skoog et al., 2008

Uso de modificadores químicos

El objetivo de la etapa de pirolisis es volatilizar todos los componentes de la matriz antes de la atomización del analito, pero sin embargo no siempre este proceso ocurre de forma eficiente, y existe la ya mencionada absorción de fondo. LA correcta calcinación de la matriz depende de la volatilidad de los componentes de ésta y del analito. Es deseable que la matriz sea más volátil que el elemento en estudio, pero cuando esto no es posible, el proceso puede ser controlado por agregado de modificadores químicos de matriz.

Generalmente, el uso de modificadores químicos permite alcanzar mayores temperaturas de pirolisis, reduciendo o eliminando la pérdida de analito y las interferencias que pudieran generarse en estado vapor, y minimizando las señales de fondo. (Giacomelli et al., 2002)

La introducción de la mezclas de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2:\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ como un modificador universal facilitó en gran medida las determinaciones libres de interferencias, especialmente para los elementos volátiles, siendo incluso parte de las condiciones recomendadas por los fabricantes de instrumentos. Otros elementos han mostrado propiedades modificadoras, como el grupo del platino elementos (Pt, Pd, Ir, Rh y Ru) (Giacomelli et al., 2002).

Cuando el modificador se aplica como una solución sobre la superficie del tubo de grafito o plataforma y es sometido a un programa de temperatura, actúa como un modificador permanente, es decir, no es necesario agregar el modificador para cada determinación (Giacomelli et al., 2002).

Las principales ventajas del uso de modificadores permanentes son:

- Producción simple y rápida de la capa de modificador sobre las paredes del tubo utilizando un programa de horno adecuado.
- Limpieza in situ durante la producción de la capa, contribuyendo a la obtención de menores valores de blanco y mejores límites de detección.
- Eliminación o minimización de interferencias espectrales y no espectrales, permitiendo el análisis directo de ciertas muestras sin digerir.
- Protección del tubo de grafito, resultando en un aumento considerable de la vida útil del mismo (Giacomelli et al., 2002)

La correcta selección de los modificadores de matriz es una parte crítica en el éxito de los métodos analíticos que se basan en ETAAS.

Espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP OES)

Los análisis multielementales de tejidos vegetales hoy en día llevar adelante utilizando técnicas de emisión atómica como ser de plasma de acoplamiento inductivo óptico o acoplado a masas (ICP-OES e ICP-MS). Estas técnicas vienen reemplazando gradualmente la mayoría de los métodos clásicos basados en absorción atómica, con la ventaja de alcanzar límites de detección muy bajos combinados con una alta precisión y veracidad (Evans et al., 2019). Sin embargo, estas técnicas son de mayor costo que las clásicas de absorción atómica

(como ETAAS), sobre todo para los ámbitos universitarios ya que son muy difíciles de mantener (a modo de ejemplo mantener encendido 6 horas un equipo de ICP-OES o ICP-MS consume como mínimo 10 m³ de argón de alta pureza (en nuestro medio unos USD 220 por jornada de trabajo), entre otros gastos de mantenimiento.

En el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Química recientemente se adquirió un equipo de emisión atómica de plasma inducido por microondas (MIP OES). Este equipo trabaja con un plasma de nitrógeno que es generado a partir de aire, por lo que es muy eficiente y económico.

Los plasmas inducidos por microondas han evolucionado históricamente como fuentes de atomización y excitación / ionización y podrían potencialmente utilizarse como alternativas a los plasmas acoplados inductivamente tradicionales (ICP) en espectrometría atómica. El plasma es inducido aplicando radiación de microondas, la energía asociada con la onda dentro de una cavidad resonante se transfiere al gas (nitrógeno) que se ioniza, y los campos eléctricos y magnéticos generados producen y sostienen este plasma. La cavidad donde se coloca la antorcha y la dirección de los campos aplicados se muestran en la Figura 1.8 (Williams et al., 2019).

Este equipamiento es bastante más barato que los antes mencionados y el plasma se mantiene funcionando con suministro de nitrógeno generado a partir de aire con un compresor. El plasma de nitrógeno no alcanza temperaturas tan altas como las de los plasmas de argón (menos de 5000 K en la zona de atomización) por lo cual los límites de detección que proporciona son mayores y muchas veces se descarta para ser aplicado en análisis de elementos traza.

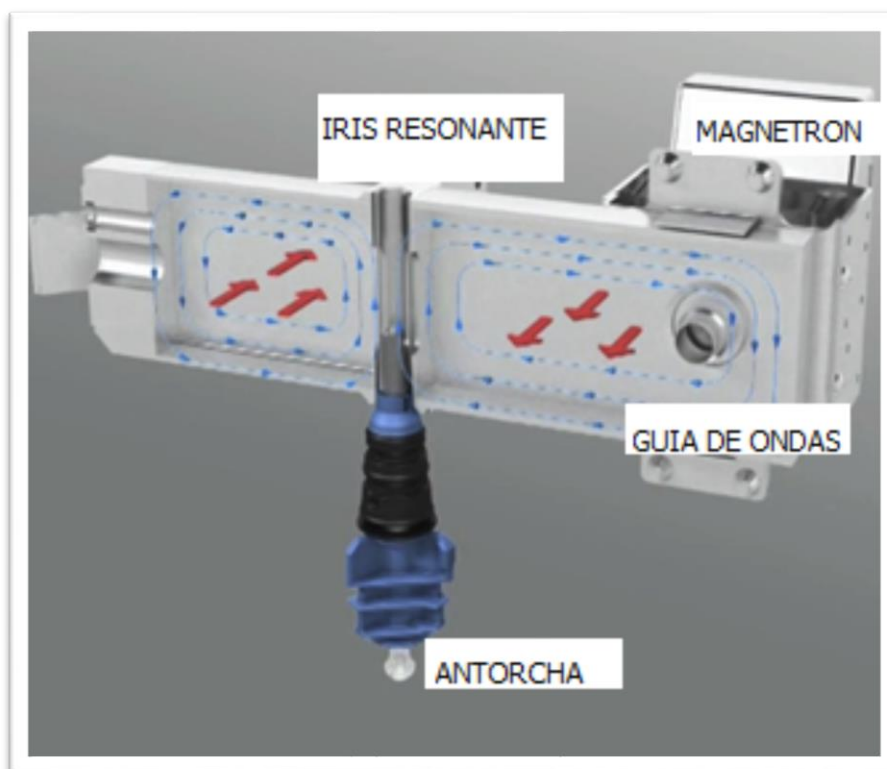


Figura 1. 7-Representación de la cavidad resonante (de Hammer) utilizada en el equipo comercial MIP OES Agilent Technologies (modelo 4210). Las flechas muestran la dirección del campo magnético (azul) y el campo eléctrico (rojo) (adaptada de Williams et.al, 2019 con permiso de Agilent Technologies)

Si bien el uso de MIP OES con plasma de nitrógeno, tiene esta ventaja de ser económico, a nivel internacional no hace mucho que se comienzan a encontrar publicaciones sobre análisis en matrices vegetales. Uno de los posibles motivos de que sea poco explorada en comparación a las antes mencionadas es que no alcanza límites de detección lo suficientemente bajos. Sin embargo, esto puede mejorarse mucho cuando se le acoplan otros sistemas de introducción de muestras como, por ejemplo, la generación de hidruros para especies como As, Se y Pb (HG-MIP OES) lo permite disminuir los límites de detección.

Esta estrategia de acoplamiento de generación de hidruros se utilizó para las determinaciones de As en esta tesis. En la Figura 1.9 se describe el sistema de cámara ciclónica comercial utilizada. La liberación del hidruro volátil se produce en la unión (gap) entre el cono superior e inferior por donde llega la muestra y el agente reductor (generalmente NaHB_4) impulsados por una bomba peristáltica.

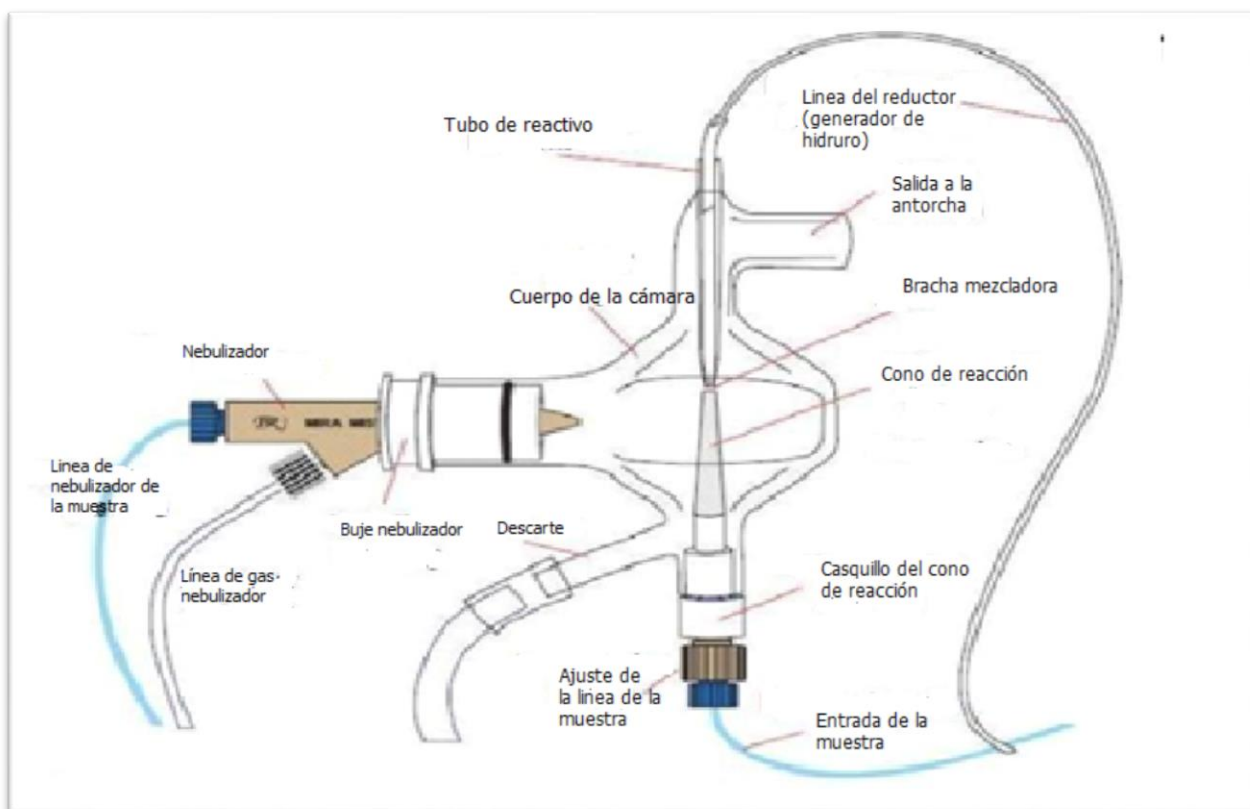


Figura 1. 8-Adaptado de <https://docplayer.es/39027572-Nuevas-tecnicas-exclusivas-e-innovadoras-de-agilent-en-analisis-elemental.html> (Agilent Technologies)

1.4.3 Optimización de metodologías analíticas

Durante la etapa de optimización los métodos analíticos es frecuente recurrir a los diseños experimentales de manera de recabar información útil a partir de un número lo más pequeño posible de experimentos, ahorrando tiempo e insumos de análisis. Cualquier variable de las condiciones experimentales que influya en el resultado final se define como factor y puede ser cualitativo o cuantitativo. Los diferentes valores que puede tomar un factor en el diseño se definen como niveles de ese factor.

Para que la información proporcionada sea de utilidad y las conclusiones que se obtienen de los experimentos sean las correctas, es necesario identificar de primeramente los factores que influyen en el resultado, y si es posible controlarlos. En muchas técnicas y métodos la respuesta del sistema de medida depende de determinados factores experimentales que son controlados por el analista, como pH, temperatura, concentración de diluyentes, tiempo de extracción, etc. La búsqueda de los valores óptimos de esos factores se conoce como optimización (Miller., 2005).

El método tradicional de experimentación, el que quizás surge de forma más intuitiva, es el univariado, que consiste en variar un factor cada vez. A partir de las condiciones iniciales se realizan experimentos en los cuales todos los factores se mantienen constantes excepto el que se está estudiando. De esta manera, la variación de la respuesta se atribuye a ese factor. Luego el procedimiento se repite para los otros factores. Con esta forma de diseño experimental, si se varían dos o más factores entre experimentos consecutivos, no es posible determinar a quién atribuir el cambio en la respuesta. Además, si son muchos los factores a evaluar, se requiere un número elevado de experimentos, por lo que no siempre es la elección más adecuada.

Una forma más racional y eficiente de diseñar experimentos en el ámbito del desarrollo de nuevos métodos analíticos es trabajar de manera multivariada.

Uno de los abordajes multivariados para optimización más utilizados es el diseño factorial que es un tipo de diseño experimental que dependiendo como se diagrama puede ser desde muy económico, hasta un diseño completo en el cual se miden las respuestas con todas las combinaciones de los niveles de los factores.

Cuando la respuesta de un sistema analítico depende de dos factores que son variables continuas, la relación entre la respuesta y los niveles de los dos factores puede ser representada por una superficie en tres dimensiones como se muestra en la Figura 1.10. Este gráfico es conocido como superficie de respuesta, siendo el valor óptimo la parte superior del gráfico en tres dimensiones (Miller, 2005). La obtención de superficies de respuesta a partir de un diseño experimental multivariado es de gran utilidad para encontrar de forma simple las condiciones experimentales óptimas.

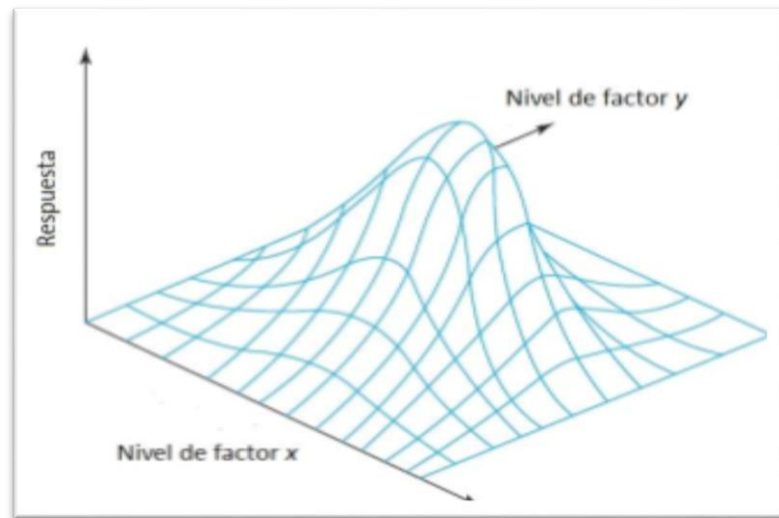


Figura 1. 9-Superficie de respuesta adaptada de Miller, 2005

Otro modelo de diseño multivariado es el denominado diseño central compuesto (Figura 1.11), que surge de la yuxtaposición de un diseño que forma una estrella en una representación espacial con $2k + 1$ combinaciones de factores y un diseño factorial de dos niveles y k factores con $2k$ combinaciones de factores, para dar un total de $2k + 2k + 1$ combinaciones (siendo k = número de factores).

El diseño estrella consta de un punto central alrededor del cual se disponen los otros puntos a una determinada distancia. Cuando el centro de la estrella y del diseño factorial coinciden, el diseño se denomina “central”. Este tipo de diseño se utiliza para modelar una variable de respuesta con curvatura al agregar puntos centrales y axiales (estrella) a un diseño factorial previamente ejecutado. Los niveles pueden representarse de varias formas. Generalmente el nivel $+$ ($0 + 1$) indica el nivel más alto, el nivel $-$ ($0 - 1$) indica el nivel más bajo y el 0 indica el nivel central. A modo de ejemplo, la Figura 1.8 muestra un diseño central compuesto de dos factores a dos niveles con $2 \times 2 + (2 \times 2) + 1 = 9$ condiciones experimentales (Massart et al., 1997).

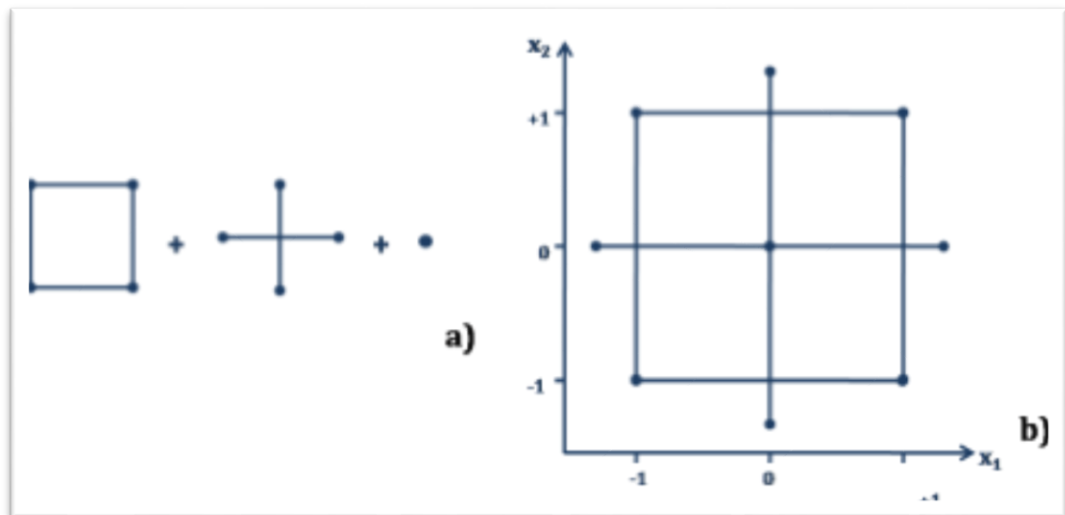


Figura 1. 10-Diseño central compuesto, adaptado de Massart et al. 1997

1.4.4 Validación

Una vez desarrollados y optimizados los métodos analíticos, con el objetivo de que pueda aplicarse a las cuatro matrices, se lleva a cabo la validación para demostrar objetivamente que cumple con los requisitos para los que fue desarrollada.

Los criterios de validación son definidos previamente en base al criterio de adecuación al uso de la metodología, teniendo en cuenta el objetivo del análisis. Una vez cumplida esta etapa, se aplica a las muestras a analizar y se recopilan y analizan los resultados obtenidos.

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

A nivel internacional, organismos tales como International Standardization Organization (ISO), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), y AOAC International han establecido guías para la validación de métodos analíticos.

Las normas ISO definen a la validación de un método como la confirmación mediante examen y provisión de evidencia objetiva de que las necesidades particulares para un uso específico previsto se cumplan. La validación consiste en evaluar las características de rendimiento y compararlas con requisitos analíticos fijados previamente, independientemente de los datos de rendimiento existentes que puedan estar disponibles (Magnusson et al., 2014).

En la práctica, la validación de un método se realiza mediante la evaluación de una serie de características o parámetros de su desempeño tales como: precisión, veracidad, selectividad, linealidad, límite de detección (LD) y de cuantificación (LQ) y robustez (Taverniers et al., 2004).

La validación se llevó a cabo tomando como referencia la Guía Eurachem (Magnusson et al., 2014). Según esta guía se mencionan a continuación definiciones de parámetros de desempeño relevantes de un método.

La **precisión** se define como el grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos en condiciones establecidas. Es una medida de cuán cerca está un resultado del otro. Usualmente se expresa como desviación estándar (s) o desviación estándar relativa. La precisión se estudia a tres niveles diferentes: repetibilidad, reproducibilidad y precisión intermedia.

La **repetibilidad** se define como la precisión de medición de un analito utilizando el mismo método, en la misma muestra en un solo laboratorio en un corto período de tiempo durante el cual no existen diferencias en los métodos, analistas, materiales y/o equipos involucrados.

La **reproducibilidad** es la precisión de medición de un analito utilizando el mismo método, en diferentes laboratorios, con diferentes analistas, o durante un período de tiempo en el cual existan variaciones en los materiales y equipos.

La **precisión intermedia** es la precisión en condiciones donde los resultados de un ensayo se obtienen con el mismo método, en pruebas idénticas, en el mismo laboratorio, realizado por diferentes analistas utilizando diferentes equipos durante un período de tiempo prolongado. Hay que tener en cuenta que la precisión depende de la concentración del analito, por lo que debe evaluarse a lo largo del rango de interés. Además, se requiere un número suficiente de réplicas

independientes, entre 6 y 15 para poder realizar el tratamiento estadístico. Es importante que se repitan todos los pasos del método, incluidos los tratamientos de muestra (Magnusson et al., 2014).

La **veracidad** es una característica de desempeño que indica lo cerca que está el promedio de la medida de un número infinito de resultados producidos por el método respecto a un valor de referencia. Para esto debe de realizarse una evaluación práctica, que se expresa cuantitativamente en términos de sesgo, ya que es imposible realizar infinitas determinaciones. El sesgo se determina comparando la media de los resultados del método a validar con un valor de referencia o "valor verdadero". Puede determinarse mediante el análisis de material de referencia certificado (MRC), ensayos de recuperación, comparación de resultados obtenidos con un método de referencia y mediante el análisis de muestras artificiales o matriz fortificada. En caso de utilizar MRC se expresa como z-score, de lo contrario como porcentaje de recuperación comparando contra el valor establecido en el certificado (Magnusson et al., 2014). En el caso de utilizar el porcentaje de recuperación como forma de evaluar la veracidad, se puede aplicar una prueba t de Student, para poder determinar si existe diferencias significativas entre el valor obtenido y el valor certificado un material de referencia certificado (MRC) utilizado (Miller, 2005).

Un **MRC**, es un material que ha sido caracterizado utilizando uno o más procedimientos metrológicamente válidos, acompañado de un certificado donde se establece el valor de la propiedad, su incertidumbre asociada y una declaración de la trazabilidad metrológica (ISO 17034:2016).

También se define a un MRC como un material suficientemente homogéneo y estable en el cual uno o más valores de sus propiedades son definidos para permitir utilizarlos en la calibración de un instrumento, la evaluación de un método de medición, o la asignación de valores a los materiales (VIM, 2008).

Existen algunos organismos que fabrican materiales de referencia como NIST (National Institute of Standards and Technology), IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements, de la Unión Europea), IAEA (Internacional Atomic Energy Agency) que cuentan con prestigio reconocido. El NIST proporciona hoy en día más de 1300 MRC, con composición y/o propiedades bien caracterizadas y establecidas. Estos materiales se utilizan como parte de aseguramiento de garantía

de calidad, para verificar la veracidad y precisión y para respaldar el desarrollo de nuevas metodologías (www.nist.gov/).

Estos materiales se adquieren con su correspondiente certificado. Se trata de un documento que acompaña al MRC, que indica uno o más valores de sus propiedades y su incertidumbre y confirma que han sido realizados los procedimientos necesarios para asegurar su validación y trazabilidad (valor certificado).

En algunos casos también aparecen en los certificados “valores informados”, en esos casos no se informa incertidumbre y el valor indicado solo puede ser tomado como una guía en el trabajo. En estos casos se suele trabajar con otras estrategias para evaluar la veracidad como es el uso de ensayos “spike-recovery”. En estos ensayos la matriz en estudio se fortifica con el analito de interés y se evalúa su recuperación luego de todo el proceso analítico.

Dos propiedades muy importantes de estos materiales son su homogeneidad y su estabilidad. Un material de referencia es homogéneo cuando no existen diferencias en el valor establecido para una propiedad, ni en la matriz ni entre los diferentes lotes. Las pruebas de homogeneidad dependen de la naturaleza del material y de los componentes. Si el material contiene diversos componentes de distinta densidad y forma se deben establecer procedimientos para preservar la homogeneidad. En cuanto a la estabilidad, es cuando no existen diferencias entre el valor establecido para la propiedad en el tiempo y durante su transporte. La estabilidad debe extenderse a todos los parámetros establecidos y a la matriz si corresponde (Inczédy et al., 1998).

Para la verificación de una metodología analítica, se pueden emplear MRC con matriz. El MRC que se seleccione para una determinada validación debe ser lo más parecido posible a la matriz que se está analizando, en este trabajo se contó con material de referencia de hojas de espinaca y hojas de tomate adquiridos del NIST.

Estos materiales están preparados de acuerdo a una combinación requerida de analito/matriz, que permiten la caracterización del analito en condiciones controladas, lo más cercanas a la realidad; lo que permite suponer que existe una conmutatividad entre el análisis de una muestra real y el del MRC con

matriz de modo que permita verificar nuestras mediciones con una veracidad conocida y una.

La **linealidad** se define como la capacidad del método de obtener respuestas (en un determinado rango) proporcionales a la concentración del analito. Para realizar la evaluación en primer lugar se grafica la respuesta analítica (eje y) en función de la concentración de los patrones (eje x) y se realiza inspección visual de los datos en busca de tendencias o puntos anormales. Luego mediante análisis de regresión se obtienen los parámetros de la recta de mejor ajuste. Como criterios de evaluación pueden utilizarse el análisis de residuales o la estimación del coeficiente de determinación R^2 . El análisis de residuales consiste en calcular los residuos como la diferencia entre los valores de y observados y los calculados mediante la regresión para cada valor de x y graficarlos en función de x. Una distribución al azar de los residuales en torno a cero confirma la linealidad, mientras que tendencias sistemáticas indican que no es el mejor ajuste para los datos considerados.

El **límite de detección** (LD) es la concentración mínima de analito que puede ser detectada por el método con un nivel de confianza determinado.

El **límite de cuantificación** (LQ) se define como la mínima concentración de analito que puede ser cuantificada por el método con una veracidad y precisión adecuada.

Existen diversas maneras de estimar los límites de detección y cuantificación y para ello se utilizan disoluciones blanco o muestras con concentraciones muy bajas de analito. En general, el LD se expresa como la concentración derivada de la señal más baja (x_L), que puede ser detectada por el método con un nivel de confianza determinado. La señal más baja x_L corresponde a k veces la desviación estándar de la señal del blanco o de la disolución que se utilice. El factor k depende del nivel de confianza. Para estimar el LD, para un nivel de confianza $\alpha = 0,05$ k es 3,3. El LQ se estima de forma análoga con $k = 10$.

La **robustez** es la medida de la capacidad de un método analítico de permanecer inalterado por pequeñas y deliberadas variaciones en los parámetros operacionales del método. Provee la seguridad de obtención de resultados confiables durante su normal ejecución.

La **selectividad** según la guía Eurachem es la capacidad de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes de la matriz de la muestra bajo condiciones de prueba establecidas. La guía también se refiere al concepto de confirmación de identidad o el establecimiento de que la señal producida en la etapa de medición, la cual se atribuye al analito, se debe únicamente a él y no a la presencia de algo química o físicamente similar.

El químico analítico debe explorar las opciones de que dispone para conseguir la mejor selectividad, ya sea mediante la optimización de las condiciones experimentales, mediante la remoción directa de las interferencias o mediante análisis multivariante.

La **incertidumbre** según IUPAC es el parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos la mensurando (Inczédy et al., 1998). La evaluación y estimación de la incertidumbre de las medidas analíticas es un gran tema, la estimación exhaustiva utilizando los modelos matemáticos adecuados es sin duda engorrosa. En el caso de la acreditación de ensayos de laboratorio es un requisito la estimación de la incertidumbre. Está claro que un resultado sin una incertidumbre asociada no significa nada, solo es un número que da poca información si al menos no se hace una estimación de la precisión del método. Sin embargo existen formas simplificadas de expresar resultados evaluando aquella o aquellas fuentes de incertidumbre de mayor peso en el resultado final.

