

CAPITULO 20

ANALISIS DE MINERALES Y ELEMENTOS TRAZA EN ALIMENTOS

Peter Kastenmayer

INTRODUCCION

Los minerales y elementos traza son esenciales para una amplia gama de funciones metabólicas en el cuerpo humano. Las deficiencias de minerales y elementos traza pueden producir severos daños en la salud (1). Los alimentos juegan un rol clave al suministrar estos nutrientes para su consumo por los seres humanos. Los datos sobre el contenido de minerales y elementos traza de los alimentos son críticos para las personas involucradas en investigación epidemiológica y patrones de enfermedades, evaluación de la salud y estado nutricional de individuos y poblaciones y el comercio nacional e internacional de los alimentos.

Los datos de composición de alimentos son en la actualidad inadecuados. Existen grandes brechas en los datos disponibles en relación a lo que contienen los alimentos y existe muy poca información sobre la variabilidad de los componentes alimentarios. Por lo tanto, es esencial revisar y completar la información existente sobre el contenido de minerales y elementos traza en los alimentos para las tablas de composición de alimentos. Este artículo dará una breve visión de las técnicas analíticas disponibles para el análisis de estos elementos en los alimentos y los problemas relacionados con su aplicación.

Con el fin de obtener resultados precisos y exactos, se debe controlar cuidadosamente las siguientes etapas durante el análisis:

- Recolección de la muestra
- Pretratamiento de la muestra
- Descomposición de la muestra
- Validación de los métodos y datos analíticos
- Análisis instrumental

Las reglas básicas establecidas para el análisis traza e indicadas a continuación deberían ser seguidas para el procedimiento completo de análisis. Una revisión detallada de estos temas, se encuentra en las referencias (2) y (3):

- El procedimiento analítico debería ser lo más simple posible (el mínimo de manipulación).
- Los análisis deberían realizarse en un ambiente limpio a fin de reducir el riesgo de contaminación.
- La manipulación de la muestra debería hacerse utilizando guantes de polietileno libres de talco.

Todo el material que entre en contacto con las muestras debe ser en lo posible puro e inerte. Generalmente este requerimiento se cumple con cuarzo,

teflón, polietileno y polipropileno.

- El instrumental y los contenedores deberán limpiarse rigurosamente para proporcionar bajos niveles de blanco y reducir los riesgos de pérdidas por absorción en las paredes de los vasos (Gráfico 1)
- Deberán utilizarse sólo reactivos purificados y agua de alta pureza

Todas las etapas del proceso analítico deben ser efectivamente monitoreadas y probadas mediante el análisis de mate-

riales de referencia estándar apropiados y de blancos químicos.

RECOLECCION DE LA MUESTRA

El muestreo es una etapa muy crítica del proceso de análisis debido a que los errores que se cometen en esta etapa pueden comprometer seriamente los resultados obtenidos posteriormente mediante métodos analíticos sofisticados. A menudo los alimentos no son homogéneos, por lo tanto, el tamaño de la muestra debe escogerse cuidadosamente a fin de obtener una muestra representativa.

Gráfico 1
Control de contaminación y pérdidas

Regla básica para la limpieza del equipamiento :

Cada ítem que no se ha limpiado lleva el riesgo de contaminar !

Limpieza del material de vidrio y plástico (polietileno, polipropileno, etc) :

- Sumergir en HCl o HNO₃ 1M durante 24 horas, enjuagar bien con agua pura, secar en un lugar libre de polvo, guardar en bolsas plásticas o en cajas herméticas

Limpieza de teflón, cuarzo :

- Hervir en HNO₃ 4M durante 8 horas, enjuagar bien con agua pura, secar en un lugar libre de polvo, guardar en bolsas plásticas o en cajas herméticas

Se deben tomar precauciones para evitar la contaminación durante el muestreo. El material complementario al muestreo (como por ejemplo, cuchillos, cucharas, etc.) deberá ser de material inerte como titanio, teflón o polietileno.

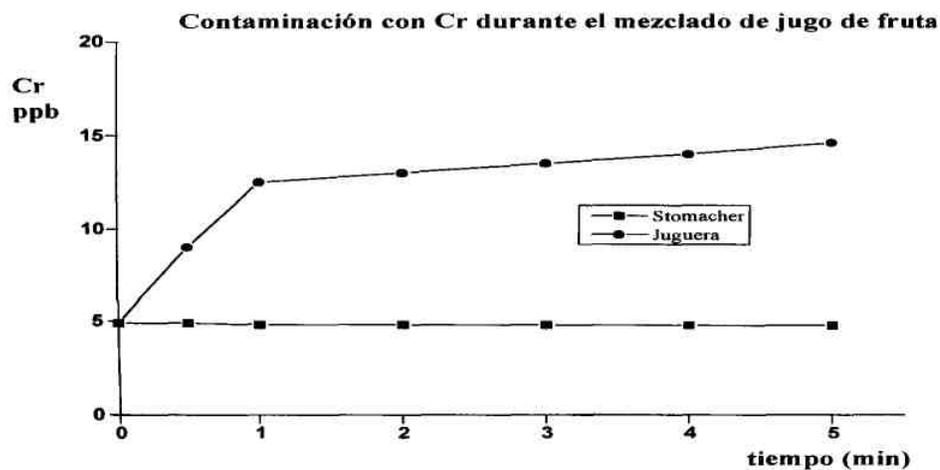
PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Si el contenido mineral y de elementos traza de las muestras se va a expresar sólo en base a alimento fresco, es necesario una homogeneización o molienda. Para obtener datos sobre base seca o para preservar la muestra para su almacenamiento, se requiere una preparación posterior como por ejemplo secar en estufa o liofilizar.

Homogeneización

La homogeneización húmeda en una bolsa plástica cerrada utilizando una licuadora de laboratorio del tipo Stomacher se usa frecuentemente para homogeneizar muestras de alimentos frescos. Una de las principales ventajas de esta técnica consiste en el hecho que no existe un contacto directo entre la muestra y el equipo. Esto elimina el riesgo de contaminación y no existe necesidad de limpiar las partes de la máquina. Una alternativa menos costosa son los mezcladores de laboratorio con hojas de titanio o mezcladores caseros (por ejemplo una moladora de café). Estos son más difíciles de limpiar y aumenta el riesgo de contaminación con Fe, Cr y Ni si se utilizan hojas de acero inoxidable (Gráfico 2).

