

INNOTEC ISSN 1688-6593 [en línea]

es una revista científica arbitrada editada por el Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

EQUIPO EDITORIAL

Dirección

Dr. Jorge Silveira
Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

Consejo editorial

Dra. Sofia Barrios
Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ingeniería,
Instituto de Ingeniería Química, Uruguay

MBA. Ing Mariela De Giuda

Gerente de Tecnología y Gestión, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

Dr. Andrés Dieste

Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ingeniería, Instituto de Ingeniería Química, Uruguay

Dr. Gustavo Domínguez

Gerente de Latitud - Fundación LATU, Uruguay

Dra. Gabriela Eguren

Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ciencias, Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Uruguay

PhD. Federico Harte

Profesor adjunto de Food Science, Penn State University, Estados Unidos

MSc. Rosa Márquez

Latitud - Fundación LATU, Uruguay

Dr. Eduardo Méndez

Universidad de la República (UdelaR), Facultad de Ciencias, Instituto de Química Biológica, Uruguay

PhD. Laura Moya Silva

Universidad ORT Uruguay, Facultad de Arquitectura, Uruguay

Dr. Daniel Vázquez

INIA La Estanzuela, Plataforma de Agroalimentos, Uruguay

MSc. Daniel Volpe

Gerente de Análisis, Ensayo y Metrología, Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU), Uruguay

EDITORAS ASOCIADAS

QF Cristina Álvarez

Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR)

Ing. Quím. Isabel Dol

Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR)

Dra. Inés Viera

Departamento Estrella Campos, Facultad de Química, Universidad de la República (UdelaR)

EDICIÓN

Lic. Marina Barrientos

Edición revistas INNOTEC, Centro de Información Técnica, Laboratorio Tecnológico del Uruguay-LATU, Uruguay

ACERCA DE INNOTEC

INNOTEC es una publicación arbitrada en modalidad doble ciego por un comité independiente de revisores externos a su entidad editora, el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). Editada en Montevideo, Uruguay, contiene artículos originales inéditos y su periodicidad es semestral (enero-junio y julio-diciembre).

El objetivo de la revista es la divulgación y transferencia del conocimiento en las áreas de Forestales, Medio Ambiente, Metrología y Tecnología Alimentaria. INNOTEC está dirigida a académicos, investigadores y técnicos de la comunidad científica uruguaya e internacional.

INNOTEC se encuentra indexada en las siguientes bases de datos: Latindex, Google Académico, Fuente Académica Premier de EBSCOhost y DOAJ.



La colección completa se puede consultar en línea en <http://ojs.latu.org.uy/index.php/INNOTEC/index>

Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional.

Los conceptos y opiniones vertidas en los artículos aquí publicados, así como el uso que otros puedan hacer de ellos, son de responsabilidad exclusiva de los autores y no reflejan el punto de vista del Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

INNOTEC - NÚMERO 17

Enero a junio de 2019

ISSN electrónico: 1688-6593

Título clave: INNOTEC (En línea)

Título clave abreviado: Innotec (En línea)

Centro de Información Técnica, LATU

Av. Italia 6201. Tel. (598) 2601 3724,

internos 1314 y 1350

ditec@latu.org.uy

<http://www.latu.org.uy>

<http://ojs.latu.org.uy>

Administración de OJS y gestión de información

Lic. Lorena Fiori,

Centro de Información Técnica. Laboratorio

Tecnológico del Uruguay-LATU, Uruguay

DISEÑO Y ARMADO

Manosanta Desarrollo Editorial

contacto.manosanta@gmail.com

<http://manosanta.com.uy>

SUMARIO

Artículos

- 10 Relevamiento de la concentración de arsénico total en agua proveniente de varias fuentes en una zona arrocerá del Uruguay**
Survey of the total arsenic concentration in the water coming from several sources in a rice area of Uruguay
Falchi, Lucía; Pizzorno, Paulina; Iaquinta, Fiorella; Cousillas, Adriana
- 18 Diseño, construcción y evaluación de un analizador autónomo in situ para la monitorización de los niveles de fósforo y nitrógeno en aguas superficiales. Primeros resultados**
Design, construction and evaluation of an in situ autonomous analyser for monitoring of phosphorus and nitrogen levels in surface waters. First results
Knochen, Moisés; Roth, Guillermo; González, Pablo; Pérez, Nicolás; Monzón, Pablo; Del Castillo, Mariana.
- 31 Determinación de potenciales contaminantes inorgánicos en muestras de suelos y aguas del territorio uruguayo en la Antártida**
Determination of potential inorganic contaminants in samples of soils and waters of the Uruguayan territory in Antarctica
Belluzzi Muiños, Marcelo; Lopes Fialho, Lucimar; Pistón, Mariela
- 47 Recuperación de resinas polifuncionales para purificación del agua: estudios adsorptivos con azul de metileno y naranja de metilo**
Recovery of polifunctional resins for water purification: adsorption studies with methylene blue and methyl orange
Assis, João Matheus Cassiano; Pastre, Ieda Aparecida; Silva, Matheus Antônio.
- 57 Valor nutricional de *Moringa stenopetala*: determinación de micro y macronutrientes esenciales, vitamina C y factor de transferencia a infusiones**
Nutritional value of *Moringa stenopetala*: determination of micro and macro essential nutrients, vitamin C and transfer factor to infusions
Machado, Ignacio; Tissot, Florencia; Bühl, Valery; Santander, Jessica; Falchi, Lucía; Chambón, Jessica.
- 66 Implementación de un método para el análisis de glifosato en miel por LCMS/MS, utilizando QuPPE para la preparación de muestra**
Implementation of a methodology for the analysis of glyphosate in honey by LC-MS/MS, using QuPPE for sample preparation
Jesús, Florencia; Pequeño, Fiamma; Gérez-García, Natalia; Niell, Silvina; Cesio, María Verónica; Heinzen, Horacio.
- 78 Comparación de diferentes métodos de extracción para la determinación del perfil lipídico en semillas de quinoa**
Comparison of different extraction methods for the lipids profile determination in quinoa seeds
Taborda, Belén; Telles, Inés; Pareja, Lucía; Niell, Silvina; Jesús, Florencia; López, Andrés
- 88 Desarrollo de un método multiresiduo para la evaluación en leche cruda de residuos de organofosforados y piretroides aplicados comúnmente en ganadería**
Development of a multiresidue method for the evaluation in raw milk of organophosphorus and pyrethroids residues commonly applied in livestock production
Gérez García, Natalia; Bertón Passarino, Analía; Gil Borba, Guillermo; Cesio, María Verónica; Heinzen, Horacio.
- 102 Optimización de un método primario para la determinación de creatinina en suero humano mediante GC-IDMS**
Optimization of a primary method for the determination of creatinine in human serum by GC-IDMS
Silva, Ana Inés; Almirón, Florencia; Ferreira, Elizabeth; Pistón, Mariela

NOTA TÉCNICA

- 117 Uso de nuevas tecnologías para obtener una producción más limpia**
Use of new technologies to obtain a cleaner production
Barros, Carolina; García, Irene

POLÍTICA EDITORIAL DEL LATU

La actividad editorial del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU) tiene como finalidad la difusión en la comunidad académica y profesional uruguaya de las investigaciones que apoyen el desarrollo de tecnologías y modelos de gestión que aporten valor a los procesos de innovación.

Misión

Nuestra misión es la publicación de trabajos originales, con un enfoque de rigor y calidad teórica y metodológica, que contribuyan a la producción sistemática de nuevo conocimiento científico tecnológico y al fortalecimiento de la presencia uruguaya en redes regionales e internacionales. Es de interés del LATU consolidar el campo de la documentación científica a nivel local mediante la creación e innovación de productos editoriales.

Los objetivos específicos son:

- Promover la publicación de investigaciones de excelencia en las áreas de conocimiento estratégicas del LATU, alineadas a su misión como impulsor del desarrollo sustentable del país y su inserción internacional a través de la innovación.
- Posicionar a los autores, técnicos y colaboradores en las plataformas electrónicas internacionales, estimulando su participación en el marco de un proceso de edición arbitrado por especialistas.
- Contribuir al desarrollo y transferencia de tecnologías de innovación orientadas a la mejora de procesos industriales, empresariales y sociales.
- Aportar y divulgar conocimiento científico de calidad a los técnicos, académicos, investigadores y a la sociedad en su conjunto, tanto para la efectiva transmisión de las experiencias como para el crecimiento profesional.
- Facilitar el intercambio y la creación de nuevo conocimiento entre instituciones.

Invitamos a los autores interesados en publicar en INNOTEC a ingresar a nuestra página en la plataforma Open Journal Systems (<http://ojs.latu.org.uy>) o a contactarse con el Centro de Información Técnica del LATU a través del correo electrónico ditec@latu.org.uy para recibir instrucciones para el envío de artículos a nuestro proyecto editorial.

CÓDIGO ÉTICO DE INNOTEC

La revista INNOTEC adhiere a los principios publicados por COPE (Committee on Publication Ethics) en <https://publicationethics.org/resources/code-conduct> y promueve así la conducta ética de todos los participantes del proceso editorial: autores, revisores y equipo editorial.

Los autores se comprometen a:

- Enviar artículos originales, de su autoría y que no infrinjan derechos de propiedad intelectual y/o derecho de imagen y/o de datos personales de terceros, e inéditos, que no hayan sido presentados simultáneamente a otra publicación.
- Asegurar la veracidad de los datos presentados en su investigación.
- Asegurar la integridad de su investigación, evitando la publicación de resultados parciales.
- Consignar a los autores de acuerdo al nivel de responsabilidad intelectual que han tenido en la elaboración del artículo, en orden decreciente, sin que medien otros criterios jerárquicos.
- Designar un autor de correspondencia, que asume la responsabilidad de difundir entre todos los autores los avances y resultados del proceso editorial.
- Identificar debidamente las fuentes originales de los trabajos que cita en su artículo.
- Revisar los antecedentes de otras investigaciones del ámbito teórico inmediato de su trabajo para dar cuenta de la información más actualizada y relevante.
- Reconocer los apoyos académicos, financieros y logísticos que hicieron posible la investigación y/o la elaboración del artículo.

Los revisores se comprometen a:

- Declarar que no existe conflictos de interés para la evaluación de un artículo.
- Realizar su evaluación respondiendo a criterios objetivos y respetando su independencia académica.
- Asegurar la confidencialidad tanto del contenido del artículo como del resultado de su evaluación.
- Preservar el anonimato en todo el proceso, apelando al editor como intermediario de cualquier comunicación con los autores.
- Respetar los tiempos acordados con los editores de la revista para la realización de su trabajo.

El equipo editorial se compromete a:

- Asegurar la honestidad y transparencia de todo el proceso editorial, desde la presentación del artículo, evaluación por pares y publicación en las condiciones pautadas.
- Seleccionar los revisores idóneos para cada trabajo.
- Garantizar la independencia de criterio de los revisores en el ejercicio de su rol.
- Asegurar el anonimato de todas las partes involucradas en el proceso de arbitraje por pares.
- Mediar en posibles conflictos de interés con el apoyo del consejo editorial.
- Velar por el cumplimiento de los plazos acordados en cada fase del proceso.
- Difundir los números publicados en las redes académicas y bases bibliográficas de su entorno local y regional.
- Controlar el cumplimiento de los requisitos por parte de los autores y la actuación acorde de los árbitros.
- Identificar casos de incumplimiento de los compromisos éticos enumerados en este código y penalizar a sus responsables con sanciones que van de la suspensión del infractor en su rol en el proceso editorial a la difusión de una rectificación pública y la remoción del artículo.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES PARA PUBLICAR EN INNOTEC

Ámbito de los artículos y proceso de revisión

INNOTEC publica artículos originales inéditos en español e inglés. Los campos temáticos que aborda responden a las áreas estratégicas de investigación del LATU: Forestales, Medio Ambiente, Metrología y Tecnología Alimentaria.

Esta publicación semestral arbitrada por un comité de revisores externos, recopila las investigaciones realizadas en el marco de distintos proyectos y procesos de transferencia de conocimiento para el desarrollo de sistemas innovadores, productivos y de investigación.

Las publicaciones editadas por el Centro de Información Técnica son gestionadas en Open Journal Systems, software para la gestión del proceso editorial, desarrollado, soportado y libremente distribuido por el Public Knowledge Project bajo licencia pública general GNU.

INNOTEC no cobra cargos de ningún tipo por el envío de originales ni por su procesamiento. El tiempo estimado para los procesos de evaluación y publicación es de 8 a 12 semanas.

El proceso de envío de artículos para la revista incluye los siguientes pasos:

- (a) Ingreso por parte del autor del artículo completo en el sistema utilizado por el Centro de Información Técnica para la edición de sus publicaciones en la web: <http://ojs.latu.org.uy>.
- (b) Por medio del sistema se notifica al autor la recepción del artículo y su eventual publicación. En este paso se considera la originalidad del trabajo y se priorizan aquellos de áreas estratégicas y temáticas nacionales.
- (c) Una vez aprobado por el Consejo editorial de la revista, el artículo es enviado a proceso de arbitraje.
- (d) Se asignan los árbitros, independientes y externos, quienes evaluarán el desarrollo específico del manuscrito, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos.
- (e) Devuelto el informe de arbitraje, el editor se comunica con el/los autor/es en respuesta de los comentarios que hace el evaluador del artículo. En caso de ser necesario habrá otras rondas de evaluación.
- (f) Se edita el artículo aplicando en el texto las normas del Manual de estilo del LATU y se envía la última versión diseñada al/los autor/es para su aprobación final.

Para poder incluir artículos completos, se debe considerar que estos no tengan derechos de autor otorgados a terceros a la fecha de envío y que no se hayan presentado a otras publicaciones simultáneamente. Los artículos son publicados en OJS y se distribuyen bajo la modalidad de acceso abierto. Los derechos autorales son protegidos por Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial 4.0 Unported. Al ingresar al sistema <http://ojs.latu.org.uy> los autores deberán aceptar la nota de copyright en la que se asumen los términos de responsabilidad, se reconoce la licencia CC y se establece el compromiso a realizar la cita completa de la edición institucional de esta primera publicación del artículo en sus siguientes publicaciones –completas o parciales– efectuadas en cualquier otro medio de divulgación, impreso o electrónico.

Los autores están autorizados a realizar una publicación simultánea en sistemas de autoarchivo o repositorios institucionales.

Los conceptos y opiniones vertidos en los artículos publicados y el uso que otros puedan hacer de ellos son de responsabilidad de sus autores. Esta responsabilidad se asume con la sola publicación del artículo enviado. El LATU se reserva el derecho de publicar aquellos artículos que responden a las áreas estratégicas fijadas por la organización para cada edición y de realizar modificaciones que considere favorables a la óptima presentación de los contenidos en la revista.

PROCESO DE REVISIÓN

El arbitraje de esta revista se realiza por pares y bajo modalidad doble ciego, por lo que autores y árbitros permanecen anónimos a lo largo de todo el proceso. El arbitraje es el proceso de evaluación crítica especializada de un manuscrito por parte de pares idóneos que operan en el área temática que dicho texto desarrolla. Cada artículo es revisado por un mínimo de dos árbitros. Los comentarios y recomendaciones de los evaluadores son un insumo determinante para la aceptación o rechazo de un manuscrito en el proceso editorial de publicaciones técnicas del LATU, no obstante el equipo editor es responsable de la decisión final de publicación o rechazo de un artículo y de la notificación al autor de contacto.

El comité técnico de arbitraje de INNOTEC es un cuerpo de especialistas técnicos seleccionados por su grado de especialización, prestigio académico y experiencia profesional y editorial. Nuestros árbitros cumplen la vital función de evaluar el desarrollo específico del contenido de las publicaciones, tanto en sus aspectos temáticos como metodológicos, guiados por un formulario de revisión que una vez completo es presentado a los autores del artículo.

Los autores cuentan con un plazo de siete días para la devolución del artículo corregido según las recomendaciones de los árbitros.

NORMAS DE PRESENTACIÓN Y ENVÍO DE LOS TEXTOS

Para que el artículo sea considerado para su publicación, debe cumplir con las siguientes normas de presentación. Ante cualquier consulta diríjase al correo electrónico de referencia ditec@latu.org.uy.

Para el correcto envío de su artículo, siga las instrucciones que se indican en OJS. Recuerde completar todos los datos del artículo, entre ellos: título, autores, filiación, resumen y palabras clave.

Nota: Los nombres completos de los autores deberán ser incluidos en los metadatos en la forma en la que se solicitan en OJS pero omitidos en el documento Word del artículo, primera medida para asegurar la integridad de la revisión ciega.

DEFINICIONES:

Autor. Persona o colectividad responsable del contenido intelectual del documento.

Título. Refleja el contenido del texto con precisión, es neutro e informativo.

Resumen. Provee información específica. Sintetiza, anuncia y jerarquiza contenidos.

Introducción. Incluye antecedentes concretos y datos del proceso, enumeración de objetivos e importancia del tema.

Materiales y métodos. Relato de los métodos y procedimientos que permitieron obtener los resultados presentados. Obtención del material, condiciones y metodología. Análisis estadísticos, programas.

Resultados. Presentación y expresión de los hallazgos en tablas, gráficos y/o figuras.

Discusión y conclusiones. Síntesis de los avances y las contribuciones más relevantes de la investigación. En esta sección se discuten los resultados en el orden en el que fueron presentados. Asimismo, se define y diferencia claramente el aporte del trabajo en relación al conocimiento previo. Si procede, se mencionan posibles líneas futuras de investigación y de aplicación de los resultados.

Reconocimientos. Breve agradecimiento a quienes colaboraron en la producción del artículo y/o que permitieron el desarrollo de la investigación.

Referencias. Referencias al material bibliográfico consultado para la elaboración del artículo.

LOS ARTÍCULOS DEBEN PRESENTAR:

Título del artículo en mayúsculas y minúsculas, en inglés y español.

Nombre completo de todos los autores (solo en metadatos de OJS), ingresados en orden decreciente según el grado de responsabilidad en el desarrollo del artículo, sin que medien jerarquías funcionales. Indicar la sección o departamento al que pertenecen y empresa de la que forman parte. Se debe señalar además el autor de contacto para las comunicaciones electrónicas subsiguientes. Los autores deberán contar con un número de registro en ORCID, que se consigna en OJS al ingresar los autores en metadatos. Para más información sobre ORCID y su relevancia para los autores puede consultar esta página: <https://orcid.org/>.

Resumen en inglés y español, de 200 palabras máximo en su versión castellana.

Palabras clave, de dos a cinco, las cuales no deben repetir los términos ya utilizados en el título.

Texto de tres (3) a veinticinco (25) páginas de desarrollo (introducción, métodos, descripción de equipos, descripción de programas, desarrollo de teorías, resultados y discusión, conclusiones, referencias, tablas, figuras, gráficos e imágenes, (ver sección Estilo y formato de citas y referencias en este documento). El texto deberá ser presentado en fuente Arial 11, a espacio doble y con numeración de líneas, con títulos en mayúsculas y minúsculas y en formato .doc, de cualquier versión de Microsoft Word.

Secciones. Los títulos de sección (que señalan Introducción, Materiales y Métodos, Discusión, etc.) deben ser escritos en mayúscula y minúsculas, estilo de fuente bold y centrados en el texto. Los

subtítulos serán justificados a la izquierda, escritos en mayúscula y minúsculas, también en bold. Tanto la primera letra del título y la primera letra de los nombres propios deben ser escritas en mayúscula. Se debe dejar un espacio entre líneas antes y después de cada subtítulo.

Fórmulas, figuras, tablas y gráficos. Las figuras deben numerarse correlativamente en orden de aparición en el texto, y deben incluir un breve título explicativo en el margen inferior. Si es necesario incluir fotos o imágenes, estas se deben designar como figuras, deben ser nítidas y enviadas en formato jpg (mínimo 300 px aseguran una buena calidad de visualización). Las tablas deben ser numeradas correlativamente y en forma independiente de las figuras, y cada entrada debe ocupar su propia celda. Las tablas se numeran según el orden de aparición en el texto, y su título explicativo debe ubicarse en el margen inferior. Evite utilizar líneas verticales, incluir más de dos tablas por carilla y dividir tablas en más de un folio o en forma perpendicular al texto. Recuerde que el texto presenta las tablas, no desarrolla su contenido, estas deben explicarse en sí mismas.

Los gráficos deben ser enviados en formato xls o doc, con los datos editables, para su eventual utilización en la etapa de diseño. No se consideran válidos los gráficos enviados en formato jpg, salvo en los casos en los que hayan sido creados en programas que no habilitan la exportación a Excel.

Además de estar insertadas en el artículo, cada figura, gráfico y tabla debe ser remitida en su propio archivo como fichero complementario en OJS, con la referencia numérica correspondiente. Los números y símbolos empleados no deben ser menores al tamaño usado en el resto del texto (Arial 11).

Evite las notas al pie en el desarrollo del artículo.

Denominaciones en latín: deben ir en cursiva.

ESTILO DE CITAS Y REFERENCIAS SEGÚN EL SISTEMA HARVARD

Si el texto está en inglés utilizar “and” en lugar de “y”, “In:” en lugar de “En:”, “[Accessed: day month year]” en lugar de “[Consulta: día mes año]” y “Available at:” en lugar de “Disponible en:”

Ejemplos usuales de citas

Registro de citas textuales

(López, 1985, p.93)

(González y Rubio, 1990, pp.110-111)

(Johnson, et al., 1970, pp.25-26)

Para más de una obra del mismo autor y año en citas textuales

(Alonso, 1988a, p.126-128)

(Alonso, 1988b, p.84)

Registro de cita ideológica o paráfrasis

Amor (2000) analiza los motivos para comenzar un negocio en línea...

Si el motivo para comenzar un negocio en línea es sólo para imitar a la competencia, se puede considerar que dicha razón no es la estrategia adecuada (Amor, 2000).

(Pérez y González, 2005)

(Rodríguez, et al., 2011).

(Pérez, 2014a)

(Pérez, 2014b)

EJEMPLOS USUALES DE REFERENCIAS MONOGRAFÍAS (LIBROS)

Apellidos(s), Nombre o Inicial, año de edición. Título del libro en cursiva. N^o de edición. Lugar de edición: editorial.

(Serie; N^o). ISBN (Este último si se posee)

Bobbio, Norberto, 1958. Autobiografía. Madrid: Taurus. ISBN: 84-306-0267-4.

Newman, R., Walter, C., 2008. Barley for food and health: science, technology, and products. Nueva York: John Wiley & Sons

REVISTAS COMO UN TODO

Título de la publicación en cursiva. Responsabilidad. Edición. Identificación del fascículo. Lugar de edición: editorial, fecha del primer volumen-fecha del último volumen. ISSN

Boletín Económico. Banco de España. 1998, (1). Madrid: Banco de España, Servicio de Publicaciones, 1979- . ISSN: 0210-3737

ARTÍCULOS DE REVISTAS

Apellido(s), Nombre o Inicial, año. Título del artículo. En: Título de la publicación seriada, Volumen(Número), páginas.

Llosa, J., Smith, M., Moore, A. y Cave, K., 1998. Modulo scheduling with reduced register pressure. En: IEEE Transactions on computers, 47(6), pp.625-638.

Álvarez, Begoña, Ballina, F. Javier de la y Vázquez, Rodolfo, 2000. La reacción del consumidor ante las promociones. En: MK Marketing + Ventas, (143), pp.33-37.

NORMAS

Entidad responsable de la norma (País de la entidad), año de publicación. No. o código de la norma: Título. Lugar de publicación: editorial abreviada.

Asociación Española de Normalización y Certificación (España), 2010. UNE 166000 EX, UNE 166001 EX, UNE 166002 EX: Gestión de la I+D+I. Madrid: AENOR.

Instituto Uruguayo de Normas Técnicas (Uruguay), 2000. UNIT-ISO 9001: Sistemas de gestión de calidad - requisitos. Montevideo: UNIT.

TEXTOS ELECTRÓNICOS, BASES DE DATOS Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Responsabilidad principal, año. Título [tipo de soporte]. Edición. Lugar de publicación: editor, [fecha de consulta]. Descripción física. (Colección). Notas. Disponibilidad y acceso. Número normalizado

Rapp, A. O., Augusta, U. y Peek, R. D., 2001 Facts and ideas of testing wood durability above ground [En línea]. Hamburgo: BFH. [Consulta: 25 de setiembre de 2008]. Disponible en:

<http://www.bfah.de/inst4/43/pdf/3doublay.pdf>

PATENTES

Mención de responsabilidad principal, Año de publicación del documento. Denominación del elemento patentado. Identificador del documento (país u oficina que lo registra). Clase internacional de documento de patente. Número.

Green, Daniel R., 2008. Cereal flake with topical pieces. United State Patent. 0101. D572,427.

Crosa, M. J., Harispe, R., Repiso, L., Silvera, C. y Wurtz, P., 2009. Sistema que acelera el ingreso de solutos en alimentos porosos. Uruguay. Dirección Nacional de la Propiedad Industrial. 31620.

Relevamiento de la concentración de arsénico total en agua proveniente de varias fuentes en una zona arrocerá del Uruguay

Survey of the total arsenic concentration in the water coming from several sources in a rice area of Uruguay

RECIBIDO: 17/10/2018 → APROBADO: 27/11/2018 ✉ lfalchi@fq.edu.uy

✉ FALCHI, LUCÍA (1); PIZZORNO, PAULINA (2); IAQUINTA, FIORELLA (1); COUSILLAS, ADRIANA (2)

(1) ÁREA QUÍMICA ANALÍTICA, DEPARTAMENTO ESTRELLA CAMPOS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.

(2) CEQUIMTOX. ÁREA TOXICOLOGÍA, DEPARTAMENTO ESTRELLA CAMPOS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

El Arsénico (As) es un elemento natural de la corteza terrestre de gran relevancia toxicológica debido a los efectos nocivos sobre la salud que provoca su exposición. Los elevados niveles de As en agua subterránea en Argentina y Chile son ampliamente estudiados y conocidos, no obstante, en Uruguay existen escasos estudios de investigación sobre el tema. En este trabajo se realizó la determinación de As total en muestras de agua mediante espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS). La metodología se basó en el método normalizado de la American Public Health Association (APHA 3114 B) y se evaluó la linealidad, la precisión y la veracidad como parámetros de desempeño para su implementación. Fueron analizadas 49 muestras de agua superficial y subterránea provenientes de una zona del país que se caracteriza por el cultivo de arroz. Los resultados obtenidos no superan el nivel de As establecido por la normativa uruguaya ($20 \mu\text{g L}^{-1}$) y se observan valores más elevados en aguas subterráneas que en las superficiales. Este trabajo es un primer aporte para conocer los niveles de As total en agua que se utiliza para uso doméstico y en los cultivos de arroz.

PALABRAS CLAVE: As, agua subterránea, arroz, HG-AAS.

ABSTRACT

Arsenic (As) is a natural element of the earth's crust. Due to the health effects caused by its exposure, it has a great relevance in toxicological studies. The high

levels of As in groundwater in Argentina and Chile are widely studied and known. However, in Uruguay there are few research studies based on the levels of As in water. In this work the determination of the total As in water samples was carried out, using atomic absorption spectrometry with hydride generation (HG-AAS). The methodology was based on the standardized method of the American Public Health Association APHA 3114 B. We evaluated linearity, accuracy and veracity as performance parameters for its implementation. A total of 49 samples of surface and underground water were analyzed. The results did not exceed the standards level established in Uruguayan regulations ($20 \mu\text{g L}^{-1}$). Also, higher values were observed in groundwater rather than in surface water. This research is an initial work to know the As levels in water used for domestic purposes and rice plantations in Uruguay.

KEYWORDS: As, underground water, rice, HG-AAS.

INTRODUCCIÓN

El Arsénico (As) es un metaloide presente en la naturaleza, ampliamente distribuido en la corteza terrestre: en agua, aire y suelo. Es capaz de formar compuestos orgánicos e inorgánicos y presentarse en distintos estados de oxidación (-III, 0, +III, +V). Las especies químicas más relevantes del As son: arseniato [As(V)], arsenito [As(III)], formas metiladas de As V y As III, arsenobetaína, arsenocolina, arsenoazúcares y arsenolípidos. Las especies inorgánicas de As son las de mayor toxicidad frente a las orgánicas (WHO, 2001; WHO, 2011; Litter, et al., 2009). La Agencia para las sustancias tóxicas y el registro de enfermedades (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR) ubica al As en el primer lugar de la lista de prioridad de sustancias toxicológicamente relevantes (ATSDR, 2017). La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo considera dentro de las diez sustancias más preocupantes para la salud pública (WHO, 2018) y el Centro Internacional de Investigaciones sobre Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC) ha clasificado al As como cancerígeno para seres humanos (IARC, 2014).

Las principales vías de exposición son el aire, el agua, el suelo y los alimentos. A excepción de la contaminación antropogénica, los mayores niveles de As se han encontrado en los recursos hídricos subterráneos, debido a los procesos de interacción natural de agua-roca y a la elevada relación de sólidos en solución que se encuentra en los acuíferos (Mañay, 2013).

El principal problema para la salud pública radica en el uso de agua contaminada, para beber, preparar alimentos y regar cultivos agropecuarios. Los síntomas de intoxicación aguda involucran principalmente entumecimiento de los pies y las manos, calambres musculares y ocasionalmente la muerte. La exposición crónica a bajos niveles de As inorgánico debido a la ingesta de agua contaminada incluye: cambio de pigmentación de la piel, lesiones cutáneas, hiperqueratosis, además de cáncer de piel, vejiga, pulmón y riñones (WHO, 2018; Mañay, 2013; Spratlen, 2017).

La presencia de altos niveles de As en el agua es un tema prioritario de preocupación ambiental, ya que limita el uso del recurso de agua potable e impide el crecimiento socioeconómico, la sostenibilidad del uso racional de los suelos y el desarrollo sostenible de la agricultura (Litter, et al., 2009). Esta preocupación, junto con los efectos tóxicos en la salud humana y animal y las consecuentes repercusiones patológicas asociadas con su exposición, ha llevado a profundizar su estudio y desarrollar diversas metodologías analíticas capaces de estudiar al As en sus diferentes formas y concentraciones, incluso a niveles de traza. Existen diversas metodologías para la determinación de As; la espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros (HG-AAS) y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) son las más utilizadas hoy en día, ya que son compatibles para la detección y cuantificación de As de acuerdo con los límites impuestos por la legislación para su contenido en agua potable. En la mayoría de los países este límite se ha fijado recientemente en $10 \mu\text{g L}^{-1}$ como valor objetivo de acuerdo a las recomendaciones de la OMS (WHO, 2018; Litter, et al., 2009).

Debido a la introducción de estos nuevos límites internacionales, la determinación de As en agua comenzó a tener relevancia geoquímica-ambiental en Uruguay. En noviembre de 2011 se aprobó en el país el Decreto N° 375/011 (Uruguay, 2011) que establece que la norma UNIT 833 (Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 2008) define los parámetros requeridos para el agua. Allí se determina que los niveles de As total deberán ser menores a $20 \mu\text{g L}^{-1}$, con el objetivo de alcanzar las recomendaciones de la OMS (Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 2008).

Dada la relevancia en la salud pública y el impacto ambiental que representa la presencia de As en agua en altas concentraciones, así como las escasas referencias bibliográficas sobre la situación en Uruguay, este estudio surge con el fin de realizar un relevamiento de sus niveles en una zona del país dedicada al cultivo de arroz altamente demandante de agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

La región de muestreo se ubica al noreste de Uruguay, en el departamento de Treinta y Tres, y es reconocida por el cultivo de arroz. Se tomaron muestras dentro del predio de una empresa arrocera interesada en conocer los niveles de As del lugar. Los puntos de muestreo fueron aguas superficiales de la laguna Merín, de donde surgen los canales que abastecen a las plantaciones, y varios puntos en los canales. Además, se tomaron muestras de aguas subterráneas de los pozos que la suministran al poblado vecino y a las oficinas e instalaciones de la empresa arrocera. Se recolectaron muestras de agua en las localidades de Vergara y Cebollatí y en el río Cebollatí. Estas muestras de zonas aledañas se consideran control, ya que son localidades cercanas a la zona de interés y el agua proviene de la misma cuenca principal, la Laguna Merín o acuífero Chuy. Se realizó el muestreo de

forma no probabilística por conveniencia, abarcando todas las áreas a las que se tuvo acceso dentro de la empresa arrocera y en las ciudades aledañas. En total se recolectaron 49 muestras.

Tanto la toma como la conservación de las muestras se realizó según recomendaciones de APHA (American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation, 2012). Para la recolección de agua subterránea se limpió la tubería de salida dejándola correr unos 3 minutos y se hizo la toma de muestra. Las muestras de agua superficial fueron extraídas de preferencia en la zona central y de una zona donde fluía el agua pero sin turbulencia. Se evitó tomar agua de las márgenes del río, ya que allí no está perfectamente mezclada y puede haber sufrido efectos de evaporación o de contaminación. Las muestras fueron colectadas en frascos de polipropileno de 500 mL con la adición de ácido nítrico al 5 %v/v para su conservación, transporte y posterior análisis en el laboratorio.

Análisis

La determinación de As total en las muestras de agua se realizó en el CEQUIMTOX (Centro Especializado en Química Toxicológica - Facultad de Química) mediante espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros (HG-AAS), basada en el método normalizado de APHA 3114 B (American Public Health Association, American Water Works Association and Water Environment Federation, 2012). Se analizó cada muestra por duplicado, con un tratamiento inicial de digestión abierta utilizando ácido clorhídrico concentrado y posterior agregado del agente reductor yoduro de potasio 20 % m/v.

Se verificó la metodología evaluando los siguientes parámetros de desempeño: linealidad, precisión, veracidad (muestras fortificadas a dos niveles y material de referencia certificado: LATU MRC. INO. 101), límites de detección y cuantificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La metodología para la determinación de As se adaptó basándose en las recomendaciones de la APHA con el objetivo de trabajar dentro de los lineamientos de la química verde, con el uso de la menor cantidad de reactivos, con la menor concentración posible y generando la menor cantidad de residuos, en el menor tiempo de análisis. Se realizó una digestión en condiciones fuertemente ácidas para eliminar materia orgánica presente. Luego de la digestión las muestras se redujeron con el agregado de yoduro de potasio para obtener la forma adecuada de As para la generación de hidruros. Se estudiaron parámetros de desempeño para evaluar las modificaciones realizadas y los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla 1.

TABLA 1. Parámetros de desempeño.

Parámetros de desempeño	Resultado
Linealidad (0-12 µg L ⁻¹)	R ² > 0.995
Precisión (n = 10, RSD)	<10%
Veracidad (n = 10)	75-125%
LOD (3s/b, n = 10)	0,5 µg L ⁻¹
LOQ (10s/b, n = 10)	1,5 µg L ⁻¹

Los resultados de As total obtenidos por el análisis de las muestras de agua recogidas en el predio de la empresa se agrupan en la Tabla 2. Se clasifican según su origen, superficial o subterránea, y se indica la cantidad de muestras por punto de muestreo analizadas. Se presentan en ambos casos las concentraciones máximas y mínimas encontradas para cada grupo de muestras. A su vez, se indican en la Tabla 3 los resultados de As obtenidos en las muestras provenientes de la zona aledaña a la empresa arrocera. Allí se especifican las ciudades muestreadas, la cantidad de muestras obtenidas en cada una y los valores mínimos y máximos en cada grupo de muestras.

TABLA 2. Resultados de As en aguas provenientes del predio de la empresa arrocera.

Concentración promedio de As (µg L ⁻¹)							
Agua superficial				Agua subterránea			
Lagunas (n = 6)	Canales (n = 9)	Chacra (n = 7)	Pozo ESCUELA (n = 2)	POZO 1 (n = 3)	POZO 2 (n = 9)	POZO 3 (n = 4)	POZO 4 (n = 2)
<1,5	<1,5	<1,5	5,6	9,5	6,3	7,9	2,2
Mín/Máx <0,5/2,2	Mín/Máx <0,5/2,4	Mín/Máx <0,5/2,4	Mín/Máx 4,7/6,4	Mín/Máx 8,9/10,3	Mín/Máx 5,4/8,2	Mín/Máx 6,3/10,5	Mín/Máx 1,2/2,8

TABLA 3. Resultados de As en las zonas aledañas.

Concentración promedio de As (µg L ⁻¹) en zonas aledañas			
Vergara	Cebollatí		Río Cebollatí
Ciudad (n = 1) < 0,5	Ciudad: punto 1 (n = 2)	Ciudad: punto 2 (n = 3)	(n = 1)
	4,9	10,7	6,5
--Mín/Máx 1,8/7,1	Mín/Máx 9,3/12,2		Mín/Máx -

La norma nacional UNIT 833 (Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 2008) determina el valor máximo permitido de As en $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para agua potable. Como se observa en los resultados tanto de las aguas superficiales como de las subterráneas, las concentraciones promedio de As obtenidas cumplen con la especificación. Esto es de significativa relevancia, ya que las aguas subterráneas de pozo son las que abastecen a la población de la zona y no se observa anomalía en la concentración de As que consumen.

