



#### FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

#### UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

#### **Tesis**

para optar el grado académico de

#### LICENCIADO EN QUÍMICA

"EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE MINERALIZACIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS MULTIELEMENTAL DE GRANOS DE MAÍZ MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON PLASMA GENERADO POR MICROONDAS (MPAES)"

**AUTOR: CINA, MARIEL** 

DIRECTOR: SAVIO, MARIANELA

CO-DIRECTOR: CAMIÑA, JOSÉ MANUEL

SANTA ROSA (LA PAMPA), ARGENTINA.

2017

#### **PREFACIO**

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, bajo la dirección de la Dra. SAVIO, MARIANELA y bajo la co-dirección del Dr. CAMIÑA, JOSÉ MANUEL.

Cina, Mariel.

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

El cielo no es azul, el sol no es amarillo. Una broma puede ser una tragedia de la EMISION LUMINICA. Lo que vemos en la intersección de la antorcha y el nebulizador es algo que atravesó y cambio su estructura, su forma, su todo. Excepto su alma.

Mariel y el Capitán

#### **AGRADECIMIENTOS**

Mi mayor agradecimiento es para la Directora de esta tesis, quien me ha permitido explorar libremente el área de la investigación, su predisposición y colaboración continua produjo en mi un crecimiento muy importante, tanto en el orden personal como académico.

Al Dr. José Camiña, mi Co-Director, por su valiosa ayuda en todos los análisis estadísticos, además de la escritura del trabajo.

Agradecer a la Universidad Nacional de La Pampa, Institución que me formó para obtener el título de Licenciado en Química y me permitió conocer hermosas personas que hoy son parte de mi círculo más cercano.

Por último, no por ser las personas menos importantes, quisiera agradecer a mi familia. Mis papás, hermanos y sobrinos que me han apoyado desde los inicio y han dado todo para que pueda obtener el título. Orgullosa de todos ellos por hacer de mí lo que soy hoy.

Eternamente gracias.

#### **RESUMEN**

En el presente trabajo se desarrolló un pretratamiento de granos de maíz para la determinación multielemental por espectrometría de emisión atómica por plasma inducido por microondas (MPAES). Se comparó el método propuesto con el método convencional de digestión asistida por horno de microondas (MW).

La preparación de muestras es una etapa crítica en la secuencia analítica. Dada la complejidad de las muestras usadas, se buscó un pretratamiento eficaz, que mejore el rendimiento y la productividad del análisis. El procedimiento propuesto consistió en agregar al grano de maíz molido una solución diluida de ácido nítrico al 20 %, mantenerla a 100 °C durante 30 minutos, y someterla por el mismo tiempo a agitación ultrasónica (US). Paralelamente, las mismas muestras fueron tratadas mediante el método convencional (MW). Luego de la digestión por US y MW, se procedió a la cuantificación de 18 elementos, y los resultados, de ambas preparaciones de muestra se compararon estadísticamente. En aquellos analitos que presentaron comparación, el tratamiento propuesto se validó con un material de referencia certificado.

El método propuesto de pretratamiento, US-MPAES, disminuyó el tiempo de digestión, aumentó la cantidad de muestras mineralizadas por unidad de tiempo, lo que indica que es simple, rápido y efectivo para la digestión de granos de maíz permitiendo cuantificar Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni y Zn.

#### **SUMMARY**

In the present work, a corn grain pretreatment was developed for multielement determination by microwave-induced plasma atomic emission spectrometry (MPAES). The proposed method was compared with the conventional method of microwave assisted digestion (MW).

Sample preparation is a critical step in the analytical sequence. Due to the complexity of the sample used, an effective pretreatment improving performance and productivity of the analysis was required. The proposed procedure consisted in adding a 20% of nitric acid to the milled corn, maintaining it at 100 ° C for 30 minutes, and subjecting it to ultrasonic agitation (US) for the same time. In parallel, the same samples were treated by the conventional method. After digestion by US and MW, 18 elements were quantified, and the results of the two sample preparations were compared statistically. In the analytes that presented comparison, the proposed treatment was validated with a certified reference material.

The proposed pretreatment method, US-MPAES, decreased the time of digestion and increased the amount of mineralized samples per unit of time, indicating that it is simple, fast and effective for the digestion of corn grain, allowing Cu, Fe, Mg, Mn, Ni and Zn quantification.

#### ÍNDICE

	,		
CAl	PITI	$\mathbf{\Omega}$	1

1. IN	NTRODUCCIÓN	
1.1.	LA QUÍMICA ANALÍTICA	1
	1.1.1. Etapas del análisis químico	1
1.2.	TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS PARA LA DETERMINACIÓN	
MU	LTIELEMENTAL	6
	1.2.1. Introducción a los métodos espectrométricos	6
	1.2.2. Espectrometría de Emisión Atómica	6
	1.2.3. MPAES. Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Inducido por	
	Microondas	7
1.3.	ULTRASONIDO EN PREPARACIÓN DE MUESTRAS	9
	1.3.1. Fundamento de la técnica.	9
	1.3.2. Baño ultrasónico para preparación de muestras	9
1.4.	EL MAÍZ	10
	1.4.1. Composición química del maíz	10
1.5.	HIPÓTESIS	12
1.6.	OBJETIVOS	12
CAI	PÍTULO II	
	IATERIALES Y MÉTODOS	
2.1.	REACTIVOS	14
	2.1.1. Solución patrón de elementos minoritarios	14
	2.1.2. Solución patrón de elementos mayoritarios	14
	2.1.3. Material de referencia certificado de maíz.	14
2.2.	INSTRUMENTAL	14
	2.2.1.MPAES	14
	2.2.2. Horno microondas (MW)	15
2.3.	MUESTREO	15
2.4.	PREPARACIÓN DE MUESTRA	17
	2.4.1. Digestión por ultrasonido	17
	2.4.2. Digestión asistida por horno microondas	17
	2.4.3. Digestión del material de referencia certificado	18

2.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	18
CAPÍTULO III	
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1. OPTIMIZACIÓN INSTRUMENTAL	20
3.1.1. Presión del nebulizador	20
3.1.2. Posición de visualización.	20
3.1.3. Selección de la longitud de onda óptima	22
3.1.4. Calibración	24
3.2. DESEMPEÑO ANALÍTICO	25
3.3. PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS	26
3.3.1. Comparación del tratamiento convencional con el tratamiento propuesto	28
3.4. VALIDACIÓN ANALÍTICA MEDIANTE MRC	31
3.5. APLICACIÓN ANALÍTICA: COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE MUESTRAS DE MAÍZ.	33
CAPÍTULO IV	
4. CONCLUSIÓN	36
REFERENCIAS	37

# CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN

#### 1.1. LA QUÍMICA ANALÍTICA

La finalidad de la química analítica es proporcionar los medios para la determinación de una o más especies químicas -moléculas, átomos, iones- en diferentes materiales. En principio, la química analítica debe dilucidar un problema que podrá ser solucionado analizando una o más muestras por un método apropiado. El análisis directo, sin cualquier tratamiento, in situ, es en principio ideal para los analistas, pues la determinación de la especie de interés -analitos- puede realizarse en el lugar de muestreo, y la secuencia analítica quedará restringida a unas pocas etapas, tornándose más simple. Sin embargo, aún son pocos los equipamientos con desempeño apropiado para la determinación a campo de especies químicas de interés en diferentes tipos de muestra. Así, como no siempre es posible analizar las muestras in situ, se debe elegir un procedimiento de muestreo y almacenamiento apropiado de las muestras, para la determinación de los analitos de interés en el laboratorio. Para su análisis, la muestra debe ser sometida a tratamientos preliminares -secado, molienda, digestión, etc.-, para que la introducción de la muestra sea compatible con la técnica instrumental utilizada. De esta manera, una muestra en estado sólido deberá ser transformada en solución, ya que gran parte de los métodos analíticos de determinación, sólo admiten la introducción de soluciones líquidas [1].

La manera de mineralizar o descomponer la muestra para el análisis depende de su naturaleza, del analito y de su concentración, del método de determinación y de la precisión y exactitud deseada. En algunos casos la relación masa de muestra / volumen de solución debe ser flexible para que la dilución de la muestra sea compatible con el límite de detección del método.

#### 1.1.1. Etapas del análisis químico

Antes de proceder al estudio detallado sobre el pretratamiento de muestras, es conveniente conocer las etapas que un analista deberá considerar para la realización de los análisis. Siguiendo la guía de CITAC/EURACHEM [2] un análisis, es una investigación compleja que puede ser resumida en una serie de etapas que comienza con una cuestión a resolver y finaliza con los resultados analíticos (Figura 1) [3].

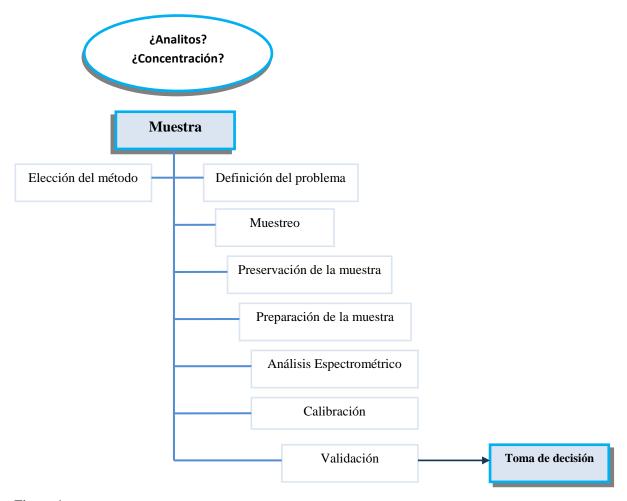


Figura 1. Secuencia analítica. Pasos a seguir en un análisis cuantitativo típico.

#### a) Definición del problema

Este debe ser el primer paso en el planeamiento de un análisis, debe responder una cuestión: ¿cuál es la información analítica deseada?. La definición del problema establece los objetivos cualitativos, cuantitativos y/o estructurales, o temporales, de la secuencia analítica.

#### b) Elección del método

El método de análisis para la determinación de las especies químicas debe ser eficiente, y siempre que sea posible, simple y rápido. El método seleccionado deberá ser capaz de detectar y cuantificar adecuadamente el/los analitos de interés, así como ser debidamente validado. Asimismo, es recomendable considerar las restricciones de tiempo, costo, incertidumbre de los resultados, como la evaluación de la trazabilidad, supervisión y control de calidad.

