

**VERIFICACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE PLOMO EN
MATRIZ VINO UTILIZANDO EL MÉTODO DE ADICIÓN
ESTÁNDAR POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN
ATÓMICA.**

Tesis

PARA OBTENER EL GRADO DE LICENCIADA EN BROMATOLOGÍA

Autora: Brom. Alfonsina M. Calcagno

Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo

Mendoza, setiembre de 2.022

VERIFICACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE PLOMO EN MATRIZ VINO UTILIZANDO EL MÉTODO DE ADICIÓN ESTÁNDAR POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

Autora: Brom. Alfonsina Calcagno.

calcagno@inti.gob.ar

Directora: Lic. Patricia Lucero plucero@inti.gob.ar

Codirectora: Lic. Analía Valdes avaldes@fca.uncu.edu.ar

Comité evaluador: Dra. Lic. Brom. Andrea ANTONIOLLI

Vocales: Dra. Lic. en Brom. Adriana GIMÉNEZ

Mgter. Lic. Brom. Nora MARTINENGO

RESUMEN

El presente trabajo describe la metodología recomendada por el Organismo Internacional del Vino (OIV) para determinar plomo en la matriz vino mediante espectrofotometría de Absorción Atómica por Adición Estándar.

La hipótesis planteada “Es posible verificar la puesta a punto una metodología analítica para la determinación de plomo mediante atomización electrotérmica, utilizando la técnica de Adición Estándar, en muestras de vinos tintos”, en concordancia con el objetivo principal establecido, el cual se describe a continuación: Verificar la puesta a punto de la técnica de Adición Estándar por Espectrofotometría de Absorción Atómica para la determinación de plomo en vino tinto, son el eje del presente trabajo.

Las muestras, provistas por el cliente, se analizaron por duplicado, correspondiendo cada análisis individual a un analista. El motivo principal de esta modalidad de análisis se basa en el aprovechamiento de los recursos utilizados: gases, hornos de grafito, insumos, horas hombre. Se puso a punto el equipo analítico realizando la técnica de Adición Estándar y se realizaron los estudios de los resultados obtenidos para verificar la aptitud del método, mediante el análisis del coeficiente de correlación r , la prueba de hipótesis para la pendiente del método, y el coeficiente de determinación R^2 . Se analizó también el porcentaje de recuperación del método.

De acuerdo al objetivo planteado, se concluye del presente trabajo, que la técnica de Adición Estándar por Espectrofotometría de Absorción Atómica, para el espectrofotómetro modelo A 7000 que se encuentra en el Laboratorio de Instituto Nacional de Tecnología Industrial región Cuyo (INTI Cuyo), es apta para determinar plomo en vino para el alcance estudiado.

ABSTRACT

The present paper describes the methodology recommended by the OIV to determine lead in the wine matrix by Means of Atomic Absorption Spectrophotometry by Standard Addition.

The hypothesis raised "It is possible to verify the development of an analytical methodology for the determination of lead by electrothermal atomization, using the Standard Addition technique, in samples of red wines", in accordance with the main objective established, which is described below: Verifying the development of the Technique of Standard Addition by Atomic Absorption Spectrophotometry for the determination of lead in red wine, are the axis of this work.

The samples, provided by the client, were analyzed in duplicate, each individual analysis corresponding to an analyst. The main reason for this type of analysis is based on the use of the resources used: argon gas, graphite furnaces, inputs, man hours. The analytical equipment was developed by performing the Standard Addition technique and the studies of the results obtained were carried out to verify the aptitude of the method, through the analysis of the correlation coefficient r , the hypothesis test for the slope of the method, and the coefficient of determination R^2 .

According to the stated objective, it is concluded from this work that the technique of Standard Addition by Atomic Absorption Spectrophotometry, for the spectrophotometer model A 7000 that is in the Laboratory of the National Institute of Industrial Technology Cuyo region (INTI Cuyo), is suitable to determine lead in wine for the scope studied.

PALABRAS CLAVES

Espectrofotometría de Absorción Atómica, Adición Estándar, plomo, vino

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a mi familia, siempre tan presente. A mis amigos que me empujaron crónicamente a lograr este postergado objetivo. A Martina, mi motor. A Laurita y a Beppino. Y a Dios por llevarme siempre amorosamente en sus manos.

- Índice:

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1- El plomo y la determinación analítica adecuada.	1
1.2- Importancia y naturaleza del estudio y su relación con otros semejantes.	1
1.2.1- Reseña de los metales pesados en la naturaleza	1
1.2.2- El plomo y su toxicidad	2
1.2.2.1- Fuentes de exposición al plomo	3
1.2.2.2- Toxicología del plomo	3
1.2.2.3- Toxicocinética del plomo	4
1.2.2.2- Toxicodinamia del plomo	5
1.2.3- Plomo en alimentos	6
1.2.4- Legislación alimentaria sobre plomo	6
1.2.5- Niveles de plomo detectados en alimentos	7
1.3- Absorción Atómica para detectar plomo: Fundamentos	8
1.3.1- Aplicaciones y principales características de la Absorción Atómica	9
1.3.1.1- Etapas que se producen en el horno de grafito.....	10
1.3.2- ¿Qué es la Adición Estándar?	11
1.4- Objetivos del trabajo.....	14
1.4.1- Objetivo general	14
1.4.2- Objetivos particulares	14
1.5- Hipótesis del trabajo.....	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS	14
2.1- Materiales	14
2.2- Método.....	15
1.2.1- Acondicionamiento del equipo	15
2.2.1.1- Condiciones experimentales del Espectrofotómetro	15
2.2.1.2- Programa del Horno: Rampa.....	16
2.2.1.3- Parámetros de medición	16
2.2.2- Muestra	16
2.2.2.1- Muestreo	16
2.2.2.1- Preparación de las muestras	17
2.2.3- Preparación de la curva	17
2.2.4- Lectura de la muestra	18
2.2.5- Análisis de los datos	19
2.2.5.1- Análisis del coeficiente de correlación (r)	19
2.2.5.2- Prueba de hipótesis sobre los parámetros del modelo.....	19
2.2.5.3- Análisis del coeficiente de determinación R^2	20
2.2.5.4- Recuperación.....	20
2.3- Resultado y discusión	21

2.3.1- Análisis del coeficiente de correlación (r)	21
2.3.2- Prueba de hipótesis sobre los parámetros del modelo	23
2.3.3- Análisis del coeficiente de determinación R^2	24
2.3.4- Recuperación	24
2.4- Conclusiones	25
Bibliografía	26
Anexos	29
Anexo 1: Imagen del análisis de la muestra 10	29
Anexo 2: Certificado del patrón de plomo	32
Anexo 3: tabla de la distribución t de Student	33

Abreviaturas:

CE: Comunidad Europea

EAA: Espectrofotometría de Absorción Atómica

FAO/OMS: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación/Organización Mundial de la Salud

INV: Instituto Nacional de Vitivinicultura

K: Potasio

mg/L: miligramos por litro

Na: Sodio

Pb: plomo

pg: picogramo

ppb: parte por billón

ppm: parte por millón

PTWI: Provisional Tolerable Weekly Intake

Sb: antimonio

Sn: estaño

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El plomo y la determinación analítica adecuada.

En el presente trabajo se realiza la puesta a punto del método de Determinación de Plomo por Espectrofotometría de Absorción Atómica en vino, utilizando el método de Adición Estándar, utilizando un espectrofotómetro Marca Shimadzu modelo A7000.

En nuestro país, el organismo regulador de la industria vitivinícola, es el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV). El mismo establece, en la Resolución 135/2018, como límite máximo de plomo en el vino un valor de 0,15 mg/L, el cual debe ser respetado, para que este producto pueda ser comercializado tanto en el mercado interno como en el externo. (Instituto Nacional de Vitivinicultura [INV], s.f.).

En el vino, la detección y determinación de plomo requiere una metodología particular debido a la matriz estudiada, ya que ésta presenta interferencias que dificultan el análisis y detección de la cantidad real del metal mencionado. Es por ello que se plantea el uso de una metodología adecuada cuyo fin es disminuir el efecto matriz, efecto que se explica en el apartado 1.3 “Absorción Atómica para detectar plomo: Fundamentos”.

1.2- Importancia y naturaleza del estudio y su relación con otros semejantes.

1.2.1- Reseña de los metales pesados en la naturaleza

Los elementos presentes en la naturaleza han resultado de gran utilidad para el desarrollo de la civilización. Los metales, que representan aproximadamente el 75% de la corteza terrestre, han sido particularmente útiles para el avance de la humanidad. Tal es así que determinados periodos históricos se identifican de acuerdo con la posibilidad técnica de manejo de estos metales, por ejemplo, la Edad de Bronce o la Edad de Hierro. (Grassi, 2015).

La aparición de la agricultura y la ganadería incrementaron los problemas ambientales, tal como se documenta en las ciudades griegas o romanas. Durante el imperio Romano, grandes cantidades de metales pesados fueron requeridos para sustentar el elevado nivel de vida. Especialmente plomo (>80.000 ton/año), cobre (15.000 ton/año), cinc (10.000 ton/año) y mercurio (>2 ton/año). Durante esta época, se produjeron derrames de grandes cantidades

de minerales en las operaciones mineras, resultando en sustanciales emisiones de metales pesados al ambiente. (Grassi, 2015).