Al comparar los resultados entre las aguas superficiales y subterráneas se observa diferencia entre las concentraciones encontradas en ellas. Las muestras provenientes de aguas superficiales en su mayoría poseen concentraciones bajas, menores a $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$, mientras que las subterráneas presentan casi en su totalidad valores de concentración de As mayores a $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Los resultados se representan de forma gráfica en la Figura 1, donde se dividió el rango de concentraciones de As obtenidas según las normativas legales y se evalúa si el mayor aporte de As proviene de aguas superficiales o subterráneas. Se observa claramente que para concentraciones desde el nivel de cuantificación hasta $20 \mu\text{g L}^{-1}$ el aporte que prima siempre es de origen subterráneo. Esta observación se puede deber a procesos de origen geogénico, a la composición y condiciones de suelo subterráneo. En general, el pH del suelo es levemente alcalino y junto con las condiciones reductoras se favorece la desorción del As desde fases adsorbidas del suelo, vertiéndose en el agua presente (Smedley y Kinniburgh, 2002).

La concentración de As encontrada tanto para aguas superficiales y subterráneas en el predio de la empresa arrocera, en el pueblo vecino y las zonas aledañas es en general similar, por lo que se podría atribuir la presencia de As en la zona a su proveniencia natural desde los suelos de la zona.

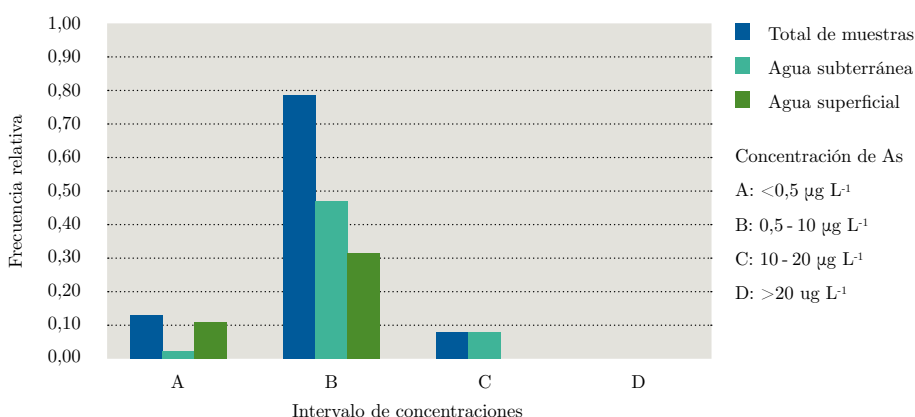


Figura 1. Frecuencia relativa de aguas superficiales y subterráneas frente al total de muestras dependiendo de la concentración de As total.

Según la OMS, el valor máximo permitido para As total es $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Este valor es el objetivo planteado según la norma nacional a implementarse como límite en un futuro cercano. Las concentraciones de As de algunas muestras analizadas en este trabajo, provenientes de pozos subterráneos que abastecen a la población, sobrepasan

ese valor. En Uruguay más de un tercio de la población utiliza agua subterránea para consumo doméstico (OSE, s.d.) y es un recurso ampliamente utilizado en el sector agroproductivo, por lo que el estudio de la calidad de agua en cuanto a su contenido de As es de gran relevancia.

Existen escasos estudios de investigación hoy en día en Uruguay. Son conocidos los relevamientos de Manganelli (2006) o Mañay (2013), por ejemplo, pero se encuentran en general relacionados a zonas del sur o suroeste de Uruguay. Por ello, este trabajo es un aporte inicial para conocer los niveles de As en agua de consumo humano en una zona puntual del noroeste del país no estudiada anteriormente, dando paso a que se inicien nuevos proyectos de investigación para su estudio en todo Uruguay.

Dada la conocida toxicidad de la especie inorgánica de As III y su estrecha relación con patologías en seres humanos, se continuará este trabajo con el desarrollo de la metodología para la determinación de las especies de As en agua. Luego se estudiará el grado de toxicidad y se realizará una evaluación de riesgo poblacional con el fin de aportar información a la salud pública.

CONCLUSIONES

Este estudio es un primer aporte al conocimiento de los niveles de As total en agua que se utiliza para consumo poblacional y de riego en plantaciones de arroz en una zona puntual del noreste de Uruguay. Si bien las concentraciones de As total se encontraron dentro de especificaciones de normativas nacionales, se encontraron concentraciones de As que sobrepasan los niveles objetivos del país para aguas potables de consumo humano.

REFERENCIAS

- American Public Health Association, American Water Works Association y Water Environment Federation, 2012. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22va ed. Washington: APHA. Standard Method 3114 CL, Approved 2009- Editorial Rev. 2011.
- ATSDR, 2017. *CERCLA Priority list of hazardous substances* [En línea]. Atlanta: ATSDR. [Consulta: 12 de octubre, 2018]. Disponible en: <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/previous/07list.html>
- IARC, 2014. *World cancer report*. Lyon: IARC.
- Instituto Uruguayo de Normas Técnicas, 2008. UNIT 833: *Agua potable-Requisitos*. Montevideo: UNIT.
- Litter, M., Armienta, M.A. y Farias, S.S., eds., 2009. *IBEROARSEN. Metodologías analíticas para determinación y especiación de As en aguas y suelos*. Buenos Aires: CYTED.
- Manganelli, A., Goso, C., Guerequiz, R., Fernández-Turiel, J.L., García Vallès, M. y Gimeno, D., 2006. Estudio preliminar del contenido de arsénico de las aguas subterráneas del suroeste de Uruguay. En: *Geogaceta*, 41, pp.115-118.

- 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 SUG*, 38, pp.20-38.
- OSE, [s.d.]. *Agua subterránea* [En línea]. Montevideo: OSE. [Consulta: 12 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://www.ose.com.uy/agua/agua-subterranea>
- Smedley, P. y Kinniburgh, D., 2002. A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. En: *Applied Geochemistry*, 17(5), pp.517-568.
- Spratlen M.J., Gamble M.V., Grau-Pérez, M., Kuo, C.C., Best, L.G., Yracheta, J., Francesconi, K., Goessler, W., Mossavar-Rahmani, Y., Hall, M., Umans, J.G., Fretts, A., Navas-Acien, A. Arsenic metabolism and one-carbon metabolism at low-moderate arsenic exposure: Evidence from the strong heart study. En: *Food and Chemical Toxicology Journal*, 105, pp.387-397.
- Uruguay. Decreto 129/009, de 03 de noviembre de 2011. *Diario Oficial*, 14 de setiembre de 2011, No. 28.348, p.11.
- WHO, 2018. *Arsenic* [En línea]. Geneva: WHO. [Consulta: 12 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/>
- WHO, 2011. *Guidelines for drinking-water quality* [En línea]. Geneva: WHO. [Consulta: 12 de octubre de 2018]. Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/9789241548151_toc.pdf
- WHO, 2001. *Arsenic and arsenic compounds* [En línea]. Geneva: WHO. (Environmental Health Criteria, 224). [Consulta: 12 de octubre de 2018]. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42366/WHO_EHC_224.pdf;jsessionid=1FC9D7D022CC57D77AAD352F36A11B55?sequence=1

Diseño, construcción y evaluación de un analizador autónomo *in situ* para la monitorización de los niveles de fósforo y nitrógeno en aguas superficiales. Primeros resultados

Design, construction and evaluation of an *in situ* autonomous analyser for monitoring of phosphorus and nitrogen levels in surface waters. First results

RECIBIDO: 15/10/2018 → APROBADO: 7/11/2018 ✉ mknochen@fq.edu.uy

✉ KNOCHEN, MOISÉS (1, 3); ROTH, GUILLERMO (1, 3); GONZÁLEZ, PABLO (1, 3); PÉREZ, NICOLÁS (2, 3); MONZÓN, PABLO (2); DEL CASTILLO, MARIANA (2)

(1) DEPARTAMENTO ESTRELLA CAMPOS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.

(2) INSTITUTO DE INGENIERÍA ELÉCTRICA, FACULTAD DE INGENIERÍA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.

(3) GRUPO DE INSTRUMENTACIÓN Y AUTOMATIZACIÓN EN QUÍMICA ANALÍTICA (GIAQA), FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

Se describe un prototipo de analizador automatizado de bajo costo capaz de operar *in situ* junto a un cuerpo de agua realizando la determinación analítica de los niveles de fósforo (ortofosfato) y nitrógeno (nitrato+nitrito), así como pH y temperatura, transmitiendo los resultados obtenidos a una estación remota mediante internet inalámbrica. Las determinaciones de fósforo y nitrógeno son realizadas mediante métodos de desarrollo de color con detección fotométrica implementados en un sistema de flujo pulsado. Para el control y adquisición de datos se recurrió a la plataforma de microcontroladores Arduino. El sistema opera con baterías recargables y habilita el uso de un panel solar para su recarga. La evaluación preliminar de los métodos analíticos realizada en el laboratorio arrojó cifras de mérito perfectamente adecuadas para los fines buscados. Está prevista una evaluación de campo donde se estudiará el desempeño del equipo en condiciones reales. Se entiende que el uso de este tipo de sistemas que no requieren personal para su operación puede resultar de utilidad en el análisis ambiental.

PALABRAS CLAVE: Agua, nutrientes, análisis automatizado, telemetría química.

ABSTRACT

A prototype of a low-cost automated analyser capable of *in situ* operation next to a water body is described. The analyser can determine levels of phosphorus (orthophosphate) and nitrogen (nitrate+nitrite), along with pH and temperature, transmitting the results to a remote station via wireless internet. Phosphorus and nitrogen determinations are carried out by means of photometric methods, implemented in a pulsed-flow system. For control and data acquisition the open-source Arduino platform of microcontrollers was used. The system runs on rechargeable batteries, with the possible support of a solar panel. Preliminary evaluation of the analytical methods carried out in the laboratory showed figures of merit fit for the purpose. A field evaluation is foreseen in the near future, where the analyser will be tested under real conditions. This type of instruments is considered to be potentially useful in environmental analysis.

KEYWORDS: Water, nutrients, automated analysis, chemical telemetry.

INTRODUCCIÓN

Analizadores *in situ* y telemetría química

La evaluación del estado de los cuerpos de agua desde el punto de vista de su calidad es un área en la que el análisis químico y fisicoquímico encuentra un amplio campo de aplicación. Esto es cierto en lo relativo a su aptitud para el uso (riego, recreación, fuente de agua para consumo humano), a los aspectos regulatorios y también en estudios científicos en el campo de las ciencias ambientales.

Las tecnologías analíticas disponibles en la actualidad permiten la determinación en las muestras ambientales de un gran número de sustancias a niveles de concentración cada vez más bajos y con gran precisión y exactitud. Como consecuencia la demanda de análisis y resultados relativos a la calidad ambiental ha aumentado considerablemente, con la consiguiente sobrecarga de los laboratorios. Se debe tener presente que la estrategia tradicional empleada en el análisis de muestras ambientales (al igual que la mayoría de las matrices) está centrada en el laboratorio: se extraen muestras en los puntos designados, que son transportadas al laboratorio y almacenadas hasta el instante del análisis. A diferencia de otros campos de aplicación del análisis químico, como el control de calidad industrial, en el análisis ambiental los puntos de muestreo suelen estar a gran distancia del laboratorio y en lugares no siempre de fácil acceso. Por lo tanto, la estrategia tradicional exige no solo una planificación ajustada sino un despliegue logístico para transportar el personal encargado de la toma de muestra y su equipo hasta el punto de muestreo y de regreso. Las muestras deben ser aditivadas y refrigeradas para garantizar su conservación y luego transportadas al laboratorio, donde serán almacenadas hasta la realización del análisis. Este modo de operación presenta entonces costos adicionales asociados al muestreo. Además, sobre todo en el caso del análisis a niveles de trazas, existe

el riesgo de alteración de la muestra durante el transporte y almacenamiento, ya sea por contaminación o por pérdidas de analito.

La estrategia alternativa basada en el empleo *in situ* de *kits* de reactivos logra evitar el transporte, la conservación y el almacenamiento de muestras, pero sigue requiriendo del desplazamiento del personal para la realización de los análisis de campo.

Los avances tecnológicos surgidos en las últimas décadas han dado lugar a una tercera estrategia, que implica un verdadero cambio de paradigma: el empleo de analizadores automatizados desplegados en campo en los lugares donde se desea obtener los datos analíticos. Al añadir al analizador la capacidad de establecer comunicaciones inalámbricas se hace posible enviar los resultados analíticos a una estación central. Se alcanza así la capacidad de realizar la telemedición o telemetría de los parámetros de interés y de obtener incluso resultados en tiempo real (Mukhopadhyay y Mason, 2013). La telemetría química es una tecnología ampliamente conocida en la industria de procesos químicos, e incluso en los últimos años también en la exploración espacial, posibilitando el análisis de la composición química de suelo y rocas en planetas como Marte (Grotzinger, et al., 2012). Últimamente esta disciplina está tomando auge también en el análisis ambiental (Glasgow, et al., 2004). La creciente disponibilidad comercial de sensores químicos para distintas sustancias y parámetros ha hecho posible la implementación de analizadores *in situ* que pueden ser instalados en campo y operan en forma desatendida reportando los resultados mediante un sistema de comunicaciones adecuado, ya sea con una periodicidad predeterminada o a demanda.

La telemetría no debe confundirse con la teledetección o percepción remota, en la cual el sensor está ubicado a cierta distancia del punto bajo estudio y, por tanto, sin contacto físico con él, como en el caso del empleo de aeronaves o satélites artificiales en monitorización ambiental. En la telemetría *in situ* el dispositivo sensor o analizador se ubica físicamente en el punto bajo estudio, distante del observador o usuario de la información.

Como se mencionó anteriormente, en la actualidad existe un amplio conjunto de sensores para varios parámetros químicos y fisicoquímicos (Gründler, 2007; Narayanaswamy y Wolfbeis, 2004). No obstante, si empleamos el término sensores, según la definición estricta propuesta por IUPAC (Hulanicki, et al., 1991), existen numerosos parámetros químicos para los cuales actualmente no se dispone de sensores adecuados. A modo de ejemplo, no existen en la actualidad sensores comerciales para fosfato suficientemente confiables para ser empleados fuera del laboratorio. En estos casos es necesario recurrir a dispositivos más complejos, denominados analizadores, que implementan en forma completa el proceso analítico deseado.

Actualmente existe oferta comercial de varios tipos de analizadores *in situ* para el análisis de cuerpos de agua. Estos adoptan varias formas, por ejemplo, boyas (destinadas a flotar ancladas en los cuerpos de agua), cilindros (diseñados para ser sumergidos), etcétera. Algunos de estos sistemas se alimentan mediante baterías recargadas por paneles solares para asegurar su autonomía. Lamentablemente,

su precio es elevado, lo cual puede ser un obstáculo a la hora de emplearlos en proyectos de bajo presupuesto.

En este contexto y con la intención de generar conocimiento local en un área poco desarrollada en el medio, nuestro grupo encaró el diseño y construcción de un prototipo de analizador *in situ* que pudiera ser usado en proyectos de investigación donde se requiera el despliegue de cierto número de analizadores para la determinación de varios parámetros de calidad en aguas superficiales.

Objetivos y características del prototipo

El objetivo fue diseñar y construir un prototipo de analizador *in situ* de bajo costo de construcción, con capacidad multiparamétrica y de comunicaciones, aprovechando las redes GSM ampliamente difundidas en el país.

Se definió que los parámetros a determinar serían ortofosfato, nitrato+nitrito, pH y temperatura. Estos fueron seleccionados por su papel en el desarrollo explosivo de poblaciones de cianobacterias, conocidos como “floraciones algales”. Sin embargo, se previó que el sistema tuviera características modulares de modo de posibilitar la incorporación de subsistemas para la determinación de otros analitos o parámetros físicoquímicos de interés.

Para simplificar el diseño se decidió que en una primera etapa el prototipo debería poder determinar ortofosfato o nitrato+nitrito, pero no los dos simultáneamente. Para una etapa posterior se previó la posibilidad de determinar ambos parámetros en forma sucesiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Subsistema de toma de muestra y medida de pH y temperatura

Para cada determinación la muestra es tomada del cuerpo de agua mediante un tubo de goma de silicona y una minibomba peristáltica de 12 V, pasando por un prefiltro grueso de malla y un filtro de membrana de celulosa. La muestra filtrada pasa por la celda de flujo que contiene el sensor de temperatura y el electrodo de pH y de allí a un reservorio intermedio con desborde. Desde este reservorio la muestra es bombeada por el subsistema analítico para la determinación de ortofosfato o de nitrato+nitrito.

La medida de pH se realiza mediante un electrodo de vidrio combinado ubicado en la celda de flujo.

Para la medida de temperatura del agua se emplea un sensor digital DS18B20 (Maxim) encapsulado en una vaina de acero inoxidable y ubicado en la misma celda de flujo del electrodo de pH.

La Figura 1 muestra el esquema de este subsistema.

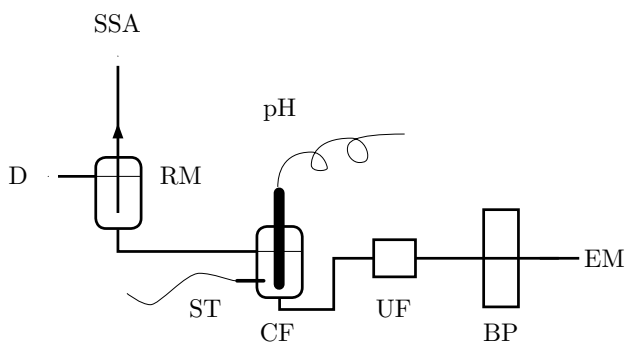


Figura 1. Esquema del subsistema de toma de muestra. EM: entrada de muestra. BP: bomba peristáltica. UF: unidad de filtración. CF: celda de flujo. pH: electrodo combinado de pH. ST: sensor de temperatura. RM: reservorio de muestra. D: descarte. SSA: subsistema analítico.

Subsistema analítico

Para la determinación de ortofosfato así como de nitrato+nitrito se optó por métodos de desarrollo de color clásicos con detección fotométrica, implementados mediante sistemas en flujo (Estela y Cerdà, 2005; Miró, et al., 2003; Motomizu y Li, 2005). El ortofosfato se determina mediante el método del molibdovanadofosfato con medida a 365 nm. Para nitrato+nitrito se recurrió al método de Griess con medida a 525 nm. El nitrato es pre-reducido a nitrito en una minicolumna de cadmio cobreado.

El subsistema analítico para la determinación de ortofosfato y nitrato+nitrito se basa en el uso de flujo pulsado generado por microbombas solenoide con un desplazamiento de 20 μL por pulso. Las mismas son alimentadas con pulsos de 12 V de ancho controlado enviados por el microcontrolador.

Para la detección fotométrica se emplearon LEDs como fuente de radiación y fotodiodos como detectores. Para el sistema de fosfato se empleó un LED ultravioleta de 365 nm (Nichia). El sistema de nitrato+nitrito emplea un LED de 525 nm (Kingbright). En ambos casos se emplearon celdas de flujo de cuarzo de 10 mm de camino óptico con un volumen interno de 80 μL . Estas se conectaron entre sí en serie, de modo que el flujo pasa primero por la celda de detección de nitrógeno y luego por la de fósforo. Las burbujas que puedan aparecer durante el proceso son eliminadas antes de ingresar a las celdas de flujo mediante un desgaseador basado en una membrana microporosa de Teflon. La Figura 2 muestra el diagrama general del subsistema analítico.

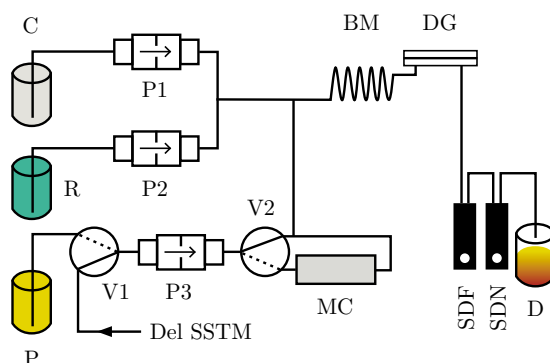


Figura 2. Esquema del subsistema analítico. P1, P2, P3: microbombas solenoide. V1, V2: válvulas solenoide. C: reservorio de portador. R: reservorio de reactivo. P: reservorio de patrón. MC: micolumna rellena con granulos de cadmio cuperizado. BM: bobina de mezclado. DG: desgaseador. SDF: sistema de detección para fósforo. SDN: sistema de detección para nitrógeno. D: descarte. SSTM: subsistema de toma de muestra.

Electrónica

Para el control del sistema se emplearon placas de microcontrolador de la plataforma Arduino (ver página web sugerida luego de las referencias; Colaboradores de Wikipedia, [s.d.]). El control global del sistema está a cargo de una placa Arduino Uno, que se comunica por medio de protocolo I²C. Esta placa realiza también la medida de pH mediante una entrada analógica de 10 bits, y se comunica con el sensor de temperatura mediante protocolo 1-Wire. En el caso del electrodo de pH se implementó la conexión mediante un amplificador operacional de alta impedancia de entrada.

El subsistema analítico es controlado por una segunda placa Arduino Uno. Para la adquisición de datos se empleó una interfaz analógico-digital ADS1115 de 16 bits que se comunica con el Arduino mediante I²C. La señal de los fotodiodos es amplificada mediante sendos amplificadores operacionales TL081 operados en el modo de transimpedancia. La activación de las microbombas solenoide se realiza desde salidas digitales del Arduino a través de un circuito integrado ULN2803, el cual también controla la activación de los LEDs asociados a la detección.

Comunicaciones

Las comunicaciones se realizan mediante un modem GSM/GPRS basado en el módulo SIM900, el cual se comunica con el microcontrolador central. Este modem ampliamente difundido permite implementar fácilmente comunicaciones mediante mensajes de texto (SMS) y también conexión a internet mediante GPRS.

Alimentación eléctrica

La alimentación se implementó mediante baterías recargables. Dependiendo del periodo de autonomía deseado está previsto el reemplazo periódico de la batería por una ya cargada o bien recargar la batería mediante un panel solar.

Construcción

Para la construcción de partes de los subsistemas analítico y de toma de muestra se recurrió extensivamente a la impresión 3D mediante tecnología de filamento fundido (FFF). Se empleó un impresor 3D QidiTech X-one 2. Para las partes en contacto con agua o con reactivos se empleó filamento de ABS, mientras que para las partes accesorias se usó filamento de PLA.

El sistema se instala dentro de una caja de material plástico resistente, que alberga dos placas de acrílico ubicadas en dos niveles. El nivel superior se destinó a los subsistemas analítico, de toma de muestra y de medida de pH y temperatura. El nivel inferior se destinó a la electrónica (albergada en cajas estancas grado IP65), batería de alimentación y frascos de reactivos, patrones y descarte. La Figura 3 muestra una vista de la placa superior.

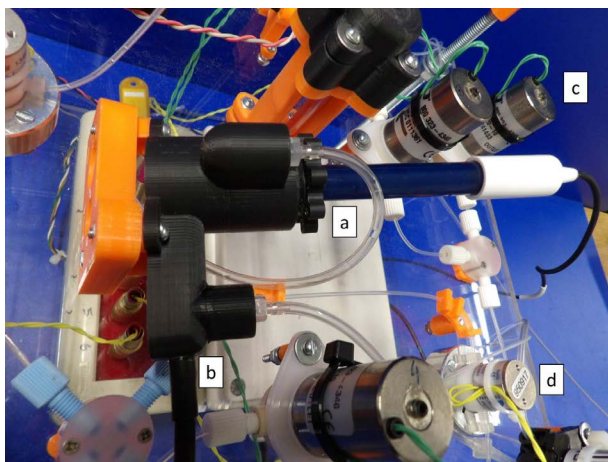


Figura 3. Vista de la placa de los subsistemas analítico y de toma de muestra. a: electrodo combinado de pH instalado en la celda de flujo. b: sensor de temperatura. c: microbombas solenoide. d: válvula solenoide.

RESULTADOS

Validación de métodos

En una primera etapa se validaron en el laboratorio los métodos para fosfato y nitrato+nitrito. Posteriormente se realizarán las pruebas de campo, donde se validarán

todos los métodos y se tomarán en forma paralela y simultánea contramuestras que serán analizadas en el laboratorio por métodos de referencia.

La validación incluyó la precisión (repetibilidad), el rango lineal y los límites de detección y cuantificación. La precisión se evaluó calculando la desviación estándar relativa de la altura de pico obtenida en 10 inyecciones sucesivas.

Validación en el laboratorio del método para PO_4^{3-}

La precisión ($s_r(\%)$) para la determinación de fosfato a la concentración de 1 mg-P L^{-1} fue mejor que 1%, y de 4,5% a la concentración de 0,1 mg-P L^{-1} .

Para la evaluación del rango lineal se inyectaron por triplicado soluciones en el rango de 0 a 20 mg-P L^{-1} . Se verificó la hipótesis de linealidad a concentraciones hasta 10 mg-P L^{-1} ($R^2 = 0,997$).

Los límites de detección (3s) y cuantificación (10s) fueron 5,5 y 18,2 $\mu\text{g-P L}^{-1}$, equivalentes a 16,9 y 55,8 $\mu\text{g-PO}_4^- \text{L}^{-1}$, respectivamente.

Validación en el laboratorio del método para nitrato+nitrato

La precisión ($s_r(\%)$) fue de 1,8% a 0,8 mg-N L^{-1} .

La linealidad fue evaluada inyectando por triplicado soluciones de patrón nitrato con concentraciones en el rango 0 – 10 mg-N L^{-1} . La hipótesis de linealidad fue verificada en el rango hasta 4 mg-N L^{-1} ($R^2 = 0,994$).

Los límites de detección (3s) y cuantificación (10s) fueron de 4,3 y 14,2 $\mu\text{g-N L}^{-1}$, respectivamente.

Asimismo, se estudió la vida útil de la columna de cadmio cuperizado empleada para la determinación de nitrato, y se halló que su eficiencia disminuyó de 90% a 74% luego de 340 ciclos de análisis.

DISCUSIÓN

Metodologías analíticas

Una de las primeras decisiones que se debían tomar fue la de los parámetros a determinar. Si bien para determinar el contenido de fósforo en agua se prefiere con frecuencia determinar fósforo total, se encontró que los métodos de oxidación química se realizan a alta temperatura por lo que se requiere una gran cantidad de energía, incompatible con los postulados de autonomía establecidos. Por otra parte, las especies de fósforo que sirven como nutrientes son las solubles, por lo que se optó por determinar ortofosfato.

En cuanto a las técnicas analíticas, se consideró la posibilidad de emplear sensores potenciométricos. Si bien existe amplia experiencia con los electrodos selectivos a nitrato, los electrodos para fosfato son aún experimentales y no existe oferta significativa a nivel comercial. Por este motivo se optó por un método químico con detección fotométrica para la determinación de fosfato.

Sin embargo, se evaluó el comportamiento de un electrodo combinado selectivo a nitrato (Thermo Orion) instalado en una celda de flujo y se emplearon soluciones patrón de diversas concentraciones de nitrato. Los resultados obtenidos sugieren que, si bien el desempeño es adecuado a altas concentraciones, tanto la linealidad de la calibración como la repetibilidad fueron pobres a bajas concentraciones como las que se espera determinar. A su vez, la necesidad de calibración multipunto aumentaría la complejidad del sistema. Por este motivo se optó también para el caso del nitrato por el uso de un método químico con detección fotométrica.

Entre las ventajas de estos métodos se encuentran la amplia experiencia acumulada, el detallado conocimiento de las posibles interferencias y la posibilidad de calibración con un único patrón dentro del rango de linealidad. A cambio de esas ventajas se requiere disponer de uno o más reactivos y de un control riguroso de los tiempos de reacción.

En el caso de la determinación de fosfato, el método más ampliamente usado en los laboratorios es el del llamado “azul de fosfomolibdeno”. Se basa en una reacción compleja que, dependiendo de las condiciones de trabajo, puede dar lugar a diversos productos de reacción (Nagul, 2015). Si bien es uno de los métodos fotométricos más sensibles, la fuerte dependencia con las condiciones experimentales puede resultar inconveniente. Además, requiere reactivos reductores intrínsecamente inestables, como el ácido ascórbico.

Otro método disponible es el del ácido molibdovanadofosfórico (Kitson y Mellon, 1944; Abbott, et al., 1963). Este método puede desarrollarse empleando un único reactivo muy estable. Aunque es considerado como un método poco sensible, esto es consecuencia de que los manuales de métodos suelen indicar que la medida se realice a longitudes de onda de 400 nm o incluso superiores. Dado que el máximo de absorción del producto coloreado se encuentra a alrededor de 315 nm, es fácil comprender que midiendo en un flanco de la banda de absorción a 400 nm, la sensibilidad será muy baja. En este caso se exploró la conveniencia de usar una longitud de onda más próxima a la del máximo. Actualmente existe un fuerte desarrollo de diodos emisores de luz (LEDs) para la región del ultravioleta, aunque para las longitudes de onda más bajas estos son aún costosos y de baja potencia radiante. Como solución de compromiso se empleó un LED de 365 nm, con lo cual se alcanzó una sensibilidad aceptable para el propósito.

La selección de una longitud de onda menor a 400 nm presenta como inconveniente un mayor riesgo de interferencias espectrales. Por este motivo se incorporó en el programa una etapa de medida del “blanco de muestra” para corregir esas interferencias. Analizando muestras reales en la etapa de evaluación del prototipo en campo se espera obtener suficientes datos para comprobar la eficacia de esta estrategia.

Cabe señalar que la sensibilidad y detectabilidad exhibidas por el método para nitrógeno lo hacen adecuado al uso, considerando el valor máximo (10 mg-N L^{-1}) establecido para los cuerpos de agua de clases 1 a 3 por el Decreto 253/79 (Uruguay, 1979).

En el caso del método para fósforo, las cifras de mérito exhibidas no son suficientes para permitir la determinación a niveles inferiores al valor máximo ($25 \text{ } \mu\text{g-P L}^{-1}$) establecido para los cuerpos de agua de clases 1 a 3 por el mismo decreto (Uruguay,

1979). Sin embargo resulta adecuado para la determinación de fósforo en cuerpos de agua contaminados, por ejemplo en la proximidad de puntos de vertido. En el futuro se podrá estudiar la mejora de esos parámetros.

Determinaciones de pH y temperatura

Estas determinaciones fueron incorporadas para complementar la información obtenida sobre los niveles de nutrientes. La determinación de la temperatura del agua es empleada además para corregir la medida de pH.

Esta última, a pesar de su aparente simplicidad, encierra varias dificultades que deberán ser evaluadas en las pruebas de campo. Entre ellas, se encuentra la frecuencia con que deberá repetirse el ajuste (o calibración) del sistema de medición. Para no aumentar la complejidad del sistema en la primera versión del prototipo no se ha previsto realizar ese ajuste en forma autónoma, sino por un operador y en forma periódica, simultáneamente con la reposición de reactivos y cambio de batería. De esta forma se evita la necesidad de disponer de patrones de pH intrínsecamente poco estables.

Electrónica y comunicaciones

La plataforma de microcontroladores Arduino fue seleccionada por estar ampliamente disponible y ser de muy bajo costo. Esto último es consecuencia de ser una plataforma de “fuente abierta”, lo que elimina los costos de propiedad intelectual. Asimismo, existe una extensa comunidad de desarrolladores que contribuyen en forma accesible con su conocimiento bajo la forma de bibliotecas, subrutinas y, en general, su experiencia.

La mayoría de las placas de dicha plataforma incorporan un puerto de comunicaciones USB, de modo que la carga y modificación de sus programas se puede realizar en forma muy simple desde un notebook, incluso en campo.

El sistema basado en microcontroladores no solo realiza el control de las bombas y válvulas del subsistema analítico sino que también controla la adquisición de datos fotométricos. Esta última consta de varias etapas. Al inicio de una secuencia de medición se ajusta la escala fotométrica, para ello se apaga el LED en uso y se mide y memoriza la “señal oscura”, S_D . A continuación se enciende el LED y se llena la celda de flujo. En esas condiciones se mide la “señal de referencia”, S_R . Con esas dos medidas se puede definir la escala fotométrica. Para cualquier medida posterior S_X es posible entonces calcular la absorbancia correspondiente A_X .

Desde el punto de vista analítico, corresponde realizar una calibración analítica para cada serie de medidas. La calibración se realiza midiendo un patrón ubicado en un frasco dentro del gabinete del prototipo. Una vez verificado el rango lineal es posible emplear la calibración por dos puntos, un blanco (realizado con agua destilada) y el patrón mencionado.

Con los datos de la función de calibración disponibles se puede calcular la concentración correspondiente a cada muestra. Este resultado está entonces disponible para su transmisión a la base mediante el sistema de comunicaciones.

En las etapas de diseño se seleccionó la tecnología de comunicaciones GSM/GPRS por su amplia difusión y cobertura en el país. Las pruebas preliminares realizadas en el laboratorio empleando mensajes de texto resultaron totalmente satisfactorias. En el prototipo final se implementará un sistema más elaborado mediante el uso de internet inalámbrica. Este posibilitará una gestión más avanzada de los datos que podrán ser ingresados directamente a una base de datos.

Consideraciones sobre autonomía

La autonomía operativa del sistema depende, por un lado, del consumo de reactivos (y la consiguiente generación de residuos) y, por otro, del consumo de electricidad. El subsistema analítico opera mediante la técnica de flujo pulsado, y, por lo tanto, el consumo de reactivos es predecible. En función de esto se ha previsto un ciclo de trabajo de una semana, al final de la cual un operador procederá al recambio de los recipientes de reactivos, patrones y descarte (residuos químicos). Los residuos serán transportados al laboratorio para su adecuada disposición.

De acuerdo a las estimaciones de consumo y al tipo de batería empleada, se prevé que esta última podrá alimentar el sistema sin necesidad de recarga por una semana como mínimo. Sin embargo, esta previsión se basa en una serie de suposiciones que deberán confirmarse en las pruebas de campo. Entre otros aspectos, el comportamiento de las baterías depende de su calidad y del régimen de consumo, y varía a lo largo de su vida útil. En este analizador existen picos de consumo asociados a la operación de las bombas y del módem GSM/GPRS que pueden afectar el comportamiento de la batería a largo plazo. Por estos motivos, si la evaluación de campo demostrase que la duración de la carga de la batería no alcanza el objetivo prefijado, se incorporará como respaldo un panel solar y su circuito asociado para la recarga de la batería. En etapas posteriores se avanzará en la optimización del sistema a fin de lograr una autonomía aún mayor.

CONCLUSIONES

El prototipo de analizador *in situ* construido fue evaluado en el laboratorio desde el punto de vista de su desempeño analítico. Los resultados obtenidos en esta primera evaluación resultaron ampliamente satisfactorios con relación a los objetivos propuestos.

Las pruebas de campo en condiciones reales permitirán evaluar en forma definitiva el comportamiento analítico y adicionalmente los aspectos de comunicaciones y autonomía.

RECONOCIMIENTOS

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC-UdelaR) por el financiamiento del proyecto “Desarrollo de una plataforma analítica flexible y de bajo costo para la telemedición de parámetros de calidad de agua”. A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII). Al PEDECIBA Química.