Queda implícito que los métodos de preparación de muestra y de determinación seleccionados deben ser compatibles. Así, es imprescindible que el método de determinación sea escogido *a priori*, para que se pueda definir la estrategia más apropiada

para la obtención de los resultados analíticos que permitan la solución del problema. Con base a esta elección, se define el método de muestreo y cómo la muestra tiene que ser pretratada antes de proceder a la determinación de los analitos.

#### c) Muestreo

Mediante muestreo probabilístico -donde cada muestra tiene la misma probabilidad de ser elegida en el lote- se selecciona una cantidad determinada de muestra, que sea representativa de la población, para establecer el análisis correspondiente e inferir en base a ella. Idealmente, la muestra debería contener exactamente la misma composición de la población, pero en la práctica esto nunca sucede, y las discrepancias surgen como consecuencia de las incertezas en el muestreo y de la variabilidad intrínseca propia de las muestras.

Los métodos y la instrumentación analítica moderna requieren el uso de pequeñas porciones de muestra -masa o volumen- para la determinación de bajas concentraciones. Por otra parte, a medida que la concentración del analito disminuye, la incertidumbre asociada a su determinación aumenta exponencialmente, generando la variación conocida como ecuación o "trompeta" de Horwitz, debido al gráfico que describe [4, 5].

Las muestras pueden experimentar una variedad de cambios químicos y físicos, pérdida de componentes, contaminación externa, reacciones con componentes atmosféricos, etc., durante la recolección, transporte, almacenamiento y preparación para el análisis. Los errores debidos a estas fuentes se pueden minimizar aplicando adecuados protocolos para la toma y conservación de la muestra, a fin de evitar interacciones con el medio. Es por este motivo que, por ejemplo, se utilizan contenedores para proteger la muestra de las interacciones con sus alrededores durante el transporte y almacenamiento.

Se ha demostrado que para la mayoría de los elementos traza, los contenedores de Teflón®, o polietileno lineal introducen menos contaminación que el vidrio, pero deben ser limpiados cuidadosamente con  $HCl_{(ac)}$  y  $HNO_3$  antes del uso; al igual que el agua de enjuague, deberán ser de alta pureza y calidad [1, 3].

Si la muestra no es representativa de la población de la cual proviene, no será posible relacionar el resultado analítico con la composición del material original, independientemente de la calidad del método y de todos los cuidados para la determinación del analito. Por ello, por más que se aplique un procedimiento analítico válido y por más cuidadoso que sea su empleo, un problema analítico solo será resuelto si las muestras fueron correctamente tomadas y conservadas, adhiriendo estrictamente a un protocolo y diseño de muestreo preestablecidos.

#### d) Pretratamiento de la muestra

En una investigación destacada por el *Analytical Methods Committee* de la *Royal Society of Chemistry* [6], se indicó que la principal causa de resultados inadecuados se encuentra en la preparación de muestra, considerando un muestreo adecuado. La preparación de muestras es una de las etapas más importantes y decisivas en el procedimiento analítico, y más aun en el contexto del análisis de elementos traza, ya que en esta etapa es donde se comenten más errores y donde se gasta más tiempo y dinero [7-10]. Además, es posible que aumenten los errores tanto aleatorios –precisión- como sistemáticos –veracidad- a medida que crece el número de etapas y reactivos empleados; así como también puede disminuir la capacidad de detección de las posteriores determinaciones. Tal como se mencionó anteriormente, estos tipos de errores aumentarán en la medida que disminuyan las concentraciones de analitos a determinar. De esta manera, el proceso analítico obliga a identificar y llevar a su mínima expresión cada una de las fuentes de error en el análisis [4, 11-13].

De todos modos, es necesario tener certeza que la señal analítica obtenida en la etapa de medición, es debida solamente al analito y no a la presencia de otras especies químicamente similares –interferentes-. La posibilidad de que exista una interferencia dependerá de la eficiencia del método de separación y de la selectividad / especificidad de la etapa de medición. La selectividad y especificidad son los parámetros de desempeño que avalan la confiabilidad de los resultados de las mediciones. Por lo expuesto, es de suma importancia recurrir a métodos donde se simplifique el tratamiento de muestras para su posterior análisis elemental, procurando alcanzar con ello la máxima selectividad y especificidad.

#### e) Medición: análisis espectroquímico

Se trata de la obtención de datos analíticos —espectros- a partir de una muestra pretratada. El resultado analítico es el valor final de concentración encontrada en la muestra. En general, es obtenido a partir de un medidor de lectura -transductor o detectorque proporciona una medida de una cantidad física, como por ejemplo intensidad de emisión que contiene información sobre la concentración del analito.

#### f) Calibración

La manera convencional para realizar una calibración en un análisis químico es a través de la medida de cantidades conocidas de analitos mediante un método instrumental y monitorear las lecturas obtenidas. En la secuencia analítica, la calibración se refiere a la

obtención de datos analíticos a partir de patrones de concentración conocida preparados adecuadamente. A partir de estos se construye un modelo de calibración, cuya representación más frecuente corresponde a una recta en la cual se conocen los parámetros que la representan, como la pendiente, la ordenada al origen, el coeficiente de correlación al cuadrado, etc.

#### g) Validación

La validación permite garantizar y confirmar la calidad de los resultados. Es la interpretación y comparación de los resultados obtenidos a partir de la operaciones realizadas en el ítem 1.1.1., apartados e y f, utilizando un material de referencia certificado (MRC). Así el proceso de validación establecerá que analitos podrán ser determinados, especificándose la matriz o las matrices, y los riesgos de interferencias; y será posible prever los niveles de precisión y exactitud alcanzados. Otra forma posible de validación, en caso de no contar con un MRC adecuado, es a través de la comparación estadística entre el método propuesto y otro de referencia establecido, a fin de hallar la existencia o no de errores sistemáticos en el método.

#### h) Predicción

El modelo de calibración, una vez validado correctamente, podrá ser utilizado para cuantificar la concentración del analito en muestras desconocidas. Basándose en los resultados obtenidos, la última etapa corresponderá a la toma decisión, donde se responderá el problema analítico planteado inicialmente.

#### i) Toma de decisiones

El resultado analítico, concentración de los analitos de interés, será usado para tomar una decisión con respecto al problema original. En ese sentido, es importante que el analista sea capaz de traducir los resultados generados durante el análisis de muestra usando un método validado, en respuestas que estén relacionadas con el problema analítico. Las características del desempeño del método establecidas durante el proceso de validación, contribuyen para que la toma de decisión sea hecha con seguridad. La repetitividad y reproducibilidad pueden ser usadas para establecer si las diferencias de los resultados son significativos o no. Los controles de calidad, basados en los datos de validación, pueden ser usados para confirmar si el método está produciendo resultados confiables. La estimación de las incertezas de las medidas, en concordancia con el desempeño del método, permite la expresión del resultado dentro de un rango de valores -

intervalos de confianza- en el cual el valor más probable, valor considerado verdadero, puede ser aceptado con un determinado nivel de confianza, por ejemplo, al 95%.

### 1.2. TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS PARA LA DETERMINACIÓN MULTIELEMENTAL

#### 1.2.1. Introducción a los métodos espectrométricos

La espectroscopía constituye la base del análisis espectroquímico, donde la interacción de la radiación electromagnética con la materia es utilizada para obtener información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición de una muestra [13-14]. La espectroscopía estudia la absorción, emisión y fluorescencia de la radiación por especies atómicas, iónicas y/o moleculares libres. Estas especies son generadas y examinadas en un medio gaseoso de alta energía, que constituye una fuente de vaporización-atomización-ionización-excitación.

La espectroscopia atómica implica la interacción entre la radiación electromagnética con átomos al estado gaseoso, ya sea, absorción, emisión o fluorescencia atómica. Estos fenómenos están asociados con cambios en los estados de energía de las diferentes especies. Por consiguiente, dado que cada especie posee estados energéticos característicos, la espectroscopía puede utilizarse para identificar y cuantificar la composición elemental de la muestra a analizar [4].

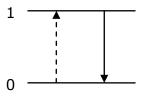
En los últimos cincuenta años, los métodos espectroscópicos han evolucionado junto con el avance tecnológico, lo que ha permitido un gran salto en la química analítica, alcanzando límites de detección de µg a pg en cuestiones de décimas de segundos.

#### 1.2.2. Espectrometría de Emisión Atómica

A modo de introducción a este fenómeno, se puede considerar un átomo con tan sólo dos estados electrónicos de energía, en el cual el estado de energía fundamental es designado con 0 y el estado excitado con 1. Puede asumirse también que, bajo condiciones normales, la mayoría de los átomos se encuentran en el estado fundamental.

El fundamento de la *Espectroscopia de Emisión Atómica* (AES) se puede explicar cuando a un átomo que se encuentra en su estado de menor energía, denominado estado fundamental, se le transfiere energía calórica del atomizador -plasma o llama-, suministrando energía suficiente para promover uno de los electrones ubicado en un orbital externo, a un estado electrónico de mayor energía, estado excitado. Al retornar al estado fundamental, este emite el exceso de energía bajo la forma de fotón -radiación característica-. La energía del fotón será igual a la diferencia de energía entre los estados

fundamental y excitado: este proceso es conocido como transición electrónica (Figura 2) [14].



$$\mathbf{M}^{o}_{(g)}$$
 + Energía térmica  $\longrightarrow$   $\mathbf{M}^{*}_{(g)}$   $\longrightarrow$   $\mathbf{M}^{o}_{(g)}$  +  $hv$ 

**Figura 2.** Fundamento AES. Las transiciones radiactivas se muestran en líneas llenas, y las transiciones no radiantes, en líneas punteadas.  $M^{o}_{(g)}$  y  $M^{*}_{(g)}$  representan al átomo en estado fundamental y excitado, respectivamente.

Los espectros atómicos están caracterizados por su relativa simplicidad, ya que típicamente consisten en líneas estrechas, las cuales corresponden a un número limitado de posibles niveles de energía. Cada elemento posee una única configuración de niveles de energía, y consecuentemente, un único espectro.