Las transformaciones del medio ambiente dan un salto cualitativo a partir de la revolución industrial. Desde ese momento, la intensificación en la explotación de los recursos naturales, el reemplazo de fuentes de energía renovable por combustibles fósiles, la introducción de nuevos componentes de mayor o menor toxicidad debido a sus diferentes ventajas tecnológicas, explican la degradación producida al medio ambiente. En el caso particular de los metales pesados, la revolución industrial marca el comienzo de un consumo sin precedentes de este recurso, el cual se incrementa en forma exponencial, tanto en masa como en número de elementos tóxicos utilizados. El 90% de las emisiones de cadmio, cobre, plomo, níquel y cinc se produjeron en el último siglo. Las emisiones de metales pesados aumentaron rápidamente a partir de la segunda guerra mundial. Cada metal en particular tiene una variación espacio temporal propia dependiendo de la proximidad a la fuente de contaminación y de la aplicación de determinadas tecnologías. En particular, a partir de los años 70' las emisiones de plomo aumentan un orden de magnitud debido a la utilización de combustibles con antidetonantes formulados en base a este metal. Sin embargo, una vez producido el reemplazo de este aditivo en los combustibles las emisiones de plomo al medio ambiente fueron disminuidas sustancialmente. (Grassi, 2015).

1.2.2- El plomo y su toxicidad

El plomo es un elemento químico de símbolo Pb (del latín plumbum) y número atómico 82 en la Tabla Periódica, que se ubica en el grupo 14. Se trata de un elemento metálico muy particular. Dada su enorme flexibilidad y capacidad de reacción química, es de enorme uso. El plomo es un metal pesado no esencial ya conocido en Egipto al menos 4.000 años antes de Cristo. Sus aleaciones con antimonio y estaño se remontan a la antigüedad. Los efectos tóxicos del plomo fueron descritos hace más de 2.000 años por Nicander, un poeta griego quien escribió sobre una enfermedad conocida como plumbismo, causada por una intoxicación aguda por plomo. Posteriormente, a la intoxicación por plomo se le llamó saturnismo porque la alquimia consideraba al plomo como el origen de los demás metales, y por ello fue dedicado al dios Saturno. La clase dirigente romana padeció saturnismo debido a la conservación de ciertos alimentos en recipientes de cobre recubiertos interiormente con planchas de plomo. El plomo tiene la capacidad de bioacumularse por lo que su concentración en plantas y animales se magnifica a lo largo de la cadena alimentaria. (Gutiérrez et al., 2004).

El uso y la polución ambiental por plomo han aumentado enormemente en los últimos 50 años como se manifiesta en las capas secuenciales de hielo de Groenlandia. En 1780, en

los comienzos de la Revolución Industrial, 1 g de hielo contenía 10 pg de plomo. Doscientos años más tarde, la concentración de plomo en 1 g de hielo era 20 veces superior (200 pg), con mayores incrementos a partir de 1940. En la era de la Revolución Industrial, la intoxicación por plomo se convirtió en un problema de la Medicina Ocupacional, pues el mayor número de intoxicados eran operarios de ciertas industrias que manipulaban plomo. También muchos pintores, entre ellos Goya, sufrieron intoxicaciones por el repetido contacto con pinturas a base de plomo. Hoy en día, sin embargo, preocupa principalmente la exposición alimentaria a este metal. (Gutiérrez et al., 2004).

1.2.2.1-Fuentes de exposición al plomo

El plomo y sus derivados se encuentran en todas partes del medio ambiente, por ejemplo, en el aire, en las plantas y animales de uso alimentario, en el agua de la bebida, en los ríos, océanos y lagos, en el polvo, en el suelo, etc. El agua de mar contiene entre 0,003 y 0,20 mg/L de plomo por lo que las concentraciones de este metal en aguas marinas contribuyen a la contaminación de los peces que habitan en ellas. En el suelo de terrenos no cultivados se han encontrado de 8 a 20 mg Pb/Kg mientras que en terrenos cultivados puede llegar a encontrarse por encima de 360 mg Pb/Kg y cerca de fuentes de contaminación industrial, el suelo alcanza contenidos de 10.000 mg Pb/Kg o más. En áreas rurales, los niveles de plomo en el aire son del orden de 0,1 $\mu\text{g Pb/m}^3$. Sin embargo, dependiendo del grado de contaminación, en zonas urbanas las cantidades de plomo en el aire están comprendidas entre 1 y 3 $\mu\text{g Pb/m}^3$ y ocasionalmente pueden ser mucho mayores. Es el uso de plomo como aditivo antidetonante en las gasolinas lo que más ha contribuido a la acumulación de este metal en el medio ambiente. El plomo procedente de las gasolinas supone el 76% de las emisiones de este metal a la atmósfera. Además, se puede encontrar en la fabricación de pigmentos, recubrimientos, recipientes, ungüentos, pilas eléctricas, etc. En la actualidad, lo podemos hallar en aplicaciones en metalurgia, munición de armas, metal para rodamientos, cobertura de cables, compuestos de calafateo, plomo laminado, soldaduras, pigmentos, vidriado de cerámica y ciertos tipos de cristal. (Gutiérrez et al., 2004).

1.2.2.2-Toxicología del plomo

El plomo es un metal pesado caracterizado por ocasionar efectos tóxicos sobre el tracto gastrointestinal, sobre el sistema renal y sobre el sistema nervioso central y periférico, así como interferencias con sistemas enzimáticos implicados en la síntesis del grupo hemo. A pesar de que en los últimos diez años los contenidos de plomo de los productos alimenticios han disminuido sensiblemente, gracias a los esfuerzos realizados para reducir la emisión de

plomo en su origen y por los progresos en los análisis químicos, la dieta sigue siendo una fuente importante de exposición al plomo. Es por ello que, el objetivo a largo plazo de las autoridades sanitarias es el de continuar reduciendo los contenidos medios de plomo en los productos alimenticios con el fin de que las ingestas medias dietéticas de Pb de las poblaciones cumplan con la PTWI (Provisional Tolerable Weekly Intake) de 25 µg Pb/Kg/semana establecida por el Comité Mixto FAO/OMS. Un adulto sano no expuesto al plomo ingiere diariamente de 0,3 a 0,5 mg de este metal, el 80% del mismo es eliminado por el riñón. Si la ingesta es superior a 0,6 mg/día el plomo se acumula y puede provocar una intoxicación. La Food and Drug Administration, FDA, calculó en 1979 que aproximadamente el 20% del plomo presente en la dieta diaria de las personas de más de un año procedía de los alimentos envasados. Precisamente, puede ser tan importante este contacto, que la Environmental Protection Agency, EPA, de los EEUU estima que las conservas aportan actualmente el 15% del plomo vehiculado por los alimentos, que recibe el consumidor medio. Hasta hace unos años, se encontró plomo en las cápsulas que recubren los tapones de las botellas de vino para evitar su avinagrado. Los envases de cristal empleados en alimentación no pueden contener más del 24% de óxido de plomo para no producir toxicidad por migración del plomo al alimento, debido a la acidez y al calor. (Gutiérrez et al., 2004).

1.2.2.3-Toxicocinética del plomo

El plomo puede penetrar en el organismo por tres vías: respiratoria, digestiva y cutánea, siendo ésta última de escasa entidad. El plomo que atraviesa la piel pasa a través de los folículos pilosos y glándulas sebáceas y sudoríparas directamente al torrente circulatorio. En la especie humana la absorción de plomo por vía inhalatoria es mínima en comparación con la vía digestiva. En el caso de penetrar por vía respiratoria se combina con proteínas o con el CO₂ (dióxido de carbono) respirado, formándose PbCO₃ (carbonato de plomo) soluble. Por vía respiratoria, la más importante en el medio laboral, se llega a absorber el 40 % del plomo. Parte de este Pb se fija en la saliva y se traga. Por esto, la vía respiratoria está considerada como la más peligrosa. Respecto a la absorción digestiva, mientras los adultos absorben el 10% de este elemento, los niños absorben hasta el 50% del Pb ingerido. Tras ser absorbido, el plomo en el organismo sigue un modelo tricompartmental:

- El sanguíneo (el 2% del contenido total, cuya vida media es de 36 ± 5 días)
- El de los tejidos blandos (cuya vida media es algo más prolongada)
- El óseo (que representa el 90% del contenido total con una vida media entre 10 y 28 años).

El plomo circula en un 95-99% transportado por los hematíes, unido a la Hb (hemoglobina) y otros compuestos. Se distribuye desigualmente en los tejidos; cerca del 10%

del plomo es almacenado en los tejidos blandos, conteniendo el tejido óseo el restante 90%. En el hueso, el plomo es incorporado a los cristales de hidroxapatita, de los cuales puede ser utilizado muy lentamente. Si las concentraciones en sangre son elevadas, el almacenamiento de plomo en los huesos se ve favorecido, pudiendo acumularse un 94% del Pb absorbido. La sangre transfiere lentamente el plomo a los huesos donde se fija siguiendo un metabolismo paralelo al del calcio. Debido a la gran cantidad de plomo acumulado en los huesos, se puede observar radiológicamente en casos avanzados de saturnismo, que las metafisis de los huesos largos han aumentado de espesor y de densidad, apareciendo unas bandas radiopacas en los huesos de los antebrazos, rodillas, piernas y en el borde del omóplato de personas que no han finalizado su crecimiento. Cualquier vía de ingestión de plomo tiene su punto final en el hígado, el cual metaboliza los compuestos que a él llegan, eliminando una parte por la bilis. Cuando existe una insuficiencia hepática o la concentración del metal es excesiva se elimina por el sudor, la saliva, el páncreas y por la orina. Se excreta fundamentalmente por orina (80%) y de forma secundaria por heces, saliva y faneras. En el caso de baja exposición al plomo, existe un equilibrio entre el aporte del tóxico y la eliminación. Pero, pasado un cierto nivel, comienza a acumularse. Este nivel depende no sólo del grado de exposición, sino también de la edad y de la integridad de órganos como el hígado y el riñón. La semivida del plomo circulante es de unos 25 días, la del plomo de los tejidos blandos de unos 40 días y la del plomo depositado en los huesos puede ser de hasta 30 años. Por ello, el plomo en hueso puede ser utilizado para describir, en el tiempo, el contenido corporal del mismo. (Gutiérrez et al., 2004).