REFERENCIAS

- Abbott, D.C., Emsden, G.E. y Harris, J.R., 1963. A method for determining orthophosphate in water. En: *Analyst*, 88, pp.814-816.
- Colaboradores de Wikipedia, [s.d.]. *Arduino* [En línea]. [s.l.]: Wikipedia. [Consulta: 05 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://en.wikipedia.org/wiki/Arduino>
- Glasgow, H.B., Burkholder, J.A.M., Reed, R.E., Lewitus, A.J. y Kleinman, J.E., 2004. Real-time remote monitoring of water quality: a review of current applications, and advancements in sensor, telemetry, and computing technologies. En: *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 300, pp.409-448.
- Grotzinger, J.P., Crisp, J., Vasavada, A.R., Anderson, R.C., Baker, C.J., Barry, R., Blake, D.F., Conrad, P., Edgett, K.S., Ferdowski, B., Gellert, R., Gilbert, J.B., Golombek, M., Gómez-Elvira, J., Hassler, D.M., Jandura, L., Litvak, M., Mahaffy, P., Maki, M., Meyer, M., Malin, M.C., Mitrofanov, I., Simmonds, J.J., Vaniman, D., Welch, R.V. y Wiens, R.C., 2012. Mars science laboratory mission and science investigation. En: *Space Science Reviews*, 170, pp.5-56.
- Estela, J.M. y Cerdà, V., 2005. Flow analysis techniques for phosphorus: an overview. En: *Talanta*, 66, pp.307-331.
- Gründler, P., 2007. *Chemical sensors*. Berlin: Springer-Verlag.
- Hulanicki, A., Glab, S. y Ingman, F., 1991. Chemical sensors. Definitions and classification. En: *Pure and Applied Chemistry*, 63, pp.1247-1250.
- Kitson, R.E., Mellon, M.G., 1944. Colorimetric determination of phosphorus as molybdivanadophosphoric acid. En: *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition*, 16, pp.379-383.
- Miró, M., Estela, J.M. y Cerdà, V., 2003. Application of flowing stream techniques to water analysis. Part I. Ionic species: dissolved inorganic carbon, nutrients and related compounds. En: *Talanta*, 60, pp.867-886.
- Motomizu, S. y Li, Z-H., 2005. Trace and ultratrace analysis methods for the determination of phosphorus by flow-injection techniques. En: *Talanta*, 66, pp 332-340.
- Mukhopadhyay, S.C. y Mason, A., eds., 2013. *Smart sensors for real-time water quality monitoring*. Berlin: Springer-Verlag.
- Nagul, E.A., McKelvie, I.D., Worsfold, P., Kolev, S.D., 2015. The molybdenum blue reaction for the determination of orthophosphate revisited: opening the black box. En: *Analytica Chimica Acta*, 890, pp.60-82.
- Narayanaswamy, R. y Wolfbeis, O.S., 2004. *Optical sensors. Industrial environmental and diagnostic applications*. Berlin: Springer-Verlag.

Uruguay. Decreto 253/979, de 09 de mayo de 1979. *Diario Oficial*, 31 de mayo de 1979, No. 20.504, p. 1473.

Página web sugerida

Arduino: <https://www.arduino.cc/>

Determinación de potenciales contaminantes inorgánicos en muestras de suelos y aguas del territorio uruguayo en la Antártida

Determination of potential inorganic contaminants in samples of soils and waters of the Uruguayan territory in Antarctica

RECIBIDO: 25/10/2018 → APROBADO: 20/11/2018 ✉ mbeluzzi@fq.edu.uy

✉ BELLUZZI MUIÑOS, MARCELO (1); LOPES FIALHO, LUCIMAR (2); PISTÓN, MARIELA (1)

(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) GRUPO DE ANÁLISE INSTRUMENTAL APLICADA (GAIA), CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCAR), SAN PABLO, BRASIL

RESUMEN

La investigación científica en la Antártida se ha incrementado en los últimos años, fundamentalmente en áreas como microbiología, biología y oceanografía. Existen pocos reportes sobre los niveles de contaminantes inorgánicos y el impacto antrópico relacionado a ellos en el ecosistema. Al ser un territorio prácticamente virgen, es de particular interés realizar esta evaluación. En este trabajo se analizaron por primera vez y como primera aproximación al abordaje del tema seis muestras de aguas y seis muestras de suelos obtenidas en seis puntos de muestreo próximos a la base uruguaya en Antártida. Los elementos determinados para ambas matrices fueron: cromo, níquel, cobalto, arsénico, estroncio, cadmio, mercurio, plomo, uranio. En agua también se determinaron torio, estaño y antimonio. La preparación de las muestras de suelos se realizó mediante un tratamiento asistido con radiación de microondas; las muestras de agua fueron analizadas directamente. Las determinaciones analíticas se realizaron mediante espectrometría de emisión atómica de plasma de acoplamiento

inductivo acoplado a masas y óptico (ICP-MS e ICP-OES). La mayoría de los elementos se encuentran dentro de los límites establecidos por algunas agencias de regulaciones ambientales, como *Canadian Environmental Quality Guidelines-CCME* o *United States Environmental Protection Agency-USEPA*, y es llamativo fundamentalmente el contenido de estroncio en aguas.

PALABRAS CLAVE: Antártida, contaminantes inorgánicos, impacto antrópico.

ABSTRACT

Scientific research in Antarctica has increased in recent years, mainly in areas such as Microbiology, Biology and Oceanography. There are few reports about the levels of inorganic contaminants and the anthropic impact related to them in the ecosystem. Being a practically virgin territory, it is of particular interest to carry out this evaluation. In this work, for the first time and as a first approximation to the approach of the subject, six water samples and six soil samples obtained in six sampling points near the Uruguayan base in Antarctica were analyzed. The elements determined for both matrices were: chromium, nickel, cobalt, arsenic, strontium, cadmium, mercury, lead, uranium. In water, thorium, tin and antimony were also determined. The preparation of soil/sediment samples was carried out by means of an assisted treatment with microwave radiation; the water samples were analyzed directly. The analytical determinations were carried out by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and optical emission spectrometry (ICP-OES). The majority of the elements are within the limits established by some environmental regulation agencies such as the *Canadian Environmental Quality Guidelines-CCME* or the *United States Environmental Protection Agency-USEPA*, being striking strontium content in waters.

KEYWORDS: Antarctica, inorganic contaminants, anthropic impact.

INTRODUCCIÓN

La Antártida es el continente más austral de la Tierra, posee una superficie de aproximadamente 14 millones de km², y menos del 1% se encuentra libre de hielo. Abarca los territorios al sur del paralelo 60° S, región a la que se refiere el Tratado Antártico firmado el 1 de diciembre de 1959 en Washington (Tratado Antártico, 1959). Presenta un límite natural ubicado entre los 55° y 58° de latitud sur, denominado Convergencia Antártica, el cual constituye una importante frontera desde el punto de vista biológico y oceanográfico. Este límite está definido por la corriente más intensa del mundo, llamada Corriente Circumpolar Antártica, que rodea al continente en dirección W-E. En promedio es el continente más frío, seco, ventoso y con mayor altura media (más de 2000 m sobre el nivel del mar) del planeta. A pesar de poseer la mayor reserva de agua dulce del mundo, el continente es considerado un desierto (excepto las zonas costeras e insulares) debido a la

baja humedad atmosférica, las escasas precipitaciones y, además, al estar el agua en forma de hielo o nieve, no se encuentra disponible para la flora y la fauna. El territorio es prácticamente virgen y es concebido como un continente dedicado a la paz y la ciencia; solamente se registran actividades humanas en las bases científicas y militares que operan allí (Instituto Antártico Uruguayo, 2018).

La investigación científica en el territorio de la Antártida es relevante para el país y aporta al conocimiento no solo a nivel nacional sino también a la comunidad internacional. Existen pocos reportes sobre los niveles de contaminantes inorgánicos y su impacto antrópico en ese ecosistema (De Lima Neto, 2017; Brugnoli, [s.d.]).

Es conocido el impacto sobre la salud humana y ecosistemas de varios metales y semimetales (o especies de ellos) que son elementos clasificados como no esenciales para la vida. En este caso se encuentran varios de los elementos determinados en este trabajo en dos matrices de importancia medioambiental: aguas y suelos (De Azevedo y Da Matta Chasin, 2003).

La Antártida es un continente prácticamente virgen. Es uno de los pocos lugares en el mundo que conservan esa condición, por lo cual es de fundamental importancia la investigación científica en ese territorio. Se presenta un relevamiento primario de los niveles de elementos inorgánicos, algunos de ellos potencialmente tóxicos, como punto de partida para estudios más exhaustivos sobre aguas y suelos en este territorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se dispuso de seis muestras de aguas y seis muestras de suelos obtenidos en seis puntos de muestreo próximos a la base uruguaya en Antártida. Las muestras fueron aportadas por la Dra. Silvana Vero del área de Microbiología de la Facultad de Química, quien al momento de los trabajos era responsable de un proyecto de investigación autorizado por el Instituto Antártico Uruguayo. Las muestras de agua fueron colectadas en recipientes de vidrio borosilicato 3.3 con tapa a rosca, transportadas a 1-5 °C hasta su arribo a los laboratorios de Facultad de Química, acidificadas a $\text{pH} < 2$ con HNO_3 pa (Asociación Española de Normalización y Certificación, 2003) y posteriormente colocadas en freezer a -20 °C hasta el traslado a Brasil, donde nuevamente fueron colocadas en freezer hasta el análisis. Las muestras de suelos fueron colectadas directamente en recipientes de plástico con tapa a rosca y con las mismas condiciones de frío que las muestras de agua hasta que fueron analizadas; en este último caso no se agregaron aditivos. Las coordenadas que ubican los puntos de muestreo se especifican en la Tabla 1.

TABLA 1. Ubicación geográfica de los puntos de muestreo.

Punto de muestreo	Coordenadas (decimal)		Coordenadas (DMS)	
	Sur	Oeste	Sur	Oeste
Base Artigas	62.184846	58.904239	62°11'5.4455''	58°54'15.2603''
Ionosférico	62.183579	58.906307	62°11'0.8844''	58°54'22.7051''
Glaciar Collins	62.184579	58.869612	62°11'4.4843''	58°52'10.6031''
Fossil Hill	62.208494	58.970854	62°12'30.5784''	58°58'15.0744''
Lago Uruguay	62.185775	58.908140	62°11'8.7900''	58°54'29.3040''
Half Three Point (HTP)	62.227169	58.950031	62°13'37.8084''	58°57'0.1116''

En la Figura 1 se muestran imágenes fotográficas de algunas de las zonas de muestreo y en la Figura 2 se muestran capturas de pantalla de las imágenes satelitales de las seis zonas de muestreo donde se obtuvieron las muestras para este trabajo.



Figura 1. Vista de las zonas de muestreo en la Base Artigas, Glaciar Collins y Lago Uruguay. Fotos cedidas por BC Adalgisa Martínez del Área Microbiología de la Facultad de Química, encargada de los muestreos.



Figura 2. Capturas de pantalla de imágenes satelitales de Google Earth® de las zonas de muestreo.

Instrumentación

La digestión de las muestras de suelos fue llevada a cabo mediante un tratamiento asistido con radiación de microondas utilizando un digestor de microondas Ethos 1 (Milestone, Sorisole, Italia).

La determinación de los elementos se realizó mediante espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado a masas, habiéndose utilizado un ICP-MS Agilent 7800 (Agilent Technologies, Tokio, JHS, Japón) equipado con nebulizador concéntrico, cámara generadora de aerosol de cuarzo, bomba peristáltica de bajas pulsaciones de 10 cilindros, introducción de muestra mediante sistema HMI (*High Matrix Introduction*), antorcha de cuarzo con control en tres dimensiones (horizontal, vertical y profundidad), celda de colisión de tipo octapolo (*ORS, Octapole Reaction System*) y analizador de masas de tipo cuadrupolo. Las mediciones se utilizaron en el modo de colisión He (White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil) y modo sin gas. Las condiciones de operación se detallan en la Tabla 2.

TABLA 2. Condiciones de operación de plasma ICP-MS.

Parámetro instrumental	Condiciones de operación
Potencia RF aplicada (w)	1550
Flujo de gas de plasma (L min ⁻¹)	12,0
Flujo de gas auxiliar (L min ⁻¹)	1,8
Flujo de gas carrier (L min ⁻¹)	1,0
Flujo de gas He en celda de colisión (mL min ⁻¹)	4,5
Profundidad de introducción de muestra (mm)	8
Tiempo de integración (s)	3,0
Nebulizador	Concéntrico
Cámara generadora de aerosol	Scott-doble pase
Número de réplicas	3

La determinación de estroncio se realizó además utilizando un espectrómetro de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) iCAP6000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) que funciona en modo de vista radial y axial y está equipado con un detector de CID simultáneo y rejilla Echelle, una bomba peristáltica, nebulizador concéntrico, cámara de pulverización ciclónica y antorcha de plasma desmontable de cuarzo con un inyector de tubo central con un diámetro interno de 2,0 mm. Se seleccionó la línea de emisión de 421,5 nm, que posee una intensidad de emisión adecuada para la determinación. Las condiciones de operación se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3. Condiciones de operación de plasma ICP-OES

Parámetro instrumental	Condiciones de operación
Potencia RF aplicada (w)	1150
Flujo de gas de plasma (L min ⁻¹)	0,7
Flujo de gas auxiliar (L min ⁻¹)	0,5
Flujo de gas carrier (L min ⁻¹)	12,0
Número de réplicas	3

Se utilizó argón 99,996% (White Martins-Praxair, Sertãozinho, SP, Brasil) en ambas espectrometrías.

Reactivos y patrones

El material utilizado fue previamente descontaminado utilizando una disolución de HNO_3 (Merck pa) 10% mv^{-1} . Todas las disoluciones fueron preparadas utilizando agua calidad I (Resistividad no menor a 18,2 $\text{M}\Omega$ cm) según especificaciones de la American Society for Testing and Materials (American Society for Testing and Materials, 2006) obtenida de un sistema de purificación de agua Milli-Q® Plus Total Water System (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). Los patrones de calibración se prepararon a partir de disoluciones 1000 mg L^{-1} (Qhemis, São Paulo, SP, Brazil). Para la digestión de las muestras se utilizó HNO_3 (Merck pa) previamente destilado utilizando un sistema de destilación *sub-boiling distillation system* (Milestone, Sorisole, Italia) y H_2O_2 30% mv^{-1} (Labsynth, Diadema, Brasil).

Preparación de muestras

Las muestras de suelos fueron tratadas en mortero de ágata para reducir el tamaño de partícula y homogeneizar. Se tomaron masas de muestra de aproximadamente 200 mg y se agregó 5,0 mL de HNO_3 7 mol L^{-1} y 3,0 mL de H_2O_2 30% mv^{-1} para la digestión asistida con radiación de microondas (Krug, 2016). El programa de calentamiento utilizado fue: (1) 5 min para alcanzar 160 °C; (2) mantenimiento de temperatura (160 °C) durante 5 min; (3) 10 min para alcanzar 240 °C; (4) mantenimiento de temperatura (240 °C) durante 10 min; (5) enfriamiento del sistema. Cada muestra de suelo y los blancos fueron preparados por duplicado.

Las muestras de aguas fueron medidas directamente sin tratamiento alguno.

Determinaciones analíticas

Los elementos determinados para ambas matrices fueron: cromo, níquel, cobalto, arsénico, estroncio, cadmio, mercurio, plomo, uranio; en agua además se determinaron los elementos torio, estaño y antimonio. Se analizaron los isótopos más abundantes de cada elemento (Perkin Elmer SCIEX, 2008).

TABLA 4. Elementos determinados, isótopos analizados y su abundancia. Información obtenida de Perkin Elmer SCIEX (2008).

Elemento	Símbolo	Isótopo	Abundancia (%)
Cromo	Cr	^{52}Cr	83,79
		^{53}Cr	9,50
Níquel	Ni	^{58}Ni	68,08
		^{60}Ni	26,22
Cobalto	Co	^{59}Co	100,00
Arsénico	As	^{75}As	100,00

Elemento	Símbolo	Isótopo	Abundancia (%)
Estroncio	Sr	⁸⁶ Sr	9,86
		⁸⁸ Sr	82,58
Cadmio	Cd	¹¹² Cd	24,13
		¹¹⁴ Cd	28,73
Estaño	Sn	¹¹⁸ Sn	24,23
		¹²⁰ Sn	32,59
Antimonio	Sb	¹²¹ Sb	57,36
		¹²³ Sb	42,64
Mercurio	Hg	²⁰⁰ Hg	23,10
		²⁰² Hg	29,86
Plomo	Pb	²⁰⁶ Pb	24,10
		²⁰⁷ Pb	22,10
		²⁰⁸ Pb	52,40
		²³² Th	100,00
Uranio	U	²³⁵ U	0,72
		²³⁸ U	99,27

Calibración

Para el análisis mediante ICP-MS se realizó para todos los elementos curva de calibración con patrones de concentración 0,00; 0,01; 0,05; 0,10; 0,50; 1,00; 5,00; 10,00 y 50,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, mediante diluciones apropiadas a partir de las disoluciones stock de aproximadamente 1000 mg L^{-1} de cada elemento. Se utilizó un método de calibración de compatibilización matricial entre disoluciones de calibración y muestras (*matrix match*).

La calibración para el análisis de estroncio mediante ICP-OES fue realizada con patrones de concentración 0,00; 0,50; 1,00; 1,50; 3,00; 5,00 y 10,00 mg L^{-1} , preparados mediante diluciones apropiadas a partir de la disolución stock correspondiente.

Para las determinaciones mediante ICP-MS se estudiaron los siguientes parámetros de desempeño: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y veracidad. Para realizar la evaluación de veracidad de todos los elementos determinados excepto estroncio se fortificaron muestras a dos niveles de concentración (adición de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de patrones de cada analito). Para el estudio de veracidad en la determinación de estroncio, las muestras diluidas 100 veces se adicionaron con 10 y 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de un patrón de Sr.

Las determinaciones mediante ICP-OES en las muestras de agua se realizaron para confirmar los resultados obtenidos para el estroncio mediante ICP-MS; en este caso se evaluó linealidad y veracidad. Para el estudio de veracidad, las muestras se diluyeron en proporción 1:1; 1:2; 1:3 y 1:4.

RESULTADOS

Resultados de la validación

En las Tablas 5, 6 y 7 se presentan los resultados obtenidos de los parámetros de desempeño evaluados y en las Tablas 8, 9 y 10 los resultados obtenidos en las muestras analizadas.

TABLA 5. Resultado de algunos parámetros de validación mediante ICP-MS.

Parámetro	Concepto/unidad	Resultado
Linealidad	Ajuste a modelo lineal	Cumple
	R ²	>0,9996
Veracidad	%R (agua)	72,0 - 107,5 Promedio 90,9
	%R (suelos)	71,0 - 132,5 Promedio 95,3

%R: porcentaje de recuperación.

TABLA 6. Resultados de límites de detección (LD) y límites de cuantificación (LC) mediante ICP-MS.

Elemento	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Cr	0,017	0,057
Ni	0,014	0,047
Co	0,005	0,017
As	0,014	0,047
Sr	0,040	0,133
Cd	0,001	0,004
Sn	0,015	0,050
Sb	0,003	0,011
Hg	0,013	0,043
Pb	0,010	0,033
Th	0,001	0,002
U	0,001	0,002
Criterio	"3s"	"10s"

TABLA 7. Resultados de los parámetros validados por ICP-OES.

Parámetro	Concepto/unidad	Resultado
Linealidad	Ajuste a modelo lineal	Cumple
	R ²	0,9984
Veracidad	%R	96,7 - 123,1 Promedio 111,4

Resultados en muestras de agua

TABLA 8. Resultados en las muestras de aguas mediante ICP-MS (ND: no detectado).

Muestra	Cr	Ni	Co
Base Artigas	0,641 ± 0,046	1,467 ± 0,052	0,062 ± 0,055
Half Three Points (HTP)	0,473 ± 0,071	0,113 ± 0,011	0,00914 ± 0,00090
Fossil Hill	0,473 ± 0,050	0,1128 ± 0,0045	0,0065 ± 0,0035
Ionosférico	0,422 ± 0,052	0,1038 ± 0,0084	0,0071 ± 0,0010
Glaciar Collins	0,429 ± 0,024	0,1034 ± 0,0024	0,0087 ± 0,0045
Lago Uruguay	0,522 ± 0,053	0,1881 ± 0,0084	0,00601 ± 0,00090
Muestra	As	Sr	Cd
Base Artigas	0,965 ± 0,064	3809 ± 12	0,099 ± 0,039
Half Three Points (HTP)	0,956 ± 0,012	3971,9 ± 2,2	0,0216 ± 0,0012
Fossil Hill	0,854 ± 0,034	3611 ± 18	0,0280 ± 0,0023
Ionosférico	0,822 ± 0,074	3412,0 ± 9,0	0,0199 ± 0,0067
Glaciar Collins	0,808 ± 0,018	3288 ± 16	0,0192 ± 0,0022
Lago Uruguay	0,810 ± 0,021	3422 ± 20	0,0213 ± 0,0045
Muestra	Hg	Pb	U
Base Artigas	0,233 ± 0,034	0,0206 ± 0,0039	0,769 ± 0,046
Half Three Points (HTP)	0,1129 ± 0,0082	ND	0,6971 ± 0,0051
Fossil Hill	0,134 ± 0,016	ND	0,5829 ± 0,0083
Ionosférico	0,0528 ± 0,0039	ND	0,5291 ± 0,0032
Glaciar Collins	0,0917 ± 0,0067	ND	0,5397 ± 0,0057
Lago Uruguay	0,0213 ± 0,0041	ND	0,572 ± 0,016

Muestra	Th	Sn	Sb
Base Artigas	0,0250 ± 0,0035	0,0357 ± 0,0053	0,0895 ± 0,0025
Half Three Points (HTP)	ND	ND	0,0706 ± 0,0043
Fossil Hill	<0,002	ND	0,0619 ± 0,0028
Ionosférico	ND	ND	0,0582 ± 0,0014
Glaciar Collins	0,0027 ± 0,0023	ND	0,0539 ± 0,0078
Lago Uruguay	ND	ND	0,0596 ± 0,0036
Resultados ± desviación estándar (µg L⁻¹)			

Resultados en muestras de suelos

TABLA 9. Resultados de las muestras de suelos mediante ICP-MS.

En los casos en que el criterio adoptado para la estimación de la incertidumbre arrojará resultados no coherentes (muestras con muy bajo contenido del analito), solamente se expresó el resultado de la cuantificación. ND: no detectado.

Muestra	Cr	Ni	Co
Base Artigas	2,7 ± 1,7	2,7 ± 1,9	12,5 ± 0,1
Half Three Points (HTP)	17,5 ± 0,3	9,7 ± 0,5	17,0 ± 0,2
Fossil Hill	15,2 ± 0,1	6,1 ± 0,2	20,7 ± 0,2
Ionosférico	22,3 ± 0,3	8,7 ± 0,2	13,2 ± 0,5
Glaciar Collins	2,3 ± 2,0	2,1 ± 1,5	8,1 ± 1,4
Lago Uruguay	4,6 ± 2,5	2,6 ± 1,8	11,9 ± 0,6
Muestra	As	Sr	Cd
Base Artigas	1,3 ± 1,0	391,5 ± 0,5	0,08
Half Three Points (HTP)	0,4 ± 0,3	403,1 ± 0,1	0,04
Fossil Hill	1,8 ± 0,7	161,7 ± 0,1	0,08
Ionosférico	13,2 ± 0,6	288,4 ± 0,1	0,11
Glaciar Collins	8,1 ± 1,5	237,6 ± 0,1	0,04
Lago Uruguay	11,9 ± 0,7	322,1 ± 0,1	0,10

Muestra	Hg	Pb	U
Base Artigas	0,06	5,8 ± 0,5	1,0 ± 0,8
Half Three Points (HTP)	ND	1,8 ± 1,1	0,6 ± 0,5
Fossil Hill	0,52	2,6 ± 0,8	0,47
Ionosférico	ND	4,4 ± 0,8	0,57
Glaciar Collins	ND	2,5 ± 0,7	0,67
Lago Uruguay	ND	3,6 ± 1,5	1,2 ± 0,6
Resultados (mg kg⁻¹) ± (diferencia porcentual entre réplicas/promedio)			

TABLA 10. Resultados del contenido de estroncio mediante ICP-OES en aguas.

Muestra	Sr (mg L ⁻¹)
Base Artigas	4,076 ± 0,010
Half Three Points (HTP)	4,1576 ± 0,0053
Fossil Hill	3,9934 ± 0,0068
Ionosférico	3,8545 ± 0,0078
Glaciar Collins	3,777 ± 0,024
Lago Uruguay	4,141 ± 0,027
Resultados ± desviación estándar (mg L⁻¹)	

DISCUSIÓN

La validación de la metodología para las dos técnicas instrumentales utilizadas arrojó resultados satisfactorios para el fin propuesto, adecuados para estudios ambientales.

Resultados en muestras de aguas

Algunas agencias de regulaciones ambientales, como Canadian Environmental Quality Guidelines - CCME o United States Environmental Protection Agency - US EPA (United States Environmental Protection Agency - USEPA, [s.d.]), establecen límites máximos para contaminantes inorgánicos en aguas. CCME publica una guía que refiere a aguas de consumo y aguas marinas (Canadian Council of Ministers of the Environment - CCME, 2007a, 2007b). US EPA también publica guías de referencia y recomendaciones para aguas de consumo (Safe Drinking Water Act y 2018 Drinking Water Standards and Health Advisories Tables) que establecen el contenido máximo admisible de contaminantes inorgánicos en agua de consumo humano. Si bien las aguas estudiadas no son de consumo directo, igualmente se

toman en cuenta las recomendaciones de las agencias antes citadas para ese tipo de aguas. Un resumen de los contenidos máximos sugeridos se presenta en la Tabla 11.

TABLA 11. Contenidos máximos admisibles recomendados por CCME y US EPA para aguas de consumo. N/D: no declarado.

Agencia	Unidades	Cr	Ni	Co	As	Sr	Cd
CCME	$\mu\text{g L}^{-1}$	1,5	N/D	N/D	12,5	N/D	0,12
US EPA	mg L^{-1}	0,1	N/D	N/D	0,01	4	0,005
Agencia	Unidades	Hg	Pb	U	Th	Sn	Sb
CCME	$\mu\text{g L}^{-1}$	0,016	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D
US EPA	mg L^{-1}	0,002	0,015	N/D	N/D	N/D	0,006

Los contenidos de mercurio en las seis muestras analizadas cumplen con los límites establecidos por US EPA pero superan los límites establecidos por CCME. Respecto al contenido de cadmio, una de las muestras presenta un contenido del metal que se encuentra cerca del límite del valor máximo sugerido por CCME pero cumple con lo establecido por US EPA en todas las muestras analizadas. Particularmente es de destacar el contenido de estroncio en las muestras de agua. La US EPA ha establecido un límite de $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ para este metal en agua de consumo directo (2018 Drinking Water Standards and Health Advisories Tables). Los contenidos de estroncio determinados por ICP-OES en las seis muestras están en el entorno del valor máximo sugerido por esa agencia, tres de ellas poco por debajo y tres de ellas por encima de ese valor (resultados en el rango $3,78 - 4,16 \text{ mg L}^{-1}$). El valor promedio obtenido en los puntos muestreados fue precisamente el del valor máximo sugerido por US EPA. Estos resultados son del mismo orden que los determinados por ICP-MS (resultados en el rango $3,29 - 3,97 \text{ mg L}^{-1}$). Si bien son pocas muestras, es un estudio de *screening* para obtener los primeros datos sobre niveles de estroncio, pues no se conocen antecedentes sobre estudios de este tipo.

Resultados en muestras de suelos

Para esta discusión se toman en cuenta los valores máximos recomendados por CCME para suelos de parques. En la Tabla 12 se resumen estos valores.

TABLA 12. Valores máximos recomendados de CCME de contaminantes inorgánicos en suelos de parques. N/D: no declarado.

Agencia	Unidades	Cr	Ni	Co	As	Sr
CCME	mg kg^{-1}	64	50	N/D	12	N/D
Agencia	Unidades	Cd	Hg	Pb	U	
CCME	mg kg^{-1}	10	6,6	140	23	

La observación de los resultados obtenidos permite visualizar que en general las muestras analizadas cumplen con las recomendaciones de la Canadian Environmental Quality Guidelines (Canadian Environmental Quality Guidelines, 2007). Si bien no está declarado el contenido máximo de estroncio en las recomendaciones que publica esa agencia, los resultados obtenidos podrían indicar que el contenido de este metal puede resultar alto. El estroncio está asociado a rocas, es un elemento relativamente abundante en la naturaleza y representa una media del 0,034% de todas las rocas ígneas. Se encuentra mayoritariamente en forma de sulfato en el mineral celestina y carbonato en el mineral estroncianita (U.S. Geological Survey, 2010).

CONCLUSIONES

Los estudios presentados en este trabajo están entre los primeros dirigidos a relevar el impacto antropogénico en el territorio antártico a partir del monitoreo de los niveles de concentración de los elementos indicados, y es un punto de partida de futuros proyectos de monitoreo ambiental. Particularmente debería ponerse especial atención a los contenidos de cadmio, mercurio y estroncio en aguas y estroncio en suelos. En relación a este último metal, sería interesante determinar cuál es el isótopo predominante para evaluar posible actividad nuclear en la zona (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, [s.d.]; Baeza, 1994). Si bien en este trabajo los contenidos de estaño, plomo y antimonio no resultaron relevantes, igualmente son interesantes de monitorear porque pueden ser indicadores de contaminación por residuos de cascos de los barcos.

Asimismo, resulta de importancia la ampliación de los estudios a otras matrices, como por ejemplo algas (Farías, et al., 2002; Farías, et al., 2007), especies marinas y otras especies comunes en la zona.

RECONOCIMIENTOS

Se agradece al Instituto Antártico Uruguayo por autorizar la investigación científica y publicación de este trabajo y al Dr. Álvaro Soutullo como jerarca responsable de las actividades en ese territorio. A la Dra. Silvana Vero y Dra. Silvana Alborés del Área Microbiología de la Facultad de Química - UdelaR, responsables ante el I.A.U. de los muestreos y quienes aportaron gentilmente las muestras utilizadas en este trabajo. A los colegas que participaron de los muestreos y que aportaron información relevante para la confección de este texto.

A PEDECIBA Química.

Al profesor Joaquim de Araújo Nóbrega y a los colegas del laboratorio GAIA, quienes brindaron su apoyo y permanente disposición para la realización de este trabajo. A través de ellos, agradecemos a la Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), en cuyas instalaciones y laboratorios fueron desarrollados los ensayos.

A Agilent Technologies, Thermo Scientific and Analítica.

REFERENCIAS

- Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, [s.d.]. *Resúmenes de Salud Pública - Estroncio (Strontium)* [En línea]. Atlanta: ATSDR. [Consulta: 15 de octubre de 2018]. Disponible en: https://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs159.html
- American Society for Testing and Materials, 2006. ASTM 1193: *Standard specification for reagent water*. Philadelphia: ASTM.
- Asociación Española de Normalización y Certificación, 2003. UNE-EN 5667-2: *Guía para la conservación y manipulación de las muestras de agua*. Madrid: AENOR
- Baeza, A., Del Río, M., Paniagua, J., Navarro, E., Rodríguez, M. y Sánchez, F., 1994. Radioactive concentrations of the livingston island soils (Antarctica). Dosimetry considerations. En: *Appl. Radiat. Isot.*, 6, pp.675-681.
- Bruognoli, E., Colina, R., Victoria, M., Venturini, N., Bueno, C., Iglesias, K. y otros, [s.d.]. *Identificación de los impactos antrópicos en ambientes cercanos a la Base Científica Antártica Artigas (Isla Rey Jorge), mediante el uso de indicadores químicos y microbiológicos (02/2014 - 03/2016)*. Proyecto de investigación con apoyo financiero del Instituto Antártico Uruguayo. Inédito
- Canadian Council of Ministers of the Environment - CCME, 2007a. *Canadian environmental quality guidelines* [En línea]. Winnipeg: CCME. [Consulta: 15 de octubre de 2018]. Disponible en: https://www.ccme.ca/en/resources/canadian_environmental_quality_guidelines/
- Canadian Council of Ministers of the Environment - CCME, 2007b. *Canadian soil quality guidelines for the protection of environmental and human health* [En línea]. Winnipeg: CCME. [Consulta: 15 de octubre de 2018]. Disponible en: http://esdat.net/Environmental%20Standards/Canada/SOIL/rev_soil_summary_tbl_7.0_e.pdf
- De Azevedo, F. A. y Da Matta Chasin, A., 2003. *Metais. Gerenciamento da toxicidade*. San Pablo: Atheneu, InterTox
- De Lima Neto, E., Braga Bueno Guerra, M., Thomazini, A., Daher, M., Medeiros de Andrade, A. y Schaefer G.R., C. E., 2017. Soil contamination by toxic metals near an Antarctic Refuge in Robert Island, Maritime Antarctica: a monitoring strategy. En: *Water Air Soil Pollut*, 228, pp.228-66.
- Fariás, S., Pérez Arisnabarreta, S., Vodopivec, C. y Smichowsky, P., 2002. Levels of essential and potentially toxic trace metals in Antarctic macro algae. En: *Spectrochimica Acta Part B*, 57, pp.2133-2140.
- Fariás, S., Smichowsky, P., Vélez, D., Montoro, R., Curtosi, A. y Vodopivec, C., 2007. Total and inorganic arsenic in Antarctic macroalgae. En: *Chemosphere*, 69, pp.1017-1024.
- Instituto Antártico Uruguayo, 2018. *Publicaciones científicas 1997-2018* [En línea]. Montevideo: Instituto Antártico Uruguayo. [Consulta: 12 de octubre de 2018]. Disponible en: http://www.iau.gub.uy/?page_id=1953&lang=es
- Krug, F. y Piovezani Rocha, F. R., 2016. *Métodos de preparo de amostras para análise elementar*. San Pablo: Sociedade Brasileira de Química. pp.315-383.
- Perkin Elmer SCIEX, 2008. *Isotopo abundances, interferences and DRC information*. Massachusetts: Perkin.

- Tratado Antártico*, 1959 [En línea]. Buenos Aires: Secretaría del Tratado Antártico. [Consulta: 11 de octubre de 2018]. Disponible en: http://www.ats.aq/documents/keydocs/vol_1/vol1_2_AT_Antarctic_Treaty_s.pdf
- U.S. Environmental Protection Agency, 2018. *2018 Edition of the drinking water standards and health advisories tables* [En línea]. Washington: USEPA. [Consulta: 20 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-03/documents/dwtable2018.pdf>
- U.S. Geological Survey, 2010. *2007 minerals yearbook* [En línea]. Virginia: USGS. [Consulta: 15 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/strontium/myb1-2007-stron.pdf>
- United States Environmental Protection Agency - USEPA, [s.d.]. *Safe drinking water act (SDWA)* [En línea]. [s.l.]: USEPA [Consulta: 15 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://www.epa.gov/sdwa>

Páginas web recomendadas

Instituto Antártico Uruguayo: <http://www.iau.gub.uy/?lang=es>

Recuperación de resinas polifuncionales para purificación del agua: estudios adsorptivos con azul de metileno y naranja de metilo

Recovery of polifunctional resins for water purification: adsorption studies with methylene blue and methyl orange

RECIBIDO: 16/10/2018 → APROBADO: 19/12/2018 ✉ joamateuscassiano@gmail.com

✉ ASSIS, JOÃO MATHEUS CASSIANO (1); PASTRE, IEDA APARECIDA (1); SILVA, MATHEUS ANTÔNIO (1)

(1) UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)/INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS (IBILCE) - SÃO JOSÉ DO RIO PRETO/SÃO PAULO/BRASIL

RESUMEN

Las resinas de intercambio iónico son constituidas, en su gran mayoría, por polímeros orgánicos sintéticos con estructura reticulada que forman gránulos porosos y son portadores de carga eléctrica. Estas cargas son neutralizadas por sus contraiones presentes en soluciones, los cuales son intercambiables y dan origen al proceso del cambio iónico. Las resinas, muy utilizadas en deionizadores del agua, tienen en su estructura grupos ácidos y básicos cambiables por los cationes y aniones contaminantes. Estos últimos son eliminados en una dinámica de iones con la resina en un proceso denominado desmineralización. Las pruebas comparativas propuestas para evaluar la eficacia de la recuperación de las resinas polifuncionales fueron la conductividad y la capacidad adsorptiva frente a los colorantes azul de metileno (AM) y naranja de metilo (AL). La conductividad obtenida en el agua aplicada a las resinas recuperadas fue de $0,880 \mu\text{S cm}^{-1}$, valor contenido en el rango ideal para agua deionizada ($0,5\text{-}3,0 \mu\text{S cm}^{-1}$). Frente a la resina comercial, la recuperada presentó una capacidad adsorptiva superior; la resina recuperada aniónica (R-) adsorbió 22% más que la comercial anionica (C-), mientras que la capacidad adsorptiva de la resina catiónica (R+) y de la comercial catiónica (C+) fueron prácticamente semejantes. Aplicando los modelos matemáticos de adsorción, se halló que la recuperación no sufrió modificación en el perfil adsorptivo, que permaneció homogéneo (Langmuir), mientras que en las resinas C+ y R+ ocurrió la modificación del perfil de adsorción,

que varió de homogéneo a heterogéneo (Freundlich), respectivamente. En pruebas de espectro en la luz infrarroja fue posible constatar que la recuperación modifica la morfología de la resina pero no su estructura química.

PALABRAS CLAVE: purificación de agua; adsorción en resinas polifuncionales, isothermas de adsorción, modelos de Langmuir y Freundlich.

