



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Grado en Química**

Memoria del Trabajo de Fin de Grado

*Optimización de un método de extracción de metales en alimentos (nueces de Brasil) mediante Hidrólisis Enzimática asistida por Energía de Microondas (EH-MAE)*

*Optimización dun método de extracción de metais en alimentos (noces do Brasil) mediante Hidrólise Enzimática asistida por Enerxía de Microondas (EH-MAE)*

*Optimization of an Enzymatic Hydrolysis method assisted by Microwave Energy (EH-MAE) for simultaneous determination of metals in food (Brazil nuts)*

Directores: Jorge Moreda Piñeiro

Isabel Turnes Carou

Autor: Joel Sánchez Piñero

Curso: 2015-2016, convocatoria de junio



# Índice

<b>1. Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Introducción</b> .....	<b>5</b>
2.1. Elementos traza en el organismo .....	5
2.2. Importancia de la determinación de metales en muestras alimentarias y medioambientales .....	6
2.3. Nueces de Brasil .....	6
2.4. Química Verde .....	7
2.5. Digestión ácida asistida por energía de microondas (MAE).....	7
2.6. Hidrólisis enzimática asistida por energía de microondas (EH-MAE).....	8
2.7. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) .....	9
2.8. Diseño de experiencias en Química Analítica.....	11
2.8.1. Diseño factorial Plackett-Burman .....	12
2.8.2. Optimización de las variables .....	13
2.9. Toxicidad.....	14
2.10. Legislación .....	14
<b>3. Objetivos</b> .....	<b>15</b>
<b>4. Procedimiento experimental</b> .....	<b>17</b>
4.1. Material inventariable .....	17
4.2. Material fungible .....	17
4.3. Reactivos .....	18
4.4. Obtención de las muestras.....	18
4.5. Pretratamiento de las muestras.....	18
4.6. Digestión ácida asistida por energía de microondas (MAE).....	19
4.7. Hidrólisis enzimática asistida por energía de microondas (EH-MAE).....	21
4.8. Determinación de metales mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).....	22
<b>5. Estudio de las características analíticas</b> .....	<b>25</b>
5.1. Evaluación del efecto matriz.....	25
5.2. Límites de detección y cuantificación.....	28
<b>6. Resultados y discusión</b> .....	<b>31</b>
6.1. Valores de referencia para las nueces de Brasil y otros alimentos .....	31
6.2. Estudio de las variables implicadas en EH-MAE .....	33
6.3. Cartas Pareto de primer y segundo orden .....	37
6.4. Optimización de las variables estadísticamente significativas .....	38

<b>7. Conclusiones</b> .....	<b>41</b>
<b>8. Bibliografía</b> .....	<b>45</b>

# 1. Resumen

## *Optimización de un método de extracción de metales en alimentos (nueces de Brasil) mediante Hidrólisis Enzimática asistida por Energía de Microondas (EH-MAE)*

En este trabajo se ha puesto a prueba la utilidad de la hidrólisis enzimática asistida por energía de microondas (EH-MAE) para la extracción de metales en nueces de Brasil. Los metales objetos de estudio son: Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Rb, Sb, Se, Si, Sn, Sr, Ti, Tl, V, W y Zn.

Los resultados obtenidos por este método se comparan con las concentraciones determinadas para cada metal al someter la nuez de Brasil a una digestión ácida asistida por energía microondas (MAE). Adicionalmente, y como objetivo secundario, se determina el contenido metálico de otras muestras ricas en oligoelementos, tales como: baya inca del Perú, açai en polvo y palmito.

Los metales contenidos en todos los extractos (ácidos y enzimáticos) son analizados mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Para evaluar el efecto matriz en la determinación de cada metal, se realiza la comparación estadística entre las rectas de calibrado con patrones acuosos y las rectas de adiciones estándar, empleando siempre como patrones internos Sc, Ge, Y, Rh e In. De esta forma, se selecciona el método de cuantificación más adecuado.

Para identificar las variables más importantes implicadas en el método de extracción EH-MAE se realiza un diseño de experiencias Plackett-Burman. Las variables que se tienen en cuenta son las siguientes:

- Etapas de extracción
- Masa de proteasa
- pH
- Concentración de Tris
- Volumen de tampón Tris-HCl
- Masa de DTT

Los resultados obtenidos en el diseño Plackett-Burman se analizan mediante la representación de cartas Pareto de primer y segundo orden, obteniéndose que las variables estadísticamente significativas (al 95% de confianza) para la extracción de dichos metales son la masa de DTT y las etapas de extracción. Finalmente, se realiza un estudio de optimización para dichas variables.

# 1. Resumo

## *Optimización dun método de extracción de metais en alimentos (noces do Brasil) mediante Hidrólise Enzimática asistida por Enerxía de Microondas (EH-MAE)*

Neste traballo púxose a proba a utilidade da hidrólise enzimática asistida por enerxía de microondas (EH-MAE) para a extracción de metais en noces de Brasil. Os metais estudados foron: Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Rb, Sb, Se, Si, Sn, Sr, Ti, Tl, V, W y Zn.

Os resultados acadados por este método compáranse coas concentracións obtidas para cada metal ó someter a noz de Brasil a unha dixestión ácida asistida por enerxía de microondas (MAE). Ademais, e como obxectivo secundario, determínase o contido metálico doutras mostras ricas en oligoelementos, tales como: bago inca do Perú, açai en po e palmito.

Os metais contidos en todos os extractos (ácidos y enzimáticos) son analizados mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Para avalia-lo efecto matriz na determinación de cada metal, realízase a comparación estatística entre as rectas de calibrado con patróns acuosos e as rectas de adicións estándar, empregando sempre como patróns internos Sc, Ge, Y, Rh e In. Desta forma, selecciónase o método de cuantificación máis adecuado.

Para identifica-las variables máis importantes implicadas no método de extracción EH-MAE realízase un deseño de experiencias Plackett-Burman. As variables que se teñen en conta son as seguintes:

- Etapas de extracción
- Masa de proteasa
- pH
- Concentración de Tris
- Volume de tampón Tris-HCl
- Masa de DTT

Os resultados obtidos no deseño Plackett-Burman analízanse mediante a representación das cartas Pareto de primeiro e segundo orde, obténdose que as variables estadísticamente significativas (ó 95% de confianza) para a extracción de ditos metais son a masa de DTT e as etapas de extracción. Finalmente, realízase un estudo de optimización para ditas variables.

# 1. Abstract

## *Optimization of an Enzymatic Hydrolysis method assisted by Microwave Energy (EH-MAE) for simultaneous determination of metals in food (Brazil nuts)*

In this work, the feasibility of microwave energy to speed up enzymatic hydrolysis of Brazil nuts for simultaneous metal (Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, Rb, Sb, Se, Si, Sn, Sr, Ti, Tl, V, W and Zn Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Se, Sr, V y Zn) extraction is studied.

Results obtained are compared with metal concentrations achieved after Brazil nut microwave acid extraction (MAE). The metal content of several food samples with high oligoelements such as Inca berry, açai fruit and palmito after MAE was also assessed. The target elements extracted (by using MAE and EH-MAE) are simultaneously determined by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-MS).

Both external calibration and standard addition calibration using Sc, Ge, Y, Rh and In are selected as internal standards were tested. Matrix effect was statistically evaluated for each target metal.

The statistical significance of the variables involves on the extraction procedure by EH-MAE was simultaneously evaluated by applying a Plackett-Burman experimental design approach. The studied variables were:

- Extraction steps
- Protease mass
- pH
- Tris concentration
- Tris-HCl volume
- DTT mass

The design is analyzed by the main effect Pareto chart and two-factor interactions Pareto charts. The results showed that extraction steps and DTT mass are statistically significant (confidence interval of 95%) variables for several metals extraction by EH-MAE. Finally, optimum values of these variables were assessed.





## 2. Introducción

### 2.1. Elementos traza en el organismo

Los organismos vivos están constituidos por varios elementos, de los cuales el C, H, O y N constituyen el 99%. El resto de elementos presentes en el organismo son los llamados elementos minerales y se clasifican atendiendo a diferentes criterios. En base a su función se pueden clasificar en tres categorías: esenciales, no esenciales y tóxicos.

Entendemos por elemento esencial aquel cuya deficiencia provoca alteraciones en el funcionamiento del organismo, si bien éstas desaparecen cuando se suministran dichos elementos en la proporción adecuada<sup>1</sup>. Los elementos constituyentes (C, H, O y N) y los macroelementos (Na, Ca, Cl, K, Mg, P y S) están presentes en altas concentraciones. Sin embargo, los elementos esenciales para el hombre como el Cr, Cu, Fe, Zn, Mo y Se, están presentes en el organismo a niveles trazas y ultratrazas. Actualmente se sabe que hay por lo menos 25 elementos químicos que son esenciales para la vida, participando de forma activa en gran cantidad de procesos biológicos<sup>2</sup>.