En esta tesis para todos los trabajos desarrollados se han identificado las variables de influencia de forma tal de expresar los resultados con una incertidumbre simplificada, en todos los casos se utilizará la desviación estándar para acompañar el resultado analítico.

Para la validación de los métodos propuestos en este trabajo, se utilizó la Guía Eurachem para la estimación de los parámetros de desempeño o cifras de mérito y se tomaron las especificaciones de AOAC como referencia para establecer la adecuación de estos al propósito establecido.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

2.1 Justificación

Las frutas y hortalizas son una fuente en la dieta de minerales y oligoelementos esenciales para la vida, pero también pueden incorporar sustancias indeseables y potencialmente tóxicas para los organismos vivos.

Según las prácticas de agricultura, el aporte de nutrientes para el cultivo, los insumos agropecuarios utilizados, el tiempo de cosecha, el tipo de suelo y el agua de riego, pueden ingresar a las plantas contaminantes inorgánicos como As, Cd y Pb concentrándose estos principalmente en las hojas.

Uruguay se rige por una regulación técnica a nivel de MERCOSUR sobre límites máximos de contaminantes inorgánicos en alimentos. El Reglamento Técnico Mercosur establece límites máximos de concentración de estos contaminantes en alimentos, para la comercialización de estos entre países miembros y para las importaciones desde otros países.

La determinación de estos elementos se debe realizar en laboratorios analíticos que cuenten con metodologías validadas, de forma rápida y confiable para cumplir con los requerimientos y así liberar los productos al mercado interno o para la exportación.

En este contexto se trabajó en el marco de un proyecto nacional Innovagro con INIA Las Brujas. Se planteó la evaluación de la inocuidad de una serie de muestras de varias frutas y hortalizas de alto consumo en nuestro país como un primer screening sobre la situación con relación a los niveles de estos contaminantes.

Para esta evaluación, se garantizó la trazabilidad de los resultados analíticos ya que el proyecto marco cuenta con la información revelada durante su ejecución (operadores, muestreo, transporte).

Se necesitaba contar con una plataforma analítica que funcione de forma rápida y confiable y esto llevó al desarrollo y validación de métodos para lograr este primer relevamiento nacional en algunas frutas y hortalizas seleccionadas.

La preparación de las muestras es una etapa crítica en cualquier proceso analítico y es la que mayor tiempo consume. Para el análisis de trazas de contaminantes inorgánicos los métodos oficiales de análisis de la AOAC, que aún son ampliamente utilizados, recomiendan el uso de ácidos concentrados y altas temperaturas de trabajo para lograr la digestión de las distintas matrices, lo cual no está de acuerdo con los principios de la Química Analítica Verde. Las nuevas tendencias se basan en evitar el uso de tratamientos drásticos, y sustituirlos por procedimientos de extracción bajo condiciones menos agresivas para el ambiente.

En base a la premisa anterior se planteó, no solo la mejora de las metodologías conocidas como de referencia para obtener el contenido de estos elementos, sino el desarrollo de una extracción asistida con ondas de ultrasonido como una nueva alternativa de tratamiento de muestras.

Por todo lo antes mencionado llevar a cabo esta investigación se consideró de relevancia para el sector productivo y para la población en general, ya que es un tema no solo local, sino que este tipo de monitoreo es exigencia para otros mercados internacionales.

La transferencia de los resultados de esta tesis podrá ser utilizada por los organismos involucrados en la vigilancia de la inocuidad, y seguridad de los alimentos que llegan a los consumidores.

Además, es importante destacar la formación en recursos humanos, en una temática de alto interés y constante actualización, en pro de extender este tipo de controles de calidad, para asegurar la inocuidad de todo producto de origen natural vegetal que sea para consumo humano.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

- Desarrollar y validar metodologías analíticas para la determinación de contaminantes inorgánicos (As, Cd y Pb) en matrices de origen hortifrutícola para evaluar su inocuidad, utilizando tratamientos de muestra simples y rápidos, asistidos con ultrasonido.

3.2 Objetivos específicos

- Desarrollo de métodos de tratamiento alternativos simples y eficientes, basados en el uso de ondas de ultrasonido, para extracción multielemento de As, Cd, Pb y posterior cuantificación analítica en zanahoria, lechuga, manzana y tomate.
- Determinación de Pb y Cd mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) y desarrollo de un método acoplado HG-MP OES para la determinación de As en los alimentos seleccionados.
- Validación de los métodos desarrollados
- Aplicación de los métodos analíticos validados en las determinaciones de As, Cd y Pb en muestras provenientes de los muestreos en el marco del proyecto FSA-I-2017-1-140199 para evaluación de inocuidad de estos alimentos.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y

MÉTODOS

4.1 Reactivos

Para las determinaciones de los analitos se utilizaron soluciones estándar comerciales para absorción atómica de 1000 mg L⁻¹ de As, Cd y Pb (Merck, Alemania).

Las curvas de calibración fueron preparadas mediante dilución apropiada de las disoluciones comerciales concentradas, utilizando agua ultrapura de resistividad 18,2 MΩcm (ASTM Tipo I), obtenida mediante un purificador Millipore Direct-Q 3. Todo el material utilizado se descontaminó previamente con HNO₃ 10% v/v, preparado a partir de HNO₃ concentrado (15,7 mol L⁻¹, Merck, Alemania) durante al menos 12 horas y posteriormente se enjuagó con agua ultrapura.

Para las determinaciones de As mediante HG-MIP OES se utilizó NaBH₄ 2 % m/v (Sigma Aldrich, USA) en hidróxido de sodio 0,5 % m/v preparado a partir de NaOH (Mallinckrodt, México). El proceso de pre reducción fue llevado a cabo con HCl 12 mol L⁻¹ (Merck, Alemania) y KI 20% m/v (Carlo Erba, Francia).

Se utilizaron como modificadores de matriz para las determinaciones de Cd y Pb mediante ETAAS, disoluciones de Pd(NO₃)₂ (Merck, Alemania) 10000 mg L⁻¹ y NH₄H₂PO₄ 5000 mg L⁻¹ (Sigma Aldrich, USA).

Para la optimización y la evaluación de la veracidad y precisión de los métodos se utilizaron dos materiales de referencia certificados (MRC): hojas de espinaca (NIST 1570a) y hojas de tomate (NIST 1573a). Los valores de referencia se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4. 1-Valores de referencia de MRC

MRC	Valor certificado mg kg ⁻¹ (base seca)		
	As	Cd	Pb
Hojas de espinaca (mg kg ⁻¹ , base seca)	0,068 ± 0,012	2,876 ± 0,058	0,2*
Hojas de tomate (mg kg ⁻¹ , base seca)	0,1126 ± 0,0024	1,517 ± 0,027	--

(*) Valor no certificado

4.2 Instrumentos

- Espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito Thermo Scientific iCE 3500 (Cambridge, UK).
- Espectrómetro de emisión atómica inducido por microondas MIP OES, Agilent 4210 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) equipado con nebulizador inerte One Neb, una cámara ciclónica de doble paso y una antorcha de tipo estándar. El espectrómetro cuenta con un productor de nitrógeno modelo 4107 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) que toma aire del ambiente por medio de un compresor modelo KK70 TA-200K (Dürr Technik, Bietigheim-Bissingen, Germany).
- Horno de microondas CEM Mars 6 provisto con vasos de reacción Easy Prep Plus®. (Carolina del norte, USA)
- Sonda de ultrasonido Sonics™ Vibracell VC505 (USA)

Instrumentos auxiliares

- Centrifuga Luiguimac LC-15
- Balanza analítica Shimadzu AUX220.

4.3 Muestras y muestreo

Tanto el muestreo como las operaciones preliminares fueron realizados por parte de personal de INIA Las Brujas y el Mercado Modelo, en el marco del proyecto en que se encuentra esta tesis (FSA_I_2017_1_140199).

Las muestras de frutas y hortalizas frescas fueron obtenidas por medio del Mercado Modelo de Montevideo, entidad que comercializa más del 60% de los vegetales frescos en Uruguay. Se siguió un protocolo estandarizado de selección al azar de los operadores del mercado, donde cada muestra es representativa del total del volumen a la venta del día. Los muestreos fueron realizados durante las primeras horas de operación y simultáneamente se realizó una encuesta complementaria siguiendo la Metodología de Evaluación de Cadenas Agroalimentarias (MECA) (La Gra, et al., 2016). En el caso de lechuga se seleccionaron aleatoriamente 5 unidades de distintos cajones y para manzana, tomate y zanahoria, se tomaron muestras de

al menos 1 kg siguiendo el mismo criterio de aleatoriedad. En la Figura 4.1 se muestra una fotografía del muestreo de tomates que nos fue compartida.



Figura 4. 1-Muestreo de tomate en el Mercado Modelo

Luego de recibidas las muestras en INIA Las Brujas, se codificaron y se realizaron los tratamientos preliminares correspondientes (limpieza, secado y molienda para obtener un material homogéneo). Estas fueron acondicionadas en bolsas de polietileno sin uso previo, precintadas, codificadas y llevadas al laboratorio de INIA donde se procedió al cuarteo y submuestreo (100-200 g) en el mismo día. Luego fueron cortadas con cuchillo de cerámica sobre superficie plástica y secada en estufa de circulación forzada Modelo DN93 (Yamato, Tokio, Japón) a 70 °C por 96 horas.

En la Figura 4.2 se muestra vegetales cortados y puestos a secar.



Figura 4. 2 Pretratamiento realizado en instalaciones de INIA

Una vez secas, fueron procesadas en un molino de martillos Willey Model 4 (Thomas Scientific, NJ, USA), tamizadas en malla de tamaño de partícula de 1 mm, acondicionadas en tubos plásticos. En estas condiciones se trasladaron a Facultad de Química donde fueron mantenidas en condiciones de baja humedad hasta el momento del análisis (Figura 4.3).



Figura 4. 3-Muestras para análisis

Se recibieron durante todo el desarrollo de esta tesis un total de 30 operadores que correspondían a las matrices de trabajo. Operador fue la forma que se identificó a cada muestra, adjudicándole un número que le otorgaba trazabilidad.

4.4 Preparación de muestras

Se llevaron a cabo dos estrategias de preparación de las muestras para poder obtener los elementos en estudio en la forma líquida. Como se describió en la Introducción, se denomina **A** al método asistido por microondas y **B** al nuevo método desarrollado basado en extracción asistida con ondas de ultrasonido.

4.4.1 Extracción asistida por microondas- Método A

Se realizó una digestión asistida por microondas utilizando un equipo CEM (Mars 6, EUA). Para ello se pesaron 0,5 g de muestra (seca y tamizada) en vasos de reacción de 100 mL (EasyPrep Plus®) y se agregaron 10,00 mL de HNO_3 4,8 mol L^{-1} . La programación de temperatura utilizada fue la siguiente: potencia 400-1800 W, rampa de temperatura: 15 min hasta alcanzar 200 °C, 10 min a 200 °C, presión 500 psi. Se realizaron blancos de reactivos simultáneamente al análisis de las muestras y estas últimas se analizaron por triplicado.



Figura 4. 4-Microondas CEM

Una vez finalizada la digestión se realizó un trasvase cuantitativo y se llevó a un volumen final de 20,00 mL con agua ultrapura. En la Figura 4.5 se muestran las disoluciones de muestras obtenidas luego del proceso de digestión.

Sobre estas disoluciones se realizaron las determinaciones analíticas de As, Cd y Pb.

El procedimiento descrito anteriormente fue utilizado para las cuatro matrices analizadas. Este método que involucra una digestión total fue considerado como de referencia en las comparaciones realizadas posteriormente en etapas de validación de las determinaciones de los elementos en estudio. Si bien no está descrito como un método estándar de referencia, en la sección resultados y discusión se explicará en detalle esta consideración.

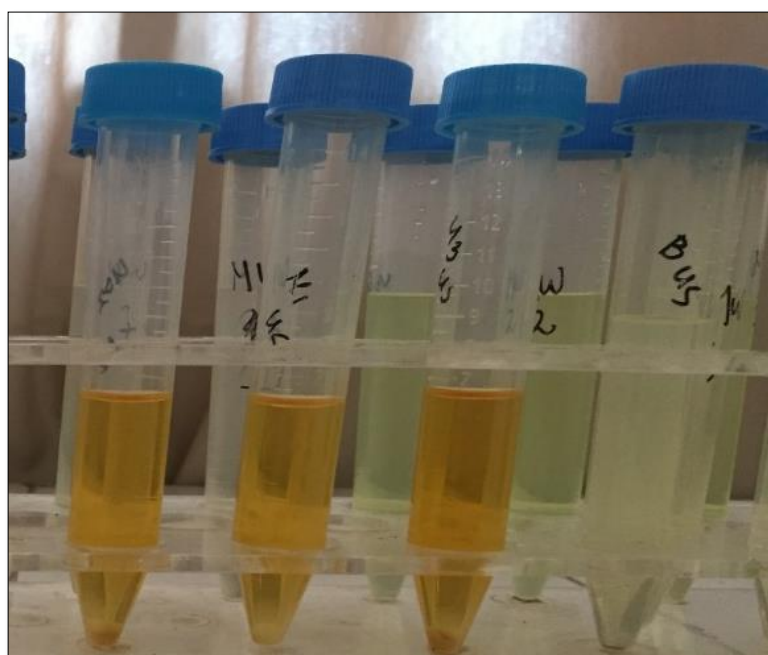


Figura 4. 5-Muestras digeridas en microondas

Cabe mencionar que este procedimiento que utiliza ácido diluido para la digestión fue publicado en la revista nacional arbitrada (INNOTECH) (Tissot et al., 2019)

4.4.2 Extracción asistida por ondas de ultrasonido – Método B

Se realizó un tratamiento de extracción asistido por ondas de ultrasonido, utilizando una sonda equipada con puntero de aleación de titanio de 13-mm, que

trabajó a una frecuencia de 20kHz y 35% de amplitud. En la Figura 4.6 se muestra la sonda utilizada.



Figura 4. 6-Sonda de ultrasonido Sonics Vibracell VC505

Las condiciones de extracción con la sonda fueron optimizadas, realizando un diseño experimental central compuesto (5 niveles- 2 variables) (Massart et al., 1997).

Las variables en estudio en este diseño multivariado fueron el tiempo de contacto de la sonda con la muestra y concentración del medio extractante, en este caso se utilizó ácido nítrico. Estos experimentos (9 en total) se realizaron utilizando el MRC de hojas de tomate para Cd y As, y muestras de lechuga operador N° 184240 que presentaron valores cuantificables de Pb cuando se aplicó el Método A, ya que el MRC no contaba con un valor certificado. Dado el alto costo del material de referencia certificado, se decidió no realizar por triplicado cada experimento del diseño, ya que el objetivo era optimizar las condiciones de tratamiento con sonda. Según fue reportado por investigadores de este grupo, esta forma de trabajo es útil

para lograr una exploración razonable de las condiciones experimentales óptimas, y solo se repiten los experimentos más prometedores (Machado et al., 2016).

Una vez encontradas las condiciones de trabajo óptimas, el procedimiento final fue el siguiente: Se pesaron 0,5 g de muestra (seca y tamizada) en tubos de polipropileno de tamaño adecuado para llevar adelante el tratamiento. Posteriormente se agregaron 20,00 mL de HNO_3 2,5 mol L^{-1} . El proceso de sonicado se realizó durante 15 minutos a una frecuencia de 20-kHz. Una vez finalizado el tratamiento, se centrifugó 15 minutos a 3500 rpm, y el sobrenadante resultante se utilizó para realizar la determinación analítica de los elementos de interés. Se realizaron blancos de reactivos simultáneamente con el tratamiento de las muestras. La Figura 4.7 muestra diferentes etapas de proceso asistido con ondas de ultrasonido.

El procedimiento desarrollado durante la tesis fue publicado en la revista internacional arbitrada: *Results in Chemistry* (Pereira et al., 2021).

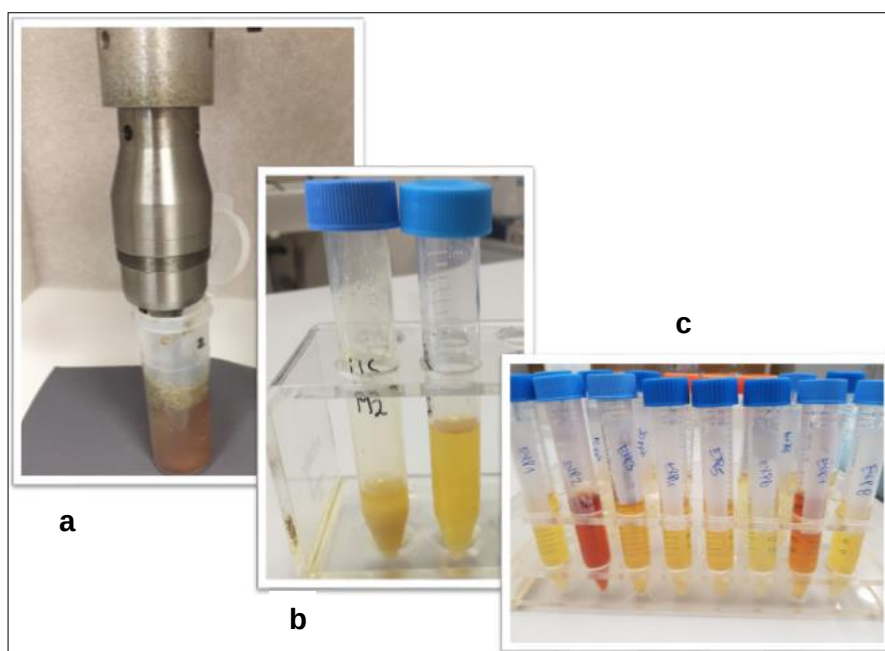


Figura 4. 7-Tratamiento asistido con ultrasonido con sonda (a), muestra luego de centrifugar, sólido y sobrenadante (b) y aspecto de las extracciones luego del tratamiento según las condiciones del diseño experimental (c)

4.5 Determinaciones analíticas mediante ETAAS (Cd y Pb)

Todas las determinaciones analíticas de Cd y Pb se realizaron en un espectrómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica Thermo Scientific iCE-3500 (Cambridge, Reino Unido) equipado con un atomizador de horno de grafito calefaccionado longitudinalmente (GFS35Z), módulo automuestreador (GFS33) y con corrección de fondo basada en efecto Zeeman. Como fuente de radiación se utilizaron lámparas de cátodo hueco de Pb y Cd (Photron, Pty. Ltd., Victoria, Australia). Operadas a las líneas analíticas de 228,8 nm (Cd) y 283,3 nm (Pb). Todas las medidas se llevaron a cabo en tubos de grafito de vida extendida ELC (Thermo Scientific). El espectrómetro fue controlado mediante el software SOLAAR (Thermo Scientific, Cambridge, Reino Unido). Se empleó gas argón 99,998% (Linde, Montevideo, Uruguay), el cual fue usado como gas de purga y protector. La evaluación de las señales y cuantificación fue realizada utilizando la absorbancia integrada (área de pico).



Figura 4. 8-Espectrómetro Thermo Scientific iCE-3500

Los programas de temperatura del horno de grafito utilizados para las determinaciones se detallan en el siguiente apartado donde se presentan las condiciones operativas optimizadas para cada analito y en cada matriz de estudio.

4.6 Condiciones de atomización y pirolisis

Las disoluciones resultantes luego de la digestión mediante microondas y la de extracción con ondas de ultrasonido tuvieron características diferentes y por lo tanto requirió en cada caso de optimizaciones independientes. Para ello se obtuvieron y se estudiaron las correspondientes curvas de atomización y pirolisis para encontrar las mejores condiciones de trabajo (máxima señal). Además, se debió hacer similar estudio para la selección de los modificadores de matriz adecuados para el análisis. Dichas curvas son el resultado del monitoreo de las señales para cada uno, incrementado las temperaturas de ambas etapas en un rango determinado (generalmente el recomendado para cada proceso). Se graficó absorbancia en función de temperatura para pirolisis y atomización respectivamente, de esta forma es más fácil determinar el máximo para ambos procesos, que se corresponde con la mayor sensibilidad.

4.6.1 Condiciones de atomización y pirolisis para el Método A

Para la determinación de Cd y Pb está reportado el uso de diferentes modificadores químicos como $Mg(NO_3)_2$, $Pd(NO_3)_2$ y mezclas de ambos. Es factible que ocurran pérdidas por volatilización de los elementos a las temperaturas de trabajo, por este motivo y a los efectos de optimizar el programa de temperatura se realizaron las curvas de atomización y pirolisis para ambos elementos utilizando diferentes modificadores de matriz.

Para el caso del tratamiento propuesto como método A, se trabajó inicialmente con lechuga, matriz que fue tomada como modelo de estudio, y sobre esta fue que se optimizaron las condiciones de temperaturas, con el objetivo de obtener un único método de cuantificación para cada elemento en las cuatro matrices simultáneamente. Los resultados obtenidos en esta etapa se presentarán en el Capítulo de Resultados y Discusión.

Las condiciones de atomización y pirolisis que resultaron óptimas fueron las que se detallan en la Tabla 4.2. El volumen de inyección fue de 20 μL . Para la

determinación de Cd, como modificador de matriz se utilizaron 10 µL de una disolución con un contenido de 5 µg de Pd(NO₃)₂. En el caso del Pb, como modificador se utilizaron 10 µL de una mezcla de Pd(NO₃)₂ y NH₄H₂PO₄ conteniendo 2,5 µg de Pd(NO₃)₂ y 25 µg de NH₄H₂PO₄.

Tabla 4. 2-Programas de temperaturas de atomización y pirolisis- Método A

	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo de gas (L min⁻¹)
Cd	Secado	110	20	0,2
	Pirolisis	800	20	0,2
	Atomización	1800	3	---
	Limpieza	2500	3	0,2
Pb	Secado	120	35	0,2
	Pirolisis	900	20	0,2
	Atomización	1400	4	---
	Limpieza	2500	3	0,2

En la Tabla 4.3 se detalla la composición de las mezclas, sobre las siguientes mezclas de modificadores en las concentraciones indicadas para determinar cuál era el adecuado para la determinación de Pb.

Tabla 4. 3-Pruebas de modificadores de matriz

	Mg(NO ₃) ₂ (mg L ⁻¹)	Pd(NO ₃) ₂ (mg L ⁻¹)	NH ₄ H ₂ PO ₄ (mg L ⁻¹)	Volumen (µL)
1	---	250	2500	10
2	150	---	2500	10
3	150	250	---	10

4.6.2 Condiciones de atomización y pirolisis para el Método B

Se trabajó también con lechuga como matriz modelo, se fortificó muestra blanco correspondiente a un operador que no cuantificaba para los elementos en estudio. Para ello se adicionó de forma de obtener una concentración de Pb de 0,3 mg kg⁻¹ y de Cd de 0,2 mg kg⁻¹ (límites máximos admitidos según reglamentación para ambos elementos).

Las condiciones de atomización y pirólisis que resultaron óptimas fueron las que se detallan en la Tabla 4.4. El volumen de inyección fue de 20 μL . Para la determinación de Cd, como modificador de matriz se utilizaron 10 μL de una disolución con un contenido de 5 μg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$. En el caso del Pb, como modificador se utilizaron 10 μL de una mezcla de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ conteniendo 2,5 μg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ y 25 μg de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Es importante destacar que de acuerdo con el objetivo de desarrollar un único método que pueda cuantificar Pb en todas las matrices, en alguno de los casos se evaluó un compromiso costo- beneficio con la sensibilidad, para poder utilizar las mismas condiciones para los cuatro productos. En este sentido el único cambio que fue requerido en los programas de temperatura fue la disminución de la temperatura de atomización para Pb.

Tabla 4. 4-Programa de temperatura optimizado de atomización y pirólisis para el método B

	Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo de gas (L min^{-1})
Cd	Secado	110	20	0,2
	Pirólisis	800	20	0,2
	Atomización	1800	3	---
	Limpieza	2500	3	0,2
Pb	Secado	120	35	0,2
	Pirólisis	900	20	0,2
	Atomización	1200	4	---
	Limpieza	2500	3	0,2

4.7 Determinación analítica de arsénico mediante HG-MIP OES

Para la determinación de As se utilizó la técnica de generación de hidruros (HG) con detección mediante MIP OES. Las mediciones fueron realizadas a 193,695 nm. Las condiciones operativas utilizadas fueron las siguientes: flujo de N_2 0,7 L min^{-1} , velocidad de la bomba 30 rpm, posición de lectura 10 y tiempo de lectura 10 s. Se trabajó en el modo de corrección de fondo automático. Estas condiciones se fijaron

luego de estudiar el comportamiento de la señal de emisión variando el flujo de N_2 y la posición de lectura de la antorcha mediante el software del que dispone el equipo.



Figura 4. 9-Espectrómetro de emisión atómica Agilent 4210



Figura 4. 10-Cámara de reacción (MSIS)

El As puede cuantificarse mediante medidas a partir de su hidruro volátil que es generado luego de una reducción con tetrahidrobórato de sodio ($NaBH_4$) en medio ácido. Esta reducción se produjo en una cámara de reacción comercial disponible en el laboratorio (MSIS).

En la Figura 4.11, se muestra el sistema en flujo que permite una reducción en línea de la especie As (III) a su correspondiente hidruro (AsH_3) y posterior separación de éste en la cámara. El tubo de muestra que generalmente ingresa al nebulizador es bloqueado en esta forma de trabajo y la muestra se bombea hacia la parte inferior de la cámara de separación según se muestra en la Figura 4.11 (0,90 mL/min). El agente reductor se bombea (0,90 mL/min) hacia la parte superior de la cámara de separación y una vez que se produce el hidruro volátil éste se desprende (se separa en la cámara) y es arrastrado por el gas transportador (N_2) hasta el plasma donde se produce la atomización.

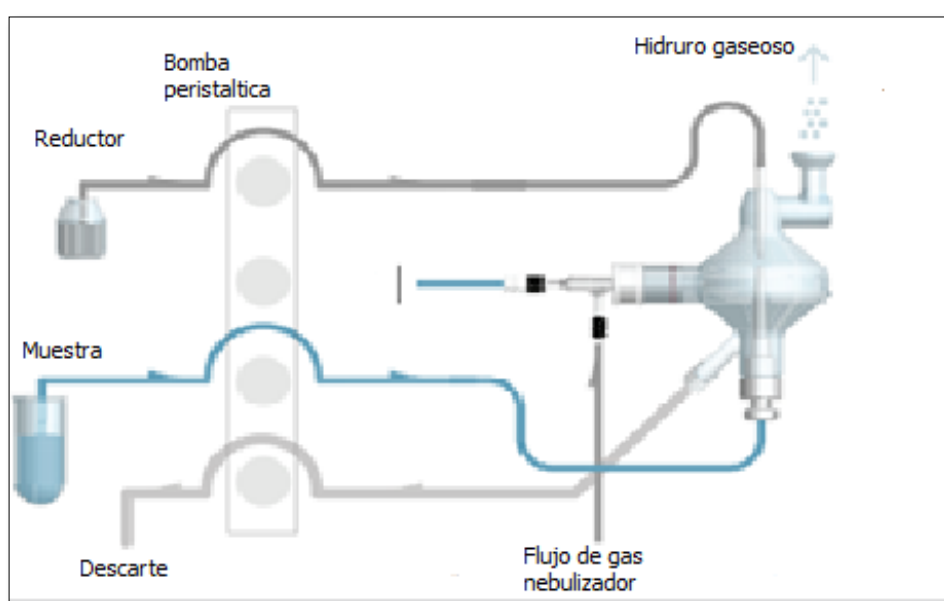


Figura 4. 11-Configuración del sistema en flujo para la generación de hidruro (adaptada de Manual de Agilent Technologies)

Cuando se trabaja con muestras complejas, provenientes de un proceso de digestión en un medio altamente oxidante, que es necesario para destruir los compuestos orgánicos de arsénico, el proceso finaliza con el As presente como As (V). Para poder llevar adelante la determinación mediante generación de hidruros, previamente se requiere de un proceso de pre reducción. Dado que la formación de del hidruro de arsénico (arsina- AsH_3) es más favorable para los estados de oxidación más bajos, es necesario realizar esta pre-reducción y así llevar el As (V) a As (III) (fuera de línea). El proceso se completa en forma eficiente con otra etapa de reducción en línea con NaHB_4 cuyo esquema se muestra en la Figura 4.11.