ABSTRACT

The ion-exchange resins are mainly constituted by synthetic organic polymers, with reticulated structure which form porous granules with ion charges. These charges are neutralized by their counterions available in solution, which are exchangeable, leading to a charge exchange process. The resins are very used in water deionizers, which have acid and basic groups in its structure, changeable by the cations and anions contaminants that are disposed in a resin and ions dynamic, in a process called demineralization. The comparative tests proposed to evaluate the recovery efficiency of polyfunctional resin was the conductivity test and the adsorptive capacity of the methylene blue (MB) and methyl orange (MO) dye. The conductivity obtained in the recovered resins was $0,880 \mu\text{S cm}^{-1}$, the value contained in the band ideal for deionized water ($0,5-3,0 \mu\text{S cm}^{-1}$). Compared to the commercial resin, the recovered one presented a superior adsorptive capacity; the anionic recovered resin (R-) adsorb 22% more than the anionic commercial (C-). Regarding the adsorption capacity of the cationic recovered resin (R+) and the cationic commercial (C+), both are practically alike. Applying the adsorption mathematical models, it was found that the recovery process applied did not modify the adsorption pattern (remaining homogenic, Langmuir), while in the C+ and R+ resin there were modification in the adsorption pattern, from homogeneous to heterogeneous (Freundlich), respectively. The FTIR tests showed the recovery modifies the morphology of the resin, but not its chemical structure. **KEYWORDS:** ion-exchange resins, adsorption isotherms, Langmuir and Freundlich models.

INTRODUCCIÓN

Las resinas de intercambio iónico están constituidas, en su gran mayoría, por polímeros orgánicos sintéticos con estructura reticulada, que forman gránulos porosos y son portadores de carga. Las cargas son oriundas de grupos ácidos y básicos, como grupos sulfonatos y aminas cuaternarias, y son neutralizadas por sus contraiones, especies intercambiables en el proceso de intercambio iónico. En este proceso, cationes y aniones de naturaleza orgánica o inorgánica son removidos de la fase acuosa por medio de una dinámica simple de adsorción física. Estas resinas se utilizan extensamente en los sistemas de purificación de agua, donde se utiliza aproximadamente 1 kg de resina dentro de los deionizadores.

En general, las resinas polifuncionales poseen viabilidad de 24 meses y poseen capacidad de deionizar aproximadamente 500 L de agua hasta llegar al estado de saturación. Después de la saturación de la resina, es enviada al entreposto de residuos para el descarte final en el vertedero. Al ser un polímero sintético y de difícil degradación en el medio ambiente, la recomendación del fabricante es la incineración (Baird, 2002). En el caso de que sea descartada directamente, la resina contribuye a la polución por microplásticos en varios ecosistemas, principalmente en el acuático (Gregory, 2009).

La propuesta de recuperación de la resina resulta viable, pues se utilizan menos recursos financieros y materiales que los derivados de la producción y la compra (o sustitución) de estas y, en consecuencia, una menor cantidad de resinas saturadas en el medio ambiente causan menos impacto ambiental.

Una de las formas de evaluar la eficacia de la recuperación de las resinas es realizando estudios adsorptivos. Uno de los principales modos de estudio es la adecuación en modelos de adsorción ya establecidos, como los de Langmuir y Freundlich. Para el estudio de la adecuación de los modelos de Langmuir y de Freundlich a los datos experimentales se emplearon las ecuaciones linealizadas.

El modelo de Langmuir (Ecuación 1) describe cuantitativamente la formación de monocapa del adsorbato en la superficie del adsorbente y no considera la transigración del adsorbato en el plano de la superficie. Es válida para la adsorción en monocapa en superficies que contienen un número finito de lugares idénticos y una energía uniforme.

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{Q_m K_L} + \frac{1}{K_L} C_e \quad [1]$$

Donde:

q_e representa la cantidad adsorbida por gramo de adsorbente en el equilibrio (mg g^{-1}); C_e es la concentración del adsorbato en el equilibrio (mg L^{-1}); Q_m representa la cobertura máxima de la monocapa (mg g^{-1}), y K_L es la constante de Langmuir (L mg^{-1}), que está relacionada con la energía de adsorción que refleja la afinidad entre adsorbente y adsorbato (Marco-Brown, et al., 2014).

El modelo de Freundlich describe mejor la adsorción en superficies heterogéneas donde ocurre adsorción en multicapas con interacción entre las moléculas de adsorbato. Es representado matemáticamente por la Ecuación 2.

$$\ln Q_e = \ln K_F + \frac{1}{n} \ln C_e \quad [2]$$

Donde:

K_F es la constante de Freundlich (mg g^{-1}) que indica la capacidad de adsorción; C_e es la concentración del adsorbato en el equilibrio (mg L^{-1}); Q_e es la cantidad adsorbida por gramo de adsorbente en el equilibrio (mg g^{-1}), y n indica cualitativamente la reactividad de los sitios de conexión (Sodré, 2001).

Objetivos

Separar y recuperar resinas apunta a reducir los costos de su sustitución en el sistema de purificación del agua implantado en los laboratorios didácticos y de investigación de los campus de la UNESP. Además, proporciona un fin alternativo para un residuo sin un plan de descarte que sea ecológicamente correcto. En este contexto, el objetivo de este trabajo es estudiar y evaluar la recuperación y capacidad adsorptiva de la resina empleada en los purificadores del agua.

MATERIALES Y MÉTODOS

El proceso de recuperación de la resina se realizó en tres etapas.

La primera etapa incluyó la separación de las resinas catiónicas y aniónicas. Para esto, fue preparada una solución acuosa de una sal inorgánica, que posee una densidad intermedia entre las dos resinas. De esta manera, las resinas son separadas por densidad intermedia entre las dos resinas. Luego, la fracción de la resina aniónica y catiónica se diferenció por medio de la adsorción del colorante AM. En la camada superior se identificó la presencia de la resina catiónica, en la camada inferior, de la camada aniónica.

La segunda etapa involucró tratamiento específico de cada resina con solución ácida y básica, ambas con una concentración de 1 mol L^{-1} , bajo agitación de 30 minutos. A continuación, las resinas fueron lavadas con agua desmineralizada, agitándose por 30 minutos. Las resinas fueron puestas en una columna y lavadas con agua desmineralizada hasta verificar que el pH del agua de salida fuera igual al pH del agua de entrada en la columna.

La tercera etapa implicó la elaboración de un sistema de filtración a pequeña escala, utilizando la resina post-uso y recuperada. Para verificar la eficiencia del proceso se comparó la conductividad del agua con aquella proveniente de la resina comercial. Después de recuperada, se realizaron estudios de la capacidad de intercambio iónico de la resina mixta y de la aniónica, comercial y recuperada, frente a colorantes AM y AL en medio acuoso y a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ de temperatura.

Los estudios de intercambio iónico se realizaron añadiendo en medio acuoso concentraciones fijas de resina en concentraciones variadas de colorante, con el sistema bajo agitación constante por 24 horas. Luego el sistema fue centrifugado por 20 minutos a 3000 rpm. Las cuantificaciones del colorante presentes en la fase acuosa fueron determinadas por espectrofotometría en la región del visible. La lectura para los ensayos de adsorción para AM se realizó en la longitud de onda de 670 nm, que corresponde a la longitud de máxima absorción de la especie monomérica de azul de metileno, y para los ensayos con AL 463 nm, que corresponden a naranja de metilo.

En el análisis de evaluación de la recuperación se realizaron las pruebas de espectro en la luz infrarroja con el objetivo de comparar las estructuras de las resinas estudiadas. Para esto se pulverizó las resinas con un mortero y luego se analizó en el espectrofotómetro FT-IR Spectrometer: Spectrum Two, PerkinElmer®.

RESULTADOS

Uno de los parámetros para la evaluación de la viabilidad del proceso de recuperación fue la conductividad, que permite determinar cuantitativamente la presencia de iones en solución. El agua del grifo, que tiene iones disueltos, presentaba una conductividad de $207,4 \mu\text{S cm}^{-1}$. Después que el agua pasó por las columnas, conteniendo la resina comercial y la recuperada, la conductividad se redujo a $0,66$ y $0,88 \mu\text{S cm}^{-1}$, respectivamente.

Los datos presentados son la media de 10 mediciones y el valor para el agua tratada con la resina recuperada está cerca del rango ideal para el agua desionizada ($0,5$ a $3,0 \mu\text{S cm}^{-1}$; Gehaka, 2013), como se puede ver en la Tabla 1.

TABLA 1. Conductividad del agua del grifo sin tratamiento y después del tratamiento con la resina comercial y recuperada.

	Comercial	Recuperada	Grifo
Conductividad ($\mu\text{S/cm}$)	0,666	0,880	207,4

La eficiencia del proceso se demuestra porque las resinas recuperadas, al ser aplicadas en los sistemas de deionización, reducen significativamente (99,6%) la conductividad del agua que entra al comienzo del proceso ($207,4 \mu\text{S cm}^{-1}$).

Las isoterms de adsorción del azul de metileno con la resina mixta y la aniónica, comercial y recuperada, se presentan en las Figuras 1 y 2. Las isoterms presentan perfil de alta afinidad; la resina aniónica recuperada presentó un aumento del 22% de la capacidad máxima de adsorción del azul de metileno en relación a la resina comercial aniónica, como se observa en la Figura 1.

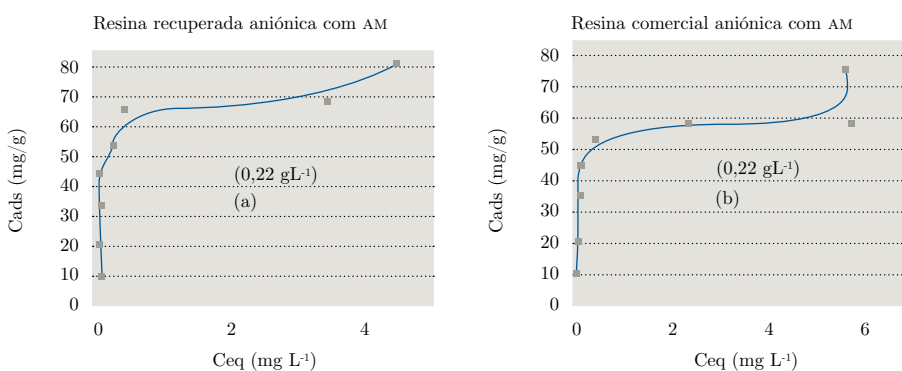


Figura 1. Adsorción del azul de metileno en las resinas aniónicas: (a) recuperadas, (b) comerciales. $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$; medio acuoso.

En la Figura 2 se presentan las isotermas de adsorción del colorante en la resina mixta recuperada y comercial. Se observa que la resina catiónica, cuando se ubica junto con la aniónica, presenta un perfil de alta afinidad para las bajas concentraciones del colorante, con una adsorción lenta en concentraciones del colorante mayores que $2,1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sin “plató” definido (Myers, 2003).

Contemplando que en 0,22 g de la mistura de la resina mixta (aniónica y catiónica) el 60% corresponde a la aniónica, la concentración máxima adsorbida es equivalente a la observada para la resina aniónica separada (Figura 1). Al contrario de la isoterma, que presenta un plato horizontal según el modelo de Giles, presentó un plato ascendente, que expresa que una segunda camada se forma antes del término de la primera monocamada. Ese efecto puede ser atribuido a la agregación del colorante en la superficie de la resina, lo cual se induce por la concentración de las moléculas de AM en solución.

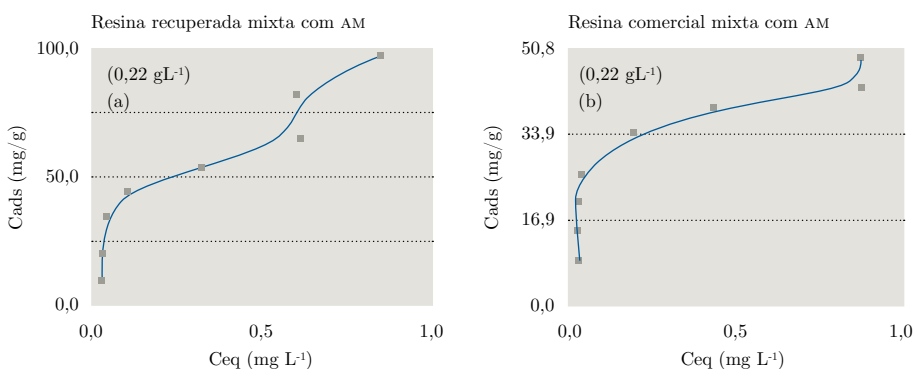


Figura 2. Adsorción del azul de metileno en las resinas mixtas (polifuncionales): (a) recuperadas, (b) comerciales. $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$; medio acuoso.

Para las resinas catiónicas que en su matriz polimérica contienen cargas positivas se empleó el colorante aniónico naranja de metilo (AL). Las curvas que representan la relación de la composición del colorante agregado con la absorbancia del colorante que permanece en el sobrenadante se expresan en la Figura 3. Se observa que la resina recuperada presenta menor capacidad de adsorción en las concentraciones del colorante menores que $1,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en relación con el comercial.

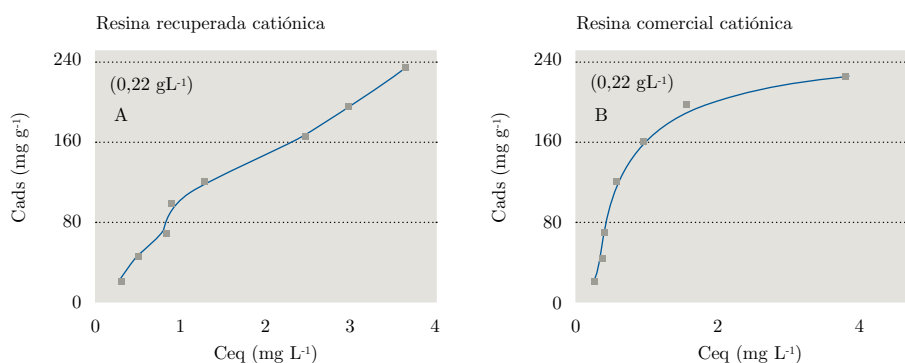


Figura 3. Adsorción del naranja de metilo en las resinas: A) catiónicas recuperadas, B) comerciales. $T = 27 \text{ }^\circ\text{C}$; medio acuoso.

Con el fin de obtener más datos y caracterizar el proceso adsorptivo de las resinas comerciales y recuperadas, se aplicó a los datos obtenidos los modelos matemáticos de Langmuir y Freundlich. Además, se realizó una estimación de la capacidad máxima de retención de especies por las resinas (Sposito, 1989).

Cuando los modelos matemáticos linealizados de isothermas de adsorción se aplican a los datos experimentales obtenidos para la adsorción del azul de metileno en las resinas, solo el de Langmuir alcanza valores de coeficiente de correlación satisfactorios ($R^2 > 0,90$, Tabla 2). Este modelo de isoterma considera la adsorción que ocurre en monocapa, donde la energía de los sitios de adsorción es homogénea durante el proceso adsorptivo.

TABLA 2. Parámetros de Langmuir y Freundlich obtenidos por medio de las isothermas de adsorción de las resinas: catiónica comercial (C+) y recuperada (R+), aniónica comercial (C-) y aniónica recuperada (R-), $T = 25 \text{ }^\circ\text{C}$. Donde, R^2 : coeficiente de correlación; Q_m : cobertura máxima de la monocapa; K_L : cte. de Langmuir; n : reactividad de los lugares; K_f : capacidad de adsorción (cte. de Freundlich).

Resinas	Langmuir			Freundlich		
	R^2	$Q_m(\text{mg g}^{-1})$	$K_L (\text{L mg}^{-1})$	R^2	n	$K_f (\text{mg g}^{-1})$
C+	0,9979	265,95	1,69	0,8934	-	-
R+	0,6086	-	-	0,99466	0,83	101,18
C-	0,9728	66,05	20,73	0,7740	-	-
R-	0,9841	78,55	7,58	0,3157	-	-

Se aplicaron los modelos matemáticos de Langmuir y Freundlich en las adsorciones realizadas con las resinas aniónicas y el naranja de metilo. Se observó que mientras la adsorción del azul de metileno en la resina aniónica, recuperada y comercial, presentó siempre correlación con la isoterma de Langmuir, las adsorciones realizadas con el

naranja de metilo en las resinas catiónicas presentaron un perfil mixto. Mientras la comercial catiónica presentó perfil de la isoterma de Langmuir, la recuperada catiónica presentó perfil de la isoterma de Freundlich y menor eficiencia adsorptiva.

La R+ posee una mayor correlación con el perfil de adsorción heterogéneo, a diferencia de las otras tres resinas estudiadas (C+, C-, R-, Langmuir). Para realizar una comparación global, se utilizan como dato común los factores encontrados en las ecuaciones 1 y 2, Q_m y K_f , respectivamente. Ambos expresan un mismo sentido físico, la cantidad máxima adsorbida.

La constante de Langmuir, K_L , que presentó la resina comercial catiónica, tuvo valores de cinco a veinte veces menores que los obtenidos con la resina comercial aniónica con azul de metileno. Esto demuestra que la interacción entre la resina comercial catiónica y el colorante naranja de metilo tiene menor afinidad que la resultante de la resina comercial mixta y aniónica con azul de metileno.

El parámetro n de la isoterma de Freundlich indica cualitativamente la reactividad de los sitios de conexión, así como la heterogeneidad del adsorbente. En el caso de la resina recuperada con naranja de metilo, el parámetro n menor que 1 indica que el proceso de adsorción ocurrió de forma física, sin reacciones químicas entre adsorbente y adsorbato y sin la formación de nuevas conexiones químicas. Además, la heterogeneidad del adsorbente es baja, pues cuanto más lejos de 1 está el parámetro n , más heterogénea se muestra la superficie del adsorbente.

Por último, en relación a las pruebas de infrarrojos, se presentan en la Figura 4 las curvas referentes a las resinas comerciales y recuperadas, aniónicas y catiónicas.

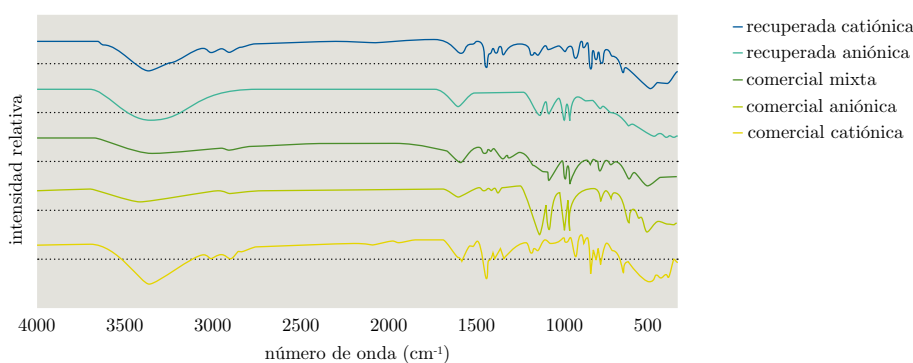


Figura 4. Resultados de infrarrojos para las resinas comerciales / recuperadas aniónica / catiónica.

En la Figura 4 se presentan los espectros en la región del infrarrojo de la resina comercial mixta separada y de las resinas que sufrieron el proceso de recuperación. En las resinas aniónicas se evidencian las bandas alrededor de 3420 cm^{-1} , referentes a los grupos sulfonatos presentes en el poliestireno sulfonato de sodio (PSSNa) (Souza, 2014). En contraste, en las resinas catiónicas la banda ancha en torno a 3365 cm^{-1} y la banda de menor intensidad en 3024 cm^{-1} son características de las

aminas cuartenarias presentes en el hidróxido de trimetilamina quartenizado (HTQ), que se halla en las resinas de carga positiva (Dow, 2018).

La resina comercial mixta presenta una banda ancha en 3360 cm^{-1} , resultado de la suma de las intensidades de las bandas evidenciadas en las resinas aniónicas y catiónicas.

La Figura 5 compara las resinas recuperadas y comerciales. Se observa que no existen diferencias significativas en el número de onda de las bandas, lo que indica que no ocurrió modificación química a partir de la aplicación del proceso de recuperación:

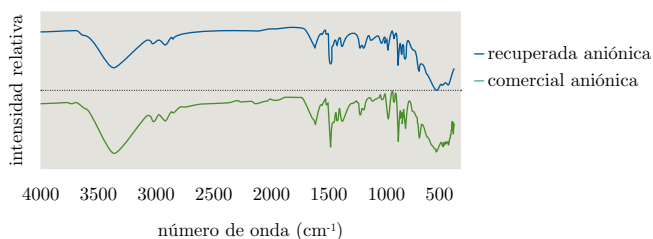


Figura 5. Comparación entre la resina comercial y recuperada aniónica.

CONCLUSIONES

Este trabajo que comenzó en 2015 ha mostrado datos satisfactorios desde su comienzo, pues el proceso empleado para la recuperación es viable.

La recuperación propuesta proporcionó un aumento en la capacidad adsorptiva en relación a la resina comercial, dado que una de las resinas recuperadas, la aniónica, presenta capacidad adsorptiva un 22% mayor. La recuperación no causó modificación en la estructura química, lo que indica solo una modificación física en la superficie de la resina y ocasiona el aumento de la capacidad adsorptiva observada.

Además, cumple con el compromiso económico y ambiental propuesto por el proyecto, dado que utiliza una cantidad mínima de agua desmineralizada para el tratamiento, además de permitir que lo que se obtenga hasta aquí sea expandido a trabajos futuros que utilicen las resinas recuperadas para descontaminación de contaminantes emergentes en aguas, como el herbicida paraquat y el fármaco diclofenaco.

RECONOCIMIENTOS

Laboratório de Fotoquímica (LFQ), PET - Programa de Ensino Tutorial/MEC (Ministério de Educação e Cultura), Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (UNESP/Ibilce).

REFERENCIAS

- Baird, C., 2002. *Química ambiental*. 2ª ed. Porto Alegre: Bookman. ISBN 85-363-0002-7
- Dow, 2018. *Product Data Sheet: Amberlite™ MB20 H/OH Ion Exchange Resin* [En línea]. [Consulta: 10 de diciembre de 2018]. Disponible en: http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDOWCOM/dh_09b7/0901b803809b7501.pdf

- Gekaka, 2013. *A medida de pH e condutividade* [En línea]. São Paulo: Gekaka.
[Consulta: 16 de octubre de 2018]. Disponible en: www.gehaka.com.br/downloads/apresentacao_sanepar.pdf
- Giles, C.H., Macewan, T.H., Nakhwa, S.N. y Smith, D., 1960. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanism and in measurement of specific surface areas of solids. En: *Journal Society Dyers Colourists*, 846, pp.3973-93.
- Gregory, M. R., 2009. Environmental Applications of plastic debris in marine settings - entanglement, ingestion, smothering, hangers-on, hitchhiking and alien invasions. En: *Philosophical Transactions Royal Society London Series B: Biological Sciences*, 364(1526), p.2013-25.
- Marco-Brown, J.L., Areco, M.M., Sánchez, R.M.T. y Afonso, M.S., 2014. Adsorption of picloram herbicide on montmorillonite: Kinetic and equilibrium studies. En: *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 449(1), pp.121-128.
- Myers, D., 1999. *Surfaces, interfaces and colloids - Principles and applications*. 2ª ed. Cap. 9. New York: Wiley.
- Sodré, F.F., Lenzi, E. y Costa, A.C.S., 2001. Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos. En: *Química Nova*, 24(3), pp.324-330.
- Souza, B., Nunes, G.A., 2014. *Sulfonação de poliestireno*. São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, Faculdade de Engenharias, Arquitetura e Urbanismo. (Trabajo de fin de curso).
- Sposito, G., 1989. *The chemistry of soils*. Oxford: Oxford Univ. Press.
ISBN: 0-19-504615-3

Valor nutricional de *Moringa stenopetala*: determinación de micro y macronutrientes esenciales, vitamina C y factor de transferencia a infusiones

Nutritional value of *Moringa stenopetala*: determination of micro and macro essential nutrients, vitamin C and transfer factor to infusions

RECIBIDO: 3/10/2018 → APROBADO: 8/11/2018 ✉ imachado@fq.edu.uy

✉ MACHADO, IGNACIO (1); TISSOT, FLORENCIA (1); BÜHL, VALERY (1); SANTANDER, JESSICA (1); FALCHI, LUCÍA (1); CHAMBÓN, JESSICA (1)

(1) GRUPO DE ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA Y DESARROLLO DE ESTRATEGIAS SIMPLES PARA PREPARACIÓN DE MUESTRAS (GATPREM), ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA, DEPARTAMENTO ESTRELLA CAMPOS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY

RESUMEN

Moringa stenopetala es una gran fuente de nutrientes utilizada para alimentación humana y animal. Este hecho inspiró el estudio de su composición química en lo que respecta al contenido de minerales y vitamina C. Las determinaciones analíticas de metales se realizaron mediante espectrometría de absorción atómica de llama. Para las determinaciones de vitamina C se utilizó cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos. Se evaluó la disponibilidad de nutrientes en infusiones mediante el cálculo de factores de transferencia desde las matrices sólidas. Luego de analizar varias marcas comerciales, se pudo observar una mayor variabilidad en el contenido de elementos como hierro, magnesio y sodio. Se destacó un alto contenido de calcio en las muestras, pero con bajo factor de transferencia a las infusiones. En el caso de la vitamina C, se evidenció una gran pérdida durante la preparación de las infusiones debido a la descomposición térmica. *Moringa stenopetala* sería un interesante suplemento natural beneficioso para la salud, sobre todo consumido en base fresca, rico en calcio, potasio, magnesio y vitamina C, en cantidades similares a las presentes en alimentos recomendados como fuente de estos nutrientes por excelencia.

PALABRAS CLAVE: *Moringa stenopetala*, nutrientes, análisis elemental.

ABSTRACT

Moringa stenopetala is a good source of nutrients intended for human and animal consumption. This fact inspired the study of its minerals and vitamin C contents. Metals were analyzed by flame atomic absorption spectrometry. Vitamin C was determined by liquid chromatography equipped with a diode array detector. The nutrients availability in infusions was evaluated by calculating transfer factors from the solid matrices. After analyzing several commercial brands, a greater variability in the content of elements such as iron, magnesium and sodium was observed. The high calcium content found in the samples was highlighted, but with a low transfer factor to the infusions. In the case of vitamin C, a great loss was detected during the preparation of the infusions due to thermal decomposition. *Moringa stenopetala* would be an interesting natural supplement beneficial to health, especially consumed on a fresh basis, rich in calcium, potassium, magnesium and vitamin C, in quantities like those present in foods recommended as a source of these nutrients.

KEYWORDS: *Moringa stenopetala*, nutrients, elemental analysis.

INTRODUCCIÓN

Moringa stenopetala es un árbol tropical perteneciente a la familia Moringaceae, nativa de Etiopía, Kenia y Somalia. Estos cultivos fueron introducidos en América Central (Nicaragua, Honduras) en 1920, principalmente como plantas ornamentales y cercos vivos. También se han extendido a Colombia, Venezuela y Paraguay, donde las condiciones son propicias para su desarrollo. En Uruguay existen pequeños emprendimientos particulares que se dedican al cultivo de *Moringa stenopetala* a partir de semillas importadas (FAO, 2018; Olson, 2017; Alegbeleye, 2017).

Se trata de una especie multipropósito utilizada para alimentación humana y animal, que posee diversos usos a nivel agrícola, industrial y medicinal. Es muy apreciada como alimento por ser fuente de minerales, carbohidratos, aminoácidos esenciales y vitaminas. Se consumen tanto las hojas como sus respectivas infusiones (Fekadu, et al., 2017; Melesse, et al., 2012; Gebregiorgis, et al., 2012).

Además de su rápido crecimiento, resistencia a la sequía y a diferentes plagas, ofrece muchas ventajas de subsistencia a los agricultores. Una planta de *Moringa stenopetala* puede mantener a una gran familia durante varios años. Las hojas verdes están disponibles durante la mayor parte del año, incluso durante la estación seca. Se pueden consumir en ensaladas, lo cual es importante en regiones donde las verduras escasean. Asimismo, la corteza es utilizada como condimento en las comidas (Gebregiorgis, et al., 2012).

Las semillas también son utilizadas como alimento y condimento en muchos países asiáticos y africanos, así como en bebidas preparadas en medicina popular. Estas contienen 40% en peso de aceite de alta calidad y con valor culinario, y también es utilizado como ingrediente principal para la fabricación de jabones (Abuye, et al., 2003).

Las raíces de la planta se usan a menudo para tratar la malaria y otros problemas de salud. Diversos informes también han demostrado actividades medicinales de las hojas, por ejemplo: anti-Leishmaniasis, anti-Tripanosomiasis y anti-diabetes (Fekadu, et al., 2017; Toma, et al., 2014; Toma, et al., 2015). En particular, las personas con hipertensión arterial suelen beber infusiones acuosas de las hojas para obtener alivio de los síntomas. Otros estudios han reportado la potencial actividad diurética de las infusiones de las hojas, así como el alivio de ciertos trastornos estomacales y de los síntomas del asma (Seifu, 2014; Gebregiorgis, et al., 2012; Saucedo-Pompa, et al., 2018).

En algunos países africanos suelen utilizarse las hojas como forraje para mejorar la productividad de pequeños rumiantes, sobre todo cuando la calidad y la cantidad de forraje son limitadas. Sin embargo, esto no es muy bien visto por la población, ya que las hojas son muy apreciadas como alimento y suplemento dietético. Por este motivo se prefiere destinar las vainas y no las hojas para la alimentación animal (Debela, et al., 2013). Los beneficios nutricionales de *Moringa stenopetala* están poco difundidos al momento en Uruguay. Este hecho inspiró el estudio de esta matriz de forma de proporcionar información sobre la composición química de este alimento de origen vegetal no convencional. En este sentido, el objetivo principal del trabajo fue la determinación del valor nutricional de *Moringa stenopetala* en lo que respecta al contenido de micro y macronutrientes esenciales como calcio (Ca), magnesio (Mg), cobre (Cu), hierro (Fe), potasio (K), zinc (Zn) y vitamina C. A su vez, se realizó una comparación contra los respectivos valores encontrados en la literatura en los alimentos usualmente recomendados como fuente de estos nutrientes (USDA, s.d.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Para las determinaciones de metales se utilizaron soluciones estándar para absorción atómica de 1000 mg L⁻¹ de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na y Zn (Merck, Alemania). Las curvas de calibración fueron preparadas mediante dilución apropiada de la correspondiente solución stock, utilizando agua ultrapura de resistividad 18,2 MΩcm (ASTM Tipo I), obtenida mediante un purificador Millipore Simplicity 185 (São Paulo, Brazil). Todo el material de vidrio se descontaminó con ácido nítrico 10% v/v, preparado a partir de HNO₃ concentrado (67% v/v, Merck, Alemania) y luego se enjuagó exhaustivamente con agua ultrapura previo a su uso.

Las determinaciones de vitamina C se realizaron bajo la forma de ácido ascórbico. Para ello se utilizó una solución estándar de 1000 mg L⁻¹ preparada a partir de ácido L-ascórbico (99%, Sigma-Aldrich, EUA) en agua ultrapura. Para las extracciones se utilizó ácido fosfórico 0,5 %v/v preparado a partir de H₃PO₄ concentrado (85% v/v, Merck, Alemania).

Muestras

Un total de 15 muestras de *Moringa stenopetala* fueron adquiridas en mercados locales de Montevideo, Uruguay. A los efectos de su acondicionamiento, todas las muestras tomadas en su estado original fueron secadas en estufa (Daihan Scientific ON-50, EUA) a 105 °C, trituradas y guardadas a 20 °C en ausencia de luz.

Para la optimización y la evaluación de la veracidad y precisión de las metodologías analíticas se utilizaron dos materiales de referencia certificados: hojas de manzana (SRM NIST 1515) y coles de Bruselas (CRM BCR 431).

Preparación de las muestras para la determinación de metales y vitaminas

Para las determinaciones de metales se llevaron a cabo digestiones ácidas asistidas por microondas (CEM Mars 6, EUA). Para ello se pesaron 0,5 g de muestra en vasos de reacción EasyPrep Plus® y se agregaron 10,00 mL de HNO₃ 50% v/v. La programación de temperatura fue la siguiente: potencia 400-1800 W, rampa de temperatura: 15 min hasta alcanzar 200 °C, 10 min a 200 °C, presión 500 psi. Se realizaron blancos de reactivos junto con las muestras. El método consistió en una digestión total, que a su vez es considerada como método de referencia.

Para las determinaciones de vitamina C (expresada como ácido ascórbico) se realizaron extracciones sólido-líquido utilizando como solvente extractante H₃PO₄. Para ello se pesaron 0,2 g de muestra y se agregaron 2,0 mL de H₃PO₄ 0,5% v/v a pH=2,81. Las suspensiones obtenidas fueron agitadas en vórtex (Qilinbeier 5, China) durante 1 minuto y luego centrifugadas (Luguimac LC-15, Argentina) a 3700 rpm durante 15 minutos.

Preparación de las infusiones para la determinación de metales y vitaminas

A los efectos de evaluar la disponibilidad de nutrientes y teniendo en cuenta las formas de consumo, se prepararon las infusiones correspondientes colocando 2,0 g de muestra en un recipiente tipo Pyrex® junto con 250,0 mL de agua ultrapura a 100 °C y dejando reposar durante 5 minutos. Inmediatamente se filtraron utilizando papel de filtro tipo Whatman No. 541. Luego se realizaron las determinaciones analíticas mediante absorción atómica y cromatografía líquida, y se calculó el factor de transferencia de los diferentes nutrientes desde la matriz sólida como: Factor de transferencia (%) = (concentración en infusión por unidad de masa/concentración en base seca) x 100.

Determinaciones analíticas

Para las determinaciones analíticas de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na y Zn se utilizó un espectrómetro de absorción atómica de llama Perkin Elmer AAnalyst 200 (Norwalk,

CT, EUA) equipado con un quemador de 10 cm y operado a las líneas analíticas de 422,67 nm (Ca), 324,75 nm (Cu), 248,33 nm (Fe), 766,49 nm (K), 285,21 nm (Mg), 589,00 nm (Na) y 213,86 nm (Zn), respectivamente. Las lámparas de cátodo hueco utilizadas (Photron, Australia) fueron operadas según las recomendaciones del fabricante. Se utilizó gas acetileno (Linde, Montevideo, Uruguay) como combustible. La composición de la llama fue acetileno (2,5 L min⁻¹) - aire (10,0 L min⁻¹).

Para la determinación de vitamina C (expresada como ácido ascórbico) se empleó cromatografía líquida con detector de arreglo de diodos (Agilent 1260 Infinity), utilizando como fase móvil una mezcla de ácido fosfórico 0,5% v/v: acetonitrilo (95:5) a un flujo de 0,7 mL min⁻¹ en modo isocrático. Como fase estacionaria se utilizó una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) (Agilent, EUA). La longitud de onda de trabajo fue 254 nm.

DISCUSIÓN

Los experimentos de optimización para la determinación de metales fueron realizados utilizando el SRM de hojas de manzana. La cantidad de muestra a pesar y el volumen de ácido a agregar para la extracción fueron determinados considerando los rangos de concentración de los diferentes elementos informados en el certificado del SRM. Con este criterio, todos los analitos se encontraron en un nivel adecuado para realizar tratamientos de muestra simultáneos. Una masa de 0,5 g y un volumen de ácido de 10,0 mL resultaron el mejor compromiso obtenido para llevar a cabo el método propuesto para la determinación de todos los elementos en estudio, en las muestras analizadas y en una única extracción. Los elementos Ca, K, Mg, Na y Zn requirieron una dilución posterior con agua ultrapura. Los experimentos de optimización para la determinación de vitamina C (expresada como ácido ascórbico) fueron realizados utilizando el CRM de coles de Bruselas, que declaraba los valores certificados para este analito.

La validación fue llevada a cabo en las condiciones experimentales descriptas para cada tratamiento en la sección Materiales y Métodos. La veracidad y la precisión fueron evaluadas mediante la aplicación de los métodos seleccionados utilizando el material de referencia correspondiente (n = 6). Los métodos optimizados y validados fueron luego aplicados al análisis de muestras comerciales de *Moringa stenopetala*.

Después de realizar una prueba t de Student, todos los valores experimentales de t se encontraron por debajo del valor teórico de $t(0,05, 5) = 2,57$. Por lo tanto, pudo concluirse que a un nivel de significancia del 95% las concentraciones obtenidas utilizando los métodos desarrollados no diferían significativamente de los respectivos valores certificados, con lo cual la veracidad de ambos métodos fue asegurada.