Los elementos no esenciales (Li, Zr, Sr, Br, Al, Cd, Sb, Sn, Pb, As, ...) se definen como aquellos elementos que se encuentran presentes de manera regular en los organismos vivos en concentración variable y cuya función aún se desconoce.

Finalmente, los elementos tóxicos (Cd, Hg, Sn, Pb...) se caracterizan por producir efectos nocivos en el organismo a niveles de concentración bajos.

La Tabla 1 recoge algunos de los elementos traza y ultratrazas considerados hasta la fecha como esenciales o potencialmente esenciales.

Tabla 1. Algunos de los elementos esenciales y sus funciones bioquímicas más relevantes<sup>1,3</sup>.

Elemento	Función bioquímica
<b>F</b>	Formación de dientes y huesos
<b>Si</b>	Calcificación y función estructural en tejido conectivo
<b>V</b>	Biocatalizador
<b>Cr</b>	Metabolismo de carbohidratos y lípidos
<b>Mn</b>	Fosforilación oxidativa, metabolismo de los ácidos grasos, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas
<b>Fe</b>	Captación, transporte y liberación de oxígeno
<b>Co</b>	Forma parte de la vitamina B12, metabolismo de la metionina
<b>Ni</b>	Estabilizante de la estructura del ARN
<b>Cu</b>	Síntesis de hemoglobina, metabolismo del tejido conectivo, desarrollo óseo
<b>Zn</b>	Síntesis y degradación de ácidos nucleicos y proteínas, secreción pancreática
<b>Se</b>	Antioxidante
<b>Mo</b>	Metabolismo de la xantina
<b>I</b>	Sustrato en la biosíntesis de hormonas tiroideas

La entrada de los elementos en el cuerpo humano tiene lugar por vía digestiva (aguas, bebidas en general y alimentos ingeridos) y por vía respiratoria (aire). Posteriormente, son transportados por la sangre mediante proteínas transportadoras (p.e. albúmina o transferina) y compuestos de bajo peso molecular que se unen a elemento en cuestión.

Los elementos se distribuyen por los distintos tejidos, en donde al enlazarse a determinadas proteínas se acumulan en lugares específicos tales como el hígado, el riñón, el músculo y el hueso. La acumulación se puede interpretar como un mecanismo de desintoxicación, pero en casos extremos, puede producir disfunciones generalizadas en estos tejidos y la muerte del individuo.

Finalmente, tiene lugar la eliminación de los productos derivados del metabolismo, los productos de desecho o los productos en exceso. Las vías renal y gastrointestinal son las más importantes. Otros mecanismos de excreción incluyen las secreciones salivares, la sudoración, la exhalación, la lactación, la exfoliación de la piel, la pérdida de pelo, uñas y el sangrado<sup>3</sup>.

## 2.2. Importancia de la determinación de metales en muestras alimentarias y medioambientales

Los metales se encuentran ampliamente distribuidos en el medioambiente. Su presencia puede tener un origen natural o ser el resultado de distintas actividades antropogénicas derivadas del desarrollo industrial. Las actividades antropogénicas han provocado el enriquecimiento de los metales en el medioambiente, originándose una acumulación de 100 a 1000 veces más alta en relación con su proporción natural en la corteza terrestre<sup>4</sup>. Su distribución geográfica y las concentraciones encontradas en los diferentes compartimentos medioambientales (aire, agua, plantas, animales y suelo) son factores importantes a la hora de evaluar la exposición de los seres humanos a la contaminación metálica<sup>5</sup>.

La eliminación de los metales presenta dificultades especiales. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales no pueden degradarse ni biológica ni químicamente en la naturaleza. Los compuestos que contienen metales pueden alterarse, pero los metales indeseables aún permanecen. Su estabilidad también permite que sean transportados a distancias considerables tanto por aire como por agua. Uno de los resultados más graves de su persistencia es la amplificación biológica de los metales en las cadenas tróficas. Como consecuencia de esto, los niveles de metales en los eslabones superiores de la cadena pueden alcanzar valores altos, lo que puede provocar que muchas plantas y animales lleguen a constituir un peligro para la salud al usarse como alimento<sup>6,7</sup>.

Ante esta situación, hay que tener especialmente cuidado con los denominados "metales pesados", los cuales presentan una densidad relativamente alta y cierta toxicidad para el ser humano, representando un serio problema medioambiental. Los metales tóxicos más conocidos son el Hg, Cd, Pb y As, siendo principalmente emitidos debido a la actividad industrial y minera<sup>8</sup>.

## 2.3. Nueces de Brasil

A lo largo de la historia, las nueces han sido un alimento básico reconocidas por su valor nutricional y su alta contribución a la salud humana, haciendo que formen parte de una dieta saludable<sup>9</sup>.

Las nueces de Brasil, originarias de Sudamérica, son producidas por árboles que se encuentran en suelos bien drenados y ricos en oligoelementos, como en las cuencas del río Amazonas. Su gran valor nutricional se debe a los altos niveles de compuestos bioactivos: antioxidantes, grasas esenciales saturadas e insaturadas, vitaminas, aminoácidos y elementos esenciales que contienen<sup>9-15</sup>. Otra de las características de las nueces de Brasil es su alto contenido en Se respecto a otros tipos de nueces y semillas.

Algunos de los beneficios para la salud derivados del consumo de las nueces de Brasil son el control del peso corporal y la presión arterial, reducción de enfermedades del corazón, y la reducción de los niveles de colesterol y de triglicéridos en la sangre. Además, también proporcionan propiedades antioxidantes, anti-microbianas, anti-inflamatorias, anti-mutagénicas, anti-cáncer, anti-diabéticas y glucorreguladoras<sup>16-19</sup>.

## 2.4. Química Verde

El papel de la química en el desarrollo de nuestras sociedades ha sido clave dado el enorme suministro de productos y procesos destinados fundamentalmente a la mejora de nuestra calidad de vida. Este papel tan importante de la química que ha contribuido, sin lugar a duda, al desarrollo de nuestra sociedad, ha sido y está siendo aún contrarrestado por una visión negativa por parte de la producción de los compuestos químicos.

Ante esta situación, a comienzos de la década los años 90 surgió, entre los químicos, la corriente de introducir aspectos ambientales en el diseño de los procesos químicos de forma económicamente provechosa.

Esta rama de la química, denominada Química Verde, tiene como objetivo el diseño e investigación de compuestos y procesos químicos que reduzcan o eliminen la generación de sustancias peligrosas para la salud humana y el medio ambiente, haciendo un uso sostenible de los recursos<sup>20</sup>.

Los principios de la Química Verde sirven para formular las principales características de la Química Analítica Verde:

- Eliminación (o al menos, reducción significativa) de los reactivos de los procedimientos analíticos, sobre todo de aquellos altamente tóxicos.
- Reducción de emisiones de vapores y gases, así como de residuos líquidos y sólidos generados en el laboratorio.
- Reducción del consumo de energía.

En este trabajo se tiene el objetivo de optimizar un método verde para la extracción de metales en nueces de Brasil.

## 2.5. Digestión ácida asistida por energía de microondas (MAE)

Desde 1975, la digestión ácida asistida por energía de microondas ha sido uno de los métodos más empleados para la extracción de metales en muestras sólidas. En este trabajo, se emplea para obtener las concentraciones de metales totales en la muestra, con el objetivo de poder ser comparadas con las concentraciones de metales obtenidas mediante el método de estudio (EH-MAE).

La digestión ácida implica el uso de ácidos minerales y oxidantes y una fuente de microondas externa de calentamiento para descomponer la muestra. La elección de ácidos y el programa de uso de las microondas depende de la naturaleza de la matriz.

La muestra se pone en contacto con los ácidos en el interior de un reactor de teflón de alta presión, y se encaja en un carrusel que lleva además otros reactores. De esta forma, se pueden digerir de forma simultánea varias alícuotas de la muestra<sup>14,21</sup>.

La digestión ácida asistida por energía de microondas no es considerada un método de extracción verde porque se emplean ácidos, aunque sea en pequeñas proporciones.

## 2.6. Hidrólisis enzimática asistida por energía de microondas (EH-MAE)

El uso de las enzimas para la extracción de metales y compuestos organometálicos ha ido cobrando popularidad con el paso de los años desde su primera aplicación en 1981<sup>22</sup>, siendo actualmente una técnica ampliamente utilizada.