Generalmente la etapa de pre-reducción se realiza con un tratamiento con yoduro de potasio (KI) o cloruro de estaño (SnCl_2) (Welz y Sperling, 1999).

El mecanismo de formación de hidruros es complejo, y se han propuesto las siguientes reacciones, donde R se refiere a un radical orgánico o puede ser hidrógeno, Figura 4.12. (Tenabe et al., 2016).

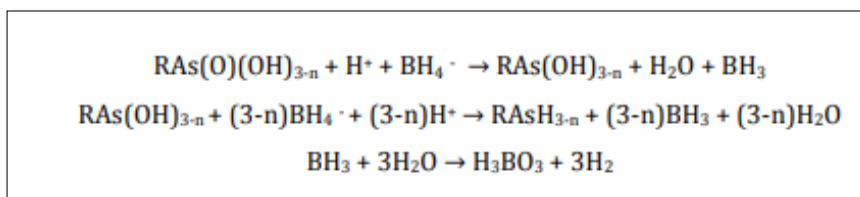


Figura 4. 12-Mecanismo de pre-reducción de arsénico

En este trabajo, la pre-reducción fue llevada a cabo con HCl 12 mol L^{-1} and KI 20% (m/v) en relación: muestra/estándar (10): HCl (1): KI (1). En primer lugar, se agregó HCl y se llevó a ebullición en plancha calefactora hasta una reducción de volumen del 50% aproximadamente (Figura 4.13). Luego se reconstituyó el volumen original de 10 mL con agua ultrapura y se procedió al agregado de KI . Se dejó reaccionar una hora a temperatura ambiente previo a la realización de las medidas (Tenabe et al., 2016). Estas condiciones no fueron modificadas según lo reportado por Tenabe et al obteniéndose resultados satisfactorios.

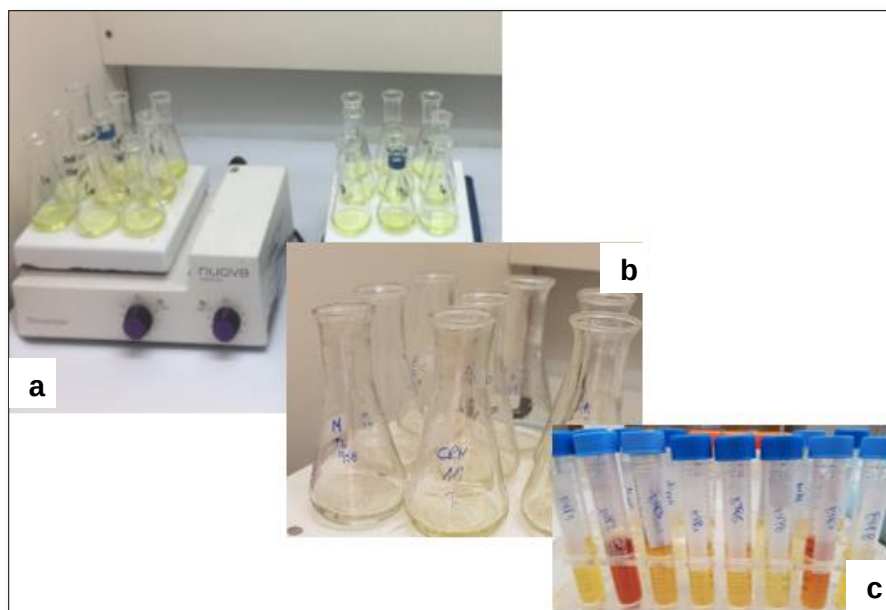


Figura 4. 13-Prereducción para determinación de As (a): tratamiento con HCl y calor-(b): muestras previo a trasvase-(c): muestras luego del agregado de KI y reposo de 1 hora

4.8 Microscopía Confocal

Un aporte extra que incluyó la tesis y que no estaba programado en el plan original, fue la caracterización químico-estructural de los residuos del material de referencia de hojas espinaca utilizado para los experimentos de la etapa de optimización de la extracción mediada por ultrasonido.

Esta caracterización se realizó mediante microscopia Raman Confocal, utilizando un Microscopio Confocal Raman & de Fuerza Atómica (AFM) marca WITec, modelo Alpha 300RA instalado en el IPTP/FQ, gestionado por el Centro NanoMat del DETEMA (Pereira et al., 2021).

La microscopía Confocal ofrece una mejor resolución que la microscopía convencional a la hora de caracterizar superficies. Permite obtener información en tres dimensiones y a diferentes profundidades (Cardona et al., 2013).

Los residuos obtenidos de los tratamientos realizados con ultrasonido cuando se llevó adelante el diseño experimental fueron separados, secados en estufa y observados en el microscopio para su caracterización.

Se intentó también la obtención de espectros Raman, pero debido a la alta fluorescencia de las muestras no fue posible contar con estos estudios.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y

DISCUSIÓN

5.1 Extracción asistida con microondas-MÉTODO A

De acuerdo con los objetivos planteados en este trabajo, se desarrolló un método de extracción asistido por microondas para el tratamiento de tomate, lechuga, zanahoria y manzana, para posteriormente cuantificar elementos contaminantes a niveles traza.

La digestión con microondas fue considerada como un método de referencia, dado que se logró una digestión total de la muestra, se utilizaron las mismas condiciones para las cuatro matrices logrando así obtener un único método de tratamiento de muestra. A partir de los resultados obtenidos con este tratamiento fue posible no solo informar a los responsables del proyecto Innovagro sobre los niveles de los contaminantes, sino que también se realizó la comparación con los resultados obtenidos realizando la extracción con ultrasonido.

Si bien los métodos oficiales de análisis (AOAC) todavía sugieren tratamientos donde se utilizan ácidos concentrados y altas temperaturas para la digestión de alimentos (Latimer Jr, 2016), el tratamiento con microondas se puede considerar una alternativa que logra los mismos resultados y es ampliamente utilizado. Además, el uso de ácidos diluidos para algunas matrices complejas ha sido reportado como exitoso (Nóbrega et al., 2002).

En este trabajo se demostró que se puede trabajar con ácido nítrico diluido también para las matrices estudiadas, lo cual es un aporte adicional que está alineado a los principios de la Química Verde. Se logró reducir considerablemente el volumen y concentración de ácidos, así como también tiempos de tratamiento y consumo de energía obteniendo cifras de mérito adecuadas para el propósito.

Para la medición los niveles de As, Cd y Pb se trabajó en primera instancia en la optimización y evaluación de las condiciones experimentales necesarias para contar, en nuestro laboratorio, con métodos que brinden resultados confiables. Esto se realizó tanto para el Método A como el B.

5.1.1 Desarrollo y optimización de las condiciones de digestión

Como punto de partida para la optimización se tuvieron en cuenta las condiciones reportadas previamente por investigadores de nuestro grupo (Machado et al., 2016) donde se utilizaba ácido nítrico diluido para la digestión de otros

vegetales. El programa de temperatura del digestor de microondas se mantuvo según esta experiencia previa.

Para la determinación mediante ETAAS de Cd y Pb se intentó disminuir aún más la concentración de ácido luego de la digestión, lo cual también era deseable para aumentar la vida útil de los tubos de grafito. Es importante mencionar que con concentraciones de $4,7 \text{ mol L}^{-1}$, como se había trabajado anteriormente se observó un deterioro importante de los hornos de grafito.

Si bien la digestión se realizó con una concentración del ácido igual a la reportada en los antecedentes, se logró, en esta tesis, un método de determinación con ETAAS adecuado diluyendo el digesto 1:2 en agua ultrapura (reducción de la concentración de ácido nítrico a $2,4 \text{ mol L}^{-1}$). De esta forma el analito se encuentra en un medio menos ácido, lo que redundó en un aumento de la vida útil de los tubos de grafito.

Se realizó siempre en paralelo, además de análisis de blancos, tratamientos idénticos a muestras de MRC de hojas de espinaca. De esta manera se realizaba un control de calidad en cada corrida, asegurando la calidad de los resultados. En el presente trabajo de tesis se estableció como criterio de aceptación para la corrida una recuperación de 75-125% respecto al valor certificado del material de referencia, de acuerdo a lo establecido en AOAC. En el caso de no contar con un valor certificado de referencia se llevó a cabo el análisis de muestras fortificadas, con una concentración exactamente conocida de cada uno de los elementos.

5.1.2 Optimización de programas de temperatura mediante ETAAS

Si bien la espectrometría de absorción atómica electrotrémica presenta límites de detección adecuados para los fines propuestos, suele presentar interferencias dependientes del tipo de matriz en estudio. Para vencer estas interferencias es preciso evaluar el uso de modificadores de matriz que permitan mejorar el desempeño del método.

Para obtener las condiciones experimentales presentadas en las Tablas 4.3 y 4.4 en el capítulo Materiales y Métodos, se evaluaron las curvas de atomización y pirolisis. Estos programas fueron optimizados para Cd y Pb, con los modificadores

que allí se mencionaron, observándose señales bajas para los blancos y picos muy bien definidos para estándares y muestras.

En el caso de Cd estaba reportado el uso de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ con excelentes resultados en matrices similares a las que se utilizaron en este trabajo. Por lo que se realizaron unas pruebas preliminares que permitieron continuar con el desarrollo del trabajo, solo fue necesario realizar las optimizaciones de temperaturas de las diferentes etapas de la atomización.

Con respecto al Pb puede utilizarse $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, los trabajos indicaban el uso independiente de estos. Las pruebas preliminares no arrojaron buenos resultados, con un marcado efecto matriz, obteniéndose señales poco intensas, incluso negativas.

Por lo que en el caso del Pb en una primera etapa, se buscó el mejor modificador de matriz y luego se trabajó optimizando las temperaturas en diferentes matrices.

Los resultados obtenidos se representan en las curvas de pirolisis y atomización que se muestran en las Figura 5.1 y 5.2, donde se puede observar las respuestas obtenidas para cada una de las etapas en el rango de optimización sugerido por el fabricante del equipo.

Como se puede observar cada una las evaluaciones se realizó en un rango de temperaturas que son las adecuadas para cada uno de los procesos, ya que el objetivo en esta etapa era determinar cuál era la mezcla más indicada.

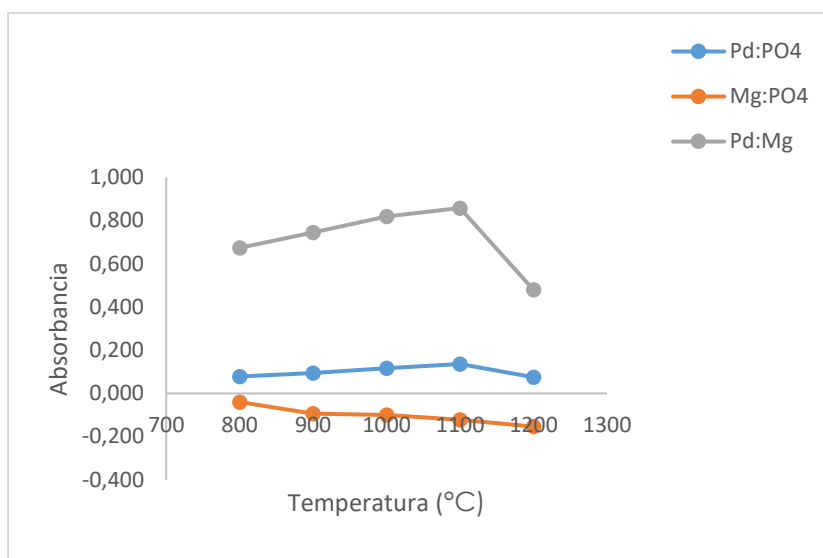


Figura 5. 1-Curva de pirolisis Pb en lechuga (Etapa 1- Selección modificador de matriz)

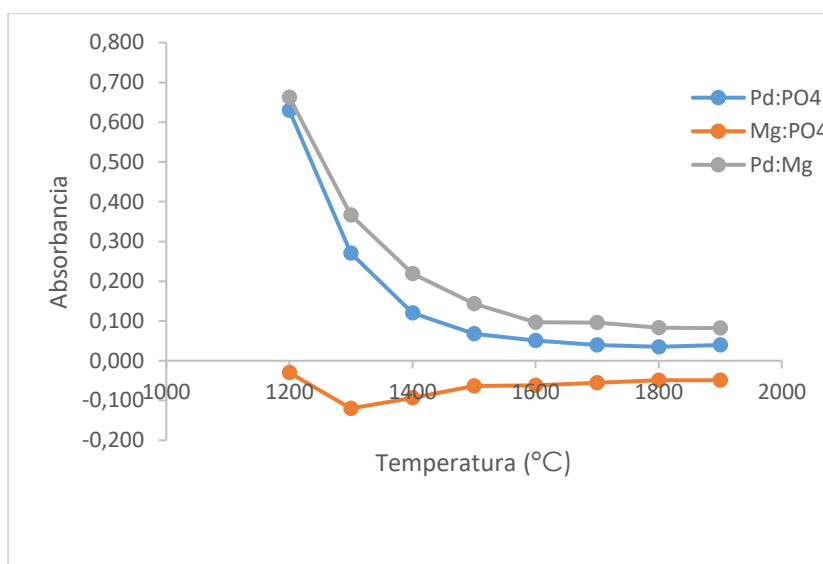


Figura 5. 2-Curva de atomización Pb en lechuga (Etapa 1- Selección modificador de matriz)

Mediante este estudio se obtuvo que la mezcla de modificadores más adecuada para la determinación de Pb, fue 10 μL de una mezcla de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ y $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, conteniendo 2,5 μg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ y 25 μg de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, arrojando las condiciones óptimas de trabajo (mayor señal).

Las condiciones expuestas en la Tabla 4.2, surgen de la experiencia previa del grupo de trabajo de Química Analítica y de la bibliografía reportada para Cd. En el caso de Pb, una vez determinada la mezcla de modificadores de matriz se realizó curva de atomización y pirolisis para lechuga, y con esas condiciones se procedió a continuar con el trabajo en las demás muestras. .

5.1.3 Optimización de la determinación de As mediante HG-MIP OES

Para la determinación de As, en primer lugar se intentó utilizar ETAAS, observándose resultados no satisfactorios. Se realizaron curvas de atomización y pirolisis tratando de encontrar las condiciones óptimas, sin resultados positivos. Se variaron las proporciones de la mezcla de modificadores de matriz e incluso se intentó trabajar con soluciones conteniendo solamente $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ en distintas concentraciones, pero los resultados no fueron buenos, ya que el efecto matriz era demasiado alto. Se obtuvieron en todos los ensayos preliminares señales con muy baja respuesta, e incluso señales negativas a raíz del marcado efecto matriz, que el modificador utilizado no lograba revertir.

En caso de volver a intentar trabajar con la determinación de As mediante ETAAS se podría evaluar utilizar los llamados modificadores permanentes, que como se desarrolló en el Capítulo 1 no es necesario agregar el modificador para cada determinación, ya que genera una capa sobre el tubo de grafito que disminuye considerablemente las interferencias (Costa et al., 2015; Giacomelli et al., 2002).

Ante la alternativa de trabajar con otra técnica disponible en el laboratorio (HG-MIP OES), se optó por explorar esta posibilidad para llevar adelante las determinaciones de As.

Como se mencionó oportunamente, se realizó una etapa de optimización de condiciones instrumentales que se lleva a adelante con el software del instrumento probando con diferentes matrices. Las condiciones descritas en el capítulo de Materiales y Métodos fueron adecuadas para las cuatro matrices. Esto se manifiesta en base a los resultados obtenidos, con el estudio de los MRC y la obtención de una precisión adecuada.

Acoplar la generación de hidruros a la emisión atómica, también resultó un desafío ya que tradicionalmente el acople se realiza con técnicas de absorción atómica (HG-AAS). Uno de los factores limitantes de la sensibilidad en espectrometría de plasma (ICP y MIP) es el transporte muestra.

La mayoría de los sistemas de introducción de muestras tienen una eficiencia muy limitada, si las condiciones operativas no se ajustan adecuadamente por ejemplo puede pasar que grandes cantidades de muestra de aerosol lleguen al

plasma y esto puede conducir a una reducción en la temperatura de este, atomización incompleta y aumento del efecto matriz (Williams et al., 2019).

Estas desventajas pueden evitarse con la introducción de la muestra en forma de hidruro gaseoso, esto llevó a la posibilidad de introducir más muestra en el plasma, sin los inconvenientes antes mencionados y como consecuencia se obtuvieron cifras de mérito muy adecuadas para el fin propuesto como se describirá más adelante.

5.1.4 Validación

Una vez desarrollado el método A y realizados todos los ajustes correspondientes para las determinaciones analíticas, se llevó a cabo la validación para las matrices correspondientes y los analitos en estudio.

Se determinaron los principales parámetros de desempeño del método (cifras de mérito: linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y veracidad) siguiendo las recomendaciones de la Guía Europea de validación Eurachem (Magnusson, et al., 2014). En todos los casos se utilizaron las condiciones experimentales óptimas descritas para cada uno de los analitos en el capítulo 4.

La **linealidad** fue determinada mediante inspección visual de las curvas de calibración, valor del coeficiente de determinación (R^2) y el estudio de aleatoriedad de los residuales. Los coeficientes de determinación obtenidos para las regresiones lineales fueron mayores a 0,99 para todos los analitos en estudio en los rangos que se presentan en la Tabla 5.1.

Los **límites de detección** (LD) y **cuantificación** (LC), fueron expresados como el contenido del analito correspondiente según criterio 3,3 y 10 veces la desviación estándar del blanco, respectivamente (Magnusson, et al., 2014).

La **precisión** (precisión intermedia) expresada como DER (%) (Desviación estándar relativa porcentual) fue estudiada utilizando MRC, obteniéndose valores menores al 10% para para todos los analitos.

La **precisión** (repetibilidad) expresada como DER (%) (Desviación estándar relativa porcentual) fue estudiada muestras adicionadas con los analitos en estudio, obteniéndose valores menores al 10% para para todos los elementos.

Para la evaluación de la **veracidad** se utilizaron dos MRC: hojas de espinaca (NIST 1570a) y hojas de tomate (NIST 1573a). La Tabla 5.1 resume los parámetros de validación obtenidos.

Tabla 5. 1-Cifras de mérito de validación

	Límite de detección ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Límite de cuantificación ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Veracidad % Recuperación (**)	Precisión (Repetibilidad) RSD % (n=6)
Pb	1,0 ^a	3,0 ^a	(4,7-40) ^a	111 ± 8 ^{(1*) a b c d}	15 ^a
	3,3 ^b	11 ^b	(5,0-40) ^b		12 ^b
	2,5 ^c	8,4 ^c	(2,7-40) ^c		6,7 ^c
	3,1 ^d	10 ^d	(2,4-40) ^d		11 ^d
Cd	0,4 ^a	1,0 ^a	(0,9-4) ^a	92 ± 11 ^{(1*) a b} 100 ± 6 ^{(1*) c d}	15 ^a
	0,5 ^b	2,0 ^b	(0,7-4) ^b		7,8 ^b
	1,2 ^c	4,2 ^c	(1,3-4) ^c		8,5 ^c
	2,2 ^d	7,3 ^d	(1,7-4) ^d		10 ^d
As	1,9 ^a	6,3 ^a	(4,4-100) ^{abcd}	89 ± 8 ^{(2*) abcd}	7,2 ^a
	2,5 ^b	8,3 ^b			2,4 ^b
	4,1 ^c	14 ^c			8,5 ^c
	3,3 ^d	11 ^d			8,5 ^d

a lechuga, b tomate, c manzana, d zanahoria

(1*)Material de referencia certificado de hojas de espinaca NIST 1570a

(2*)Material de referencia certificado de hojas de tomate NIST 1573a

(**) Promedio $\pm$ desviación estándar (n = 6)

Se realizó una prueba t de Student, para los resultados obtenidos a partir de las determinaciones de As, Cd y Pb en los MRC, todos los valores experimentales de t se encontraron por debajo del valor teórico $t(0,05, 5) = 2,57$. En la tabla 5.2 se muestran los t experimentales para cada elemento. Por lo tanto, a un nivel de significancia del 95%, las concentraciones obtenidas cuando se aplican los métodos desarrollados no difieren significativamente de los respectivos valores certificados, con lo cual se garantiza la veracidad. En el caso del Pb, si bien no se tenía valor certificado (con una incertidumbre asociada), se utilizó el valor que estaba reportado para calcular el t de Student experimental. A los efectos del trabajo, la información obtenida tenía valor para dar lugar a la discusión de los mismos.

Tabla 5. 2-t de Student experimentales

Analito	t experimental
Pb	2,52
Cd	0,033(*)
	-1,99(**)
As	-3,95

(*)Material de referencia certificado de hojas de espinaca NIST 1570^a

(**) Material de referencia certificado de hojas de tomate NIST 1573a

Los límites de detección y cuantificación para los tres elementos están muy por debajo de los límites máximos admitidos en la reglamentación vigente y de los que se establecen en los métodos oficiales de análisis AOAC (Tabla 5.3) como criterios para considerar que un método analítico es apto para el fin propuesto (Latimer Jr, 2016). Esto permite emitir resultados confiables y que aseguren la inocuidad del alimento desde el punto de vista de contaminantes inorgánicos.

Tabla 5. 3 Límites admitidos por AOAC, adaptado de Latimer Jr, 2016

	Límite de cuantificación ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Veracidad % Recuperación	Repetibilidad RSD %
Pb	≤ 10	60-115	≤ 15
Cd	≤ 10	60-115	≤ 15
As	≤ 10	60-115	≤ 20

El valor objetivo para la desviación estándar de un análisis determinado varía con la concentración de analito a medir y para estimarlo se puede establecer una relación funcional entre la concentración y la desviación estándar relativa (DER). Esta ecuación conduce a una curva que se puede utilizar para estimar valores objetivo de desviación estándar relativa para los análisis (Horwitz et al., 2006). Para los niveles de concentraciones de trabajo según la campana de Horwitz (Figura 5.3) se esperarían DER de hasta 20 %. Los resultados de precisión (DER) obtenidos para el método desarrollado fueron menores al 10 % para todos los elementos, lo cual se considera muy bueno, y sumado a los resultados del estudio de veracidad, avalan la aplicación del método para determinar la concentración de As, Cd y Pb en los productos seleccionados, con fines de control sanitario.

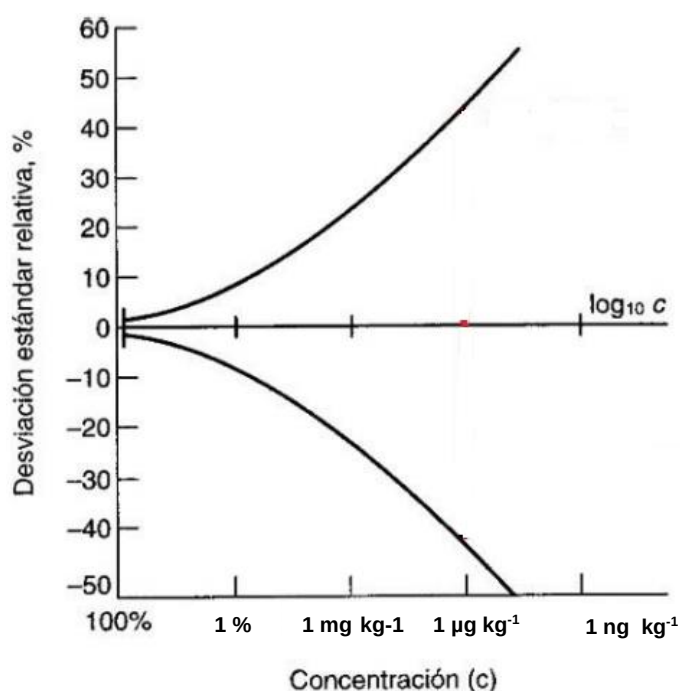


Figura 5. 3-Campana de Horwitz adaptada de Miller 1993

No se encontraron evidencias de interferencias debidas a la matriz ya que la veracidad en todos los casos fue adecuada una vez que se encontraron las condiciones óptimas de trabajo.

En base a lo explicado y a los resultados de la validación, para las determinaciones de rutina se establece como aseguramiento de la calidad de las corridas, el análisis de materiales de referencia y criterios de precisión que deben cumplirse según se reporta en Tabla 5.3 (Latimer Jr, 2016).

En lo que respecta al tratamiento de la muestra, se logró evitar el uso de ácidos concentrados para la digestión, lo que disminuyó costos y generación de residuos peligrosos. También es destacable que a partir de un mismo proceso de digestión se pudo realizar las medidas de todos los elementos, lo que ahorra tiempo de análisis y también costos.

Los parámetros de desempeño resultaron adecuados para el fin propuesto de monitoreo, con un único método de preparación de muestras para todas las matrices.

5.1.5 Análisis de muestras seleccionadas

Se realizaron determinaciones de As, Cd y Pb en muestras de lechuga, manzana, tomate y zanahoria, obtenidas en el marco del proyecto INNOVAGRO. Estos resultados se informaron al sector productivo ya que fueron obtenidos mediante un tratamiento, que, aunque fue mejorado, es decir modificado, está dentro de los reconocidos como confiables.

Se analizaron un total de 25 muestras, las cuales llegaron al laboratorio como se indicó en el capítulo 4.

En las Tablas 5.4 a 5.7 se muestran los resultados obtenidos para cada alimento.

En todos los casos se obtuvieron resultados muy por debajo de los límites legales establecidos, razón por la cual podemos asegurar la inocuidad de estos alimentos desde el punto de vista de contaminantes inorgánicos. El contenido de humedad de cada una de las muestras fue determinado en INIA Las Brujas y para la expresión de resultados se aplicó el dato de contenido de humedad a cada muestra. En promedio los contenidos de humedades fueron: 95,2 %, 94,5 %, 86,3 % and 82,8% para lechuga, tomate, zanahoria y manzana respectivamente.