Gráfico 2
Pretratamiento de la muestra



Secado

Generalmente se acepta que no existen mayores problemas de pérdidas de metales típicos como Na, K, Mg, Ca, Fe, Cu y Zn durante la liofilización o el secado en estufa a 60-120°C. Para el Se, se han observado pérdidas en muestras secadas en estufa pero no en las muestras liofilizadas (4). La liofilización generalmente ocupa más tiempo que el secado en estufa pero es más adecuado para los materiales sensibles al calor.

DISOLUCIÓN DE LA MUESTRA

La mayoría de los métodos espectroscópicos para la determinación de metales traza requieren de una mineralización de la muestra para remover la materia orgánica de los alimentos. El método más frecuentemente utilizado para la mineralización de las muestras de alimentos es la calcinación ya sea por vía seca o, por vía húmeda con agentes oxidantes. La vía húmeda puede realizarse en vasos abiertos o sistemas cerrados bajo presión.

La calcinación vía seca en una mufla tiene la ventaja de que no se necesitan reactivos o sólo se requiere una pequeña cantidad de ellos; el rendimiento de muestras es alto y se requiere sólo instrumental simple. Por lo general, las muestras son calentadas a 500-550°C en crisoles de sílica o de platino (5). La técnica no es adecuada

para elementos volátiles (por ejemplo Se, Hg) los cuales se pierden durante la calcinación. Generalmente, la técnica puede utilizarse para el análisis de metales tales como Na, K, Mg, Ca, Fe, Cu y Zn aunque se ha informado ocasionalmente pérdidas de estos elementos. Por lo tanto, es aconsejable verificar los resultados para cada matriz de la muestra analizando un material de referencia o comparando con una técnica establecida de calcinación por vía húmeda.

Las técnicas convencionales de calcinación por vía húmeda en vasos abiertos involucran el calentamiento de la muestras en ácido por períodos largos. Las mezclas más comúnmente utilizadas son $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HClO}_4$ y $\text{HNO}_3/\text{HClO}_4$. Para muchas aplicaciones pueden utilizarse reactivos de alta pureza disponibles comercialmente. Para propósitos especiales, se puede preparar ácidos ultra puros mediante subebullición (4). La vía húmeda puede utilizarse también para elementos volátiles como Se si se seleccionan las condiciones apropiadas de oxidación. Bock (5) ha revisado en detalle los diferentes procedimientos. Sin embargo, los sistemas abiertos de calcinación vía húmeda también tienen una serie de desventajas. Se requieren largos períodos de calentamiento y grandes cantidades de ácidos y existe un riesgo de contaminación y pérdidas durante la mineralización.

Además, los ácidos fuertes son altamente corrosivos y el uso del ácido perclórico requiere de precauciones especiales de seguridad debido al riesgo de explosiones.

Estas desventajas han llevado al desarrollo de sistemas cerrados donde la descomposición puede realizarse bajo temperatura y presión elevadas. Se reduce significativamente el tiempo de digestión, se necesitan sólo cantidades pequeñas de ácidos y se elimina el riesgo de pérdida de elementos volátiles o contaminación

aérea. En la actualidad, se encuentran disponibles diversos sistemas que utilizan bombas calentadas con microondas las cuales permiten una rápida digestión (10-20 min) de la mayoría de los alimentos usando sólo HNO_3 y H_2O_2 (Gráfico 3) (6,7). Pequeñas cantidades de compuestos solubles de carbono permanecen en el digerido especialmente si se utilizan bombas de baja presión (presión máxima <14 bar). En la mayoría de los casos, estos compuestos solubles no son un problema para las determinaciones de metales que utilizan métodos espectroquímicos.

Gráfico 3
Métodos de descomposición

Digestión por microondas (bombas cerradas)
<ul style="list-style-type: none">• Muchos sistemas disponibles en el mercado :<ul style="list-style-type: none">- MDS (CEM), PMD (Kürner), MLS (MLS GmbH), Parr• La calidad de la digestión depende de la presión/temperatura :<ul style="list-style-type: none">- Vaso estándar : 15 a 20 bar- Vaso de alta presión : 80 a 100 bar• Algunas desventajas :<ul style="list-style-type: none">- Sólo 0.1 a 0.5 gramos de muestra orgánica- Digestión incompleta a baja temperatura/presión (compuestos orgánicos solubles)- Riesgo de explosión si no se utilizan según las instrucciones

VALIDACION DE LOS METODOS Y DE LOS DATOS ANALITICOS

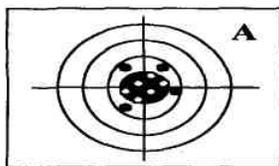
La principal dificultad en la determinación de elementos traza en el análisis de alimentos es la exactitud y precisión de los resultados analíticos. En el Gráfico 4 se muestra la diferencia entre la reproducibilidad (precisión) y la exactitud. Una técnica analítica bien desarrollada y validada debería proporcionar resultados sin error sistemático (exactos) y un pequeño error estadístico (precisos). Los

métodos absolutos como por ejemplo volumetría, gravimetría, electrogravedad, colorimetría y dilución isotópica son, por lo general, muy precisos y exactos pero, a menudo, no pueden aplicarse a los análisis de minerales o elementos traza.

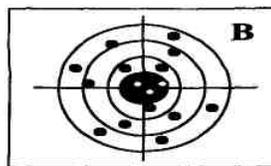
Los métodos comparativos tales como los métodos espectroquímicos requieren de calibración contra estándares conocidos para obtener resultados cuantitativamente exactos.

Gráfico 4
Metodología de determinaciones analíticas

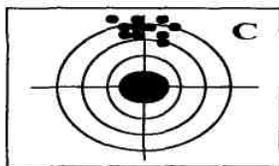
Exactitud y Precisión



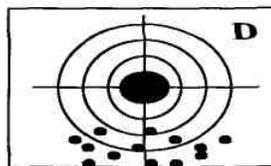
Error estadístico : pequeño
Error sistemático : cero



Error estadístico : grande
Error sistemático : cero



Error estadístico : pequeño
Error sistemático : grande



Error estadístico : grande
Error sistemático : grande

Preparación de estándares

Los estándares deberían prepararse en ácido diluido (por ejemplo HNO_3

0,5 M) utilizando metales de alta pureza, sales estequiométricas o soluciones calibradas de elementos disponibles en el comercio. Tiene que

verificarse la calibración de pipetas y matraces volumétricos usados en este proceso. Los estándares deberían almacenarse en contenedores no contaminados y muy herméticos. La concentración de estándares deberá revisarse después de un almacenamiento prolongado. Para trabajar en el rango de ppb, las soluciones estándares se preparan preferentemente en forma diaria a partir de soluciones concentradas.