Los métodos de hidrólisis enzimática abarcan aquellos procedimientos consistentes en hidrolizar biomoléculas mediante la ruptura de ciertos enlaces, permitiendo la liberación de determinados analitos de la matriz de la muestra. Para llevar a cabo la hidrólisis, es necesario poner la muestra en contacto con las enzimas seleccionadas y una disolución tampón que actúe en el rango de pH deseado<sup>23</sup>.

La enzima debe ser seleccionada cuidadosamente basándose en la naturaleza de la muestra, en función de su contenido en proteínas (enzimas proteolíticas), grasas (lipasas) o carbohidratos (amilasa y celulasa). En este trabajo, la enzima empleada es la proteasa, ya que se encontraron evidencias bibliográficas acerca de la presencia de metales enlazados a las proteínas de las nueces<sup>9,24</sup>. Esta enzima ataca a los enlaces peptídicos de proteínas y péptidos, reduciéndolos a aminoácidos.

Las enzimas son capaces de hidrolizar macromoléculas contenidas en muestras biológicas empleando condiciones moderadas de pH y temperatura, en ausencia de reactivos contaminantes y tóxicos. Por este motivo se trata de métodos comprometidos con el medio ambiente. Además, debido a que los fenómenos de degradación o interconversión de los analitos se minimizan, resultan métodos adecuados para estudios de especiación<sup>25</sup>.

Por otra parte, el mayor inconveniente de las hidrólisis enzimáticas es el tiempo requerido para completar dicho proceso, llegando a necesitar entre 4 a 24 h para las más convencionales. En este trabajo, se usa la energía de microondas para asistir y acelerar el proceso de extracción, llegando a reducirlo de horas a minutos. Esta reducción del tiempo es debida fundamentalmente a la rápida y eficiente ruptura de las membranas o paredes celulares por la acción de las microondas, lo que permite un rápido ataque de la enzima a los componentes liberados<sup>26</sup>.

La selección de las variables de estudio en el proceso de extracción se realizó a partir de la experiencia previa y de búsquedas bibliográficas. Las variables seleccionadas mediante este criterio han sido:

**Etapas de extracción (Etapas):** Se trata del número de etapas programadas en el microondas. En este trabajo se evalúan de una a tres etapas de extracción de 15 min, manteniendo una potencia de 50 W y alcanzando temperaturas entre 35-37°C.

**Masa de proteasa ( $M_{\text{proteasa}}$ ):** Es la cantidad de enzima empleada en la reacción de hidrólisis. A la hora de estudiar este parámetro hay que tener en cuenta que el uso de cantidades elevadas de enzima puede disminuir la respuesta de los instrumentos analíticos, por lo que podría implicar además exhaustivos procesos de limpieza (*clean-up*)<sup>22</sup>. Las cantidades estudiadas en el trabajo fueron 25 y 50 mg, teniendo en cuenta que siempre se utiliza la misma cantidad de muestra (0,3 g).

**Concentración de Tris ([Tris]):** El Tris es un compuesto orgánico que se utiliza para preparar las disoluciones tampón. Es frecuentemente empleado cuando se trabaja con enzimas y medios biológicos, ya que tampona en un rango de pH fisiológico. Se estudian concentraciones de Tris de 30 mM y 60 mM.

**pH:** En este trabajo, se realizaron pruebas con disoluciones tampón a pH 7 y 8, para evaluar su influencia en el método de extracción.

**Volumen de tampón Tris-HCl ( $V_{\text{Tris}}$ ):** Se trata del volumen empleado de disolución tampón en el proceso de extracción. En el estudio se abordan los volúmenes de 3 y 6 mL de disolución tampón.

**Masa de DTT ( $M_{\text{DTT}}$ ):** En este caso se estudia la utilidad del empleo de un activador enzimático en el proceso de extracción. El DTT es capaz de romper algunos enlaces de las proteínas, por lo que permite una rápida acción de la proteasa. En lo referente al uso del DTT, se ha estudiado su uso para la extracción de especies de Se en muestras biológicas. El DTT es capaz de romper los enlaces Se-S y Se-Se en las estructuras de las proteínas, y por lo tanto permite una rápida acción de la proteasa<sup>24</sup>.

Otros parámetros que afectan en menor medida a la actividad enzimática y no han sido objetos de estudio son la fuerza iónica y la presencia de sustancias que puedan inhibir la actividad enzimática (inhibidores)<sup>25</sup>.

Este método de extracción de metales es considerado verde, ya que no requiere el uso de reactivos y disolventes tóxicos. Además, se usa una cantidad moderada de muestra y reactivos, siendo mínima la generación de residuos sólidos.

## 2.7. Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

Desde principios de los años 80, la espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción se ha perfeccionado hasta convertirse en una de las técnicas más empleadas para el análisis elemental, pudiéndose analizar más de 70 elementos de forma simultánea.

En este trabajo, la determinación de metales se realiza mediante esta técnica, debido fundamentalmente a los siguientes motivos: bajos límites de detección para la mayoría de los elementos, alto grado de selectividad, rapidez de análisis (alrededor de 10s/elemento) y buenas exactitudes y precisiones. Sin embargo, los inconvenientes más destacables de esta técnica son el alto coste de la instrumentación y mantenimiento<sup>27,28</sup>.

Esta técnica se basa en el uso de una antorcha de plasma de un gas inerte (Ar) que actúa como atomizador e ionizador de la muestra a altas temperaturas. Una vez formados los iones, pasan al espectrómetro de masas, donde son separados mediante un analizador de masas y son detectados. El plasma se define como un gas ionizado, capaz de conducir la electricidad<sup>29</sup>, siendo los cationes de Ar y los electrones las principales especies conductoras. Los iones de Ar son capaces de absorber la suficiente energía de una fuente externa como para mantener la temperatura a un nivel tal, que la posterior ionización sustente el plasma indefinidamente, llegando a alcanzar temperaturas de 10000 K. La energía para ionizar el Ar procede de la aplicación de un campo electromagnético de radiofrecuencia: los electrones se aceleran por medio del campo electromagnético y colisionan con los átomos de Ar contiguos, produciendo un

calentamiento y una ionización adicional que mantiene el estado de plasma. La denominación de *plasma de inducción* se debe a que el plasma no está conectado directamente con el bucle, sino que la energía se aplica por inducción<sup>30</sup>.

La introducción de la muestra se realiza mediante la aspiración a una cámara de nebulización, donde, por efecto Venturi, se convierte en un aerosol de partículas finas en suspensión. Posteriormente, dichas partículas son arrastradas al plasma por el canal central de la antorcha mediante la corriente de Ar.

La antorcha está formada por tres tubos concéntricos de cuarzo por los cuales circula Ar de forma continua: el central arrastra el aerosol, el intermedio para refrigerar el material de la antorcha y evitar que se funda y el exterior para el Ar plasmógeno. En la Figura 1 se muestra un esquema de la antorcha empleada.

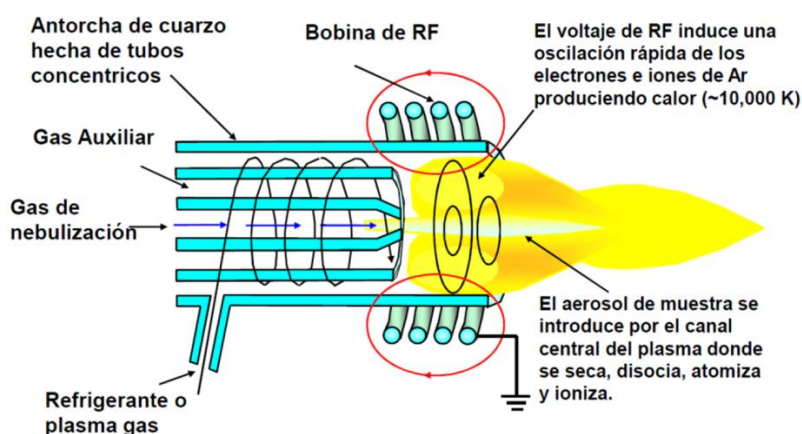


Figura 1. Esquema de funcionamiento de la antorcha de un equipo ICP-MS<sup>31</sup>.

Los analitos, tras ser atomizados e ionizados, se introducen en un pequeño octapolo que se utiliza como celda de colisión/reacción para eliminar posibles interferencias en la detección, como los aductos Ar-Cl o Ar-Ar<sup>+</sup>, que poseen masas similares a algunos metales bajo estudio.

En la cámara en modo reacción, un gas reactivo (H<sub>2</sub>) reacciona con la interferencia y la convierte en otras especies de distinta relación m/z. En el modo colisión, un gas inerte (He) colisiona con los iones poliatómicos (puesto que tienen mayor tamaño), por lo que reduce su energía cinética y provoca que no alcancen el detector.