La linealidad fue determinada mediante inspección visual de las curvas de calibración, valor del coeficiente de correlación (r^2) y el estudio de aleatoriedad de los residuales. Los coeficientes de correlación de las regresiones lineales obtenidos luego de realizar las curvas de calibración fueron mayores a 0,99 para todos los analitos en estudio. Los rangos lineales se pueden apreciar en la Tabla 1. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) fueron expresados como el contenido

del analito correspondiente a tres y diez veces la desviación estándar del blanco, respectivamente (Tabla 1). La precisión expresada como DER (%) (desviación estándar relativa porcentual) fue estudiada utilizando los materiales de referencia certificados y las muestras de *Moringa stenopetala*. Se obtuvieron valores menores al 10% para todos los analitos en estudio.

TABLA 1. Principales parámetros de desempeño estudiados. (a) SRM NIST 1515, (b) CRM BCR 431.

Nutriente	Rango lineal (mg L ⁻¹)	LD (mg kg ⁻¹) (3σ; n = 10)	LC (mg kg ⁻¹) (10σ; n = 10)	DER (%) (n = 6)	Recuperaciones (n = 6)
Ca	3,0	0,87	2,90		
Cu	4,0	0,16	0,54		
Fe	3,0	0,10	0,34		
K	1,0	0,59	1,97	≤ 10 (a)	92 – 105 (a)
Mg	0,5	0,08	0,27		
Na	1,0	0,56	1,87		
Zn	1,0	0,08	0,26		
Vit. C	40,0	0,40	1,30	≤ 10 (b)	95 – 103 (b)

En la Tabla 2 se aprecian los rangos de concentración obtenidos para Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Zn y Vit. C en las muestras comerciales de hojas de *Moringa stenopetala* analizadas utilizando las metodologías validadas.

TABLA 2. Rangos de concentración obtenidos para cada analito en las muestras analizadas (expresados en base seca).

Nutriente	Material vegetal (mg kg ⁻¹)	Infusión (mg kg ⁻¹)	Transferencia (%)
Ca	17340,0 – 20981,8	767,5 – 1106,6	4,2 – 5,4
Cu	5,8 – 7,7	3,2 – 3,7	41,2 – 62,3
Fe	39,3 – 79,9	2,4 – 4,5	5,6 – 6,9
K	5587,6 – 7006,1	1556,8 – 1753,3	22,9 – 27,9
Mg	2393,6 – 4128,2	167,8 – 312,1	5,2 – 9,4
Na	38,4 – 64,6	37,2 – 46,6	65,0 – 96,8
Zn	18,0 – 24,5	9,7 – 12,2	49,8 – 54,7
Vit. C	330,2 – 447,0	1,6 – 4,5	0,5 – 1,0

Las diferencias encontradas en la literatura respecto al contenido de elementos metálicos en este tipo de cultivos puede deberse a varios factores: el origen geográfico, el medio de cultivo, los nutrientes, el uso de fertilizantes, el tiempo de siembra, el tipo de suelo y el momento de colecta. Las tasas de absorción, translocación y retención de metales varían fuertemente entre las distintas poblaciones, dependiendo de la tolerancia y la fisiología. La mayoría de las plantas restringen el movimiento de los iones metálicos en los tejidos fotosintéticos, regulando el transporte a través de la endodermis y removiendo cualquier ion móvil por medio del almacenamiento en las paredes celulares y en las vacuolas o mediante la unión a metalotioneínas o fitoquelatinas (Colangelo, et al., 2006).

De acuerdo con el contenido de metales hallado, los valores de concentración obtenidos para todos los analitos están en muy buen acuerdo con los reportados en la literatura (Hamza, et al., 2017; Kumssa, et al., 2017).

Luego de analizar varias marcas comerciales se pudo observar una mayor variabilidad en el contenido elemental de Fe, Mg y Na entre las diferentes muestras. Los valores de concentración más altos encontrados fueron para Ca, un orden mayor respecto a K y Mg, tres órdenes respecto a Fe, Na y Zn, y cuatro órdenes respecto a Cu. *Moringa stenopetala* podría considerarse como una fuente promisoría para cubrir los niveles de elementos esenciales de la ingesta diaria recomendada, y en particular sería una buena fuente de elementos como Ca y Mg. A modo de ejemplo, los requerimientos diarios de Ca de un niño de entre 1 y 3 años estarían cubiertos con 100 g de hojas frescas. En este sentido, las hojas de *Moringa stenopetala* podrían destacarse como suplemento alimenticio para mitigar las deficiencias de nutrientes esenciales.

Sin embargo, a pesar del alto contenido de Ca se observó un bajo factor de transferencia a las infusiones, y algo similar ocurrió con el Mg, posiblemente por la forma en que estos elementos se unen a la matriz. Esto pone de manifiesto el consumo de la hoja fresca en lugar de las infusiones para obtener mayores beneficios. De forma similar, en el caso de la vitamina C se evidenció una gran pérdida durante la preparación de las infusiones debido a que ésta se descompone a altas temperaturas.

Las hojas de *Moringa stenopetala* serían un interesante suplemento natural para la salud, sobre todo consumidas en base fresca, por ser ricas en Ca, K, Mg y Vit. C, en cantidades similares a las encontradas en los alimentos usualmente recomendados como fuente de estos nutrientes. Contienen niveles de Ca similares a los encontrados en leche de vaca, niveles de Vit. C similares a los reportados en naranjas y niveles de K similares a los hallados en bananas (Hamza, et al., 2017).

CONCLUSIONES

En este trabajo fueron optimizados y validados dos métodos simples de preparación de muestras para la extracción y subsecuente determinación de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Na, Zn y Vit. C en hojas de *Moringa stenopetala*.

Los niveles encontrados en las muestras analizadas ponen de manifiesto la importancia desde el punto de vista nutricional de esta especie vegetal como fuente

de aporte de Ca, K, Mg y Vit. C a la dieta, en cantidades similares a las encontradas en alimentos ricos en estos nutrientes, principalmente cuando es consumida en base fresca.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y al Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA-Química).

REFERENCIAS

- Abuye, C., Urga, K., Knapp, H., Selmar, D., Omwega, A.M., Imungi, J.K. y Winterhalter, P., 2003. A compositional study of *Moringa stenopetala* leaves. En: *East African Medical Journal*, 80(5), pp.51-56.
- Alegbeleye, O.O., 2017. How functional is Moringa Oleifera? A review of its nutritive, medicinal, and socioeconomic potential. En: *Food and Nutrition Bulletin*, 39(1), pp.149-170.
- Colangelo, E.P. y Guerinot, M.L., 2006. Put the metal to the petal: metal uptake and transport throughout plants. En: *Current Opinion in Plant Biology*, 9, pp.322-330.
- Debela, E. y Tolera, A., 2013. Nutritive value of botanical fractions of *Moringa oleifera* and *Moringa stenopetala* grown in the mid-Rift Valley of southern Ethiopia. En: *Agroforestry Systems*, 87(5), pp.1147-1155.
- FAO, Organización Mundial de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2018. *Cultivos tradicionales. Moringa* [En línea] [s.l.]: FAO. [Consulta: 2 de octubre de 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/traditional-crops/moringa/es/>
- Fekadu, N., Basha, H., Meresa, A., Degu, S., Girma, B. y Geleta, B., 2017. Diuretic activity of the aqueous crude extract and hot tea infusion of *Moringa stenopetala* (Baker f.) Cufod. leaves in rats. En: *Journal of Experimental Pharmacology*, 9, pp.73-80.
- Gebregiorgis, F., Negesse, T. y Nurfeta, A., 2012. Feed intake and utilization in sheep fed graded levels of dried moringa (*Moringa stenopetala*) leaf as a supplement to Rhodes grass hay. En: *Tropical Animal Health and Production*, 44, pp.511-517.
- Hamza, T.A. y Azmach, N.N., 2017. The miraculous moringa trees: From nutritional and medicinal point of views in tropical regions. En: *Journal of Medicinal Plants Studies*, 5(4), pp.151-162.
- Kumssa, D.B., Joy, E.J.M., Young, S.D., Odee, D.W., Ander, E.L. y Broadley, M.R., 2017. Variation in the mineral element concentration of *Moringa oleifera* Lam. And *M. stenopetala* (Bak. f.) Cuf.: Role in human nutrition. En: *PLOS ONE*, 12(4), pp.1-26.
- Melesse, A., Steingass, H., Boguhn, J., Schollenberger, M. y Rodehutsord, M., 2012. Effects of elevation and season on nutrient composition of leaves and green pods of *Moringa stenopetala* and *Moringa oleifera*. En: *Agroforest Systems*, 86, pp.505-518.
- Olson, M.E., 2017. Moringa frequently asked questions. En: *Acta Horticulturae - I*

- International Symposium on Moringa*, 1158, pp.19-32.
- Saucedo-Pompa, S., Torres-Castillo, J.A., Castro-López, C., Rojas, R., Sánchez-Alejo, E.J., Ngangyo-Heya, M. y Martínez-Ávila, G.C.G., 2018. Moringa plants: Bioactive compounds and promising applications in food products. En: *Food Research International*, 111, pp.438–450.
- Seifu, E., 2014. Actual and potential applications of *Moringa stenopetala*, underutilized indigenous vegetable of Southern Ethiopia: a review. En: *International Journal of Agricultural and Food Research*, 3(4), pp.8–19.
- Toma, A., Makonnen, E., Mekonnen, Y., Debella, A. y Adisakwattana, S., 2015. Antidiabetic activities of aqueous ethanol and n-butanol fraction of *Moringa stenopetala* leaves in streptozotocin-induced diabetic rats. En: *BMC Complement and Alternative Medicine*, 15, pp.242.
- Toma, A., Makonnen, E., Mekonnen, Y., Debella, A. y Addisakwattana, S., 2014. Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcoholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. En: *BMC Complement and Alternative Medicine*, 14, pp.180.
- USDA, United States Department of Agriculture, [s.d.]. *Choose my plate* [En línea]. Washington: USDA. [Consulta: 2 de octubre de 2018].
Disponible en: <https://www.choosemyplate.gov/fruits-nutrients-health>.

Implementación de un método para el análisis de glifosato en miel por LC-MS/MS, utilizando QuPPE para la preparación de muestra

Implementation of a methodology for the analysis of glyphosate in honey by LC-MS/MS, using QuPPE for sample preparation

RECIBIDO: 14/10/2018 → APROBADO: 14/11/2018 ✉ heinzen@fq.edu.uy

✉ JESÚS, FLORENCIA (1); PEQUEÑO, FIAMMA (2); GÉREZ-GARCÍA, NATALIA (3), NIELL, SILVINA (1); CESIO, MARÍA VERÓNICA (1, 2, 3); HEINZEN, HORACIO (2, 3)

(1) PDU «ABORDAJE HOLÍSTICO AL IMPACTO DE AGROQUÍMICOS SOBRE ALIMENTOS Y AMBIENTE», GACT, CENUR LITORAL NORTE, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, PAYSANDÚ, URUGUAY.

(2) DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DEL LITORAL, GACT, CENUR LITORAL NORTE, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, PAYSANDÚ, URUGUAY.

(3) CÁTEDRA DE FARMACOGNOSIA Y PRODUCTOS NATURALES, DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÁNICA, GACT, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

El uso de la miel como alimento natural establece altas exigencias en cuanto a su calidad. Dado que la producción de miel se realiza de la mano con las actividades agrícolas, se han detectado residuos de pesticidas en mieles en varios países, y Uruguay es uno de ellos, a veces excediendo los límites máximos de residuos (LMR). Este trabajo presenta el ajuste para la determinación de glifosato en miel. Se empleó una metodología moderna de extracción con metanol, denominada *QuPPE*, desarrollada específicamente para el análisis de pesticidas polares empleando cromatografía líquida de intercambio iónico acoplada a un detector de masas en tándem (LC-MS/MS). Por las particularidades de la molécula de glifosato, no puede ser incluido en un método multiresiduo. El método evaluado y validado fue desarrollado por el Laboratorio de Referencia Europeo para el análisis monoresiduo de pesticidas (EURL-SRM). Para su validación, se siguieron las directrices del documento SANTE y se obtuvieron resultados aceptables incluso al LMR establecido por la Unión Europea (0,050 mg kg⁻¹). Se analizaron muestras reales uruguayas y en algunos casos se encontraron residuos

de glifosato. La metodología es útil para el control de calidad e inocuidad de la miel en lo que a residuos de glifosato respecta.

PALABRAS CLAVE: Pesticidas polares, extracción con metanol, cromatografía líquida de intercambio iónico; espectrometría de masas en tándem.

ABSTRACT

Honey as a natural food has a high quality standard. Nevertheless, honey production is performed together with agricultural activities. Pesticide residues have been detected in honey samples from various countries including Uruguay, sometimes exceeding their maximum residue limits (MRL). The implementation of a modern methodology for the analysis of glyphosate in honey is presented. The sample preparation method named QuPPE involves extraction with methanol and was specifically developed for the analysis of polar pesticides, by ionic liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (LC-MS/MS). Due to the particularities of the glyphosate molecule it can not be included in a multiresidue method. The evaluated and validated methodology was developed by the European Union Reference Laboratory for Single Residue Methods (EURL-SRM). In order to perform its validation, SANTE guidelines were followed, obtaining good results even at the European MRL in honey (0.050 mg kg^{-1}). Real Uruguayan samples were analyzed finding glyphosate residues in some cases. The methodology is useful for quality control and safety assurance of honey regarding glyphosate residues.

KEYWORDS: Polar pesticides, extraction with Methanol, ion exchange liquid chromatography, tandem mass spectrometry

INTRODUCCIÓN

La miel es el producto de la colmena más consumido por el ser humano, por lo que debe tener asegurada su inocuidad alimentaria. Los pesticidas, posibles contaminantes de la miel, pueden ingresar a la colmena a través de varias rutas; por ejemplo: el mal uso de los agroquímicos empleados para la sanitización de la colmena, la contaminación ambiental, o el no cumplimiento de las buenas prácticas agrícolas (BPA). El uso de la miel como alimento natural establece altas exigencias en cuanto a su calidad, pero la producción de miel se realiza de la mano con las actividades agrícolas. La contaminación de las abejas y de los productos de la colmena (miel, cera y polen) tiene implicancias tanto económicas como sanitarias. Dado que el sistema nervioso de la abeja es afectado por dosis subletales de agroquímicos, alterando los parámetros biológicos de funcionamiento general de la colmena se ve disminuida su productividad y amenazada su sobrevivencia (Decourtye y Pham-Delègue, 2002; Decourtye, et al., 2005; Decourtye, et al., 2011; El Hassani, et al., 2008; Smodiš Škerl, et al., 2010). Para poder asegurar que la miel es un alimento inocuo, es importante el análisis de la miel con el objetivo de control de los residuos de pesticidas en este alimento, tanto para consumo interno como para exportación.

En Uruguay, la producción nacional se comercializa en un 82% en el exterior y el 18% restante se destina al mercado interno y cubre casi la totalidad de la demanda (DIGEGRA, 2018).

Recientemente, han existido problemas de comercialización de mieles uruguayas en países de la Unión Europea, Alemania por ejemplo, a raíz de la presencia de glifosato en concentraciones superiores a las permitidas, lo que provocó el rechazo de partidas de exportación y afectó negativamente a la apicultura uruguaya. El límite máximo de residuos (LMR) de glifosato en miel está definido en la Unión Europea como $0,050 \text{ mg kg}^{-1}$ (Unión Europea, 2013), aunque el valor puede variar de acuerdo a reglamentaciones internas de cada país dentro de Europa, que deben tenerse en cuenta en caso de exportación.

El glifosato (N-fosfometilglicina) es uno de los herbicidas más ampliamente utilizados en todo el mundo para el control de malezas tanto en agricultura como en áreas urbanas. Es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, sistémico y de post-emergencia. Su mecanismo de acción consiste en interferir en la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano, mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS). Los aminoácidos aromáticos son necesarios para el metabolismo primario y secundario de las plantas, y una deficiencia en ellos impide su crecimiento y les provoca la muerte. La enzima EPSPS no está presente en mamíferos, quienes obtienen sus aminoácidos esenciales a partir de la dieta.

La molécula de glifosato es relativamente simple: consiste en la unión del aminoácido glicina con un grupo fosfometil (Figura 1). Es una molécula pequeña, muy polar, que no posee grupos cromóforos; es poco volátil, con gran solubilidad en agua y baja en solventes orgánicos.

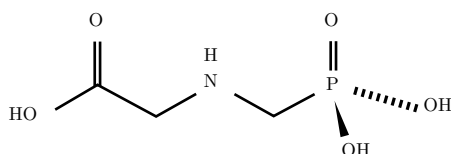


Figura 1. Estructura de la molécula de glifosato (PM = 169).

Debido a las particularidades de este compuesto, no es posible analizarlo mediante una metodología multiresiduo, es decir, simultáneamente con otros pesticidas. Las metodologías más utilizadas para su análisis consisten en la derivatización de la molécula de glifosato, por ejemplo, con el reactivo 9-fluorenilmetilclorofornato (FMOC-Cl), con el fin de aumentar su masa y hacerla más apolar para su posterior determinación por cromatografía gaseosa o líquida utilizando columnas cromatográficas y/o detectores convencionales (Gill, et al., 2017). Sin embargo, el uso de reacciones de derivatización en la preparación de la muestra implica mayores tiempos de preparación de muestra y de análisis. Además, en el caso del FMOC-Cl

pueden producirse subproductos que potencialmente dañen el instrumental. Por lo tanto, la posibilidad de contar con un método de preparación de muestra más sencillo cobra importancia cuando se desea implementar el análisis rutinario de este tipo de compuestos, por ejemplo. Ha sido desarrollada por los laboratorios de referencia de la Unión Europea (EURL-SRM) una metodología para el análisis de varios pesticidas muy polares (método QuPPE, del inglés *Quick method for the analysis of numerous highly Polar Pesticides*) en alimentos de origen vegetal mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) (Anastassiades, et al., 2017). Este método utiliza una preparación de muestra sencilla con equipamientos específicos y columnas especiales de intercambio iónico. Las desventajas que presenta son el tiempo empleado para estabilizar las condiciones de trabajo de la columna previo a su uso y la necesidad de aumentar la frecuencia de limpieza y mantenimiento del espectrómetro de masas debido al tipo de fase móvil utilizado.

En este trabajo se muestra el ajuste y posterior validación del método QuPPE bajo las condiciones del laboratorio del Grupo de Análisis de Compuestos Traza (GACT) de la Universidad de la República, para poder dar respuesta a los pedidos de los apicultores de una metodología aplicable de rutina.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y estándares

Se utilizaron metanol y acetonitrilo de calidad HPLC de Pharmco – Apper (Brookfield, CT, USA) y de Merck (Darmstadt, Germany), respectivamente. El agua (H₂O) fue desionizada en el laboratorio con un purificador de agua Thermo Scientific (Marietta, OH, USA) EASYpure RoDi. El ácido fórmico p.a. (98 – 100%) fue obtenido de Merck y una solución de ácido fórmico al 1% (v/v) fue preparada en metanol. El ácido cítrico monohidrato p.a. (pureza 99,7%) y la dimetilamina (DMA) anhidro (> 99%) utilizados fueron de BDH Chemicals Ltd. (Poole, England) y de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), respectivamente. El estándar analítico de glifosato, sólido cristalino de pureza 98%, fue suministrado por Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). La solución stock del estándar se preparó en matraz aforado a una concentración de 0,2 mg mL⁻¹ utilizando como disolvente una mezcla 1:1 de H₂O y ácido fórmico 1% (v/v) en metanol, considerando la pureza del estándar sólido, el cual se pesó en balanza analítica. Las soluciones de trabajo se prepararon diluyendo apropiadamente la solución stock con acetonitrilo 10% (v/v) en H₂O. Todas las soluciones se conservaron en la oscuridad a menos de 4 °C.

Instrumentos

Se trabajó con pipetas automáticas adecuadas para medir volúmenes de 10–100 µL, 20–200 µL, 100–1000 µL y 1–10 mL de Socorex (Lausanne, Switzerland), balanzas analíticas con capacidad de medir hasta 0,01 mg o 10 mg de Shimadzu (Kyoto,

Japan). Los tubos con tapa a rosca de polipropileno descartables para centrífuga de 50 mL (30 × 115 mm) fueron adquiridos de Kartell (Milan, Italy). El vortex utilizado para la homogenización de las muestras de miel fue un VM-10 de Daihan Scientific Co. (Seúl, Corea). La centrífuga, capaz de alcanzar al menos 3000 × g, fue una SL16 de Thermo Electron (Langensfeld, Germany). El pH-metro utilizado para ajustar el pH de la fase móvil B fue un pH Tutor Oakton® fabricado por Eutech Instruments (Singapore). Los viales de autosampler de 1,5 mL fueron suministrados por Thermo Scientific (Rockwood, TN, USA). Se utilizaron insertos de polipropileno de 0,25 mL de Waters Corporation (Milford, MA, USA). Filtros para jeringa de PVDF (13 mm, 0,45 µm) fueron adquiridos de Lubitech Technologies (Songjiang, Shanghai, China).

Condiciones experimentales de LC-MS/MS

Para el análisis por LC-MS/MS se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 (Agilent Technologies, Palo alto, CA, USA) acoplado a un sistema 4000 QTRAP LC-MS/MS de SCIEX (Framingham, Massachusetts, USA) en modo Scheduled MRM™. La separación cromatográfica se llevó a cabo dentro del horno a 40 °C utilizando una columna Dionex IonPac AS 11 (2 × 250 mm) equipada con una precolumna Dionex IonPac AG 11 (2 × 50 mm), ambas de Thermo Scientific. Se empleó un gradiente con una fase móvil compuesta por: A: agua; B: ácido cítrico 1 mM en agua ajustado a pH 11 con DMA, a un flujo constante de 300 µL min⁻¹. El volumen de inyección fue 20 µL. La detección en MS/MS se realizó en modo monitoreo de reacciones múltiples (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM) usando una interfase de ionización por *electrospray* (ESI) en modo de ionización negativa. El voltaje de ionización fue -4500 V, el gas de nebulización fue nitrógeno a 50 psi, y el *curtain* gas, nitrógeno a 20 psi. La evaporación por solvente en la fuente fue asistida por un gas para secado (nitrógeno a 50 psi calentado a 500 °C) y el gas de colisión también fue nitrógeno. Se realizaron experimentos utilizando una solución del analito a 0,1 mg L⁻¹ para determinar las transiciones MRM óptimas, potencial de *declustering* (DP) y energías de colisión (CE). Para esto se utilizó una bomba de jeringa a flujo constante para la inyección directa al equipo de MS/MS de la solución de estándar. Los parámetros del MS/MS utilizados en este estudio están listados en la Tabla 1.

Preparación de muestras

Se ajustó la metodología de análisis denominada QuPPE. En un tubo de centrífuga se pesaron (5,00 ± 0,01) g miel, se agregaron 9 mL de H₂O y se homogenizó utilizando un vortex. Luego, se adicionaron 10 mL de metanol acidificado con ácido fórmico al 1% y se agitó vigorosamente de forma manual y durante 1 minuto. El tubo se centrifugó 5 min a 4000 rpm. Finalmente, una alícuota de extracto se filtró a un vial de 2 mL con inserto de plástico para posteriormente inyectar en LC-MS/MS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización de transiciones

Para comenzar a trabajar fue necesario ajustar las condiciones de operación del instrumento utilizado para la determinación de glifosato, en este caso un espectrómetro de masas en tándem de tipo triple cuadrupolo, operando en el modo de adquisición monitoreo de reacciones múltiples (*Multiple Reaction Monitoring*, MRM).

El tipo de ionización utilizado fue *electrospray* (ESI) en modo negativo, es decir, que en este caso se da la remoción de un protón de la molécula de glifosato, la cual queda cargada negativamente: pasa de un peso molecular de 169 (Figura 1) a tener, luego de la ionización, una relación masa/carga (m/z) = 168, con $z = 1$.

Los parámetros instrumentales optimizados para las transiciones de glifosato se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1. Parámetros instrumentales optimizados en el espectrómetro de masas. DP: Declustering Potential; CE: Collision Energy; CXP: Cell Exit Potential.

	$m/z > m/z$	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
Primera transición	167,9 > 149,7	-45	-14	-9
Segunda transición	167,9 > 62,9	-45	-32	-3
Tercera transición	167,9 > 80,9	-45	-22	-1

Optimización de condiciones cromatográficas

El glifosato como tal es un compuesto compatible con cromatografía líquida. Para el análisis de los pesticidas muy polares se describen en el documento de EURL–SRM varias condiciones de LC–MS/MS. En particular para glifosato se enumeran tres condiciones posibles que han mostrado buenos resultados para el análisis de este herbicida: métodos 1.1, 1.2 y 1.3. En la Tabla 2 se indican sus principales características. Para adecuar la metodología conforme al instrumental y materiales con los que se contaba en el laboratorio fue necesario ajustar las condiciones cromatográficas. De acuerdo a esto, se trabajó con el método 1.1 “Glyphosate & Co. AS 11” para el cual se utilizó una columna de intercambio aniónico Dionex IonPac AS 11 (2 × 250 mm) conectada a una precolumna Dionex IonPac AG 11 (2 × 50 mm), ambas mantenidas en un horno a 40 °C. El volumen de inyección fue de 20 µL.

TABLA 2. Condiciones de LC-MS/MS utilizadas para el análisis de glifosato. Modificado de Anastassiades et al. (2017).

	M 1.1	M 1.2	M 1.3
Modo ESI	Negativo	Negativo	Negativo
Principio de separación	Intercambio aniónico	Intercambio aniónico	Carbón
Tipo de columna	AS 11	AS 11 – HC	Hypercarb

Las fases móviles empleadas fueron agua y una solución de ácido cítrico 1 mM en agua, ajustada a pH 11 con dimetilamina (DMA). En la Tabla 3 se muestra el gradiente utilizado, con un tiempo total de corrida de 23 minutos.

TABLA 3. Gradiente utilizado en la corrida cromatográfica. A = agua. B = ácido cítrico 1 mM en agua, ajustado a pH 11 con dimetilamina (DMA).

Tiempo (min)	Flujo (mL min ⁻¹)	A (%)	B (%)
0	0,3	100	0
8	0,3	50	50
15	0,3	50	50
15,1	0,3	100	0
23	0,3	100	0

Método de extracción

El método utilizado para la extracción de glifosato de la miel fue el descrito en el documento de EURL – SRM para el análisis de varios pesticidas muy polares (denominado método QuPPE) en alimentos, dentro de los cuales se encuentra la miel como producto procesado. Esta metodología consiste en una extracción de los residuos de la muestra con metanol acidificado, previo ajuste del contenido de agua en caso de ser necesario. La cantidad de agua esperada en el extracto es 10 g, incluyendo el contenido natural de agua de la muestra y lo que deba agregarse para alcanzar esa cantidad; para el caso de la miel, fue necesaria la adición de 9 mL de agua a los 5 g de muestra.

Validación de la metodología

Para realizar la validación del método, se siguió el documento SANTE/11813/2017 de la Unión Europea, en el cual se establece una guía sobre procedimientos analíticos de control de calidad y validación de métodos para el análisis de residuos de

pesticidas en alimentos y piensos (European Commission, Directorate General for Health and Food Safety, 2017).

Se llevaron a cabo ensayos de recuperación a tres niveles de concentración: 0,025 mg kg⁻¹, 0,050 mg kg⁻¹ y 0,075 mg kg⁻¹. Los ensayos se hicieron fortificando una muestra de miel blanco, es decir, que no contuviera glifosato, con una cantidad conocida del pesticida. Para cada nivel de concentración se hicieron cinco réplicas, a partir de las cuales se calculó el porcentaje de recuperación (Ecuación 1) para evaluar la veracidad del método y la desviación estándar relativa (RSD, por sus siglas en inglés) (Ecuación 2), con el fin de evaluar su precisión.

$$Rec(\%) = \frac{Concentración_{experimental}}{Concentración_{teórica}} \times 100 \quad [1]$$

$$RSD(\%) = \frac{\sigma}{Rec_{promedio}} \times 100 \quad [2]$$

El documento SANTE (European Commission, Directorate General for Health and Food Safety, 2017) establece como parámetros aceptables que el porcentaje de recuperación se encuentre entre 70% y 120%, con una RSD menor a 20%. Como límite de cuantificación del método se considera el nivel de concentración más bajo evaluado en el proceso de validación y que cumpla con los criterios descritos anteriormente. Como se puede observar en la Tabla 4, a los tres niveles ensayados se cumplen las condiciones. Por lo tanto, el límite de cuantificación del método fue establecido en 0,025 mg kg⁻¹. En la Figura 2 se ejemplifican los cromatogramas obtenidos al nivel del límite de cuantificación.

TABLA 4. Porcentajes de recuperación y desviaciones estándar relativas (RSD) obtenidos a los tres niveles de concentración ensayados.

	Recuperación (%)	RSD (%)
0,025 mg kg ⁻¹	72	5
0,050 mg kg ⁻¹	81	1
0,075 mg kg ⁻¹	74	5

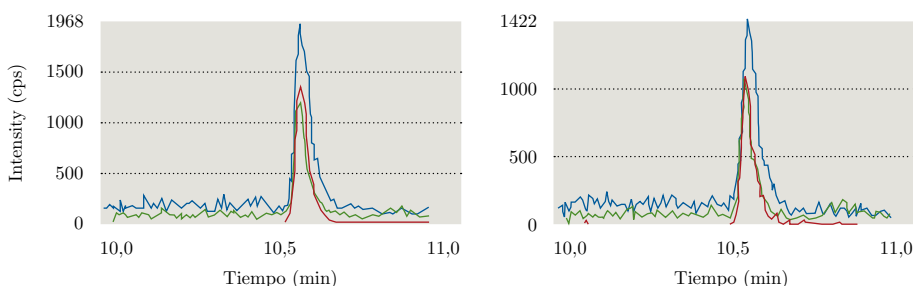


Figura 2. Cromatogramas de iones extraídos de glifosato en: a) punto de calibración en matriz a 0,025 mg kg⁻¹ y b) recuperación a 0,025 mg kg⁻¹.

Por otro lado, se evaluó la linealidad de la respuesta instrumental con respecto a la concentración del analito. El estudio de la linealidad se llevó a cabo a partir de la construcción de curvas de calibración tanto en solvente como en matriz (Figura 3). La linealidad fue evaluada de acuerdo al criterio de $\pm 20\%$ de desviación de la concentración calculada mediante la curva de calibración con respecto a la teórica evaluada en cada punto (Ecuación 3). Además, se realizó una inspección visual del gráfico y se calculó el coeficiente de determinación (R^2). Se observó un comportamiento lineal del glifosato tanto en solvente como en matriz entre 0,010 y 0,500 mg kg⁻¹, ya que se obtuvo un coeficiente de determinación apropiado y para todos los puntos se tuvo una desviación menor a $\pm 20\%$, tal como establece el documento SANTE (European Commission, Directorate General for Health and Food Safety, 2017).

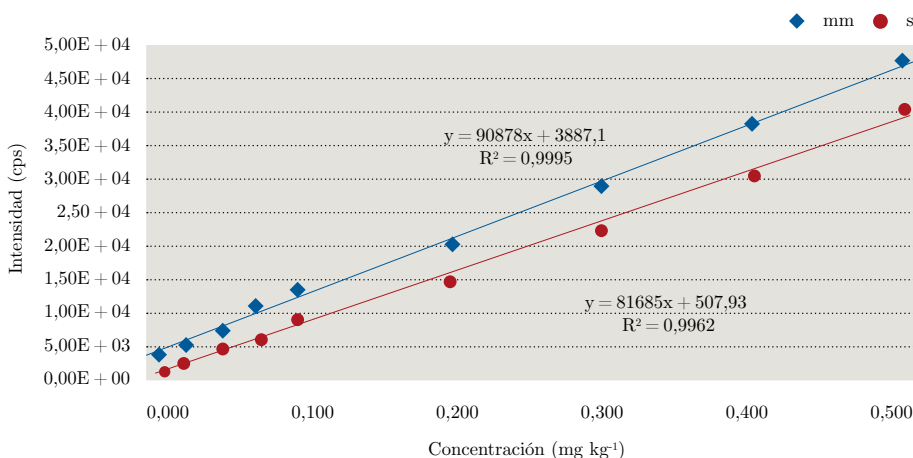


Figura 3. Curvas de calibración en matriz (mm) y en solvente (s) para glifosato.

$$\text{Desviación de la concentración calculada (\%)} = 100 \times \frac{C_{\text{calculada}} - C_{\text{teórica}}}{C_{\text{teórica}}} \quad [3]$$

La curva de calibración en matriz (en inglés *Matrix – matched calibration*) se construye agregando cantidades crecientes conocidas de pesticida a varias alícuotas de extracto blanco, y es útil para cuantificar correctamente cuando se trabaja con

matrices complejas en las cuales por lo general se observa efecto matriz, es decir, cuando existe una supresión o incremento de la señal instrumental por la presencia de otros componentes de la matriz que coeluyen con el analito. El efecto matriz para glifosato en el extracto de miel fue evaluado y calculado como el porcentaje de la diferencia entre la pendiente de la curva en matriz con respecto a la pendiente de la curva en solvente (Ecuación 4). Se observó un incremento en la señal, con un porcentaje de efecto matriz del 12%, lo cual no es lo más común, ya que por lo general, al trabajar con cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas con una fuente de ionización por *electrospray*, se observa supresión de la señal. Esto se produce porque los componentes de la matriz que coeluyen con los analitos de interés “compiten” por la carga, disminuyendo la eficiencia de la ionización de estos últimos. Es de destacar la importancia de cuantificar utilizando la curva de calibración preparada en matriz, ya que de prepararla en solvente se podría estar cuantificando de manera errónea un resultado positivo.

$$EM (\%) = \frac{\text{pendiente}_{mm} - \text{pendiente}_s}{\text{pendiente}_s} \times 100 \quad [4]$$

Análisis de muestras reales

Para evaluar el desempeño del método, se analizaron 15 muestras reales de mieles uruguayas, en 13 de las cuales se encontraron residuos de glifosato. De las 13 muestras que tuvieron un resultado positivo, el 70% contenía una concentración por encima del límite de cuantificación del método (0,025 mg kg⁻¹), en un rango que varió hasta 0,500 mg kg⁻¹.

CONCLUSIONES

El método ajustado es sencillo y podrá ser empleado para el control de calidad e inocuidad de la miel en lo que a residuos de glifosato respecta, ya que el LMR de glifosato para la miel según la Unión Europea está establecido como 0,050 mg kg⁻¹.

Además, esta herramienta analítica validada bajo las condiciones del laboratorio del Grupo de Análisis de Compuestos Traza (GACT) de la Universidad de la República es un insumo que contribuye a asegurar la inocuidad del alimento a ser consumido por la población y a la sustentabilidad de la cadena apícola uruguaya, que tiene participación en el PBI del país y que representó el 0,3% del total de las exportaciones de origen agropecuario en el año 2017 (DIEA, 2018).

La metodología ajustada y validada es una buena herramienta, porque además contribuirá a generar insumos para utilizar la colmena como un indicador de sustentabilidad de agroecosistemas.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a RALACA–IAEA por el suministro del estándar de glifosato, a INIA en el marco del proyecto FPTA–320 y al Quinto Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA).

REFERENCIAS

- Anastassiades, M., Kolberg, D. I., Benkenstein, A., Eichhorn, E., Zechmann, S., Mack, D., Wildgrube, C., Sigalov, I. Dörk, D. y Barth, A., 2017. *Quick method for the analysis of numerous highly polar pesticides in foods of plant origin via LC-MS/MS involving simultaneous extraction with methanol (QuPPE-Method)* [En línea]. Stuttgart: EURL-SRM. [Consulta: 10 de octubre de 2018]. Disponible en: http://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlSRM/meth_QuPPE-PO_EurlSRM.pdf
- Decourtye, A. y Pham-Delègue, M., 2002. *Estimating the environmental impact of chemicals*. Boca Ratón: CRC Press. pp.67-84.
- Decourtye, A., Devillers, J., Genecque, E., Menach, K.L., Budzinski, H., Cluzeau, S. y Pham-Delègue, M.H., 2005. Comparative sublethal toxicity of nine pesticides on olfactory learning performances of the honeybee *Apis mellifera* En: *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(2), pp.242-250.
- Decourtye, A., Devillers, J., Aupinel, P., Brun, F., Bagnis, C., Fourrier, J. y Gauthier, M., 2011. Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. En: *Ecotoxicology*, 20(2), pp.429-437.
- DIEA, 2018. Anuario estadístico agropecuario [En línea]. [s.l.]: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. [Consulta: 7 de noviembre de 2018]. Disponible en: https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2018/Anuario_2018.pdf
- Dirección General de la Granja, 2018. Boletín Consumo de Miel en Uruguay [En línea]. [s.l.]: Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. [Consulta: 7 de noviembre de 2018]. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/boletin_consumo_de_miel2018.pdf
- El Hassani, A., Dacher, M., Gary, V., Lambin, M., Gauthier, M. y Armengaud, C., 2008. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). En: *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 54(4), pp.653-661.
- European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017. *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017* [En línea]. [s.l.]: Unión Europea. [Consulta: 10 de octubre de 2018]. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2017-11813.pdf
- Gill, J.P.K., Sethi, N. y Mohan, A., 2017. Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agents. En: *Environmental Chemistry Letters*, 15(1), pp.85–100.