Curvas de calibración

Una curva de calibración se obtiene al medir una señal v de una serie de estándares con concentraciones crecientes del analito x y se grafican estos valores en contra de las concentraciones respectivas. Las curvas de calibración pueden ser rectas o curvadas en altas concentraciones. Debe tenerse cuidado en seleccionar el enfoque matemático correcto para definir la línea de calibración a través de los puntos (por ejemplo regresión no lineal para las líneas curvadas).

Interferencias

Idealmente, los estándares y el blanco deberían contener exactamente la misma concentración de todos los elementos de la matriz que la muestra excepto para el analito. A menudo en la práctica, esto no puede realizarse. Entonces, debe verificarse que no existan interferencias que compro-

metan la exactitud del resultado analítico. Las interferencias surgen debido a las diferencias en composición de la muestra analizada y de los estándares externos y los blancos utilizados para la calibración. Pueden subdividirse en interferencia por el blanco o aditiva e interferencia por la matriz o multiplicativa. Una interferencia aditiva puede ser causada por los componentes de la matriz que producen un señal no compensada independiente de la concentración de analitos. Un ejemplo típico es la interferencia espectral producida por H_2SO_4 en la longitud de onda del Fe (248,3 nm) en espectrometría de absorción atómica de llama. Si no puede evitarse el uso de H_2SO_4 para un análisis en particular tal interferencia puede corregirse usando un sistema de corrección del fondo (background) (para mayores detalles, ver párrafo sobre espectrometría de absorción atómica) o restando a la señal de la muestra, la señal de un blanco que contiene exactamente la misma cantidad de H_2SO_4 que la muestra.

Debe mencionarse también que tanto la contaminación con el analito como la pérdida de éste produce errores del tipo aditivo.

Las interferencias multiplicativas o de la matriz son causadas por componentes de la matriz que alteran la respuesta de la señal del componente analito en una forma proporcional a la señal (por ejemplo

cambio en la pendiente de la línea de calibración). Un ejemplo de tal interferencia puede encontrarse en la depresión de la pendiente de la línea de calibración del Ca en muestras que contienen sulfates o fosfatos en espectrometría de absorción atómica de llama. La separación del elemento objetivo de los elementos de la matriz es una forma eficiente de evitar tales problemas pero por lo general, ocupa mucho tiempo y es costosa. Por lo tanto, se escogen otros enfoques para minimizar las interferencias de la matriz tales como el método del estándar interno, la compatibilización de matrices o el método de adición de estándar.

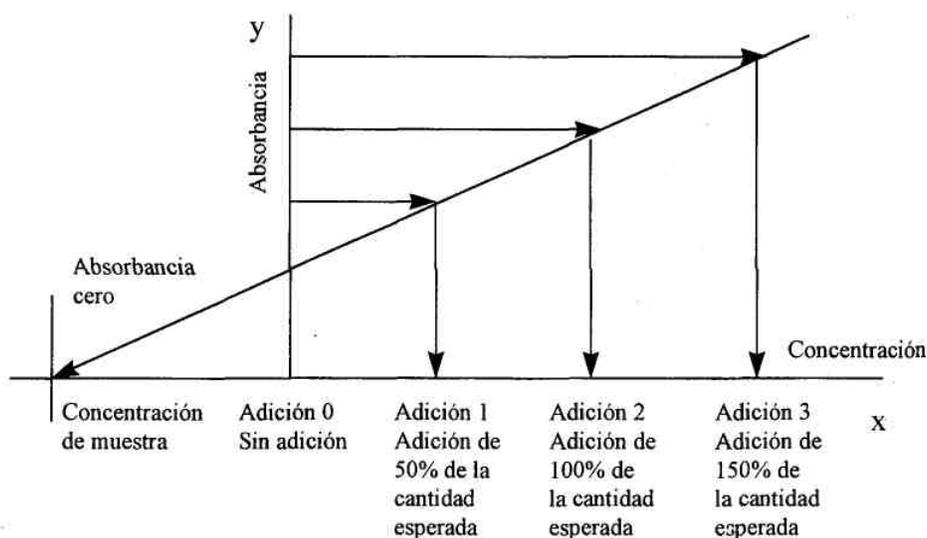
En el método del estándar interno, una concentración conocida de un elemento de referencia x_r se agrega a todas las muestras, estándares y blancos. La señal del analito v , es comparada con la señal del estándar interno y_r . La curva de calibración se prepara graficando la relación entre la señal del analito y la señal de referencia y_i/y_r contra la concentración del analito de los estándares x_i . Las especies de referencia, por lo general son escogidas, por tener propiedades químicas y espectroscópicas similares

a aquellas del analito de tal modo que la señal analítica del analito y del estándar interno cambien proporcionalmente cuando ocurren los efectos de la matriz. El método del estándar interno se aplica frecuentemente en espectrometría de masa de plasma acoplado inductivamente.

En el método de la compatibilización de la matriz, los estándares se preparan para que calcen lo más posible con la matriz de la muestra en que ha de determinarse el analito. Este método se utiliza principalmente para muestras con una matriz simple. Para matrices complicadas o desconocidas, se aplica generalmente el método de adiciones de estándares (Gráfico 5). Se toman volúmenes iguales de solución de la muestra; se agregan cantidades conocidas y crecientes del elemento que ha de analizarse a todas las soluciones exceptuando a una. Todas las *soluciones son diluidas al mismo volumen* y se miden. La adición de estándar puede aplicarse sólo si existe una relación lineal entre la señal y la concentración del analito x . Es importante mencionar que el método de adición de estándar no puede aplicarse para corregir las interferencias aditivas (8).

Gráfico 5
Metodología de determinaciones analíticas

- Para superar las interferencias:
- Compatibilización de la matriz
 - Método del estándar interno
 - Método de la adición de estándar



Detección y límite de determinación

Los métodos analíticos se caracterizan por sus límites de sensibilidad, detección y determinación. El límite de detección, definido como la concentración de analito más pequeña que se puede detectar, se puede calcular mediante:

$$D_L = \frac{K_L \times S_B}{b} \quad (K_L = 3) \quad (1)$$

El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito que puede determinarse con una

desviación estándar específica de, por ejemplo, 10%

$$D_Q = k_Q \times S_B \quad (k_Q = 10) \quad (2)$$

b = pendiente de la línea de calibración (b es también la sensibilidad del método)

S_B = desviación estándar del fondo o blanco.