### 1.2.3. MPAES. Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Inducido por Microondas

La espectrometría de emisión atómica suele llamarse a menudo espectrometría de emisión óptica, debido a la naturaleza de la luz que se emite. Es por eso que suelen utilizarse indistintamente los términos AES (espectrometría de emisión atómica) y OES (espectrometría de emisión óptica). El plasma de acoplamiento inductivo (ICP), ya sea de inducción por radiofrecuencia o de inducción por microondas (siglas comúnmente utilizadas MIP o MP) es la fuente de atomización, que junto a un espectrofotómetro de emisión atómica u óptico (AES/OES) constituye el equipo de MPAES u ICPOES.

Mediante MPAES es posible determinar de forma cuantitativa la mayoría de los elementos de la tabla periódica a niveles trazas partiendo de muestras en disolución acuosa.

El proceso de emisión en el MPAES, se ilustra en la Figura 3. En forma más detallada se puede decir que la muestra, en forma líquida, es transportada por medio de una bomba peristáltica hasta el sistema nebulizador donde es convertida en aerosol por la acción del gas nitrógeno, por efecto Venturi [4, 15]. Dicho aerosol es conducido a la zona de atomización. Esta zona consiste en un plasma, que es generado al someter un flujo de gas nitrógeno, y pequeñas cantidades de argón, introducidos tangencialmente a través de la antorcha, a una zona donde se aplican microondas, y se genera un campo magnético oscilante. Una chispa produce algunos electrones libres en el argón, que son acelerados en

el campo magnético, causando una mayor ionización y formación del plasma, haciendo que el plasma sea autosostenido sólo con nitrógeno una vez que es generado. El flujo de gas que transporta la muestra genera una abertura en el plasma [4, 13-16].

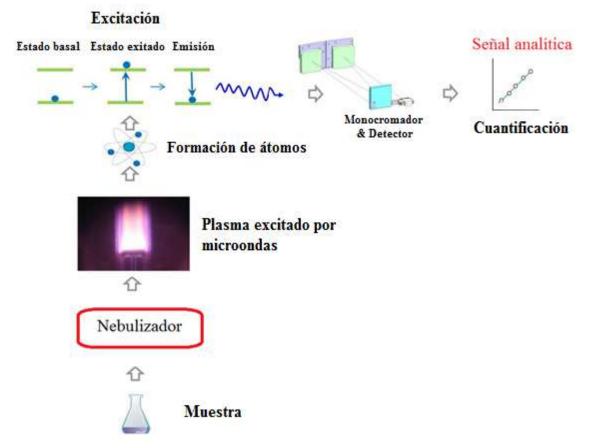


Figura 3. Proceso de emisión en el MPAES [15].

El plasma de nitrógeno produce una temperatura considerablemente mayor que una llama de aire-acetileno, pudiendo alcanzar temperaturas hasta 5000 K, pero es menor a la temperatura producida por un plasma de argón, de 10000 K. En estas condiciones la muestra es convertida en átomos al estado gaseoso que son excitados por consecuencia de las temperaturas que alcanza el plasma. Cada átomo de la muestra excitado por el plasma vuelve al estado fundamental, emitiendo radiaciones a una longitud de onda que es característica de cada elemento. Esta radiación pasa a través de un sistema óptico que separa la radiación según su longitud onda. A continuación un detector mide la intensidad de cada una de las radiaciones relacionando ésta con la concentración de cada elemento en la muestra. La información es procesada por el sistema informático [14-16].

La espectrometría de emisión atómica se ha convertido en los últimos años en la metodología analítica de mayor interés, debido a su poder de detección, precisión, sensibilidad, velocidad, y capacidad de análisis multielemental. Además se puede resaltar los bajos costos de operación, ya que el MPAES posee un generador de nitrógeno, que

utiliza el aire atmosférico para proporcionar un suministro de nitrógeno continuo que permite el funcionamiento del plasma.

#### 1.3. ULTRASONIDO EN PREPARACIÓN DE MUESTRAS

#### 1.3.1. Fundamento de la técnica

Como todos los sonidos, los ultrasonidos se propagan a través de una serie de ondas de compresión y expansión que viajan a través de un medio. Los ciclos de compresión juntan las moléculas del medio mientras que los ciclos de expansión las separan. En un medio líquido, el ciclo de expansión de los ultrasonidos puede generar suficiente presión negativa cómo para romper las fuerzas de cohesión de las moléculas del líquido, separándolas localmente, creando allí una verdadera microcavidad o burbuja. Estas burbujas van creciendo en unos cuántos ciclos, desde una medida inferior al micrómetro hasta unas decenas de micrómetros, atrapando vapores y gases del medio (Figura 4). Esta implosión de la cavidad crea un entorno inusual para las reacciones químicas. La rápida compresión de los gases y vapores dentro de la burbuja genera temperaturas y presiones enormes, de hasta 5000 °C y 1000 atm, respectivamente. Dado que las burbujas son muy pequeñas en comparación con el volumen del líquido que hay alrededor, el calor generado se disipa muy rápidamente, > 1010 °C s<sup>-1</sup>, con lo cual las condiciones ambientales se mantienen inalteradas. Esta combinación de altas temperaturas, altas presiones y rápido enfriamiento genera unas condiciones difícilmente alcanzables con otras técnicas [1].

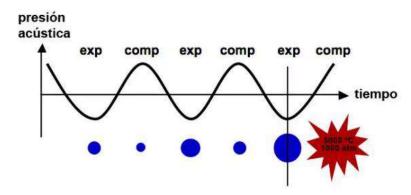


Figura 4. Ciclos de expansión/compresión de una burbuja producida, en el seno del líquido, por ultrasonido.

#### 1.3.2. Baño ultrasónico para la preparación de muestras

El baño ultrasónico es la fuente más ampliamente disponible, comúnmente utilizada y más económica para introducir ultrasonidos en una reacción. Posee un transductor - componente electromecánico encargado de generar el ultrasonido- que está fijo en la base de un baño lleno de agua. Los baños de ultrasonidos trabajan con frecuencias entre 30 y 50 kHz [1].

El uso de ultrasonido es una tendencia creciente en áreas científicas, como también medicina e industrias. En los últimos años, la utilización de ultrasonido, ha tenido un mayor impacto en la química analítica, contemplando los usos más básicos como limpieza de material, hasta su empleo en la participación de preparación de muestra. Estos dispositivos han sido capaces de ayudar a perfeccionar, acelerar o automatizar la preparación de muestra, como así también, mejorar la detección de los analitos [17].

En preparación de muestra, los baños ultrasónicos implican la inmersión de una batería de tubos tipo Falcon, que contienen la muestra con la mezcla de reactivos; aplicando una distribución uniforme de energía ultrasónica en el medio de reacción que permite la digestión de la muestra.

#### **1.4. EL MAÍZ**

El consumo de maíz (*Zea mays L.*) viene incrementándose aceleradamente debido a los nuevos mercados, como también al constante aumento de la población mundial [18]. Este cultivo se destaca como uno de los más importantes en el mundo, ocupando un lugar prioritario en el desarrollo de casi todos los países. Es un insumo clave para una gran cantidad de industrias que abarcan desde la alimentación humana y el forraje -para las producciones de carnes o leche - hasta su procesamiento industrial en plantas de alta complejidad cuyo producto final puede ser un alimento, un combustible o una materia prima para elaborar productos químicos, como los biomateriales [19].

#### 1.4.1. Composición química del maíz

Los granos de maíz están constituidos principalmente de tres partes: la cascarilla, el endospermo y el germen. La cascarilla o pericarpio es la cubierta externa del grano, que sirve como elemento protector. El germen contiene una pequeña planta en miniatura, además de grandes cantidades de energía en forma de aceite, que tiene la función de nutrir a la planta cuando comienza el período de crecimiento, así como otras muchas sustancias necesarias durante el proceso de germinación y desarrollo. El endospermo es la reserva energética del grano y ocupa hasta el 80 % del peso del grano: contiene aproximadamente 90 % de almidón y 9 % de proteína, además de pequeñas cantidades de aceites, minerales y elementos traza [18, 20].

Las necesidades nutricionales de las plantas se engloban dentro de dos grandes grupos. En primer lugar un 90-95% corresponde a los nutrientes orgánicos, conformados por compuestos de carbono, oxígeno e hidrógeno; y los componentes minerales, que representan entre el 5-10 % restante [20]. Las plantas absorben, por medio del sistema

radicular, los nutrientes de la solución del suelo, trasladándose hacia el tallo hasta llegar a los tejidos de almacenamiento -hojas, frutos, granos- donde se pueden bioacumular [21, 22].

Dentro de los requerimientos nutricionales minerales, algunos elementos resultan esenciales para el normal crecimiento y desarrollo de la planta, como B, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, S, Se y Zn; en particular Fe, Zn, Mg y Cu son indispensables para el correcto funcionamiento de diversas enzimas y proteínas. Por otra parte, hay otros no esenciales, tales como Al, As, Cd, Cr, Hg, Na, Pb, y Tl, que pueden ser potencialmente tóxicos si sobrepasan el límite de tolerancia basal [21-23]. La determinación nutricional del grano de maíz es un indicador y predictor de la calidad del cultivo en relación con la salud humana y animal [20, 24], por ello resulta relevante evaluar el contenido elemental de los cultivos de maíz.

Por los bajos niveles de concentración en que se encuentran generalmente los distintos analitos es necesario contar con técnicas modernas, sensibles y selectivas, como MPAES. Los granos de maíz presentan una matriz compleja, debido a su alto contenido en almidón, grasa, lignina, etc., y por este motivo es necesario desarrollar un procedimiento adecuado de pretratamiento de muestra, para su introducción en el MPAES.

Las muestras de origen orgánico son un desafío para los sistemas de introducción de muestras, ya que generan varios inconvenientes, como: inestabilidad en el plasma, deposición de materia orgánica, interferencias, entre otros. Generalmente se requiere una solubilización completa de la muestra, seguida de una dilución para poder ser introducida al MPAES. Sin embargo, la mineralización de la muestra puede llegar a ser un trabajo tedioso y arduo, que puede causar pérdidas de muestra (y consecuentemente de los analitos) así como contaminación [7-10, 25, 26].