1.2.2.4- Toxicodinamia del plomo

Este metal interacciona con oligoelementos como Ca, Fe, Zn y Cu compitiendo con ellos o modificando sus concentraciones celulares. Inhibe la ATPasa Na/K incrementando la permeabilidad celular además de la síntesis de ADN, ARN y proteínas. Inhibe también, la síntesis del grupo hemo, y, por lo tanto, a todas las enzimas respiratorias que lo contienen y también la hemoglobina por inhibición específica de la ALAD (δ -aminolevulínico-deshidrasa), coprofibrinógeno-oxidasa y ferroquelatasa. Es importante destacar que los signos y síntomas de la intoxicación por plomo orgánico difieren significativamente de los correspondientes a la intoxicación por plomo inorgánico. El plomo tetraetilo y tetrametilo son compuestos liposolubles y se absorben con facilidad por la piel, el tracto gastrointestinal y los pulmones. Prácticamente todos los efectos tóxicos tienen lugar a nivel del sistema nervioso central y no suelen presentarse efectos hematológicos de importancia. El límite de concentración de plomo sin efectos biológicos ha sido fijado en 35 $\mu\text{g/dL}$ de plomo, y altas concentraciones de plomo han sido asociadas a diferentes problemas de salud en el hombre incluyendo disfunciones del sistema nervioso en fetos y niños, y en adultos hematoxicidad, disfunción reproductiva y

enfermedad de Alzheimer. Las manifestaciones clínicas de la intoxicación aguda son dolor cólico, anemia hemolítica, elevación de enzimas hepáticas, encefalopatía aguda y neuropatía. Las manifestaciones de la intoxicación crónica por plomo son muy variadas, incluyendo alteraciones orales como el Ribete de Burton, manifestaciones gastrointestinales, alteraciones hematológicas (anemia microcítica-hipocrómica), parálisis motoras, encefalopatía, alteraciones renales, cólicos saturninos, aumento de tensión arterial y anemia. El plomo afecta al sistema reproductor humano, tanto masculino como femenino y además la exposición al plomo es especialmente peligrosa para el neonato, ya que una exposición de la mujer embarazada a este metal puede dar lugar a un nacimiento prematuro, a niños con bajo peso al nacer, e incluso a abortos. A nivel del SNC los niños son más sensibles a la encefalopatía saturnina. Sufren disminución del cociente intelectual, retrasos en el desarrollo y problemas de audición. Otros efectos tóxicos del plomo son hipertensión y enfermedades cardiovasculares en adultos. (Gutiérrez et al.,2004).

1.2.3- Plomo en alimentos

Hay dos razones que pueden explicar situaciones de fácil contaminación de determinados alimentos con plomo. La primera, por vía ambiental, se debe tener en cuenta en las zonas industriales y en las de tráfico muy intenso, tales como zonas agrícolas adyacentes y vecinas a las grandes rutas de las autopistas (viñedos, frutales, etc.). Aunque esta última, ha disminuido notablemente desde la prohibición del uso del plomotetraetilo en los combustibles de vehículos. La segunda deriva de la fácil solubilización del plomo en ácidos débiles inorgánicos y orgánicos, lo que lo convierte en un elemento ubicuo. Es también muy importante la cesión de plomo por parte de las tuberías de las redes de distribución de agua urbana. Actualmente, está prohibido por las normas de urbanismo modernas el empleo de este tipo de cañerías, pero no se puede desestimar el hecho de que hay numerosas casas con cañerías antiguas. En la actualidad, se aconseja el uso de tuberías plásticas. En aguas duras las tuberías quedan protegidas por una costra de carbonato cálcico que impide que se disuelva el plomo de las mismas. (Gutiérrez et al.,2004).

1.2.4-Legislación alimentaria sobre plomo

La legislación en cuanto a la concentración máxima de plomo autorizada en los distintos alimentos ha ido actualizándose en los últimos años. El 9 y 10 de agosto de 2021, la Unión Europea publicó los nuevos límites máximos permitidos en los productos alimenticios para plomo y cadmio. El cambio aplica a menudencias, alimentos para lactantes y niños de corta edad, sal y setas silvestres. El nivel máximo permitido para vinos, se irá reduciendo

según la vendimia y alcanzando un valor de 0,1 mg/L para los vinos producidos con vendimia 2022. Para el caso de especias, como la cúrcuma, la disminución del límite máximo permitirá combatir prácticas fraudulentas, como la adición de cromato de plomo. (Official Journal of the European Union, 2021).

Para el caso de Argentina, los niveles de plomo reglamentados, tienen una tendencia a reducirse, en correlación a la situación mundial. En la actualidad el valor permitido es igual o menor a 0,15 mg/L. Esta práctica se ve favorecida por el control cada vez más exhaustivo de los alimentos que se destinan a la exportación como al mercado interno. Estas medidas reduccionistas se pueden encontrar en el Codex Alimentarius y en el Código Alimentario Argentino (CAA). Para vinos, contamos con los límites establecidos por el INV, con metodología analítica del OIV. Además de estos parámetros, se pueden observar recomendaciones que nacen en el seno estatal, con la finalidad de guiar a los productores y elaboradores - y al consumidor en general- que aparecen en el Código de Prácticas para la prevención y reducción de la presencia de plomo en los alimentos (CAC/RCP 56–2004). Estas recomendaciones están basadas en las Buenas Prácticas Agrícolas y en las Buenas Prácticas de Fabricación, y el objetivo, es disminuir el riesgo de ocurrencia de la exposición del plomo al alimento. (Alimentos Argentinos, 2004).

1.2.5- Niveles de plomo detectados en alimentos

Según Gutierrez et al. (2004, p75 y 76), los valores hallados de plomo en algunos alimentos son:

- Leche de vaca: 1,32 mg/kg
- Vinos: 0,55 mg/kg
- Jugos de fruta: 0,06 mg/kg
- Pescados: 0,28 a 10,6 mg/kg
- Cereales, verduras y legumbres: 1.400 mg/kg

Uno de los alimentos que ha sido tradicionalmente considerado como vehículo de plomo es el vino. La Unión Europea actualmente ha establecido el nivel máximo permisible en 0,2 mg/L. Se ha demostrado que existe una pequeña diferencia entre la concentración de plomo encontrada en vinos jóvenes y añejos, apreciándose menores concentraciones en los jóvenes, debido a un fenómeno de clarificación natural. Hoy en día, sin embargo, existen estudios sobre los posibles efectos preventivos del consumo de vino tinto sobre la exposición al plomo ingerido en la dieta. Estos autores consideran que la acción quelante de los

polifenoles presentes en el vino tinto disminuye la absorción de las pequeñas cantidades de plomo procedente de la dieta. (Gutiérrez et al., 2004).

1.3 Absorción Atómica para detectar plomo: Fundamentos

La Espectrofotometría de Absorción Atómica, es una técnica analítica que data del siglo XIX y que tiene por finalidad determinar la concentración de un elemento metálico en una muestra. La forma moderna de esta metodología, fue desarrollada durante la década de los 50 por un equipo de químicos dirigidos por Alan Walsh. Esta técnica, evalúa la concentración de un analito en una muestra, basándose en gran medida en la ley de Lambert-Beer. Básicamente, establece que los átomos en el atomizador pueden ser promovidos a orbitales más altos por instantes, mediante la absorción de una cantidad de energía (es decir, luz de una determinada longitud de onda). Esta cantidad de energía o longitud de onda, se refiere específicamente a una transición de electrones de un elemento particular, y en general, cada longitud de onda corresponde a un solo elemento. Como la cantidad de energía es conocida, y la cantidad restante en el detector se puede medir, es posible, a partir de la mencionada ley, calcular cuántas de estas transiciones tienen lugar, y así obtener una señal que es proporcional a la concentración del elemento que se mide. (Perez, sf).

En la siguiente figura se observa el principio de la Absorción Atómica

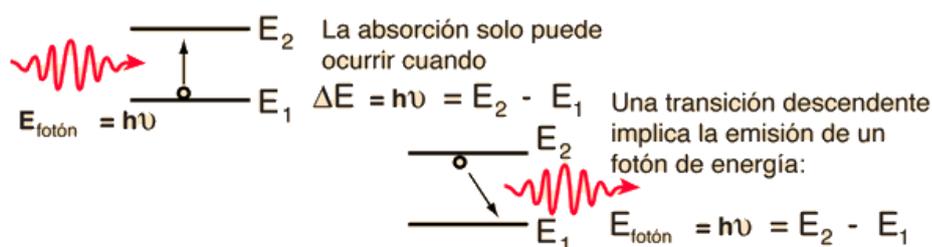


Figura 1: Transición por absorción o entrega de fotones.

Gráfico extraído de Nave, (2017).