Tabla 5. 4-Resultados de lechuga expresados en mg kg^{-1}

Muestras						
Analito	1	2	3	4	5	6
Pb	0,0187 $\pm$ 0,0022	0,0557 $\pm$ 0,0061	0,0301 $\pm$ 0,0022	0,0440 $\pm$ 0,0022	0,0182 $\pm$ 0,0017	0,0809 $\pm$ 0,0021
Cd	0,0017 $\pm$ 0,0001	0,0011 $\pm$ 0,0001	0,0041 $\pm$ 0,0006	0,0029 $\pm$ 0,0006	<LQ	<LQ
As	<0,0088	<0,0088	0,0107 $\pm$ 0,0008	ND	ND	0,0222 $\pm$ 0,0006

ND: no detectado. Resultados expresados como promedio $\pm$ desviación estándar (mg kg^{-1} , base húmeda, n=3)

Tabla 5. 5-Resultados de manzana expresado en mg kg^{-1}

Muestras				
Analito	1	2	3	4
Pb	0,0259 $\pm$ 0,0028	0,0167 $\pm$ 0,0029	ND	0,0441 $\pm$ 0,0019
Cd	ND	0,0059 $\pm$ 0,0005	<0,0042	<0,0042
As	ND	ND	ND	ND

ND: no detectado. Resultados expresados como promedio $\pm$ desviación estándar (mg kg^{-1} , base húmeda, n=3)

Tabla 5. 6-Resultados muestras de tomate expresado en mg kg^{-1}

Analito	Muestras							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Pb	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	<0.003	<0,0062	<0,0062	ND
Cd	$0,0020 \pm 0,0001$	$0,0029 \pm 0,0003$	$0,0034 \pm 0,0001$	<0.002	$0,0023 \pm 0,0001$	<0,0020	<0,0020	<0,0020
As	<0.002	$0,0146 \pm 0,0033$	<0.002	ND	ND	ND	ND	ND

ND: no detectado. Resultados expresados como promedio $\pm$ desviación estándar (mg kg^{-1} , base húmeda, n=3)

Tabla 5. 7-Resultados muestras de zanahoria expresado en mg kg^{-1}

Analito	Muestras					
	1	2	3	4	5	6
Pb	ND	ND	ND	$0,0148 \pm 0,0035$	$0,0205 \pm 0,0061$	$0,0175 \pm 0,0047$
Cd	<0,0073	<0,0073	ND	$0,0085 \pm 0,0011$	<0.002	$0,0114 \pm 0,0014$
As	ND	ND	ND	<0.011	ND	<0.002

ND: no detectado. Resultados expresados como promedio $\pm$ desviación estándar (mg kg^{-1} , base húmeda, n=3)

Es importante destacar que debido a que el método arroja límites de cuantificación del orden de los $\mu\text{g kg}^{-1}$ (ppb), fue posible cuantificar alguno de los elementos en algunos de los operadores. Como se desarrolló en el capítulo 1 puede deberse a las diferentes formas que tienen los contaminantes inorgánicos de llegar hasta dichos alimentos, ya sea por absorción desde el suelo, por el agua de riego, por uso de fertilizantes que los contengan como impurezas, etc.

En todos los casos se obtuvieron resultados muy por debajo de los límites legales establecidos, razón por la cual podemos asegurar la inocuidad de estos alimentos desde el punto de vista de contaminantes inorgánicos.

5.2 Extracción asistida con ondas de ultrasonido- METODO B

De acuerdo con los objetivos de esta tesis, se desarrolló, optimizó y validó un único método de extracción utilizando ondas de ultrasonido para la determinación de Pb, Cd y As en frutas y hortalizas.

5.2.1 Optimización de las condiciones experimentales para las determinaciones de Cd, Pb y As

Para las determinaciones de Cd y Pb, si bien se habían optimizado las condiciones experimentales de ETAAS para el método A, fue necesario realizar las curvas de atomización y pirolisis análogamente a como se hizo para el método A ya que las características del extracto eran bastante diferentes a las del digesto. De esta evaluación se encontró que el único cambio fue la temperatura de atomización para Pb (200°C menor). El uso de los modificadores se mantuvo.

5.2.2 Optimización de programas de temperatura mediante ETAAS PLOMO

La temperatura de pirolisis se evaluó, para la determinación de Pb, en un rango entre 800-1200 °C incrementándose en intervalos de 100 °C y para ello la temperatura de atomización utilizada fue 1200°C. Para optimizar la atomización se evaluaron temperaturas entre 1200-1900 °C, incrementándose en 100 °C. Para estas medidas se utilizó una temperatura de pirolisis de 900°C. En ambos casos se utilizó un volumen de inyección de 20 µL de muestra y 10 µL de la mezcla de modificador de matriz, se realizó el secado a 110 °C durante 20 segundos.

En las Figuras 5.4 a 5.7 se muestran los resultados obtenidos para ambos procesos. Se puede observar que para la determinación de Pb la temperatura de pirolisis que arroja mayor sensibilidad es 900 °C, y la temperatura de atomización es 1200°C. Este patrón se repite en las cuatro matrices ensayadas, lo que permite establecer las condiciones de trabajo que se detallan en la Tabla 4.4.

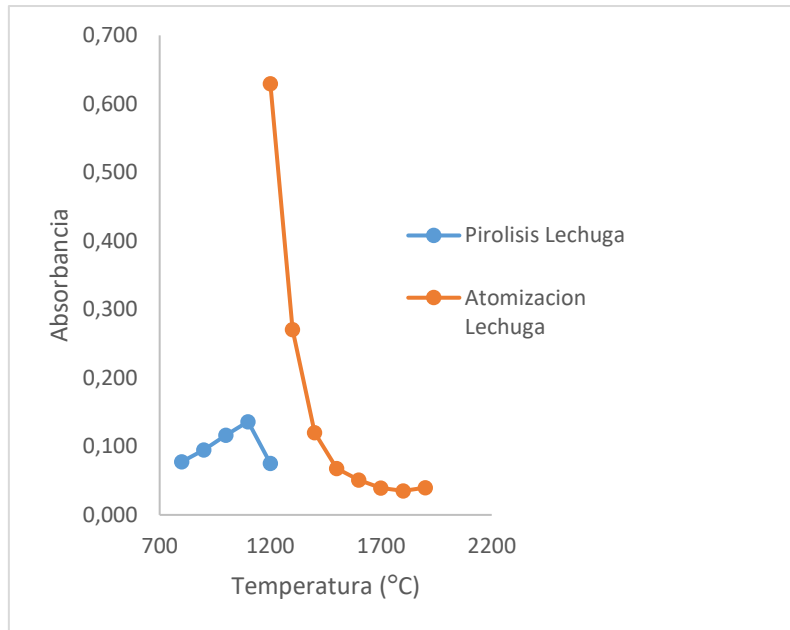


Figura 5. 4-Curva de atomización y pirolisis en lechuga

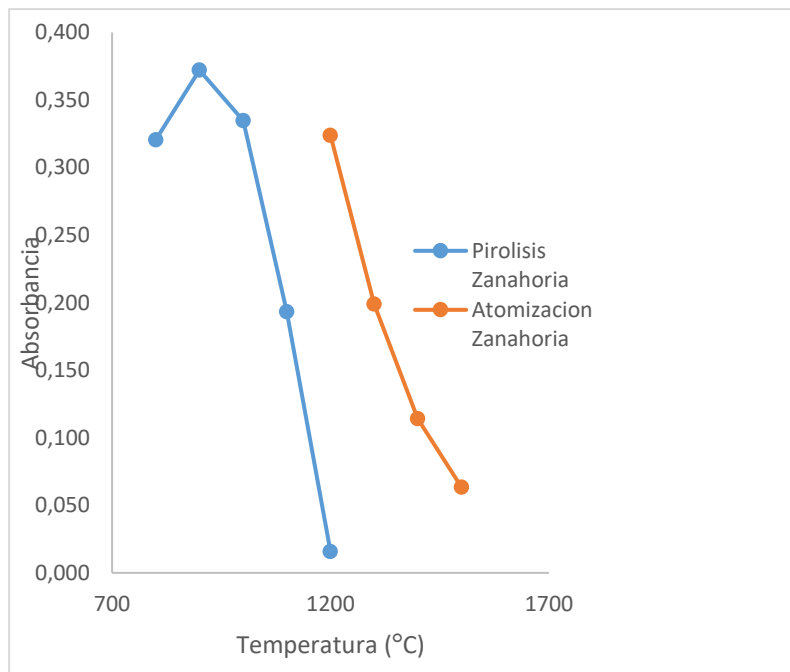


Figura 5. 5-Curva de atomización y pirolisis en zanahoria

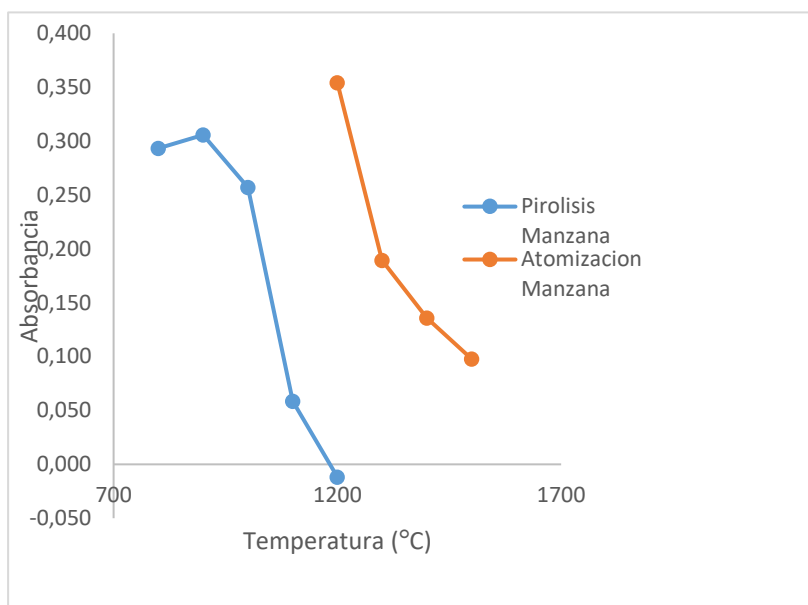


Figura 5. 6-Curva de atomización y pirolisis en manzana

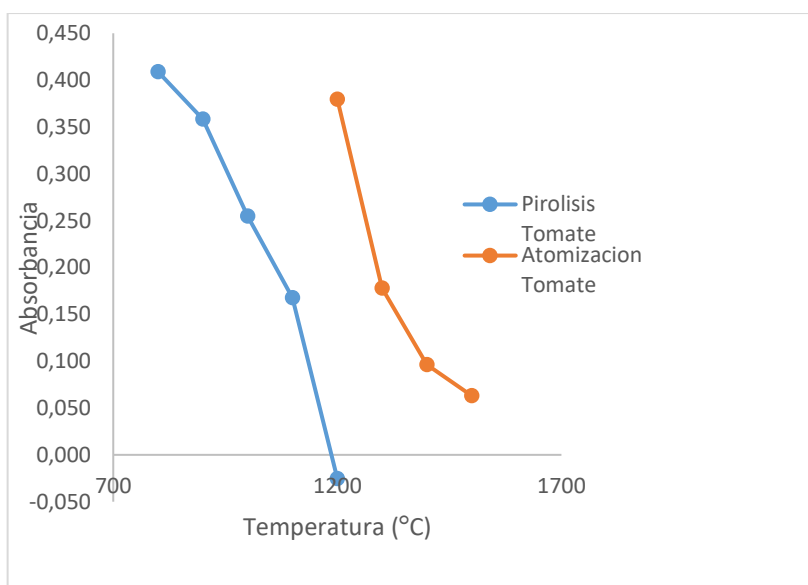


Figura 5. 7-Curva de atomización y pirolisis en tomate

CADMIO

En el caso de cadmio, se realizaron las curvas de pirolisis y atomización para las cuatro matrices de interés, como se muestra en las Figuras 5.8 a 5.11, utilizando como modificador de matriz $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$ 500 mgL^{-1} . El mismo se reportaba como el más utilizado para la determinación de Cd en matrices vegetales. (Machado et al., 2016; Mirosławski y Pauksto, 2018).

La temperatura de pirolisis se evaluó en un rango entre 700-1000 °C incrementándose en intervalos de 100 °C y para ello la temperatura de atomización utilizada fue 1800°C. Para optimizar la atomización se evaluaron temperaturas entre 1200-1900 °C, incrementándose en 100 °C. Para estas medidas se utilizó una temperatura de pirolisis de 800°C. En ambos casos se utilizó un volumen de inyección de 20 µL y se realizó el secado a 120 °C durante 20 segundos y como modificador de matriz se utilizaron 10 µL de una disolución con un contenido de 5 µg de $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$.

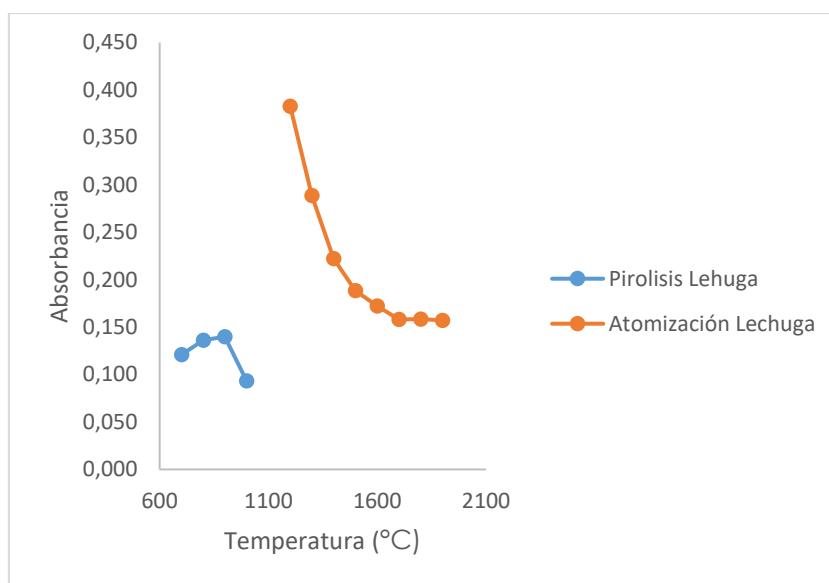


Figura 5. 8-Curva de atomización y pirolisis en lechuga

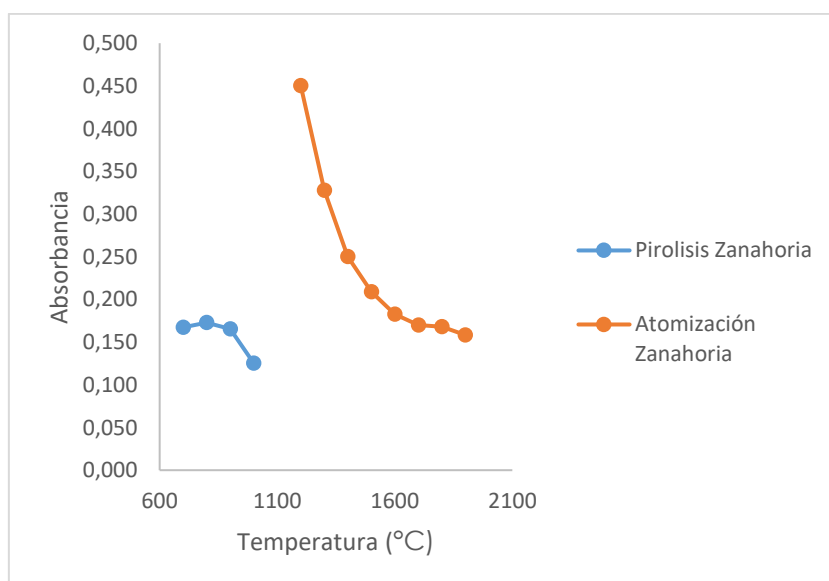


Figura 5. 9-Curva de atomización y pirolisis en zanahoria

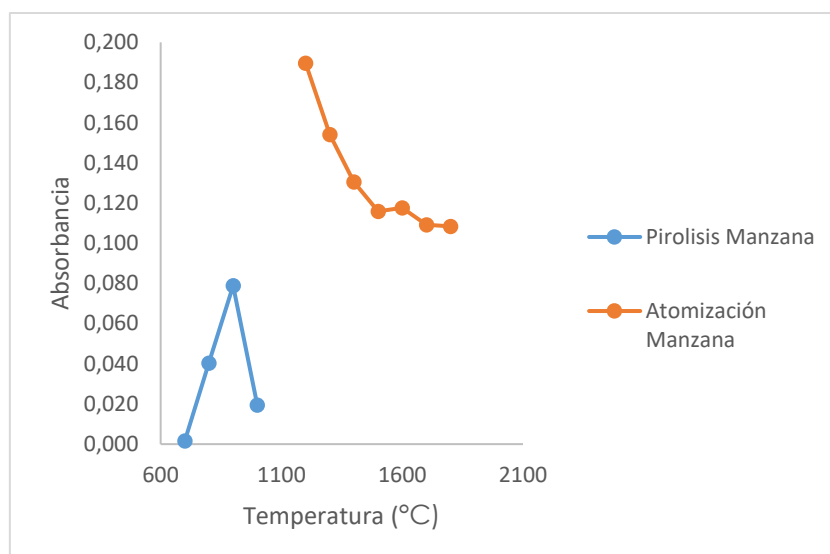


Figura 5. 10-Curva de atomización y pirolisis cadmio en manzana

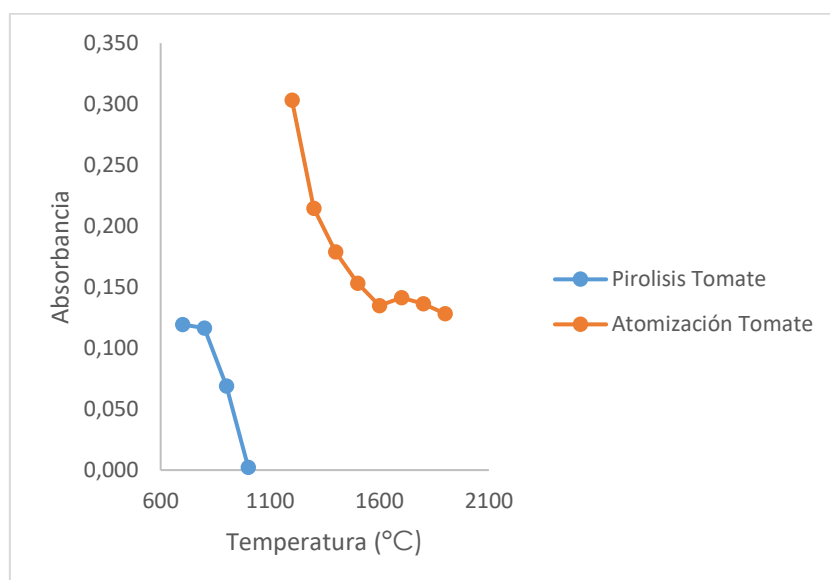


Figura 5. 11-Curva de atomización y pirolisis cadmio en tomate

A partir de la evaluación de los gráficos se puede observar que la temperatura de pirolisis con la que se obtiene mayor sensibilidad es 800 °C, y la temperatura de atomización es 1800 °C. Este patrón se repite en las cuatro matrices ensayadas, lo que permite establecer las condiciones de trabajo que se detallan en la Tabla 4.4.

5.2.3 Optimización de la determinación de As mediante HG-MIP OES

En el caso de las determinaciones de As, las condiciones experimentales fueron las mismas que para el método A.

5.2.4 Optimización de las condiciones de extracción.

Como punto de partida se comenzó revisando los antecedentes del grupo en el desarrollo de métodos de extracción de elementos traza asistidos con ondas de ultrasonido. En varias matrices de alimentos se habían obtenido buenos resultados (leche en polvo, arroz, semillas de soja, hojas de alcachofa). Tomando como referencia estos antecedentes se comenzó probando con muestras de lechuga, fortificadas con los analitos en estudio según se detalló en el capítulo 4. Los extractos resultantes se analizaron, luego de centrifugación y se obtuvieron resultados alentadores pero que debían de optimizarse ya que las recuperaciones para los MRC estaban comprendidas entre el 65-70 % para Cd y Pb, valores que se esperaba que podían mejorarse con un adecuado diseño experimental.

Luego este tipo de tratamiento siempre se obtiene una suspensión. Luego de centrifugar, el residuo se descarta y se determinan los analitos de interés en el sobrenadante. Para ello se requiere una extracción cuantitativa de los elementos.

Se estudiaron dos variables para mejorar las recuperaciones, mediante un diseño experimental multivariado. Ellos fueron la concentración de ácido nítrico y el tiempo de contacto de la sonda de ultrasonido con la muestra. Como una variable secundaria que tiene también influencia, cada tratamiento ensayado generó un aumento de temperatura inherente al sistema. Este aumento de temperatura no es una variable controlable, depende del tiempo de sonicado y de la concentración de ácido nítrico.

Se planteó entonces, un diseño experimental central compuesto de 5 niveles y 2 variables, en la Tabla 5.8 se muestra las condiciones de este y la temperatura final de cada tratamiento probado. Los efectos del tratamiento sobre los tejidos vegetales fueron producto de la cavitación, la concentración del ácido y la penetración de este reactivo en los tejidos y el aumento de la temperatura.

Tabla 5. 8-Diseño central compuesto (adaptado Massart et al., 1997)

Experimento (n=1)	HNO ₃ (mol L ⁻¹)	Tiempo (min)
1	2.5	5
2	2	10
3	3	10
4	1	15
5	2.5	15
6	3.5	15
7	3	20
8	2	20
9	2.5	20

Para la optimización de Cd y As se utilizó MRC de hojas de tomate NIST 1573a, y para caso del Pb se realizó el diseño utilizando una muestra de lechuga que tenía resultados cuantificables de Pb obtenidos mediante el método A. Para encontrar las condiciones óptimas se tomó en cuenta, como respuesta en el diseño experimental, el % recuperación (%R) respecto al valor certificado o al valor cuantificado en el método A para el caso del Pb. En la tabla 5.8 se resumen los resultados obtenidos, para cada uno de los analitos.

Tabla 5. 9-Resultados de diseño experimental

Experiment	Cd (%R)	As (%R)	Pb (R%)
1	95 ± 4	8.9±4.2	63 ± 4
2	54 ± 6	86±7	94 ± 3
3	50 ± 3	51±1	108 ± 2
4	66 ± 4	32±5	125 ± 2
5	81 ± 3	59±1	112 ± 5
6	64 ± 4	19±2	74 ± 4
7	60 ± 3	80±7	55 ± 10
8	59 ± 3	99±6	154 ± 5
9	72 ± 7	-4.9±5	51 ± 4

Si analizamos los resultados obtenidos antes de evaluar las superficies de respuesta podemos ver que, en el caso del As se obtiene un valor de 8.9 % de recuperación y otro de -4.9, el primero puede estar asociado a que el tiempo de contacto con la sonda no fue suficiente (5 minutos) para romper las células y poder pasar el elemento al medio de extracción. Con respecto al valor de -4.9, se cree puede haber sido algún error experimental y no atribuible a alguna de las variables que se estudiaron.

En el caso del Pb se obtiene en el experimento 8 un valor de 154% de recuperación, fuera de las especificaciones que se manejan para este tipo de

muestras y analitos. Esto pudo deberse también a un error analítico, o contaminación, dado que se preparó solo una muestra.

Con los resultados obtenidos se realizaron las superficies de respuesta que se presentan a continuación. Se utilizó para esta representación el software Minitab Statistical Software.

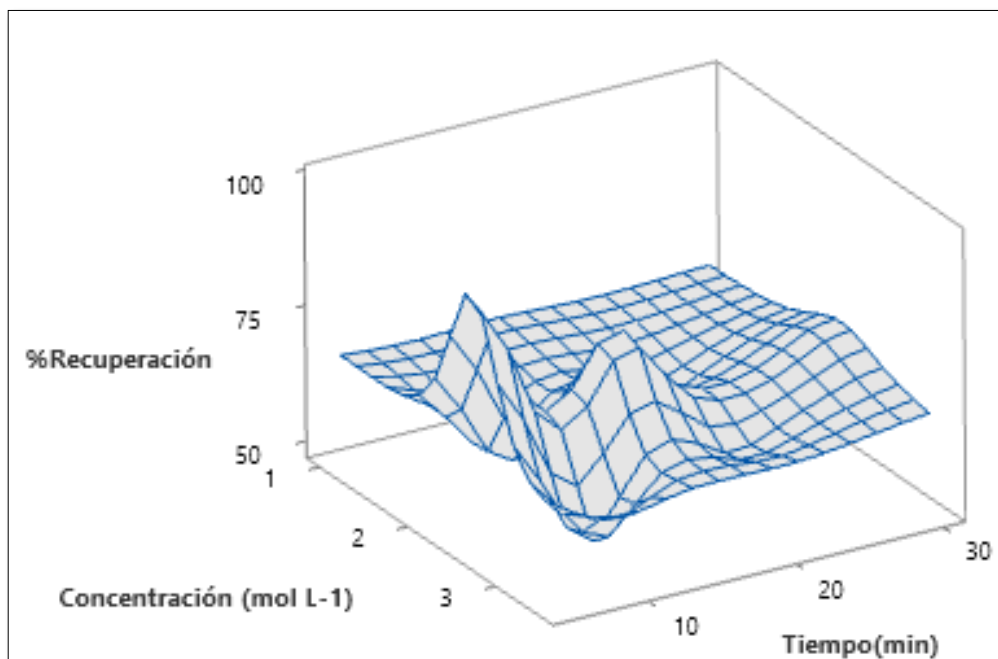


Figura 5. 12-Superficie de respuesta para Cd

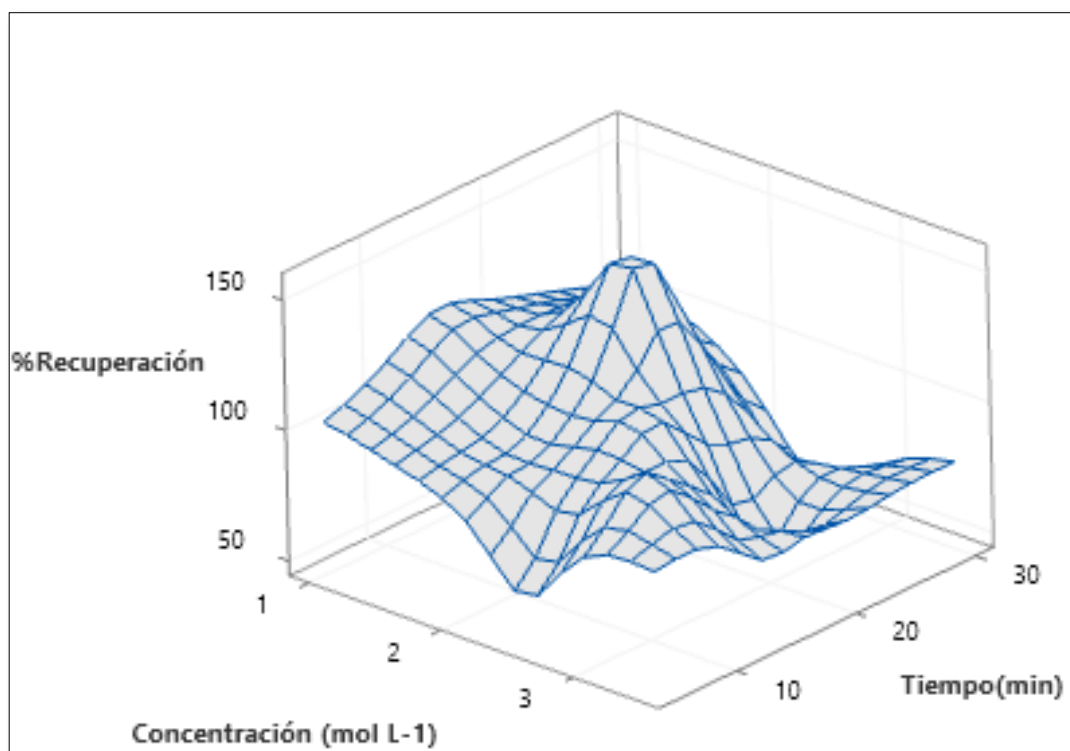


Figura 5. 13-Superficie de respuesta para Pb

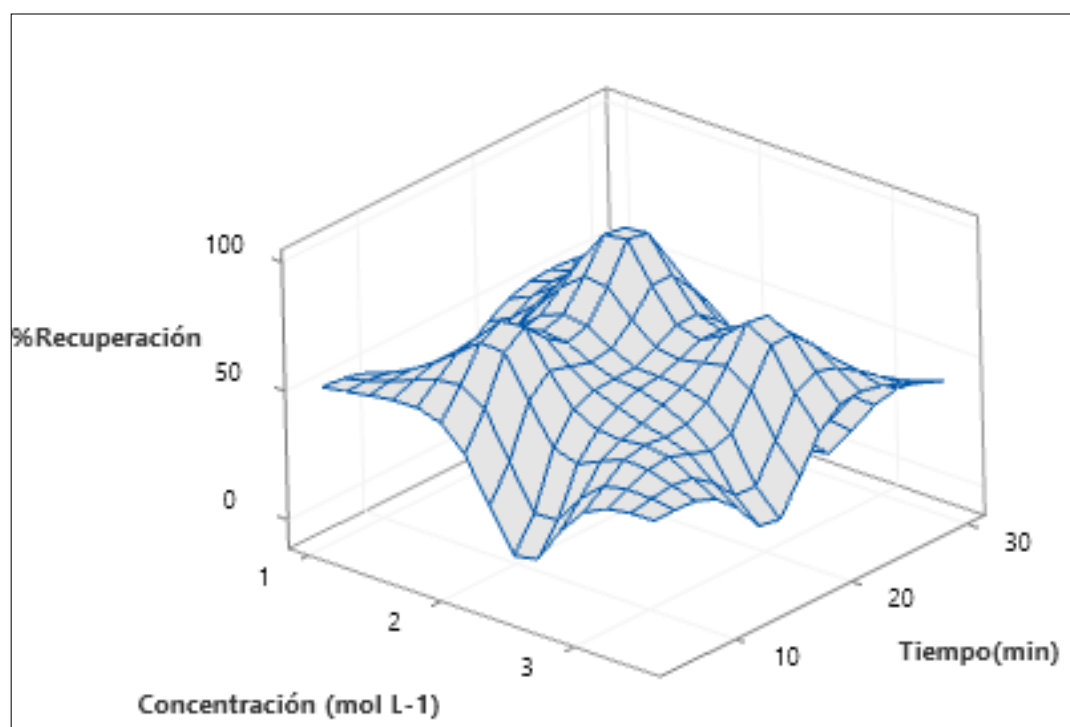


Figura 5. 14-Superficie de respuesta para As

Según las superficies de respuesta, obtenidas a partir de los diseños experimentales, se pudo determinar las condiciones óptimas para cada elemento, a partir del máximo de cada una (%R más cercano a 100). En base a esto fue posible

establecer las condiciones de un único tratamiento de forma de obtener un compromiso entre las cifras de mérito y la simplicidad para determinar los tres analitos a partir de un único extracto. Estas condiciones fueron: concentración de ácido nítrico $2,5 \text{ ml L}^{-1}$ y tiempo de sonicado de 15 minutos. Además, la extracción se realizó en un medio ácido más diluido que la digestión con microondas (la mitad de concentración) por lo cual se trata de un método aún más verde que el primero, y más simple.

