



FACULTAD DE CIENCIAS
EXACTAS Y NATURALES

Universidad Nacional de La Pampa

**“COMPARACION DE TECNICAS DE
PREPARACION DE MUESTRAS
AMBIENTALMENTE AMIGABLES PARA LA
DETERMINACION DE MINERALES EN
CARNE PORCINA POR MIP OES”**

AUTOR: RIVERA MENDIOLA, FLORENCIA

TESINA PRESENTADA PARA
OBTENER EL GRADO ACADÉMICO
DE LICENCIADO EN QUÍMICA

SANTA ROSA, LA PAMPA

ARGENTINA

2023

PRÓLOGO

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química 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 Laboratorio de Espectrometrías Atómicas (LEA) dependiente del Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam, durante el período comprendido entre el 28/10/22 y 06/12/23 bajo la dirección de la Lic. **CORA JOFRÉ, FLORENCIA** y bajo la co-dirección de la Mg. **MURCIA.VANINA N.**

Rivera Mendiola, Florencia.

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

UNACIONAL DE LA PAMPA

06/12/23

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Directora de esta tesis por el apoyo, consejos, dedicación, tiempo y acompañamiento a lo largo de toda esta etapa, no solo en lo académico, sino también en lo personal.

A mi co-Directora, por su ayuda en toda la primera parte de la investigación, por brindarme las muestras liofilizadas en INTA.

Agradecer a la Universidad Nacional de La Pampa por haberme formado tanto en lo académico como en lo personal para hoy obtener el título de Licenciada en Química, y que además me permitió conocer personas hermosas que hoy son parte de mi círculo más cercano.

Por último, no por ser las personas menos importantes, darle gracias a mi familia y amigos por haberme apoyado desde el inicio y haber dado todo para que pueda obtener este título tan anhelado.

Rivera Mendiola, Florencia

06/12/23

RESUMEN

En el contexto actual, la carne porcina tiene una gran oportunidad de posicionarse como una carne sustituta. Sin embargo, muchos consumidores desconocen el perfeccionamiento de las cualidades que esta carne ha tenido en los últimos años, estableciéndose así la necesidad de profundizar el conocimiento sobre su valor nutritivo. El pretratamiento de este tipo de muestras es un paso decisivo en el procedimiento analítico, donde en la actualidad un requisito es el desarrollo de nuevas metodologías alineadas con los principios de la química analítica verde (QAV), favoreciendo la disminución en el uso de solventes, reducción del impacto ambiental y mejorando la eficiencia de extracción. El presente proyecto de tesis buscó comparar, evaluar y optimizar formas alternativas de preparación de muestras amigables con el ambiente, siguiendo los principios de la QAV, para la determinación de la composición de macro y micro nutrientes en carne de cerdos por espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP OES). El conocimiento de las características nutricionales permitió disponer de información sobre los atributos de calidad presente en los mercados de la provincia de La Pampa.

SUMMARY

In the current context, pork presents a significant opportunity to establish itself as a viable meat substitute. However, a considerable number of consumers remain unaware of the remarkable improvements in the nutritional qualities of this meat in recent years. Consequently, there is a pressing need to deepen the understanding of its nutritional value.

The pivotal initial step in the analytical process involves the pork sample pretreatment. The development of innovative methodologies in concordance with the principles of Green Analytical Chemistry (GAC) becomes imperative. These methodologies not only aim to reduce solvent usage but also seek to minimize environmental impacts while enhancing extraction efficiency.

This thesis project was focused on the comparison, assessment, and optimization of environmentally friendly sample preparation methods in accordance with the principles of GAC. The objective was to determine the macro and micronutrient composition of pork using Microwave Induced Plasma Atomic Emission Spectrometry (MIP OES). By gaining insights into the nutritional characteristics of pork, we could provide valuable information regarding the quality attributes available in the markets of La Pampa province.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	8
1.1 CARNES PORCINAS	9
1.2 DETERMINACION MULTIELEMENTAL	9
1.2.1 Espectrometría de emisión óptica con plasma inducido por microondas (MIP-OES)	11
1.3 PRETATAMIENTO DE MUESTRA	13
1.3.1 Radiación Infrarroja	14
1.3.2 Energía Ultrasónica	15
1.3.3 Calor por Convección	16
1.4 INDICES VERDES	17
1.5 HIPOTESIS	20
1.6 OBJETIVOS	20
CAPÍTULO II. MATERIALES Y METODOS.....	21
1.1 REACTIVOS	22
2.1.1 Solución de patrón de elementos minoritarios	22
2.1.2 Solución de patrón de elementos mayoritarios	22
2.1.3 Material de Referencia	22
2.1.4 Acidez	22
2.1.5 Carbono orgánico disuelto	23
2.2 INSTRUMENTAL	23
2.2.1 Equipamiento	23
2.2.2 MIP OES	25
2.2.3 Optimización del instrumental	25
2.3 MUESTREO Y CONSERVACION DE MUESTRAS	25
2.4 PREPARACION DE MUESTRA	27
2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	28
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
3.1. SELECCION DE LA DIGESTION/EXTRACCION	30
3.2 DESEMPEÑO ANALITICO	34
3.3 METRICAS DE INDICES VERDES	36

3.4 APLICACIÓN ANALITICA	37
CAPÍTULO IV.	41
CONCLUSIONES	42
BIBLIOGRAFIA	43

CAPITULO I

INTRODUCCION

1.1 Carnes Porcinas

La carne ha desempeñado un papel crucial en la evolución humana y es un componente importante de una dieta sana y bien equilibrada debido a su riqueza nutricional. Los factores nutritivos que definen la calidad de la carne incluyen proteínas y sus componentes, grasas y sus componentes, vitaminas, minerales, digestibilidad y valor biológico. Las concentraciones promedio de estos en las carnes, dependen en parte, del tipo de corte, la edad de los animales y otros factores [1]. La importancia y rol de los nutrientes en la salud es bien conocida, debido a que cumplen funciones importantes en la nutrición, desde estructurales hasta una amplia variedad de reacciones químicas esenciales para el mantenimiento, el crecimiento y la reproducción [2], [3], [4].

Los minerales tienen numerosas funciones en el organismo humano ya que forman parte de la estructura de muchos tejidos y son constituyentes esenciales de ciertas hormonas. Algunos son necesarios en cantidades pequeñas, denominados microminerales o microelementos como hierro (Fe), zinc (Zn), cromo (Cr), manganeso (Mn), níquel (Ni), cobre (Cu), selenio (Se), estroncio (Sr) y cesio (Cs). Los minerales que se requieren en mayor cantidad se denominan macrominerales o macroelementos. Dentro de este grupo se encuentran: calcio (Ca), potasio (K), magnesio (Mg), sodio (Na) y fósforo (P) [5], [6].

La carne magra de cerdo es un alimento con alto contenido nutricional, incluidos ácidos grasos, proteínas y minerales, que ha mejorado en forma progresiva su producción internacional y nacional. De hecho, los alimentos derivados de esta carne son los productos con mayor incremento de consumo en América Latina [7], existiendo un interés considerable en la composición multielemental de la carne de cerdo desde la perspectiva de la salud humana [8] así como el crecimiento y desarrollo de los lechones [9], [10].

1.2 Determinación multielemental

Varias técnicas analíticas modernas se han desarrollado permitiendo la determinación de la composición elemental en los alimentos. En este sentido, las Espectrometrías Atómicas (AS) son las más utilizadas debido a que se destacan por

su capacidad de análisis elemental, elevada sensibilidad, bajos Límites de Detección (LODs), amplio intervalo dinámico, precisión, exactitud y velocidad de análisis. Entre las más empleadas se encuentran: Espectrometría de Absorción Atómica con llama (FAAS), Espectrometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (GFAAS), Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP OES), Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inducido por Microondas (MIP OES) y Espectrometría de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

Las técnicas de plasma en particular, permiten la detección multielemental de manera simultánea o secuencial, lo que conlleva una mejora en la velocidad de análisis, pudiendo realizar la medida de un gran número de elementos en minutos. Además, presentan un mayor intervalo lineal, buena sensibilidad, versatilidad, y bajos LODs para la mayoría de los elementos. En contraste, FAAS y GFAAS al tratarse de técnicas monoelementales, requieren de mayor tiempo de análisis para realizar la cuantificación de varios analitos.

En la Figura 1 se ilustra la relación entre los LODs alcanzados por distintas AS y el número de analitos que se pueden determinar por muestra en cada una de ellas.

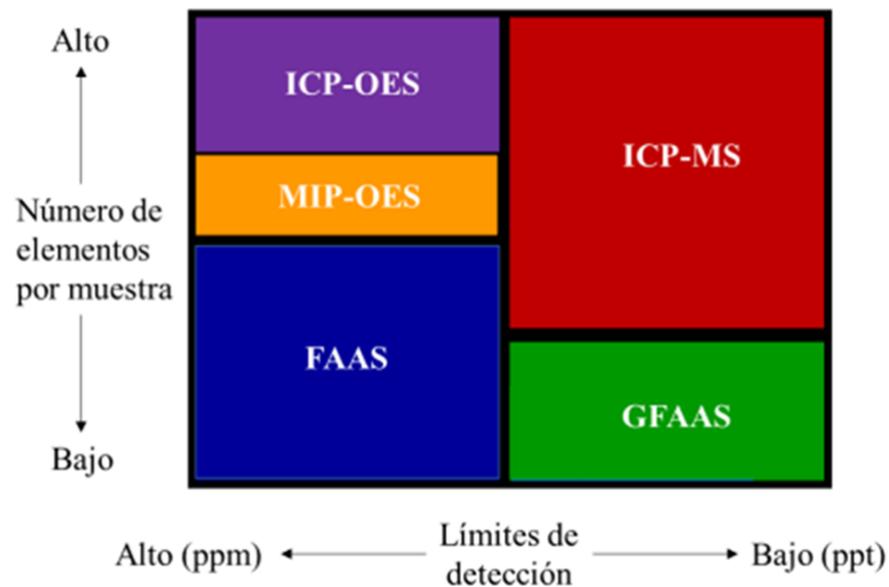


Figura 1. Capacidad multielemental vs LODs de diferentes AS.