Existen pocos antecedentes en el pretratamiento de muestras de grano de maíz, que sea diferente al tratamiento convencional por horno microondas [25-29]. Por eso, en este trabajo, se intenta hallar un método simple de mineralización de grano de maíz, para determinar el contenido elemental por MPAES.

#### 1.5. HIPÓTESIS

• El método de pretratamiento de muestras de grano de maíz propuesto en la presente tesis, digestión asistida por ultrasonido (US), será tan efectivo como el tratamiento convencional por horno microondas, para la determinación multielemental por MPAES.

#### 1.6. OBJETIVO

• Evaluar un procedimiento analítico de pretratamiento de muestra de granos de maíz, más simple y rápido que la digestión convencional por horno microondas, para su posterior determinación multielemental en MPAES.

### CAPÍTULO II

# MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. REACTIVOS

#### 2.1.1. Solución patrón de elementos minoritarios

Se utilizó un patrón multielemental SCP SCIENCE Plasma CAL. Matriz 5 % ácido nítrico, que contiene 100 mg L<sup>-1</sup> de: Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Th, Tl, U, V y Zn. A partir de este patrón, se obtuvieron las rectas de calibración de los elementos, que se hallan en bajas concentraciones, minoritarios, abarcando un intervalo de concentraciones de 0,25 mg L<sup>-1</sup> a 1 mg L<sup>-1</sup>. A modo de ejemplo, esta última concentración, se preparó tomando 0,1 mL de la solución estándar certificada, adicionando 0,1 mL de HNO<sub>3</sub> para simular la matriz ácida de digestión y llevando a un volumen final de 10 mL. Para las concentraciones intermedias, 0,25 mg L<sup>-1</sup>, 0,5 mg L<sup>-1</sup> y 0,75 mg L<sup>-1</sup>, se realizaron los mismos pasos de preparación que para 1 mg L<sup>-1</sup>, con los respectivos volúmenes de solución patrón. Se preparó una solución blanco para cada recta.

Para la preparación de todas las soluciones, se utilizó agua destilada, purificada mediante un ultrapurificador de agua Millipore® modelo ultrapure System (Mili-Q), con resistividad de 18,2 M $\Omega$  cm, a 25° C.

#### 2.1.2. Solución patrón de elementos mayoritarios

Se utilizaron patrones monoelementales SCP SCIENCE Plasma CAL de 1000 mg L<sup>-1</sup> para Ca, Fe, y Mg. A partir de estos se construyó una recta de calibrado para los elementos mayoritarios, del mismo modo que para los elementos minoritarios, donde se eligió un rango de concentración desde 0,1 mg L<sup>-1</sup> a 0,4 mg L<sup>-1</sup>. Se evaluaron soluciones blanco para cada elemento.

#### 2.1.3. Material de referencia certificado de maíz

Se utilizó para la validación de la digestión propuesta el material de referencia certificado NCS ZC73012 Mealie, al cual se le realizó el mismo tratamiento que las muestras (Sección 2.4).

#### 2.2. INSTRUMENTAL

#### **2.2.1 MPAES**

Las mediciones se realizaron con un Espectrómetro de Emisión Atómica marca Agilent, modelo MP 4100, equipado con un autosampler Agilent modelo SPS3, nebulizador One Neb y una cámara de *spray* de doble paso.

Con el patrón de calibración de máxima concentración, 1 mg L<sup>-1</sup> para los elementos minoritarios y 0,4 mg L<sup>-1</sup> para los mayoritarios, se optimizó los parámetros instrumentales

del MPAES, la alineación de la antorcha, posición de visualización, y la presión de nebulización para todos los elementos.

Los parámetros instrumentales seleccionados se muestran en la Tabla 1. Se establecieron 13 segundos de toma de muestra, 15 segundos de estabilización antes de la lectura, y 5 segundos de tiempo de lectura para la medición de las emisiones de cada analito.

Tabla 1. Parámetros instrumentales utilizados en la determinación multielemental por MPAES.

Tiempo de toma de muestra (seg)	13
Tiempo de lavado (seg)	20
Tiempo estabilización (seg)	15
Velocidad de bombeo (rpm)	15

#### 2.2.2. Horno Microondas (MW)

Para la digestión de las muestras se utilizó un equipo de digestión asistida por microondas MILESTONE, modelo START-D, utilizando el programa de temperatura que se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Rampa de calentamiento en digestor MW.

Etapa	Tiempo (min)	Temperatura (°C) <sup>a</sup>
1.Rampa	15	190
2.Mantenimiento	15	190
3.Rampa	30	0
Tiempo Total (min)	60	

<sup>a</sup>Umbral de potencia aplicada : 1200W

#### 2.3 MUESTREO

Las muestras se recolectaron en 14 sitios de La Pampa con el propósito de abarcar la amplia superficie cultivada de la Provincia (Figura 5).

El muestreo se llevó a cabo durante los meses de septiembre de 2014 a marzo de 2015, que coincide con el periodo de cosecha del cultivo. Se recolectaron un total de 86 muestras, en parcelas controladas pertenecientes al Instituto Nacional de Tecnología Aropecuaria (INTA), a la Facultad de Agronomía de la UNLPam y a establecimientos agropecuarios privados de la provincia de La Pampa. En la Tabla 3 se observan los sitios de muestreo ordenados en forma creciente por la relación entre su precipitación media anual y su temperatura media anual.

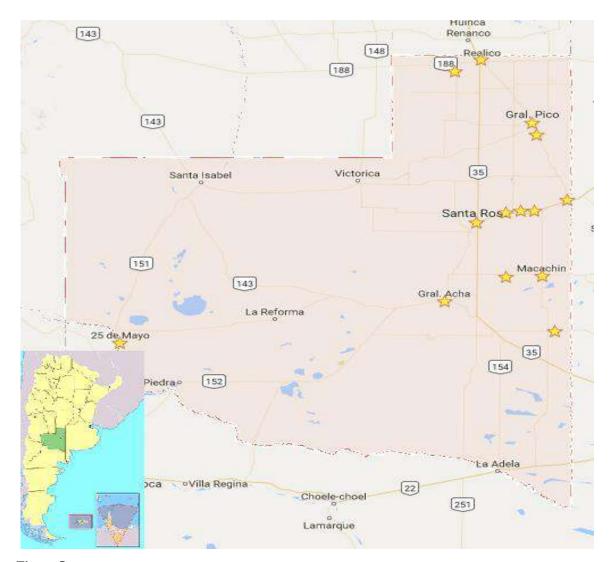


Figura 5. Sitios de muestreo de maíz en la provincia de La Pampa.

Tabla 3. Número de muestras de granos de maíz en su correspondiente sitio de muestreo.

Sitios de muestreo	N° de Muestras
25 de Mayo*	2
La Gloria***	6
Parera***	2
Colonia Santa María***	1
Macachín*	6
Guatrache*	5
Realicó ***	3
Doríla <sup>*</sup>	4
Santa Rosa**	4
Uriburu***	2
Catrilo***	4
General Pico*	3
Anguil*,***	40
General Acha*	4
N° total de muetras	86

<sup>\*</sup> Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

<sup>\*\*</sup>Facultad de Agronomía – UNLPam.

<sup>\*\*\*</sup> Establecimientos agropecuarios privados.

Una vez recolectadas las muestras de maíz, se secaron en estufa a 60 °C, se separaron las diferentes partes del cultivo -tallo, hojas, marlo, grano, espiga, raíz- y suelo, y se las almacenaron en bolsas de polietileno.

Para el análisis de los granos de maíz, se tomaron las muestras acopiadas y se sometieron a molienda. Para esto, se utilizó un Molinillo TDMC, potencia 190 Watt, durante 3 minutos a 22000 rpm y luego se almacenó en frascos de polietileno.

En todos los casos, tanto para la manipulación, almacenamiento y tratamiento de las muestras, se empleó material de plástico para prevenir la contaminación por metales. El material de plástico que se utilizó, se lavó previamente con una solución de acido nítrico al 5 % (v / v), y posteriormente se lavó con agua Milli-Q.

#### 2.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Previo a la mineralización del grano de maíz, las fracciones molidas se secaron en estufa durante 24 h y luego se pesó con exactitud 0,5 g en balanza analítica.

Para digerir las muestras se utilizó ácido nítrico, el cual se trató en un destilador de ácidos minerales con sistema *sub-boiling* marca Berghoff®, para obtener ácido ultra puro, libre de metales.

#### 2.4.1. Digestión por ultrasonido

La porción pesada de muestra, como se indica en el apartado 2.4, se colocó en un tubo de polietileno de 50 mL tipo Falcon, se le agregó 5 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado destilado y se llevó a baño María, bajo campana de extracción, durante 30 minutos a una temperatura de 100 °C. Posteriormente se sometió a un agitador ultrasónico modelo TBO4, el mismo periodo de tiempo que duró el calentamiento. Una vez finalizada la digestión ácida, la muestra se enfrió y se llevó a un volumen final de 30 mL con agua Milli-Q.

#### 2.4.2. Digestión asistida por horno microondas

Las muestras tratadas como se menciona en el apartado 2.4 se transfirieron a los vasos de 100 mL de politetrafluoroetileno (PTFE), pertenecientes al horno microondas. Se agregaron 6 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado purificado mediante destilación *suboiling*, junto con 2 mL de agua. Luego se llevaron al digestor de microondas donde se aplicó el programa de temperaturas que se detalla en la Tabla 1.

Una vez finalizado el programa, se transvasó a un tubo tipo Falcon de 50 mL y se enrasó a 30 mL con agua ultrapura.

#### 2.4.3. Digestión del Material de Referencia Certificado

Alícuotas de 0,5 g de MRC se sometieron a digestión asistida por ultrasonido y microondas siguiendo los procedimientos detallados en 2.4.2 y 2.4.3.

#### 2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los cálculos y test estadísticos se realizaron a través de Microsoft Office Excel 2007. Los datos de las muestras se analizaron por un test *t* para medias de dos muestras emparejadas, con un 95 % de nivel de confianza.

### CAPÍTULO III

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. OPTIMIZACIÓN INSTRUMENTAL

Se identificaron las variables instrumentales del MPAES, cuya fluctuación podría tener un efecto sobre la intensidad analítica; entre ellas se optimizaron: presión de nebulización, y posición de visualización. Se procedió a la realización de múltiples mediciones de la intensidad de señal de los analitos respecto a la fluctuación de cada una de estas variables de manera individual. Para ello, se mantuvieron constantes las variables del tiempo de toma de muestra, lavado y estabilización del plasma, y la velocidad de bombeo a la que ingresa la muestra, indicadas en la Tabla 1, de la sección 2.2.