En este método se analiza de a una muestra por vez, lo cual puede considerarse una desventaja en relación con el tiempo total de análisis, además de los riesgos inherentes de una posible contaminación cruzada. Sin embargo, a pesar de poder realizar digestiones en hornos de microondas simultáneas, hay un tiempo del operador dedicado al trasvase cuantitativo de cada muestra y llevar a un volumen final.

5.2.5 Microscopía Confocal

Se contaba en el grupo con experiencia previa de caracterización físico-química de los residuos remanentes luego de la extracción asistida con ultrasonido, observando mediante microscopía confocal los posibles efectos sobre tejidos vegetales de este tipo de tratamiento (Machado et al., 2019).

De esta forma se obtuvo información complementaria observando en este caso los residuos obtenidos luego de la realización del diseño experimental para la optimización del método. Los 9 residuos, luego de centrifugar, se secaron en estufa y se procedió a las observaciones mediante microscopía Confocal. Estas imágenes fueron obtenidas por el Prof. Ricardo Faccio (Centro NanoMat, Facultad de Química).

Las Figuras 5.15 fueron seleccionadas como las imágenes más representativas para discutir. Se eligieron los experimentos donde varió el tiempo de sonicado y se mantuvo la misma concentración de ácido nítrico ($2,5 \text{ mol L}^{-1}$).

Se puede observar que el tratamiento con ultrasonido produjo pérdida de la estructura fibrosa comparando con la muestra control. El efecto no es demasiado drástico con 5 minutos, mientras que a los 15 minutos los efectos que se observaron más significativos. Al aumentar el tiempo se pudo evidenciar mayor daño al tejido vegetal observando efectos de erosión y abrasión sobre la superficie.

El tiempo óptimo fue 15 minutos, los resultados mostraron ser precisos y veraces. Como reportan Petigny et al., existe un tiempo en estos procesos que permite al medio extractante acceder al sustrato luego de una suficiente erosión y abrasión de la superficie, esto permite el pasaje de los elementos de interés al extracto (Petigny et al., 2013). Luego de 20 minutos de sonicado la superficie ya es lisa mostrando destexturización otro efecto también conocido provocado por la cavitación.

De esta forma, mediante las imágenes, se obtuvo información complementaria que concuerda con lo reportado en la literatura sobre los efectos de las ondas de ultrasonido sobre los tejidos, a este efecto ha de sumarse el uso de un ácido como extractante y el aumento de temperatura del medio de reacción.

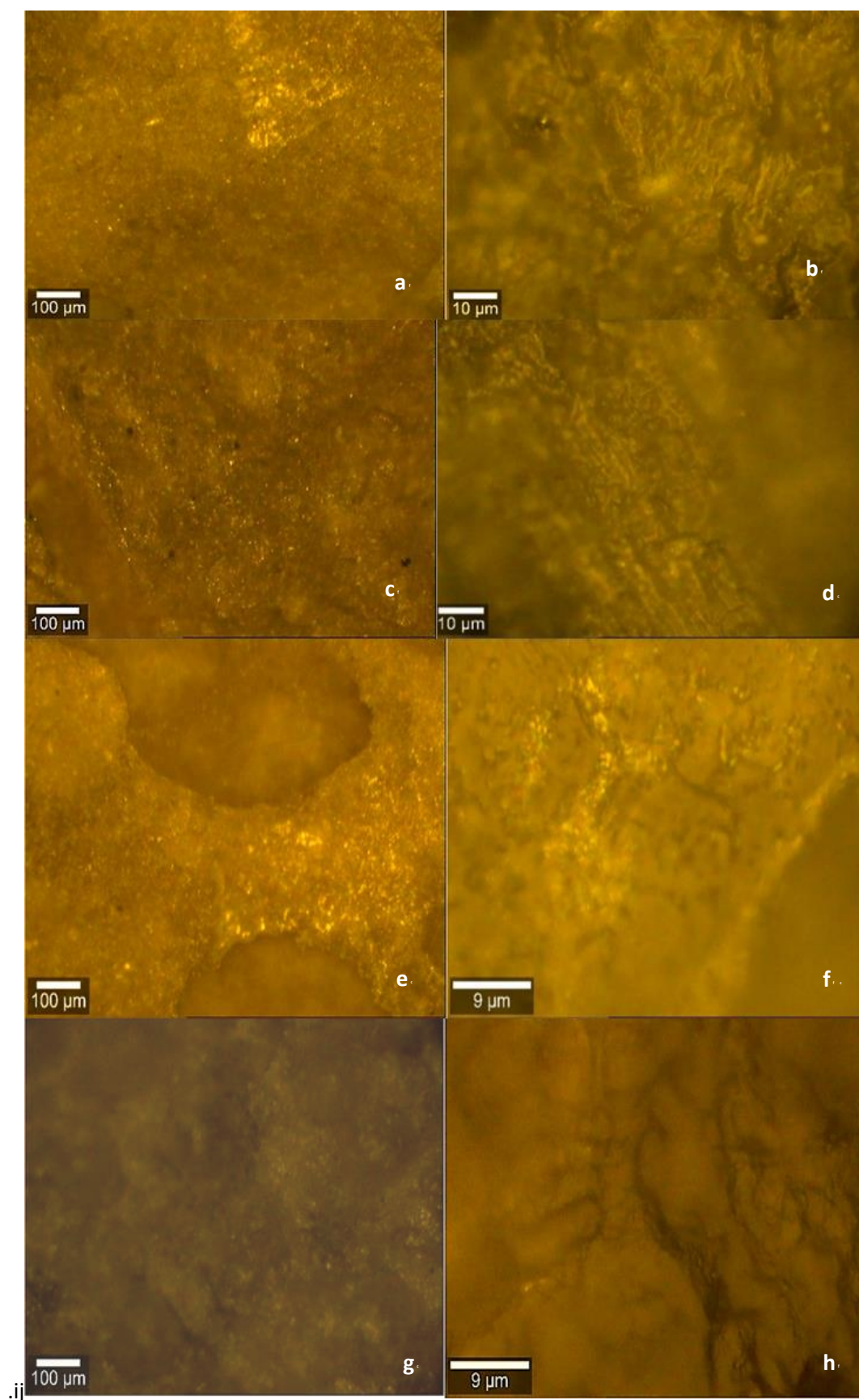


Figura 5. 15-Imágenes confocales de residuos de MRC (NIST 1570a) sin tratamiento -control- (a, b); luego de 5-min de sonicated (c, d); luego de 15-min de sonicated (e, f) y luego de 20-min de sonicated (g, h). Las barras de la escala son 100 and 10 μm , respectivamente. Concentración de HNO_3 2.5 mol L^{-1}

5.2.5 Validación

Siguiendo los mismos lineamientos que se habían mantenido para el trabajo con la digestión asistida por microondas, luego de desarrollado y optimizado el método de extracción y también de las determinaciones analíticas, se llevó a cabo la validación.

Se determinaron los principales parámetros de desempeño del método (linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y veracidad) tal como se determinaron para el método A, siguiendo las recomendaciones de la Guía Europea de validación Eurachem (Magnusson, et al., 2014).

Se utilizaron muestras blancos (muestras correspondientes a operadores que no cuantificaban para los analitos en estudio) para determinar **LD y LQ**, estas muestras habían sido analizadas previamente por el método A. Para realizar esta determinación se sometieron al tratamiento con la sonda de ultrasonido diez muestras para cada matriz según lo sugiere la Guía Europea de validación Eurachem (Magnusson, et al., 2014).

La **precisión** como precisión intermedia expresada como DER (%) (desviación estándar relativa porcentual) fue estudiada utilizando los MRC. También se utilizaron muestras de operadores que cuantificaban alguno de los elementos. Para el caso de muestras que no cuantificaban, se evaluó la precisión fortificando con una concentración conocida de analito (límite máximo admitido para cada uno) en estudio a estas matrices blanco. Se obtuvieron valores menores al 10% de DER, para para todos los elementos en las cuatro matrices de trabajo. De esta forma se evaluó la precisión, utilizando dos formas aceptadas por las guías de validación internacionales, el uso de materiales de referencia certificados y el uso de muestras reales adicionadas con cantidades conocidas de analito (Magnusson, et al., 2014).

La evaluación de la **veracidad** se realizó analizando dos MRC: hojas de espinaca (NIST 1570a) y hojas de tomate (NIST 1573a). También se evaluó la recuperación sobre muestras reales fortificadas con cantidades exactamente conocidas de analito (límite máximo admitido para cada uno). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 5.10

Tabla 5. 10-Resultados de validación

	Límite de detección ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Límite de cuantificación ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Veracidad % Recuperación (**)	Precisión (Repetibilidad) RSD % (n=6)
Pb	0,7 ^{a b} 1,2 ^c 0,4 ^d	2,1 ^{a b} 4,1 ^c 1,4 ^d	(5,8-40) ^a (4,9-40) ^b (9,2-40) ^c (3,0-40) ^d	97 $\pm$ 10 ^{(*) a b c d}	5,3 ^a 3,4 ^b 7,1 ^c 6,4 ^d
Cd	0,07 ^a 0,3 ^b 0,2 ^{c d}	0,2 ^a 1,0 ^b 0,6 ^c 0,7 ^d	(1,6-4) ^a (2,3-4) ^b (1,3-4) ^c (1,4-4) ^d	112 $\pm$ 8 ^{(*) a b c d}	9,3 ^a 15 ^b 6,2 ^c 12 ^d
As	1,9 ^a 2,5 ^b 4,1 ^c 3,3 ^d	6,3 ^a 8,3 ^b 14 ^c 11 ^d	(4,4-100) ^{abcd}	87 $\pm$ 7 ^{(2*) a b}	7,2 ^a 2,4 ^b 8,5 ^c 8,5 ^d

^a lechuga, ^b tomate, ^c manzana, ^d zanahoria

(1*)Material de referencia certificado de hojas de espinaca NIST 1570a

(2*)Material de referencia certificado de hojas de tomate NIST 1573a

(**) Promedio $\pm$ desviación estándar (n = 6)

LD y LQ en base húmeda

Se realizó una prueba t de Student, para los resultados obtenidos para las concentraciones obtenidas de As, Cd y Pb en los materiales de referencia certificados. Todos los valores experimentales de t se encontraron por debajo del valor teórico t (0,05, 5) = 2,57 en la Tabla 5.11 se muestran los t experimentales para cada elemento.

Por lo tanto, a un nivel de significancia del 95%, las concentraciones obtenidas utilizando los métodos desarrollados no difieren significativamente de los respectivos valores certificados, con lo cual se garantiza la veracidad de los métodos.

Tabla 5. 11- *t* de Student experimentales

Analito	<i>t</i> experimental
Pb	-0.72
Cd	2.40
As	-3.95

Los parámetros de desempeño resultaron adecuados para el fin propuesto de monitoreo, con un único método de preparación de muestras para todas las matrices, resultado una alternativa menos costosa y más alineada a los principios de la química verde que el método A.

Además, los resultados son comparables con los obtenidos en el método considerado de referencia (método A), incluso se logró mejorar la repetibilidad para los tres elementos en las cuatro matrices. Esto es razonable debido a que el trasvase cuantitativo cuando se trabaja con digestiones con microondas es crítico.

Se obtuvieron límites de detección y cuantificación para los tres analitos muy por debajo de los límites máximos admitidos en la reglamentación vigente. Además, estos valores están por debajo de los que se establecen en los métodos oficiales de análisis AOAC, como criterios para considerar que un método analítico es apto para el fin propuesto (Latimer, 2016). Se destaca también que los límites de cuantificación obtenidos son 10 veces menores que los obtenidos por el método A. Todo esto permite afirmar que el método desarrollado no solo es apto para implementarlo en un análisis de rutina, para el monitoreo de inocuidad alimentaria desde el punto de vista de estos contaminantes, sino que brinda más información para vigilancia sanitaria al tener límites más bajos. Resultando también más accesible en equipamiento, con reducción de tiempos de análisis y consumo de energía, y generando menos residuos peligrosos para el operario y el medioambiente.

5.2.6 Análisis de muestras seleccionadas y comparación de métodos

Una vez validado el método se realizaron las determinaciones de As, Cd y Pb en las mismas muestras de lechuga, manzana, tomate y zanahoria, provenientes del proyecto INNOVAGRO, que habían sido analizadas por el método A.

Para poder establecer si ambos métodos arrojaban resultados comparables estadísticamente, se realizó la prueba t de Student, para los resultados obtenidos a partir de las determinaciones con resultados cuantificables, todos los valores experimentales de t se encontraron por debajo del valor teórico $t_{(0,05,2)} = 4,30$, lo que permitió asegurar que a un nivel de significancia del 95%, las concentraciones obtenidas utilizando ambos métodos desarrollados no difieren significativamente.

Se analizaron un total de 8 muestras, provenientes de diferentes productores, todas por triplicado. Las muestras que no cuantificaban, se obtuvieron en ambos métodos resultados comparables ya sea por debajo del límite de cuantificación o detección respectivamente. En la Tabla 5-12 se muestran los resultados de la comparación.

Tabla 5. 12-Comparación de resultados

Matriz	Promedio $\pm$ desviación estándar- Método A (n=3) (mg kg ⁻¹)	Promedio $\pm$ desviación estándar- Método B (n=3) (mg kg ⁻¹)	t experimental
Lechuga	0,0187 $\pm$ 0,0022 ^a	0,0125 $\pm$ 0,0020 ^a	4.38
	0,0017 $\pm$ 0,0001 ^b	0,0017 $\pm$ 0,0002 ^b	-0.11
	0,0301 $\pm$ 0,0022 ^a	0,0350 $\pm$ 0,0020 ^a	2.5
	0,0041 $\pm$ 0,0001 ^b	0,0047 $\pm$ 0,0005 ^b	-0.64
	0,044 $\pm$ 0,0022 ^a	0,048 $\pm$ 0,0023 ^a	1.92
	0,0029 $\pm$ 0,0006 ^b	0,0021 $\pm$ 0,0005 ^b	1.99
Zanahoria	<0,0031 ^a	<0,0040 ^a	--
	<0,0073 ^b	<0,0073 ^b	
Tomate	<0,0062 ^a	<0,0021 ^a	--
	<0,0020 ^b	<0,0010 ^b	--
	<0,0062 ^a	<0,0021 ^a	--
	<0,0020 ^b	<0,0010 ^b	--
Manzana	0,0167 $\pm$ 0,0029 ^a	0,0191 $\pm$ 0,0042 ^a	-0.45
	0,0059 $\pm$ 0,0005 ^b	0,0051 $\pm$ 0,0006 ^b	2.19
	0,0441 $\pm$ 0,0019 ^a	0,0401 $\pm$ 0,023 ^a	1.00
	<0,0042 ^b	<0,0060 ^b	--

^a Plomo ^b Cadmio. Se informa (promedio $\pm$ desviación estándar) mg kg⁻¹, base húmeda (n=3)

Los resultados de la comparación mostraron que, si bien ambos métodos proporcionan resultandos equivalentes, el método B tiene ventajas respecto al A y podría ser propuesto con un método de análisis confiable. La principal desventaja sería el tratamiento de a una muestra por vez si se cuenta con una única sonda. Aun

así, fue un desarrollo novedoso y exitoso en el marco de este trabajo de tesis en la disciplina Química Analítica.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y

PERSPECTIVAS

6.1 Conclusiones

Los objetivos del trabajo se han cumplido exitosamente. Los resultados obtenidos se han difundido en publicaciones científicas y en varios eventos científicos del área de investigación.

Se logró desarrollar una metodología analítica que permite la determinación de As, Cd y Pb en cuatro diferentes matrices vegetales mediante un tratamiento de muestra único, que es más amigable con el ambiente comparado con los métodos clásicos. Los mismos cumplen con todas las especificaciones de desempeño requeridas según normas internacionales de validación (AOAC).

En relación con la generación de nuevo conocimiento en la disciplina Química Analítica, se logró desarrollar un método de preparación de las muestras asistido con ondas de ultrasonido simple, rápido y amigable con el medio ambiente.

Se validó la determinación de arsénico mediante una técnica poco utilizada para análisis de rutina como ser HG-MIP OES, la cual resultó eficiente para los fines propuestos y con parámetros de desempeño comparables a otras técnicas de espectrometría atómica ampliamente utilizadas, pero más costosas.

Todas las muestras analizadas en el marco del proyecto cumplieron con los criterios establecidos en la reglamentación vigente (MERCOSUR/GMC/RES. N° 12/11).

No se conoce si los niveles de estos elementos, aun cumpliendo con los requisitos de la normativa, no pudieran representar algún riesgo a largo plazo. Los métodos propuestos pueden postularse como alternativas para el monitoreo de la inocuidad alimentaria de estos cultivos, desde el punto de vista del cumplimiento con las normativas y para control de los niveles de estos contaminantes para estudios toxicológicos futuros.

Se ha logrado poner a disposición una plataforma analítica, que es fundamental para el sector productivo y para organismos de contralor, ya que es posible detectar y cuantificar concentraciones muy por debajo de los límites máximos permitidos.

6.2 Perspectivas

Dado los buenos resultados obtenidos, se plantea la ampliación de dicha validación a otras matrices de origen vegetal, para la determinación de elementos potencialmente tóxicos en concentraciones traza. Este monitoreo es importante no solo a nivel de la industria alimenticia, sino farmacéutica, ya que hoy es un requerimiento la cuantificación de elementos inorgánicos potencialmente tóxicos, en materiales vegetales (principalmente herbales) que contienen principios activos utilizados en la industria farmacéutica.

También sería interesante comparar el uso de sonda de ultrasonido y baño de ultrasonido. Esto no se realizó debido a que se llegó al final de los plazos establecidos para este trabajo con un desarrollo exitoso lo cual se consideró suficiente para el trabajo de Maestría. Se podrá continuar explorando si el uso de un baño de ultrasonido permitiría realizar varios tratamientos a la vez. Por otra parte, la energía y la frecuencia a la que opera un baño de ultrasonido son diferentes (menor potencia y mayor frecuencia) por lo cual habría que verificar la eficacia de las extracciones con una estrategia metodológica similar a la llevada adelante en la tesis.

También se podría explorar la eficacia de la extracción de oligoelementos tanto en estos productos como en otros para conocer sobre su composición y valor nutricional.

REFERENCIAS

- Aberoumand, A., & Deokule, S. S. (2009). Determination of Elements Profile of Some Wild Edible Plants. *Food Analytical Methods*, 2(2), 116-119. <https://doi.org/10.1007/s12161-008-9038-z>
- Akinyele, I. O., & Shokunbi, O. S. (2015). Comparative analysis of dry ashing and wet digestion methods for the determination of trace and heavy metals in food samples. *Food Chemistry*, 173, 682-684. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.097>
- Aleixo, P. C., Júnior, D. S., Tomazelli, A. C., Rufini, I. A., Berndt, H., & Krug, F. J. (2004). Cadmium and lead determination in foods by beam injection flame furnace atomic absorption spectrometry after ultrasound-assisted sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 512(2), 329-337. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.02.049>
- Allende, A., & Monaghan, J. (2015). Irrigation Water Quality for Leafy Crops: A Perspective of Risks and Potential Solutions. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(7), 7457-7477. <https://doi.org/10.3390/ijerph120707457>
- Altundag, H., & Tuzen, M. (2011). Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES. *Food and Chemical Toxicology*, 49(11), 2800-2807. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.07.064>
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Interaction profile for arsenic, cadmium, chromium and lead, (2004). <https://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/ip04.html>.
- Armenta, S., Garrigues, S., de la Guardia, M., & Esteve-Turrillas, F. A. (2018). Green Analytical Chemistry. En *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (p. B9780124095472140000). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13980-0>
- 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. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 31, 50-60. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.06.018>
- Burló, F., Guijarro, I., Carbonell-Barrachina, A. A., Valero, D., & Martínez-Sánchez, F. (1999). Arsenic Species: Effects on and Accumulation by Tomato Plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1247-1253. <https://doi.org/10.1021/jf9806560>
- Capelo, J. (2005). Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid-liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. *Ultrasonics Sonochemistry*, 12(3), 225-232. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2003.10.010>
- Codex Alimentarius Commission. JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME CODEX (2011), http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCCF/CCCF5/cf05_INF.pdf.
- Costa, B. E. dos S., Coelho, N. M. M., & Coelho, L. M. (2015). Determination of arsenic species in rice samples using CPE and ETAAS. *Food Chemistry*, 178, 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.014>
- Dirección Nacional de Estadísticas Agropecuarias (DIEA). Dponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/tematica/diea> (consultada en diciembre de 2020)

- Evans, E. H., Pisonero, J., Smith, C. M. M., & Taylor, R. N. (2019). Atomic spectrometry update: Review of advances in atomic spectrometry and related techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 34(5), 803-822. <https://doi.org/10.1039/C9JA90018G>
- FAO, WHO, Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Contaminants in Foods, Food CF/5 INF/1. Fifth Session, The Hague, The Netherlands, (2011). Disponible en : www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCCC/CCCCF5/cf05_INF.pdf.
- Giacomelli, M. B. O., Lima, M. C., & Stupp, V. (2002). Determination of As, Cd, Pb and Se in DORM-1 dogfish muscle reference material using alkaline solubilization and electrothermal atomic absorption spectrometry with IrqRh as permanent modifiers or PdMg in solution. 7.
- Inczédy, J., Lengyel, T., Ure, A.M. (1998). International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Analytical Nomenclature. Definitive Rules 1997. 3aEd, Oxford: IUPAC-Blackwell Science.
- Islam, Md. S., Ahmed, Md. K., Habibullah-Al-Mamun, Md., Raknuzzaman, M., Ali, M. M., & Eaton, D. W. (2016). Health risk assessment due to heavy metal exposure from commonly consumed fish and vegetables. *Environment Systems and Decisions*, 36(3), 253-265. <https://doi.org/10.1007/s10669-016-9592-7>
- ISO 17034:2016. Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui#iso:std:iso:17034:ed-1:v1:es>
- Joint Committee for Guides in Metrology. (2008). International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM) 3rd edition. Disponible en: www.bipm.org/en/publications/guides/gum.html
- Krug, F.J. Ed.(2008) Métodos de preparo de amostras. fundamentos sobre preparo de amostras orgánicas e inorgánicas para análise elementar. 1º Edición, Piracicaba.
- Lasat, M. M. (1999). Phytoextraction of Metals from Contaminated Soil: A Review of Plant/Soil/Metal Interaction and Assessment of Pertinent Agronomic Issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, 2(1). <https://doi.org/10.4148/1090-7025.1015>
- Lasat, Mitch M. (2002). Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms. *J. ENVIRON. QUAL.*, 31, 12.
- Latimer Jr, G.W. (Editor), (2016). Official Methods of Analysis of AOAC International. 20 th Edition. Maryland: AOAC International. ISBN 0-935584-87-0.
- Machado, I., Dol, I., Rodríguez-Arce, E., Cesio, M. V., & Pistón, M. (2016). Comparison of different sample treatments for the determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*). *Microchemical Journal*, 128, 128-133. <https://doi.org/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, 104752. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104752>
- Magnusson, B. y Örnemark, U., (2014). Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Segunda Edición. ISBN: 978-91-87461-59-0
- Mañay, N., Pistón, M., Cáceres, M., Pizzorno, P., & Bühl, V. (2019). An overview of environmental arsenic issues and exposure risks in Uruguay. *Science of The Total Environment*, 686, 590-598. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.443>

- Mañay, N., Goso, C., Pistón, M., Fernández-Turiel, J.L., García-Vallés, M., Rejas, M. y Guerequiz, R. (2013). Groundwater arsenic content in Raigón Aquifer system (San José, Uruguay). *Revista de la Sociedad Uruguaya de Geología*, 18, pp 20-38.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., De Jong, S., Lewi, P.J., SmeyersVerbeke, J. (1997). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A, Data Handling in Science and Technology Volume 20A*, Elsevier Science, Amsterdam.
- Matusiewicz, H., & Ślachciński, M. (2010). Method development for simultaneous multi-element determination of hydride forming elements (As, Bi, Ge, Sb, Se, Sn) and Hg by microwave induced plasma-optical emission spectrometry using integrated continuous-microflow ultrasonic nebulizer-hydride generator sample introduction system. *Microchemical Journal*, 95(2), 213-221. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2009.12.004>
- McLaughlin, M. J., Maier, N. A., Freeman, K., Tiller, K. G., Williams, C. M. J., & Smart, M. K. (1995). Effect of potassic and phosphatic fertilizer type, fertilizer Cd concentration and zinc rate on cadmium uptake by potatoes. *Fertilizer Research*, 40(1), 63-70. <https://doi.org/10.1007/BF00749863>
- Miller, J.N., Miller, J.C. (1993) *Estadística para Química Analítica*, Segunda Edición, Addison-Wesley Iberoamerican S.A., Wilmington.
- Miller, J.N., Miller, J.C. (2005) *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Fifth Edition, Pearson, Essex.
- Mirowski, J., & Paukzto, A. (2018). Determination of the Cadmium, Chromium, Nickel, and Lead Ions Relays in Selected Polish Medicinal Plants and Their Infusion. *Biological Trace Element Research*, 182(1), 147-151. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1072-5>
- National Institute of Standards and Technology. Disponible en: <https://www.nist.gov>
- Nóbrega, J. A., Trevizan, L. C., Araújo, G. C. L., & Nogueira, A. R. A. (2002). Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 57(12), 1855-1876. [https://doi.org/10.1016/S0584-8547\(02\)00172-6](https://doi.org/10.1016/S0584-8547(02)00172-6)
- Pereira, M., Tissot, F., Faccio, R., Ibáñez, F., & Pistón, M. (2021). A simple and economical ultrasound-assisted method for Cd and Pb extraction from fruits and vegetables for food safety assurance. *Results in Chemistry*, 3, 100089. <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2020.100089>
- Petigny, L., Périno-Issartier, S., Wajsman, J., & Chemat, F. (2013). Batch and Continuous Ultrasound Assisted Extraction of Boldo Leaves (*Peumus boldus* Mol.). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 5750-5764. <https://doi.org/10.3390/ijms14035750>
- Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2004). Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(9), 644-653. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.06.006>
- Reglamento Técnico Mercosur MERCOSUR/GMC/RES. N° 12/11. [En línea]. [Consulta: 22 de enero de 2021]. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos-internacional/14-2013/1>.
- Rehman, Z. U., Khan, S., Brusseau, M. L., & Shah, M. T. (2017). Lead and cadmium contamination and exposure risk assessment via consumption of vegetables grown in agricultural soils of five-selected regions of Pakistan. *Chemosphere*, 168, 1589-1596. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.11.152>

- Rehman, Z. U., Khan, S., Qin, K., Brusseau, M. L., Shah, M. T., & Din, I. (2016). Quantification of inorganic arsenic exposure and cancer risk via consumption of vegetables in southern selected districts of Pakistan. *Science of The Total Environment*, 550, 321-329. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.094>
- Rincon Cardona, J. A., Huck, C., & Lidia, M. (2013). Applications of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) in Foods. En N. Lagali (Ed.), *Confocal Laser Microscopy—Principles and Applications in Medicine, Biology, and the Food Sciences*. InTech. <https://doi.org/10.5772/55653>
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R.(2008) *Principios de Análisis Instrumental*, Sexta Edición, Cengage Learning Editores, México D.F.
- Welz, B., Sperling, M.(1999). *Atomic Absorption Spectrometry*. 3th Edition. Alemania: Wiley-VCH. ISBN 3-257-28571-7.
- Williams, C. B., Amais, R. S., Fontoura, B. M., Jones, B. T., Nóbrega, J. A., & Donati, G. L. (2019). Recent developments in microwave-induced plasma optical emission spectrometry and applications of a commercial Hammer-cavity instrument. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, 151-157. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.007>
- Zoppolo, R., Faroppa, S., Bellenda, B., García, M. (2008). *ALIMENTOS EN LA HUERTA GUÍA PARA LA PRODUCCIÓN Y CONSUMO SALUDABLE*. INIA - OPS – UDELAR. ISBN: 978-9974-38-262-6

Anexo I- Publicaciones y presentaciones

A simple and economical ultrasound-assisted method for Cd and Pb extraction from fruits and vegetables for food safety assurance. Mónica Pereira, Florencia Tissot, Ricardo Faccio, Facundo Ibáñez, and Mariela Pistón. *Results in Chemistry*, 2021, 3. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rechem.2020.100089>

Tissot F., Pereira M., Ibáñez F., Dini S., Pistón M. Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de Cd, Pb y As en frutas y hortalizas como una alternativa a los métodos estándar de análisis. *INNOTEC 2020*, No. 19 (52 - 63) DOI: <https://doi.org/10.12461/19.01>

Desarrollo de un método analítico asistido con ondas de ultrasonido para la extracción y determinación de cadmio en lechuga. Pereira M., Ibáñez F., Dini S., Tissot F., Pistón M. *Sexto Encuentro Nacional de Química*, Montevideo 16 al 18 de octubre de 2019. Presentado en modalidad de e-póster.