En este contexto, MIP OES se destaca entre las técnicas analíticas disponibles más versátiles del mercado. Sus ventajas están relacionadas a la detección multielemental, buena sensibilidad, amplio intervalo lineal de respuesta, permitiendo la determinación de un gran número de elementos incluso en matrices complejas [11], [12]. MIP OES ha ganado gran atención en los últimos años como una alternativa a ICP OES, con costos operativos reducidos al eliminar los requisitos de gases inflamables y/o costosos utilizados en las técnicas de análisis elemental típicas [13]. Sin embargo, esta fuente de plasma aún sufre fuertes efectos de matriz debido a elementos fácilmente ionizables (como Na, Ca, etc.) y los LODs para algunos elementos aún son más altos de los que ofrece ICP OES [14].

1.2.1 Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inducido por Microondas (MIP OES)

El desarrollo de MIP OES se produjo a partir de la década de 1950, pero con dificultad para consolidarse en el campo de las AS. Las aplicaciones de plasma inducido por microondas (MIP) en un primer momento, ocurrieron principalmente en asociación con la cromatografía de gases y era sustentado por helio, luego en el 2000 comenzó a utilizarse nitrógeno molecular (N_2).

El instrumento disponible comercialmente (de Agilent Technologies) contiene una cavidad de martillo con iris resonante donde se mantiene un MIP a 1,0 kW por N_2 proveniente del aire de un suministro de aire comprimido y un generador de nitrógeno, lo que resulta en una reducción significativa en los costos operativos y en los costos de infraestructura. Un monocromador de distancia focal de 600 nm y un detector CCD (charge-coupled device) refrigerado por Peltier. El N_2 -MIP se visualiza axialmente y los analitos se determinan secuencialmente. La nebulización neumática (PN) ha sido el principal sistema de introducción de muestras empleado seguido de la generación de vapor químico (CVG) que incluye generación de hidruros (HG) y vapor frío (CV) [15].

Principio de funcionamiento:

La introducción de muestra ha sido llamada el talón de Aquiles de la AS debido a que en muchos casos este paso limita la exactitud, precisión y los LODs de las

mediciones. El objetivo principal del sistema de introducción de muestra es transferir una porción representativa y reproducible de la muestra a los atomizadores, donde los elementos presentes en la muestra se convierten en átomos en estado gaseoso. El que sea posible llevar a cabo este objetivo con facilidad depende del estado físico y químico del analito y de la matriz de la muestra. En el caso de muestras sólidas, su introducción es por lo común un problema fundamental; para soluciones y muestras gaseosas, el paso de introducción es con frecuencia trivial.

Así una muestra líquida es trasladada mediante una bomba peristáltica hacia el nebulizador, el cual introduce de manera constante la muestra en forma de una fina dispersión de pequeñas gotas, denominada aerosol. A continuación, estas gotas son introducidas a una cámara de nebulización que permite el paso de las más pequeñas hacia el atomizador (en este caso, el plasma) y las de mayor tamaño se reúnen en el fondo de la cámara drenando hacia un recipiente de desechos. Con el fin de eliminar el disolvente del aerosol, la muestra es sometida a un proceso de desolvatación. Una vez ya en el plasma, es atomizada.

A temperatura ambiente todos los átomos de una muestra se encuentran en su “estado fundamental”. El plasma por medio de su energía térmica consigue excitar los electrones externos de los átomos para que estos migren a orbitales de mayor energía. El tiempo de vida de un átomo excitado es breve y al regresar a su estado fundamental, los electrones emiten radiación que es característica para cada elemento. La intensidad de cada línea de emisión se mide en el detector y es proporcional a la concentración [16]. El proceso descrito se representa en la Figura 2.

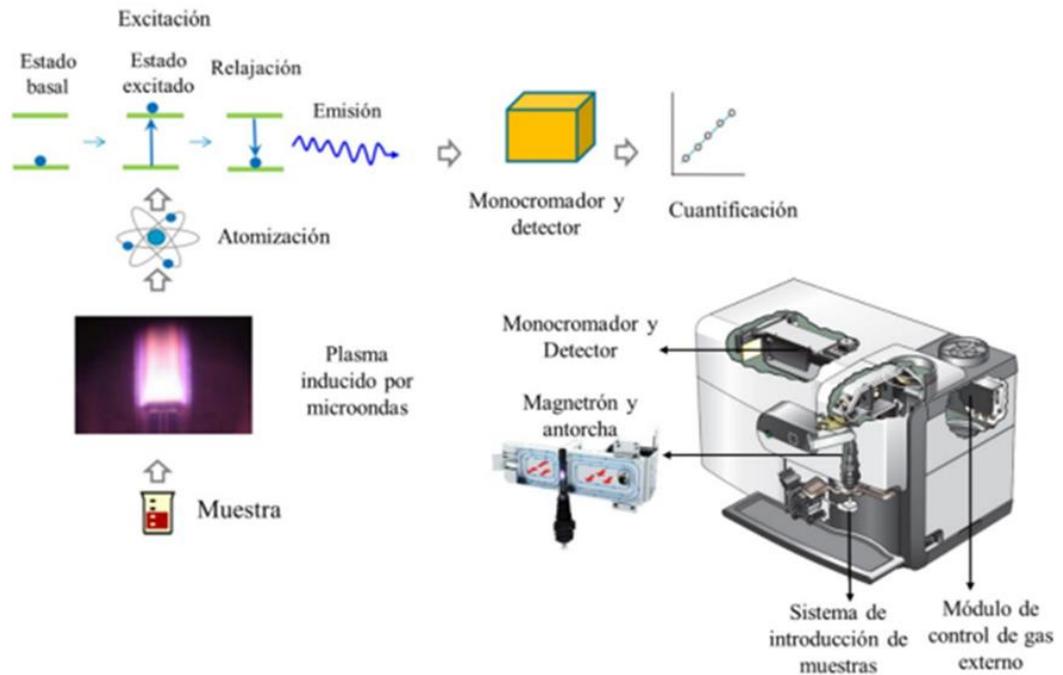


Figura 2. Esquema y principios del funcionamiento de MIP OES.

1.3 Pretratamiento de Muestra

En la secuencia analítica, los pasos de muestreo y preparación de muestra son responsables de la mayoría de los errores en los resultados del análisis. Según la literatura, el porcentaje de error generado por esta etapa puede alcanzar entre 100–300%; por ello, es necesario el desarrollo de métodos de preparación de muestras que proporcionen resultados analíticos confiables [17].

La preparación de muestras es función de diversos factores, como el estado físico de la muestra, la naturaleza de la matriz de la muestra y los analitos, así como el tipo de detector. Por lo tanto, la primera distinción se refiere a la naturaleza de la muestra: sólida, líquida o gaseosa. Las muestras sólidas son las más difíciles de procesar ya que la mayoría de los instrumentos analíticos están equipados para muestras en solución y no pueden manejar las muestras en estado sólido. De esta manera mediante un pretratamiento de muestras adecuado se produce la transferencia de los analitos de interés a una fase líquida [18]. Se pretende que la descomposición sea completa, que los materiales inorgánicos pasen a ser completamente solubles y que los compuestos orgánicos se mineralicen en su totalidad. Preferentemente el

procedimiento debe ser simple y la descomposición y separación deben darse en un solo paso.

Dentro de los métodos tradicionales de preparación de muestras se encuentran:

- métodos por vía seca (oxidación térmica en mufla y obtención de cenizas)
- técnicas de digestión/oxidación por vía húmeda usando bloques calentadores o placas calientes.

Las técnicas comúnmente empleadas en preparación de muestras ricas en compuestos orgánicos para la determinación elemental, consumen mucho tiempo y requieren grandes cantidades de reactivos (que son caros, generan desechos y pueden contaminar la muestra). Sin embargo, en la actualidad se requieren procedimientos que sean más rápidos, sin empleo de solventes o reactivos altamente tóxicos o contaminantes, de bajo costo, susceptibles de automatización [19] y en concordancia con los principios de la Química Analítica Verde (QAV) que serán discutidos en la sección 1.4.

Cuando se examina la literatura, se puede ver que hay algunos estudios de revisión que explican los enfoques ecológicos para el análisis de alimentos. Por ejemplo; Ballesteros-Vivas y col. (2021) se centraron en el efecto y la contribución de los principios de la QAV para cumplir con los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). Boateng (2023) evaluó el efecto de los solventes eutécticos profundos (DES) como solventes verdes en la química de los alimentos, pudiéndose observar una gran ventaja sobre los procedimientos convencionales en la reducción del tiempo y el consumo de solventes [20].