En Absorción Atómica, la metodología de trabajo consiste en realizar una curva de calibrado, donde la señal analítica mantiene una relación proporcional con la concentración del analito en cuestión. En determinados casos y debido a la naturaleza de la matriz que se estudia, suele ocurrir que la intensidad medida en el análisis, no otorga resultados reproducibles, ya que se producen interferencias espectrales tanto conocidas como desconocidas. Así, podemos mencionar conceptos como el efecto matriz y las interferencias.

El efecto matriz es un efecto indeterminado de las especies que rodean a la muestra y que afectan a la sensibilidad del método. Definimos a una interferencia, en espectrofotometría, a cualquier efecto determinado y aditivo que altere o haga fluctuar la señal mientras la concentración del analito se mantiene constante.

Los tipos de interferencia que se conocen son:

Interferencias no espectrales: Es cualquier interferencia que afecte la formación de átomos libres en el estado fundamental. Para controlar este efecto, el procedimiento más comúnmente utilizado es utilizar calentamiento a máxima potencia o adicionar un modificador de matriz. Si la interferencia es difícil de controlar, se utilizan métodos como la igualación de matriz entre muestras y patrones, o el método de adición estándar.

Interferencia espectral: es cuando se produce una superposición de la señal del analito con una señal debida a otros elementos o moléculas en la muestra o debida a la llama u horno del equipamiento. La contribución proveniente de equipamiento se puede reducir utilizando corrección de background por lámpara de deuterio o corrección de Zeeman. La corrección por lámpara de deuterio (D2), se basa en que ésta proporciona una fuente de radiación continua a través de la región ultravioleta. La absorbancia de la radiación de deuterio, se sustrae de la del haz del analito. Para este tipo de problemas, cuando algún elemento superpone su señal a la del analito de interés, se puede utilizar otra longitud de onda que evite este tipo de interferencia, siempre y cuando la sensibilidad en la detección lo permita. (Interferencias Espectrales, sf).

1.3.1 Aplicaciones y principales características de la Absorción Atómica

La Espectrofotometría de Absorción Atómica, EAA, se basa en la cuantificación de elementos mediante la estimación de la radiación absorbida por dichos elementos en su forma atómica. Dentro de la Absorción Atómica, hay distintas aplicaciones dependiendo de la característica de la muestra y de la del analito. Así, podemos mencionar tres metodologías: EAA por horno de grafito o por atomización electrotérmica, EAA por llama y EAA por generador de hidruros. (Series Manual Shimadzu A7000)

El análisis en horno de grafito consiste en medir y dispensar un volumen conocido de muestra en el horno. Allí, mediante una secuencia de pasos en donde se programa una rampa de temperatura, la muestra es atomizada. La energía requerida para la atomización es obtenida aplicando una diferencia de potencial eléctrico a través de un tubo de grafito (dentro del cual ha sido colocada la muestra). El tubo está alineado con la luz procedente de la lámpara espectral. Así, el vapor atómico generado por la muestra cuando el horno está encendido, absorberá luz proveniente de la lámpara del elemento a determinar. En este caso,

la señal de absorción es transitoria, en forma de pico, de tal modo que se eleva la concentración y posteriormente cae a medida que los átomos difunden fuera del horno. En otras palabras, a medida que al suministrar una determinada cantidad de energía a los átomos en estado fundamental (E_0), ésta es absorbida por los átomos de tal forma que se incrementará el radio de giro de sus electrones de la capa externa llevando al átomo a un nuevo estado energético (E_1) que llamamos excitado. Cuando éstos vuelven a su estado fundamental, ceden una cantidad de energía cuantitativamente idéntica a su energía de excitación, emitiendo radiaciones a longitudes de onda determinadas. (Gil Hernández, 2014).

En cada etapa que la muestra transita en el horno de grafito, se manejan variables como temperaturas, tiempos, tipo y flujo de gas.

Algunas consideraciones importantes en el manejo del equipo se detallan a continuación.

1.3.1.1 Etapas que se producen en el horno de grafito

- **Secado**

Es la evaporación del solvente a una temperatura superior al punto de ebullición. Para soluciones diluidas de HNO_3 , el secado se produce a 120°C . Hay un flujo de gas inerte que pasa por el tubo, y no se produce el proceso de hervor (esto provocaría salpicaduras). El tiempo estimado es de 1 a 2 segundos/L.

- **Pirólisis**

Es la descomposición térmica a temperaturas que van de los 300 a los 1.200°C . La matriz se descompone en productos gaseosos que son eliminados por el flujo de gas inerte. Aquí, además, se producen reacciones entre el analito, los componentes de la matriz y los modificadores. La duración del proceso puede ser de decenas de segundos.

- **Atomización**

Es el procedimiento por el cual se produce vapor atómico. En donde los átomos presentes son capaces de absorber energía. Este proceso es caracterizado por un calentamiento rápido a temperaturas que van desde los 1.400 a los 2.700°C . Se produce la transformación de analito de moléculas a átomos. Se registran las absorbancias totales y la señal de fondo. En este proceso, que dura de 3 a 5 segundos, se detiene el flujo de gas inerte.

- **Limpieza**

El grafito se calienta a temperaturas muy altas, alrededor de 2.800°C , durante 3 a 5 segundos, para evaporar y atomizar cualquier resto de analito, matriz o modificador. Estos restos son arrastrados por el flujo de gas inerte.

- **Enfriamiento**

El atomizador es llevado a temperatura ambiente, mediante una corriente de agua que circula por las paredes de los refrigerantes. (Series Manual Shimadzu A7000).

1.3.2 ¿Qué es la Adición Estándar?

La Adición Estándar es un método de análisis cuantitativo, que se utiliza cuando la muestra de interés tiene varios componentes que producen el efecto matriz y donde los elementos adicionales pueden aumentar o reducir la señal de absorbancia del analito. En los casos en los que se presenta el efecto matriz, ocurre que no es posible encontrar o replicar el blanco con la misma composición que tiene la muestra. Esto causa una respuesta no lineal en la curva de trabajo. Esta metodología se debe emplear para evitar errores significativos en los resultados del análisis, los cuales se evidencian, por ejemplo, en la falta de repetibilidad entre duplicados. (JoVE Science Education Database, 2022).

En este método, la matriz es el medio de calibración. En vez de preparar cada punto de la curva en solventes puros o en solución acuosa ácida, se utiliza la misma matriz para preparar el analito. De esta forma, la señal analítica de estos calibrantes, está compuesta de la señal propia del analito, así como también de los interferentes, lo que permite corregir o minimizar sus efectos. (Gómez, 2022).

Para ejecutar el método, una cantidad conocida de analito es adicionada a la muestra y se mide el incremento de la señal de absorbancia. El incremento de la señal, nos permite inferir qué cantidad de analito hay en la muestra original, asumiendo que la señal es proporcional a la concentración de este elemento. En la práctica, al tener una muestra cuya concentración inicial $[X]_i$ da una señal I_x (dicha señal es en este caso, una absorbancia), se adiciona a la muestra una concentración conocida de estándar S y se observa la señal de la mezcla, I_{s+x} . $[X]_f$ es la concentración final del analito desconocido después de adicionar el estándar y $[S]_f$ es la concentración final del estándar después de adicionar el analito desconocido. (Gómez, 2022).

$$\frac{\text{concentración del analito desconocido}}{\text{concentración del analito+estándar en mezcla}} = \frac{\text{señal del desconocido}}{\text{señal de la mezcla}}$$

Al representar de otra manera lo antedicho, podemos mencionar:

$$\text{Ecuación de la Adición Estándar} = \frac{[X]_i}{[X]_f + [S]_f} = \frac{I_x}{I_{s+x}}$$

Donde:

$[X]_i$ = concentración inicial

I_x = es la señal de la concentración inicial de la muestra y dicho valor es el que obtendremos en el experimento.

S_f = concentración conocida de estándar

I_{s+x} = señal de la mezcla

$[X]_f$ = concentración final del analito desconocido después de adicionar el estándar, y

$[S]_f$ = es la concentración final del estándar después de adicionar el analito desconocido

En la práctica, se realiza añadiendo cantidades conocidas y crecientes de analito a distintas porciones de muestra para construir la curva de calibrado (se debe incluir la muestra sin adición). Gráficamente, se representa la señal obtenida para cada porción frente a la concentración o cantidad añadida a dicha porción. La concentración de la muestra se obtiene como el punto de corte de la prolongación de la recta en el eje de abscisas. Matemáticamente se iguala la señal a cero y se despeja la concentración (cambiando de signo). En el punto de corte de las abscisas nos da la concentración del analito, ya que $0 = a + b.C$ (donde C es la concentración que queremos hallar), así que C es simplemente: $C = -a/-b$. Estos cálculos los emite el software del espectrofotómetro, no teniendo el analista que realizarlos. (Gómez, 2022).

Para explicar gráficamente el método de Adición Estándar, se pueden observar las figuras N°1 y N°2. En ellas, la diferencia que se observa entre un análisis realizado a una muestra que presenta interferencias en su composición, y un análisis en donde se realiza la adición estándar para minimizar este efecto, se visualiza claramente.