Determination of total arsenic in vegetables using hydride generation-microwave induced nitrogen plasma atomic emission spectrometry (HG-MIPOES). Tissot F., Pereira M., Machado I., Dini S., Bühl V., Belluzzi M., Ibáñez F., Pistón M. *15 th Rio Symposium on Atomic Spectrometry*, Mendoza 6 al 11 de octubre de 2019. Presentado en modalidad de e-póster.

Desarrollo de una metodología para monitoreo de la inocuidad de frutas y hortalizas desde el punto de vista de contaminantes. Pereira M., Ibáñez F., Dini S., Tissot F., Pistón M. *Noveno Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos*, Montevideo 2 al 4 de octubre de 2019. Presentado en modalidad de e-póster.

Desarrollo de un método analítico asistido con ondas de ultrasonido para la extracción y determinación de cadmio en lechuga

Mónica Pereira¹, Facundo Ibáñez², Sebastián Dini², Florencia Tissot¹ y Mariela Pistón¹

¹Grupo de Análisis de Elementos traza y desarrollo de estrategias simples para preparación de muestras (GATPREM). Área Química Analítica – DEC- Facultad de Química. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay; ² Agroalimentos INIA, Estación Experimental Las Brujas, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Canelones, Uruguay
mocepebe@hotmail.com

La inocuidad de los alimentos, fundamental para la salud y factor muy relevante en la comercialización de éstos, engloba diferentes acciones con el objetivo de garantizar la máxima seguridad posible al consumirlos. En este sentido la acumulación de metales potencialmente tóxicos debe ser controlado, en particular en aquellos que se consumen crudos. El Reglamento técnico MERCOSUR vigente (MERCOSUR/GMC/RES. N° 12/11) establece un límite máximo de cadmio de 0,2 mg kg⁻¹.

Con el objetivo de desarrollar una metodología alternativa a los métodos estándar (poco amigables con el ambiente y con condiciones drásticas de preparación de las muestras) se desarrolló un procedimiento rápido y confiable de extracción de cadmio en un alimento de alto consumo y su posterior determinación, incorporando el uso de ondas de ultrasonido. El ultrasonido es una energía limpia y eficiente, teniendo la ventaja de que la energía empleada facilita y acelera procesos tales como disolución, fusión y lixiviación.

El método validado se aplicó para la extracción de cadmio en muestras de lechuga obtenidas en el Mercado Modelo de Montevideo. Brevemente, el procedimiento implica que a 0,5 g de muestra seca y tamizada se le agrega 20 mL de HNO₃ 4,7 mol L⁻¹ y dentro de esta suspensión se introduce una sonda de ultrasonido (punta de 13 mm de diámetro, 20 kHz, 500 W) durante 15 minutos. Posteriormente se centrifuga a 3500 rpm y en el sobrenadante se realiza la determinación de Cd mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electroterma (ETAAS) agregando 20 µL de Pd (500 mgL⁻¹) como modificador de matriz. En estas condiciones el límite de detección fue de 0,0009 mg kg⁻¹ y el de cuantificación 0,0031 mg kg⁻¹, con una precisión 9,3%. La veracidad se evaluó analizando un material de referencia certificado de hojas de espinaca (NIST1570a) obteniéndose una recuperación media de 95 % (n=6). Se analizaron muestras de lechuga obteniéndose resultados desde menores al límite de cuantificación hasta 0,0047 mg kg⁻¹, lo cual está varios órdenes por debajo del límite máximo permitido, siendo estas muestras seguras para su consumo desde el punto de vista del contenido de este elemento. Los parámetros de desempeño de esta metodología indican que la misma es adecuada para los fines propuestos además resultó muy rápida y más amigable con el ambiente y puede ser extendida a otras matrices vegetales.

Agradecimientos: Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), FSA_I_2017_1_140199, Mercado Modelo por proveer de muestras y Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC).

POSTER PRESENTATIONS

DETERMINATION OF TOTAL ARSENIC IN VEGETABLES USING HYDRIDE GENERATION- MICROWAVE INDUCED NITROGEN PLASMA ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY (HG-MIPOES)

Florencia Tissot¹, Mónica Pereira¹, Ignacio Machado¹, Sebastián Dini², Valery Bühl¹, Marcelo Belluzzi¹, Facundo Ibáñez², Mariela Pistón¹.

¹Grupo de Análisis de Elementos traza y desarrollo de estrategias simples para preparación de muestras (GATPREM). Analytical Chemistry - Faculty of Chemistry. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

²Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Plataforma de Agroalimentos, Estación Experimental Las Brujas, Canelones, Uruguay

*ftissot@fq.edu.uy

Food safety is essential for public health and of great importance in the supply chain. It encompasses different actions with the objective of assuring safety for consumers. In this regard, the accumulation of potentially toxic elements such as arsenic (As) must be controlled. The current MERCOSUR Technical Regulation establishes maximum As limits between 0.1 - 0.3 mg kg⁻¹ for different vegetables. In order to efficiently monitoring this element, a reliable analytical methodology was developed and validated, involving a microwave assisted digestion using diluted acid and subsequent determination by HG-MIP OES. This work presents the use of HG-MIP OES as an economic alternative for the determination of total As in lettuce, tomato, carrot, onion, apple, strawberry, pepper and spinach.

Samples (0.5 g, dried and sieved) were treated by microwave assisted digestion (10 mL HNO₃, 4.7 mol L⁻¹). Analytical determinations were performed using an Agilent 4210 MIP OES spectrometer equipped with a standard torch and a multimode spray chamber for hydride generation (MSIS). The multichannel spray chamber was operated with one channel for the sample and the other for the reducing agent (NaBH₄, 2% (w/v) in NaOH 0.5 % (w/v)). The pre-reduction step was carried out with HCl 12 mol L⁻¹ and KI 20% (w/v) in the ratio: sample/standard (10): HCl (1): KI (1). The main figures of merit studied were linearity, precision, trueness, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ). The linear range was studied from 4.0 to 100 µg L⁻¹. Precision expressed as repeatability (n=6) was s_r(%) < 10. Trueness was assessed using certified reference materials (NIST 1573a tomato leaves and LGC7162 strawberry leaves) and by spiking assays, obtaining recoveries better than 85 % in all cases. LOD (3.3s) was 0.029 mg kg⁻¹ and LOQ (10s) was 0.089 mg kg⁻¹. Although HG-MIP OES it is not as sensitive as ETAAS, it is sufficient to carry out the monitoring of samples according to current regulations, being more economical and faster. All the analyzed samples presented As concentrations below the corresponding maximum limit.

Acknowledgements

Authors thank to Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), FSA_I_2017_1_140199, Mercado Modelo for providing samples and Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC).

DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA MONITOREO DE LA INOCUIDAD DE FRUTAS Y HORTALIZAS DESDE EL PUNTO DE VISTA DEL CONTENIDO DE CONTAMINANTES INORGÁNICOS.

PEREIRA, Mónica^{*1}; IBÁÑEZ, Facundo²; DINI, Sebastián²; TISSOT, Florencia¹; PISTÓN, Mariela¹

¹Grupo de Análisis de Elementos traza y desarrollo de estrategias simples para preparación de muestras (GATPREM). Área Química Analítica – DEC- Facultad de Química. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

² Agroalimentos INIA, Estación Experimental Las Brujas, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria. Canelones, Uruguay

*mocepebe@hotmail.com

La inocuidad de los alimentos engloba diferentes acciones con el objetivo de garantizar la máxima seguridad posible de los mismos, es fundamental para la salud pública y un factor muy relevante en la comercialización de los alimentos.

Casi la totalidad de las frutas y algunas hortalizas pueden ser consumidas sin necesidad de cocción como parte de la dieta, pero pueden contener contaminantes que llegan al producto en cualquier punto, desde su cultivo, cosecha, y hasta en la cadena de procesamiento que la lleva al consumidor final. En particular, la acumulación de metales y semi-metales potencialmente tóxicos en alimentos de consumo humano y animal son cruciales para definir el concepto de calidad del alimento. Las determinaciones analíticas de elementos como arsénico (As), cadmio (Cd), y plomo (Pb) en diversas matrices alimentarias han tomado gran relevancia para asegurar y monitorear la inocuidad de los alimentos.

Con el objetivo de monitorear los contaminantes inorgánicos antes mencionados de forma rápida, confiable y con métodos analíticos en acuerdo con las bases de Química

Verde, se desarrolló y validó una metodología para la extracción simultánea de As, Cd y Pb asistida con microondas, en un solo paso y utilizando ácidos diluidos. Se aplicó el método validado en cuatro productos: zanahoria, lechuga, manzana y tomate. La determinación de Cd y Pb se realizó mediante espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS), y As mediante una técnica novedosa con generación de hidruros acoplada a emisión atómica con plasma inducido por microondas (HG-MP-AES). Los parámetros de desempeño de esta metodología indican que la misma es adecuada para monitorear los referidos alimentos tomado como referencia los límites establecidos en el Reglamento técnico MERCOSUR vigente (MERCOSUR/GMC/RES. N° 12/11). Todas las muestras analizadas cumplieron con los criterios establecidos en la reglamentación.



A simple and economical ultrasound-assisted method for Cd and Pb extraction from fruits and vegetables for food safety assurance

Mónica Pereira^{a,b}, Florencia Tissot^a, Ricardo Faccio^c, Facundo Ibáñez^d, Mariela Pistón^{a,*}

^a Grupo de Análisis de Elementos Traza y Desarrollo de Estrategias Simples para Preparación de Muestras (GATPREM), Analytical Chemistry, DEC, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay

^b Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Gral. Flores 2124, Montevideo, Uruguay

^c Área Física and Centro NanoMat, DETEMA, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^d Plataforma de Agroalimentos INIA, Estación Experimental Las Brujas, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, Canelones, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:

Ultrasound-assisted extraction
Food safety
Confocal optical microscopy

ABSTRACT

Ultrasound-assisted extraction (UAE) methods for food analysis are recognized as being in accordance with the principles of green analytical chemistry (GAC). Reference standard methods generally use microwave-assisted extraction (MAE) for sample digestion; however, the use of ultrasonication processes has many advantages. Herein, a simple, and economical method for the determination of Cd and Pb in fruits and vegetables for food safety monitoring is reported. This method was optimized using a standard reference material (SRM, spinach leaves) through a multivariate experimental design (optimal conditions: 0.5 g of sample, 15 min of sonication, and 20.00 mL of 2.5 mol L⁻¹ HNO₃) and subsequently validated. The limits of detection obtained were one or two orders of magnitude lower than those achieved with MAE, making this a promising technique for contaminants monitoring. The UAE method was then tested on vegetable samples (apples, carrots, tomatoes, and lettuce) obtained from commercial sources in Uruguay and a comparison was made with samples treated by MAE. Both processes yielded comparable results, and the levels of Cd and Pb in all samples were below the maximum allowed concentration (MAC) established by the World Health Organization (WHO). In addition, to provide insight into the mechanism by which the ultrasonic process aids extraction, confocal optical images of the surface of the SRM were obtained. The leaves were examined after treatment at different sonication times (5–20 min). The confocal microscopy images show the effects of the ultrasonic treatment on the plant tissue, including desaturation, erosion, and abrasion, which increased with increasing sonication time. In conclusion, the UAE method meets and overcomes the requirements of a standard method for food safety assurance.

1. Introduction

Food safety is a matter of global concern, and policies and processes to ensure food safety must cover the entire food chain, from production to consumption. Safety is essential to ensure public health and is a crucial factor in commercial food production [1].

Fruits and vegetables are an important source of essential micronutrients, but there is growing concern about the accumulation of potentially toxic metals in these foods. Therefore, the monitoring of contaminants is crucial to assess health risks, and knowledge of the food composition is necessary to define food quality [2–4].

Cadmium reaches the soils and water via the indiscriminate use of phosphate fertilizers, which contain this element as a byproduct of their production. The accumulation of Cd-containing phosphate fertilizers in soils allows Cd to be absorbed by plants and, thus, incorporated into foods destined for human consumption [1,5]. Pb is naturally present in the environment. However, when there are high levels of Pb, this is typically a result of human activities. Cd and Pb are toxic metals, mainly affecting the kidneys and the cardiovascular and nervous systems of children and adults [6].

The increasing global awareness for food safety and contamination by chemicals related to human health and specially in low income

Abbreviations: UAE, ultrasound-assisted extraction; SRM, standard reference material; MAE, microwave-assisted extraction; GAC, green analytical chemistry; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification.

* Corresponding author.

E-mail address: mpiston@fq.edu.uy (M. Pistón).

<https://doi.org/10.1016/j.rechem.2020.100089>

Received 12 October 2020; Accepted 16 December 2020

countries leads to the development of new safe, reliable, and economical analytical methods.

Ultrasonic techniques have numerous applications for food processing [7–9]. Although many ultrasound-assisted extraction (UAE) analytical methods have been reported, these are not standard methods for food analysis, and, so far, they have not been included in any international compendia such as the AOAC [7–17].

UAE methods have numerous advantages over other widely used methods, such as microwave-assisted extraction (MAE), for the determination of the mineral composition of foodstuffs. UAE is simple and accurate, and the effect of UAE on food has been characterized, thus explaining the success of this technique [9–16]. Thus, sonochemistry and analytical chemistry are good partners for food composition analysis. In addition to the advantages of UAE mentioned above, it is important to increase awareness of analytical methods that are consistent with the principles of green analytical chemistry (GAC) [18–20]. Cairós et al. discussed the use of sonochemistry in analytical chemistry and stated, “the secret relies on the bubbles,” in reference to the powerful effects of cavitation in sonicated liquids [20].

A useful tool to understand the processes occurring when food is subjected to sonication under set conditions is confocal microscopy [9,21]. Optical confocal microscopy images provide fine details and better contrast than conventional microscopy [22].

In this study, optical confocal microscopy images of a standard reference material (SRM; in this case, spinach leaves) were obtained to observe the physical effects of acoustic cavitation over the surface of the vegetable matter.

Thus, a UAE analytical method for the determination of Cd and Pb in apples, carrots, lettuce, and tomatoes was developed and validated. These fruits and vegetables were selected considering that they can be eaten raw and its consumption may involve higher risks. Multivariate experiments were performed for optimization. The proposed UAE method meets the requirements established by the AOAC for standard methods for contaminant analysis. In addition, the UAE method has several advantages compared with the traditional MAE method.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Calibration curves were obtained using atomic absorption spectrometry. Solutions of appropriate dilution were prepared in ultrapure water using commercial standard solutions containing 1000 mg L⁻¹ of Cd and Pb (Merck, Darmstadt, Germany). Commercial solutions of palladium nitrate (Pd(NO₃)₂) (10,000 mg L⁻¹, Merck, Darmstadt, Germany) and ammonium phosphate monobasic (NH₄H₂PO₄) (5000 mg L⁻¹, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) were used to prepare chemical matrix modifiers for Cd and Pb determination. All glassware was soaked overnight in 10% v/v HNO₃ prepared from 67% w/w HNO₃ (Merck, Darmstadt, Germany) and then rinsed exhaustively with ultrapure water. Ultrapure water having a resistivity of 18.2 MΩ.cm (ASTM Type I) was obtained from a water purification system (Millipore DirectQ3 UV, Darmstadt, Germany). Other reagents used were all analytical grade.

2.2. Samples

Samples of fresh fruits and vegetables were obtained from the *Mercado Modelo*, the central municipal market in Montevideo, Uruguay. A random selection of five sellers was obtained following a protocol, established by the municipal safety authority, where each sample was representative of the total sale volume of the day. Sampling was carried out during the first hours of the market's working hours (6:00 to 10:00 AM) and the samples were sent to the laboratory and processed the same day.

The selected fruits and vegetables for this study were lettuce, tomatoes, carrots, and apples. In the case of lettuce, five units from different sellers were randomly selected to obtain several pools of lettuce samples. For apples, tomatoes, and carrots, samples of at least 1 kg of the fresh vegetables were obtained following the same randomization protocol. The samples were packed in virgin polyethylene bags, sealed, coded, and transported to the laboratory where they were quartered and sub-sampled in portions of 100–200 g. This was carried out on the same day as sampling. Then, the samples were cut with a ceramic knife on a plastic surface and dried in a forced circulation stove DN93 (Yamato, Tokyo, Japan) at 70 °C for 96 h. Once dried, they were processed in a hammer mill (Willey Model 4, Thomas Scientific, NJ, USA), sieved through 1-mm sieve, and kept in conical plastic tubes under low-humidity conditions until analysis.

A spinach leaf SRM (NIST 1570a, Gaithersburg, MD, USA) was used for the optimization and validation of the analytical method.

2.3. Sample preparation procedures

2.3.1. Proposed UAE method

An ultrasonic homogenizer (Sonics™ Vibracell, 750 W; 20 kHz; 230 VAC, USA) equipped with a 13-mm titanium alloy probe was used.

The sample preparation procedure was as follows: 0.5 g of dry powder was accurately weighed in a 50-mL polypropylene vessel and then, 20.00 mL of 2.5 mol L⁻¹ HNO₃ was added. The ultrasound probe was immersed in the mixture for 15 min at a sonication amplitude of 35%. Once the treatment had finished, the obtained suspension was centrifuged for 15 min at 28,000g, and the resulting supernatant was used for analysis. Each sample was analyzed in triplicate, and reagent blanks were also run.

2.3.2. MAE reference method for total digestion

For comparison of the proposed UAE method with a sample preparation procedure based on total digestion, microwave-assisted extraction (MAE) in acidic media was performed using the same samples. For this purpose, a microwave oven (CEM, Mars 6, North Carolina, USA) with 12-vessel capacity (Easy Prep Plus, North Carolina, USA) was employed. In this procedure, 0.5 g of the dry powder sample was accurately weighed in the microwave reaction vessels and then, 10.00 mL of 4.8 mol L⁻¹ HNO₃ was added [18]. The applied program was: 15-min ramp until 200 °C and then, 10 min at 200 °C. The power varied between 400 and 1800 W, and the maximum pressure was 500 psi. Finally, the samples were allowed to cool for 15 min. Once the digestion had completed, the obtained solutions were quantitatively transferred, and the samples were made up to a final volume of 20.00 mL with ultrapure water. These solutions were used for the analytical determination of Cd and Pb. All samples were analyzed in triplicate, and reagent blanks were also run.

2.4. Analytical determination

Analytical determination of Cd and Pb was achieved using electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) using a spectrometer with Zeeman background correction (Thermo Scientific iCE 3500, Cambridge, UK), a transversely heated graphite-tube furnace module (Thermo Scientific GFS35Z, Cambridge, UK), and an autosampler module (Thermo Scientific GFS33, Cambridge, UK). The analytical lines employed were 228.8 nm (Cd) and 283.3 nm (Pb), and the signal used for quantification was the integrated absorbance (peak area). Pyrolytically coated graphite tubes were provided by Thermo Scientific, and the purge and protective gas was argon (99.998%, Praxair, Uruguay). The graphite furnace heating programs used for the analytical determinations are presented in Table 1. The injection volume was 20 µL in all cases. The chemical matrix modifier used for Cd determination consisted of 10 µL of a solution containing 5 µg of Pd(NO₃)₂, whereas, for Pb, this was 10 µL of a solution containing 2.5 µg of Pd

Table 1

Experimental conditions. Temperature programs for Cd and Pb determinations by ETAAS.

Stage	Temperature (°C)	Hold time (s)	Ramp rate (°C s ⁻¹)
Drying	110 ^(Cd) /120 ^(Pb)	20 ^(Cd) / 35 ^(Pb)	10
Pyrolysis	800 ^(Cd) /900 ^(Pb)	20	150
Atomization	1200 ^{*(Cd)} /1800 ^{***(Cd)} /1200 ^{*(Pb)} / 1400 ^{***(Pb)}	3 ^(Cd) /4 ^(Pb)	0
Cleaning	2500	3	0

* Atomization temperature for the UAE method. ** Atomization temperature for the MAE method.

(NO₃)₂ and 25 µg of NH₄H₂PO₄. In all cases, the argon gas flow rate was 0.2 L min⁻¹ at all stages (except for atomization).

2.5. Optimization and validation

For the optimization of the proposed UAE method, several critical variables were evaluated. For this method, the most critical variables that influence the analyte extraction process are the concentration of the extractant (dilute nitric acid) and sonication time. The effects of these variables were studied by means of a multivariate experimental design. The optimal experimental conditions were obtained by means of a two-level central composite design in which the HNO₃ concentration (1–3.5 mol L⁻¹) and sonication time (5–20 min) were varied. The spinach leaf SRM (NIST 1570a) was selected for optimization and validation because of its similarity with the matrices under study and because it contains quantifiable levels of Cd and Pb. This SRM is widely used not only for the validation of new methods but also for quality control in food analysis [17]. Surface responses were obtained using Minitab™.

After optimizing the sample preparation stage, the methodology was validated following the Eurachem Guide recommendations [23]. The figures of merit evaluated were linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), precision, and trueness. Linearity was studied by constructing a six-point calibration curve (each level in triplicate). The LOD was estimated using a signal-to-noise ratio of 3 (3 s criterion, $n = 10$), and, analogously, the LOQ was determined using a signal-to-noise ratio of 10 (10 s criterion) [23]. Precision is expressed as relative standard deviation (RSD, %) after the analysis of six replicates of the SRM and with real samples. Trueness was evaluated by statistical comparison of the values obtained using the UAE method for the analysis of the SRM of spinach leaves with the corresponding certified values of Cd and Pb (percentage recovery (R%)) and for real samples by comparison with the results obtained using the MAE method (total digestion). In both cases Student's *t*-test was used [24].

2.6. Confocal microscopy

Confocal microscopy characterization was performed utilizing a WITec Alpha 300RA confocal Raman microscope. A small amount of the spinach leaf SRM without previous treatment or solid residues obtained after different sonication times were deposited on a glass substrate for optical imaging in air (5x and 100x magnification). Raman spectra could not be measured because of intrinsic fluorescence, which could not be avoided even using two different excitation laser wavelengths (532 and 785 nm). Nevertheless, the purpose of this part is to provide optical characterization with confocal resolution.

3. Results and discussion

3.1. Optimization and validation

3.1.1. Optimization

One of the objectives of this work is to develop a simple UAE method for the simultaneous determination of two inorganic contaminants in foodstuffs. Here, we focus on the optimization of the process. The percentage recovery (R%), defined as the ratio between the obtained results and the correspondent certified value of the SRM (NIST 1570a), was used as the response to optimize. The goal was to achieve an R% value close to 100 using the simplest conditions required to determine Cd and Pb with the same procedure and complying with standard analytical requirements. The Official Methods of Analysis of AOAC International is the most widely compendium of standard methods used in food analysis; therefore, we critically analyzed the developed UAE method against the AOAC requirements [17].

The results obtained after performing the experimental design are summarized in Table 2, and the effects of critical variables are shown in the response surfaces in Fig. 1. Table 2 also lists the final temperature of the suspension because an increase in temperature can damage vegetal structures, mainly proteins, releasing metals into the extracting solution [25]. Thus, the combination of the sonication, acid medium, and *in situ* heating contribute to the quantitative extraction of Cd and Pb.

According to the AOAC, the R% value using a suitable SRM must range from 60% to 115%. For our target contaminants, an R% at the lower end of this range is adequate because they are typically present at the trace level [17,26]. For the selected vegetables, the NIST-provided SRM is appropriate and widely used for this type of validation.

Experiments 2–4 and 7–9 did not yield adequate recoveries for both Cd and Pb, whereas experiments 1 and 6 do meet the standards for the recoveries of both Pb and Cd. However, note that some other experiments showed better individual recoveries for Cd or Pb. Experiment 5 showed the best performance for both elements, having a R% for both elements meeting the AOAC requirements, and the combination of the use of dilute acid and moderate sonication time is favorable; thus, the selected optimum conditions for the method validation are 2.5 M HNO₃ and 15 min of sonication. Under these conditions, the final temperature caused by bubble collapse during cavitation was 82 °C, one of the highest temperatures reached in this experimental design.