1.3.1 Radiación Infrarroja

La radiación infrarroja (IR) forma parte del espectro electromagnético con longitudes de onda comprendidas desde los 760-780 nm; limitando con el color rojo en la zona visible del espectro, hasta los 10.000 o 15.000 nm por debajo del límite de las microondas [21].

Debido a la capacidad de promover un calentamiento más rápido, IR se exploró en diferentes sistemas. Como fuente de calor, ha encontrado muchas aplicaciones, sin

embargo, recientemente ha sido empleada en la digestión húmeda para la preparación de muestras. El mecanismo de calentamiento se basa en la penetración profunda de la radiación IR en las sustancias. Específicamente, las moléculas absorben radiación, estimulando la vibración molecular que produce calor [22]. La principal característica que distingue la digestión/extracción asistida por IR por sobre el resto de los procesos es que no requiere un medio para la transmisión de la energía desde la fuente emisora (lámpara) a la muestra, ya que la propia muestra es la que absorbe la radiación IR [23], de esta forma, promueve un calentamiento uniforme y, en consecuencia, un tratamiento de muestra eficiente [24].

La preparación de muestras basada en la digestión asistida por IR proporciona una alternativa rápida y económica a otras técnicas convencionales para el análisis de muestras complejas y permite emplear masas de muestra relativamente grandes, lo que disminuye posibles problemas de homogeneidad mejorando el poder de detección. Aunque es una técnica menos popular, la aplicación de IR para la preparación de muestras ha demostrado ser una alternativa viable, utilizando materiales económicos y proporcionando eficiencias comparables a otras metodologías de preparación [25]. Gouveia y col. (2000) investigaron un procedimiento para la preparación de muestras utilizando radiación infrarroja generada por lámparas de tungsteno para el calentamiento rápido de una suspensión de muestra ácida contenida en un matraz de vidrio para la posterior cuantificación de Cu, Fe, Mn y Zn en hígado bovino y hojas de manzano como materiales estándar de referencia. Dantas y col. (2013) propusieron el uso combinado de radiación infrarroja y radiación de microondas (IR-MW) para aumentar la cantidad de muestra orgánica digerida al determinar minerales (Cu, Mn, Mo, Zn, Ca, K, Mg, Na, Fe y P) en carne porcina mediante ICP OES. Los autores concluyeron que el procedimiento de calentamiento IR-MW fue exitoso, sumado a que se trata de un sistema simple y económico que utiliza lámparas infrarrojas disponibles comercialmente.

1.3.2 Energía Ultrasónica

La energía ultrasónica (US) puede considerarse como una alternativa para la extracción de analitos, ya que el ultrasonido genera una energía auxiliar que promueve la interacción entre los elementos de la muestra y el medio de extracción

ácido, transfiriendo los analitos de la matriz orgánica a la fase acuosa. A través de la extracción sólido-líquido asistida por ultrasonido (USAE), el área de la superficie de contacto entre la fase sólida y la líquida aumenta, lo que permite una mayor penetración del solvente en la matriz de la muestra. La extracción de analitos sigue el principio de cavitación mediante la aplicación de ondas de US en el medio, generalmente agua. Los ciclos de expansión y compresión pueden causar localmente temperaturas de hasta 5000 K y presiones de hasta 1000 atm. En estos ciclos alternos de alta/baja presión, los gases y las moléculas en fase de vapor pueden ser expulsados de las burbujas [22].

USAE es una alternativa prometedora en el análisis de muestras sólidas cuando no es aplicable ni la disolución simple ni el análisis directo [18]. Se considera un método simple, robusto, de bajo costo y utiliza menos reactivos para reciclar o desechar en el ambiente, además tiene la ventaja de reducir el tiempo y el volumen de reactivos utilizados en la preparación de muestras [26]. Alves y col. (2023) utilizaron USAE combinada con FAAS para cuantificar el contenido de Fe, Mn, Mg y Ca en jarabes de caña; Nehera y col. (2018) plantearon USAE como alternativa a la digestión MW convencional, para la preparación de muestras. Ambos autores concluyeron que el método ultrasónico fue simple, preciso, amigable con el ambiente y poco costoso [27], [28].

1.3.3 Calefacción por convección

EL principio de bloque calefactor seco es básicamente muy sencillo: calentar un bloque de metal y mantener la temperatura estable. Este diseño ofrece muchas ventajas en comparación con los baños líquidos más tradicionales. En este caso el sistema emplea un bloque calefactor de grafito el cual permite la transmisión del calor generado, permitiendo usar menores tamaños de muestra, para así, emplear menores cantidades de ácido, generar menores residuos y producir menos gases nocivos [29].

Los procedimientos de digestión en placa caliente se llevan a cabo a presión atmosférica y no sufren los problemas asociados con la acumulación de presión. Este enfoque también permite la mineralización de varias muestras al mismo tiempo [30].

1.4 Índices Verdes

Debido a que las preocupaciones sobre el ecosistema están creciendo, es esencial estudiar las acciones de los químicos que pueden afectar el ambiente. Actualmente, la química analítica está íntimamente asociada con los temas de protección ambiental. Así, la QAV se define como la aplicación de técnicas y procedimientos de la química analítica para disminuir o eliminar solventes, reactivos y otros materiales que son peligrosos para el individuo o el ecosistema y proporcionar metodologías rápidas y de ahorro de energía.

Los 12 principios de la QAV, según Gałuszka y col. [31] son los siguientes:

1. Aplicar técnicas analíticas directas para evitar el tratamiento de muestra.
2. Minimizar el tamaño y número de muestra.
3. Realizar mediciones in situ.
4. Integrar operaciones y procesos analíticos para ahorrar energía y reducir el uso de reactivos.
5. Seleccionar métodos automatizados y miniaturizados.
6. Evitar la derivatización.
7. Evitar la generación de un gran volumen de desechos analíticos y proporcionar una gestión adecuada de los desechos analíticos.

8. Utilizar preferentemente métodos multianalito o multiparámetro frente a los métodos que analizan un analito a la vez.
9. Minimizar el uso de energía.
10. Utilizar reactivos obtenidos de fuentes renovables.
11. Reemplazar o eliminar reactivos tóxicos.
12. Aumentar la seguridad del operador.

Si bien puede parecer que estos 12 principios son suficientes para evaluar el impacto ambiental de un método, esto no es completamente certero. La preparación de muestras es un paso clave en el procedimiento analítico, esencial para la separación y el enriquecimiento de los analitos y el primer principio de QAV sugiere evitar la misma y, en su lugar, utilizar técnicas analíticas directas. Esto sin embargo no es posible en todos los casos, y hay quienes plantean que existen enfoques modernos de preparación de muestras que no afectan negativamente a la salud humana ni al ambiente y pueden conducir a metodologías más eficientes y metrológicamente mejoradas [32]. Así, se establecieron 10 bases de preparación de muestras verdes (GSP) que se describen a continuación [33]:

1. Favorecer la preparación de muestras in situ
2. Utilizar solventes y reactivos más seguros
3. Favorecer el uso de materiales sostenibles, reutilizables y renovables
4. Minimizar los residuos
5. Minimizar las cantidades de muestras, productos químicos y materiales
6. Maximizar el rendimiento de la muestra
7. Integrar pasos y promover la automatización
8. Minimizar el consumo de energía
9. Seleccionar la configuración de detección más ecológica posible para el análisis
10. Garantizar procedimientos seguros para el operador.

En este contexto surgieron AGREE y AGREEprep, dos softwares libres y gratuitos que proponen herramientas métricas basadas en los 12 principios de QAV y en las 10 bases de GSP para evaluar el verdor de los métodos donde, después de la evaluación cuantitativa, el resultado del cumplimiento del criterio se refleja como una

puntuación en una escala de 0 (no cumple) a 1 (cumple) [32], [34]. Una puntuación global de 0 significa que el método evaluado tiene el peor rendimiento en todos los criterios, mientras que una puntuación global de 1 representa el mejor rendimiento en todos los criterios para un procedimiento bajo estudio. El resultado obtenido al aplicar AGREE se representa como un pictograma circular diferenciado por colores (rojo, amarillo y verde). Alrededor del círculo, hay 12 fracciones, cada una correspondiente a cada uno de los criterios de desempeño. Las puntuaciones más altas (color verde) podrían considerarse metodologías más verdes, mientras que los valores bajos, corresponden a procedimientos menos ecológicos (color rojo) como se representa en la Figura 3. En el centro del pictograma se ubica la puntuación global de la evaluación del método analítico. AGREEprep de manera similar que AGREE, se basó en 10 categorías de impacto que se calculan en puntuaciones de escala de 0 a 1 y luego se utilizan para calcular la puntuación de la evaluación final.

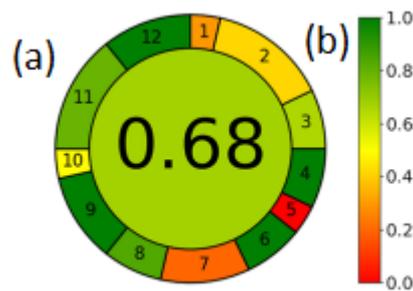


Figura 3. Resultado genérico de la evaluación (a) y la correspondiente escala de colores de referencia (b).