#### 3.1.1. Presión del nebulizador

En la Figura 6 se representa la proporción de la señal analítica y la señal del ruido que la corrompe - relación señal/ruido- en función de un aumento la presión del gas en el nebulizador. Se observa que la mayoría de los elementos presentan la mejor intensidad de señal analítica, a una presión del nebulizador entre 180 y 240 kPa.

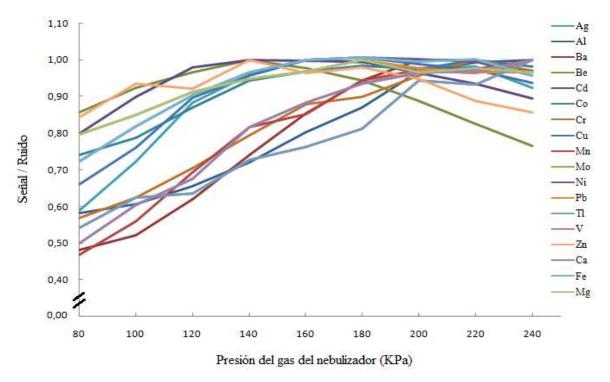


Figura 6. Cambios en la relación Señal/Ruido en función de la presión del gas del nebulizador.

#### 3.1.2. Posición de visualización

El plasma inducido por microondas tiene una visión axial para una óptima sensibilidad y mejores límites de detección. Sin embargo, la antorcha está orientada verticalmente (de forma radial) para mejorar la manipulación de la matriz [15, 16].

Se representa en la Figura 7 el diagrama óptico interno que contiene el MPAES. Se puede observar cómo variando los grados de la posición de visualización de la antorcha variaría la intensidad de la señal detectada en función de la relación señal/ruido, para obtener así, la óptima señal analítica de los elementos estudiados.

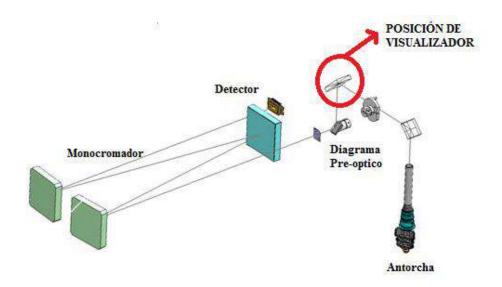


Figura 7. Diagrama óptico interno del MPAES.

Se evaluó la posición de visualización del plasma para cada longitud de onda seleccionada de los elementos estudiados. Como se muestra en la Figura 8, los analitos tuvieron el máximo de intensidad analítica entre -10 y 0 grados de posición de visualización.

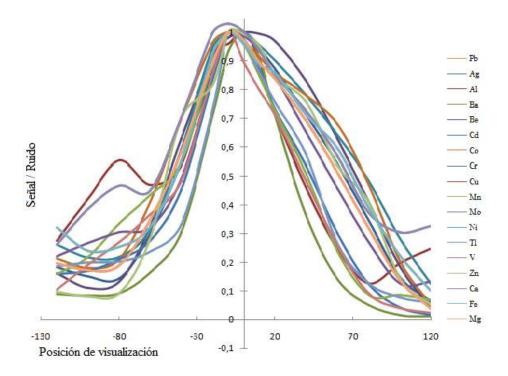


Figura 8. Señal/ruido en función de posición de visualización de la antorcha del MPAES.

#### 3.1.3. Selección de la longitud de onda óptima

Con el fin de aumentar la sensibilidad y lograr una buena selectividad en la determinación, se evaluaron las longitudes de onda a ser utilizadas en el análisis final de cada analito.

En esta sección, se utilizará el Zn, a modo de ejemplo, para demostrar la elección de la óptima longitud de onda.

El software Agilent MP Expert contiene una amplia biblioteca de espectros, donde recomienda utilizar para el análisis aquella longitud de onda que posea la mayor intensidad de señal analítica, como puede observarse en la Figura 9 [15].

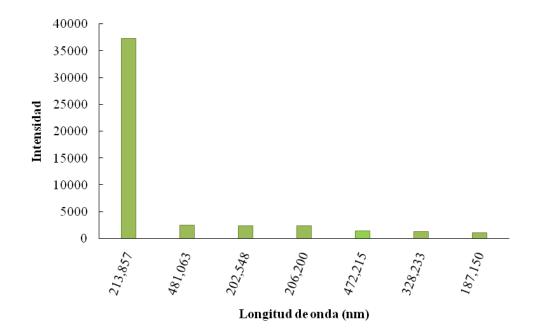


Figura 9. Intensidad de señal analítica a diferentes longitudes de onda para el Zn.

Además, el software resalta las interferencias que tiene el elemento a determinar, a medida que se seleccionan las longitudes de onda de los demás elementos involucrados en el análisis.

En la Figura 10 se muestran las posibles interferencias del Zn a diferentes longitudes de onda, 213,857 nm y 481,053 nm. Estas poseen las señales más elevadas dentro de la biblioteca de longitudes de onda para el Zn.

Si bien a 213,857 nm la intensidad analítica es 15 veces mayor que a 481,053 nm, aparecen interferentes con longitud de onda cercanas que están involucrados en nuestro análisis multielemental, como Fe y V; otros que también pueden estar presentes en la muestra, como el P, que en este trabajo no es determinado; y un tercer grupo, cuyas probabilidades

de ser encontrados en este tipo de muestras son bajas, como es el caso de Os, Re y Ta (Figura 9.a.) [15, 16]. Por el contrario, a 481,053 nm, se observan interferentes poco probable de ser encontrados en la muestra, y que además no son estudiados en este trabajo (Figura 9.b.).

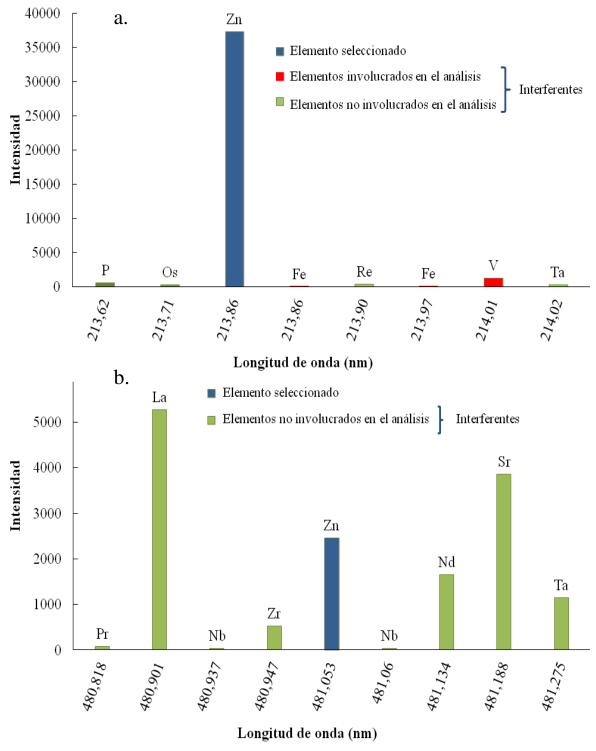


Figura 10. Intensidad de señal analítica de Zn frente a interferentes. a. Zn a 213,857; b. Zn a 481,053.

Para corroborar el efecto de los interferentes, se evaluó la sensibilidad a través de la pendiente de la recta de calibrado (Tabla 4). Era esperable encontrar una pendiente mayor a 213,857 nm, por ser la longitud de onda a la cual el elemento posee la mejor señal analítica. Sin embargo, se aprecia una disminución de la misma, igualándose a la pendiente de 481,053 nm. Esta semejanza en las pendientes obtenidas a las diferentes longitudes de onda, puede deberse a la fuerte presencia de interferentes en 213,857 nm, haciendo que las rectas de calibrado se equiparen en sensibilidad.

Tabla 4. Rectas de calibración de Zn en dos longitudes de onda.

Analito	Longitud onda	Ec. recta	$\mathbb{R}^2$		
Zn	213,857	y = 501,6x - 0,216	0,999		
Zn	481,053	y = 498,1x + 2.390	0,999		

De esta manera, se seleccionó 481,053 nm como la longitud de onda óptima para trabajar cuando se realiza la determinación de Zn.

Esta misma evaluación de la intensidad de señal analítica a determinada longitud de onda y su probable interferencia se realizó con todos los elementos estudiados en este trabajo. Las longitudes de onda utilizadas se muestran en la tabla 5.

#### 3.1.4. Calibración

Una vez optimizados los parámetros instrumentales, se continuó con la etapa de calibración analítica de los elementos a determinar en las muestras de grano de maíz.

El MPAES permite la determinación multielemental, es por eso, la calibración se dividió en dos grandes bloques -elementos minoritarios y mayoritarios- con el fin de disminuir los tiempos de análisis y evitar posibles interferencias entre ellos. Se utilizó soluciones estándares acuosas certificadas, preparadas tal como se indicó en los apartados 2.1.1 y 2.1.2.

En la Tabla 5 se observa los diferentes analitos determinados con sus respectivas longitudes de onda, ecuaciones de la recta y el coeficiente de correlación (R<sup>2</sup>) obtenido.

Tabla 5. Rectas de calibración de los analitos y sus respectivas longitudes de onda.

Elementos Minoritarios									
Analito	Longitud de onda	Ec. Recta	$\mathbb{R}^2$						
Ag	328,068	y = 64354x + 916,7	0,997						
Al	396,152	y = 18969x + 128,5	0,998						
Ba	455,403	y = 52795x - 423	0,999						
Be	234,861	y = 60190x + 1912	0,999						
Cd	228,802	y = 31448x + 323	0,999						
Co	340,512	y = 9753x + 2096	0,995						
Cr	425,433	y = 32297x - 132,7	0,999						
Cu	324,754	y = 158289x - 1530,5	0,999						
Mn	403,076	y = 35176x - 140,5	0,999						
Mo	386,41	y = 21557x + 65,3	0,999						
Ni	352,454	y = 21718x - 71,5	0,999						
Pb	283,305	y = 2545, x - 60	0,999						
Tl	535,046	y = 13829x - 38,6	0,999						
V	437,923	y = 3428x - 14,5	0,999						
Zn	481,053	y = 498,1x + 2,4	0,999						
	Elementos	Mayoritarios							
Analito	Longitud de onda	Ec. Recta	$\mathbb{R}^2$						
Ca	422,673	y = 3E + 06x - 26745	0,993						
Fe	259,94	y = 9890, x + 126,6	0,998						
Mg	383,829	y = 10159x - 484,6	0,997						

#### 3.2. DESEMPEÑO ANALÍTICO

Las cifras de mérito del método propuesto fueron aquellas que se obtuvieron utilizando las longitudes de onda optimizadas para cada analito. Estas se pueden observar en la Tabla 6.