Posteriormente, los iones se introducen en el analizador del espectrómetro de masas (cuadrupolo) a través de unos conos metálicos (interfase). Es necesario trabajar siempre en condiciones de alto vacío hasta la detección para que no se desvíe la trayectoria de los iones y se realice una correcta separación en función de su relación m/z.

Un analizador de masas cuadrupolar está compuesto por cuatro barras cilíndricas paralelas cargadas eléctricamente y equidistantes a un eje central, de modo que queden diagonalmente opuestos los dos polos positivos y los dos negativos. La aplicación de un potencial de radiofrecuencias provoca que los iones se aceleren en el espacio entre las barras cargadas, por lo que estarán además sometidos a fuerzas de atracción y repulsión. Para un determinado valor de radiofrecuencias, solo los iones que tengan una determinada relación m/z seguirán una trayectoria lineal y llegarán al detector. Por otra parte, el resto de los iones describirán una trayectoria curva y chocarán con las barras, provocando su neutralización. El sistema puede permitir el paso de una sola relación m/z o de varias mediante la variación continua del intervalo de radiofrecuencias<sup>31</sup>. En la Figura 2 se muestra un esquema general del equipo empleado.

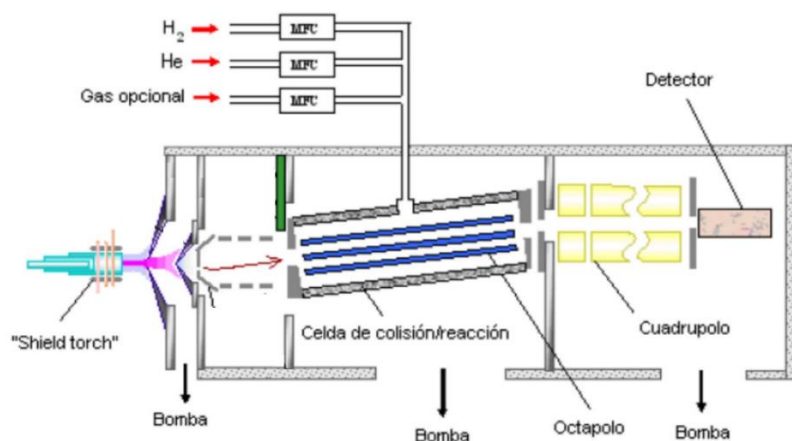


Figura 2. Esquema de un equipo ICP-MS con analizador de cuadrupolo equipado con una celda de colisión<sup>32</sup>.

El detector empleado está compuesto por multiplicadores de electrones, cuya función es convertir el haz de iones en una señal eléctrica proporcional. Cuando los iones llegan al primer dínodo, arrancan electrones que chocarán con otros dínodos de forma sucesiva, generando más y más electrones hasta la obtención de la señal eléctrica. Posteriormente, la señal eléctrica es procesada por un software<sup>27</sup>.

## 2.8. Diseño de experiencias en Química Analítica

Actualmente, la estadística se ha convertido en una herramienta fundamental para interpretar los resultados obtenidos a partir de un método analítico, así como en el diseño y optimización del mismo.

El diseño de experimentos trata sobre estrategias que resulten más eficaces y que aportan la máxima información con el mínimo número de ensayos experimentales. El propósito final es deducir la forma en la que las variables (factores) que influyen en el sistema, afectan a una o varias características (respuestas) de interés. Sin embargo, siempre hay que llegar a un compromiso entre la información que se obtiene y el número de experimentos a realizar.

Generalmente, se puede abordar el problema desde dos puntos de vista: El diseño clásico (o univariante) y el diseño factorial (o multivariante).

En el diseño clásico, se estudia la respuesta del método analítico al fijar todas las variables bajo estudio excepto una, que toma diferentes valores. Dichos valores se eligen en base a los conocimientos previos del sistema.

Por otra parte, en el diseño factorial se mide la respuesta del método analítico para todas las combinaciones posibles de los valores que toman las variables bajo estudio. De la misma forma, los valores que toman las variables se eligen en base a los conocimientos previos del sistema.

Hay dos razones de peso para emplear el diseño factorial frente al clásico:

- El diseño factorial detecta y estima cualquier interacción entre variables.
- Para proporcionar una misma precisión, el diseño factorial implica la realización de menos experimentos que el clásico (es decir, se reduce el coste y tiempo).

Por estos motivos, el uso de los diseños factoriales frente al clásico se ha incrementado progresivamente a lo largo de los años<sup>33</sup>.

### 2.8.1. Diseño factorial Plackett-Burman

A continuación, se realiza una breve explicación de los diseños de experiencias Plackett-Burman, metodología empleada en este trabajo.

Cuando un sistema es poco conocido resulta muy difícil decidir cuáles son las variables que debemos de considerar a la hora de optimizarlo. Algunas de esas variables pueden resultar evidentes, en cambio no se puede descartar que otras menos aparentes no tengan influencia en el sistema. La solución más fácil sería considerarlas todas, pero en ese caso, el número de experimentos que habría que realizar sería inviable<sup>34,35</sup>.

Ante esta situación, una de las metodologías más empleadas son los diseños de experiencias Plackett-Burman, basado en un método estadístico que reduce el número de experimentos a utilizar y produce datos de gran utilidad<sup>36</sup>.

Los diseños Plackett-Burman son un caso particular de diseños factoriales en los que se estudian N-1 variables, siendo N el número de experimentos y múltiplo de 4 para mantener la ortogonalidad. Para realizar este tipo de diseño, previamente tienen que fijarse un valor alto (+) y bajo (-) para cada una de las variables bajo estudio<sup>34</sup>.

Los experimentos que realizar se establecen a partir de una matriz de diseño que se construye partiendo de una primera fila (generadora) dada en el trabajo original de Plackett-Burman para un determinado N. Esta primera fila, se desplaza cíclicamente en una posición, N-2 veces, hasta completar la matriz, cuya última fila está formada completamente por los valores más bajos (-) establecidos para cada una de las variables.

En el caso en el que el número de variables no sea el adecuado para construir el experimento se deben añadir variables asociadas a efectos falsos llamadas variables fantasma (o *dummy*), las cuales no estorban a la hora de realizar los experimentos, pero sí se estudian estadísticamente con el resto de variables<sup>35</sup>.

En el estudio realizado en este trabajo, la matriz de diseño experimental nos la proporciona el paquete estadístico Statgraphics Plus 4.0.

Para interpretar más fácilmente los resultados que ofrece el diseño de experimentos y detectar las variables que son estadísticamente más significativas, se suelen convertir los datos en gráficos estadísticos. Los tipos más frecuentes son las cartas Pareto (o Diagramas de Pareto) y las representaciones de Probabilidad Normal de los efectos<sup>35</sup>.

Una vez obtenida la variable respuesta para cada experiencia, se introducen sus valores en el paquete estadístico Statgraphics Plus 4.0, obteniéndose la información necesaria para evaluar la importancia de cada una de las variables.

En este trabajo, el análisis de los resultados se realiza con ayuda de las cartas Pareto. En estos diagramas, se representa en el eje de las ordenadas una escala de valores normalizados para los efectos. En el eje de las abscisas se disponen las variables, ordenadas de mayor a menor, en función de su efecto en el sistema. De este modo, la longitud de las barras es proporcional al valor absoluto del efecto estimado para cada variable, lo que indica la importancia de cada una de ellas. Además, en estos diagramas se encuentra una línea vertical que representa el mínimo valor de "t" (t de Student) a



partir del cual se considera que las variables son significativas al 95% de confianza. Este valor de “ $t$ ” se denomina  $t_{crítico}$ . En la Figura 3 se muestra la apariencia de las cartas Pareto.

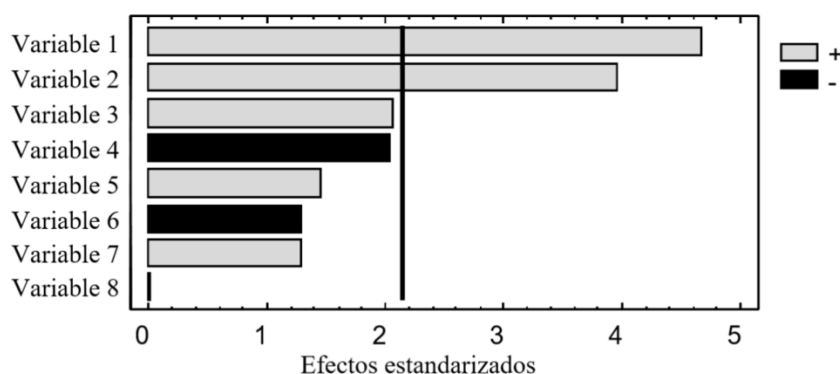


Figura 3. Carta Pareto genérica.

Por lo tanto, en el análisis de estas cartas se obtiene información de los efectos de cada variable, así como el valor de la  $t_{experimental}$  para cada una de ellas.