En química analítica los valores escogidos para k_L y k_Q son, por lo general, 3 y 10. Debe mencionarse que para una concentración D_L , el

promedio de la señal medida será $y_B + 3SB$ y sólo un 50% de los resultados serán considerados como detectados. Por lo tanto, las mediciones de bajas concentraciones no son confiables. En tal situación, es aconsejable tratar de mineralizar una cantidad más grande de muestra o incluir una etapa de preconcentración para obtener una mejor relación señal/fondo (o blanco). Si esto no es posible, deberá seleccionarse un método analítico más adecuado para el problema analítico.

Control de calidad

Cuando se desarrolla un nuevo método analítico, tiene que revisarse la exactitud para asegurar que se obtengan resultados confiables. Existen varias posibilidades para este propósito. Si se encuentra disponible en el laboratorio otro método analítico validado, puede analizarse una serie de muestras por ambos métodos y comparar los resultados utilizando regresión lineal. Los resultados obtenidos con el nuevo método se grafican en el eje y , y aquellos obtenidos con el método estándar en el eje x . El coeficiente de correlación y la línea de regresión dan información sobre la concordancia entre los métodos (por ejemplo $\text{intercepto} = 0$, $\text{pendiente} = 1$, $r = 1$ en el caso ideal de una perfecta concordancia).

La exactitud de los resultados también puede revisarse analizando un material de referencia (MR) adecuado junto

con la muestra. Los materiales de referencia son sustancias donde la concentración de uno o más elementos es certificada por un procedimiento técnicamente válido mediante un ente certificador prestigioso. Es importante que el contenido del elemento y la matriz del material de referencia sean similares a aquellos de la muestra. Los materiales de referencia son proporcionados por la Oficina Comunitaria de Referencia (BCR, Bruselas, Bélgica), la Agencia Internacional de Energía Atómica (IAEA, Viena, Austria), el Instituto Nacional de Estudios Ambientales (NIES, Tsukuba Ibaraki, Japón) y por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, Gaithersburg, USA).

Otro enfoque es el uso de métodos estándares de análisis emitidos por instituciones tales como la Asociación Americana de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC).

Además, la validez del procedimiento analítico puede someterse a pruebas utilizando muestras sintéticas y muestras "spiked".

MÉTODOS ANALÍTICOS

En la actualidad, está disponible una amplia variedad de métodos analíticos para el análisis de minerales y elementos traza en los alimentos. Los métodos más frecuentemente utilizados incluyen:

- Espectrofotometría
- Fluorometría
- Espectrometría de absorción atómica, -AAS- (atomic absorption spectrometry)
- Espectrometría de absorción atómica de llama, -FAAS- (flame atomic absorption spectrometry)
- Espectrometría de absorción atómica de horno de grafito, -GFAAS- (graphite furnace atomic absorption spectrometry)
- Espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros, -HGAAS- (hydride generation atomic absorption spectrometry)
- Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente, -ICP-AES- (inductively coupled plasma atomic emission spectrometry)
- Espectrometría de masa de plasma acoplado Inductivamente, -ICP-MS- (inductively coupled plasma mass spectrometry)

La elección del método analítico, por lo general, depende de la instrumentación disponible, la experiencia del

laboratorio y los niveles de concentración del analito.

Espectrofotometría

Hace tres década era la técnica más común para el análisis de metales en los alimentos. Sin embargo ha perdido importancia en años recientes debido al desarrollo de nuevas técnicas tales como la espectrometría de absorción atómica. Se basa en la relación entre la absorción de la radiación visible o ultravioleta cercana de una solución y la concentración de las especies coloreadas en la solución. El analito tiene que ser convertido a un complejo coloreado antes del análisis. Marczenko entrega una buena revisión de la literatura reciente (10).

La instrumentación básica es todavía relativamente simple y de bajo costo en comparación con los instrumentos que se requieren para las otras técnicas de análisis de metales. El método puede automatizarse fácilmente para el análisis rutinario y da resultados con una buena sensibilidad y precisión. Las desventajas de esta técnica son que a menudo se requiere un control estricto del pH y un estado de oxidación específico y también pueden haber problemas con la interferencia de otros metales. Sin embargo, puede predecirse que se utilizará por muchos años especialmente en laboratorios pequeños o en condiciones de terreno.

Fluorometría

Ciertos metales pueden ser transformados en complejos orgánicos asociados con iones o quelatos fluorescentes que tienen la característica de absorber luz de una longitud de onda y en su lugar emitir luz de otra longitud de onda. La luz emitida o fluorescencia es proporcional a la concentración del analito. El método es relativamente barato y es muy sensible, varios órdenes de magnitud mejor que la espectrofotometría. Se utiliza frecuentemente para la determinación de elementos traza en muestras biológicas y en alimentos que son más difíciles de analizar con otras técnicas como por ejemplo Se (11).

Espectrometría de absorción atómica (AAS)

Los átomos libres producidos en un atomizador a partir de una muestra (llama u horno de grafito calentado eléctricamente) pueden absorber radiación de su longitud de onda específica de resonancia generada por una fuente externa (por ejemplo un cátodo hueco o una lámpara de descarga sin electrodos. Si la luz de esta longitud de onda específica pasa a través del atomizador que contiene el vapor atómico del elemento, parte de la luz será absorbida, y el grado de absorción será proporcional a la densidad de átomos en el paso de la luz.

Más de 60 elementos metálicos pueden determinarse, en un amplio rango de concentraciones mediante este método con una buena sensibilidad y precisión (12).

Diferentes formas de introducción de la muestra y atomización han sido desarrolladas para esta técnica la cual puede automatizarse fácilmente para el análisis rutinario.

Espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS)

La llama se utilizó exclusivamente como fuente de atomización en los primeros años del desarrollo de la AAS. La solución de la muestra se aspira vía un nebulizador dentro de la llama de aire/acetileno o N_2O /acetileno donde se evapora el solvente y los sólidos remanentes se separan en átomos. La FAAS no es muy susceptible a los efectos de la matriz, aunque pueden encontrarse interferencias. Las interferencias físicas pueden ocurrir debido a cambios en la viscosidad de la solución, lo que influye en su velocidad de aspiración dentro de la llama y, por lo tanto, en la cantidad de analito en la llama.