1.5 HIPÓTESIS:

Las nuevas metodologías de preparación de muestras amigables con el ambiente permiten la determinación multielemental por MIP OES en muestras de carne porcina.

1.6 OBJETIVO:

Comparar metodologías analíticas de preparación de muestras complejas amigables con el ambiente para la evaluación del perfil mineral por MIP OES en muestras de carne porcina de la provincia de La Pampa.

CAPITULO II

MATERIALES Y

METODOS

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 contenía 50 mg L⁻¹ de: Cu, Mn, Mo y Zn. A partir de este patrón, se obtuvieron las soluciones para construir las rectas de calibración de los elementos mencionados, abarcando un intervalo de concentraciones de 0,05 a 1,00 mg L⁻¹. A modo de ejemplo, esta última concentración, se preparó tomando 500 µL de la solución estándar, adicionando 50 µL de HNO₃ para simular la matriz ácida de la mineralización y llevando a un volumen final de 5 mL. Además, se preparó una solución blanco para cada recta, y cada recta se preparó por triplicado.

Para la preparación de todas las soluciones, se utilizó agua ultra pura obtenida mediante un ultra purificador de agua Millipore® modelo ultrapureSystem (Mili-Q), con resistividad de 18,2 MΩ cm, a 25° C.

2.1.2 Solución patrón de elementos mayoritarios

Se utilizaron patrones monoelementales SCP SCIENCE Plasma CAL de 100 mg L⁻¹ para Na, Ca, Mg, K; y de 1000 mg L⁻¹ para Fe y P. A partir de estos se construyó una recta de calibración para los elementos mayoritarios, del mismo modo que para los elementos minoritarios, empleando un rango de concentración desde 0,1 mg L⁻¹ a 5 mg L⁻¹ para Ca, K, Na y Mg; de 1 mg L⁻¹ a 50 mg L⁻¹ para Fe y P. También se evaluaron soluciones blanco para cada elemento, todo por triplicado.

2.1.3 Material de Referencia

Para la validación del método de digestión propuesto se empleó como material de referencia Figado Bovino RM-Agro E3001a.

2.1.4 Acidez Residual

Se realizó la determinación utilizando hidróxido de sodio (NaOH) 0,02N. Para esto, se pesaron 0,2005 g de NaOH y se disolvieron con 250 mL de agua Mili-Q. Este fue validado frente a biftalato de potasio. Para preparar este último se pesaron con exactitud 0,1998 g y se llevaron a 50 mL con agua Mili-Q obteniendo una concentración de 0,01957 N. Como indicador para la titulación acido-base se utilizó fenolftaleína 1% m v⁻¹.

Para determinar la acidez residual, se tomó 1 mL de los digestos o 0,5 mL del material de referencia (MR) luego de ser sometidos al proceso de preparación de muestras y filtración. En ambos casos se adicionaron 2 gotas de indicador y 5 mL de agua mili-Q y se titularon frente a NaOH.

2.1.5 Carbono Orgánico Disuelto

La determinación de carbono orgánico disuelto (DOC) en las muestras se realizó mediante la determinación de carbono (C) por MIP OES a 247,856 nm. Se construyó una recta de calibración a partir de ácido oxálico. Se prepararon 25 mL de ácido oxálico de concentración 1% m v^{-1} C en 1% de ácido nítrico concentrado y a partir de este se realizaron las diluciones correspondientes para los puntos de la curva 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75%.

2.2 Instrumental

2.2.1 Equipamiento para el pretratamiento de muestras

Prototipo IR:

Consiste en una caja rectangular de madera, con dos lámparas eléctricas infrarrojas comerciales (250 W, Francia, China) en el interior, las cuales son de bajo costo y accesibles para cualquier laboratorio. En la parte superior se ubica una tapa metálica con orificios del tamaño de los tubos de teflón utilizados para realizar la digestión de las muestras por MW. El prototipo alcanza una temperatura máxima fija de funcionamiento de aproximadamente 190 °C, aproximadamente. Se puede visualizar el prototipo en la Figura 4.



Figura 4. Prototipo de digestor IR.

Baño Ultrasónico

El baño de ultrasonido (Testlab, Buenos Aires, Argentina) empleado tiene una frecuencia de 40 kHz y una potencia de 160 W. La temperatura del baño de agua del tanque de llenado se reguló en el rango de 30 a 60 °C, mientras que el tiempo de trabajo fue de 45 min. El baño ultrasónico utilizado puede visualizarse en la Figura 5.



Figura 5. Baño Ultrasónico Teslab.

DigiPREP

El sistema de digestión por bloque calefactor (DigiPREP Jr, SCP SCIENCE) empleado tiene una potencia eléctrica a 750 W. La temperatura se mantuvo uniforme y programada a 120°C. El sistema DigiPREP Jr se observa en la Figura 6.



Figura 6. Sistema de digestión por bloque calefactor.

2.2.2 MIP OES

Las mediciones se realizaron con un espectrómetro de emisión atómica marca Agilent, modelo MPAES 4250, nebulizador OneNeb y una cámara de simple paso. Equipado con

un monocromador Czerny Turner con un detector de matriz de dispositivo de carga acoplada (CCD) VistaChip. MIP OES opera con un generador de nitrógeno. Los parámetros instrumentales seleccionados se muestran a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros instrumentales utilizados en la determinación multielemental por MIP OES.

Parámetros instrumentales	Condiciones operacionales
Tiempo de toma de muestra (s)	2
Tiempo de estabilización (s)	5
Tiempo de lectura (s)	3
Velocidad de bombeo (rpm)	15

Optimización instrumental

Se identificaron las variables instrumentales que podrían tener efecto sobre la intensidad de la señal analítica; entre ellas se optimizaron: presión de nebulización (PN) y posición de visualización (PV). 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 y estabilización del plasma, y la velocidad de bombeo a la que ingresó la muestra. Con el patrón de calibración de máxima concentración; 1 mg L^{-1} , para los elementos minoritarios y de mínima concentración para los elementos mayoritarios ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$ para Ca, Mg y Na; 1 mg L^{-1} para Fe y P) se optimizaron los parámetros instrumentales: PV y PN. Los resultados se presentan en la Tabla 2. Se observa que la mayoría de los elementos presentan la mejor intensidad de señal analítica, a una PN entre 160 y 240 kPa y los valores de PV se ubican entre 10 (Cu, Mn, Mo, Zn, Ca, Mg, P y Fe) y 20 (K y Na).

Tabla 2. PN y PV para los elementos analizados.

Elemento	Presión del nebulizador (kPa)	Posición de visualización
Cu	240	10
Mn	240	10
Mo	240	10
Zn	220	10
Ca	200	10
K	240	20
Mg	240	10
Na	240	20
P	160	10
Fe	240	10

2.3 Muestreo y conservación de muestras

El muestreo es la etapa más importante del procedimiento analítico, ya que los resultados finales del análisis dependerán de la forma como se realizó.

Se utilizaron bifés del músculo *Longissimus dorsi* (LD) de cerdos alimentados con dietas isoproteicas hasta los 105 kg de peso vivo. Luego de la faena se procedió a extraer un bloque de bife con hueso del lado izquierdo de cada canal, incluyendo la sección del LD en un corte transversal a la columna vertebral entre la décima y onceava costilla. Los bloques se identificaron individualmente y fueron conservados a $4 \pm 1^\circ\text{C}$, hasta el momento de su manipulación como se muestra en la Figura 7a). La carne fue procesada con una procesadora de carne y posteriormente liofilizados en el liofilizador Labconco (Figura 7b).



Figura 7. a) Musculo LD fresco; b) Musculo LD liofilizado.

2.4 Preparación de muestras

Se utilizaron 0,25 g de las muestras liofilizadas pesadas en balanza analítica, las mismas fueron sometidas a los tratamientos detallados en la Tabla 3. En todos los casos se adicionaron 2 mL de HNO_3 calentando a sequedad o por un tiempo definido según el procedimiento; y posteriormente se añadieron 2 mL de H_2O_2 siguiendo el mismo calentamiento que para HNO_3 .

Tabla 3. Tratamientos evaluados.

Tratamientos	Concentración de HNO_3 (M)	Concentración de H_2O_2 (%)
1	2	0
2	7	0
3	2	30
4	7	30
5	4,5	15
6	4,5	15
7	4,5	15

Los tratamientos expuestos a US fueron sometidos a 45 min de tratamiento para cada reactivo, mientras que para los expuestos a IR y DP, se mantuvieron hasta sequedad luego de la adición de cada reactivo.

2.5 Análisis estadístico

Los análisis se realizaron por triplicado y el resultado analítico se expresó en función del promedio de las medidas \pm el intervalo de confianza (IC) calculado como:

$$IC = t s/\sqrt{n} \quad (1)$$

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 comparación de medias con un valor de referencia, con un 95 % de nivel de confianza.