Obtenemos además otra información adicional, de tipo cualitativo, ya que el signo que una variable muestra en el diagrama se puede asociar a una relación directa, en caso de signos positivos, o inversa, si el signo es negativo, entre la variación de la variable y la respuesta obtenida<sup>35,36</sup>.

Al reducir el número de experimentos respecto del diseño factorial completo, se pierden grados de libertad y provoca un efecto de “confusión” para cada variable respecto a los términos de interacción de las demás. Lo mismo ocurre con las variables fantasma y, por lo tanto, el coeficiente evaluado para ellas también incluirá efectos de interacción de las demás. Esto significa que el valor de  $t_{experimental}$  obtenido para cada una de las variables analíticas podría no ser debido exclusivamente a una sola variable, sino que puede incluir el efecto debido a combinaciones de variables. Por este motivo, se estudian además las cartas Pareto de segundo orden, eliminando las variables que puedan enmascarar la importancia de las variables principales<sup>34</sup>.

## 2.8.2. Optimización de las variables

Posteriormente, las variables estadísticamente significativas se deben optimizar mediante un diseño de experiencias composicional. Para las restantes variables se fija el valor más apropiado para el estudio, aunque su variación no suponga cambios significativos.

## 2.9. Toxicidad

Una sustancia tóxica es aquella que tiene efectos dañinos en la salud. La toxicidad se define como la capacidad que tiene una sustancia de provocar trastornos en un organismo al ser ingerida, inhalada, absorbida por la piel o penetrar en el organismo por cualquier otra vía. Se habla de toxicidad crónica, cuando los efectos tóxicos provienen de una exposición prolongada del organismo al agente, o de toxicidad aguda, cuando provienen de una exposición muy localizada en el tiempo<sup>29</sup>.

La más inocua de las sustancias puede tener efectos indeseables o dañinos cuando es tomada por un organismo en cantidad excesiva. Un concepto importante en toxicología es que, en general, ninguna sustancia es completamente inocua o totalmente tóxica. El factor que determina si un agente es potencialmente dañino o seguro es la relación entre la concentración de sustancia a la que se expone el organismo y la duración de dicha exposición<sup>7</sup>.

El nivel de toxicidad para cada metal depende de la especie biológica, tiempo y vía de exposición, concentración y forma química del metal en el medio ambiente. Muchos elementos químicos son también esenciales, o por lo menos, beneficiosas para la salud humana, pero también pueden ser tóxicos cuando se encuentran en exceso<sup>37</sup>.

## 2.10. Legislación

Actualmente, en la UE se encuentran establecidos límites de metales en el Reglamento (CE) nº 1881/2006 de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Para los frutos pequeños, solo se encuentra establecido un límite máximo para el Pb, que se fija en 0,20 mg Kg<sup>-1</sup> peso fresco<sup>38</sup>.

### 3. Objetivos

En el presente trabajo se optimiza un método de Química Verde para la extracción de metales mediante hidrólisis enzimática asistida por energía de microondas (EH-MAE) en nueces de Brasil desgrasadas. Los objetivos que se persiguen son los siguientes:

- Estudio y optimización de las variables significativas que influyen en el proceso de extracción de metales mediante EH-MAE.
- Estudio de las características analíticas del método: Efecto matriz, límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ).
- Evaluación de los metales contenidos en las fracciones grasas y desgrasadas de las nueces de Brasil.

Por otra parte, se analizan los metales contenidos en otros alimentos ricos en oligoelementos mediante MAE, y así tener valores de referencia para la posible aplicación del método propuesto (EH-MAE) a otras muestras.



## 4. Procedimiento experimental

### 4.1. Material inventariable

- Balanza electrónica AND modelo ER-180A, de precisión  $\pm 0,0001\text{g}$  (Thebarton SA, Australia).
- Balanza granataria GRAM modelo SV-510ix, de precisión  $\pm 0,001\text{g}$  (Barcelona, España).
- Micropipetas Eppendorf de volumen fijo y variable (Hamburgo, Alemania).
- Paquete estadístico Statgraphics Plus V4.0, para Windows, 1994-1999 (Maugistics, Rockville, MD, EEUU).
- Molinillo de café doméstico Moulinex (Alençon, Francia).
- Microondas Anton Paar Multiwave, Perkin-Elmer, Graz, Austria, (Figura 4) provisto de un sistema de 6 reactores Anton Park de alta presión de teflón (Figura 5).
- ICP-MS Thermo Finnigan X series 2 (Waltham, MA, EEUU).
- Rotavapor Büchi R-3000 (Postfach, Suiza).
- Soxhlet Büchi B-811.
- Tamiz de acero inoxidable con perforación cuadrada de luz 0,50 mm, Retsch (Düsseldorf, Alemania).



Figura 4



Figura 5

*Figuras 4 y 5. Microondas empleado y reactores de teflón empleados para las extracciones MAE y EH-MAE.*

### 4.2. Material fungible

- Material volumétrico de vidrio de clase A.
- Espátulas de plástico
- Embudos de plástico.
- Cartuchos de celulosa para Soxhlet, previamente lavados con hexano.
- Papel filtrante Whatman grado 40.
- Botes de plástico de 25 mL para conservar los extractos.

El material de uso general en el laboratorio (botes, espátulas, embudos y material volumétrico) se deja sumergido en un baño de  $\text{HNO}_3$  al 10% (V/V) durante 48 horas para eliminar la contaminación metálica. Una vez hecho esto, se enjuaga con abundante agua Milli-Q.

### 4.3. Reactivos

- Agua Milli-Q con resistencia superior a  $18 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$  obtenida mediante el dispositivo Milli-Q purification, Millipore Co (Bedford, MA, EEUU).
  - Preparación de disoluciones patrón multi-elementales a partir de disoluciones madre de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de Al, As, Ba, Be, Bi, Cd, Co, Cr, K, Li, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Rb, Sb, Se, Si, Sn, Sr, Ti, Tl, V, W; y  $10000 \text{ mg L}^{-1}$  de Ca, Na y Mg Panreac (Barcelona, España).
  - Patrón interno multi-elemental con Ge, In, Rh, Y de  $10 \pm 2 \text{ mgL}^{-1}$  y Sc de  $50 \pm 2 \text{ mgL}^{-1}$  (Panreac).
  - Extracción de la grasa (pretratamiento de la muestra):
    - n-Hexano UniSolv®, para análisis de trazas orgánicas, Merck (Darmstadt, Alemania).
  - Digestión ácida:
    - $\text{HNO}_3$  concentrado, 69-70%, J.T.Baker (Phillipsburg, PA, EEUU)
    - $\text{H}_2\text{O}_2$  33%, Panreac
  - Hidrólisis enzimática:
    - Proteasa de *Streptomyces griseus*, tipo XIV, Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, EEUU).
    - DL-Ditiotreitol (DTT)  $\geq 99,5\%$ , BioUltra, para biología molecular, Sigma-Aldrich.
    - Se prepararon las siguientes disoluciones tampón:
      - Disolución tampón Tris-HCl de  $[\text{Tris}]=30\text{mM}$  y  $\text{pH}=8$
      - Disolución tampón Tris-HCl de  $[\text{Tris}]=30\text{mM}$  y  $\text{pH}=7$
      - Disolución tampón Tris-HCl de  $[\text{Tris}]=60\text{mM}$  y  $\text{pH}=8$
      - Disolución tampón Tris-HCl de  $[\text{Tris}]=60\text{mM}$  y  $\text{pH}=7$
- Para la preparación de estas disoluciones tampón se emplearon los reactivos:
- $\alpha,\alpha,\alpha$ -Tris-(hidroximetil)-metilamina (Tris) 99,9+%, ultrapure grade, Sigma-Aldrich.
  - HCl 36,5-38%, J.T.Baker
- $\text{HNO}_3$  al 10% (V/V) para el lavado del material general preparado a partir de  $\text{HNO}_3$  concentrado, 69-70%, J.T.Baker.

### 4.4. Obtención de las muestras

Las nueces de Brasil son adquiridas en un supermercado local. Se comercializan enteras y envasadas. Se ha comprobado su origen, asegurándose de que proceden del amazonas boliviano (suelos bien drenados y ricos en oligoelementos). El fruto del açai fue importado desde una empresa comercial alemana. El palmito y las bayas incas del Perú se obtienen en un establecimiento especializado.

### 4.5. Pretratamiento de las muestras

En primer lugar, se trocean las nueces de dos paquetes diferentes con un cuchillo, y posteriormente se trituran con un molinillo de café doméstico. El resultado es la obtención de una pasta debido a su alto contenido en grasas. La pasta resultante se mezcla bien para homogeneizarla.