3.1.2. Validation

The UAE method was validated for Cd and Pb determination in apple, lettuce, carrot, and tomato samples according to the recommendations of the Eurachem Guide. Validation was carried out with respect to the main figures of merit, as explained in Section 2.5 [23]. Table 3

Table 2

Results corresponding to the multivariate experimental design [21].

Experiment	HNO ₃ (mol L ⁻¹)	Time (min)	Cd (R%)	Pb (R%)	Final T (°C)
1	2.5	5	95 ± 4	63 ± 3	70
2	2	10	54 ± 6	94 ± 3	70
3	3	10	50 ± 3	108 ± 2	78
4	1	15	66 ± 4	125 ± 2	76
5	2.5	15	81 ± 3	112 ± 5	82
6	3.5	15	64 ± 4	74 ± 4	86
7	3	20	60 ± 3	55 ± 10	88
8	2	20	59 ± 3	154 ± 5	76
9	2.5	20	72 ± 7	51 ± 4	77

R%: percentage recovery using the SRM (NIST 1570a). Mean ± standard deviation ($n = 3$).

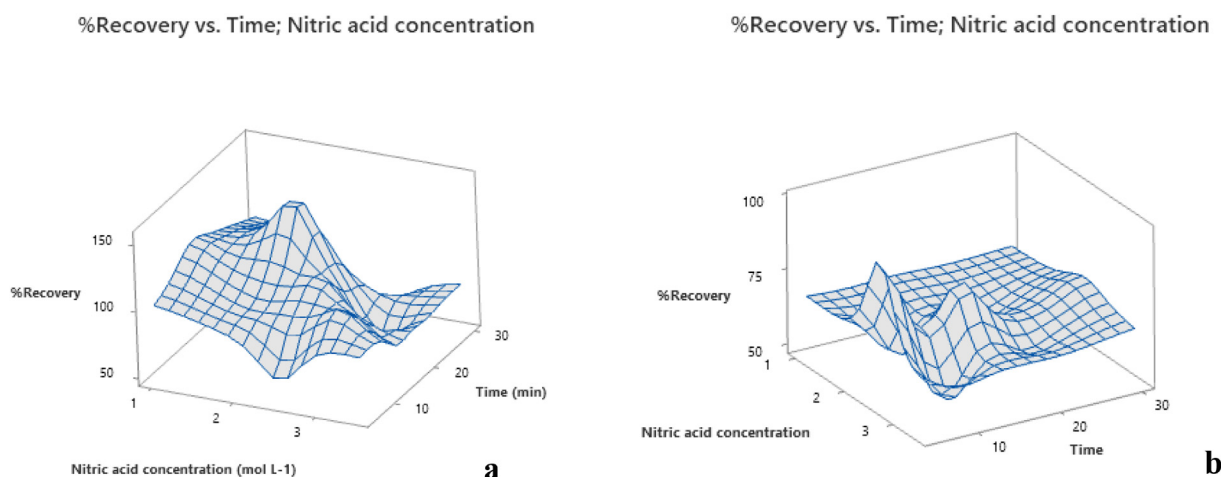


Fig. 1. Response surface obtained for Cd (a) and Pb (b).

Table 3

Figures of merit for UAE and MAE.

	UAE: Cd/Pb				MAE: Cd/Pb			
	LOD	LOQ	Trueness* (R%)	RSD, %	LOD	LOQ	Trueness* (R%)	RSD, %
Lettuce	0.07/0.7	0.2/2.1	112 ± 7/97 ± 9	9.3/5.3	0.4/1.0	1.0/3.0	96 ± 8/111 ± 8	15/15
Tomato	0.3/0.7	1.0/2.1		15/3.4	0.5/3.3	2.0/11		7.8/12
Apple	0.2/1.2	0.6/4.1		6.2/7.1	1.2/2.5	4.2/8.4		8.5/6.7
Carrot	0.2/0.4	0.7/1.4		12/6.4	2.2/3.1	7.3/10		10/11

LOD and LOQ expressed in $\mu\text{g kg}^{-1}$ fresh weight. * Mean $\pm$ standard deviation ($n = 6$) using SRM (NIST 1570a) [23].

summarizes the validation results for the UAE method, as well as the results obtained using the MAE method for comparison. Good linearity was observed for both elements, having coefficients of determination (R^2) greater than 0.999. Individual residuals were also studied, and their random distribution was verified [27].

The maximum allowable concentration (MAC) for Cd and Pb according to regional regulations agreed by the Mercosur trade bloc and the Codex Alimentarius Commission are 0.2 and 0.3 mg kg^{-1} (expressed in fresh weight), respectively, in leafy vegetables and 0.1 mg kg^{-1} of Cd and Pb in fruits and other vegetables [28,29]. Notably, the LODs and LOQs (see Table 3) obtained with the UAE method expressed in micrograms/kilogram of fresh weight were one and two orders of magnitude below the MAC, respectively, so the detectability is more than enough for food safety monitoring. These results also comply with the requirements of the AOAC, that is, an LOD at least 10 times lower than the MAC. Thus, the UAE method could be considered as a standard method for the analysis of these contaminants in food [17]. In particular, the LODs are considerably lower (10 times)

than those reported by Machado et al. for both elements in other vegetables, and the acid used as an extractant is 1.4 times more dilute [9].

For trueness evaluation, the experimental t -values obtained by means of Student's t test were 2.40 and -0.72 for Cd and Pb, respectively, both below the theoretical value ($t(0.05, 6) = 2.57$), indicating that, at the 95% confidence level, the obtained concentrations of both elements did not differ significantly from the certified values of the SRM. The precision in all cases was better than 15% (RSD). This is adequate considering that these elements, when detected, are at the trace concentration level and is in accordance with the provisions of AOAC (RSD < 15%) for both elements in the four studied matrices [17].

To compare the performance of UAE with classical MAE, figures of merit for MAE were also obtained, and the results are listed in Table 3. The LOD and LOQ values obtained using the UAE method are significantly lower than those obtained using MAE, which is related to the high precision of the UAE process. This is advantageous for trace element determination, particularly when applied to monitor inorganic contaminants because, in addition to foods containing contaminants

Table 4

Cd and Pb levels in samples. Comparison UAE and MAE.

	UAE	MAE	UAE	MAE
	Cd (mg kg^{-1})		Pb (mg kg^{-1})	
Lettuce	0.013 $\pm$ 0.002	0.016 $\pm$ 0.004	0.0017 $\pm$ 0.0002	0.0017 $\pm$ 0.0001
	0.035 $\pm$ 0.002	0.030 $\pm$ 0.002	0.0047 $\pm$ 0.0005	0.0041 $\pm$ 0.0001
	0.048 $\pm$ 0.002	0.044 $\pm$ 0.002	0.0021 $\pm$ 0.0005	0.0029 $\pm$ 0.0006
Carrot	<0.0007	<0.007	<0.0014	ND
Tomato	ND	ND	<0.0021	ND
	<0.0010	<0.0020	<0.0021	ND
Apple	0.019 $\pm$ 0.004	0.017 $\pm$ 0.003	0.0019 $\pm$ 0.004	0.017 $\pm$ 0.003
	<0.0006	ND	0.040 $\pm$ 0.023	0.044 $\pm$ 0.002

Mean $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Fresh weight. ND = not detected.

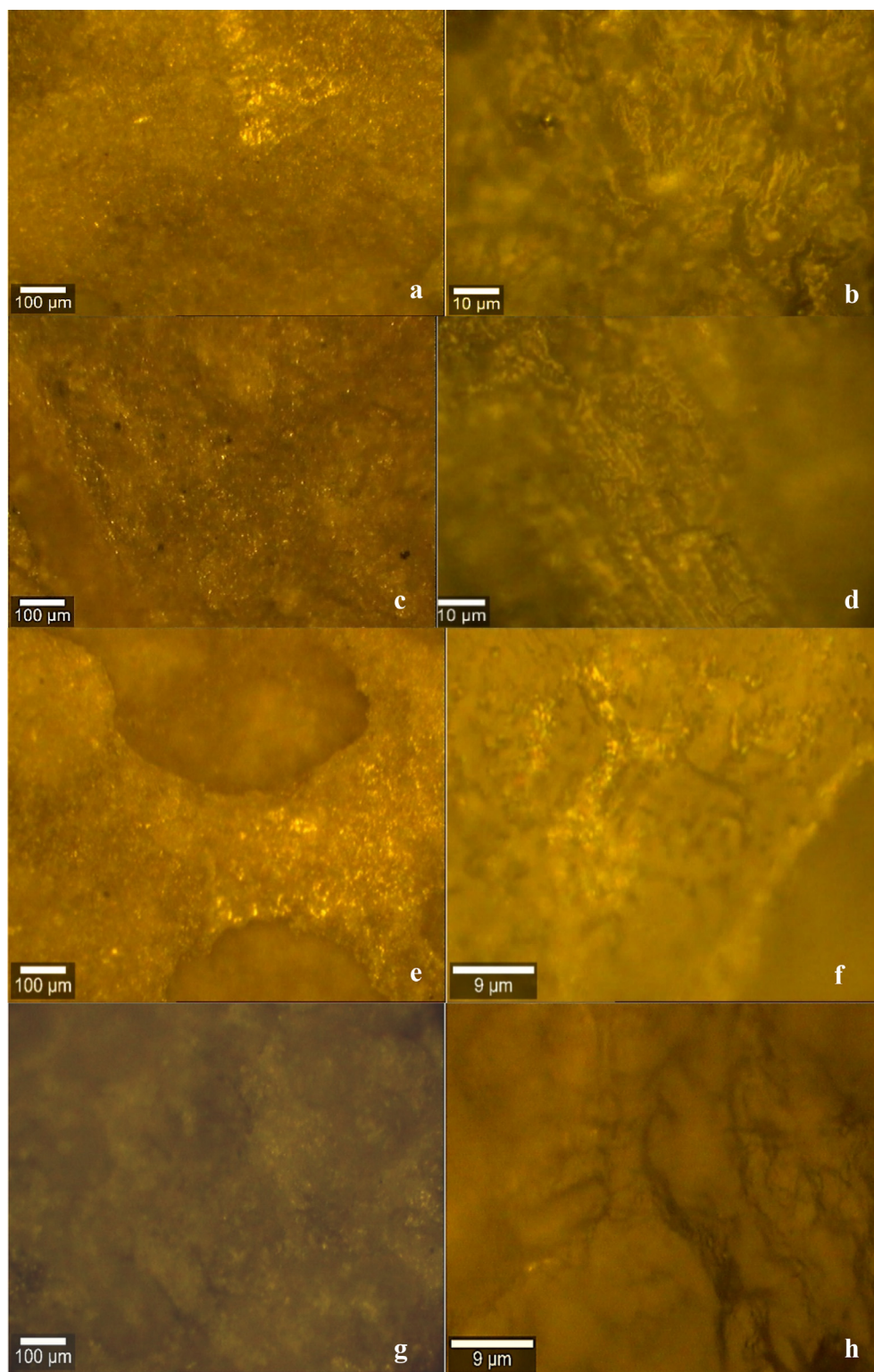


Fig. 2. Confocal optical images of a control sample (SRM NIST 1570a) without treatment (a, b); the SRM sample after 5-min sonication (c, d); after 15-min sonication (e, f) and after 20-min sonication (g, h). Scale bars are 100 and 10 μm , respectively.

below the MAC, more information can be obtained about the levels of these contaminants for preventive purposes. However, when an ultrasound probe is used, only one sample at a time can be processed, whereas several can be treated simultaneously in a microwave oven. Nevertheless, the UAE process lasts 30 min, yielding a solution ready for measurement, whereas, for the MAE, the digestion program lasts

45 min and, subsequently, each sample must be individually quantitatively transferred and made up to the final volume by the analyst.

Several factors favor UAE as a green analytical method, including the use of dilute acid, the simultaneous determination of Cd and Pb, simple operation without the need for a microwave oven, and lower atomization temperatures required for ETAAS, which extends the life-

time of the graphite furnaces, thus making the process more economical. In addition, compared with those obtained with the MAE method, the LODs and LOQs are remarkably low, and all the figures of merit are in accordance with the AOAC requirements. Thus, this alternative method could yield better quality than standard methods.

3.2. Real sample analysis

Once the method had been validated, it was applied to local samples. Table 4 show the results obtained using UAE compared with those obtained using MAE to demonstrate the robustness of the former method. Results were expressed in fresh weigh. Moisture percentage of the raw vegetables were: 95.2%, 94.5%, 86.3% and 82.8% for lettuce, tomato, carrot, and apple, respectively.

Although several samples contained measurable levels of Cd and Pb, they were below the MAC values for both elements. Therefore, these food samples are considered safe for consumption.

The inorganic contaminants present in fruits and vegetables cannot be removed by washing or other treatment techniques because the elements are integrated in the plant tissues. Thus, if high levels of metals are found, the source of pollution must be identified and minimized. Consequently, it is crucial to determine the amounts of Pb and Cd, even though they are low, to identify risk factors, such as contaminated areas of cultivation. On comparing the UAE and MAE results, we noticed that not only are the results are comparable, which demonstrates robustness, but also, because of the low LOQs, more information about the Cd and Pb levels could be obtained, making this an accurate method for monitoring purposes.

3.3. Optical characterization by confocal microscopy

Confocal microscopy offers slightly higher resolution than conventional microscopy and, in the case of transparent samples, allows three-dimensional information to be obtained. Analysis is carried out by taking images at different depths to identify distinctive features of each sample [30]. The effects of treatments have been similarly analyzed and characterized using confocal microscopy as reported in previous work [9]. Thus, complementary information about the effect of the ultrasonication process on the spinach leaf SRM was obtained using this technique.

The SRM spinach leaves were used for the optimization and validation of the method, so confocal microscopy images were obtained of this sample without any treatment (control) and after different sonication times with constant concentrations of the extractant ($2.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$). The images were obtained at 5x and 100x magnification, allowing us to observe structures of approximately 100 and 10 μm (Fig. 2).

As shown by the images, the ultrasonic treatment resulted in the loss of the fibrous structure in the control (Fig. 2 a-h). This result is consistent with those described by Machado et al. [9]. The effect of ultrasonication is not drastic with $2.5 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ and 5 min of sonication, whereas after 15 min the effects are significant i.e., the plant structures were damaged. Importantly, as shown in Section 3.1.1., extraction was efficient and quantitative for Cd and Pb after treatment for this time. After 20-min sonication, erosion, and abrasion over the surface of the vegetable can be observed in Fig. 2 (g-h).

The optimum sonication time was, thus, 15 min, and this treatment time was enough for the accurate determination of both elements. As Petigny et al. reported, there is an optimal sonication time that allows the extractant medium access to the substrate surfaces to allow erosion and extraction [31]. After 20-min sonication, the surfaces became smoother, and this was also observed by Chemat et al. in caraway seeds and reported as the detexturation of cell structures [8]. Thus, the images show changes on the surface of the spinach leaves consistent with detexturation, sonoporation, and erosion caused by ultrasonic waves. Therefore, confocal microscopy probed to be an

important technique for the structural characterization of ultrasonicated samples at a microscopic level.

4. Conclusions

An analytical method based on ultrasound-assisted extraction with dilute acid was developed for the determination of Cd and Pb in apples, tomatoes, carrots, and lettuce. This method is simpler, more economical, and more consistent with the principles of green analytical chemistry than those based on microwave-assisted digestion. The results of the validation showed that the ultrasonic method can be considered a reference standard method for food safety monitoring. In addition, via confocal microscopy, we verified several structural effects of sonication on the surfaces of SRM spinach leaves used for validation. Detexturation, erosion, and abrasion were evident when the sonication time was increased from 5 to 20 min at a constant concentration of extractant. Several vegetable and fruit samples from a Uruguayan market were analyzed using the developed method, and the concentrations of Cd and Pb were far below the corresponding maximum allowed concentrations, indicating their safety. The results of this work reinforce the utility and efficiency of ultrasound-assisted extraction methods applied in sample preparation procedures for the development of greener analytical methods and how promising they are to explore other matrices.

CRedit authorship contribution statement

Mónica Pereira: Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation. **Florencia Tissot:** Conceptualization, Data curation, Investigation, Methodology, Validation. **Ricardo Faccio:** Data curation, Investigation, Formal analysis. **Facundo Ibáñez:** Funding acquisition, Investigation, Project administration. **Mariela Pistón:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Supervision, Validation, Visualization, Writing - original draft, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

Funding: This work was supported by the Agencia Nacional de Investigación e Innovación [ANII FSA_I_2017_1_140199], Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), and PEDECIBA-Química.

References

- [1] N. Shaheen, N.M. Irfan, I.N. Khan, S. Islam, M.S. Islam, M.K. Ahmed, Presence of heavy metals in fruits and vegetables: Health risk implications in Bangladesh, *Chemosphere* 152 (2016) 431–438.
- [2] M.S. Islam, M.K. Ahmed, M. Habibullah-Al-Mamun, M. Raknuzzaman, M.M. Ali, D. W. Eaton, Health risk assessment due to heavy metal exposure from commonly consumed fish and vegetables, *Environ. Syst. Decis.* 36 (2016) 253–265.
- [3] Z.U. Rehman, S. Khan, K. Qin, M.L. Brusseau, M.T. Shah, I. Din, Quantification of inorganic arsenic exposure and cancer risk via consumption of vegetables in southern selected districts of Pakistan, *Sci. Total Environ.* 550 (2016) 321–329.
- [4] Z.U. Rehman, S. Khan, M.L. Brusseau, M.T. Shah, Lead and cadmium contamination and exposure risk assessment via consumption of vegetables grown in agricultural soils of five-selected regions of Pakistan, *Chemosphere* 168 (2017) 1589–1596.
- [5] G. Nziguheba, E. Smolders, Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries, *Sci. Total Environ.* 390 (2008) 53–57.
- [6] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Interaction profile for arsenic, cadmium, chromium, and lead, (2004).
- [7] M. Ashokkumar, Applications of ultrasound in food and bioprocessing, *Ultrason. Sonochem.* 25 (2015) 17–23.

- [8] F. Chemat, N. Rombaut, A.G. Sicaire, A. Meullemiestre, A.S. Fabiano-Tixier, M. Abert-Vian, Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols, and applications. A review, *Ultrason. Sonochem.* 34 (2017) 540–560.
- [9] I. Machado, R. Faccio, M. Pistón, Characterization of the effects involved in ultrasound-assisted extraction of trace elements from artichoke leaves and soybean seeds, *Ultrason. Sonochem.* 59 (2019) 2.
- [10] M. Mohebbi, R. Heydari, M. Ramezani, Determination of Cu, Cd, Ni, Pb and Zn in edible oils using reversed-phase ultrasonic assisted liquid-liquid microextraction and flame atomic absorption spectrometry, *J. Anal. Chem.* 73 (2018) 30–35.
- [11] A. Ismaili, R. Heydari, R. Rezaeepour, Monitoring the oleuropein content of olive leaves and fruits using ultrasound- and salt-assisted liquid-liquid extraction optimized by response surface methodology and high-performance liquid chromatography, *J. Sep. Sci.* 39 (2016) 405–411.
- [12] R. Rezaeepour, R. Heydari, A. Ismaili, Ultrasound, and salt-assisted liquid-liquid extraction as an efficient method for natural product extraction, *Anal. Methods* 7 (2015) 3253–3259.
- [13] M. Rashidipour, R. Heydari, Ultrasonic-assisted matrix solid-phase dispersion and high-performance liquid chromatography as an improved methodology for determination of oleuropein from olive leaves, *Anal. Bioanal. Chem. Res.* 5 (2018) 307–316.
- [14] R. Heydari, M.R. Darabi Bazvand, Ultrasound-assisted matrix solid-phase dispersion coupled with reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction for determination of vitamin C in various matrices, *Food Anal. Method.* 12 (2019) 1949–1956.
- [15] A. Ghassempour, R. Heydari, Z. Talebpour, A.R. Fakhari, A. Rassouli, N. Davies, H. Y. Aboul-Enein, Study of new extraction methods for separation of anthocyanins from red grape skins: analysis by HPLC and LC-MS/MS, *J. Liq. Chromatogr. R T.* 31 (2008) 2686–2703.
- [16] I. Machado, G. Bergmann, M. Pistón, A simple and fast ultrasound-assisted extraction procedure for Fe and Zn determination in milk-based infant formulas using flame atomic absorption spectrometry (FAAS), *Food Chem.* 194 (2016) 373–376.
- [17] G.W. Latimer Jr., ed., Standard method performance requirements SMPR 2012.007. Official Methods of Analysis of AOAC International, 20th ed., AOAC International, Rockville, MA, 2016.
- [18] I. Machado, I. Dol, E. Rodríguez-Arce, M.V. Cesio, M. Pistón, Comparison of different sample treatments for the determination of As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in globe artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *Cardunculus*), *Microchem. J.* 128 (2016) 128–133.
- [19] N. Altunay, A. Elik, C. Bulutlu, R. Gürkan, Application of simple, fast, and eco-friendly ultrasound-assisted-cloud point extraction for pre-concentration of zinc, nickel and cobalt from foods and vegetables prior to their flame atomic absorption spectrometric determinations, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 98 (2018) 655–675.
- [20] C. Cairós, J. González-Sálamo, J. Hernández-Borges, The current binomial Sonochemistry-Analytical Chemistry, *J. Chromatogr. A* 1614 (2020) 460511.
- [21] M. Irazoqui, M. Romero, E. Paulsen, S. Barrios, N. Pérez, R. Faccio, P. Lema, Effect of power ultrasound on quality of fresh-cut lettuce (cv. Vera) packaged in passive modified atmosphere, *Food Bioprod. Process.* 117 (2019) 138–148.
- [22] A. Nwaneshiudu, C. Kuschal, F.H. Sakamoto, R. Rox Anderson, K. Schwarzenberger, R.C. Young, Introduction to confocal microscopy, *J. Invest. Dermatol.* 132 (2012) 1–5.
- [23] B. Magnusson, U. Örnemark, eds., Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (2nd ed.). ISBN 978-91-87461-59-0. Eurachem, 2014. <http://www.eurachem.org>.
- [24] N.H.A. Nguyen, S.G. Anema, Effect of ultrasonication on the properties of skim milk used in the formation of acid gels, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11 (2010) 616–622.
- [25] E.R. Ziegel, D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. de Jong, P.J. Lewi, J.S. Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part B, Elsevier Science, Amsterdam, 2000. <https://doi.org/10.2307/1271476>.
- [26] W. Horwitz, R. Albert, The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision, *J. AOAC Int.* 89 (2006) 1095–1109.
- [27] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S.D. Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part A, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [28] Mercosur, Mercosur Technical Regulation Concerning Maximum Limits of Inorganic Contaminants in Foods. (Repeal of Resolution GMC No 102/94 and No 35/96) [Original Title: Reglamento Técnico Mercosur Sobre Límites Máximos De Contaminantes Inorgánicos En Alimentos (DEROGACIÓN DE LAS RES GMC No. 102/94 y No. 35/96) MERCOSUR/GMC/RES. No. 12/11), 2011. http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_12-11.pdf.
- [29] FAO, WHO, Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Contaminants in Foods, Food CF/5 INF/1. Fifth Session, The Hague, The Netherlands, 2011. www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCCF/CCCF5/cf05_INF.pdf.
- [30] J.A.R. Cardona, C.H. Iriart, M.L. Herrera, Applications of Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) in Foods, IntechOpen, Rijeka, 2013.
- [31] L. Petigny, S. Périno-Issartier, J. Wajsman, F. Chemat, Batch and continuous ultrasound assisted extraction of boldo leaves (*Peumus boldus* Mol.), *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 5750–5764.

Desarrollo de una metodología analítica para la determinación de Cd, Pb y As en frutas y hortalizas como una alternativa a los métodos estándar de análisis

Development of an analytical methodology for the determination of Cd, Pb and As in fruits and vegetables as an alternative to standard methods of analysis

Desenvolvimento de uma metodologia analítica para a determinação de Cd, Pb e As em frutas e vegetais como alternativa aos métodos padrão de análise

RECIBIDO: 9/9/2019 → APROBADO: 12/11/2019 ✉ ftissot@fq.edu.uy

✉ TISSOT, FLORENCIA (1); PEREIRA MÓNICA (1); PISTÓN, MARIELA (1); IBÁÑEZ, FACUNDO (2); DINI, SEBASTIÁN (2)

(1) 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.

(2) AGROALIMENTOS INIA, ESTACIÓN EXPERIMENTAL LAS BRUJAS, INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA, CANELONES, URUGUAY.

RESUMEN

Las frutas y hortalizas pueden contener contaminantes que llegan al producto en cualquier punto de la cadena productiva. En este sentido, se debe controlar la acumulación de elementos potencialmente tóxicos como arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb) para asegurar y controlar la inocuidad de estos alimentos.

Con el objetivo de monitorear los contaminantes inorgánicos, de forma rápida, confiable y con métodos analíticos en acuerdo con los principios de la química verde, se desarrolló y validó una metodología para la extracción simultánea de estos elementos asistida con microondas, en un solo paso y utilizando ácido diluido.

Se aplicó el método validado a cuatro productos: zanahoria, lechuga, manzana y tomate. Los parámetros de desempeño de esta metodología indicaron que resultó adecuada para monitorear estos alimentos tomando como referencia la reglamentación vigente y que todas las muestras analizadas cumplieron con los criterios establecidos. Esta metodología validada puede ser considerada como alternativa a los métodos estándar de análisis de As, Cd y Pb en este tipo de alimentos. El desarrollo de estas herramientas analíticas es de relevancia y deja disponible una plataforma analítica al servicio del sector productivo y de organismos de contralor nacional.

PALABRAS CLAVE: inocuidad alimentaria, vegetales, plomo, cadmio, arsénico.

ABSTRACT

Fruits and vegetables may contain contaminants that reach the product at any point in the production chain. In this sense, the accumulation of potentially toxic elements such as arsenic (As), cadmium (Cd) and lead (Pb) must be controlled to ensure food safety.

In order to monitor inorganic pollutants, a fast and reliable analytical method also following the principles of green chemistry was developed and validated for simultaneous extraction of these elements using a microwave-assisted procedure, in a single step and with diluted acid. The validated method was applied in four products: carrot, lettuce, apple and tomato. The figures of merit of this methodology indicated that it was adequate to monitor these contaminants in the analyzed foods fulfilling with the current regulations. The developed method can be considered as an alternative to standard methods for the determination of As, Cd and Pb in these foods. These kinds of studies applied to monitor food safety are relevant and, in this case, an analytical platform is now available for the productive sector and national control agencies.

KEYWORDS: food safety, vegetables, lead, cadmium, arsenic.

RESUMO

Frutas e legumes podem conter contaminantes que atingem o produto em qualquer ponto da cadeia de produção. Nesse sentido, o acúmulo de elementos potencialmente tóxicos como arsênico (As), cádmio (Cd) e chumbo (Pb) deve ser controlado para garantir e controlar a segurança desses alimentos.

Para monitorar poluentes inorgânicos de arsênico, cádmio e chumbo, de forma rápida, confiável e com métodos analíticos de acordo com os princípios da química verde, foi desenvolvida e validada uma metodologia para a determinação simultânea desses elementos assistida por microondas, em uma única etapa e usando ácido diluído.

O método validado foi aplicado em quatro produtos: cenoura, alface, maçã e tomate. Os parâmetros de desempenho dessa metodologia indicaram que o método era adequado para monitorar esses alimentos tomando como referência as normas vigentes. O método analítico desenvolvido pode ser considerado uma alternativa aos métodos padrão de análise para a determinação de As, Cd y Pb nesses alimentos.