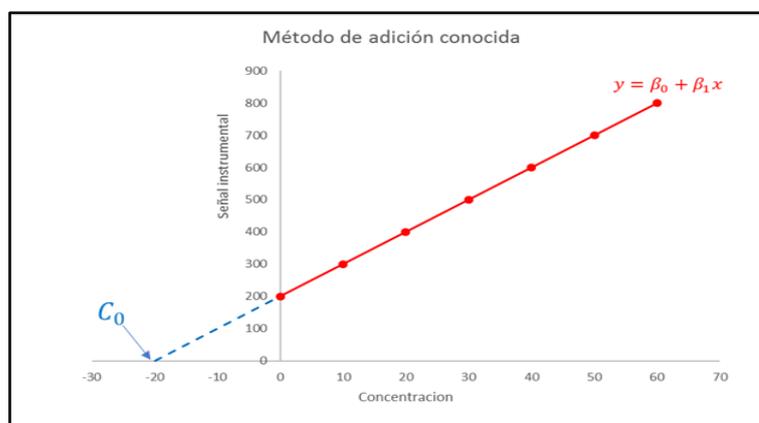


Figura 1: Representación de la recta en Adición Estándar. (Gómez, 2022).

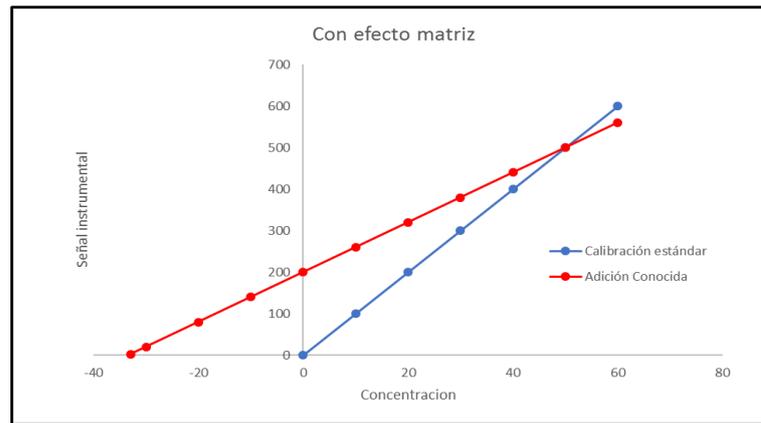


Figura 2: Rectas obtenidas al realizar un análisis en una muestra con efecto matriz, trabajando con y sin Adición Estándar. (Gómez, 2022).

Se debe considerar que la absorbancia está relacionada con la concentración de la sustancia c , por la ley de Lambert-Beer, que se resume con la ecuación: $A = \epsilon b c$, donde c se expresa en mol/L, b es la longitud del camino óptico (anchura de la célula que contiene la disolución de la sustancia) y se expresa en cm, y ϵ es la absorptividad molar, propiedad característica de cada sustancia correspondiente a la cantidad de radiación que absorbe a una longitud de onda determinada por unidad de concentración, siendo sus unidades $L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (téngase en cuenta que la absorbancia no tiene unidades). Para poder aplicar la ley de Lambert-Beer es necesario seleccionar previamente una longitud de onda puesto que tanto A como ϵ varían con ella. Para ello se obtiene previamente el espectro de absorción de la sustancia, que consiste en una representación de los valores de absorbancia frente a la longitud de onda expresada en nanómetros (nm). En el espectrofotómetro, esto se denomina "Line Search". Del espectro de absorción puede seleccionarse el valor de longitud de onda para el cual la absorbancia es máxima. Si bien la ley de Lambert-Beer indica que a una representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración le correspondería una línea recta, esto sólo tiene lugar para disoluciones diluidas, por ello, no es conveniente utilizar la expresión matemática directamente, sino construir en cada caso la recta de calibrado que confirme que la ecuación de Lambert-Beer se cumple en el intervalo de concentraciones en el que se trabaja. Esta recta se construye midiendo la absorbancia de una serie de disoluciones de concentración perfectamente conocidas. (Molina Negro, 2012).

1.4- Objetivos del trabajo

1.4.1- Objetivo general

Verificar la puesta a punto de la técnica de Adición Estándar por Espectrofotometría de Absorción Atómica para la determinación de plomo en vino tinto en el Espectrofotómetro Shimadzu A7000.

1.4.2- Objetivos particulares

- Realizar los ensayos para verificar si hay relación entre las variables estudiadas, y para conocer el grado de ajuste del modelo, mediante el análisis de r , de la prueba de hipótesis sobre la pendiente del modelo lineal y R^2 .
- Realizar ensayos de recuperación en la técnica de adición estándar.
- Verificar si el equipo de Absorción Atómica Shimadzu A 7000 es apto para determinar la técnica de adición estándar en vino.

1.5- Hipótesis del trabajo

“Es posible verificar la puesta a punto de la técnica de Adición Estándar por Espectrofotometría de Absorción Atómica para la determinación de plomo en vino tinto en el Espectrofotómetro Shimadzu A7000”.

2. MATERIALES Y MÉTODOS:

2.1 Materiales:

*Material volumétrico de vidrio de laboratorio: pipetas aforadas de distintos volúmenes. Pipetas graduadas, matraces aforados de distintos volúmenes.

*Agua destilada Grado 3, según norma IRAM

*Ácido Nítrico (1+1), preparado con Ácido Nítrico para análisis o grado espectrofotométrico.

*Solución certificada patrón de Plomo Sigma Aldrich, Lote HC91308676.

*Solución patrón de 1 mg/L. Se prepara a partir de la solución patrón de 1.000 mg/mL.

*Espectrofotómetro de absorción atómica con atomización electrotérmica, en el caso de este estudio, marca Shimadzu, modelo A 7000.

*Tubo de grafito de alta densidad o plataforma.

*Muestras: las muestras corresponden a vinos tintos varietales (Malbec), de la zona de Luján de Cuyo, provenientes de una bodega que realiza su control de calidad interno y el presente análisis para obtener un certificado apto para exportación. Se analizaron un total de 10 muestras, que son las necesarias para realizar un correcto análisis de datos y lograr resultados adecuados. Las muestras de vinos tintos deben presentar azúcar residual en su composición, ya que la presencia de la misma no es deseada en la muestra por provocar depósitos de carbonos en el sistema de calentamiento, carbonización y calcinación de la muestra. Estos depósitos provocan una disminución en la señal del analito, además de un deterioro en el equipo de medición. Como consecuencia de su presencia, el resultado obtenido no es el verdadero.

*Gas: Argón 5.0

2.2. Método:

2.2.1 Acondicionamiento del equipo

Encender el equipo y realizar todos los controles que el mismo precisa, que figuran en los manuales del mismo. Colocar el bloque en la posición horno y ajustar manualmente el brazo para que la descarga del volumen de muestra se pueda realizar dentro del horno de grafito. Este procedimiento es considerado de rutina.

Las condiciones de operación del equipo se ajustan de tal manera de obtener la mayor sensibilidad posible. A continuación, se establecen las condiciones de trabajo.

2.2.1.1 Condiciones experimentales del Espectrofotómetro:

Posición lateral de Lámpara: 10

Posición altura de la lámpara: 0

Longitud de onda (λ): 283.3 nm

Ancho de ventana: 0.5 nm

Modo de lámpara: Con Corrección de base con Deuterio

2.2.1.2 Programa del horno: Rampa

Rampa se denomina a la programación de las temperaturas de manera ascendente y en distintos tiempos para cada etapa, de manera de lograr que se cumplan los procesos en el horno de grafito. En la Tabla N°1, se observan las características de la rampa con la que se trabaja en esta metodología y las condiciones especificadas para cada etapa de la misma.

Tabla N°1: Condiciones de trabajo en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica para determinar Plomo como se observa en el equipo.

Number	Temperature °C	Tim sec	Heat mode	Sensitivity	Gas Type	Flow Rate	Sample	PrePeak Time
1	120	30	Ramp	Regular	# 1	1,00	Off	0
2	250	10	Ramp	Regular	# 1	1,00	Off	0
3	300	20	Ramp	Regular	# 1	1,00	Off	0
4	300	5	Step	High	# 1	0,00	Off	0
5	1700	3	Step	High	# 1	0,00	On	2

2.2.1.3 Parámetros de Medición:

Estos parámetros están especificados en el software del equipo, aunque el analista puede modificarlos ante una necesidad.

Orden de Curva de calibrado: 1^{er} orden

Intercepción al cero: No

Unidades de concentración: ppb (equivale a mg/L)

Número de blanco preenjague: 0

Autodilución y reanálisis: Off

En el seteo, se debe especificar también el número de repeticiones utilizadas para la medición del blanco, de cada punto de la curva y de la o las muestras. Es en este punto donde se coloca el Coeficiente de Variación aceptado para cada ítem mencionado.

2.2.2 Muestra

2.2.2.1 Muestreo

El muestreo se considera dirigido y no probabilístico, ya que no se tiene en cuenta una norma o método para la recolección de las unidades de análisis. En este caso, el cliente ha incluido en su muestra a las unidades de análisis que disponía en un momento dado.

2.2.2.2 Preparación de las muestras

Se debe realizar una dilución de la muestra problema, a la que se denomina Solución A. Por ejemplo, realizar una dilución 1:10 del vino a analizar, tomando 50 mL de solución problema con material aforado, y colocarlo en un matraz aforado de 500 mL, adicionar 5 mL de ácido nítrico (1+1) medido con pipeta graduada y llevar a volumen con agua destilada. Se trabaja con volúmenes relativamente grandes (500 ml o 1.000 mL) ya que esta solución es el diluyente.

Se procede de esta manera con las diluciones necesarias conforme a los resultados estimados, de tal manera que la dilución de la muestra permita la correcta lectura de absorbancia dentro de los parámetros esperados.