Al fruto del açai no se le realizó ningún pretratamiento previo. Los palmitos fueron liofilizados y posteriormente triturados, obteniéndose un polvo que fue tamizado.

A continuación, se procede a realizar el proceso de desgrasado de los alimentos en Soxhlet. Para ello, diferentes alícuotas de los alimentos se introducen en un cartucho de celulosa limpio y se extraen con hexano durante 14 horas realizando 25 ciclos de extracción.

Al finalizar el proceso de extracción, se obtienen las muestras desgrasadas, que posteriormente son tamizadas a través de una luz de malla de 0,50 mm. Se conserva a temperatura ambiente en un recipiente de plástico.

Por otra parte, se obtiene la fracción grasa de los alimentos disuelta en el hexano empleado. Se evapora el hexano en un rotavapor y se conserva la grasa en un recipiente de plástico en la nevera (4°C). Se muestra un esquema general del pretratamiento de la muestra (nuez de Brasil) en la Figura 6.

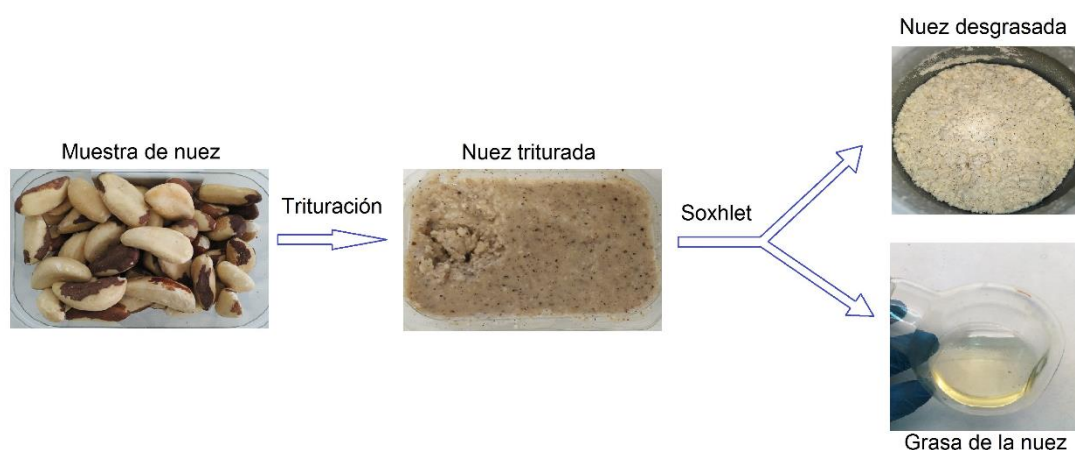


Figura 6. Esquema general de pretratamiento de la muestra.

Los resultados obtenidos indican que el porcentaje de grasa en las nueces de Brasil es elevado ( $60 \pm 0,6\%$ ), lo que coincide aproximadamente con la información nutricional indicada en la etiqueta del producto (65%). Por otro lado, el contenido graso de la baya inca del Perú es muy inferior ( $6 \pm 0,7\%$ ). Finalmente, las otras muestras (palmito, y fruto del açai) apenas contienen materia grasa.

#### 4.6. Digestión ácida asistida por energía de microondas (MAE)

La digestión ácida se emplea para obtener las concentraciones de metales totales en las diferentes fracciones de las muestras (muestra sin desgrasar, muestra desgrasada y su grasa), con el objetivo de tener valores de referencia para comparar las concentraciones de metales obtenidas mediante el método de estudio (EH-MAE).

Antes de realizar las digestiones, hay que acondicionar cada uno de los reactores del microondas. Para ello, se depositan unos mililitros de agua regia en cada uno y se activa el mismo programa (Tabla 2) con el que se realizará la extracción ácida. En las Figuras 7 y 8 se presentan los gráficos de potencia y ventilación del programa de microondas utilizado para la extracción de metales mediante MAE, respectivamente.

Tabla 2. Programa empleado en la digestión ácida asistida por energía microondas.

Fase	P inicial (W)	t (min)	P final (W)	Ventilación
1	0	2,5	450	1
2	450	6	700	1
3	700	5	1000	1
4	1000	10	1000	1
5	0	40	0	3

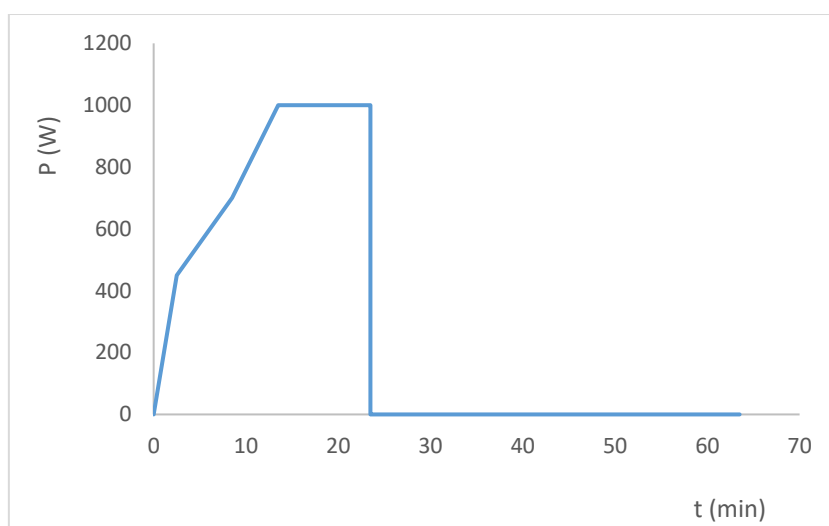


Figura 7. Gráfico de potencia del programa de microondas MAE.

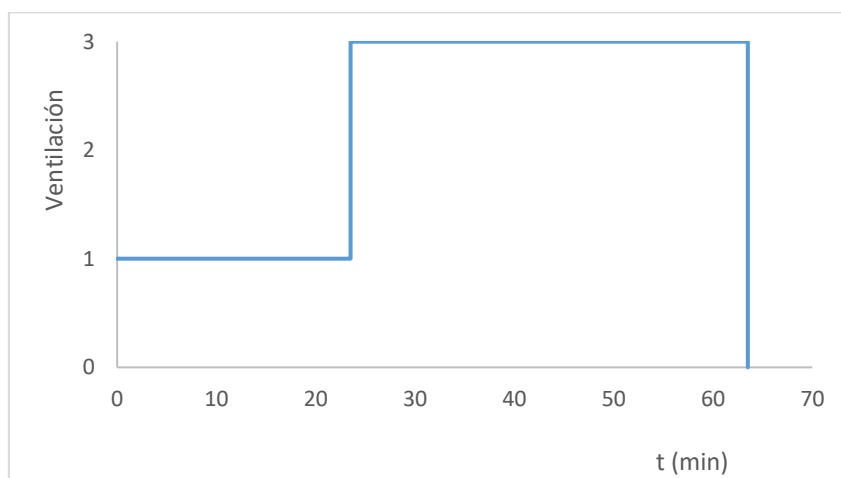


Figura 8. Gráfico de ventilación del programa de microondas MAE



Se lavan los reactores con abundante agua Milli-Q y se depositan las cantidades de muestra y reactivos indicadas en la Tabla 3 en el interior de cada reactor de teflón.

Tabla 3. *Proporción de reactivos y muestra empleada en la extracción MAE.*

<b>M<sub>muestra</sub></b> <b>(g)</b>	<b>V H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b> <b>(mL)</b>	<b>V HNO<sub>3</sub></b> <b>(mL)</b>	<b>V H<sub>2</sub>O</b> <b>(mL)</b>
0,3	2	4	3

Posteriormente, se introducen los reactores en el carrusel del horno de microondas y se activa el programa ilustrado en la Tabla 2. Por cada carro de digestión, uno de los reactores se reserva para hacer un blanco de procedimiento.

Una vez finalizado el programa, se trasvasan los extractos a matraces aforados de 25 mL y se enrasa con agua Milli-Q. Posteriormente, se depositan las disoluciones obtenidas en botes de plástico y se conservan en el congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.7. Hidrólisis enzimática asistida por energía de microondas (EH-MAE) para la extracción de metales en nueces de Brasil

Se depositan las cantidades de nuez de Brasil desgrasada y los reactivos indicados en la Tabla 4 en los reactores de teflón del microondas y se activa el programa correspondiente a 2 etapas de extracción mostrado en la Tabla 5. En las Figuras 9 y 10 se presentan los gráficos de potencia y ventilación del programa de microondas utilizado para la extracción de metales mediante EH-MAE, respectivamente.