Los errores debido a interferencias físicas se pueden reducir mediante la compatibilización de la matriz. Las interferencias de ionización se encuentran cuando el grado de ionización del analito en la llama

es diferente para las muestras que para los estándares debido a que los átomos e iones no absorben en la misma línea espectral. Los elementos alcalinos y alcalino térreos se ven especialmente afectados por esta interferencia. Las interferencias de ionización pueden ser reducidas al agregar un supresor de la ionización, el cual proporciona una alta concentración de electrones para suprimir la ionización del analito (por ejemplo adición de Cs para el análisis de Na). Las interferencias químicas en la FAAS son causadas a menudo por aniones que forman compuestos de baja volatilidad como por ejemplo óxidos refractarios (B, Al, Fe o V), fosfatos y sulfatos (Mg, Ca). En algunos casos, tales interferencias pueden eliminarse al agregar una agente liberador que reacciona de preferencia con las especies que interfieren y evita su reacción con el analito. Por ejemplo, se puede agregar La como agente liberador en la determinación de Ca para reducir la interferencia del sulfato o fosfato. En casos donde no pueda eliminarse la interferencia, deberá emplearse la técnica de adición de estándar para obtener resultados exactos. La FAAS es probablemente la técnica más ampliamente utilizada para el análisis de metales en alimentos debido a su simplicidad, alto rendimiento de muestras y el costo relativamente bajo de su instrumentación. Permite la determinación de la mayoría de los elementos traza en los alimentos en el rango de mg/kg con una precisión de

0,3-1% (a absorbancias $> 0,1-0,2$) y una exactitud de aproximadamente 0,5-5%.

Espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros (HGAAS)

La HGAAS puede determinar elementos que forman hidruros volátiles como por ejemplo As, Bi, Sn y Te. En esta técnica, el analito es reducido a su hidruro volátil, transferido mediante un chorro de gas a una célula de cuarzo caliente, descompuesto y atomizado. La separación del analito reduce en gran medida las interferencias de la matriz de tal modo que pueden determinarse niveles de concentración de $\mu\text{g}/\text{kg}$. Si el tamaño de la muestra es un problema, puede emplearse inyección de flujo que permite analizar volúmenes de muestra tan pequeños como 100 μl . Sin embargo, el método tiene sus desventajas. Se requiere de un tratamiento especial después de la digestión de la muestra para generar un estado de oxidación específico (e.g. Se^{+4}) para la formación del hidruro y ciertos metales (por ejemplo Cu, Fe) pueden interferir con la formación del hidruro.

Espectrometría de absorción atómica de horno de grafito (GFAAS)

El desarrollo de atomizadores de grafito en barras amplió el poder de

detección de la AAS para un amplio rango de elementos dentro del rango de $\mu\text{g}/\text{kg}$. La solución de la muestra, típicamente 5-100 μl , es inyectada dentro de un tubo de grafito de 3-5 cm de longitud, el cual es luego calentado eléctricamente en etapas para producir vapor atómico del analito. Por lo general el programa de calentamiento, comprende una etapa de secado para evaporar el solvente (70-120°C); una etapa de "quemado" (o calcinación) para remover la materia orgánica o los componentes volátiles de la matriz (350-1250°C); una etapa de atomización (2000-3000°C) y, un ciclo de limpieza a temperatura máxima a fin de quemar el analito remanente. Se requiere de una optimización cuidadosa de todos los parámetros del calentamiento durante el desarrollo de un método para obtener resultados reproducibles y exactos.

Al comparar con la FAAS, la atomización electrotérmica padece con mayor frecuencia de interferencias tales como absorción de fondo por especies moleculares o dispersión y efectos de la matriz. Los fabricantes del instrumental reconocieron tempranamente la importancia de corregir la absorción de fondo y en la actualidad se dispone de varios y diferentes tipos de sistemas de corrección de fondo (Deuterio, Zeeman y Smith-Hieftje). Las interferencias químicas se encuentran con frecuencia en GFAAS y para muchas aplicaciones se requiere del método de adición de estándar.

Además, algunos elementos (especialmente del grupo periódico V) pueden perderse como compuestos volátiles durante la etapa de calcinación particularmente cuando están presentes haluros. Tales problemas pueden a menudo eliminarse usando el procedimiento denominado de la modificación de la matriz. La modificación de la matriz consiste en agregar un material específico que reduce la volatilidad del analito y por lo tanto, permite la calcinación de la muestra a una mayor temperatura. Por ejemplo, se puede reducir la pérdida de As o Se al agregar iones de Ni para formar NiAs o NiSe.

En algunos casos, el modificador también puede contribuir a hacer que un componente interferente de la matriz sea más volátil sin la pérdida del analito. Como un ejemplo, se puede agregar NH_4NO_3 como modificador para volatilizar una matriz de NaCl como NH_4Cl y NaN_3 antes de atomizar los elementos del analito.

Algunos fabricantes también ofrecen instrumentos GFAAS para el análisis directo de muestras sólidas tales como polvos, hojuelas, tejidos, etc. La cantidad de muestras tomadas para el análisis fluctúa de 0,1 a 10 mg para concentraciones de analitos en el rango de ppm y las ppb. El muestreo directo de sólidos es útil para aumentar el poder de detección y evitar la disolución de la muestra, la

cual ocupa mucho tiempo y aumenta el riesgo de contaminación.

El muestreo de sólidos también tiene algunas desventajas. Por lo general, la concentración de la matriz es alta debido a que la matriz orgánica no es removida por una etapa de mineralización lo cual da como resultado una alta absorción de fondo y fuertes interferencias químicas. Adicionalmente, uno a menudo no puede estar seguro que una muestra sea homogénea en una escala de unos pocos miligramos.

La precisión y exactitud típicas para las determinaciones de la mayoría de los elementos traza por la GFAAS están en el rango de 1-5% y 0,5-5% respectivamente.

La GFAAS tiene una sensibilidad que es superior aproximadamente un factor de 1000, a la FAAS pero su rendimiento de muestras es mucho menor. Esta es una desventaja importante cuando tiene que determinarse un gran número de elementos en forma rutinaria.

Espectrometría de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES)

La ICP-AES a diferencia de la espectrofotometría, fluorometría y AAS es una técnica multielemento que permite el análisis simultáneo de un gran número de elementos (13). Se

basa en la medición de la radiación de la línea espectral emitida por átomos excitados en un plasma de Ar generado por calentamiento inductivo con un campo electromagnético de alta frecuencia. Los principales componentes de un instrumento ICP-AES son la antorcha plasmática, el nebulizador y el policromador. La antorcha consiste en 3 tubos concéntricos de cuarzo rodeados por una bobina de inducción enfriada por agua conectada a un generador de alta frecuencia. El plasma es creado al hacer que el Ar sea conductivo al exponerlo a una descarga eléctrica que crea electrones e iones. Bajo la influencia del campo electromagnético de alta frecuencia, las partículas cargadas calientan el argón hasta que el plasma alcanza una temperatura de 5500-8000 °K. Esto lleva a una vaporización casi completa del analito y a una alta eficiencia de atomización. La solución de la muestra es introducida vía nebulizador dentro de la antorcha utilizando un flujo transportador de Ar de 1 L/min. Para el gas que enfría se requiere de un flujo de gas mucho mayor, por lo general, 10 L/min. La técnica más común de introducción de la muestra es vía nebulizador. Se utilizan varios tipos de nebulizadores para generar aerosoles a partir de muestras líquidas: nebulizador concéntrico, nebulizador Babington, nebulizador de flujo cruzado y nebulizador ultrasónico. Cada tipo de nebulizador presenta características diferentes respecto a eficiencia, tolerancia a altas

cargas de sales y estabilidad. Existe una amplia variedad de técnicas de introducción de la muestra en la ICP-AES además de los nebulizadores convencionales: nebulización termo-spray, evaporación electrotérmica, generación de hidruros y muestra sólida directa utilizando ablación laser.