El límite de detección se calculó como 3,3 veces la desviación estándar del blanco dividido la pendiente de la recta de calibración. Así mismo, el límite de cuantificación se obtuvo a partir del producto de 10 veces desviación del blanco dividido la pendiente.

Siguiendo este criterio, el límite de detección alcanzado tuvo un rango de entre 0,03 mg kg<sup>-1</sup> para Ba, a 17,24 mg kg<sup>-1</sup> para Al, mientras que el límite de cuantificación fue 0,09 mg kg<sup>-1</sup> a 52,24 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente.

La precisión se evaluó como la desviación estándar relativa (DER) de nueve determinaciones repetidas de un patrón intermedio de la recta. Las precisiones satisfactorias se encuentran en valores menores al 10 %, éstas son difícilmente de alcanzar cuando se analizan soluciones con matrices con alto contenido de materia orgánica [1, 16, 26]. Sin embargo, se obtuvieron precisiones menores a 7,42 % para todos los metales, con excepción del Pb, que es un elemento muy poco sensible para la determinación en MPAES, y cuyo valor de RSD% fue superior. Por este motivo se decidió no determinar Pb en este trabajo.

**Tabla 6.** Cifras de mérito de los analitos estudiados.

Microelementos								
Elemento	LOD	LOQ	RSD					
Liemento	[mg kg <sup>-1</sup> ]	[mg kg <sup>-1</sup> ]	[%]					
Ag	0,19	0,58	5,09					
Al	17,24	52,24	6,773					
Ba	0,03	0,09	1,48					
Be	0,89	2,70	5,16					
Cd	0,47	1,42	3,51					
Co	4,94	14,98	5,1					
Cr	0,09	0,26	5,67					
Cu	0,51	1,55	7,42					
Mn	0,08	0,25	5,32					
Mo	0,21	0,63	4,32					
Ni	0,28	0,86	6,86					
Pb	31,87	96,57	37,79					
Tl	0,11	0,33	5,3					
V	0,23	0,69	4,6					
Zn	1,67	5,06	3,43					
	Macroele	mentos						
Flomonto	LOD	LOQ	RSD					
Elemento	[mg kg <sup>-1</sup> ]	[mg kg <sup>-1</sup> ]	[%]					
Ca	0,13	0,39	0,0002					
Fe	1,34	4,05	2,15					
Mg	0,23	0,68	2,33					

#### 3.3. PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS

Conocer las propiedades físico-químicas de la muestra es fundamental para una mineralización eficiente. Es importante considerar el tipo de muestras, para seleccionar la mejor estrategia de disolución o digestión [1].

En general se observa que la agitación ultrasónica disminuye el tiempo de extracción y permite utilizar soluciones ácidas más diluidas cuando se compara con métodos de agitación manual, mecánica, magnética o agitación por efecto *vortex*, frecuentemente utilizadas en los laboratorios de análisis químicos. Sin embargo, una extracción cuantitativa depende fuertemente de la interacción de los analitos con su matriz. En este sentido aunque los métodos asistidos por ultrasonidos sean promisorios, es recomendable que las variables que influyen en la extracción de los analitos sean rigurosamente evaluadas para diferentes tipos de muestras antes de la utilización de esta estrategia, a fin de evitar eventuales errores sistemáticos en el análisis [1].

Tratándose de una muestra con una matriz con alto contenido orgánico, y con el fin de encontrar la mejor disolución del grano de maíz evitando condiciones químicas extremas, se experimentaron diversos tratamientos con HNO<sub>3</sub> –reactivo utilizado en la

digestión en horno microondas- variando la concentración del mismo desde 5 a 30 %. Además, se evaluó la masa de muestra a digestar en un rango de 0,1 a 1 g. Se estudió la temperatura y tiempo de exposición en el baño María, desde 60 a 100 °C, y 15 a 60 minutos, respectivamente; y se experimentó el tiempo necesario en baño ultrasónico - potencia 160W y frecuencia 40 KHz- para acelerar la digestión, desde 15 hasta 60 minutos.

En la Figura 11 se muestra la comparación de tres pretratamientos de muestras: el tratamiento convencional por horno microondas; uno donde las condiciones experimentales no proporcionaron una digestión óptima del grano de maíz; y por último, el tratamiento propuesto, indicado en 2.4.2., donde la combinación de variables utilizadas en el pretratamiento promovieron una disminución del tamaño de las partículas, obteniéndose una solución límpida, manifestando así, la digestión total de la matriz

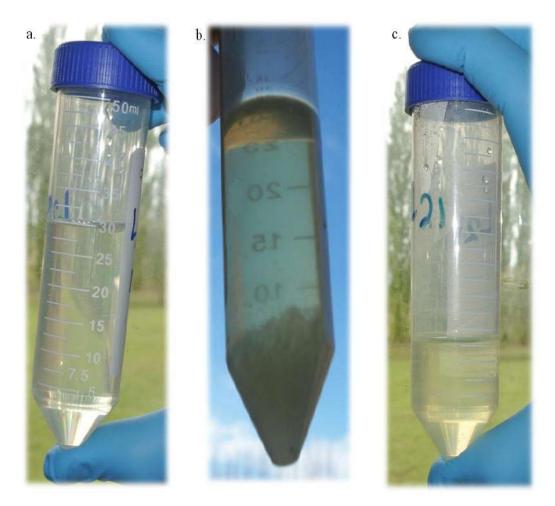


Figura 11. a. Tratamiento convencional, MW. b. Tratamiento ineficaz. c. Tratamiento propuesto.

#### 3.3.1. Comparación del tratamiento convencional con el tratamiento propuesto

Con el fin de evaluar si el tratamiento de preparación de muestra seleccionado (US) es comparable al tratamiento convencional de digestión por horno microondas (MW), se

eligieron de manera aleatoria 3 de las 86 muestras, denominadas A, B y C. Su digestión se realizó por triplicado como se indicó en los ítems 2.4.2 y 2.4.3. Luego de su mineralización se procedió a la determinación multielemental por MPAES. Los valores de concentraciones que fueron comparables en ambos tratamientos (p < 0,05) se indican en la Tabla 7. En el caso de los elementos Ag, Al, Ba, Be, Cd, Co, Mo, Tl y V, las concentraciones se encontraron por debajo del límite de detección, por lo tanto no se pudieron comparar los pretratamiento de muestras.

Tabla 7. Comparación de los métodos MW y US.

Analito	Muestras																	
[mg kg <sup>-1</sup> ]	A						В						С					
	MW US				MW US						1	US						
Ca	10,0	±	1,1	9,1	±	1,0	6,9	±	1,0	5,6	±	0,4	4,2	±	0,2	4,5	±	1,0
Cr	0,21	±	0,01	0,19	±	0,06	0,15	±	0,03	0,14	$\pm$	0,04	0,38	±	0,03	0,40	±	0,83
Cu	3,33	±	0,04	3,61	±	0,27	2,34	±	0,14	2,31	$\pm$	0,64	1,15	±	0,04	1,80	±	0,26
Fe	19,8	±	2,2	20,2	±	1,2	15,5	±	2,8	14,7	±	1,0	16,7	$\pm$	2,8	15,2	±	4,6
Mg	77,5	±	9,3	79,3	±	6,2	48,8	±	1,0	40,5	±	3,2	58,3	$\pm$	5,1	55,9	$\pm$	1,6
Mn	8,8	±	0,6	9,0	±	0,5	4,8	±	0,3	4,2	±	1,4	3,7	±	0,1	4,6	±	1,0
Ni	0,32	±	0,10	0,44	±	0,10	0,32	±	0,04	0,44	±	0,04	0,31	±	0,02	0,53	±	0,13
Zn	19,9	±	2,1	22,3	±	1,2	15,5	±	0,5	16,0	$\pm$	3,9	10,9	±	0,4	14,2	±	1.6

Se observan diferencias en la prueba *t* realizada para los elementos Cu, Mg, Ni y Zn en las muestras B y C (ver tabla 7). En estos casos, se presentaron diferencias significativas debido a que los intervalos de confianza no se superponen por la baja dispersión de la concentración de las réplicas, para cada muestra en ambos tratamientos. Sin embargo, las diferencias entre las medias no son altamente marcadas, obteniendo errores relativos porcentuales menores al 30 %. Se realizó un gráfico de barras, para mejorar la visualización de estos resultados (Figura 12).

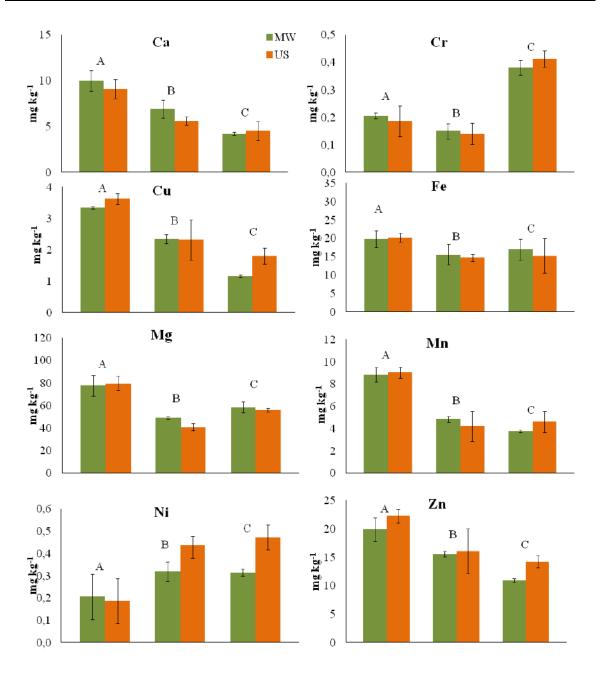


Figura 12. Concentraciones encontradas en muestras tratadas con MW y US con su respectiva barra de error.