- Smodiš Škerl, M., Kmecl, V. y Gregorc, A., 2010. Exposure to pesticides at sublethal level and their distribution within a honey bee (*Apis mellifera*) colony En: *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 85(2), pp.125-128.
- Unión Europea, 2013. *Reglamento (UE) n ° 293/2013 de la Comisión, de 20 de marzo de 2013, que modifica los anexos II y III del Reglamento (CE) n ° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo por lo que respecta a los límites máximos de residuos de benzoato de emamectina, espinosad, espirotetramato, etofenprox, etoxazol, flutriafol, fosmet, glifosato y piraclostrobina, en determinados productos* [En línea]. [s.l.]: Unión Europea. [Consulta: 10 de octubre de 2018]. Disponible en: <https://publications.europa.eu/es/publication-detail/-/publication/dad2ca6b-9dcd-11e2-ab01-01aa75ed71a1>

Comparación de diferentes métodos de extracción para la determinación del perfil lipídico en semillas de quinoa

Comparison of different extraction methods for the lipid profile determination in quinoa seeds

RECIBIDO: 18/10/2018 → APROBADO: 13/12/2018 ✉ lpareja@fq.edu.uy

✉ TABORDA, BELÉN (1); TELLES, INÉS (1); PAREJA, LUCÍA (1); NIELL, SILVINA (2); JESÚS, FLORENCIA (2); LÓPEZ, ANDRÉS (1)

(1) DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DEL LITORAL, CENUR LITORAL NORTE, UDELAR, PAYSANDÚ, URUGUAY

(2) DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DEL LITORAL, PDU ABORDAJE HOLÍSTICO AL IMPACTO DE LOS AGROQUÍMICOS, CENUR LITORAL NORTE, UDELAR, PAYSANDÚ, URUGUAY

RESUMEN

En este trabajo se compararon tres diferentes métodos de extracción de lípidos en semillas de quinoa utilizando: maceración dinámica con hexano, maceración con hexano asistida por ultrasonido y extracción continua en Soxhlet con gradiente de polaridad (hexano, acetato de etilo, metanol). Para cada una de las metodologías evaluadas se determinó el rendimiento y posteriormente la derivatización para generar los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) correspondientes. Todas las fracciones obtenidas (extractos y FAMES) fueron evaluadas mediante cromatografía en capa fina. Se observó que los métodos de extracción que utilizan hexano y acetato de etilo como solvente presentaron manchas de similar concentración y factor de retención. Mientras que el extracto obtenido con metanol presentó manchas de similar factor de retención que las fracciones de hexano pero con menor intensidad, también mostró otras manchas muy polares que permanecieron en la línea de siembra. Las diferentes fracciones en hexano transesterificadas se analizaron mediante cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama, con detector de masas y mediante resonancia magnética nuclear. Por medio de GC-FID se identificaron los siguientes ácidos grasos: C 14:0; C16:0; C18:0; C18:1; C18:2; C18:3 y C20:1. El análisis mediante GC-MS permitió la confirmación mediante biblioteca de C16:0; C18:0; C18:1; C18:2.

PALABRAS CLAVE: quinoa, GC-MS, GC-FID, Soxhlet, maceración dinámica, maceración asistida mediante ultrasonido.

ABSTRACT

In this work, three different methods for the extraction of lipids were compared in quinoa seeds: dynamic maceration with hexane, maceration with hexane assisted by ultrasound and continuous extraction in Soxhlet using an increasing polarity gradient of solvents (hexane, ethyl acetate and methanol). Method performance was evaluated thorough lipid extraction yield and the extracts were subjected to derivatization to generate the corresponding fatty acids methyl esters (FAMEs). All the obtained fractions (the extracts and FAMEs) were analyzed by thin layer chromatography, showing that the extraction methods using hexane as solvent presented spots of similar intensity and retention factor, while the extracts obtained with ethyl acetate and methanol showed spots with different retention factor. The different fractions of FAMEs were analyzed by gas chromatography using flame ionization detector and mass spectrometry, and nuclear magnetic resonance. Using GC-FID the following fatty acids were identified; C14: 0, C16: 0, C18: 0, C18: 1, C18: 2; C18: 3 and C20: 1. The analysis by GC-MS allowed the confirmation of C16: 0; C18: 0; C18: 1; C18: 2.

KEYWORDS: quinoa, GC-MS, GC-FID, Soxhlet, dynamic maceration, ultrasonic assisted maceration.

INTRODUCCIÓN

La quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) es un pseudocereal nativo de la región Andina, de hoja ancha anual de semillas blancas, rojas y negras. El término pseudocereal se debe a que, si bien comparte la mayoría de las características de crecimiento de los cereales, es una planta dicotiledónea, a diferencia de los cereales, que son monocotiledóneas (Przybylski, et al., 1994). Las semillas son pequeñas, aplanadas y de forma ovalada, de 1,5 mm de diámetro; 350 semillas pesan aproximadamente un gramo. Es un cultivo de bajos requerimientos, entre ellos, poca lluvia, elevada altitud, bajas temperaturas y suelos alcalinos arenosos (Marmouzi, et al., 2015).

Existe una alta demanda mundial dado su alto valor nutricional, particularmente por el contenido de proteínas y de aminoácidos, además de lípidos beneficiosos (Prego, et al., 1998) La calidad de las proteínas de quinoa está reportada como equivalente a las de la leche. Un inconveniente a destacar es la presencia de saponinas en el pericarpio, por lo cual se le atribuye su sabor amargo y la formación de espuma en agua. Por esta razón antes de su consumo se recomienda realizar uno o varios enjuagues hasta la desaparición de espuma.

Los principales ácidos grasos reportados por bibliografía son: ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido docosanoico, ácido miristoleico, ácido palmítoleico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico. La presencia de ácido linoleico y ácido linolénico hacen a los aceites susceptibles a la rancidez oxidativa, lo cual no ocurriría en el caso del aceite de semilla de quinoa, debido a su contenido de antioxidantes (Rubio, 2005).

El alto consumo de quinoa y de otros pseudocereales en Uruguay motiva el interés de determinar la composición de lípidos comparando diferentes metodologías para establecer cuál es la más adecuada para la extracción de los lípidos de quinoa y realizar su caracterización mediante cromatografía gaseosa acoplada a diferentes detectores y resonancia magnética nuclear.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron semillas de quinoa comerciales (La Abundancia, obtenidas de un supermercado local en la ciudad de Paysandú), que se molieron en un molino de corte (IKA-M20) hasta obtener una harina. La harina de quinoa se guardó en un ambiente seco hasta el momento del análisis (Fanalli, et al., 2015).

Extracción

Maceración dinámica

En un vaso de Bohemia de 250 mL se pesaron 50 g de harina de quinoa y se agregaron 100 mL de hexano, se agitó con agitador magnético por 30 min a temperatura ambiente. Se dejó decantar, se tomó la fase orgánica y se adicionaron nuevamente 100 mL de hexano sobre el marco vegetal, agitando por 30 min. Se filtró, se reunieron ambos extractos y se llevó a sequedad mediante destilación a presión reducida a 40 °C (Fanalli, et al., 2015).

Maceración asistida con ultrasonido

En un Erlenmeyer de 250 mL se pesaron 25 g de harina de quinoa, se agregaron 100 mL de hexano y se llevó al ultrasonido por 30 min a temperatura ambiente. Se filtró directamente a un Erlenmeyer con papel de filtro en embudo por gravedad y el extracto se llevó a sequedad mediante destilación a presión reducida a 40 °C (Pellegrini, 2018).

Extracción continua en Soxhlet

Se pesaron 50 g de harina de quinoa en un dedo de papel de filtro que se colocó en el Soxhlet, y se dejaron en reflujo con 360 mL de cada solvente durante 30 min. Se realizó un gradiente creciente de polaridad utilizando como solventes hexano, acetato de etilo y metanol, en ese orden, para la extracción de distintos compuestos del marco vegetal. Los extractos orgánicos se llevaron por separado a sequedad por destilación a presión reducida a 40 °C (Marmouzi, et al., 2015).

Transesterificación

Se realizó una derivatización a cada uno de los extractos obtenidos de los tres métodos de extracción evaluados (maceración dinámica, extracción asistida mediante ultrasonido y Soxhlet con los tres solventes seleccionados) para su posterior análisis.

El procedimiento realizado para la preparación de los ésteres metílicos consistió en tomar una alícuota de extracto correspondiente a 50 mg en un tubo de tapa a rosca, luego se agregaron 2 mL de solución metanólica de KOH 0,5 N y se agitó por 10 min. A continuación, se calentó a 60 °C por 10 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 2 mL de solución metanólica de HCl 1 N y se calentó en baño de agua por 5 min. Se dejó enfriar y se extrajo con 2 mL de hexano. Se transfirió la fase orgánica a un vial secando con Na₂SO₄ anhidro y se filtró con filtro de 0,45 µm, según método tomado y modificado de Darnoko et al. (2000).

Detección por cromatografía en capa fina

Se utilizaron placas de fase normal de sílica gel como fase estacionaria (TLC Sílica gel 60 F₂₅₄, 20 x 20 cm) y una mezcla hexano: acetato de etilo: ácido fórmico (90:10:2) como fase móvil (Huang, et al., 2015). El revelador utilizado para la evaluación de todos los extractos y sus transesterificaciones fue revelador universal de CuSO₄ (CAMAG, 2018).

Análisis por GC-FID

El análisis de los extractos de Soxhlet transesterificados fue realizado en un cromatógrafo de gases equipado con un inyector manual modelo GC2010 Plus (Shimadzu) y una columna TR-FAME (Thermo 120 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Las condiciones experimentales fueron: inyección Split, relación de Split 1:50; temperatura del inyector 280 °C; temperatura del detector 250 °C; volumen de inyección 1 µL; gas carrier Nitrógeno. El programa de temperatura se muestra en la Tabla 1, con un tiempo total de corrida de 99 min.

TABLA 1. Programa de temperatura utilizado para análisis GC-FID.

Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (min)
-	150	0
1	160	0
0,20	167	0
1,5	225	16

Análisis por GC-MS

El análisis se realizó en un equipo GC Shimadzu 2010 equipado con inyector automático Shimadzu AOC-20i y una columna TR-5MS (Thermo 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Las condiciones experimentales fueron: temperatura del inyector 280 °C; temperatura de la fuente de iones 230 °C; volumen de inyección 1 µL; inyector split, relación de Split 1:10; gas carrier Helio; 1.0 mL/min. El programa de temperatura se muestra en la Tabla 2, con un tiempo total de corrida de 50,15 min. La ionización fue por impacto electrónico 70 eV y el rango de masas 50-550 *m/z*.

TABLA 2. Programa de temperatura utilizado para análisis GC-MS.

Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (min)
-	130	1
10	165	9
8	175	3
8	250	7
8	295	4
10	305	5

Análisis por RMN

El espectro de RMN de protón se adquirió a 25 °C en un espectrómetro Bruker Avance III 500 MHz equipado con una sonda inversa de triple resonancia (TXI 1H-13C/15N) de 5 mm. Se disolvieron 10 mg de cada fracción del Soxhlet en 600µL de CDCl₃, con 0,03 % de tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Se realizaron 64 scanners con tiempo de relajación de 10 mseg.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de fracción lipídica

El rendimiento de cada una de las metodologías se evaluó por duplicado y se calcularon a partir de la masa obtenida luego de la extracción y en función de la masa inicial utilizada en cada uno de los métodos seleccionados y fueron expresados en porcentaje. Los rendimientos fueron 1,6 y 2,1% para maceración dinámica con hexano y maceración asistida con ultrasonido. Los rendimientos obtenidos para las tres fracciones obtenidas mediante Soxhlet fueron: fracción hexano 1,9%, fracción acetato de etilo 2,0%, fracción metanol 2,1%. El mayor rendimiento obtenido con metanol puede deberse a que, además de extraer el remanente de lípidos luego de la extracción exhaustiva con hexano y acetato de etilo, este solvente por su polaridad extrae componentes polares que no son extraídos con los demás solventes.

Detección por TLC

Con el fin de comparar las diferentes metodologías de extracción, se sembraron las fracciones en una placa de sílica gel de 10 cm x 12 cm, utilizando como fase móvil una mezcla hexano-acetato de etilo-ácido fórmico (90:10:2). Las fracciones sembradas fueron: extracto de maceración dinámica con hexano; extracto de maceración asistida con ultrasonido en hexano; extractos de Soxhlet con hexano, acetato de etilo y metanol; estándar de sitosterol; estándar de ácido mirístico, y los extractos transesterificados de maceración dinámica hexano, Soxhlet con hexano y Soxhlet con acetato de etilo. En la TLC se pudieron observar las manchas características

de los ésteres metílicos de ácidos grasos demostrando que se llevó a cabo una correcta transesterificación. En el punto de siembra de la fracción metanólica del Soxhlet se puede confirmar la presencia de compuestos muy polares debido a su retención sobre la sílica. Las manchas del extracto de Soxhlet en acetato de etilo fueron similares a las de hexano, pero de menor intensidad. Se observó también que las distintas extracciones que utilizan como solvente hexano presentan las mismas manchas y con la misma relación de frente, aproximadamente de 0,8 cm.

Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos por GC-FID

Debido a que los tres extractos obtenidos mediante Soxhlet fueron los que presentaron distintos comportamientos en TLC se seleccionaron para realizar el análisis mediante GC-FID. En la Figura 1 se muestra el orden elución para el estándar (PUFA 3: ácidos grasos poli-insaturados) obtenidos con la columna analítica seleccionada (Figura 1) y el orden de elución de los componentes en muestra de la fracción de hexano (Figura 2). La identificación de los AG se realizó por medio de la comparación de los tiempos de retención obtenidos para cada una de las muestras con el análisis del estándar PUFA 3: AG poli-insaturados obtenido en las mismas condiciones de análisis (Tabla 3).

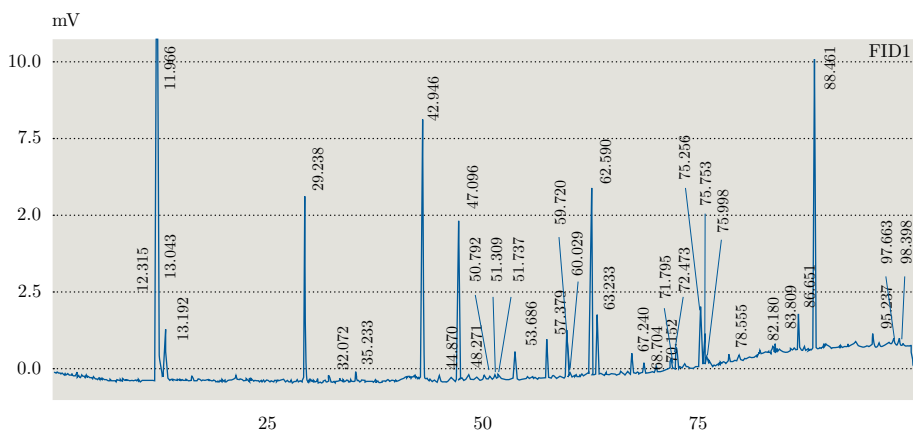


Figura 1. Cromatograma GC-FID del estándar PUFA.

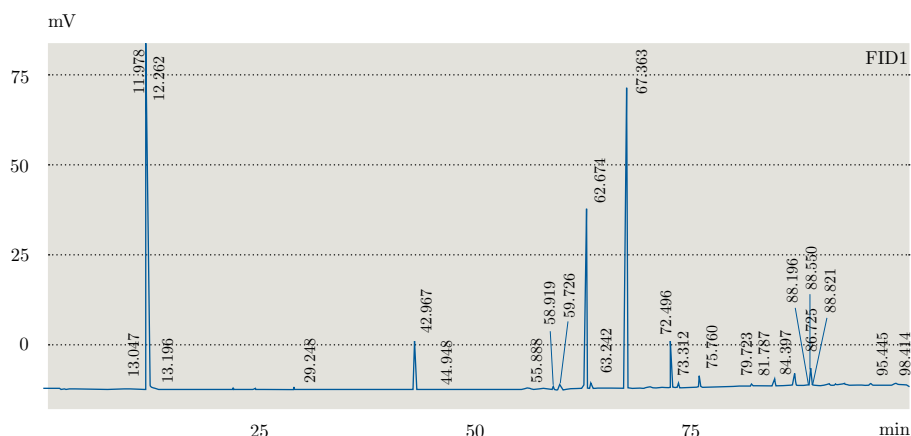


Figura 2. Cromatograma GC-FID de extracción en Soxhlet fracción hexano.

A partir de los análisis realizados mediante GC-FID se identificaron los siguientes ácidos grasos: C14:0; C16:0; C16:2; C18:0; C18:1n9; C18:1n7; C18:2; C18:3; C20:1. Para la fracción de acetato de etilo se identificaron C14:0; C16:0; C16:2; C18:0; C18:1n9; C18:1n7; C18:2; C18:3; C20:1. La fracción de metanol presentó C14:0; C16:2; C18:0; C18:1n9; C18:1n7; C18:2; C18:3; C20:1. No se observó el C16:0 en esta fracción. Como era de esperar, los extractos de hexano y acetato de etilo presentaron mayor cantidad de AG que la fracción de metanol, verificando los resultados obtenidos mediante TLC.

TABLA 3. Tiempos de retención en minutos para cada pico identificado.

Ac. Graso	Estándar PUFA	Fracción hexano	Fracción acetato de etilo	Fracción metanol
	tR (min)	tR (min)	tR (min)	tR (min)
C 14 : 0	13,043	13,047	13,03	13,059
C16 : 0	29,238	29,248	29,249	-
C16 : 2	42,946	42,967	42,968	42,998
C18 : 0	59,72	59,726	59,743	59,763
C18 : 1n9	62,59	62,674	62,645	62,645
C18 : 1n7	63,233	63,242	63,253	63,274
C18 : 2	67,24	67,363	67,317	67,308
C18 : 3	72,473	72,496	72,507	72,523
C20 : 1	75,753	75,76	75,778	75,792

Análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos por GC-MS

En los cromatogramas obtenidos para cada una de las fracciones se observaron los mismos picos correspondientes a los ácidos grasos: C16:0; C18:0; C18:1; C18:2. Estos coincidieron en tiempo de retención con el estándar PUFA. A su vez se compararon con biblioteca y se confirmó su identificación (Figura 3).

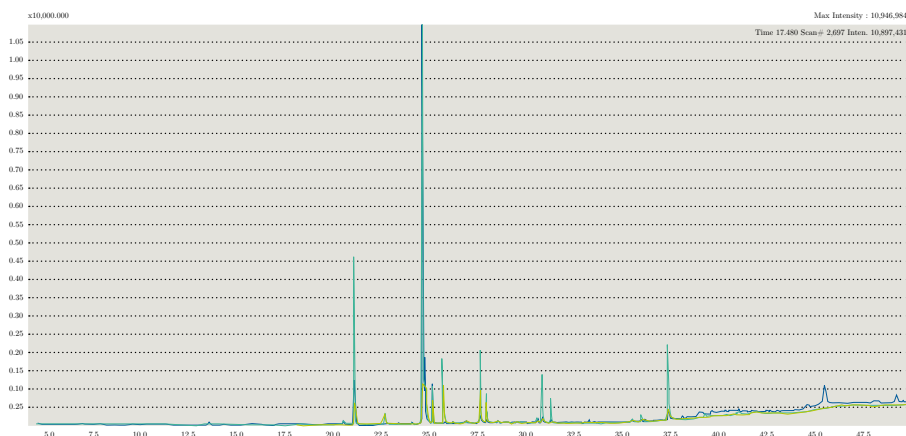


Figura 3. Superposición de cromatogramas de los tres extractos correspondientes a la extracción mediante Soxhlet.

Análisis por RMN

Se realizaron los espectros para todas las fracciones obtenidas en la extracción continua en Soxhlet. En la Figura 4 se observa el espectro obtenido correspondiente a la fracción de hexano. Se pueden observar los picos característicos del perfil lipídico, con los diferentes tipos de protones asignados. Los resultados confirman la presencia de TAG (triacilgliceroles), ácidos grasos saturados e insaturados. También se observa que en la fracción metanólica se coextraen junto con los lípidos otros compuestos que dificultan la integración y resolución de los picos para su caracterización.

Estos espectros permiten caracterizar la matriz según los siguientes parámetros: el índice de olefinas (IO: moles olefinas por mol de AG); ácidos grasos insaturados (IFA: moles AG que presentan al menos una insaturación por mol de ácido graso); MUFA (moles de olefinas totales menos los moles de olefinas conjugadas por mol de AG) y PUFA (protones bisalílicos por mol de AG), como se detalla en la Tabla 4.

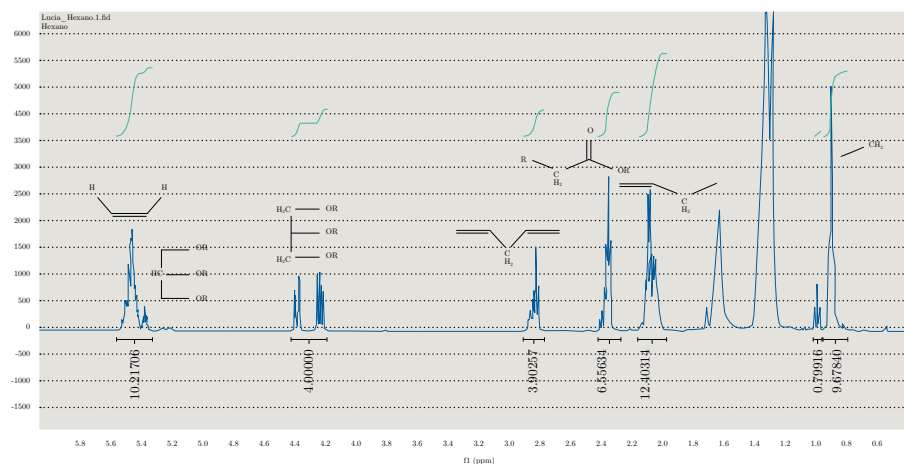


Figura 4. Espectro de RMN-1H de la fracción correspondiente a la extracción obtenida mediante Soxhlet con hexano.

TABLA 4. Datos de integración del espectro de RMN e índices obtenidos para para las fracciones correspondientes a la extracción continua en Soxhlet con hexano y acetato de etilo.

Muestra	Área Olefinas	Bisálílicos	α-Carbonilo	Alílicos	IO	IFA	MUFA	PUFA
Fracción Hexano	9,21706	3,90257	6,55634	12,40314	1,41	0,95	2,36	0,60
Fracción AcOET	9,34868	3,89052	6,60617	12,61287	1,42	0,95	2,40	0,59

La comparación de las metodologías seleccionadas muestra que los rendimientos de extracción son similares. Además, el análisis mediante TLC confirma que con todas las metodologías se obtienen los mismos compuestos mayoritarios, a excepción, como era de esperar, de la fracción obtenida mediante la extracción continua a partir de Soxhlet en metanol.

El estudio de las fracciones de la extracción por Soxhlet mediante GC-FID utilizando una columna cromatográfica específica para ésteres metílicos de ácidos grasos permite identificar los picos mayoritarios, que a su vez se corresponden con los reportados por bibliografía.

Los principales ácidos grasos extraídos se confirmaron mediante análisis por GC-MS y RMN, y se calcularon algunos parámetros de interés: IO, IFA, MUFA y PUFA.

REFERENCIAS

- CAMAG, 2018. CAMAG *Derivatizer. Recommendations for common derivatization reagents* [En línea]. Muttenz: CAMAG. [Consulta: 12/12/2018]. Disponible en: https://www.camag.com/media/2CW90PLE/Recommendations_for_common_derivatization_reagents_2017_11_02.pdf
- Darnoko, D. y Cheryan, M., 2000. Continuous production of palm methyl esters. En: *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, pp.1269-1272.
- Fanali, C., Beccaria, M., Salivo, S., Tranchida, P., Tripodo, G., Farnetti, S., Dugo, L., Dugo, P. y Mondello, L., 2015. Non-polar lipids characterization of Quinoa (*Chenopodium quinoa*) seed by comprehensive two-dimensional gas chromatography with flame ionization/mass spectrometry detection and non-aqueous reversed-phased liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry detection. En: *Journal of Separation Science*, 38, pp.3151-3160.
- Huang, Z., Zhang, P., Sun, Y., Huang, Y., Pan, Z. y Wang, L., 2015. Determination of glyceride and free fatty acid residuals in biodiesel by thin layer chromatography combined with on-line pyrolytic methylation gas chromatography. En: *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 113, pp.288-295.
- Marmouzi, I., El Madani, N., Charrouf, Z., Cherrah, Y. y El Abbas Faouzi, M.Y., 2015. Poximate analysis, fatty acids and mineral composition of processed Moroccan *Chenopodium quinoa* Willd. and antioxidant properties according to the polarity. En: *Phytothérapie*, 13, pp.110-117.
- Pellegrini, M., Lucas-Gonzales, R., Ricci, A., Fontecha, J., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A. y Viuda-Martos, M., 2018. Chemical, fatty acid, polyphenolic profile, techno-functional and antioxidant properties of flours obtained from quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) seeds. En: *Industrial Crops & Products*, 111, pp.38-46.
- Prego, I., Maldonado, S. y Otegui, M., 1998. Seed structure and localization of reserves in *Chenopodium quinoa*. En: *Annals of Botany*, 82, pp.481-488.
- Przybylski, R., Chauhan, G.S y Eskin, N.A.M, 1994. Characterization of quinoa (*Chenopodium quinoa*) lipids. En: *Food Chemistry*, 51, pp.187-192.
- Rubio, Y., 2005. *Extracción de aceite de quinoa (Chenopodium quinoa willd) y su caracterización de dos ecotipos provenientes del secano costero de la región VI de Chile* [En línea]. Santiago: Universidad de Chile. [Consulta: 18 de octubre de 2018]. Disponible en: http://repositorio.uchile.cl/tesis/uchile/2005/rubio_y/sources/rubio_y.pdf

Desarrollo de un método multirresiduo para la evaluación en leche cruda de residuos de organofosforados y piretroides aplicados comúnmente en ganadería

Development of a multiresidue method for the evaluation in raw milk of organophosphorus and pyrethroids residues commonly applied in livestock production

RECIBIDO: 19/10/2018 → APROBADO: 11/12/2018 ✉ heinzen@fq.edu.uy

✉ GÉREZ GARCÍA, NATALIA (1); BERTÓN PASSARINO, ANALÍA (1); GIL BORBA, GUILLERMO (1); CESIO, MARÍA VERÓNICA (1, 2); HEINZEN, HORACIO (1, 2)

(1) GRUPO DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS TRAZA (GACT), DQO, FACULTAD DE QUÍMICA, UDELAR, MONTEVIDEO, URUGUAY.

(2) GRUPO DE ANÁLISIS DE COMPUESTOS TRAZA (GACT), DQL, CENUR LITORAL NORTE, UDELAR, PAYSANDÚ, URUGUAY.

RESUMEN

Dentro de los ectoparasiticidas utilizados en producciones ganaderas, en las que los animales y los procesos industriales generan productos para consumo humano, como la lechería, existen diferentes combinaciones de pesticidas y acaricidas. Si no se administran adecuadamente y no se respetan los compases de espera, se pueden encontrar sus residuos en los alimentos, por ejemplo, en los productos lácteos. Este fenómeno representa un potencial peligro para los consumidores, por lo que es necesario generar herramientas que permitan determinar cómo afectan las diferentes formas de uso en las concentraciones de pesticidas a los alimentos y los intervalos que aseguren su inocuidad al consumirlos. El objetivo de este trabajo fue ajustar y validar una metodología multirresiduo de análisis en leche vacuna cruda para al determinacion de los ectoparasiticidas más empleados en ganadería utilizando GC-QqQ-MS, método elegido por su selectividad y especificidad. La preparación de muestra se basó en la metodología oficial para el análisis de residuos de pesticidas en alimentos en los EE.UU.: QuEChERS, AOAC 2007.01 (AOAC International, 2016). Se validó la metodología según el documento SANTE vigente, evaluando veracidad, precisión, linealidad, efecto matriz y límites de cuantificación (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017). Esta metodología es

una herramienta útil para determinar curvas de decaimiento de los compuestos aplicados de manera de asegurar la calidad e inocuidad de la leche vacuna cruda.

PALABRAS CLAVE: *Pour-on*, residuos de pesticidas en leche cruda, GC-MS/MS, validación de metodología.

ABSTRACT

Among the ectoparasiticides used in livestock production, where animals and industrial processes generate products for human consumption such as dairy products, there are different combinations of pesticides and acaricides. If they are not properly administered and the holding period is not respected, their residues can be present in foods, such as dairy products. This phenomenon represents a potential danger for consumers, so it is necessary to generate tools that allow to determine exactly how different forms of use affect the concentrations of pesticide residues in food and also know the holding period that ensure its innocuity when consumed. The aim of this work was to adjust and validate a methodology of analysis in raw milk for the most used compounds in livestock using GC-QqQ-MS, which is the method of choice for its selectivity and specificity. The sample preparation was based on the official methodology for the analysis of pesticide residues in food in the US: QuEChERS, AOAC 2007.01 (AOAC International, 2016). The figures of merit were evaluated according to the SANTE guidelines (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017). This validated methodology is a useful tool to determine the decay curves of the compounds applied in order to assure the food safety.

KEYWORDS: *Pour-on*, pesticides in raw milk, GC-MS/MS, method validation.

INTRODUCCIÓN

La eliminación de xenobióticos en mamíferos se realiza a través de los fluidos que el organismo excreta. Si bien las vías usuales de eliminación son la orina y las heces, otros fluidos que se producen en gran cantidad, como la leche en períodos de amamantamiento de la cría, se tornan relevantes. En particular, la leche vacuna es un alimento producido a escala industrial y altamente consumido por la población. Para mantener la productividad de los animales es crítico preservar su bienestar y salud. En ese marco, el uso de medicamentos veterinarios es una práctica corriente.

En particular, para evitar los problemas de estrés que genera la mosca de los cuernos, es común el uso de ectoparasiticidas tipo *pour-on*. Estos contienen insecticidas que luego de ser absorbidos se distribuyen sistémicamente y pueden alcanzar la leche de las vacas productoras. Este fenómeno obliga al establecimiento de períodos de espera en los que la leche obtenida no puede ser consumida porque contiene altos niveles de esos compuestos.

Debido a su contenido en grasas relativamente alto, la leche es un vehículo para la eliminación de contaminantes lipofílicos y ha sido empleada para monitorear la

bioconcentración de contaminantes orgánicos persistentes, tales como los pesticidas organoclorados (González-Rodríguez, et al., 2005), ya que está comprobado que estos se acumulan en los tejidos adiposos y son excretados en asociación con la porción grasa de la leche (Trujillo-Parra, et al., 2003).

Otros pesticidas lipofílicos pero menos persistentes o estables, como por ejemplo los organofosforados, también han sido encontrados en leches de diversos orígenes, como la leche procesada de origen animal o leche materna sin procesar.

Si bien una de las vías de contaminación de la leche vacuna puede deberse al uso de drogas veterinarias, las razones para la contaminación pueden ser de diversa índole, como por ejemplo tratamientos higiénicos contra insectos en plantas de procesamiento de leches, consumo de productos alimenticios que contengan pesticidas o uso de raciones para animales que contienen materiales vegetales tratados durante la temporada de cultivo con pesticidas, entre otros. Debido a que los pesticidas son compuestos orgánicos peligrosos, la determinación de sus residuos en alimentos como la leche es importante por el riesgo que suponen para la salud humana. A tales efectos, las principales agencias reguladoras han fijado límites máximos de residuos (LMRs) que sirven para asegurar la inocuidad de su consumo (Codex Alimentarius, 2018). Dado que los principales consumidores de leche son los niños y bebés, los límites para estas franjas etarias son mucho más estrictos. Esto obliga a emplear métodos analíticos con una capacidad de detección hasta niveles de concentración mucho menores que los alcanzados por los métodos analíticos empleados habitualmente.

La determinación de residuos de pesticidas en leche cruda presenta problemas por tratarse de una matriz compleja con alto contenido graso y proteico que forma una emulsión O/W. Para su determinación en esta matriz compleja se han desarrollado diversos métodos (Souza, et al., 2016).

Los métodos reportados para determinar residuos de pesticidas en leche están basados en extracciones líquido-líquido, como el método de Luke, que emplea acetona, el método SweEt, que utiliza Acetato de Etilo como solvente de extracción, y el de QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe), cuyo solvente extractor es acetonitrilo, así como otros métodos que involucran extracción en fase sólida, como el de Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (MSPD). Desde hace 15 años, el análisis de residuos de pesticidas está dominado por los conceptos de miniaturización y economía en el uso de reactivos con el objetivo de cumplir con los parámetros de la química verde. Para acompañar las necesidades actuales se deben emplear técnicas de alta sensibilidad como la espectrometría de masas en tándem. Dentro de los métodos descritos, el de QuEChERS es el más empleado para el análisis multiresiduos de pesticidas en alimentos y productos agrarios, ya que permite obtener altas recuperaciones, resultados precisos, rapidez de tratamiento, poco uso de solvente y material de vidrio. Además, requiere poco espacio de laboratorio y bajo consumo de reactivos (Anastasiades, et al., 2003). Asimismo, el proceso es robusto y confiable y consta de dos etapas: extracción y clean-up. La etapa de extracción utiliza acetonitrilo (MeCN) y sulfato de magnesio anhidro (MgSO₄), lo cual mejora las recuperaciones al facilitar la partición de los pesticidas en la capa orgánica gracias a que retiene el agua. En el caso de la leche, la alta fuerza iónica

que se genera ayuda a la precipitación de las proteínas. El método QuEChERS original no ajusta el pH de extracción (Anastassiades. et al., 2003), por lo que aquellos analitos lábiles a un pH elevado no serán recuperados adecuadamente (70-120%), según lo estipulado por el documento SANTE (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017).

El utilizar el método QuEChERS AOAC 2007.01 (Lehotay, et al., 2005) permitió ampliar el número de analitos determinados en él, ya que la presencia del buffer acético-acetato formado *in situ* en el solvente de extracción hace que aquellos analitos que no se recuperaban en el método original sí puedan ser analizados adecuadamente con este agregado.

En la etapa de *clean-up* de tipo dispersivo se pueden emplear diferentes sorbentes en función de las características de la matriz en estudio. Se emplea PSA (amina primaria/secundaria) para la eliminación de ácidos orgánicos y pigmentos polares y RP-C₁₈ para la eliminación de la mayor parte de los lípidos y esteroides presentes en las matrices con alto contenido graso.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y materiales

Acetonitrilo (MeCN) y Acetato de etilo (AcOEt) calidad HPLC fueron comprados a Pharmco (Brookfield, CT, USA). Sulfato de magnesio anhidro (MgSO₄), Acetato de sodio anhidro (NaAc), Amina primaria y secundaria (PSA) y RP-C₁₈ fueron obtenidos de Scharlab S.L (Barcelona, España).

Los estándares de pesticidas de alta pureza fueron obtenidos de Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania) y guardados a -20 °C. Las soluciones madre individuales de cada pesticida (2000 mg L⁻¹) fueron preparadas en AcOEt y guardadas en viales de vidrio color ámbar con tapa rosca y contratapa de teflón y en ausencia de luz a -20 °C. Los mix de soluciones stock utilizados para las calibraciones y las fortificaciones fueron preparados a partir de las soluciones stock individuales mediante diluciones adecuadas.

Instrumentos

Los residuos de pesticidas se analizaron usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-QqQ-MS). El equipo empleado fue un GC 2010 Ultra acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo TQ8040 (Shimadzu). El volumen de inyección fue de 1 µL de cada muestra en modo splitless y se usó un autosampler AOC 20 i+s. Se empleó una columna capilar RXi-5MS Sil (5% difenil/95% dimetil polisiloxano, 30 m; 0,25 mm d.i; 0,25 µm film) de Restek (Bellefonte, PA, USA). La temperatura del inyector fue 280 °C, el gas portador empleado fue Helio de alta pureza a un flujo de 1 mL min⁻¹. El programa de temperatura del horno se describe en la Tabla 1.

TABLA 1. Condiciones del programa de temperatura del horno del cromatógrafo de gases empleado en el estudio.