El policromador sirve para separar las líneas espectrales para los diferentes elementos. Pueden distinguirse dos tipos de instrumentos de ICP-AES:

- Los espectrómetros de lectura directa que poseen varias ranuras de detección prealineadas que permiten la detección simultánea de todos los elementos de interés. En este diseño, las líneas analíticas, por ejemplo el tipo de elementos medidos, no pueden cambiarse con facilidad.
- Los espectrómetros secuenciales más flexibles que utilizan sólo un canal. Los diferentes elementos son detectados secuencialmente al rotar el monocromador, lo que obviamente ocupa mucho más tiempo que el enfoque simultáneo.

Para la determinación simultánea de varios elementos, debe establecerse un compromiso en las condiciones de la fuente a fin de obtener una respuesta máxima y una buena linearidad. ICP tiene un rango dinámico lineal de tres a seis órdenes de magnitud, permitiendo la determinación de un

amplio rango de concentraciones sin dilución o preconcentración (por ejemplo rango de concentración para el análisis de Zn, de 0,04 a 10 µg/mL). Las interferencias químicas y los efectos de la matriz se deben a una mayor temperatura del plasma menos severa que en AAS. Los límites de detección para la ICP-EAS están aproximadamente en el mismo rango que para la FAAS. El método también tiene sus desventajas. El espectro de emisión de ICP puede ser complejo y por lo tanto, ocurren frecuentemente interferencias espectrales de los elementos de la matriz, de especies moleculares o del gas argón. Estas pueden ser minimizadas utilizando espectrómetros de alta resolución. Adicionalmente, se han desarrollado métodos complejos de corrección para compensar estos efectos. Otra desventaja se encuentra en el alto costo del sistema y del funcionamiento de éste debido al alto consumo de Ar. Sin embargo, ICP-EAS ha encontrado una amplia aplicación en el análisis de alimentos debido a su muy alto rendimiento de muestras.

Espectrometría de masa de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

Aunque la ICP-MS es una técnica analítica relativamente nueva si se compara con los métodos ya descritos, se ha posicionado rápidamente como una de las técnicas más útiles y versátiles para la determinación de

trazas en el análisis de alimentos (14,15,16). El desarrollo de la ICP-MS se produjo por el deseo de combinar la capacidad multielemento y amplio rango de trabajo lineal de la ICP-EAS con los límites de detección excepcionalmente bajos de la GFAAS. En esta técnica, se combina una mente de ion plasma a alta temperatura y a presión atmosférica con un espectrómetro de masa bajo vacío como un detector sensible. El plasma acoplado inductivamente se genera tal como se describe anteriormente para ICP-EAS. Los iones producidos en el plasma son maestreados en una dirección axial a través de un orificio estrecho (aproximadamente 0,7-1,2 mm de diámetro) dentro de un interfaz bombeado diferencialmente con lentes electrostáticas y desde allí extraídos hacia el analizador de masa. Para la mayoría de los tipos de ICP-MS, se utiliza un cuádrupolo para la separación de masa, pero recientemente se encuentran disponibles instrumentos de sector magnético de alta resolución. Los iones transmitidos son detectados por un multiplicador de electrones "fuera de eje", el cual puede operarse en los modos analógico y/o conteo de pulso. La captura de los datos puede hacerse en los modos de exploración (scanning) o de pico. En el primer modo, se explora la región de la masa con los isótopos de interés mientras que en el modo de pico sólo se miden los iones preseleccionados. La forma más común de introducir la muestra es

la inyección directa de soluciones utilizando un nebulizador neumático y una cámara "spray". Se dispone de una variedad de tipos diferentes de nebulizadores similares a aquellos utilizados por la ICP-EAS. Debido a la alta temperatura del plasma, los compuestos del analito en el aerosol son disociados eficientemente, atomizados y se forman iones con una carga positiva. Más de 50 elementos son ionizados a M^+ en una proporción de $> 90\%$. Desafortunadamente, también se producen picos de iones de óxidos (MO^+), iones cargados doblemente e iones poliatómicos (por ejemplo $ArNa^+$) ya sea a partir del analito, la matriz de la muestra o del solvente. Estos picos complican el espectro y pueden causar serias interferencias espectrales si ocurren en masas de iones con carga individual (por ejemplo ^{40}Ar $^{16}O^+$ en $^{56}Fe^+$). Ellos no pueden ser resueltos utilizando analizadores cuádrupolo pero pueden minimizarse optimizando las condiciones de funcionamiento de los instrumentos o utilizando métodos alternativos de introducción de la muestra. Adicionalmente, la elección del solvente puede contribuir a reducir las interferencias de fondo. Por ejemplo, se prefiere HNO_3 diluido en vez de HCl , H_2SO_4 y H_3PO_4 para la mayoría de las aplicaciones debido a que produce un espectro más simple de fondo. Las interferencias poliatómicas en muchos casos pueden eliminarse utilizando instrumentos de sector magnético de alta resolución de mayor costo, lo cual permite una

resolución de masa hasta 8000. La ICP-MS también sufre de efectos de la matriz, por ejemplo la matriz induce cambios de la intensidad de la señal iónica especialmente en concentraciones de > 1 g/L de sólidos disueltos. En altas concentraciones de sales, pueden observarse efectos de la matriz tales como supresión de la ionización o efectos de carga espacial. Se utilizan diversos métodos para corregir o superar estos efectos de la matriz: dilución de la muestra, compatibilización de la matriz, uso de un estándar interno, adición de estándar, separación química dilución isotópica.