La capacidad de detección y cuantificación son características de rendimiento importantes de cada proceso de medición. En química, una característica representativa de cualquier método analítico es la concentración más pequeña o la masa del analito (el componente de la muestra analizada) que puede detectarse y/o cuantificarse con un grado específico de certeza, así la cantidad relacionada es el límite de detección (LOD), definido por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada. Entre ellos, el límite de cuantificación (LOQ), se refiere a la concentración o masa de analito más pequeña, que puede analizarse cuantitativamente con una fiabilidad razonable mediante un procedimiento dado [36]. Los valores de LODs y LOQs fueron calculados en base a las ecuaciones (2) y (3), como [22]:

$$LOD = \frac{3.3 S y/x}{A} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \quad (2)$$

$$LOQ = \frac{10 S y/x}{A} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \quad (3)$$

Para expresar la precisión de los resultados analíticos se empleó la desviación estándar relativa (%RSD), se calculó en base a la ecuación (3) de acuerdo a lo planteado en [22]:

$$\%RSD = \frac{SD}{x} \times 100 \quad (4)$$

CAPITULO III

RESULTADOS Y

DISCUSION

3.1 Selección del procedimiento de extracción/digestión

Idealmente, la mejor digestión debería llevar a una descomposición completa del material orgánico utilizando cantidades mínimas de reactivos que deberían ser diluidas. Tal como lo indica J.A. Nóbrega (2012), los digestos obtenidos deben ser estables y caracterizados por una baja AR, un bajo contenido de carbono residual (RCC) y una baja concentración de sólidos disueltos [37]. Así, la eficiencia de los tratamientos se evaluó mediante el estudio de la acidez residual (AR), carbono orgánico disuelto (DOC) y sólido residual (RS). Bizzi y col. (2017) indicaron que la AR debe ser inferior al 10 %, es decir debe ser lo suficientemente alta para facilitar la descomposición de las muestras orgánicas, pero no demasiada como para causar daño instrumental al MIP OES [38]. La generación de digestos con menor acidez es interesante para evitar la degradación de los componentes del instrumento y para la reducción de interferencias no espectrales [39]. Por otro lado, se busca que los sólidos totales disueltos sean inferiores a $0,1\% \text{ m v}^{-1}$, para evitar la deposición de sales en los conos de la interfaz, así como la deposición de sales en la antorcha principalmente cuando se trabaja con visión axial [38].

El dióxido de carbono y algunos compuestos orgánicos volátiles y no volátiles surgen durante la digestión de las muestras orgánicas, siendo el DOC un parámetro importante a controlar en las técnicas basadas en plasma, ya que la presencia de carbono podría causar depósitos en la antorcha, afectando las condiciones de excitación del plasma y provocando interferencias espectrales [37], [38]; debido a esto se busca que el DOC presente el menor porcentaje posible.

La evaluación de la eficiencia de digestión a través de AR y RS para las 3 formas de tratamiento de muestras evaluadas: IR, DP y US, se muestra en las Figuras 8, 9 y 10. Puede observarse en la Figura 8 que el tratamiento 3 (T3) muestra un porcentaje menor de los parámetros AR y RS comparado al resto de los tratamientos. En el caso del DP (Figura 9) el menor porcentaje de AR y RS se obtuvo para los tratamientos 2 y 3 (T2 y T3), sin embargo, desde el punto de vista de la sustentabilidad el uso de HNO_3 2M (T3) se seleccionó por sobre el T2 (HNO_3 7M). Para US (Figura 10) también fue efectivo T2 desde el punto de vista de AR. En todos los casos las muestras tratadas con los procedimientos propuestos, presentaron una acidez menor al 10% de acuerdo a lo expresado por Bizzi y col.

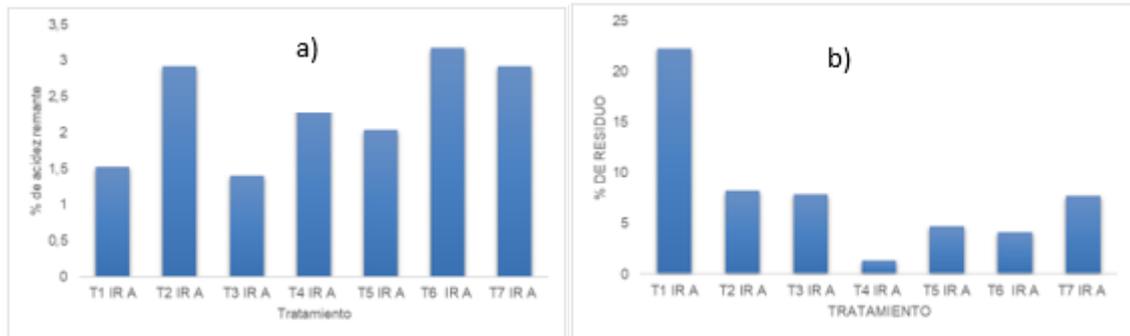


Figura 8: a) AR y b) RS para tratamientos IR.

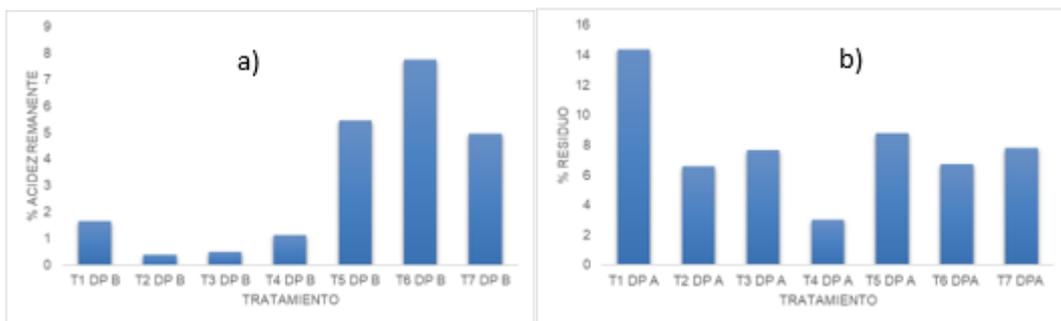


Figura 9: a) AR y b) RS para tratamientos DP.

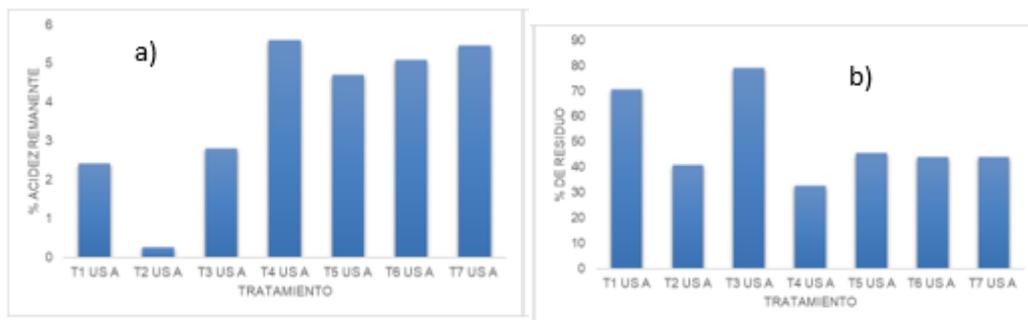


Figura 10: a) AR y b) RS para tratamientos US.

La curva de calibración obtenida para la determinación del DOC puede observarse en la Figura 11, con LOD y LOQ de 0,04 % y 0,014 % respectivamente. Todos los tratamientos presentaron una concentración de DOC inferior al LOD, con excepción de tratamiento 2 para DP que presentó una concentración de 0,3%. A partir de los resultados obtenidos se puede observar que los 3 procedimientos de extracción IR, US o DP podrían ser empleados

para llevar adelante la extracción multielemental sin mostrar inconvenientes respecto de la presencia de DOC.

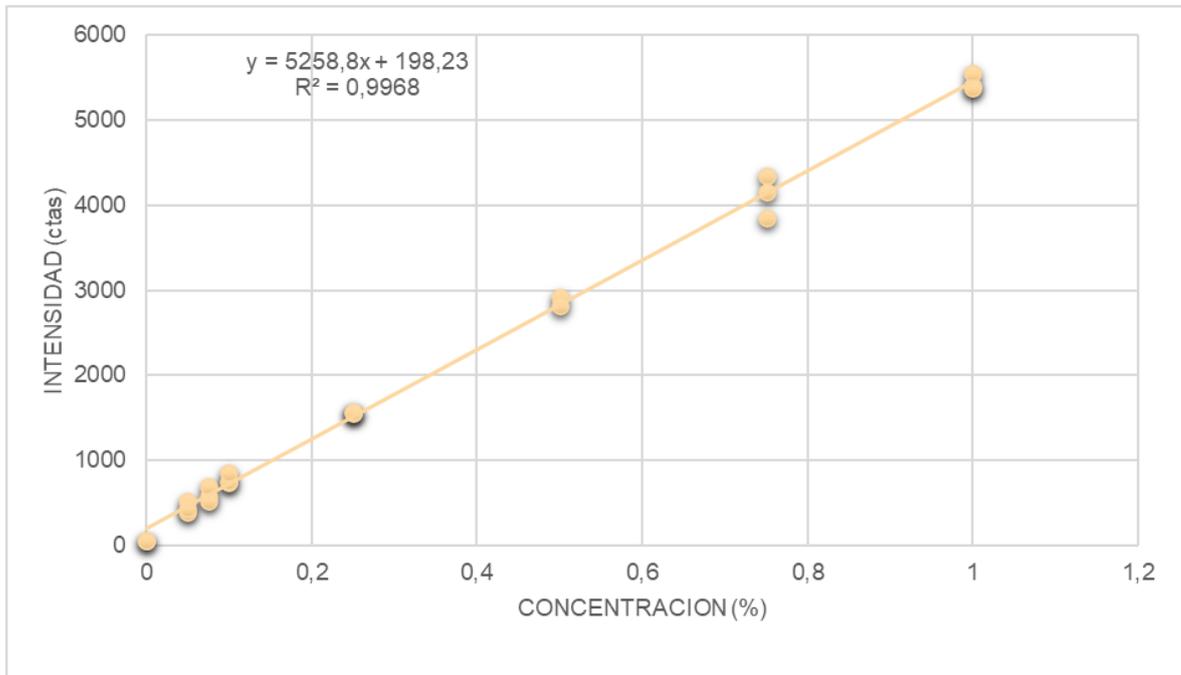


Figura 11. Curva de calibración DOC.