°C/min	Temperatura final (°C)	Tiempo de espera (°C)
-	80	2
20	180	0
5	300	3
Tiempo total de corrida: 34 minutos		

La temperatura de la interfase fue 300 °C y la temperatura de la fuente de ionización fue 230 °C. Se trabajó con un voltaje del detector de 1,25 kV y se empleó Argón (200 kPa) como gas de colisión. En todos los experimentos se operó en modo de Monitoreo de Reacciones Múltiples (MRM), ajustando las energías de colisión (EC) y empleando Smart Pesticide Database (SPDB) y MRM Optimization Tool (Restek, Bellefonte, PA, USA), como se describe en la Tabla 2.

TABLA 2. Optimización por GC-QqQ-MS de los 30 analitos evaluados en este estudio. t_R : tiempo de retención; EC: Energía de colisión expresada en V.

Analito	t_R (min)	1° Transición		2° Transición	
		m/z	EC (V)	m/z	EC (V)
1 Etoprofos	9,385	200,00 > 158,00	6	200,00 > 114,00	14
2 Monocrotofos	9,815	127,10 > 109,00	12	127,10 > 95,00	16
3 Cadusafos	9,903	158,90 > 130,90	8	158,90 > 97,00	18
4 Diazinon	11,020	304,10 > 179,10	10	304,10 > 162,10	8
5 Teflutrina	11,322	177,00 > 127,10	16	177,00 > 137,10	16
6 Clorpirifos metil	12,284	285,90 > 93,00	22	285,90 > 270,90	14
7 Fenclorfos	12,737	284,90 > 269,90	16	284,90 > 93,00	24
8 Pirimifos metil	13,003	305,10 > 180,10	8	305,10 > 290,10	12
9 Fenitrotion	13,116	277,00 > 260,00	6	277,00 > 109,10	14
10 Malation	13,314	173,10 > 99,00	14	173,10 > 127,00	6
11 Fention	13,553	278,00 > 109,00	20	278,00 > 125,00	20
12 Clorpirifos etil	13,674	313,90 > 257,90	14	313,90 > 285,90	8
13 Clorfenvinfos	14,500 14,827	323,00 > 267,00	16	323,00 > 295,00	6
14 Fipronil	14,714	366,90 > 212,90	30	366,90 > 254,90	22
15 Aletrina	14,924 14,967	136,10 > 93,10	14	136,10 > 77,10	26
16 Etion	18,002	230,90 > 174,90	14	230,90 > 184,90	12
17 Piretrina	18,634	123,10 > 81,00	8	123,10 > 67,00	6
18 Butóxido de piperonilo	20,041	176,10 > 131,10	12	176,10 > 117,10	20
19 Tetrametrina	20,760 21,063	164,10 > 107,10	14	164,10 > 77,00	22

	Analito	t _R (min)	1° Transición		2° Transición	
			m/z	EC (V)	m/z	EC (V)
20	Bifentrina	20,952	181,10 > 166,10	12	181,10 > 153,10	8
21	Clorantraniliprole	21,215	278,00 > 249,00	20	280,00 > 251,00	20
22	Cialotrina (lambda)	22,495 22,835	197,00 > 161,00	8	197,00 > 141,00	12
23	Permetrina	24,328 24,583	183,10 > 168,10	14	183,10 > 165,10	14
24	Cumafos	24,550	362,00 > 109,00	16	362,00 > 226,00	14
25	Ciflutrina	25,396 25,598 25,705 25,797	226,10 > 206,10	14	226,10 > 199,10	6
26	Cipermetrina	26,013 26,224 26,325 26,414	181,10 > 152,10	22	181,10 > 127,10	22
27	Fenvalerato	27,712	419,10 > 225,10	6	419,10 > 167,10	12
28	Esfenvalerate	28,120	419,10 > 225,10	6	419,10 > 167,10	12
29	Fluvalinato (tau)	27,982 28,123	250,10 > 200,10	16	250,10 > 55,00	18
30	Deltametrina	28,785 29,158	252,90 > 93,00	20	252,90 > 171,90	8

Selección de los analitos de interés y validación de la metodología

La selección de los analitos del estudio se hizo en base a un análisis de mercado y a la lista de importación de fitosanitarios del MGAP 2012-2017 (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, s.d.) para uso en ganadería. Se seleccionaron un total de 30 activos entre piretroides (Py) y organofosforados (OP).

Muestras

Las muestras de leche empleadas para el desarrollo y validación del método fueron obtenidas de un tambo del departamento de Artigas y guardadas en freezer a -18 °C hasta su estudio. El tiempo máximo de conservación de la muestra en freezer previo a su análisis fue de 45 días.

Preparación de muestra

Extracción

Para la extracción se siguió el esquema de QuEChERS AOAC 2007.01 (AOAC International, 2016) para matrices con alto contenido en grasa (Lehotay, et al., 2005).

Se homogeneizó la muestra a temperatura ambiente (25 °C) y en shaker mecánico durante 10 minutos, se pesaron (10,00 ± 0,05) g de leche cruda en un tubo

de polipropileno de 50 mL. Se agregaron 10 mL de MeCN (1% HAc) y se agitó manualmente durante 1 minuto.

Se agregaron 4 g de $MgSO_4$ y 1 g de NaAc y se agitó vigorosamente durante 1 minuto. Se centrifugó durante 5 minutos a 1400 RCF.

Clean-up dispersivo (d-SPE)

Se tomó una alícuota de 4 mL del sobrenadante y se colocó en un tubo de polipropileno de 15 mL con 200 mg PSA, 200 mg RP- C_{18} y 600 mg $MgSO_4$.

Se llevaron los tubos a un vortex y se agitó durante 30 segundos a 1000 RCF. Posteriormente se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 1400 RCF. Se tomaron 2 mL del sobrenadante purificado, se colocaron en tubos de vidrio y se evaporó el solvente empleando corriente de N_2 en un Turbovap[®] con un baño de agua a 45 °C.

Se retomó el residuo en 1,00 mL de AcOEt calidad HPLC, se filtró el extracto empleando filtros de jeringa de PTFE de 0,45 μm y se transfirió a un vial color ámbar de autosampler para su inyección en GC-QqQ-MS.

Validación de la metodología

Se validó la metodología de acuerdo con los lineamientos del documento SANTE/11831/2017 de la Unión Europea (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017), en el cual se establece una serie de procedimientos analíticos y su validación para el análisis de residuos de pesticidas en alimentos y piensos. Se describen abajo las cifras de mérito evaluadas.

Veracidad

Se evaluó la veracidad del método a través de los porcentajes de recuperación para cada analito a cinco concentraciones: 5; 10; 20; 50 y 100 $\mu g\ kg^{-1}$ ($n=5$ para todos los casos). Para realizar las recuperaciones se empleó una muestra blanco a temperatura ambiente y se adicionaron los volúmenes apropiados de las soluciones stock de los pesticidas seleccionados para lograr las concentraciones de trabajo. Las fortificaciones se agitaron empleando Vortex durante 1 minuto a 1000 RCF y se dejaron reposar durante 15 minutos antes de comenzar los análisis.

Precisión

La precisión se evaluó a través del grado de dispersión de las recuperaciones a cada concentración de trabajo. Se evaluó a través de la repetitividad (dispersión de los resultados de un batch de trabajo en un período corto de tiempo) y de la precisión intermedia (dispersión de los resultados de un batch de trabajo realizado en diferentes días por tres diferentes analistas).

Linealidad

La linealidad se evaluó en solvente y en matriz (*matrix matched calibration*). Se analizaron coeficientes de determinación (R^2) y “back-calculated concentration” (BCC); además se realizó una inspección visual para cada caso.

Efecto matriz

El efecto matriz se evaluó como la relación entre la sensibilidad analítica de la curva preparada en matriz en relación a la sensibilidad de la curva de calibración preparada en solvente.

Se calculó el efecto matriz expresado en forma porcentual empleando la Ecuación 1.

$$EM (\%) = \left[\left(\frac{\text{pendiente } CCM}{\text{pendiente } CCS} \right) - 1 \right] \times 100 \quad [1]$$

CCM: curva de calibración en matriz; *CCS*: curva de calibración en solvente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudios preliminares

Al inicio de este trabajo se plantearon tres alternativas para la determinación de ectoparasiticidas lipofílicos en leche cruda. El contenido de grasa en la matriz de trabajo dificulta la extracción de compuestos con K_{ow} elevados, entre ellos los que pertenecen a las familias de los piretroides y los organofosforados.

Se planteó el esquema QuEChERS adaptado por Lehotay para matrices con elevado contenido en grasa (Lehotay, et al., 2005). Particularmente se realizó un desgrasado con hexano y luego un *freeze-out* de 12 horas. La propuesta del desgrasado con hexano se planteó como alternativa para poder remover el elevado contenido de grasa presente en la leche cruda, donde los ácidos grasos se particionan hacia la fracción hexánica permitiendo una mejor limpieza del extracto de MeCN. Se completó la reducción a un mínimo del contenido en lípidos en el extracto empleando la metodología denominada *freeze out*, que consiste en precipitar las grasas a bajas temperaturas. Se dejaron en este experimento los tubos en freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas y se tomó de la fase orgánica para continuar con el esquema del *clean-up* dispersivo propuesto por Lehotay et al., 2005.

La comparación de las tres metodologías a través de la evaluación de los porcentajes de recuperación al nivel de $100\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ arrojó resultados favorables hacia la primera opción, por lo que se eligió el método QuEChERS para continuar con la validación de la metodología.

Validación de la metodología

Se realizaron recuperaciones a cinco concentraciones diferentes, por quintuplicado ($n=5$) para todos los casos. Los valores de recuperaciones y las desviaciones estándares relativas expresadas en forma porcentual se muestran en la Tabla 3.

TABLA 3. Porcentajes de recuperación (Rec) a las cinco concentraciones de trabajo y sus desviaciones estándares relativas (RSD) asociadas.

	Analito	5 µg kg ⁻¹		10 µg kg ⁻¹		20 µg kg ⁻¹		50 µg kg ⁻¹		100 µg kg ⁻¹	
		Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
1	Etoprofos	-	-	69	11	71	13	78	13	73	3
2	Monocrotofos	-	-	106	16	103	11	114	8	122	14
3	Cadusafos	-	-	75	9	70	11	74	7	73	6
4	Diazinon	-	-	73	8	75	9	72	5	79	4
5	Teflutrina	-	-	70	6	72	8	79	3	74	2
6	Clorpirifos metil	74	15	87	12	81	13	79	5	82	7
7	Fenclorfos	-	-	76	9	76	9	78	3	75	4
8	Pirimifos metil	70	11	79	7	90	7	74	2	79	3
9	Fenitrotrion	79	19	104	5	101	15	71	3	86	12
10	Malation	76	16	106	4	105	10	75	4	88	10
11	Fenthion	101	13	107	5	105	6	86	3	93	3
12	Clorpirifos etil	-	-	89	8	83	11	74	3	74	3
13	Clorfenvinfos	92	17	99	9	111	13	89	3	90	8
14	Pipronil	72	17	122	3	120	11	95	4	111	10
15	Aletrina	90	20	104	8	94	9	85	5	88	5
16	Etion	76	12	105	3	104	6	87	2	89	2
17	Piretrina	-	-	-	-	-	-	115	7	100	5
18	Butóxido de piperonilo	83	14	97	2	95	5	82	2	83	2
19	Tetrametrina	85	17	117	3	112	8	89	3	94	5
20	Bifentrina	-	-	75	2	75	6	78	2	80	4
21	Clorantraniliprole	-	-	113	11	105	11	99	3	89	6
22	Cialotrina (lambda)	71	15	107	13	107	16	112	5	113	8
23	Permetrina	76	14	81	4	81	6	72	2	79	4
24	Cumafos	91	20	119	4	108	8	83	2	84	7
25	Ciflutrina	82	20	120	9	105	9	78	6	94	8
26	Cipermetrina	74	16	113	6	110	12	85	5	90	8
27	Fenvalerato	-	-	107	7	110	14	116	7	85	10
28	Esfenvalerate	-	-	121	12	105	13	111	7	88	10
29	Fluvalinato (tau)	70	15	107	2	104	16	131	8	81	14
30	Deltametrina	72	15	115	1	106	15	117	6	96	11

Se pudo comprobar que el método es veraz a todos los niveles de trabajo ya que los porcentajes de recuperación de los compuestos evaluados se encontraban entre (70-120)%. En casos como el del Etoprofos a 10 µg kg⁻¹, el porcentaje es inferior al rango de aceptación (69%) pero con una desviación estándar relativa pequeña, por lo que el compuesto podría ser incluido en el método de análisis de rutina.

Al nivel más bajo, el 60% de los analitos se recupera con un porcentaje aceptable y cabe destacar que todos los analitos tienen al menos dos niveles de concentración en los que los criterios de veracidad y precisión se cumplen según los lineamientos de SANTE 2017 (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017).

Respecto a la precisión, el grado de dispersión de las muestras expresado en la Tabla 3 como repetitividad fueron para todos los casos menores o iguales al 20%.

El ensayo de precisión intermedia se realizó con tres analistas evaluando todos los niveles de concentración trabajados. Los resultados obtenidos expresados como RSD (%) no superaron el 20%.

Para los estudios de linealidad se construyeron curvas de calibración con seis concentraciones en cada caso, tanto en solvente como en matriz.

Pese a que la guía SANTE (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017) no exige inspección visual y evaluación de los coeficientes de determinación, se realizaron las curvas para cada analito de la respuesta analítica en función de la concentración (expresada en μg de pesticidas por kilogramo de leche). La Figura 1 muestra un gráfico de linealidad para Cipermetrina y su cromatograma.

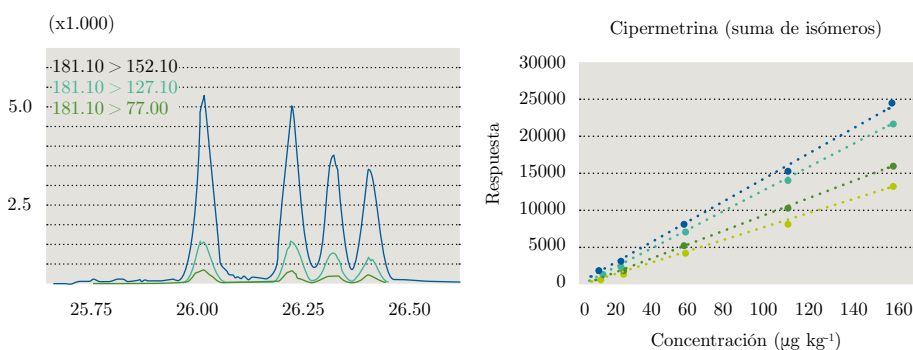


Figura 1. A la izquierda, cromatograma de Cipermetrina. En el eje de las abscisas se grafica el tiempo (en minutos) y en el eje de las ordenadas, la respuesta analítica. A la derecha, curva de calibración en matriz (*matrix matched calibration*) para sus cuatro isómeros por separado. Para todos los isómeros se grafica concentración del pesticida en función de la respuesta analítica.

Para todos los casos se observa comportamiento lineal con R^2 superiores a 0,99. Se realizaron los cálculos de “Back Calculated Concentration” (BCC) como se muestra en la Ecuación 2.

$$BBC (\%) = \frac{(C_{media} - C_{real})}{C_{real}} \times 100 \quad [2]$$

Para todos los casos, tanto en solvente como en matriz, los porcentajes de BCC fueron $\pm 20\%$ cumpliendo con los requisitos establecidos por SANTE (European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017).

De esta manera, el rango lineal para todos los analitos fue de (2,5-150) $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Empleando la información obtenida del estudio de la linealidad (pendientes de las curvas de calibración), se utilizó la Ecuación 1 y se evaluó el efecto matriz en forma porcentual.

Todos los compuestos presentan un efecto de aumento de la señal en matriz con respecto a la calibración en solvente, excepto clorantraniliprole, que presenta supresión de señal.

De los 30 compuestos evaluados, 21 presentan un efecto matriz bajo, es decir, el valor numérico obtenido de la Ecuación 1 (en módulo) se encuentra entre (0-20) %. Ocho compuestos presentan un efecto matriz moderado (20-50) % y solamente un compuesto presenta un efecto matriz elevado (>50 %). Esos resultados se pueden observar en la Tabla 4.

TABLA 4. Datos obtenidos para el estudio de linealidad y efecto matriz.
Pend: pendiente de la curva de calibración; EM: Efecto matriz calculado empleando la Ecuación 1 y expresado en forma porcentual.

Compuesto	Solvente <i>pendiente</i>	Matriz <i>pendiente</i>	EM (%)	Clasificación	Interpretación
Etoprofos	620,8	644,8	4	Bajo	Aumento señal
Monocrotofos	221,1	233,8	6	Bajo	Aumento señal
Cadusafos	813,6	814,3	0	Bajo	Aumento señal
Diazinon	196,4	202,3	3	Bajo	Aumento señal
Teflutrina	3540,7	3581,6	1	Bajo	Aumento señal
Clorpirifós metil	181,7	187,6	3	Bajo	Aumento señal
Fenclofos	417,3	424,3	2	Bajo	Aumento señal
Pirimifos metil	121,5	123,6	2	Bajo	Aumento señal
Fenitrotion	149,0	156,5	5	Bajo	Aumento señal
Malation	584,5	636,6	9	Bajo	Aumento señal
Clorpirifós etil	255,7	264,4	3	Bajo	Aumento señal
Fentión	348,0	463,7	33	Moderado	Aumento señal
Fipronil	82,8	148,1	79	Alto	Aumento señal
Aletrina I	111,4	116,3			Aumento señal
Aletrina II	99,3	102,6	4	Bajo	Aumento señal
Clorfenvinfos I	23,1	25,1			Aumento señal
Clorfenvinfos II	218,8	226,4	6	Bajo	Aumento señal
Etión	920,4	960,5	4	Bajo	Aumento señal
Piretrina I	90,7	110,2	22	Moderado	Aumento señal
Butóxido de piperonilo	1581,3	1668,4	6	Bajo	Aumento señal
Tetrametrina I	158,5	179,8			Aumento señal
Tetrametrina II	1242,4	1375,7	12	Bajo	Aumento señal
Bifentrina	8584,7	8884,1	4	Bajo	Aumento señal
Clorantraniliprole	205,6	188,5	-8	Bajo	Supresión señal
Cialotrina I	41,5	36,9			Aumento señal
Cialotrina II	499,6	590,8	18	Bajo	Aumento señal
Permetrina I	684,3	698,6			Aumento señal
Permetrina II	603,0	621,1	3	Bajo	Aumento señal
Cumafos	117,9	123,0	4	Bajo	Aumento señal

Compuesto	Solvente <i>pendiente</i>	Matriz <i>pendiente</i>	EM (%)	Clasificación	Interpretación
Ciflutrina I	27,8	32,9	23	Moderado	Aumento señal
Ciflutrina II	42,5	51,7			Aumento señal
Ciflutrina III	35,6	43,7			Aumento señal
Ciflutrina IV	74,4	95,5			Aumento señal
Cipermetrina I	136,2	163,8	24	Moderado	Aumento señal
Cipermetrina II	116,9	146,3			Aumento señal
Cipermetrina III	87,4	108,9			Aumento señal
Cipermetrina IV	69,9	88,6			Aumento señal
Fenvalerato	41,0	52,8	29	Moderado	Aumento señal
Esfenvalerato	22,4	29,0	30	Moderado	Aumento señal
Fluvalinato I	151,7	204,7	35	Moderado	Aumento señal
Fluvalinato II	145,7	197,1			Aumento señal
Deltametrina I	30,2	33,5	34	Moderado	Aumento señal
Deltametrina II	136,2	182,4			Aumento señal

Se puede observar en la Figura 2 la comparación de los gráficos de las curvas de calibración en solvente y matriz para Fipronil. Fipronil fue el único compuesto que presenta un EM positivo pronunciado (+79 %).

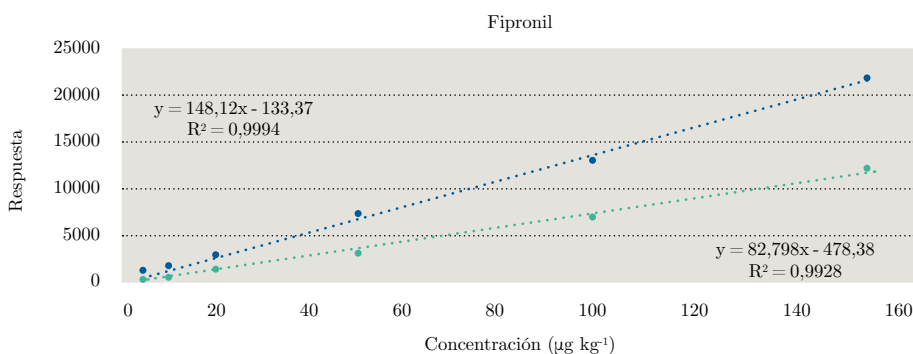


Figura 2. Comparación de las curvas de calibración realizadas para Fipronil. En verde, curva de calibración en solvente, y en azul, curva de calibración en matriz.

Respecto a los límites de cuantificación, se tomó como criterio establecerlo como el nivel más bajo de concentración al que se cumplen criterios de veracidad y precisión (recuperaciones entre 70-120 % con RSD's < 20%). Como se puede observar en la Figura 3, el límite para la mayoría de los compuestos es $5 \mu\text{g kg}^{-1}$. Solamente piretrina presenta un LOQ de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

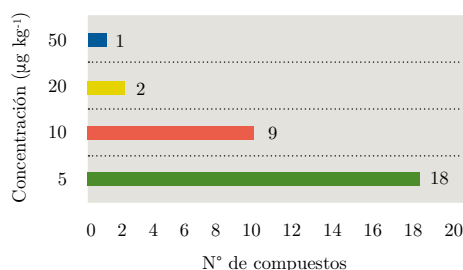


Figura 3. Límites de cuantificación (LOQ) expresados en $\mu\text{g kg}^{-1}$ para los diferentes compuestos en estudio; 18 compuestos presentaron un LOQ de $5 \mu\text{g kg}^{-1}$ (barra verde), nueve compuestos presentaron un LOQ de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ (barra naranja), dos compuestos un LOQ de $20 \mu\text{g kg}^{-1}$ y solamente un compuesto un LOQ a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

CONCLUSIONES

Se ajustó y validó una metodología multirresiduo para el análisis de ectoparasiticidas lipofílicos (piretroides y organofosforados) en leche cruda empleando un método sencillo, rápido y que demostró a través de los datos de la validación ser adecuado para su propósito.

La metodología validada es una herramienta útil para determinar curvas de decaimiento de los compuestos aplicados de manera de asegurar a la leche su calidad e inocuidad alimentaria.

Este método se emplea rutinariamente en el Laboratorio de Análisis de Residuos de Pesticidas (GACT) en Facultad de Química (UdelaR) para la determinación de ectoparasiticidas en leche vacuna.

RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen a la Red Analítica de Laboratorios de América Latina y el Caribe (RALACA-IAEA) por proveer los estándares para el estudio, a Dexin (Grupo Químico SRL) y SHIMADZU Brasil (GC-Team: R. Kitamura y F. Róveri) por brindar el soporte de software e instrumental del equipo empleado.

REFERENCIAS

- Anastassiades, M., Lehotay, S., Stajnbaher, D. y Schenck, F., 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. En: *Journal of AOAC International*, 86(2), pp.412-431.
- AOAC International, 2016. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 20a ed. Gaithersburg: AOAC. Official Method 2007.01, first action 2007-final action 2013.

- Codex Alimentarius, 2018. *Límites máximos de residuos (LMR) y recomendaciones sobre la gestión de riesgos (RGR) para residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos* [En línea]. Roma: Codex Alimentarius. [Consulta: 03 de setiembre de 2018]. Disponible en: <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/codex-texts/maximum-residue-limits/es/>
- European Commission. Directorate General for Health and Food Safety, 2017. *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017*. [s.l.]: Unión Europea.
- González-Rodríguez, M.J., Arrebola-Liébanas, F.J., Garrido-Frenich, A., Martínez-Vidal, J.L. y Sánchez-López, F.J., 2005. Determination of pesticides and some metabolites in different kinds of milk by solid-phase microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. En: *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, pp.164-172.
- Lehotay, S., Mastovska, K. y Yun, S.J., 2005. Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrixes. En: *Journal of AOAC International*, 88(2), pp.630-638.
- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, [s.d.]. *Datos estadísticos de importaciones de productos fitosanitarios* [En línea]. Montevideo: MGAP. [Consulta: 03 de marzo de 2018]. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-organizativa/direccion-general-de-servicios-agricolas/tramites-y-servicios/servicios/datos>
- Souza, R., Cesio, M.V., Heinzen, H. y Pareja, Lucía, 2016. Desarrollo de una metodología para el análisis simultáneo de pesticidas y drogas veterinarias en leche. En: Universidad de la República. *4to Congreso Uruguayo de Química Analítica (CUQA)*. Montevideo, Uruguay, (25-28 de setiembre de 2016). Montevideo: Udelar.
- Trujillo-Parra, M.A., Peláez-Suárez, L., Londoño-Arango, J.E., Pérez-Almarino, N. y Rengifo-Benítez, G., 2003. *Los residuos de medicamentos en la leche. Problemática y estrategias para su control*. Bogotá: CORPOICA.

Optimización de un método primario para la determinación de creatinina en suero humano mediante GC-IDMS

Optimization of a primary method for the determination of creatinine in human serum by GC-IDMS

RECIBIDO: 17/10/2018 → APROBADO: 29/11/2018 ✉ asilva@latu.org.uy

✉ SILVA, ANA I. (1); ALMIRÓN, FLORENCIA (1); FERREIRA, ELIZABETH (1); PISTÓN, MARIELA (2)

(1) DEPARTAMENTO DE METROLOGÍA QUÍMICA, LABORATORIO TECNOLÓGICO DEL URUGUAY, MONTEVIDEO, URUGUAY.

(2) GRUPO DE ANÁLISIS DE ELEMENTOS TRAZA Y DESARROLLO DE ESTRATEGIAS SIMPLES PARA PREPARACIÓN DE MUESTRAS (GATPREM), ÁREA QUÍMICA ANALÍTICA, DEPARTAMENTO ESTRELLA CAMPOS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA, MONTEVIDEO, URUGUAY

RESUMEN

Los métodos primarios constituyen el nivel jerárquico de medición más elevado debido a que permiten implementar la trazabilidad a las unidades del Sistema Internacional. El objetivo de este trabajo fue la optimización de un método primario para la determinación de creatinina en suero humano por dilución isotópica mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC – IDMS), adaptado de un método de referencia publicado en el Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM - BIPM). Se optimizaron factores vinculados a las etapas de equilibrado isotópico y derivatización. Para esto se realizó un diseño experimental de tres factores en dos niveles (diseño 2³) y un análisis de varianza de un factor (ANOVA). Las respuestas evaluadas en el diseño experimental fueron la señal correspondiente a la creatinina, la eficiencia de derivatización, la relación de eficiencia de derivatización y el sesgo. El método propuesto, optimizado para las etapas de equilibrado isotópico y derivatización, presenta mayor eficiencia y simplicidad comparado con el método original, y cuenta con un sesgo adecuado al propósito. Luego de su validación podrá ser implementado para el desarrollo de herramientas de aseguramiento de la calidad de los laboratorios clínicos que realizan estas mediciones rutinariamente.

PALABRAS CLAVE: metrología química, métodos primarios de medición, IDMS optimización.

ABSTRACT

Primary methods represent the highest hierarchical measurement level as they allow the implementation of traceability to the International System of Units. The aim of this work was the optimization of a primary method for the determination of creatinine in human serum by isotope dilution gas chromatography mass spectrometry (GC-IDMS) which is an adaptation of a reference method published in the Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM - BIPM) database. The isotopic equilibration and derivatization steps were optimized through a 2³ experimental design and a one-way analysis of variance (ANOVA). The monitored output variables were the creatinine peak signal, the derivatization efficiency, the relative derivatization efficiency and bias. The optimized method shows higher efficiency and simplicity compared to the original method as well as a bias that remains fit for purpose. Once validated is intended to be used for the development of quality assurance tools for routine analysis of clinical laboratories.

KEYWORDS: metrology, primary methods of measurement, IDMS, optimization.

INTRODUCCIÓN

La armonización de las mediciones a nivel global es crucial para el comercio, la salud y el avance tecnológico y científico. La metrología, es decir, la ciencia que estudia las mediciones y su aplicación, trabaja activamente para alcanzar este objetivo. Probablemente, la forma más económica de alcanzar la comparabilidad global de las mediciones sea el desarrollo de un sistema jerárquico de medición basado en la trazabilidad mediante estándares de calibración a una referencia internacional adecuada, como el Sistema Internacional de Unidades (Thompson y Ellison, 2005). Este sistema de medición depende críticamente de incertidumbres bajas entre los niveles, las cuales se alcanzan mediante mediciones de alta jerarquía metrológica. El vocabulario internacional de metrología (VIM) define la trazabilidad metrológica como la “propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida” (JCGM, 2012). La trazabilidad metrológica a las unidades del sistema internacional se obtiene a partir de los métodos primarios, que representan el mayor nivel metrológico. Estos cuentan con ecuaciones e incertidumbres descritas completamente utilizando unidades del sistema internacional (King, 2005) y no tienen correcciones significativas por factores empíricos (De Bievre y Peiser, 1997). En el campo de la metrología química, la unidad aplicable es el mol y su trazabilidad se obtiene por métodos primarios como la gravimetría y la dilución isotópica con espectrometría de masas (IDMS), que cuenta con demostrada veracidad y baja incertidumbre. Estas características le confieren especial relevancia para la certificación de materiales de referencia y en la asignación de valores de referencia de ensayos de aptitud. Este método, de vasta aplicación en el ámbito de la metrología química orgánica, consiste

en adicionar a la muestra una cantidad conocida del analito de interés que presenta una composición isotópica diferente y que cumple la función de estándar interno. La determinación de la cantidad de sustancia se calcula a partir de una ecuación que depende de la relación entre la abundancia isotópica natural del analito y la abundancia isotópica del estándar interno enriquecido isotópicamente, y esta se pueden medir con alta exactitud mediante un espectrómetro de masas (Richter, 1997). Para que este método alcance su altísimo potencial analítico, es fundamental que parámetros como la preparación de la muestra o la selección del estándar interno sean estudiados y optimizados exhaustivamente.

Un ejemplo de aplicación para este tipo de método primario es la determinación de creatinina en suero por dilución isotópica con espectrometría de masas.

La importancia de la determinación de la concentración de creatinina en suero se debe a que es utilizada clínicamente para la estimación de la tasa de filtración glomerular con el fin de diagnosticar la enfermedad renal crónica. Se considera que esta enfermedad afecta a entre 5 -10 % de la población mundial, con un aumento sostenido de la incidencia y prevalencia de la enfermedad renal en etapa terminal, la falla renal y los trasplantes de riñón a nivel mundial (Myers, et al., 2006). De forma rutinaria, este análisis se realiza por métodos colorimétricos como el método de Jaffe, que se ve afectado por interferencias de otros grupos cromóforos provenientes de la bilirrubina, proteínas y cetonas (Fernández-Fernández, et al., 2014). Estas deficiencias se compensan parcialmente tras el desarrollo de métodos enzimáticos (Myers, et al., 2006).

En el campo de la bioquímica clínica, el diagnóstico, la evaluación de riesgo y el monitoreo de un paciente dependen de forma crítica de los resultados emitidos por un laboratorio (Thienpont, et al., 2002). La comparabilidad de estos resultados permite considerar intervalos de referencia comunes o posibles estrategias de tratamiento (Thienpont, et al., 2002). Esta comparabilidad de resultados se obtiene principalmente al establecer la cadena de trazabilidad de la medición a los estándares internacionales más altos, mediante un sistema de mediciones de referencia exhaustivo (Thienpont, et al., 2002).

El Comité Conjunto para Trazabilidad en Medicina Laboratorial (JCTLM según sus siglas en inglés) lista los métodos de referencia existentes para la determinación de parámetros clínicos, muchos de los cuales emplean dilución isotópica (Kessler, 2016). La misión general de este comité, que forma parte de la Oficina Internacional de Pesas y Medidas (BIPM, según sus siglas en francés) es la mejora de la calidad en el ámbito de la salud, reduciendo los costos del gobierno y la industria del diagnóstico *in vitro* por medio de la promoción de sistemas de examinación de referencia que permiten la trazabilidad de los resultados en los exámenes y la comparabilidad mejorada. Complementariamente a la implementación de la trazabilidad en los laboratorios clínicos, la participación en instancias de evaluación externa así como la aplicación de herramientas de aseguramiento de calidad internas son elementos clave y mandatorios para estos laboratorios.

Los resultados de programas de ensayos de aptitud permiten evaluar el desempeño individual de cada laboratorio y la comparación de métodos analíticos comúnmente

utilizados. La asignación de valor de las muestras distribuidas en estos estudios, usualmente muestras liofilizadas basadas en suero humano, se realiza mediante el empleo de un método de referencia o de un material de referencia certificado. En caso de que esto no sea posible, se puede instrumentar la asignación de valor por consenso, lo que presenta un inconveniente mayor dado que no es posible contar con un valor metrologicamente trazable, por lo tanto no presenta un punto de comparación a nivel internacional. Esto dificulta la determinación certera de los sesgos asociados a los diferentes métodos analíticos.

Actualmente, los valores de referencia de los programas de evaluación externa de calidad ofrecidos en Uruguay son asignados externamente por métodos de referencia secundarios, lo cual resulta en un elevado costo asociado al transporte. El desarrollo o implementación de métodos primarios de trazabilidad claramente establecida permitirá la asignación de valores trazables a estos programas para realizar una evaluación rigurosa de la exactitud de los métodos de rutina utilizados a nivel nacional.

Este trabajo introduce modificaciones a un método de referencia para la determinación de creatinina por suero humano mediante dilución isotópica con cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-IDMS) publicado en la base de datos del Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) del BIPM (Siekmann, 1985). Las modificaciones propuestas al método son el uso de un estándar interno deuterado (creatinina- d_3) en sustitución del original (creatinina- $^{13}C,^{15}N_2$) y la preparación gravimétrica de las muestras y calibrantes.

El estándar interno presentado como alternativa se obtiene fácilmente de forma comercial, a diferencia del original, que debe sintetizarse especialmente y requiere de equipamiento no siempre disponible en un laboratorio analítico.

Adicionalmente, la preparación gravimétrica de muestras y calibrantes le confiere al método mayor exactitud y menor incertidumbre, al tiempo que elimina la necesidad de calibrar el equipamiento volumétrico. Dado que la elección de estándar interno utilizado puede incidir fuertemente en el desempeño de los métodos basados en dilución isotópica, es necesaria la búsqueda de condiciones óptimas para que su veracidad no se vea afectada.

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de factores relacionados con etapas críticas de preparación de muestra, como el equilibrado isotópico y la derivatización, sobre este método optimizado con los cambios propuestos. A partir de esta información se busca encontrar las condiciones óptimas para estas etapas para que el método presente una veracidad adecuada al propósito de desarrollar herramientas de aseguramiento de calidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y materiales

Para la cuantificación de las muestras de suero se utilizó un material de referencia certificado de creatinina pura (SRM 914a, NIST, Maryland, USA), un estándar

de creatinina- d_3 (sc-217956, Santa Cruz Biotechnology Inc., Texas, USA), y agua ultrapura “agua MQ” producida por un sistema de ultrapurificación DirectQ3-UV Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

Para el diseño experimental se utilizaron materiales de referencia certificados de creatinina en suero congelado (SRM 967a, NIST, Maryland, USA). El filtrado de las muestras se realizó con filtros de 0,45 μm .

Se utilizó ácido acético glacial (Macron Fine Chemicals, Pensilvania, USA) para preparar una solución de ácido acético al 1% “SAC” (1 mL de ácido acético se llevó a 100 mL en un matraz aforado con agua MQ) e hidróxido de amonio 30% (Carlo Erba, Milán, Italia) para preparar una solución de hidróxido de amonio 2M “SB” (11,3 mL NH_4OH se llevaron a 100 mL en matraz aforado con agua MQ).

Para la separación de creatina y creatinina se utilizó una resina de intercambio catiónico en forma hidrógeno, fuertemente ácida, 200 – 400 mesh DOWEX 50WX2 (Sigma-Aldrich, Misuri, USA), en una columna de vidrio de 12,5 mm de diámetro interno y 15 cm de largo. El control de pH de las fracciones recolectadas se realizó con tiras de pH en el rango 0 a 14 (código 109535) y 2,5 a 4,5 (código 109541) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Para el secado de las muestras se utilizó nitrógeno calidad 4.0. Durante la derivatización de las muestras se utilizó piridina (secada con tamiz molecular 0,3 nm código 105734 Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA, código 111805, Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) o N, O-Bistrifluoroacetamida (BSTFA) con 1% Trimetilclorosilano (TMCS) (código 15238 Fluka, Misuri, USA), según corresponda (ver sección “Optimización de solvente y agente de derivatización” en Resultados y discusión).