Los dos métodos de pretratamiento de muestra se compararon a través de un gráfico de correlación (Figura 13). En el eje de las abscisas se indican las concentraciones de las muestras, tomadas aleatoriamente, arrojadas por el tratamiento convencional MW y en el eje de las ordenadas, las obtenidas por el procedimiento propuesto, US. En estas circunstancias, cada punto del gráfico representa una muestra única analizada por ambos métodos. Queda claro que si cada muestra condujera a un resultado idéntico, la recta de regresión tendría la ordenada en el origen cero, y una pendiente y coeficiente de correlación de uno [5], tal como está señalada en los gráficos. En la práctica, como se puede observar en la Figura 13, no se llega exactamente a esto. Incluso si estuvieran completamente ausentes los errores sistemáticos, los errores aleatorios aseguran que los

dos procedimientos no den resultados en exacta concordancia con todas las muestras. De todos modos, los resultados obtenidos no están tan alejados de la recta ideal; sólo en algunos casos es más evidente, como por ejemplo en Mn y Ni, aunque no todos los puntos de las muestras distan en igual proporción.

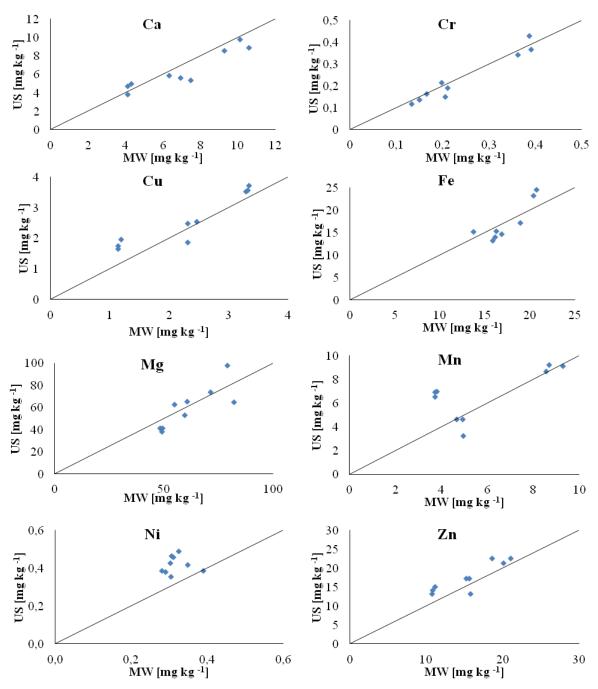


Figura 13. Correlación entre las concentraciones encontradas en las muestras tratadas con MW y US.

Es importante destacar que la extracción de los analitos depende fuertemente de su interacción con los reactivos y con la matriz en la que se encuentran. Además, el tamaño de partículas de una muestra sólida tiene un papel decisivo en la estabilidad de las suspensiones durante la aspiración, transporte e introducción de muestra, así como la eficiencia de atomización. Es deseable, en el análisis por MPAES, que las partículas sean eficientemente transportadas a través del sistema de introducción de muestras y que los procesos de descomposición de las partículas, así como la atomización / excitación de los analitos sean idénticos a aquellos obtenidos con las soluciones [1]. A partir de estos resultados, podemos observar en la mayoría de los casos, la digestión por MW tiene una mejor precisión en comparación con el tratamiento por US. Esto puede deberse a que el sistema MW posee un cerrado hermético que permite la descomposición completa de las muestras a altas temperaturas y presiones, evitando la volatilización de analitos o pérdida de muestra. Por su parte, el US, que es un sistema abierto, no alcanza la temperatura y presión necesarias para una completa digestión, influyendo notablemente en la disminución del tamaño de partícula de la muestra. Además, hay que tener en cuenta que la posición de las muestras en el baño puede intervenir, ya que la energía de las ondas ultrasónicas pueden ser distintas, reduciendo la eficiencia de la extracción de analitos [1, 3].

Debido a que algunas muestras presentaron diferencias significativas entre los tratamientos para la determinación de Cu, Mg, Ni y Zn, estos elementos deberían ser considerados en un posterior análisis de reproducibilidad, con el fin de alcanzar mejores resultados. En el caso de los elementos Ag, Al, Ba, Be, Cd, Co, Mo, Tl, y V, diversos factores pueden haber influido en que los tratamientos de MW y US no sean comparables - como se expone en el párrafo anterior - y por eso se descartaron para un análisis posterior. A pesar de esto, frente a estos resultados obtenidos, podemos afirmar que el tratamiento con US es comparable con MW, para Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, y Zn.

#### 3.4. VALIDACIÓN ANALÍTICA MEDIANTE MRC

El método propuesto se validó frente a un material de referencia, que se preparó como se indica en el apartado 2.4.4. Los promedios de las concentraciones de los analitos Ca, Cu, Fe, Mg, Mn y Zn encontrados se observan en la Tabla 8. En el caso de Cr y Ni se encontraron por debajo del límite de cuantificación y detección, respectivamente.

Tabla 8. Validación analítica del método propuesto.

Analito [mg kg <sup>-1</sup> ]	CRM N	CS ZC	US					
Ca	55	±	8	65,23	±	6,62		
Cu	0,66	$\pm$	0,08	0,61	±	0,05		
Cr	(	0,11)		< LOQ				
Fe	13,3	$\pm$	1,5	11,14	$\pm$	1,63		
Mg	180	$\pm$	20	117,74	$\pm$	15,55		
Mn	1,55	$\pm$	0,08	2,19	±	0,13		
Ni	0,097	$\pm$	< LOD					
Zn	2,9	±	0,3	1,76	±	0,33		

() indica sólo un valor de referencia.

Se observan diferencias significativas en Mg, Mn, y Zn; no así para Ca, Cu, y Fe. Respecto a Ni y Cr no se pueden evaluar, debido a que sus cifras de méritos, LOD y LOQ, son mayores a las concentraciones especificadas en el MRC. En la Figura 14, se grafican las concentraciones de referencia del MRC y las concentraciones encontradas luego del tratamiento propuesto de digestión asistida por ultrasonido.

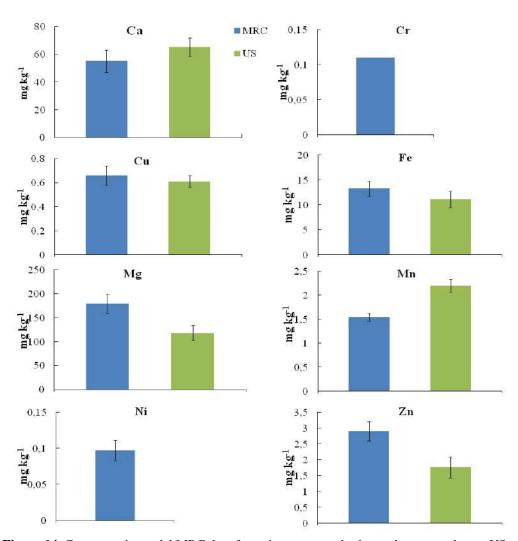


Figura 14. Concentraciones del MRC de referencia y encontradas luego de ser tratado con US.

Las diferencias encontradas en Mg, Mn y Zn pueden deberse a la baja dispersión de la concentración en las réplicas, y por eso, los intervalos de confianza no se superponen. De ser necesaria mayor exactitud, sería adecuado evaluar nuevamente el tratamiento US para estos elementos.

Para el caso de Ni y Cr que se encuentran por debajo del LOD, se podrían evaluar diferentes métodos de preconcentración, o utilizar técnicas más sensibles, por ejemplo, espectrometría de masas inorgánica con plasma acoplado inductivamente (ICPMS) o espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS). Otra alternativa, sería aumentar la cantidad de muestra a digestar para que las concentraciones encontradas sean mayores al LOD y LOQ. En todos los casos sería necesario optimizar nuevamente los parámetros instrumentales como también el desempeño analítico

En caso de que no se necesite rigurosidad analítica en la determinación, y que se requiera analizar gran número de muestras, se puede utilizar el método de digestión US para determinar Ca, Cr, Cu Fe, Mg Mn, Ni y Zn en muestra de grano de maíz.

#### 3.5. APLICACIÓN ANALÍTICA: COMPOSICIÓN ELEMENTAL DE MUESTRAS DE MAÍZ

Se prepararon las 86 muestras, por triplicado -réplicas de muestras-, lo que llevó a realizar 258 preparaciones de granos de maíz con el pretratamiento de digestión asistida por ultrasonido. Las concentraciones de los 8 analitos evaluados se determinaron por MPAES, y se muestran en la Tabla 9, cómo el promedio de cada una de las muestras obtenidas en cada sitio.

El tiempo de digestión disminuyó notablemente, al preparar las muestras por US, así como también aumentó la cantidad de muestras mineralizadas por unidad de tiempo. Esto, en comparación con la digestión asistida por MW, en donde sólo se puede tratar 16 muestras por ciclo, y cada uno de estos ciclos tarda aproximadamente 120 min desde que ingresa la muestra al digestor de microondas, se digesta, se enfría, y se transvasa y enrasa en el tubo.

Es por ello, que nuestro método de pretratamiento de muestra US, es simple, rápido y efectivo para la digestión de granos de maíz y posterior determinación multielemental de Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni y Zn por MPAES. Es importante, que para otras muestras diferentes al grano de maíz, las variables que influyen en la extracción de los analitos, sean empírica y rigurosamente evaluadas antes de la utilización de esta estrategia.

Tabla 9. Concentración de los analitos encontrados en las muestras de granos de maíz.