Analizando los resultados obtenidos para los tratamientos propuestos, se evidencio que T3 (2ml de HNO₃ 2M + 2ml H₂O₂ 30%) permite al proceso de pretratamiento una mayor sustentabilidad desde el punto de vista ambiental debido al empleo de ácidos diluidos en concordancia con los principios de la QAV. En cuanto a los diferentes tipos de radiación empleados, la más beneficiosa fue la empleada en DP, debido a que el tratamiento de muestras puede realizarse en un tiempo notablemente menor comparado al tiempo empleado en IR. Respecto a T3 con US se descartó ya que la digestión no fue total. Comparando los siete tratamientos evaluados para US los mejores resultados se obtuvieron para T2 sin embargo no es eficiente la digestión quedando muestra sin digerir, lo que dificulta su posterior análisis por MIP OES ya que habría problemas de obturación del nebulizador, por ende, una mala eficiencia de nebulización, finalizando en una mala atomización, lo que conduciría a resultados no confiables; sumado al HNO₃ 7M empleado que lo hace menos sustentable.

Las figuras 12 y 13 muestran los extractos obtenidos por DP e IR empleando T3. La figura 14 muestra los extractos obtenidos empleando US-T2.

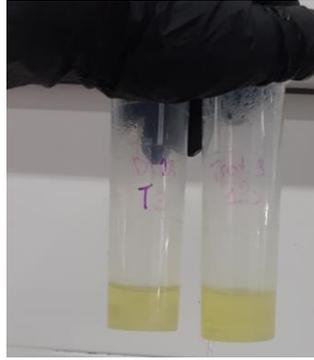


Figura 12. Extractos finales por DP-T3.

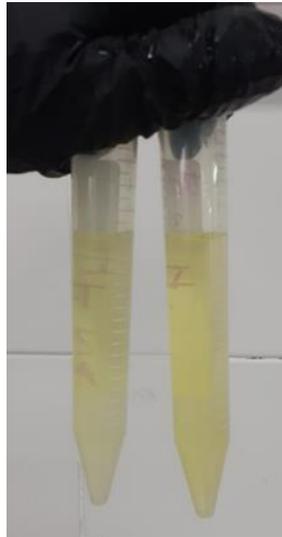


Figura 13. Extractos finales por IR-T3.



Figura 14. Extractos finales por US-T2.

3.2 Desempeño analítico

De acuerdo a lo expresado en la sección 3.1, 0.25 g de muestra fueron sometidos a una digestión empleando 2 ml de HNO₃ 2M y 2 ml de H₂O₂ 30%. Se utilizó para la validación del método de digestión propuesto, un material de referencia certificado de Hígado Bovino: RM-Agro E3001a, tal como se expresa en la sección 2.1.3, sometiéndolo al mismo procedimiento de digestión para evaluar el desempeño.

Mediante MIP OES se cuantificaron diez analitos clasificados en microelementos (Cu, Mn, Mo y Zn) y en macroelementos (Ca, K, Mg, Na, Fe y P). En las tablas 4 y 5 se muestran las longitudes de onda empleadas para la determinación de cada analito, ecuaciones de la recta y coeficiente de correlación (R^2) obtenidos. Las cifras de mérito obtenidas se presentan en la tabla 6 para microelementos y en la tabla 7 para macroelementos.

Tabla 4. Longitudes de onda empleadas en la determinación, ecuaciones de la recta y coeficiente de correlación (R^2) para microelementos.

Elemento	λ (nm)	Pendiente	Ordenada	R^2
Cu	324,75	116854	18	1,00
Mn	403,08	51777	-108	1,00
Mo	379,83	40899	-149	1,00
Zn	213,86	11821	1933	0,99

Tabla 5. Longitudes de onda empleadas en la determinación, ecuaciones de la recta y coeficiente de correlación (R^2) para macroelementos.

Elemento	λ (nm)	Pendiente	Ordenada	R^2
Ca	393,37	490178	41184	0,99
K	769,00	18548	85	0,99
Mg	285,21	224284	5271	1,00
Na	588,00	228404	-28820	0,99
Fe	371,99	7371	1937	1,00
P	214,00	106	2	1,00

Se observaron recuperaciones entre 81 y 114 % para los analitos minoritarios determinados (tabla 6) y recuperaciones entre 81 y 103 % para los analitos mayoritarios (tabla 7).

Tabla 6. Cifras de mérito para microelementos.

Analito	LOD (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)	Recuperación (%)	RSD (%)
Cu	0,02	0,06	96	0,10
Mn	0,02	0,05	114	0,29
Mo	0,01	0,04	81	0,17
Zn	0,02	0,05	98	0,30

Tabla 5. Cifras de mérito para macroelementos.

Analito	LOD (mg kg⁻¹)	LOQ (mg kg⁻¹)	Recuperación (%)	RSD (%)
Ca	0,16	0,48	103	0,56
K	0,25	0,76	92	0,46
Mg	0,09	0,26	99	0,47
Na	0,12	0,35	99	3,51
Fe	0,86	2,60	92	1
P	1,09	3,30	86	1

Las concentraciones de los 10 analitos evaluados en el MR se determinaron por MIP OES, y se muestran en la Tabla 8, como el promedio de cada una de las muestras \pm su IC. Como se puede observar, el promedio en mg kg⁻¹ de cada elemento, coincide con los valores tabulados en RM-Agro E3001a.

Tabla 8. Concentraciones de los analitos estudiados obtenidos por el método propuesto vs el MR de hígado bovino

Elementos	Método Propuesto			MR		
Cu (mg kg⁻¹)	235,26	\pm	0,98	246,26	\pm	34,1
Mn (mg kg⁻¹)	9,23	\pm	0,10	8,11	\pm	1,17
Mo (mg kg⁻¹)	3,07	\pm	0,06	3,79	\pm	0,37
Zn (mg kg⁻¹)	161,38	\pm	1,46	164,44	\pm	29,21
Ca (mg kg⁻¹)	394,53	\pm	11,32	186,07	\pm	61,26
K (mg kg⁻¹)	10967,36	\pm	718,13	11440	\pm	1850
Mg (mg kg⁻¹)	705,67	\pm	22,61	706,98	\pm	236,55
Na (mg kg⁻¹)	2623,00	\pm	836,52	2600	\pm	370
Fe (mg kg⁻¹)	162,25	\pm	3,85	206,96	\pm	49,37
P (mg kg⁻¹)	11964,05	\pm	377,52	14370	\pm	6670

3.3 Métricas verdes

Se aplicaron como método de evaluación de verdor para el método de pretratamiento propuesto las métricas de AGREE y AGREEprep, obteniendo un puntaje de 0,61 y de 0,6 respectivamente (Figura 14). En las Tablas 9 y 10 pueden visualizarse los puntajes obtenidos mediante cada etapa del análisis de acuerdo a AGREE y AGREEprep respectivamente.

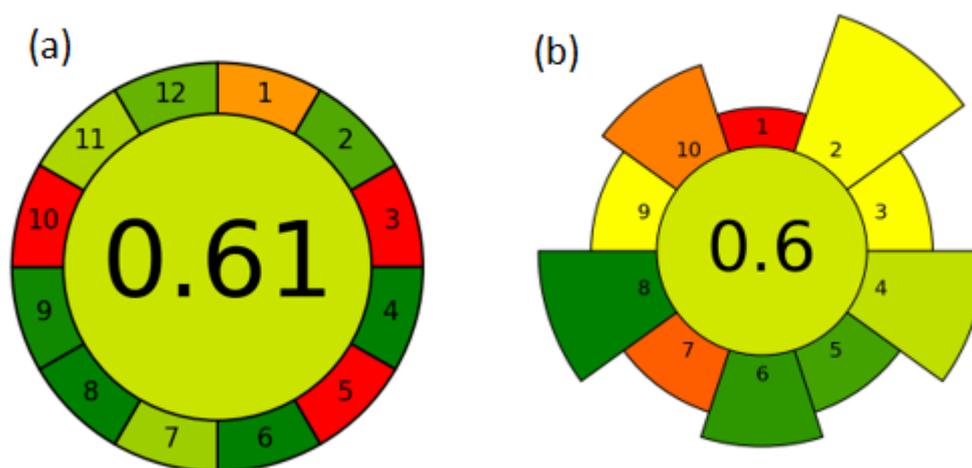


Figura 14. Gráficos circulares AGREE (a) y AGREEprep (b).

Tabla 9. Métrica AGREE.