La forma más común de introducción de la muestra en ICP-MS es la nebulización de la solución de la muestra. Durante los últimos años se ha desarrollado una gran variedad de otros métodos. Las muestras sólidas pueden ser analizadas directamente, sin una disolución preliminar, mediante volatilización electro-térmica, nebulización termospray o ablación láser. Las muestras gaseosas tales como hidruros volátiles (Se, As) o compuestos que eluyen de una cromatografía de gas o HPLC (Cr^{3+} / Cr^{6+}) también pueden introducirse en forma directa y eficiente dentro de ICP.

Los límites de detección de los instrumentos con cuádrupolo para la mayoría de los elementos son mejores que $0,1$ $\mu\text{g/L}$ y por lo tanto, considerablemente más bajos que

aquellos para la ICP-EAS ($0,1$ - 100 $\mu\text{g/L}$). Los instrumentos de sector magnético de alta resolución permiten límites de detección inferiores a $0,05$ ng/L . Ventajas adicionales, más allá de los excelentes límites de detección, incluyen un rendimiento de muestras extremadamente alto (>100 muestras/día) y la disponibilidad de información isotópica. La principal desventaja de la ICP-MS consiste en el alto costo del instrumento y de funcionamiento (derivado principalmente de un gran consumo de gas argón puro) y la existencia de interferencias isobáricas en el rango de masa baja (< 80 urna).

Elección del instrumental

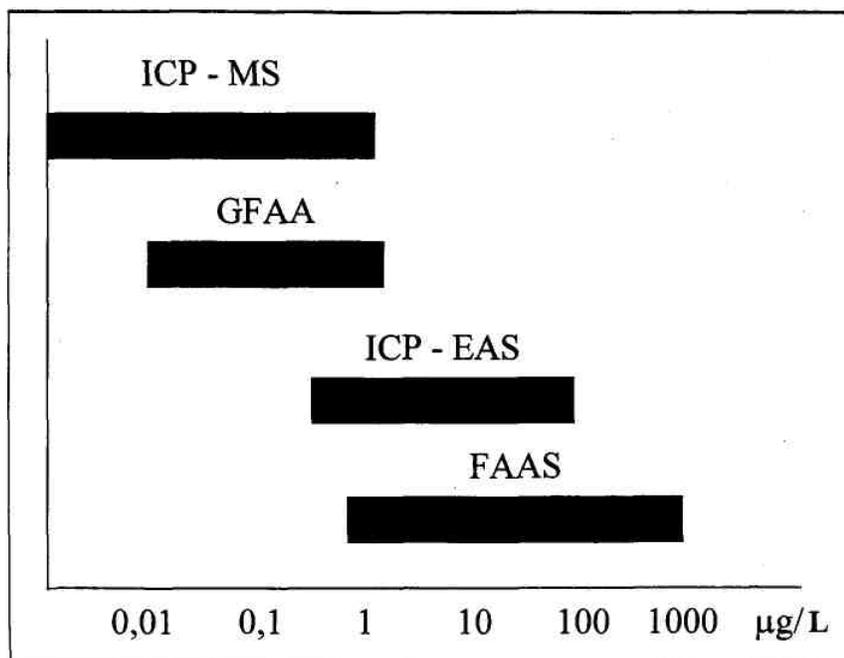
Con la amplia variedad de técnicas analíticas modernas disponibles, los jefes de laboratorio deben decidir cual técnica es la más adecuada para su laboratorio. La nueva instrumentación adquirida debería corresponder a las características de los problemas analíticos que se van a resolver. Los parámetros que se deben considerar para la selección de una técnica analítica incluyen: el límite de detección y de sensibilidad, la precisión analítica, el rango de trabajo analítico, los problemas con las interferencias, el costo del instrumento, el rendimiento de muestras, la posibilidad de automatización y los conocimientos y aptitudes del operador a cargo.

En la actualidad la mayoría de los laboratorios utiliza principalmente las técnicas espectrométricas atómicas, para el análisis de elementos traza. La espectrofotometría y fluorimetría se emplean principalmente donde no se dispone de medios suficientes para otros métodos o bajo condiciones de terreno donde es difícil de utilizar

instrumental complejo. A continuación, se dará una breve revisión de los méritos de las principales técnicas espectrométricas atómicas.

Los límites de detección típicos para las principales técnicas espectrométricas atómicas se muestran en el Gráfico 6.

Gráfico 6
Límites de detección típicos para las principales técnicas espectrométricas



Generalmente, los mejores límites de detección son alcanzados utilizando ICP-MS o GFAAS. La FAAS y la ICP-AES tienen límites de detección

similares para la mayoría de los elementos con la excepción de elementos refractantes tales como B, Al, o Zr, los cuales generalmente se

pueden analizar con una mejor sensibilidad en el plasma caliente de ICP.

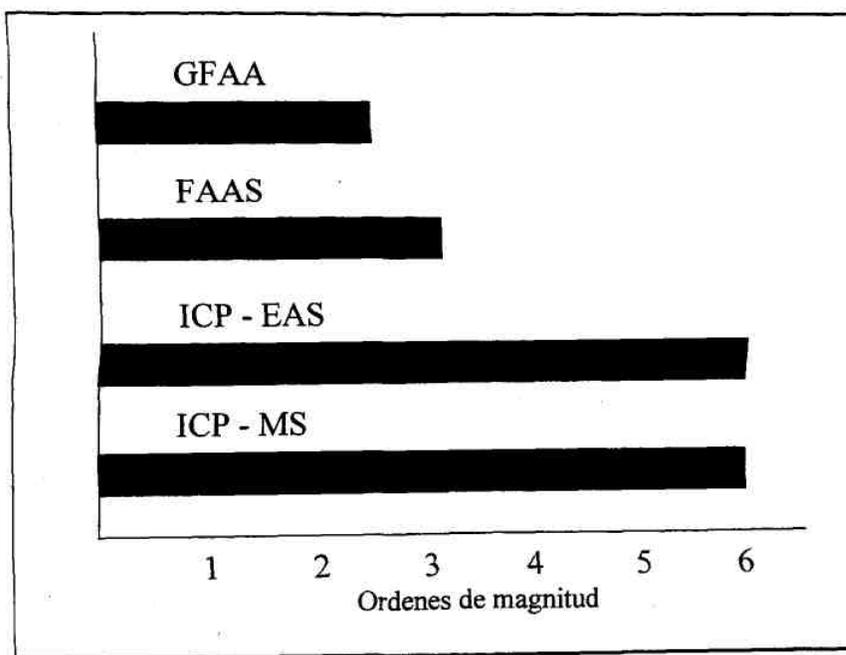
La precisión que se puede obtener en forma rutinaria se encuentra en el siguiente rango: $\approx 0.5\%$ para FAAS, $\approx 1.5\%$ para ICP-AES, $\ll 3-5\%$ para GFAAS y $\approx 2-3\%$ para ICP-MS. La exactitud depende de la calidad de los estándares, el rango de concentración, la presencia de interferencias, el grado de contaminación, etc.