2.2.3 Preparación de la curva

Se realizan un mínimo de 5 puntos, y se trabaja en un rango que comprende de 0 ppb a 150 ppb. Estos valores pueden variar según se estime el contenido de plomo que presente la muestra. La curva se prepara por duplicado.

Se realizan diluciones iniciales del patrón de plomo, a las que llamaremos "Solución Patrón 1 o S1" y "Solución Patrón 2 o S2", respectivamente. Para realizar dichas soluciones, siempre se trabaja con la fórmula $C1.V1 = C2.V2$. En el caso de la S1, para realizar los análisis del presente trabajo, se toma con pipeta aforada 1 mL del patrón y se lo diluye en un matraz aforado de 100 mL al que previamente se le agrega 1 mL de HNO₃ 1+1, obteniéndose una solución de 10.000 ppb de Pb, y para preparar la S2, se toman 10 mL de S1 y se colocan en matraz de 100 mL, y se enrasa con agua destilada. Se obtiene una solución de 1.000 ppb de Pb. Con esta solución se preparan los puntos de la curva, con la finalidad de que la concentración del mensurando se encuentre entre los puntos de la curva preparada.

Para preparar cada curva, se agrega en el matraz aforado correspondiente e identificado adecuadamente, el contenido de patrón de plomo S2 que corresponda a la concentración final deseada para cada punto, según la tabla N°2. Por ejemplo, para preparar las concentraciones indicadas, se procede a agregar el volumen de solución del patrón que se indica a continuación:

Tabla N°2: Ejemplo de concentraciones de los puntos de una curva.

Concentración de la curva en ppb	mL de solución patrón S2	Volumen final en mL*
120	1,2	100
100	1,0	100
70	0,7	100
50	0,5	100
30	0,3	100
10	0,1	100
0	0	100

* El volumen final se alcanza con la solución de la muestra problema (Solución A).

2.2.4 Lectura de la muestra

Una vez colocados los puntos de la curva en el muestreador automático del Espectrofotómetro, se da inicio a la lectura de los mismos, ya sea manual o automáticamente. El equipo analítico realiza un procedimiento de calentamiento de la lámpara y búsqueda de la Longitud de onda de interés de manera automática. A este procedimiento se lo denomina "Line Search". Los datos son registrados por el equipo, donde se observa tanto en la gráfica como en el resumen de datos, el contenido de plomo de la muestra.

Cada muestra es analizada por cada una de las dos analistas, obteniendo duplicados de los resultados, expresados en ppb, los que luego se expresan en mg/Litro.



Figura 3: Primer Espectrofotómetro de Absorción Atómica de INTI Mendoza.

2.2.5 Análisis de los datos:

Los datos se analizaron conforme al estadígrafo coeficiente de correlación muestral r , a la prueba de hipótesis para la pendiente del modelo propuesto, y al coeficiente de determinación R^2 . Se realizó también un análisis con los datos de recuperación.

2.2.5.1 Análisis del coeficiente de correlación (r):

El coeficiente de correlación muestral (r) representa la medida de asociación lineal entre las variables X e Y , y se establece para este caso que debe ser mayor a 0,980, según los criterios establecidos internamente y basados en diversas guías. (Fabro, 2015; O.A.A., 2013; Quattrocchi, 2015).

2.2.5.2 Prueba de hipótesis sobre los parámetros del modelo

El modelo de regresión lineal poblacional es $Y = \beta_0 + \beta_1 x + \varepsilon$. Se pretende analíticamente, que la pendiente, en el modelo, sea distinta de cero. Para ello se plantea la prueba de hipótesis de que la pendiente es igual a cero, de la siguiente manera:

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

Para esta hipótesis, con n-2 grados de libertad y un α de 0,05, se obtiene un estadígrafo

$$t = \frac{\widehat{\beta} - \beta_{1H0}}{\widehat{S}\beta_1}$$

2.2.5.3 Análisis del coeficiente de determinación (R^2)

El coeficiente de determinación (R^2), mide la bondad del ajuste realizado y permite decidir si el ajuste lineal es suficiente. (Quattrocchi, 2015). El valor establecido como mínimo aceptable para el R^2 es de 0,990, según parámetros internos del laboratorio.

2.2.5.4 Recuperación

El porcentaje de recuperación es la capacidad que tiene un método analítico para determinar cuantitativamente un analito que ha sido adicionado a una muestra. Se expresa como porcentaje (% R).

La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original. Por lo cual, la recuperación está intrínsecamente relacionada a las características de la matriz de la muestra. El valor obtenido debe ser entre 85 a un 120%.

$$R = \frac{\text{Conc. obtenida}}{\text{Conc. agregada al analito}} \cdot 100$$

En la práctica, se determinó la concentración de plomo de una muestra, obteniendo 144 ppb del mismo. La dilución inicial del vino es de 15 mL llevados a 500 mL. La dilución en esta etapa es de 1:33,33 y la concentración correspondiente a la lectura es de 4,35 ppb plomo. Si multiplicamos esta concentración por la dilución, obtenemos los 144 ppb Pb que tiene la muestra.

La fortificación se estableció con 200 ppb de plomo. Por lo que se resume que: 200ppb (fortificación) +144ppb (iniciales)= 344 ppb teóricos.

Al dividir el valor total de plomo teórico por la dilución de la solución, se obtiene el valor teórico de la lectura que veríamos en el software. En otras palabras: $344/33,33 = 10,32$ ppb teórico.

Al realizar la fortificación y el análisis posterior de dicha muestra, los resultados obtenidos para dos determinaciones con la muestra fortificada son 9,67 y 11,10 ppb respectivamente.

Así, el cálculo que se realiza es:

$$\text{ppb plomo en las corridas o análisis: } \frac{9,67+11,1}{2} = 10,4$$

$$\text{ppb plomo en la muestra: } 10,4 \times 33,33 = 346,6 \text{ ppb}$$

Recordando el contenido teórico de la solución: 344,0 ppb

Por lo que el % de recuperación resulta ser:

$$\%R = \frac{346,6}{344,0} 100$$

$$\%R = 100,8$$

2.3. Resultados y Discusión:

Los valores de plomo expresados en ppb (mg/L) en las muestras de vino tinto obtenidos en los distintos análisis se observan en la Tabla N°3. En la misma se resumen los resultados que entrega el software del equipo de Absorción Atómica.

Los criterios de aceptación tomados en consideración fueron:

2.3.1 Análisis del coeficiente de correlación (r).

En la Tabla N°3 se observan los datos que el equipo de Absorción Atómica Shimadzu A7000 entrega, los cuales se graficaron para visualizar de una mejor manera los resultados. En la figura N°4, se puede observar la distribución de los valores de r, para cada análisis realizado.

Tabla N°3: Concentración de plomo, y cálculo de r y R² para cada muestra analizada.

Muestra n°	Valor r	Valor R ²	Ppb de Plomo*
1	0,9969	0,997	0,11
1´	0,9950	0,998	0,10
2	0,9981	0,998	0,04
2´	0,9958	0,989	0,07
3	0,9976	0,998	0,02
3´	0,9941	0,994	0,02
4	0,9925	0,911	0,09
4´	0,9935	0,993	0,09
5	0,9948	0,995	0,05
5´	0,9992	0,999	0,04
6	0,9992	0,998	0,15
6´	0,9928	0,997	0,12
7	0,9974	0,997	0,03
7´	0,9983	0,998	0,03
8	0,9973	0,997	0,02
8´	0,9982	0,998	0,03
9	0,9932	0,993	0,03
9´	0,9975	0,997	0,03
10	0,9906	0,991	0,06
10´	0,9917	0,992	0,05

*Concentración de plomo en la muestra en ppb. Fuente: Datos obtenidos del espectrofotómetro.

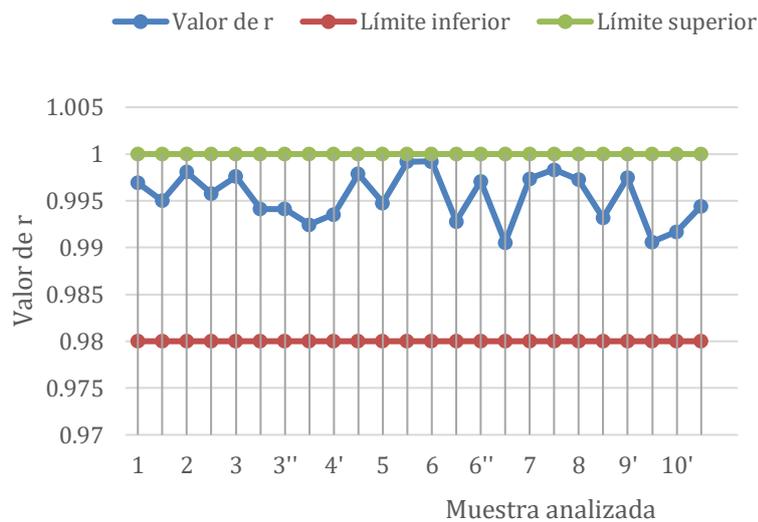


Figura N° 4. Valores de r para cada muestra analizada, y los límites superior e inferior establecidos.

2.3.2 Prueba de hipótesis sobre los parámetros del modelo

En los casos analizados, se rechazó la hipótesis nula ya que resultó que $|t| > t_{\alpha/2; n-2}$ para cada muestra analizada. Por lo que se establece que la pendiente es distinta de cero.

El valor de t según tabla es 2,1318 (Tabla en Anexo III).

Tabla N°4: Valores de t calculado para cada análisis realizado.