Criterios	Puntaje
1 Muestreo	0,30
2 Cantidad de muestra	0,85
3 Posicionamiento del dispositivo	0,00
4 Etapas de preparación de muestra	1,00
5 Automatización y miniaturización	0,00
6 Derivatización	1,00
7 Cantidad de residuos	0,69
8 Determinación de múltiples analitos y rendimiento de muestras	1,00
9 Consumo de energía	0,97
10 Naturaleza del reactivo	0,00
11 Toxicidad	0,66
12 Seguridad del operador	0,80

Tabla 10. Métrica AGREEprep.

Criterios	Puntaje
1 Colocación de la preparación de la muestra	0,00
2 Materiales peligrosos	0,51
3 Sustentabilidad y renovabilidad	0,50
4 Residuos	0,63
5 Cantidad de muestra	0,87
6 Rendimiento de muestra (muestra hs^{-1})	0,91
7 Integración y automatización	0,19
8 Consumo de energía	1,00
9 Equipamiento utilizado posterior al pretratamiento de muestra	0,50
10 Seguridad del operador	0,25

Se observa que para la herramienta AGREE el método propuesto presenta falencias en los criterios 1, 3, 5 y 10, esto ocurre porque se hace un pretratamiento de muestra, el muestreo es “ex situ” y el método empleado no es automatizado sino manual; además el HNO_3 no es obtenido de una fuente renovable. AGREEprep pone en evidencia las falencias en los criterios 1, 7 y 10 debido a que la preparación de la muestra es “ex situ”, la preparación manual se realiza en tres pasos y el HNO_3 posee tres pictogramas de seguridad. Los puntos 4 y 6 fueron por excelencia los mejores puntuados (AGREEprep) junto al 2 y al 9 por la métrica AGREE, en estos puntos se destaca la pequeña cantidad de muestra utilizada, los pocos pasos de preparación de la muestra, la ausencia de derivatización y el bajo consumo de energía. La cantidad de muestra, el rendimiento y el bajo consumo de energía son también los puntos elegidos y mejor puntuados en AGREEprep. De esta manera si bien los resultados no están cerca del óptimo de 1, muestran una adecuada performance del método propuesto al compararlo con otros presentes en la bibliografía.

3.4 Aplicación analítica

Una vez validado el método propuesto de DP-MIP OES, se procedió a analizar muestras reales (sección 1.5.3). Para ello se evaluaron un total de 31 muestras de carne de cerdo por triplicado. En la Tabla 11 se presentan las concentraciones de los microelementos y en la Tabla 12 las concentraciones de los macroelementos en las muestras obtenidas mediante DP-MIP OES. Como puede observarse, las concentraciones de Cu y Mn para algunas muestras se encuentran por debajo del LOD, lo que podría significar una deficiencia de

estos al momento de su consumo. Para Mo en todas las muestras analizadas las concentraciones fueron inferiores al LOD.

Tabla 11. Concentraciones de los microelementos presentes en las muestras

Muestras	Cu			Mn			Zn		
	(mg kg ⁻¹)			(mg kg ⁻¹)			(mgkg ⁻¹)		
504	2,17	±	0,04	0,60	±	0,01	58,8	±	0,8
508	1,90	±	0,02	0,64	±	0,01	55,3	±	0,7
509	2,24	±	0,01	0,67	±	0,01	60,6	±	0,7
511	1,92	±	0,01	0,58	±	0,01	53,7	±	0,5
512	1,68	±	0,03	0,67	±	0,01	63,7	±	0,5
513	2,56	±	0,02	0,84	±	0,02	62,2	±	0,5
514	1,96	±	0,03	0,51	±	0,01	52,7	±	0,6
515	14,58	±	0,08	0,50	±	0,01	58,5	±	0,6
516	1,78	±	0,01	0,47	±	0,00	46,5	±	0,6
517	0,85	±	0,02	<LOD			49,7	±	0,4
518	0,80	±	0,02	<LOD			52,6	±	0,3
519	0,22	±	0,03	<LOD			54,5	±	0,4
520	1,69	±	0,03	<LOD			56,2	±	0,4
521	0,56	±	0,02	<LOD			46,1	±	0,4
522	2,47	±	0,02	<LOD			57,1	±	0,3
523	1,39	±	0,02	<LOD			52,5	±	0,1
524	0,38	±	0,03	<LOD			56,0	±	0,4
525		<LOD		<LOD			54,0	±	0,2
526	0,19	±	0,01	<LOD			57,8	±	0,5
527	0,17	±	0,01	<LOD			49,0	±	0,3
528	0,18	±	0,05	<LOD			52,4	±	0,3
529		<LOD		<LOD			54,1	±	0,3
530	0,75	±	0,03	<LOD			50,7	±	0,2
531	0,33	±	0,02	<LOD			55,9	±	0,4
532	1,84	±	0,04	0,35	±	0,01	34,5	±	0,1
533	5,34	±	0,04	0,57	±	0,01	51,8	±	0,5
534	7,05	±	0,09	0,52	±	0,01	55,6	±	0,3
535	3,74	±	0,07	0,63	±	0,01	53,1	±	0,3
536	9,05	±	0,09	0,60	±	0,01	56,2	±	0,2
537	2,90	±	0,07	0,53	±	0,01	50,6	±	0,3
5010	5,94	±	0,05	0,67	±	0,01	75,4	±	0,3

Tabla 12. Concentraciones de los macroelementos presentes en las muestras.

Muestras	K (mg kg⁻¹)			Mg (mg kg⁻¹)			Na (mg kg⁻¹)			Ca (mg kg⁻¹)			P (mg kg⁻¹)			Fe (mg kg⁻¹)		
504	19317	±	1887	2753	±	9	3195	±	33	4237	±	372	5438	±	69	56	±	1
508	16587	±	1873	424	±	48	3179	±	208	6369	±	388	5737	±	935	52	±	1
509	17491	±	1022	408	±	32	2540	±	303	1243	±	52	5602	±	532	59	±	3
511	18525	±	132	400	±	6	2484	±	5	1241	±	58	5840	±	12	61	±	1
512	17730	±	802	1681	±	48	2942	±	218	1241	±	50	5555	±	167	61	±	1
513	21298	±	109	1642	±	8	3510	±	290	1241	±	50	6033	±	144	64	±	1
514	17604	±	1001	413	±	51	2816	±	110	1234	±	52	5612	±	73	58	±	1
515	15299	±	1338	357	±	7	2949	±	196	1240	±	50	5309	±	142	55	±	1
516	16617	±	1277	489	±	5	1880	±	51	1212	±	54	5523	±	267	53	±	1
517	16634	±	1119	395	±	25	2138	±	38	3600	±	253	4787	±	170	53	±	1
518	25483	±	2269	794	±	3	3736	±	117	30488	±	677	5449	±	298	57	±	1
519	16775	±	1063	736	±	100	2312	±	110	4970	±	102	5704	±	125	56	±	1
520	17480	±	1257	2936	±	238	2257	±	8	21970	±	3067	5556	±	384	53	±	3
521	16234	±	1747	4298	±	990	5556	±	214	10501	±	176	5417	±	52	61	±	2
522	14985	±	4224	1778	±	7	5764	±	53	16579	±	100	5837	±	823	58	±	3
523	18458	±	2008	5797	±	516	3265	±	47	38491	±	1849	5314	±	239	58	±	5
524	13691	±	1329	5005	±	42	4897	±	145	11677	±	113	4940	±	78	52	±	1
525	12744	±	1739	1498	±	11	2330	±	251	6983	±	1117	5603	±	259	56	±	3
526	16879	±	63	2862	±	11	2726	±	31	31847	±	147	6696	±	11	60	±	1
527	14797	±	1593	964	±	52	2940	±	69	3258	±	249	5753	±	427	55	±	1
528	12811	±	1528	941	±	34	2349	±	203	3587	±	211	5503	±	118	56	±	1
529	13307	±	1106	1115	±	180	2886	±	440	9829	±	613	5987	±	109	57	±	1
530	13620	±	1838	1091	±	149	2621	±	52	6076	±	254	6321	±	18	59	±	3
531	16114	±	1598	3600	±	7	3093	±	44	14224	±	114	5565	±	758	61	±	2
532	12034	±	1368	950	±	71	1922	±	191	7977	±	840	5506	±	40	50	±	3
533	5912	±	19	400	±	7	1019	±	14	5352	±	47	7017	±	34	75	±	3

534	13916	±	1434	3603	±	919	2472	±	221	15508	±	1835	5520	±	183	58	±	2
535	12618	±	777	1206	±	358	1894	±	36	17973	±	3294	5483	±	64	54	±	1
536	11979	±	551	792	±	49	1820	±	264	6479	±	294	5767	±	582	58	±	5
537	11283	±	726	1159	±	406	1508	±	228	9641	±	2926	5502	±	230	61	±	2
5010	11110	±	174	2038	±	141	2239	±	154	10081	±	1861	5718	±	230	64	±	2



CAPITULO IV

CONCLUSIONES

4. Conclusiones

El método de preparación de muestras propuesto con DP como fuente de calentamiento es una alternativa simple, rápida, económica y verde para la determinación multielemental de Cu, Mn, Mo, Zn, Ca, Fe, K, P, Na y Mg empleando MIP OES, en muestras de carne porcina.

Este pretratamiento de muestras complejas, con elevada carga orgánica, a través del empleo de DP como fuente de descomposición fue eficiente ya que se generó una descomposición completa del material orgánico sin contenido de carbono residual y una baja acidez en el digesto final. Además, la utilización de pequeños volúmenes de ácido nítrico diluido, lo hace “amigable con el ambiente” evaluado a través de dos índices verdes.