Las interferencias químicas y espectrales no son por lo general un

problema para la FAAS pero ocurren frecuentemente en la GFAAS. La ICP-AES sufre de interferencias espectrales especialmente cuando se analizan matrices complejas. La baja resolución de la ICP-MS también sufre de interferencia debido principalmente a los iones poliatómicos. Esto puede evitarse al utilizar instrumentos de alta resolución más nuevos pero más costosos.

Los rangos de trabajo analítico para las técnicas espectrométricas atómicas se muestran en el Gráfico 7.

Gráfico 7 Rangos de trabajo analítico para las técnicas espectrométricas atómicas

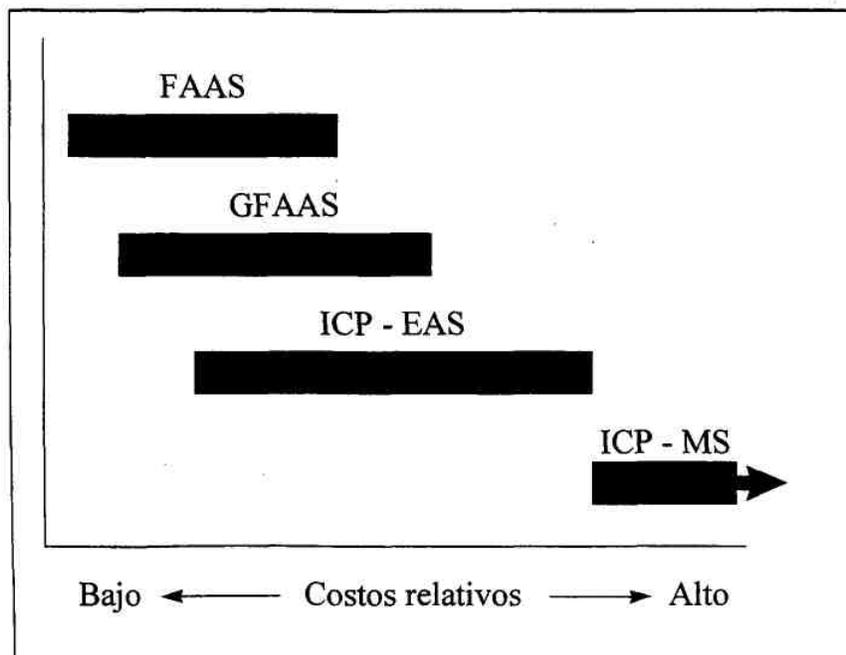


El rango de trabajo analítico se define como el rango de concentración sobre el cual pueden obtenerse resultados cuantitativos sin recalibrar el sistema. Un amplio rango de funcionamiento ahorra el tiempo de análisis que se emplea en calibrar y puede reducir los errores de manipulación de la muestra si las diluciones se mantienen a un mínimo. La ICP-MS y la ICP-AES tienen rangos de funcionamiento de 3 órdenes de magnitud mayores que la GFAAS y la FAAS.

Los costos típicos del sistema para las técnicas espectrométricas atómicas se ilustran en Gráf. 8 Los instrumentos

para análisis de elementos individuales (FAAS y GFAAS) son generalmente menos complejos y, por lo tanto, de menor costo que aquellos instrumentos para las técnicas multielemento (ICP-AES y ICP-MS). El rendimiento de muestras es siempre considerablemente mayor si se emplean los métodos multielemento. Por lo tanto, estas técnicas se utilizan preferentemente en laboratorios donde tienen que hacerse un gran número de análisis de rutina. Sin embargo, los métodos multielemento, por lo general requieren más conocimientos del operador que los métodos más simples para elementos individuales.

Gráfico 8 Sistemas típicos de costo para los sistemas espectrométricos atómicos



Para todos los métodos mencionados anteriormente, la automatización es en la actualidad un asunto de inversión de capital. La mayoría de los fabricantes ofrecen dispositivos de automuestreo que permiten el funcionamiento automático de los instrumentos.

REFERENCIAS

1. Reinhold, J.G., In: *Trace Minerals in Foods*, ed. Smith, K.T., Marcel Dekler, New York, 1988, pp. 1-55
2. Hofmann, J., *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 1988,331,220
3. Mizuike, A., In: *Enrichment Techniques for Inorganic Trace Analysis*, eds. Boschke, F.L., Fresenius, W., Huber, J.F.K., Pungor, E., Rechnitz, G. A., Simon, W., and West, Th, S., Springer Verlag, 1983, pp. 9-20
4. Versieck, J., *J.Micronutr. Anal.*, 1989,6,261
5. Bock, R., In: *Decomposition Methods in Analytical Chemistry*, de. Marr, I. L., Blackie, London, 1979, pp.123-152.
6. Kingston, H.M., and Jassie, L.B., in *Introduction to Microwave Sample Preparation*, eds. Kingston, H.M. and Jassie, L.B., American Chemical Society, Washington DC, 1988, pp. 155-166
7. Knapp, G., *Microchim. Acta*, 1991,11,445
8. Welz, B, *Fresenius Z, Anal Chem.*, 1986,325, 95
9. Vandecasteele, C, Block, C.B. in *Modern Methods for Trace Element Determination*, Wiley & Sons, Chichester, 1993, pp. 68-71.
10. Marczenko, Z., *Separation and Spectrophotometric Determination of Elements*, Horwood, Chichester, 1986.
11. Koh, T.S., and Benson, T.H., *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 1983, 66,918
12. Vandecasteele, C, Block, C.B., in *Modern Methods for Trace Element Determination*, Wiley & Sons, Chichester, 1993, pp. 92-137.
13. Vandecasteele, C, Block, C.B., in *Modern Methods for Trace Element Determination*, Wiley & Sons, Chichester, 1993, pp.138-167.
14. Gray, A.L., in *Inorganic Mass Spectrometry*, eds. Adams, F., Gibjels, R., and van Grieken, R., Wiley-Interscience, New York, 1988, pp. 257-300

15. Handbook of Inductively Coupled Mass Spectrometry, Jarvis, K.E., Gray, A.L., and Houk, R.S., Blackie, Glasgow and London, 1992.
16. Vandecasteele, C, Block, C.B., in *Modern Methods for Trace Element Determination*, Wiley & Sons, Chichester, 1993, pp.192-260.