Muestra n°	Valor t
1	27,18258923
1'	20,37105897
2	3,701156727
2'	14,84455246
3	32,41308281
3'	20,50031322
4	4,938962253
4'	19,05777815
5	21,79718274
5'	54,85868327
6	8,219780621
6'	26,27620413
7	27,47934402
7'	38,50836923

Muestra nº	Valor t
8	30,41242213
8´	20,96785083
9	16,99531783
9´	27,83198354
10	14,5101359
10´	13,3544746

2.3.3 Análisis del coeficiente de determinación (R^2).

Los análisis de los datos obtenidos en las diversas corridas espectrofotométricas entregan los resultados que se visualizan en la Tabla N°3. En la figura N°5, se puede observar la distribución de los valores R^2 obtenidos, respecto al límite establecido.

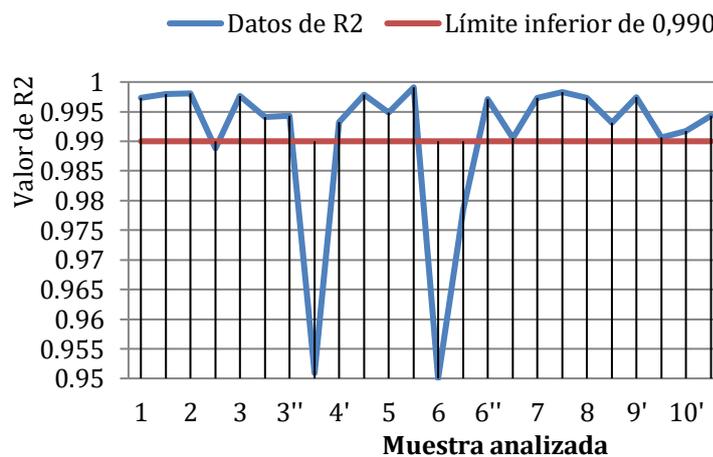


Figura N° 5: Valores de R^2 para cada muestra analizada y límite inferior establecido.

2.3.4 Recuperación

La recuperación media alcanzada de 100,8 % indica que el método propuesto tiene una excelente capacidad para determinar analíticamente el analito plomo en la matriz vino.

2.4 Conclusiones

Según los parámetros que se analizaron, podemos decir que el coeficiente de correlación cumple para todos los análisis, con el parámetro establecido, es decir, que sea igual o mayor a 0,990.

Respecto a la prueba de hipótesis para la pendiente, rechazar la hipótesis nula indica que las pendientes son distintas de cero. Al aumentar la variable concentración, la absorbancia detectada también aumenta.

Considerando el coeficiente de determinación R^2 , se puede observar que la mayoría de las determinaciones cumplen con el valor estipulado como mínimo (0,990), mientras que para algunas de ellas, el valor es inferior. Corresponde analizar estos casos puntuales nuevamente ya que sus duplicados obtuvieron datos acordes a lo esperado.

Respecto a la recuperación, el estudio entregó resultados satisfactorios ya que se encuentran entre los parámetros establecidos como aptos.

Observando los resultados obtenidos, y para las muestras analizadas, se puede concluir que se puede verificar la puesta a punto de la técnica de Adición Estándar por Espectrofotometría de Absorción Atómica para la determinación de plomo en vino tinto en el espectrofotómetro Shimadzu A7000.

3. BIBLIOGRAFÍA

Alimentos Argentinos. (s.p.). *Código de prácticas para la prevención y reducción de la presencia de plomo en los alimentos cac/rcp 56–2004*. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.

http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/Codex_Alimentarius/normativa/code_x/rcp/CODEX_CAC_RCP_56.asp.

Alvarez, M. (1997). *Acreditación de laboratorios analíticos*. Curso de postgrado. Ciudad de La Habana.

Anna1994. (2017). *Espectroscopia de Absorción Atómica*. Química Ambiental Grup B. Institut Mercè Rodoreda. <https://agora.xtec.cat/ies-merce-rodoreda/modul-b/espectroscopia-de-absorcion-atmica/>.

Aula Virtual. (2020). *Apuntes de Análisis Químico*. 2º cuatrimestre. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, UNLP.

Cátedra de Cálculo Estadístico y Biometría. (2.013). *Correlación Simple Lineal*. Universidad nacional de Cuyo.

Cátedra de Cálculo Estadístico y Biometría. (2.014). *Regresión Simple*. Universidad nacional de Cuyo.

Danzer, K. y Currie, L. (1998). Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. *Fundamentals and single component calibration*. Pure Appl. Chem. 70 (993-1014).

Danzer, K. y Currie, L. (2004). Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 2: *Multicomponent calibration (IUPAC Technical Report)*. Pure Appl. Chem. 76 (1215-1225)

Gil Hernández, F. (2014). Apoyo multimedia a la enseñanza práctica de la toxicología. Proyecto de Innovación Docente 06-01-14. Vicerrectorado de Planificación, Calidad y Autoevaluación docente. Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Psiquiatría <https://www.ugr.es/~fgil/proyecto/grafito/fundamento.html>.

Gómez, C. (2022). *¿Cómo detectar el efecto matriz en un método analítico?* Analytical.cl.

González, G., Herrador, M.A. (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Volume 26, Issue 3. Pages 227-238. ISSN 0165-9936. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>.

Grassi, Diego Alejandro. (2015). *Interacción de metales pesados con diferentes matrices orgánicas*. (Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.). Recuperado de http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n5786_Grassi.

Instituto nacional de Vitivinicultura .(s.f.). *Límites y Tolerancias analíticas*. (sp) [determinaciones analíticas metodos limites y tolerancias -pag. web.pdf \(argentina.gob.ar\)](#).

International programme on chemical safety. (1994). *Guidance values for human exposure limits*. Environmental Health Criteria 170. [Guidance values for human exposure limits \(EHC 170, 1994\)](#).

JoVE Science Education Database. (2022). *Fundamentos de adición estándar*. Química Analítica. JoVE, Cambridge, MA <http://jove.vom>.

Marcos. (2009). *El calibrado y el análisis cuantitativo instrumental*. Divulgo, luego existo. Blog de divulgación Científica y contenidos docentes en el área de la Química Analítica. Análisis de alimentos y quimiometría. <https://divulgoluegoexistoblogspot.com/2009/08/el-calibrado-y-el-analisis-quantitativo.html>.

Marcos. (2012). *El efecto matriz*. Divulgo, luego existo. Blog de divulgación Científica y contenidos docentes en el área de la Química Analítica. Análisis de alimentos y quimiometría. <https://divulgoluegoexistoblogspot.com/2012/07/>.

Molina Negro, Francisco. (2012), [PRÁCTICA 4 COLORIMETRÍA. LEY DE LAMBERT-BEER. Francisco Molina Negro]. <https://divulgoluegoexistoblogspot.com/2012/07/el-efecto-matriz.html>

Nave. (2017). *Procesos cuánticos*. Hyper Physics Department of Physics and Astronomy. Georgia State University. www.hiperphysics.phy-astr.gsu.edu.

Official Journal of the European Union. (2021). *Document 32021R1317*. Commission Regulation (EU) 2021/1317 of 9 August 2021. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32021R1317&qid=1628873647724>.

Pebbles TN Samacheer & Competitive Exams. (15 de junio de 2015). *Addition Chapter-5. 2nd std maths*. [Archivo de video]. Youtube. <https://www.youtube.com/watch?v=Cqcnb8ZiYQk>.

Perez G. (sf). *Espectrometría de absorción atómica*. www.espectrometria.com.

Poder Ejecutivo Nacional. (1969). *Código Alimentario Argentino*. Ley 18284. Decreto 2126. http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/marco/Codex_Alimentarius/normativa/code_x/rcp/CODEX_CAC_RCP_56.asp.

Rubio, C., Gutiérrez, A.J., Martín Izquierdo, R.E, Revert, C., Lozano, G., Hardisson, A. (2004). El plomo como contaminante alimentario. *Revista de Toxicología* [en línea]. 21(2-3), 72-80. ISSN: 0212-7113. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91921303>.

Salas-Marcial, C., Garduño Ayala, M., Mendiola-Ortiz, P., Vences-García, J., Zetina-Román, V., Martínez-Ramírez, O. y Ramos-García, M. (2019). Fuentes de contaminación por plomo en alimentos, efectos en la salud y estrategias de prevención. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. 20, núm. 1. <https://www.redalyc.org/journal/813/81359562002/html/>.

Series Manual Shimadzu A7000.