BIBLIOGRAFIA:

- [1] Informes técnicos | Coninagro, (n.d.). <https://www.coninagro.org.ar/informes-tecnicos/> (accessed October 7, 2023).
- [2] D.L.R. Novo, R.M. Pereira, V.C. Costa, C.A. Hartwig, M.F. Mesko, A novel and eco-friendly analytical method for phosphorus and sulfur determination in animal feed, *Food Chem.* 246 (2018) 422–427. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.11.036>.
- [3] C.A. Kan, G.A.L. Meijer, The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed, *Anim Feed Sci Technol.* 133 (2007) 84–108. <https://doi.org/10.1016/J.ANIFEEDSCI.2006.08.005>.
- [4] tablas-brasilec3b1as-aves-y-cerdos-cuarta-edicion-2017-11, (n.d.).
- [5] Capítulo 10: Minerales. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, (n.d.).
- [6] O.Y. Song, M.A. Islam, J.H. Son, J.Y. Jeong, H.E. Kim, L.S. Yeon, N. Khan, N. Jamila, K.S. Kim, Elemental composition of pork meat from conventional and animal welfare farms by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) and ICP-mass spectrometry (ICP-MS) and their authentication via multivariate chemometric analysis, *Meat Sci.* 172 (2021) 108344. <https://doi.org/10.1016/J.MEATSCI.2020.108344>.
- [7] M.S. Islam, M.K. Ahmed, M. Habibullah-Al-Mamun, Heavy metals in cereals and pulses: Health implications in Bangladesh, *J Agric Food Chem.* 62 (2014) 10828–10835. https://doi.org/10.1021/JF502486Q/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JF-2014-02486Q_0003.GIF.
- [8] C.M. Placinta, J.P.F. D’Mello, A.M.C. MacDonald, A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins, *Anim Feed Sci Technol.* 78 (1999) 21–37. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(98\)00278-8](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(98)00278-8).
- [9] Henryk Matusiewicz, *Sample Preparation for Inorganic Trace Element Analysis*, (2017).
- [10] R. Richter -JA Nóbrega -C Pirola, *Clean Chemistry Tools for Atomic Spectroscopy* Milestone Press, n.d.

- [11] J.M. Kokosa, Advances in solvent-microextraction techniques, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 43 (2013) 2–13. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2012.09.020>.
- [12] D. Martínez-Rubio, G. Grindlay, M. Llaver, R.G. Wuilloud, J. Mora, Development of preconcentration strategies for the simultaneous ultratrace determination of As, Cd and Pb in foods by ICP-OES: knotted-reactor vs. dispersive liquid–liquid microextraction, *J Anal At Spectrom*. 35 (2020) 933–942. <https://doi.org/10.1039/C9JA00427K>.
- [13] R. Serrano, G. Grindlay, L. Gras, J. Mora, Evaluation of calcium-, carbon- and sulfur-based non-spectral interferences in high-power MIP-OES: comparison with ICP-OES, *J Anal At Spectrom*. 34 (2019) 1611–1617. <https://doi.org/10.1039/C9JA00148D>.
- [14] S.C. Cunha, J.O. Fernandes, Extraction techniques with deep eutectic solvents, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 105 (2018) 225–239. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2018.05.001>.
- [15] M. Serhan, M. Sprowls, D. Jackemeyer, M. Long, I.D. Perez, W. Maret, N. Tao, E. Forzani, Total iron measurement in human serum with a smartphone, in: *AICHE Annual Meeting, Conference Proceedings, American Institute of Chemical Engineers*, 2019. <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>.
- [16] Microwave Induced Plasma Analytical Spectrometry - Krzysztof J. Jankowski, Edward Reszke - Google Libros, (n.d.). https://books.google.com.ar/books?id=t_eSzNoUvjkC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false (accessed October 7, 2023).
- [17] A.N.S. Dantas, W.O. Matos, S.T. Gouveia, G.S. Lopes, The combination of infrared and microwave radiation to quantify trace elements in organic samples by ICP OES, *Talanta*. 107 (2013) 292–296. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2013.01.047>.
- [18] Analytical Applications of Ultrasound - F. Priego Capote, M.D. Luque de Castro - Google Libros, (n.d.). <https://books.google.co.ve/books?id=IQn1rlshrYMC&printsec=copyright#v=onepage&q&f=false> (accessed October 7, 2023).
- [19] G. Dugo, G. di Bella, R. Rando, M. Saitta, Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples, *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*:

- Analytical Techniques for Scientists. (2012) 495–519. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00146-0>.
- [20] W. Alahmad, S.I. Kaya, A. Cetinkaya, P. Varanusupakul, S.A.A. Ozkan, Green chemistry methods for food analysis: Overview of sample preparation and determination, *Advances in Sample Preparation*. 5 (2023) 100053. <https://doi.org/10.1016/J.SAMPRE.2023.100053>.
- [21] F. Sendra Portelo, M. Martinez Morrillo, *RADIACION INFRARROJA*, (2019).
- [22] F. Cora Jofre, S.M. Azcarate, J.M. Camiña, P. Pacheco, M. Savio, Assessing the greenness of optimized ultrasound and infrared assisted extraction through analytical metrics, *Advances in Sample Preparation*. 5 (2023) 100054. <https://doi.org/10.1016/J.SAMPRE.2023.100054>.
- [23] G.M. C Nindo, *Infrared Heating of Food and Agricultural Processing*, CRC Press, Nueva York, 2010.
- [24] C.A. Bizzi, M.F. Pedrotti, J.S. Silva, J.S. Barin, J.A. Nóbrega, E.M.M. Flores, Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques, *J Anal At Spectrom*. 32 (2017) 1448–1466. <https://doi.org/10.1039/C7JA00108H>.
- [25] J.P.S. Oliveira, F.L.F. Silva, R.J.G. Monte, W.O. Matos, G.S. Lopes, A new approach to mineralization of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) for trace element analysis by flame atomic absorption spectrometry, *Food Chem*. 224 (2017) 335–341. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.12.096>.
- [26] C.N. Carneiro, F. de S. Dias, Multiple response optimization of ultrasound-assisted procedure for multi-element determination in Brazilian wine samples by microwave-induced plasma optical emission spectrometry, *Microchemical Journal*. 171 (2021) 106857. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2021.106857>.
- [27] V. Alves, J.K. de Andrade, M.L. Felsner, Green and fast ultrasound-assisted extraction procedures for Fe, Mn, Mg and Ca analysis in cane syrups by FAAS, *Journal of Food Composition and Analysis*. 123 (2023) 105495. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2023.105495>.
- [28] B.D. Neher, S.M. Azcarate, J.M. Camiña, M. Savio, Nutritional analysis of Spirulina dietary supplements: Optimization procedure of ultrasound-assisted digestion for

- multielemental determination, *Food Chem.* 257 (2018) 295–301. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.03.011>.
- [29] Sistemas para digestión y evaporación, n.d. www.scpscience.com.
- [30] C. Lomonte, A. Doronila, D. Gregory, A.J.M. Baker, S.D. Kolev, Chelate-assisted phytoextraction of mercury in biosolids, *Science of The Total Environment*. 409 (2011) 2685–2692. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2011.03.037>.
- [31] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 50 (2013) 78–84. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2013.04.010>.
- [32] F. Pena-Pereira, M. Tobiszewski, W. Wojnowski, E. Psillakis, A Tutorial on AGREEprep an Analytical Greenness Metric for Sample Preparation, *Advances in Sample Preparation*. 3 (2022) 100025. <https://doi.org/10.1016/J.SAMPRE.2022.100025>.
- [33] M.S. Imam, M.M. Abdelrahman, How environmentally friendly is the analytical process? A paradigm overview of ten greenness assessment metric approaches for analytical methods, *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 38 (2023) e00202. <https://doi.org/10.1016/J.TEAC.2023.E00202>.
- [34] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software, *Anal Chem*. 92 (2020) 10076–10082. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>.
- [35] MP-AES, Microwave Plasma, Agilent MP-AES Instruments | Agilent, (n.d.). <https://www.agilent.com/en/product/atomic-spectroscopy/microwave-plasma-atomic-emission-spectroscopy-mp-aes> (accessed October 7, 2023).
- [36] J. Uhrovčík, Strategy for determination of LOD and LOQ values – Some basic aspects, *Talanta*. 119 (2014) 178–180. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2013.10.061>.
- [37] J.A. Nóbrega, C. Pirola, L.L. Fialho, G. Rota, C.E.K.M.A. De Campos Jordão, F. Pollo, Microwave-assisted digestion of organic samples: How simple can it become?, *Talanta*. 98 (2012) 272–276. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2012.06.079>.

- [38] F. Cora Jofre, D.N. Larregui, V.N. Murcia, P. Pacheco, M. Savio, Infrared assisted digestion used as a simple green sample preparation method for nutrient analysis of animal feed by microwave induced plasma atomic emission spectrometry, *Talanta*. 231 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122376>.
- [39] L. São Bernardo Carvalho, C. Santos Silva, J. Araújo Nóbrega, E. Santos Boa Morte, D.C. Muniz Batista Santos, M.G. Andrade Korn, Microwave induced plasma optical emission spectrometry for multielement determination in instant soups, *Journal of Food Composition and Analysis*. 86 (2020) 103376. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2019.103376>.