Tabla 4. *Condiciones óptimas para la extracción de metales mediante EH-MAE.*

<b>M<sub>nuez desgrasada</sub></b> <b>(g)</b>	<b>M<sub>proteasa</sub></b> <b>(mg)</b>	<b>V<sub>Tris</sub> 60 mM, pH 7</b> <b>(mL)</b>	<b>M<sub>DTT</sub></b> <b>(mg)</b>
0,3	25	3	20

Tabla 5. *Programa óptimo para la extracción de metales mediante EH-MAE.*

<b>Etapas</b>	<b>P inicial</b> <b>(W)</b>	<b>t</b> <b>(min)</b>	<b>P final</b> <b>(W)</b>	<b>Ventilación</b>
1	50	15	50	3
2	0	20	0	3
3	50	15	50	3
4	0	20	0	3

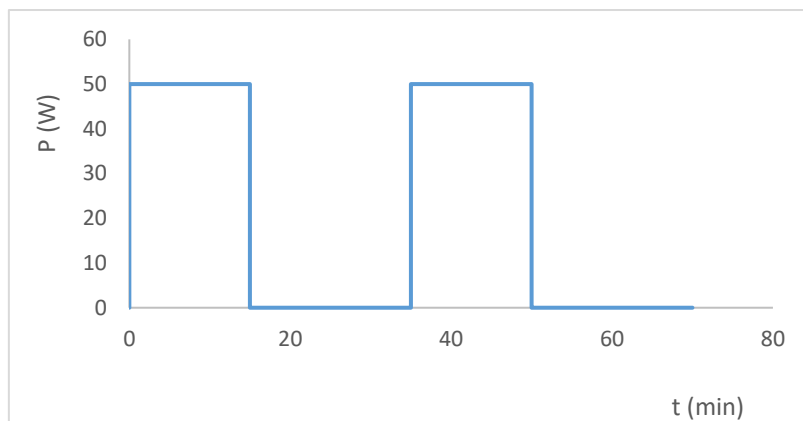


Figura 9. Gráfico de potencia para dos etapas de extracción mediante EH-MAE.

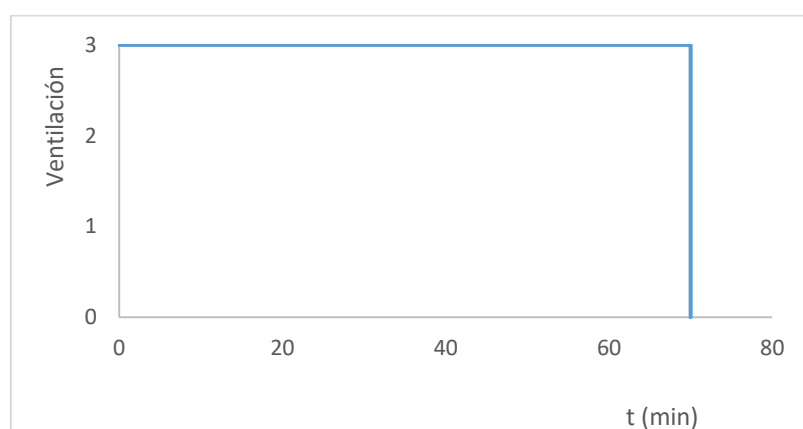


Figura 10. Gráfico de ventilación para dos etapas de extracción mediante EH-MAE.

Con este programa la temperatura máxima alcanzada en el interior de los reactores no supera los 37°C. Los extractos obtenidos en cada una de las experiencias se filtran con ayuda de embudos de plástico y papeles de filtro Whatman de grado 40. Los filtrados se recogen directamente sobre matraces aforados de 10 mL y se enrasan con agua Milli-Q. Posteriormente, se depositan las disoluciones obtenidas en botes de plástico y se conservan en el congelador (-20°C).

#### 4.8. Determinación de metales mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

Para la cuantificación de metales en los extractos ácidos es necesario realizar diluciones para mantener el nivel de ácido nítrico por debajo del 15%, debido a que no se pueden introducir elevadas concentraciones de ácidos en el ICP-MS. Los extractos ácidos se diluyen un factor 2,5 veces superior a los extractos enzimáticos.

Se realizan calibrados acuosos con patrón externo y recta de adición para cada uno de los metales estudiados, ajustando los rangos de concentración a cada uno de ellos. Además, se emplean como patrones internos Sc, Ge, In, Rh, Y en las dos formas de calibración.

Antes de comenzar la determinación se realiza una comprobación y ajuste de la intensidad de la señal de una disolución patrón para la medida de metales con masas altas, bajas y medias (Tune), así como los porcentajes de los posibles interferentes.

El número de cuentas de cada uno de los metales y el porcentaje máximo de interferentes viene indicado por el fabricante, por lo que, en caso de que no se alcancen los valores establecidos, deben modificarse las condiciones de trabajo hasta lograr dichos valores. Las condiciones seleccionadas para la determinación de metales se incluyen en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de trabajo para la determinación de metales por ICP-MS.

<b>CONDICIONES DE TRABAJO</b>	
<b>GENERAL</b>	
Potencia de radiofrecuencia (W)	1380
Velocidad de la bomba peristáltica (rpm)	0,45
Tiempo de estabilización (s)	35
Número de réplicas	4
Tipo de nebulizador	Micromist
<b>FLUJO DE GAS (Ar)</b>	
Plasma (L min <sup>-1</sup> )	17
Gas auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,65
Flujo tangencial (L min <sup>-1</sup> )	0,27
Nebulizador (L min <sup>-1</sup> )	0,98
<b>ALINEAMIENTO DE LA ANTORCHA</b>	
Distancia del inyector del aerosol a la antorcha (mm)	7
<b>ELEMENTOS/MASA</b>	
Li/7, Be/9, Na/23, Mg/24, Al/27, Si/29, P/31, K/39, Ca/44, Ti/47, V/51, Cr/52, Mn/55, Fe/56, Fe/57, Ni/58, Co/59, Ni/60, Cu/63, Zn/64, Cu/65, Zn/66, As/75, Se/76, Se/82, Rb/85, Sr/88, Mo/95, Mo/98, Cd/111, Sn/118, Sb/121, Ba/137, Ba/138, W/182, Tl/205, Pb/208, Bi/209	
<b>PATRÓN INTERNO</b>	
Sc/45, Ge/72, Y/89, Rh/103, In/115	



## 5. Estudio de las características analíticas

### 5.1. Evaluación del efecto matriz

El efecto matriz consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes de la matriz<sup>32</sup>.

Una forma de evitar el efecto matriz sería construir siempre la recta de calibrado tomando una muestra parecida a la muestra problema libre del analito que se quiera determinar (blanco de muestra), y posteriormente añadirle cantidades conocidas del analito para generar disoluciones patrón. Sin embargo, esta aproximación suele ser en la mayoría de los casos impracticable, ya que el efecto matriz varía de una muestra a otra y, además, la disponibilidad de blancos de muestras es muy limitada.

La mejor alternativa para minimizar el efecto matriz es utilizar la técnica de adiciones estándar, la cual consiste en la adición de cantidades conocidas y crecientes del analito a la propia muestra problema, la lectura de las correspondientes respuestas instrumentales y la posterior construcción de la recta de adiciones estándar. A continuación, se cuantifica el analito por interpolación en la recta al punto de las abscisas. El mayor inconveniente de esta técnica es que necesitamos construir una recta de adiciones estándar para cada muestra que se quiera analizar, lo que supone mucho trabajo de laboratorio. Por este motivo es necesario conocer si existe o no efecto matriz. Para ello, se realiza la comparación estadística de pendientes entre las rectas de calibrado con patrones externos y las rectas de adiciones estándar para los dos tipos de extractos (ácidos y enzimáticos), y así comprobar si existen diferencias significativas entre ambas pendientes.

El procedimiento que seguir es el siguiente:

**Test F de comparación de varianzas:** Se realiza el siguiente cálculo para obtener  $F_{\text{experimental}}$  ( $F_{\text{exp}}$ ) mediante los estadísticos obtenidos para cada calibrado:

$$F_{\text{exp}} = \frac{S_{(y/x)1}^2}{S_{(y/x)2}^2}; F_{\text{exp}} > 1 \quad \text{Ecuación 1}$$

Posteriormente, se mira en las tablas<sup>33</sup> el valor de  $F_{\text{crítica}}$  ( $F_{\text{crit}}$ ):

$$F_{\text{crit}}(95\%, n_1 - 2 \text{ gdl}, n_2 - 2 \text{ gdl})$$

siendo n el número de patrones para cada calibrado (externo o de adición).