4. ANEXOS

Anexo I: Imagen del análisis o corrida de la muestra 10

PEMSA321.EXP -- 14/04/16 11:47:44

Optical bench : AA-670X v1.40 A30423400175
ASC Attached : ASC-6000 v1.30 A30313400618YS
GFA Attached : GFA-6500 v1.40 A30333400594
Analyst Name :
File Comment :
Acquire Mode : Graphite Furnace
Operations Mode : Semi Auto

22465/16-9
fol anal

Experiment Conditions

Element : Pb
Turret Number : 7
Lamp Current Low : 10
Lamp Current High : 0
Wavelength : 283.3
Slit Width : 0.5
Lamp Mode : .BGC-D2

Atomizer Conditions

Furnace Height (pulses) : 30
Furnace Lateral (pulses) : 40

Furnace Program

Last Boost Cycle : 1
Number of Boost Cycles : 1

Temp	Time	Heat Mode	Sensitivity	Gas Type	Flow Rate	Sample	PrePeak Time
1	120	30 Ramp	Regular	Gas #1	1.00	Off	0
2	250	10 Ramp	Regular	Gas #1	1.00	Off	0
3	300	20 Ramp	Regular	Gas #1	1.00	Off	0
4	300	5 Step	High	Gas #1	0.00	Off	0
5	1700	3 Step	High	Gas #1	0.00	On	2

Measurement Parameters

Calibration Curve Order : 1st
Zero Intercept : No
Concentration Units : ppb
Signal Processing : Peak Area
Number of Blank Pre-Rinses : 0
Auto Dilute and Re-Analyze : Off

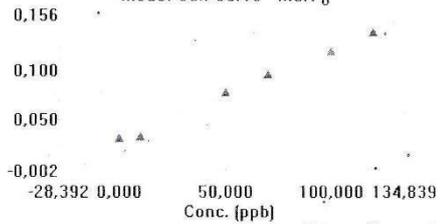
	Num Repts.	Max Repts.	CV Limit	SD Limit
Blank	1	1	99.9	0.0000
Standard	2	3	10.0	0.0000
Sample	3	3	10.0	0.0000
Sens corr.	5	5	99.9	0.0000

Sampler Parameters

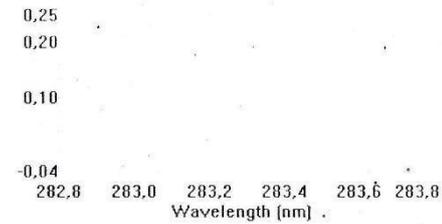
Number of Mix Cycles : 0
Rinse Method : H2O
Intake Speed (uL/sec) : 130
Discharge Speed (uL/sec) : 330
Diluent : R1
1st Reagent : R2
2nd Reagent : R3
3rd Reagent : R4
Injection Volume (uL) : 15
Injection Speed (uL/sec) : 25

Meas. Cal. Curve - MSA } Abs = 0.000927 Conc + 0.0292
 Cor. Coef. (r) = 0.99748

A
b
s



Line Search/Beam Balance
 Element : Pb
 Turret Number : 7
 Lamp Current Low : 10
 Lamp Current High : 0
 Wavelength : 283.3
 Slit Width : 0.5
 Lamp Mode : KXC-D2



Line Search: OK
 Beam Balance: OK

Type	Abs.	BG	(ppb)	Drift	Final	Units
MSA	0.1344	0.1676	120.0000	1.0000	120.0000	
REP	0.1453	0.1703	120.0000	1.0000	120.0000	
AVG	0.1399	0.1690	120.0000	1.0000	120.0000	
CV =	5.4921%	SD =	0.0077			

Type	Abs.	BG	(ppb)	Drift	Final	Units
MSA	0.1178	0.1755	100.0000	1.0000	100.0000	
REP	0.1232	0.1637	100.0000	1.0000	100.0000	
AVG	0.1205	0.1696	100.0000	1.0000	100.0000	
CV =	3.1694%	SD =	0.0038			

Type	Abs.	BG	(ppb)	Drift	Final	Units
MSA	0.0925	0.1790	70.0000	1.0000	70.0000	
REP	0.1006	0.1645	70.0000	1.0000	70.0000	
AVG	0.0966	0.1718	70.0000	1.0000	70.0000	
CV =	5.8777%	SD =	0.0057			

Type	Abs.	BG	(ppb)	Drift	Final	Units
MSA	0.0798	0.1786	50.0000	1.0000	50.0000	
REP	0.0768	0.1816	50.0000	1.0000	50.0000	
AVG	0.0783	0.1801	50.0000	1.0000	50.0000	
CV =	2.6876%	SD =	0.0021			

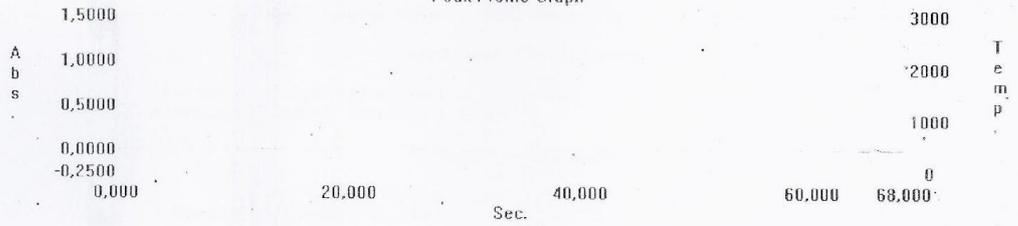
Type	Abs.	BG	(ppb)	Drift	Final	Units
MSA X	0.0509	0.1765	30.0000	1.0000	30.0000	
REP X	0.0444	0.1743	30.0000	1.0000	30.0000	
AVG X	0.0000	0.0000	30.0000	1.0000	30.0000	
CV =	0.0000%	SD =	0.0000			

Type	Abs.	BG	(ppb)	Drift	Final	Units
MSA X	0.0283	0.1931	10.0000	1.0000	10.0000	

Type	Abs.	BG	(ppb)	Drift	Final	Units
REP	0.0333	0.1859	10.0000	1.0000	10.0000	
REP	0.0332	0.1829	10.0000	1.0000	10.0000	
AVG	0.0332	0.1844	10.0000	1.0000	10.0000	
CV =	0.3894%	SD =	0.0001			

Type	Abs.	BG	(ppb)	Drift	Final	Units
MSA X	0.0280	0.1402	0.0000	1.0000	0.0000	
REP	0.0325	0.1841	0.0000	1.0000	0.0000	
REP	0.0312	0.1243	0.0000	1.0000	0.0000	
AVG	0.0319	0.1542	0.0000	1.0000	0.0000	
CV =	3.0479%	SD =	0.0010			
RES			31.5336	1.0000	31.5336	

Peak Profile Graph



Anexo II: Certificado del Patrón de Plomo

Supelco®

www.sigmaldrich.com

Certificate of Analysis – Certified Reference Material

Certipur® Lead standard solution 1000 mg/l Pb



Product no.: 1.19776.0500
Lot no.: HC91308676
Description of CRM: Lead standard solution 1000 mg/l Pb
Expiry date: 2022/12/31
Storage: +15°C to +25°C tightly closed in the original container
Composition: Pb(NO₃)₂ in HNO₃ 0.5 mol/l

Analyte	Certified value as mass fraction	Associated uncertainty, $U=k \cdot u$ ($k=2$) as mass fraction
Pb	987 mg/kg	± 5 mg/kg

Metrological traceability: Directly traceable to NIST SRM 3128, lot 101026
Measurement method: Inductively coupled plasma optical emission spectrometry ICP-OES
Intended use: This reference material is intended for use as a calibration standard in element analysis.
Instructions for handling and correct use: Shake well before use and never pipet directly from the original container. See Details for correct use on page 2.
Health and safety information: Please refer to the Safety Data Sheet for detailed information about the nature of any hazard and appropriate precautions to be taken.
Accreditation: Merck KGaA, Darmstadt, Germany is accredited by the German accreditation authority DAkkS as registered reference material producer D-RM-15185-01-00 in accordance with ISO 17034 and registered calibration laboratory D-K-15185-01-00 according to DIN EN ISO/IEC 17025.
Certificate issue date: 2019/12/18



ISO 17034



ISO/IEC 17025

A. Yildirim

Dipl.-Ing. Ayfer Yildirim
(Responsible QC Laboratory Manager)

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany, Tel.: +49 (0)6151 72-2440
EMD Millipore Corporation, 400 Summit Drive Burlington MA 01803, USA, Tel. +1-978-715-4321
Sigma-Aldrich Canada Co. or Millipore (Canada) Ltd., 2149 Winston Park, Dr. Oakville, Ontario, L6H 6J8, Phone: +1 800-565-1400



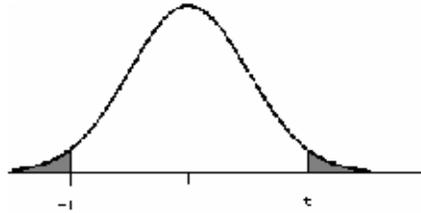
Certificate Page 1 of 2

Certificate version 01

Anexo III

Tabla de la distribución t

Tabla de cuantiles de la distribución t de Student



(a) El área de las dos colas está sombreada en la figura.
 (b) Si H_A es direccional, las cabeceras de las columnas deben ser divididas por 2 cuando se acota el P-valor.

gl	ÁREA DE DOS COLAS						
	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01	0,001	0,0001
1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657	636,619	6366,198
2	1,886	2,920	4,303	6,695	9,925	31,598	99,992
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	12,924	28,000
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	8,610	15,544
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	6,869	11,178
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,959	9,082
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	5,408	7,885
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	5,041	7,120
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,781	6,594
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,587	6,211
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,437	5,921
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	4,318	5,694
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	4,221	5,513
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	4,140	5,363
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	4,073	5,239
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	4,015	5,134
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,965	5,044
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,922	4,966
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,883	4,897
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,850	4,837
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,819	4,784
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,792	4,736
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,767	4,693
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,745	4,654
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,725	4,619
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,707	4,587
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,690	4,558
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,674	4,530
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,659	4,506
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,646	4,482
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,551	4,321
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,460	4,169
100	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626	3,390	4,053
140	1,288	1,656	1,977	2,353	2,611	3,361	4,006
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,291	3,891

Fuente de la tabla de Student: [Tabla-t-Distribución-t-de-Student.pdf \(matemovil.com\)](http://matemovil.com/Tabla-t-Distribución-t-de-Student.pdf)