Todas as amostras analisadas atenderam aos critérios regulatórios. Essa metodologia validada e aplicada a estudos de segurança é relevante e disponibiliza uma plataforma analítica ao serviço do setor produtivo e das agências nacionais de controle.

PALAVRAS-CHAVE: segurança alimentar, vegetais, chumbo, cádmio, arsênico.

INTRODUCCIÓN

El concepto de inocuidad de los alimentos comprende diferentes acciones para garantizar seguridad al consumirlos, un aspecto fundamental para la salud pública y un factor muy relevante en la comercialización. Las políticas y actividades a implementar deben abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción hasta el consumidor final.

Las frutas y hortalizas podrían contener contaminantes inorgánicos que ingresan al producto en cualquier punto, desde su cultivo a su cosecha y hasta en la cadena de procesamiento que las lleva al consumidor final.

En particular, la acumulación de metales y semimetales potencialmente tóxicos en alimentos es crucial para definir el concepto de calidad de los mismos (Islam, et al., 2016; Rehman, et al., 2016; Rehman, et al., 2017). Debido a esto las determinaciones analíticas de elementos como arsénico (As), cadmio (Cd) y plomo (Pb) en diversas matrices alimentarias han tomado vital importancia para asegurar y monitorear la inocuidad de los alimentos.

Entre las principales fuentes de contaminación inorgánica se encuentran el agua de riego, el suelo, el aire y el uso de fertilizantes (Allende y Monaghan, 2015).

En Uruguay algunos estudios demuestran que las aguas de determinados acuíferos presentan niveles de As superiores a los admitidos por la Organización Mundial de la Salud ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) y que no se cuenta con información reportada respecto a los suelos (Mañay, et al., 2013; World Health Organization, 2018; Mañay, et al., 2019).

El Cd llega a los suelos y aguas principalmente debido al uso indiscriminado de fertilizantes fosfatados, que contienen Cd como un producto secundario en su obtención y se acumula en los suelos pudiendo ser absorbido por los vegetales y, por lo tanto, incorporado en los alimentos de consumo humano (Nziguheba y Smolders, 2008).

El Pb se encuentra en el ambiente en forma natural, sin embargo, los altos niveles de este elemento en el ambiente son de origen antropogénico.

Las plantas han desarrollado mecanismos específicos para absorber, traslocar y acumular nutrientes, pero esos mismos mecanismos pueden también incorporar elementos no esenciales debido a su comportamiento electroquímico, similar al de los esenciales (Lasat, et al., 2000).

El Reglamento Técnico Mercosur establece límites máximos de concentración de contaminantes inorgánicos en alimentos. Indica que para el Cd el máximo admitido es de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ para hortalizas de hoja y $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ para frutas y demás hortalizas; para Pb es $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ para hortalizas de hoja y $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ para frutas

y hortalizas, y para As es $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ para frutas y hortalizas (MERCOSUR, 2011). En todos los casos se refiere a base fresca. La determinación de estos elementos se debe realizar en laboratorios analíticos que cuenten con metodologías validadas y de forma rápida y confiable, para cumplir con los requerimientos y así liberar los productos al mercado o para su exportación.

Para la determinación analítica de As, Cd y Pb en muestras de tejido vegetal se requiere un pretratamiento de extracción de los analitos de la matriz y posterior medición en una disolución. Este proceso puede ser más o menos complejo según la matriz y el elemento en cuestión. Generalmente se utilizan protocolos o métodos estándar que requieren digestiones ácidas por vía húmeda o seca. En particular, el método oficial para análisis de metales y otros elementos traza en alimentos de la AOAC Internacional (AOAC 986.15) utiliza ácido nítrico concentrado para la digestión de las muestras (AOAC International, 2016).

Buscando el desarrollo de métodos analíticos más alineados a los principios de la química verde se propone la utilización de una digestión asistida por microondas con ácido diluido como procedimiento alternativo de extracción de los elementos de las matrices vegetales (Nobrega, et al., 2002).

Una vez que las muestras son tratadas mediante procedimientos para obtener una disolución adecuada para la realización de las mediciones analíticas, los elementos As, Cd y Pb pueden determinarse mediante diversas técnicas de espectrometría atómica. En el caso de Cd y Pb habitualmente se utilizan las técnicas de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) y de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP OES) y acoplado a masas (ICP MS) (Welz y Sperling, 1999). Para determinación de As, se utiliza en los métodos oficiales la técnica de absorción atómica de llama acoplada a hidruros (HG-AAS), esta técnica requiere el uso de un gas inflamable como el acetileno (Welz y Sperling, 1999). Una técnica aún poco extendida en los laboratorios analíticos es la de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP OES), que permite el acople de una cámara para generación de hidruros. Esta técnica cuenta con múltiples ventajas respecto a otras, entre ellas el hecho de que el plasma es sostenido por nitrógeno que se obtiene a partir de un generador alimentado con aire comprimido (Williams, et al., 2019). Los costos tanto de inversión como de mantenimiento de este instrumento son considerablemente menores a cualquier otra técnica atómica y elimina el uso de acetileno en los laboratorios.

Para este trabajo se seleccionaron frutas y hortalizas de consumo masivo que presentan mayor riesgo de contener elevados niveles de estos elementos, ya sea por su contacto directo con el suelo o por su capacidad concentradora (Burlo, et al., 1999; Mengel, et al., 2001). Se desarrolló y validó una metodología para la determinación de contaminantes inorgánicos en lechuga, manzana, tomate y zanahoria utilizando ácido diluido e introduciendo el uso de la técnica novedosa (HG-MIP OES) para la determinación de As. Esta plataforma analítica, amigable con el ambiente, aporta una herramienta práctica al sector productivo y organismos de contralor para el monitoreo de la inocuidad de alimentos en Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Para las determinaciones de los analitos se utilizaron disoluciones estándar para absorción atómica de 1000 mg L⁻¹ de As, Cd y Pb (Merck, Alemania). Las curvas de calibración fueron preparadas mediante diluciones apropiadas a partir de las disoluciones comerciales concentradas, utilizando agua ultrapura de resistividad 18,2 MΩcm (ASTM Tipo I), obtenida mediante un purificador Millipore Direct-Q 3 UV. Todo el material utilizado se descontaminó previamente durante 12 horas con ácido nítrico 10% v/v preparado a partir de HNO₃ concentrado (67% v/v, Merck, Alemania).

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica o superior. Para las determinaciones de As se utilizó NaBH₄ 2% m/v (Sigma Aldrich, USA) en hidróxido de sodio 0,5% m/v preparado a partir de NaOH (Mallinckrodt, México). Para el proceso de prerreducción se utilizó HCl 12 mol L⁻¹ (Merck, Alemania) y KI 20% m/v (Carlo Erba, Francia). Como modificadores de matriz para las determinaciones de Cd y Pb se utilizaron disoluciones de Pd (NO₃)₂ (Merck, Alemania) 10000 mgL⁻¹ y NH₄H₂PO₄ 5000 mgL⁻¹ (Sigma Aldrich, USA).

Muestras

Las muestras de frutas y hortalizas frescas fueron tomadas del Mercado Modelo de Montevideo, entidad que comercializa más del 60% de los vegetales frescos en Uruguay. Se siguió un protocolo estandarizado de selección al azar de los operadores del Mercado, donde cada muestra es representativa del total del volumen a la venta del día. Los muestreos fueron realizados durante las primeras horas de operación y, simultáneamente, se realizó una encuesta complementaria según la Metodología de Evaluación de Cadenas Agroalimentarias (MECA) (La Gra, et al., 2016). En el caso de lechuga se seleccionaron aleatoriamente cinco unidades de distintos cajones, y para manzana, tomate y zanahoria se tomaron muestras de al menos 1 kg, siguiendo el mismo criterio de aleatoriedad. Las muestras fueron envasadas en bolsas de polietileno virgen, precintadas, codificadas y llevadas al laboratorio donde se procedió al cuarteo y submuestreo (100-200 g) en el mismo día. Luego fueron cortadas con cuchillo de cerámica sobre superficie plástica y secadas en estufa de circulación forzada Modelo DN93 (Yamato, Tokio, Japón) a 70 °C por 96 horas. Una vez secas fueron procesadas en un molino de martillos Willey Model 4 (Thomas Scientific, NJ, USA), tamizadas en malla de tamaño de partícula de 1 mm, acondicionadas en tubos plásticos y mantenidas en condiciones de baja humedad hasta el momento del análisis.

Para la optimización y la evaluación de la veracidad y precisión de las metodologías analíticas se utilizaron dos materiales de referencia certificados: hojas de espinaca (NIST 1570a) y hojas de tomate (NIST 1573a).

Digestión de muestras

Se realizó una digestión asistida por microondas utilizando un digestor CEM (Mars 6, EUA). El procedimiento consistió en pesar 0,5 g de muestra (seca y tamizada) en vasos de reacción EasyPrep Plus® y luego se agregaron 10,00 mL de ácido diluido (HNO_3 4,8 mol L^{-1}). La programación de temperatura fue la siguiente: potencia 400-1800 W, rampa de temperatura: 15 min hasta alcanzar 200 °C, 10 min a 200 °C, presión 500 psi. Se realizaron blancos de reactivos simultáneamente con las muestras.

Una vez finalizada la digestión se trasvasó cuantitativamente y se completó a un volumen final de 20,00 mL con agua ultrapura. Sobre esta disolución se realizaron las determinaciones analíticas de los As, Cd y Pb. El procedimiento fue el mismo para las cuatro matrices analizadas.

Determinaciones analíticas

La determinación de As puede realizarse mediante la medida de su hidruro volátil que es generado luego de una reducción con tetrahidrobórato de sodio (NaBH_4) en medio ácido. Antes se requiere de un proceso de digestión para destruir los compuestos orgánicos de arsénico, y debido a que se utiliza ácido nítrico en el proceso este es oxidado a la especie As(V). Para la determinación de As total en una matriz es necesario que todo el elemento se encuentre en un mismo estado de oxidación. Dado que la formación de los hidruros es más favorable para los estados de oxidación más bajos, es necesario realizar una prerreducción de As (V) a As (III) fuera de línea con ioduro de potasio (KI) o cloruro de estaño (SnCl_2) y luego una nueva reducción en línea con NaBH_4 para la generación de hidruros (Welz y Sperling, 1999).

La prerreducción fue llevada a cabo con HCl 12 mol L^{-1} y KI 20% (m/v) en relación: muestra/estándar (10): HCl (1): KI (1). En primer lugar, se agregó HCl y se llevó a ebullición hasta una reducción de volumen del 50%, aproximadamente. A continuación, se reconstituyó el volumen original con agua ultrapura y se procedió al agregado del KI. Se dejó reaccionar una hora a temperatura ambiente antes de la realización de las medidas (Tanabe, et al., 2016; Mikheev, et al., 2017).

Las mediciones de As se realizaron mediante la técnica HG-MIP OES a 193,695 nm en un espectrómetro de emisión atómica inducido por microondas (MIP OES, Agilent 4210) con generador de nitrógeno (Agilent 4107) alimentado con un compresor de aire (DurrTechnik, Alemania). El equipo cuenta con una antorcha estándar y una cámara de nebulización multimodo (MSIS, Agilent) para la generación de hidruros. Esta cámara tiene dos canales, uno para la muestra y otro para el agente reductor. Las condiciones operativas utilizadas fueron: flujo de N_2 0,7 L min^{-1} , velocidad de la bomba 30 rpm, posición de lectura 10 y tiempo de lectura 10 s.

Todas las muestras y blancos fueron analizados por triplicado.

En el caso de Cd y Pb las determinaciones se realizaron en un espectrómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS) Thermo Scientific iCE 3500 (Cambridge, Reino Unido), equipado con módulo atomizador de horno de grafito calefaccionado transversalmente (GFS35Z), un módulo automuestreador

(GFS33) y con aplicación de corrección de fondo basada en efecto Zeeman. Las longitudes de onda de medida utilizadas fueron 228,8 nm (Cd) y 283,3 nm (Pb). La cuantificación fue realizada utilizando como señal la absorbancia integrada (área de pico). En todos los casos se utilizaron tubos de grafito con recubrimiento pirolítico (Thermo Scientific) y gas argón 99,998% (Praxair, Uruguay).

En la Tabla 1 se muestran los programas de temperatura optimizados para ambos elementos.

TABLA 1. Programas de temperatura para las determinaciones de Cd y Pb.

	Etap	Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Flujo de gas (L min ⁻¹)
Cadmio	Secado	110	20	0,2
	Pirólisis	800	20	0,2
	Atomización	1800	3	---
	Limpieza	2500	3	0,2
Plomo	Secado	120	35	0,2
	Pirólisis	900	20	0,2
	Atomización	1400	4	---
	Limpieza	2500	3	0,2

Los volúmenes de inyección fueron de 20 µL. Para la determinación de Cd, como modificador de matriz se utilizaron 10 µL de una disolución con un contenido de 5 µg de Pd(NO₃)₂. En el caso del Pb, se utilizó como modificador 10 µL de una mezcla de Pd(NO₃)₂ y NH₄H₂PO₄ con 2,5 µg de Pd(NO₃)₂ y 25 µg de NH₄H₂PO₄.

RESULTADOS

Para la caracterización y evaluación de la metodología desarrollada se determinaron los principales parámetros de desempeño o cifras de mérito (linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y veracidad) siguiendo las recomendaciones de la Guía Europea de validación Eurachem (Magnusson, et al., 2014). En todos los casos se mantuvieron las condiciones experimentales descriptas para cada uno de los analitos en la sección Materiales y Métodos.

La linealidad fue determinada mediante inspección visual de las curvas de calibración, valor del coeficiente de determinación (R²) y el estudio de aleatoriedad de los residuales. Los coeficientes de determinación obtenidos para las regresiones lineales fueron mayores a 0,99 para todos los analitos en estudio en los rangos que se presentan en la Tabla 2.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) fueron expresados como el contenido del analito correspondiente a 3,3 y 10 veces la desviación estándar del blanco, respectivamente (Magnusson, et al., 2014). La precisión expresada como RSD (%) (desviación estándar relativa porcentual) fue estudiada utilizando los

materiales de referencia certificados y las muestras, y se obtuvieron valores menores al 10% para todos los analitos en estudio.

La veracidad y la precisión fueron evaluadas analizando materiales de referencia certificados. Los métodos desarrollados fueron luego aplicados para el análisis de muestras de lechuga, manzana, tomate y zanahoria.

Se realizó la prueba *t* de Student para los resultados obtenidos a partir de las determinaciones de As, Cd y Pb en los materiales de referencia certificados, todos los valores experimentales de *t* se encontraron por debajo del valor teórico $t(0,05, 5) = 2,57$. Por lo tanto, a un nivel de significancia del 95%, las concentraciones obtenidas utilizando los métodos desarrollados no difieren significativamente de los respectivos valores certificados, con lo cual se garantiza la veracidad de los métodos.

La Tabla 2 resume los parámetros de validación obtenidos.

TABLA 2. Parámetros de desempeño de los métodos analíticos.

Matriz	Manzana	Lechuga	Tomate	Zanahoria	
Parámetro	Analito				
Rango lineal estudiado (µg L ⁻¹)	Cd	hasta 4			
	Pb	hasta 40			
	As	hasta 100			
Límite de detección (mg kg ⁻¹ base húmeda)	Cd	0,001	0,0004	0,0005	0,002
	Pb	0,003	0,003	0,003	0,003
	As	0,004	0,003	0,003	0,003
Límite de cuantificación (mg kg ⁻¹ base húmeda)	Cd	0,004	0,001	0,001	0,007
	Pb	0,008	0,010	0,010	0,010
	As	0,010	0,009	0,010	0,010
Precisión (% RSD n = 6)	Cd	<8,5			
	Pb	<10,0			
	As	<7,2			
Veracidad (% Recuperación, n = 6) (*) CRM NIST 1570a (**) CRM NIST 1573a	Cd(*)	81-100			
	Pb(*)	92-102			
	As(**)	87-107			

Se realizaron las determinaciones analíticas de As, Cd y Pb en las matrices en estudio utilizando la metodología desarrollada y validada. En todos los casos, como se muestra en la Tabla 3, los resultados de los analitos que pudieron ser cuantificados fueron menores a los límites máximos permitidos.

TABLA 3. Resultados promedio de muestras analizadas por triplicado en base húmeda. Incertidumbre expresada como desviación estándar. ND: no detectado.

Analito	Manzana	Lechuga	Tomate	Zanahoria
Cd (mg kg ⁻¹)	0,0059 ± 0,0005	0,0017 ± 0,0001	<0,001	<0,007
	<0,004	0,0017 ± 0,0001	<0,001	ND
	<0,004	0,0041 ± 0,0006	<0,001	ND
Pb (mg kg ⁻¹)	0,017 ± 0,003	0,019 ± 0,002	<0,010	ND
	ND	0,056 ± 0,006	<0,010	ND
	0,044 ± 0,002	0,030 ± 0,002	<0,010	ND
As (mg kg ⁻¹)	ND	<0,009	ND	ND
	ND	<0,009	ND	ND
	ND	<0,009	ND	ND

DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta los valores máximos de concentración permitidos para los elementos en estudio (Cd 0,2 mg kg⁻¹ para hortalizas de hoja y 0,1 mg kg⁻¹ para frutas y demás hortalizas; Pb 0,3 mg kg⁻¹ para hortalizas de hoja, y 0,1 mg kg⁻¹ para frutas y demás hortalizas y As 0,3 mg kg⁻¹ para frutas y hortalizas; MERCOSUR, 2011), es de destacar que los límites de detección y cuantificación obtenidos se encuentran entre uno y dos órdenes por debajo, por lo que la detectabilidad es más que suficiente para el objetivo propuesto.

El valor objetivo para la desviación estándar de un análisis determinado varía con la concentración de analito a medir y para estimarlo se puede establecer una relación funcional entre la concentración y la desviación estándar relativa (RSD). Esta ecuación conduce a una curva que se puede utilizar para estimar valores objetivo de desviación estándar relativa para los análisis (Rivera y Rodríguez, 2010). Para los niveles de concentraciones de trabajo según la distribución de Horwitz se esperarían resultados de precisión (RSD) de hasta 20%. Los RSD obtenidos para el método desarrollado fueron menores al 10% para todos los elementos, lo cual se considera muy bueno y, sumado a los resultados del estudio de veracidad, avala la aplicación del método para determinar la concentración de As, Cd y Pb en las matrices seleccionadas con fines de control sanitario.

La AOAC establece que las metodologías estándar para análisis de metales pesados en alimentos en una concentración hasta 100 mg kg⁻¹ deben presentar un límite de cuantificación menor o igual a 10 mg kg⁻¹, la veracidad evaluada como recuperación (ya sea de materiales de referencia o de muestras fortificadas) debe ser entre 60 y 115% y la precisión como %RSD debe ser menor a 15%. Para el caso de As, para valores

de concentración hasta 100 mg kg⁻¹ los requerimientos para límite de cuantificación y veracidad son los mismos que para metales pesados y la precisión como %RSD debe ser menor a 20% (AOAC International, 2016). En lo que respecta al tratamiento de la muestra, este método utiliza solamente ácido nítrico diluido (concentrado diluido tres veces) como reactivo. No utiliza ácidos concentrados ni reactivos auxiliares para la digestión como los métodos estándar, lo que disminuye los costos y la generación de residuos peligrosos. Un ejemplo que ilustra este aspecto es que para la determinación de As mediante el método oficial para la preparación de la muestra se requiere una calcinación en mufla a 450 °C con Mg(NO₃) por 30 minutos como mínimo y luego de enfriar las cenizas se retoman en ácido clorhídrico concentrado. En la misma línea, para Cd y Pb las digestiones por el método oficial se realizan con ácido nítrico concentrado en sistemas cerrados durante 2 horas a 150 °C (AOAC 986.15, AOAC International, 2016).

Si bien cada vez se está extendiendo más el uso de tratamientos asistidos con microondas, se ha demostrado que puede realizarse utilizando un solo ácido diluido y que el mismo procedimiento es aplicable a diferentes matrices complejas. A partir de un mismo proceso de digestión se pueden realizar las medidas de todos los elementos, lo que ahorra tiempo de análisis, ya que la digestión de microondas se completa en 25 minutos y con los métodos oficiales los tiempos de digestión pueden llegar a ser de dos horas dependiendo del elemento en estudio (AOAC 986.15, AOAC International, 2016).

La técnica analítica utilizada para la determinación de As, HG-MIP OES, se aplicó exitosamente. Es una tecnología económica debido a que no utiliza argón como gas que genera y sostiene el plasma (como en las técnicas de ICP-OES o ICP MS), sino nitrógeno obtenido mediante un generador que lo produce a partir de aire suministrado por un compresor. Acoplar la generación de hidruros a la emisión atómica también resultó un desafío, debido a que tradicionalmente el acople se realiza con técnicas de absorción atómica (HG-AAS) que brinda límites de detección y cuantificación más bajos, sin embargo, los límites obtenidos son adecuados para el fin propuesto.

En base a lo expuesto anteriormente, los parámetros de desempeño obtenidos indican que los métodos analíticos desarrollados son adecuados para los fines propuestos. Su aplicación no solamente permite emitir resultados confiables y que aseguren la inocuidad del alimento desde el punto de vista del contenido de contaminantes inorgánicos, también es posible postular esta metodología como una alternativa más económica y simple en comparación con los métodos estándar ampliamente utilizados en los laboratorios.

CONCLUSIONES

Se logró desarrollar una metodología analítica que permite la determinación de As, Cd y Pb en diferentes matrices vegetales mediante un tratamiento de muestra único y más amigable con el ambiente comparado con los métodos oficiales. El tratamiento cumple con todas las especificaciones de desempeño requeridas para ser una alternativa viable de análisis de contaminantes inorgánicos en vegetales, en lo relativo a detectabilidad, precisión y veracidad.

Todas las muestras analizadas cumplieron con los criterios establecidos en la reglamentación vigente (MERCOSUR, 2011).

Esta metodología pone a disposición una plataforma analítica fundamental para el sector productivo y para organismos de contralor, que hace posible detectar y cuantificar concentraciones muy por debajo de los límites máximos permitidos. De esta forma, no solamente se puede monitorear la inocuidad mediante la verificación del cumplimiento de la normativa, sino que también es posible conocer el contenido de estos contaminantes en los alimentos seleccionados y controlar los niveles de estos elementos.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Proyecto INNOVAGRO FSA_I_2017_1_140199.

Al Mercado Modelo por proveer las muestras.

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) y a PEDECIBA.

REFERENCIAS

- Allende, A. y Monaghan, J., 2015. Irrigation water quality for leafy crops: a perspective of risks and potential solutions. En: *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12 (7), pp.7457-7477.
- AOAC International, 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20va ed. Maryland: AOAC. Official Method 986.15, first action 1986-final action 1988.
- Burlo, F., Guijarro, I., Barrachina, A. y Valero, D., 1999. Arsenic species: Effects on and accumulation by tomato plants. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, pp.1247-1253.
- Islam, M.S., Ahmed, M.K., Habibullah-Al-Mamun, M., Raknuzzaman, M., Ali, M.M. y Eaton, D.W., 2016. Health risk assessment due to heavy metal exposure from commonly consumed fish and vegetables. En: *Environment Systems & Decisions*, 36(3), pp.253-265.
- La Gra, J., Katinoja, L. y Apízar K., 2016. *Metodología de evaluación de cadenas agroalimentarias para la identificación de problemas y proyectos* [En línea]. San José: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. [Consulta: 26 de agosto de 2019]. Disponible en: <http://repiica.iica.int/docs/B4231e/B4231e.pdf>
- Lasat, M., 2000. *The use of plants for the removal of toxic metal from contaminated soil* [En línea]. Pensilvania: American Association for the Advancement of Science, Environmental Science and Engineering Fellow. [Consulta: 22 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyPDF.cgi/9100FZE1.PDF?Dockey=9100FZE1.PDF>
- Magnusson, B. y Örnemark, U., 2014. *Eurachem guide: the fitness for purpose of analytical methods – a laboratory guide to method validation and related topics*. 2a ed. Torino: Eurachem. ISBN: 978-91-87461-59-0
- Mañay, N., Goso, C., Pistón, M., Fernández-Turiel, J.L., García-Vallés, M., Rejas, M. y Guerequiz, R., 2013. Groundwater arsenic content in Raigón Aquifer system (San José, Uruguay). En: *Revista de la Sociedad Uruguaya de Geología*, 18, pp.20-38.
- Mañay, N., Pistón, M., Cáceres, M., Pizzorno, P. y Bühl, V. 2019. An overview of

- environmental arsenic issues and exposure risks in Uruguay. En: *Science of the total Environment*, 686, pp.590-598.
- Mengel, K., Kirkby E.A., Kosegarten H. y Appel T., 2001. *Principles of plant nutrition*. 5a. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. ISBN: 978- 94- 010- 1009- 2.
- MERCOSUR, 2011. Reglamento Técnico Mercosur MERCOSUR/GMC/RES. N° 12/11 [En línea]. Asunción: MERCOSUR. [Consulta: 22 de agosto de 2019]. Disponible en: http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_12-11.pdf.
- Mikheev I.V., Karpukhina E.A., Usol'tseva L.O., Samarina T.O., Volkov D.S. y Proskurnin M.A., 2017. Application of microwave plasma atomic emission spectrometry and hydride generation for determination of arsenic and selenium in mineral water. En: *Inorganic Materials*, 53(14), pp.1422-1426.
- Nobrega, J.A, Trevizan, L.C., Araujo, G.C.L. y Nogueira, A.R.A., 2002. Focused-microwaveassisted strategies for sample preparation. A review. En: *Spectrochimica Acta Part B*, 57, pp.1855-1876.
- Nziguheba, G. y Smolders, E., 2008. Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. En: *Science of The Total Environment*, 390(1), pp.53-57.
- Rehman, Z., Khan, S., Qin, K., Brusseau, M., Shah, M. y Din, I., 2016. Quantification of inorganic arsenic exposure and cancer risk via consumption of vegetables in southern selected districts of Pakistan. En: *Science of The Total Environment*, 550, pp.321-329.
- Rehman, Z., Khan, S., Brusseau, M. y Shah, M., 2017. Lead and cadmium contamination and exposure risk assessment via consumption of vegetables grown in agricultural soils of five-selected regions of Pakistan. En: *Chemosphere*, 168, pp.1589-1596.
- Rivera C.A. y Rodríguez M.R., 2010. *Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayo NMX-EC-17025-IMNC-2006* [En línea]. En: CENAM: Simposio de Metrología 2010. Santiago de Querétaro, México (27-29 de octubre de 2010). Santiago de Querétaro: CENAM. [Consulta: 6 de setiembre de 2019]. Disponible en: <https://www.cenam.mx/sm2010/info/pviernes/sm2010-vp03c.pdf>
- Tanabe, C.K., Hopfer H., Gilleland G., Liba A., Ebelerab S. E. y Nelson J., 2016. Total arsenic analysis in Californian wines with hydride generation – microwave plasma – atomic emission spectroscopy (HG-MP-AES). En: *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31, pp.1223-1227.
- Welz, B. y Sperling, M., 1999. *Atomic absorption spectrometry*. 3a ed. Berlín: Wiley-VCH. ISBN 3-257-28571-7.
- Williams, C., Amais, R., Fontoura, B., Jones, B., Nobrega, J. y Donati, G., 2019. Recent developments in microwave-induced plasma optical emission spectrometry and applications of a commercial Hammer-cavity instrument. En: *Trends in Analytical Chemistry*, 116, pp.151-157.
- World Health Organization, 2018. *Arsénico* [En línea]. Ginebra: WHO. [Consulta: 26 de agosto de 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/arsenic>