Sitio	Ca	Cr	Cu	Fe	Mg	Mn	Ni	Zn		
	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>	mg kg <sup>-1</sup>		
25 de Mayo	$3,24 \pm 0,41$	$0,47 \pm 0,1$	$1,69 \pm 0,08$	$12,32 \pm 1,77$	$63 \pm 5$	$5,78 \pm 0,58$	$0,57 \pm 0,07$	$17,19 \pm 2.0$		
La Gloria	5,73 ± 1,34	$0,4 \pm 0,06$	$3,47 \pm 1$	$16,52 \pm 1,18$	$77 \pm 9$	$7,39 \pm 0,66$	$0,51 \pm 0,03$	$18,33 \pm 1,8$		
Parera	$9,51 \pm 0,93$	$0,31 \pm 0,13$	$4,74 \pm 1,11$	$53,72 \pm 8,88$	$77 \pm 6$	$12,79 \pm 2,22$	$0,36 \pm 0,08$	$23,87 \pm 2,38$		
Santa María	$5,48 \pm 0,01$	<loq< th=""><th><math>3,45 \pm 0,07</math></th><th><math>19,08 \pm 0,99</math></th><th><math>45 \pm 3</math></th><th><math>6,37 \pm 0,76</math></th><th><math>0,49 \pm 0,01</math></th><th><math>22,59 \pm 1,61</math></th></loq<>	$3,45 \pm 0,07$	$19,08 \pm 0,99$	$45 \pm 3$	$6,37 \pm 0,76$	$0,49 \pm 0,01$	$22,59 \pm 1,61$		
Macachín	$4,21 \pm 1,54$	$0,37 \pm 0,03$	$2,16 \pm 0,18$	$25,47 \pm 8,08$	$117 \pm 12$	$7,1 \pm 0,55$	$0,4 \pm 0,06$	$18,85 \pm 1,45$		
Guatraché	$4,32 \pm 0,86$	$0.38 \pm 0.03$	$2,43 \pm 0,11$	$23,84 \pm 4,17$	$106 \pm 17$	$7,06 \pm 0,58$	$0,39 \pm 0,02$	$19,51 \pm 1,75$		
Realicó	$11,06 \pm 1,57$	<loq< th=""><th><math>2,25 \pm 0,35</math></th><th><math>17,04 \pm 2,38</math></th><th><math>55 \pm 6</math></th><th><math>13,4 \pm 4,82</math></th><th><math>0,37 \pm 0,04</math></th><th><math>17,91 \pm 2,66</math></th></loq<>	$2,25 \pm 0,35$	$17,04 \pm 2,38$	$55 \pm 6$	$13,4 \pm 4,82$	$0,37 \pm 0,04$	$17,91 \pm 2,66$		
Dorila	$3,5 \pm 0,53$	$0,42 \pm 0,09$	$2,38 \pm 0,78$	$29,61 \pm 38,68$	$71 \pm 17$	$5,24 \pm 1,18$	$0,47 \pm 0,1$	$15,27 \pm 3,88$		
Santa Rosa	$4,91 \pm 0,59$	<loq< th=""><th><math>2,93 \pm 0,6</math></th><th><math>16,12 \pm 0,87</math></th><th><math>48 \pm 4</math></th><th><math>5,42 \pm 1,18</math></th><th><math>0,44 \pm 0,07</math></th><th><math>18,1 \pm 1,04</math></th></loq<>	$2,93 \pm 0,6$	$16,12 \pm 0,87$	$48 \pm 4$	$5,42 \pm 1,18$	$0,44 \pm 0,07$	$18,1 \pm 1,04$		
Uriburu	5,42 ± 1,59	$0.38 \pm 0.07$	$1,88 \pm 0,17$	$15,35 \pm 2,07$	$54 \pm 11$	$6,22 \pm 0,92$	$0,47 \pm 1,07$	$14,79 \pm 0,94$		
Catriló	$4,34 \pm 0,49$	<loq< th=""><th><math>1,72 \pm 0,06</math></th><th><math>13,51 \pm 1,53</math></th><th><math>51 \pm 8</math></th><th><math>5,42 \pm 0,66</math></th><th><math>0,41 \pm 0,03</math></th><th><math>12,87 \pm 1,2</math></th></loq<>	$1,72 \pm 0,06$	$13,51 \pm 1,53$	$51 \pm 8$	$5,42 \pm 0,66$	$0,41 \pm 0,03$	$12,87 \pm 1,2$		
General Pico	$4,75 \pm 0,58$	<loq< th=""><th><math>2,63 \pm 0,34</math></th><th><math>15,39 \pm 1,85</math></th><th><math>58 \pm 9</math></th><th><math>6,17 \pm 0,84</math></th><th><math>0,46 \pm 0,02</math></th><th><math>14,61 \pm 0,48</math></th></loq<>	$2,63 \pm 0,34$	$15,39 \pm 1,85$	$58 \pm 9$	$6,17 \pm 0,84$	$0,46 \pm 0,02$	$14,61 \pm 0,48$		
Anguil	$6,59 \pm 1,96$	$0,49 \pm 0,09$	$2,56 \pm 0,37$	$15,05 \pm 2,35$	$72 \pm 9$	$5,92 \pm 0,7$	$0,48 \pm 0,06$	$17,12 \pm 2,2$		
General Acha	$7,04 \pm 0,63$	$0,33 \pm 0,2$	$2,33 \pm 0,35$	$14,76 \pm 3,51$	$58 \pm 7$	6,81 ± 1,39	$0,41 \pm 0,05$	$14,65 \pm 2,46$		

## CAPÍTULO IV

### **CONCLUSIONES**

#### 4.1. CONCLUSIONES

• El método de preparación de muestras por US es una alternativa simple y rápida de utilizar para la determinación de Ca, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni y Zn por MPAES, en muestras de granos de maíz.

• El pretratamiento de muestras de maíz con US, disminuyó el tiempo de extracción de los analitos, lo que lo hace recomendable para el análisis de control de calidad de rutina para laboratorios que requieran realizar una gran cantidad de análisis por día, en menor tiempo.

#### REFERENCIAS

[1]Krug F.J., Piovezani Rocha F, R. Metodo de preparo de amostras para análisis elemental. Sociedade Brasileira de Química. Brasil 2016.

- [2] CITAC/EURACHEM. Guide to Quality in Analitycal Chemistry. An Aid to Accreditation. Teddington: CITAC/EURACHEM. 2002.
- [3]Richter R.C., Nóbrega J.A., Pirola C. Think Blank Clean Chemistry Tools for Atomic Specctroscopy. Milestone Srl and Ikonos Srl. 1<sup>st</sup> Edition 2016.
- [4] Harris D. C., Analisis químico cuantitativo. Reverté. 2003.
- [5] Valcárcel M. Principios de química analítica. Springer. 1999.
- [6] ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, A.N. Sampling theory and sampling uncertainty. Analytical Methods. 2005.
- [7] Anderson, R. Sample pretreatment and separation. Wiley India Pvt. Limited. 2008.
- [8]Benincasa, C., Lewis, J., Perri, E., Sindona, G., Tagarelli, A. Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. Anal Chim Acta 585 (2007) 366-70.
- [9] Azcarate, S.M., Savio, M., Smichowski, P., Martinez, L.D., Camiña, J.M., Gil, R.A. Single-step solubilization of milk samples with N,N-dimethylformamide for inductively coupled plasma-mass spectrometry analysis. Classification based on their elemental composition. Talanta. 143 (2015) 64-70.
- [10] Ruiz-Díaz J.D., Savio M., Moyano M.F., Verni E.E., Martinez L.D., Gil R.A. Ultrasonic-assisted Dissolution of Vegetable Oils With Tetrabuthylammonium Hydroxide for Multielemental Analysis by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Atomic Spectroscopy. 36 (2015) 55-62.
- [11] M. Forina, M. Casale, P. Oliveri. Application of chemometrics to food chemistry. Comprehensive Chemometrics, Elsevier. 2009.
- [12] Otto, M. Chemometrics, Statistics and Computer. Application in Analytical Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim. 1999.
- [13] Skoog A., Holler F. J., Crouch S. R., Principios de análisis instrumental. Cengage Learning Editores. 2008.
- [14] Butcher D. j., Sneddon J. A practical Guide to Grapithe Furnace Atomic Absorption Spectrometry. Wiley Interscience. 1998.
- [15] http://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/2.Nuevo Plasma de Micr oondas\_Agilent\_4100\_MP-AES.pdf. Septiembre 2016.

[16] Jankowski, K. J., Reszke E. Microwave Induced Plasma Analytical Spectrometry. Royal Society of Chemistry, Analytical Spectroscopy Monographs. 2011.

- [17] Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation F. Priego-Capote, M.D. Luque de Castro. Trends in Analytical Chemistry. 23 (2004) 644-653.
- [18] http://www.fao.org/faostat/es/#search/maiz. Agosto 2016.
- [19] http://www.maizar.org.ar. Junio 2016.
- [20] Maize in human nutrition, FAO, Food and agriculture organization of the united nations. Roma, 1992
- [21] Azcon-Bieto, J., Talón M. Fundamentos de fisiologia vegetal. McGraw Hill Interamericana. 2008.
- [22] Kabata-Pendias A. Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press LLC. 2001.
- [23] Ghazala M., Setsuko K..Toxicity of heavy metals and metal-containing nanoparticles on plants. Biochim. Biophys. Acta. 1864 (2016) 932-44.
- [24] Wolnik K. A., Fricke F. L., Capar S. G., Meyer M. W., Satzger R. D., Bonnin E., Gaston C. M. Elements in Major Raw Agricultural Crops in the United States. 3. Cadmium, Lead, and Eleven Other Elements in Carrots, Field Corn, Onions, Rice, Spinach, and Tomatoes. J. Agric. Food Chem. 33 (1985) 807-811.
- [25] Karlsson, S.; Sjöberg, V.; Ogar, A. Comparison of MP AES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of sunflower (Helianthus annuus). Talanta. 135 (2015) 124-132.
- [26] Boorn, A. W., & Browner, R. F. Effects of organic solvents in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Anal. Chem 54 (1982) 1402–1410.
- [27] Kovács B., Gyôri Z., Prokisch J., Loch J., Dániel P. A study of plant sample preparation and inductively coupled plasma emission spectrometry parameters. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 27 (1996) 1177-1198.
- [28] Teklić M. T., Lončarić Z., Kovačević V., Singhetallic B. R. Trace elements in cereal grain a review: how much metal do we eat? Food and Energy Security 2 (2013) 81–95.
- [29] Li Y., Chen C., Qu Y., Gao Y., Li B., Zhao Y., Chai Z. Metallomics, elementomics, and analytical techniques. Pure Appl. Chem. 80 (2008) 2577-2594.