Equipamiento

Las muestras y soluciones calibrantes se pesaron en una microbalanza Mettler Toledo XPE56 (Zúrich, Suiza). Las muestras de suero humano se manipularon dentro de una cabina de bioseguridad (BSC-1300 II A2-X, Labotecgroup.com) y se llevaron a sequedad con un evaporador de muestras de bloque seco (código 109A 28680-30, Cole-Parmer, USA). La derivatización se realizó en una estufa (modelo FD 115, Binder, Alemania). Las muestras fueron analizadas en un cromatógrafo de gases 7890A acoplado a espectrómetro de masa 5795C (Agilent technologies, USA). El análisis fue realizado en las siguientes condiciones: columna de 5% fenilmetilpolisiloxano de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm (HP-5 MS, Agilent technologies, USA). Se utilizó helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min. La temperatura inicial de la columna fue 80 °C por 1 minuto, luego aumentó a 10 °C/min hasta 200 °C y 25 °C/min hasta 250 °C por 5 minutos. La inyección de 0,5 μl se realizó en un modo splitless a 300 °C. La temperatura de la interfase y la fuente de iones del espectrómetro de masa fueron 250 °C y 230 °C, respectivamente. La cuantificación de creatinina se realizó en modo “Single Ion Monitoring”, monitoreando los iones 329 m/z y 332 m/z. Para el análisis de eficiencia de derivatización, también se monitorearon los iones 256 m/z y 259 m/z. La determinación de humedad en piridina fue realizada utilizando un titulado coulombimétrico Karl – Fisher C20 (Mettler Toledo, Zúrich, Suiza).

Procedimiento

Se prepararon gravimétricamente soluciones calibrantes a partir de 3 mg de material de referencia certificado de creatinina con 25 g de agua MQ, a razón de dos soluciones independientes por cada instancia de cuantificación. Estas soluciones se diluyeron gravimétricamente para preparar soluciones de trabajo de 5; 7; 8,5; 9 y 11 mg kg⁻¹. La solución de creatinina isotópicamente marcada (creatinina-d3, de ahora en adelante se llamará solución de isótopo) se preparó de forma equivalente a las soluciones calibrantes pero partiendo de 1,5 mg del sólido. Se tomó 1 mL de suero humano previamente descongelado y homogeneizado o 1 mL de solución calibrante y se les agregó gravimétricamente solución de isótopo de manera que iguale la masa de creatinina presente en las muestras analizadas y la solución calibrante a 8,5 mg kg⁻¹.

En adelante y para simplificar, las mezclas de solución calibrante y solución isótopo se denominarán B_{ZY} y las mezclas de suero y solución calibrante B_{XY}. Para alcanzar el equilibrio isotópico, estas muestras fueron homogeneizadas por un tiempo variable entre 30 y 90 min (factor “tI”) en un agitador orbital a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Las soluciones calibrantes se reservaron para posterior secado, mientras que las muestras de suero humano se trasvasaron a una jeringa sin aguja y se filtraron a 0,45 µm hacia un tubo pyrex de 50 mL. Se agregaron 20 a 25 gotas de SAc a cada muestra, hasta comprobar un pH ~ 4,5.

Para el intercambio iónico se acondicionó una cucharada de resina en un matraz Erlenmeyer con 5 mL de SB, verificando pH básico. Se prepararon las columnas cromatográficas adicionando 2,5 mL de resina y realizando tres lavados de 10 mL de agua MQ hasta comprobar pH neutro. Se sembraron las muestras y se procedió a lavar la creatina con dos tomas de 10 mL de agua MQ. Se recolectó la creatinina adicionando 10 mL de SB, descartando los primeros 2 mL y recolectando la fracción de creatinina en los próximos 8 mL. Las fracciones de creatinina y las soluciones calibrantes se secaron en evaporador bajo nitrógeno utilizando un bloque de calor seco a 80 °C. Una vez que las muestras y soluciones calibrantes se encontraron completamente secas, se les agregó 200 µL de piridina y 50 µL de MSTFA o BSTFA + 1% TMCS, según corresponda (ver sección “Optimización de solvente y agente de derivatización” en Resultados y discusión). Se homogeneizaron mediante vórtex por 10 segundos y se trasvasaron utilizando una pipeta Pasteur de vidrio a un inserto de 400 µL. Luego, estos se colocaron en viales de automuestreador de 2 mL y se calentaron en estufa por un tiempo variable de entre 20 y 70 minutos (factor “tD”) a una temperatura variable de entre 40 y 80 °C (factor “TD”). Posteriormente, las muestras se analizaron por GC-MS.

Optimización de solvente y agente de derivatización

Tres tomas de piridina fueron sometidas a diferentes condiciones de secado. En el primer caso se adicionó tamiz molecular 72 horas antes de su uso (“PIR 72h”), en el segundo caso 4 horas antes (“PIR 4h”) y en el tercer caso no se adicionó tamiz

("PIR ST"). Cuando aplicó, se adicionó tamiz en una proporción 1 mL de tamiz seco por cada 25 mL de solvente. Se prepararon 15 mL de una mezcla B_{XY} de 20 mg kg⁻¹ de creatinina y creatinina-d3 y se realizaron tomas de 1 mL en 12 viales de 4 mL ámbar, para analizar cada variación por triplicado.

Las muestras se secaron según lo descrito en la sección anterior y se les agregó 200 µL de piridina (PIR 72h, PIR 4h o PIR ST, según el caso) y 50 µL de MSTFA o BSTFA + 1% TMCS, según corresponda (ver sección "Optimización de solvente y agente de derivatización" en Resultados y discusión). De forma paralela, se determinó la humedad de las muestras de piridina que recibieron diferentes tratamientos de secado por titulación coulombimétrica Karl-Fisher por quintuplicado.

Se registró la señal correspondiente al área del ion 329 m/z y se contrastó con el contenido de agua en cada muestra de piridina a través de un análisis de varianza de un factor (ANOVA, nivel de significancia = 5%) mientras que el efecto de la selección de agente derivatizante en la señal creatinina se evaluó mediante un test t de Student (dos colas, nivel de significancia = 5%).

Optimización de tiempo de equilibrado isotópico, tiempo y temperatura de derivatización

La optimización de las variables tiempo de equilibrado isotópico ("tI"), tiempo y temperatura de derivatización ("td" y "TD", respectivamente) se realizó a través de un diseño factorial de tres factores a dos niveles (diseño 2³). Los experimentos realizados se detallan en la Tabla 1.

TABLA 1. Diseño experimental y codificación para cada experimento (entre paréntesis). tI: tiempo de equilibrado isotópico, td: tiempo de derivatización (min) y TD: temperatura de derivatización (°C).

Experimento	tI (min)	TD (°C)	td (min)
1	30 (-1)	40 (-1)	20 (-1)
2	90 (1)	40 (-1)	20 (-1)
3	30 (-1)	40 (-1)	70 (1)
4	90 (1)	40 (-1)	70 (1)
6	30 (-1)	80 (1)	20 (-1)
7	90 (1)	80 (1)	20 (-1)
8	30 (-1)	80 (1)	70 (1)
9	90 (1)	80 (1)	70 (1)

Para llevar a cabo el diseño experimental se analizaron ocho tomas de 1 mL del material de referencia certificado de creatinina en suero humano y se procesaron según el procedimiento detallado anteriormente, variando en cada caso los factores.

Se utilizaron materiales de referencia certificados con el objetivo de detectar aquellos experimentos donde el sesgo del método fue acorde al propósito. Las respuestas evaluadas fueron la señal relacionada a creatinina (área de ion 329 m/z), el sesgo determinado como la diferencia entre la fracción de masa certificada y la fracción de masa resultante, la eficiencia de derivatización y la relación de eficiencias de derivatización (“relación ED” definido como el ratio 329/256 m/z: 332/259 m/z). La fracción de masa de creatinina fue calculada por *double exact-matching isotope dilution*, según la Ecuación 1 (Burke y Mackay, 2008).

$$w_x = w_z \frac{m_Y m_Z (R_Y - R_B) (R_{B,c} - R_Z) R_X}{m_X m_{Y,c} (R_B - R_X) (R_Y - R_{B,c}) R_Z} \quad [1]$$

donde w_x es la fracción de masa de creatinina en la muestra de suero humano, w_z es la fracción de masa de creatinina en la solución calibrante, m_Y es la masa de solución de creatinina- d_3 adicionada a la mezcla de muestra (B_{XY}), $m_{Y,c}$ es la masa de solución de creatinina- d_3 adicionada a la mezcla de calibración (B_{ZY}), m_Z es la masa de solución de calibrante adicionada a la mezcla de calibración (B_{ZY}), m_X es la masa de suero tomada, R son los ratios de los iones 329 m/z sobre 332 m/z en B_{ZY} (R_B), en B_{XY} ($R_{B,c}$), en la solución calibrante (R_X y R_Z) y la solución del isótopo (R_Y).

La eficiencia de derivatización fue evaluada como la relación entre la señal del producto tri-derivatizado (tres unidades del grupo trimetilsilil por molécula de creatinina, “3-TMS-creatinina”) y el producto di-derivatizado, “2-TMS-creatinina”. Esto corresponde a las señales de los iones 329 m/z y 256 m/z, respectivamente. La eficiencia de derivatización también se estudió para el estándar interno, creatinina- d_3 , en este caso monitoreando los iones 332 m/z y 259 m/z.

El análisis del efecto de los factores individuales y combinados se realizó según las Ecuaciones 2 y 3 (Costa Ferreira, 2015).

$$Efecto\ factor\ A = \frac{\Sigma Y_{+A} - \Sigma Y_{-A}}{4} \quad [Ec. 2]$$

$$Efecto\ interacción\ AB = \frac{\Sigma Y_{+A^*B} - \Sigma Y_{-A^*B}}{4} \quad [Ec. 3]$$

donde Y es la variable de respuesta obtenida, e Y_{+A} y Y_{-A} indican aquellas respuestas Y obtenidas cuando el factor A recibió una codificación positiva o negativa, respectivamente. El denominador indica los pares de respuestas Y_{+A} , Y_{-A} presentes en este diseño de ocho experimentos. Para el estudio de la interacción entre los factores A y B se toman las respuestas Y_{+A^*B} , Y_{-A^*B} obtenidas cuando el factor de la codificación de A y B fue positivo o negativo, respectivamente. Numéricamente, cuanto mayores sean estos resultados, mayor es el efecto del factor o interacción de los factores en el proceso estudiado. A su vez, cuando un efecto es positivo, la respuesta aumenta a medida que aumenta el factor y viceversa. La elección de las condiciones óptimas se realizó con un sistema de puntuación diseñado especialmente mediante el cual se asignó un punto por cada condición de optimización cumplida en el experimento,

estudiada para cada variable de respuesta. Luego estos puntos se sumaron. Las condiciones de optimización por variable de respuesta fueron seleccionadas como aquellos factores o combinación de factores que presentaron un efecto significativo sobre cada variable de respuesta.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización de solvente y agente de derivatización

Con el objetivo de compatibilizar la determinación de creatinina con la cromatografía gaseosa como método separativo, fue necesario favorecer la volatilización de este analito mediante derivatización. La optimización de esta etapa impacta directamente en la sensibilidad del método, dado que es posible obtener una mayor señal a partir de la misma cantidad de analito. Las condiciones óptimas fueron analizadas variando la cantidad de humedad presente en el solvente (piridina) y el agente derivatizante utilizado. La humedad es un parámetro crítico a optimizar dado que los productos de derivatización alquil-sililados son sensibles a la humedad y afectan directamente el rendimiento de la reacción (Cardinael, et al., 2015).

Los resultados del estudio de optimización se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2. Resultados del estudio de optimización de la etapa de derivatización. PIR 72h, PIR 4h y PIR ST corresponde a los tratamientos de secado aplicado al solvente piridina, descritos en la sección Optimización de solvente y agente de derivatización dentro de Materiales y Métodos.

Muestra de piridina	PIR 72h	PIR 4h	PIR ST	PIR ST
Agente derivatizante	MSTFA	MSTFA	MSTFA	BSTFA + 1% TMCS
Humedad (%)	0,0096	0,0262	0,0311	0,0311
Promedio de señal de área ion 329 m/z (n = 3)	20665682	21340254	21694744	42932003
Desviación estándar (n = 3)	8157537	1394249	1803771	1032117

El test de ANOVA indica que la variación de la señal correspondiente a creatinina no puede explicarse estadísticamente por la variación de la humedad del solvente ($F < F$ crítico, $\alpha = 5\%$) evaluado hasta una humedad del 0,04%. Por otro lado, la señal de creatinina se duplicó al utilizar BSTFA + 1% TMCS en contraste con MSTFA, lo que evidencia el efecto de la selección del agente de derivatización sobre la señal de creatinina (ANOVA, $F > F$ crítico, $\alpha = 5\%$). Esto es esperable ya que el agente BSTFA presenta una reactividad mayor que el MSTFA como donador de grupo silil, mientras que la adición de trimetilclorosilano (TMCS) en pequeñas proporciones acelera la reacción con grupos retadores como amidas, aminas secundarias y grupos hidroxilos presentando impedimento estérico (Poole, 2013).

Optimización de tiempo de equilibrado isotópico, tiempo y temperatura de derivatización

Las variables de respuesta, área de creatinina y eficiencia de derivatización fueron seleccionadas dado que afectan directamente la sensibilidad del método. La variable sesgo evalúa la veracidad del método y su signo toma especial relevancia porque la creatina, presente naturalmente en el suero humano, representa una interferencia del método debido a que tiene el mismo producto de derivatización que la creatinina. La correcta separación entre creatinina y creatina durante la etapa de intercambio catiónico fue previamente estudiada. Adicionalmente, es importante optimizar los factores para buscar que la relación de eficiencias de derivatización entre analito y estándar interno se aproxime a la unidad. El apartamiento de esta condición es un indicio de que el analito y el estándar interno no presentan comportamientos químicos equivalentes, requisito de esencial importancia para la correcta aplicación de la técnica de dilución isotópica. Los resultados obtenidos en el diseño factorial se detallan en la Tabla 3.

TABLA 3. Fracción de masa de creatinina determinada por *double exact-matching isotope dilution* (Ecuación 1), porcentaje de recuperación que toma como referencia el valor certificado del MRC SRM 967a y cálculo del sesgo, la diferencia entre concentración certificada y fracción de masa calculada.

Exp.	w (mg kg ⁻¹)	Rec. (%)	Sesgo (mg kg ⁻¹)	A creatinina	R ^{329/256} m/z	R ^{332/259} m/z	Relación ED
1	8,38	101,2%	0,101	17633	0,3853	0,3190	1,208
2	8,70	105,1%	0,421	22704	0,3373	0,3104	1,087
3	9,29	112,2%	1,011	18185	0,3411	0,2741	1,245
4	8,38	101,2%	0,100	43281	0,6056	0,4686	1,292
6	8,40	101,5%	0,125	29619	1,0342	0,8661	1,194
7	9,29	112,2%	1,006	18422	0,7968	0,6754	1,180
8	10,45	126,2%	2,168	11353	0,8331	0,5698	1,462
9	9,34	112,9%	1,064	112915	0,4795	0,4188	1,145

El efecto de los factores tI, tD y TD sobre las variables de respuesta área de creatinina, sesgo, eficiencia de derivatización y relación de ED se calcularon según las Ecuaciones 2 y 3 y se detallan en la Tabla 4.

TABLA 4. Evaluación del efecto de los factores individuales y combinados tI, TD y tD sobre las variables de respuesta área de creatinina, sesgo, eficiencia de derivatización y relación ED.

Efecto factor	A _{creatinina}	R (%)	R _{329/256}	R _{332/259}	sesgo (mg/Kg)	Relación ED
tI	30133	-0,025	-0,094	-0,039	-0,203	-0,101
TD	17626	0,082	0,369	0,290	0,683	0,037
td	24339	0,081	-0,074	-0,110	0,673	0,119
tI x TD	15050	0,011	-0,202	-0,132	0,092	-0,065
tI x td	33196	-0,097	0,049	0,061	-0,804	-0,034
td x TD	13774	0,046	-0,186	-0,167	0,378	-0,002

Los tres factores, tI, TD y td, tuvieron un efecto positivo sobre la señal de área de creatinina, tI, en mayor medida que el resto (experimentos 2, 4, 7 y 9: “E2”, “E4”, “E7” y “E9”). Es posible que este aumento se deba a una mejora en la sensibilidad del método o a la presencia de una interferencia como podría ser el caso de E9, con una recuperación de 112%. Además, el efecto combinado de tI y td tiene un mayor impacto en el área de creatinina. Los experimentos donde esto ocurre son E1, E4, E6 y E9. La incidencia de tiempo de derivatización en el aumento de la señal de creatinina puede explicarse por un aumento en la eficiencia de derivatización, produciendo una mayor proporción de 3-TMS-creatinina y aumentando su respectiva señal.

Los resultados obtenidos presentaron sesgos variables, en algunos casos aceptables (recuperación = 101%, E1, E4 y E6) o en otros, sobrecuantificaciones mayores (recuperación = 126%, E8). Dado que en todos los casos se obtuvo un sesgo positivo y recuperaciones mayores a 100%, es importante evaluar qué factor genera un efecto negativo en sesgo y recuperación. Este es el caso de tI y el efecto combinado de tI y td en mayor medida, mientras que el aumento de td y TD afectó negativamente el sesgo. Los experimentos donde el tI presenta un nivel +1 y el producto de tI x td es positivo son E1, E4 y E6. Mediante el equilibrado isotópico se busca que el analito y el estándar interno (creatinina-d₃) alcancen la equivalencia química en cuanto a su disposición en la matriz. Si esto no es alcanzado, es posible que el estándar interno se encuentre disponible en menor o mayor grado que el analito, generando una extracción diferencial de los mismos y un sesgo asociado a esto. Es por eso que, en términos generales, un mayor tiempo de equilibrado puede generar resultados menos sesgados.

En cuanto a los estudios de eficiencia de derivatización, se observó que la señal del ion 256 m/z presentó un pico con tailing excesivo en comparación con el ion 329 m/z, coherente con la presencia de un grupo amino. La señal correspondiente al producto 1-TMS-creatinina no se detectó, posiblemente porque este producto no es lo suficientemente volátil para ingresar al sistema cromatográfico.

La eficiencia de derivatización también se estudió para el estándar interno, creatinina-d₃, en este caso monitoreando los iones 332 m/z y 259 m/z. La mayor eficiencia de derivatización se alcanzó a mayores TD, en E6, E7, E8 y E9. Por otro lado, td parece no afectar significativamente la eficiencia de derivatización.

Las eficiencias de derivatización de creatinina y creatinina-d₃ no fueron iguales en todos los casos; se encontró una eficiencia de derivatización entre 8 y 46% mayor para la creatinina. Esto presenta un problema, ya que la técnica de dilución isotópica por espectrometría de masas sostiene su alto desempeño analítico en que el comportamiento químico del analito (creatinina) y del estándar interno (creatinina-d₃) es prácticamente igual. Se sospecha que la presencia de deuterio en el estándar interno desfavorece la reacción bajo algunas condiciones, por lo tanto, la eficiencia de derivatización disminuye. En vista de que la eficiencia de derivatización para creatinina es mayor que creatinina-d₃, se buscaron las condiciones de relación de ED donde la relación fuera menor y se acercara a la unidad. Esto sucede cuando t_d disminuyó (E1, E2, E6 y E7), y en menor medida cuando t_I aumentó (E2, E4, E7 y E9). El efecto favorable de la disminución de t_d en cuanto a la disminución de la relación ED y por ende del sesgo podría dar indicios de cinéticas de derivatización diferentes para creatinina y creatinina-d₃. En este caso, es posible que la formación de 3-TMS-creatinina sea más rápida que la formación de 3-TMS-creatinina-d₃ y a mayor tiempo de derivatización, mayor fue la diferencia entre el rendimiento de estos productos, induciendo un sesgo positivo. No obstante, fue posible encontrar condiciones donde la relación de ED permite un sesgo aceptable (E1, E4 y E6).

En la Tabla 5 se muestran los experimentos donde se optimizaron los factores para las diferentes variables de respuesta y la sumatoria de puntuación. Para los experimentos E2, E4, E7 y E9 se cumplieron dos condiciones de optimización para alguna de las respuestas, es decir, dos factores o combinación de factores tuvieron un efecto deseado sobre esta respuesta. Por este motivo, reciben doble puntuación en las respuestas que aplican.

TABLA 5. Resumen de experimentos de condiciones optimizadas para las diferentes variables de respuesta y su sumatoria.

Experimento	Área _{creatinina}	Sesgo	ED	Relación ED	Sumatoria
1	1	1		1	3
2	1			2	3
3					
4	2	1		1	4
6	1	1	1	1	4
7	1		1	2	4
8			1		1
9	2		1	1	4

A partir de la tabla se observa que los experimentos que sumaron mayor puntaje en cuanto a criterios cumplidos son E4, E6, E7 y E9. No obstante, E7 y E9 no cuentan con las condiciones necesarias para la disminución del sesgo, un parámetro de mayor importancia porque afecta directamente la veracidad del método. Por esta razón se descartaron. El experimento E6 presentó como ventaja sobre E4 que la eficiencia de derivatización fue mayor y, adicionalmente, que el tiempo de análisis fue menor (E6: $t_I + t_d = 50$ min vs 160 min para E4). Por lo tanto, se consideró que E6 presentó las mejores condiciones para este análisis en cuanto a veracidad y tiempo de análisis.

CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto de factores asociados a la etapa de equilibrado isotópico y derivatización sobre el método adaptado y se pudo encontrar condiciones óptimas para que los resultados presenten un sesgo adecuado al propósito (recuperación = 101%). El método adaptado tiene una mayor exactitud al implicar la preparación gravimétrica y mayor simplicidad, ya que permite el uso de un estándar interno disponible comercialmente, sin necesidad de sintetizarlo. Como ventaja adicional, este método propuesto reduce el tiempo de preparación de muestra en las etapas estudiadas a la mitad comparándolo al método de referencia (105 minutos versus 50 minutos). Una vez validado, este método adaptado podrá utilizarse para la asignación de valores de referencia trazables al sistema internacional de unidades a programas de evaluación externa de calidad y a materiales de referencia certificados. Estas herramientas de aseguramiento de la calidad serán de utilidad para los laboratorios clínicos nacionales que realizan mediciones empleando métodos de rutina.

RECONOCIMIENTOS

Al equipo del Departamento de Metrología Química del Laboratorio Tecnológico del Uruguay.

REFERENCIAS

- Burke, D. y Mackay, L., 2008. Complete equation for the measurement of organic molecules using stable isotope labeled internal standards, exact matching, and mass spectrometry. En: *Analytical Chemistry*, 80(13), pp.5071-5078.
- Cardinael, P., Casabianca, H., Peulon-Agasse, V. y Berthod, A., 2015. Sample derivatization in separation science. En: Anderson, J., Berthod, A., Pino, V. y Stalcup, A., eds. *Analytical separation science*. [s.l.]: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. pp. 1725-1756.
- Costa Ferreira, S.L., 2015. *Introdução às técnicas de planejamento de experimentos*. Salvador: Vento Leste. ISBN: 978-85-8140-067-9.

- De Bievre, P. y Peiser, H.S., 1997. Basic equations and uncertainties in isotope dilution-mass spectrometry for traceability to SI of values obtained by this primary method. En: *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 359(7-8), pp.523-525.
- Fernández-Fernández, M., González-Antuña, A., Rodríguez-González, P., Añón Álvarez, M.E., Álvarez, F.V. y García Alonso, J.I., 2014. Development of an isotope dilution GC-MS procedure for the routine determination of creatinine in complex serum samples. En: *Clinica Chimica Acta*, 431, pp.96-102.
- JCGM, 2012. *JCGM 200:2012. Vocabulario Internacional de Metrología Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM)*. [s.l.]: JCGM.
- Kessler, A., 2016. Mass spectrometry – a key technique for traceability in clinical chemistry. En: *Trends in Analytical Chemistry*, 84(B), pp.74-79.
- King, B., 2005. The practical realization of the traceability of chemical measurement standards. En: De Bièvre, P. y Günzler, H., eds. *Traceability in chemical measurements*. Berlin: Springer-Verlag. pp.85-92.
- Myers, G.L., Miller, W.G., Coresh, J., Fleming, J., Greenberg, N., Greene, T., Hostetter, T., Levey, A.S., Panteghini, M., Welch, M., Eckfeldt, J.H. y National Kidney Disease Education Program Laboratory Working Group, 2006. Recommendations for improving serum creatinine measurement: A report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program. En: *Clinical Chemistry*, 52(1), pp.5-18.
- Poole, C., 2013. Alkylsilyl derivatives for gas chromatography. En: *Journal of Chromatography A*, 1296, pp.2-14.
- Richter, W., 1997. Primary methods of measurement in chemical analysis. En: *Accreditation and Quality Assurance*, 2(8), pp.354-359.
- Siekman, L., 1985. Determination of creatinine in human serum by isotope dilution-mass spectrometry. En: *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, 23(3), pp.137-144.
- Thienpont, L., Van Uytanghe, K. y De Leenheer, A., 2002. Reference measurement systems in clinical chemistry. En: *Clinica Chimica Acta*, 323(1-2), pp.73-87.
- Thompson, M. y Ellison, S.L.R., 2005. A review of interference effects and their correction in chemical analysis with special reference to uncertainty. En: *Accreditation and Quality Assurance*, 10(3), pp.82-97.

Uso de nuevas tecnologías para obtener una producción más limpia

Use of new technologies to obtain a Cleaner production

RECIBIDO: 19/10/2018 → APROBADO: 19/12/2018 ✉ carolina.ecotech@gmail.com

👤 BARROS, CAROLINA (1); GARCÍA, IRENE (1)

(1) ÁREA MEDIO AMBIENTE, LABORATORIO ECOTECH, MONTEVIDEO, URUGUAY.

RESUMEN

En el laboratorio se realiza la determinación de diferentes iones provenientes de aguas naturales, aguas residuales y suelos. Los analitos analizados son: amonio, calcio, cloruro, magnesio, nitrato, nitrito, sulfato, entre otros. Las técnicas aplicadas para su determinación generan litros de descartes que son contaminantes para el medio ambiente y para la salud humana. Dos de los reactivos químicos más tóxicos utilizados son el Fenol, utilizado para la determinación de amonio, e Hidróxido de Amonio, utilizado para la determinación de nitratos y magnesio. La determinación de cloruros genera descartes que contienen dicromato; el sulfato genera descartes que contienen cloruro de bario. El objetivo que se plantea en el laboratorio y que se presenta en este trabajo es usar la cromatografía de intercambio iónico para reducir casi en un 100% los reactivos químicos utilizados para la determinación de los diferentes cationes y aniones, disminuir el uso de agua potable y utilizar menos de la mitad de muestra que luego se convertiría en descarte. También el uso de esta nueva tecnología permite disminuir el tiempo de análisis y brinda resultados más confiables.

PALABRAS CLAVE: cromatografía de intercambio iónico, descartes, contaminantes químicos.

ABSTRACT

The laboratory carries out the analysis of different ions from natural waters, waste-waters and soils. The ions analyzed are: ammonium, calcium, chloride, magnesium, nitrate, nitrite, sulphate, among others. The methodologies applied to determine them generate liters of discards that pollute the environment and are dangerous for human health. Two of the most dangerous pollutants are Phenol, used for the determination of ammonium, and ammonium hydroxide, used for the determination of nitrates and magnesium. The determination of chlorides produces discards that contain *potassium dichromate*; the sulfate analysis generates discards that contain

Barium chloride. The goal set in the laboratory presented in this article is to use Ion Exchange Chromatography to reduce nearly 100% the use of chemical reagents and to reduce the use of potable water. Also the use of this new technology allows to reduce the time of analysis and provides more reliable results.

KEYWORDS: ion exchange chromatography, discards.

INTRODUCCIÓN

El concepto Producción Más Limpia (PML) hace referencia a una estrategia ambiental preventiva e integrada en los procesos productivos, los productos y los servicios con el fin de reducir los riesgos relevantes a los seres humanos y el medio ambiente.

El trabajo de laboratorio produce litros de descartes que son considerados contaminantes para el medio ambiente y riesgosos para los seres humanos. Por otra parte, se genera una acumulación de sustancias peligrosas, lo que conlleva a un gran costo para su disposición final. Con el objetivo de disminuir el uso de reactivos contaminantes se comienzan a estudiar distintas tecnologías que se pueden utilizar para seguir manteniendo trazabilidad en sus resultados.

La mayoría de los descartes que se generan provienen de la determinación de cationes y aniones. Los de mayor importancia son el Fenol, el Hidróxido de amonio y el cromo VI.

El Fenol se genera en la determinación de amonio por colorimetría, donde es utilizado para el desarrollo de color. Por cada muestra analizada se generan 25 mL de Fenol; a un promedio de 30 muestras analizadas por semana se terminan generando 3 litros de descarte por mes.

El hidróxido de amonio es generado en las determinaciones de nitrato y magnesio. La técnica de nitrato consiste en una colorimetría, donde el hidróxido de amonio se utiliza para el desarrollo de color. Se consumen 10 mL por muestra y se hace un promedio de 20 muestras por semana. La determinación de magnesio se realiza por titulación, lo cual proporciona un gasto de 2 mL de hidróxido de amonio por muestra; con un promedio de 20 muestras por semana se generan 40 mL de descarte, lo que deriva en un total mensual de aproximadamente 1 litro de hidróxido de amonio residual.

El resto de los cationes y aniones generan descartes que son de menor proporción pero que son igual de contaminantes que los mencionados.

En ese contexto se comenzaron a investigar qué otras opciones existen para determinar estos mismos analitos, que comprendieran la necesidad del laboratorio de generar menos desechos y de una forma inmediata.

La cromatografía se basa en la retención selectiva, cuyo objeto es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de esos componentes. En todas las separaciones cromatográficas la muestra se desplaza en una fase móvil que puede ser un gas, un líquido, o un fluido supercrítico. Esta fase móvil se hace pasar a través de una fase estacionaria, con la cual es inmisible, y se fija a una columna o a una superficie sólida. Las dos fases se eligen de tal forma que los componentes de la muestra se distribuyen de

modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria. Aquellos componentes que son fuertemente retenidos por la fase estacionaria se desplazan lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con rapidez. La cromatografía iónica es un tipo de cromatografía líquida donde la fase móvil es un líquido y la fase estacionaria es una columna, en este caso una resina de intercambio iónico. La muestra se introduce en la parte superior de la columna y pasa a través de ella transportada por la fase móvil, que es adicionada de manera continua a flujo constante. Las sucesivas adiciones de fase móvil hacen avanzar las moléculas de soluto por la columna en una serie de continuas transferencias entre las fases móvil y estacionaria (Skoog, et al., 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizan las curvas de calibración correspondientes a cada analito a determinar utilizando los estándares adecuados. Para la validación del método se estudia linealidad de la curva de calibración, precisión entre e intralaboratorio, límites de cuantificación y detección, precisión intralaboratorio con la del método de referencia, veracidad, selectividad e incertidumbre.

Se utiliza un cromatógrafo iónico marca Thermo Scientific modelo Dionex Integrion HPIC (Figura 1). El cromatógrafo incluye los siguientes módulos: a) generador de eluyente; b) sistema de bombeo; c) compartimento para columna y guarda columna; d) detector de conductividad; e) autosampler Thermo Scientific Dionex AS-DV con capacidad para 50 muestras. Se controla el equipo a través del programa Chromeleon, que fija todos los datos correspondientes a la técnica a realizar. Las corridas se llevan a cabo ajustando las condiciones de trabajo según se analicen cationes o aniones (Tabla 1) (Trujillo, et al., 2009).

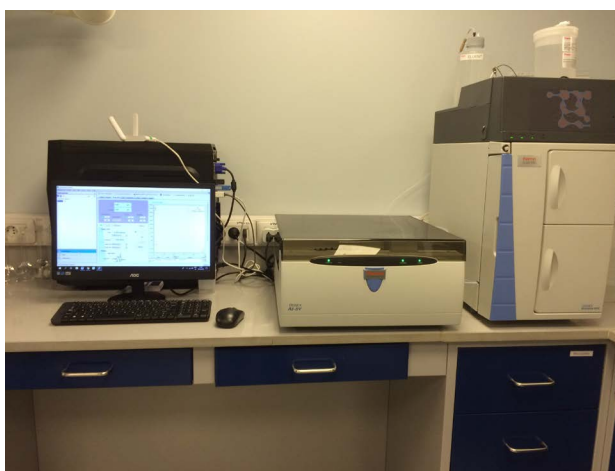


Figura 1. Cromatógrafo iónico Thermo Scientific modelo Dionex Integrion HPIC y autosampler Thermo Scientific Dionex AS-DV.

TABLA 1. Condiciones de trabajo.

	CATIONES	ANIONES
Columna y precolumna	Dionex IonPac CS16 (5x250mm) Dionex IonPac CG16 (5x50mm)	Dionex IonPac AS19 (5x250mm) Dionex IonPac AG19 (5x50mm)
Fase móvil	MSA	KOH
Flujo	0,9 mL/min	1,0 mL/min
Conc. fase móvil	30 mM	34 mM
Temperatura de columna	50 °C	30 °C
Tiempo de corrida	25 minutos	15 minutos

RESULTADOS

Se desarrollaron y validaron las metodologías para la determinación de cationes y aniones por cromatografía iónica, sustituyendo de esta forma el uso de las técnicas convencionales. En la Tabla 2 se ven los resultados obtenidos y se muestran los reactivos que se dejaron de utilizar luego de que quedara en funcionamiento el cromatógrafo. Se entiende que el uso de los reactivos disminuyó a cero.

TABLA 2. Reactivos en desuso luego de aplicar la cromatografía iónica.

	Reactivo	Consumo total anual	Unidades del reactivo	Total de muestras anuales
FOSFATO	Ácido Sulfúrico conc.	52	mL	178
	Tartrato de antimonio y potasio	0,09	g	
	Molibdato de Amonio	3,8	g	
NITRATO	Ácido Ascórbico	3,4	g	487
	HCL conc.	51	mL	
NITRATO	Fenol	191	mL	1122
	Ácido Sulfúrico conc.	1717	mL	
	Hidróxido de amonio conc.	7630	mL	
SULFATO	Cloruro de magnesio	329	g	843
	Acetato de sodio	55	g	
	Nitrato de potasio	11	g	
	Ácido Acético	219	mL	
	Cloruro de Bario	22	g	
FLUORURO	Ácido Acético conc.	238	mL	304
	Cloruro de Sodio	242	g	
	EDTA	17	g	

	Reactivo	Consumo total anual	Unidades del reactivo	Total de muestras anuales
NITRITO	Ácido Fosfórico conc.	160	mL	668
	Sulfanilamida	16	g	
	N-(naftil)- etilendiamina dihidrocloruro	2	g	
CLORURO	Cromato de potasio	52	g	755
	Nitrato de plata	5	g	
AMONIO	Fenol	4800	mL	1200
	Citrato de Sodio alcalino	2400	g	
	Hidróxido de Sodio	48	g	
CALCIO	Hidróxido de Sodio	350	mL	350
	Carbonato de Calcio			
MAGNESIO	Hidróxido de Amonio conc.	350	mL	350

CONCLUSIONES

Es posible el uso de nuevas tecnologías para obtener una producción más limpia. De esta manera se eliminan los reactivos químicos tóxicos y se logra mantener resultados confiables.

Es posible tener un laboratorio más amigable con el medio ambiente y con las personas que trabajan en él si se invierte adecuadamente en tecnología.

Como próximo desafío para el laboratorio, se plantea encontrar la forma de reutilizar el agua que genera el cromatógrafo iónico como desecho.

RECONOCIMIENTOS

Al Laboratorio Ecotech por permitirnos realizar el trabajo y desarrollarnos como profesionales.

REFERENCIAS

- Skoog, D., Haller, J. y Nieman, A., 2005. *Análisis instrumental*. 5a ed. Nueva York: Mc. Graw Hill.
- Trujillo, E., Fonseca, G., García, M. y Martínez, V., 2009. *Evaluación de la cromatografía iónica para fomentar su uso en la investigación y estudios de posgrado en ciencias del agua* [En línea]. México: Universidad Autónoma del Estado de México. [Consulta: 9 de octubre de 2018]. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-50062009000100003&lng=en&tlng=en

Página web recomendada

MVOTMA. Producción más limpia. Disponible en: <https://www.mvotma.gub.uy/ambiente/produccion-sostenible/que-es-la-produccion-mas-limpia>