- a) **Si las varianzas son comparables ( $F_{\text{exp}} < F_{\text{crit}}$ ),** se calcula un error promedio o desviación estándar combinada de las dos regresiones:

$$S_{y/x, \text{ pool}}^2 = \frac{(n_1 - 2) \cdot S_{(y/x)1}^2 + (n_2 - 2) \cdot S_{(y/x)2}^2}{n_1 + n_2 - 4} \quad \text{Ecuación 2}$$

Con dicho error promedio, se calcula el parámetro estadístico  $t_{\text{experimental}}$  ( $t_{\text{exp}}$ ) y se compara con el valor tabulado  $t_{\text{crítico}}$  ( $t_{\text{crit}}$ ):

$$t_{exp} = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{S^2_{y/x, pool} \left( \frac{1}{\sum(x_{i,1} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum(x_{i,2} - \bar{x}_2)^2} \right)}} \quad \text{Ecuación 3}$$

siendo  $b_1$  y  $b_2$  las pendientes de cada una de las rectas de calibrado.

Se toma el valor tabulado:  $t_{crit}$  (95%,  $n_1 + n_2 - 4$  gdl)

a.1) **Si  $t_{exp} < t_{crit}$ :** No hay diferencias significativas entre las pendientes y se puede emplear el calibrado acuoso con patrones externos, ya que no hay efecto matriz.

a.2) **Si  $t_{exp} > t_{crit}$ :** Hay diferencias significativas entre las pendientes y se deberá emplear el calibrado con adiciones estándar, ya que hay efecto matriz.

b) **Si las varianzas son estadísticamente diferentes ( $F_{exp} > F_{crit}$ ),** se calcula  $t_{experimental}$  ( $t_{exp}$ ) mediante la siguiente fórmula:

$$t_{exp} = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{(S^2_{b1} + S^2_{b2})}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Posteriormente, se calcula una  $t'$  a partir de las  $t$  tabuladas ( $t_1$  y  $t_2$ ) para cada calibrado:

$$t' = \frac{t_1 \cdot S^2_{b1} + t_2 \cdot S^2_{b2}}{S^2_{b1} + S^2_{b2}} \quad \text{Ecuación 5}$$

siendo  $t_1$  y  $t_2$  los valores de  $t$  (95%,  $n-2$  gdl) tabulados para cada calibrado.

b.1) **Si  $t_{exp} < t'$ :** No hay diferencias significativas entre las pendientes y se puede emplear el calibrado acuoso con patrones externos, ya que no hay efecto matriz.

b.2) **Si  $t_{exp} > t'$ :** Hay diferencias significativas entre las pendientes y se deberá emplear el calibrado con adiciones estándar, ya que hay efecto matriz.

En todos los estudios posteriores no se incluyen los metales cuya concentración en la muestra sea inferior al límite de detección (LOD), los cuales son: Al/27, As/75, Be/9, Bi/209, Cd/111, Li/7, Mo/95, Pb/208, Sb/121, Si/29, Sn/118, Tl/205, V/51, W/182. También se seleccionan los isótopos que presentan mayor sensibilidad, por lo que se descartan de los estudios posteriores para el Fe/56, Ni/60, Zn/64, Cu/65, Se/76 y Ba/138.

En la Tabla 7 se muestran la evaluación del efecto matriz para los extractos ácidos y enzimáticos, respectivamente.

Tabla 7. Evaluación del efecto matriz en los extractos ácidos y enzimáticos para cada uno de los metales, con sus  $t_{exp}$  y  $t_{crit}$  correspondientes.

Metal	EXTRACTOS ÁCIDOS			EXTRACTOS ENZIMÁTICOS		
	$t_{exp}$	$t_{critica}^{32}$	Efecto matriz	$t_{exp}$	$t_{critica}^{32}$	Efecto matriz
<b>Na/23</b>	22,8	2,18	Sí	57,1	2,58	Sí
<b>Mg/24</b>	7,44	2,12	Sí	70,5	2,58	Sí
<b>P/31</b>	29,6	2,12	Sí	118	2,58	Sí
<b>K/39</b>	7,02	2,12	Sí	45,9	2,58	Sí
<b>Ca/44</b>	37,4	2,18	Sí	52,2	3,18	Sí
<b>Ti/47</b>	10,4	2,12	Sí	39,1	2,58	Sí
<b>Cr/52</b>	2,05	2,10	No	2,20	2,58	No
<b>Mn/55</b>	2,05	2,12	No	1,04	2,58	No
<b>Fe/57</b>	2,10	2,12	No	0,92	2,58	No
<b>Ni/58</b>	4,21	2,12	Sí	21,9	2,58	Sí
<b>Co/59</b>	7,36	2,78	Sí	5,80	2,78	Sí
<b>Cu/63</b>	4,21	2,12	Sí	4,80	2,58	Sí
<b>Zn/64</b>	7,72	2,12	Sí	2,26	2,14	Sí
<b>Se/82</b>	4,42	2,12	Sí	20,8	2,14	Sí
<b>Rb/85</b>	2,09	2,12	No	3,54	2,58	Sí
<b>Sr/88</b>	16,9	2,12	Sí	0,03	2,14	No
<b>Ba/137</b>	1,1	2,45	No	1,83	2,45	No

Para aquellos metales que tengan una alta probabilidad de que haya efecto matriz debe utilizarse la respectiva recta de adiciones estándar para su cuantificación, y así minimizar el efecto matriz. Para el resto de metales se utiliza la recta de calibrado acuoso.

En la Tabla 8 se muestran las pendientes y ordenadas de las rectas empleadas para la cuantificación de cada uno de los metales estudiados mediante los dos métodos de extracción (MAE y EH-MAE). Los coeficientes de determinación de las rectas ( $R^2$ ) son adecuados para todos los casos.

Tabla 8. Rectas empleadas para la cuantificación de los metales.

Metal	a + b [Metal]	
	MAE	EH-MAE
Na/23	166,5 (±107,4) + 0,3892 (±0,1874) [Na]	0,4786 (±4,5604) + 0,0323 (±0,0056) [Na]
Mg/24	33,07 (±27,01) + 0,1191 (±0,0389) [Mg]	4,093 (±0,0496) + 2E-4 (±6E-5) [Mg]
P/31	0,3480 (±0,1157) + 0,0005 (±0,0002) [P]	0,1285 (±0,0151) + 8E-6 (±1E-6) [P]
K/39	89,82 (±9,53) + 0,0337 (±0,0137) [K]	0,0195 (±0,0833) + 0,0011 (±1E-4) [K]
Ca/44	2,025 (±1,225) + 0,1462 (±0,0467) [Ca]	0,6207 (±0,7027) + 2,336E-4 (±5,8740E-4) [Ca]
Ti/47	6,341 (±5,966) + 0,0263 (±0,0086) [Ti]	0,0008 (±0,0003) + 2E-7 (±4E-8) [Ti]
Cr/52	-0,0254 (±0,8784) + 0,0442 (±0,0013) [Cr]	
Mn/55	-0,0596 (±0,0659) + 0,0311 (±96E-4) [Mn]	
Fe/57	0,0175 (±0,0187) + 0,0011 (±3E-5) [Fe]	
Ni/58	0,6314 (±1,0326) + 0,0351 (±0,0015) [Ni]	1,912 (±1,0326) + 0,035 (±0,0014) [Ni]
Co/59	0,0292 (±0,0161) + 0,0672 (±0,0063) [Co]	-0,0032 (±0,0185) + 0,0887 (±0,0072) [Co]
Cu/63	1,985 (±1,285) + 0,0438 (±0,0018) [Cu]	9,770 (±4,389) + 0,0565 (±0,0053) [Cu]
Zn/64	8,787 (±0,4953) + 0,0111 (±0,0007) [Zn]	3,770 (±1,253) + 0,0229 (±0,0016) [Zn]
Se/82	0,0032 (±0,0040) + 0,0001 (±6E-6) [Se]	0,0574 (±0,0129) + 0,0002 (±2E-5) [Se]
Rb/85	-0,1726 (±0,5142) + 0,0200 (±0,0007) [Rb]	11,09 (±1,374) + 0,0176 (±0,0017) [Rb]
Sr/88	20,77 (±2,4013) + 0,0435 (±0,0047) [Sr]	0,0542 (±0,3109) + 0,0280 (±0,0004) [Sr]
Ba/137	2,679 (±1,560) + 0,2482 (±0,0612) [Ba]	

## 5.2. Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD) corresponde a la mínima concentración o masa de muestra que genera una señal que no puede ser confundida con un blanco (al 99% de confianza). La fórmula empleada para su cálculo se recoge en la Ecuación 6.

$$LOD = \frac{BC+3SD}{b} \cdot FD \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde: *BC* es la señal del blanco de calibrado; *SD* es la desviación estándar; *b* es la pendiente de la recta de calibrado; *FD* es el factor de dilución.

El límite de cuantificación (LOQ) corresponde a la mínima concentración de analito que genera una señal que se puede cuantificar de forma fiable (al 99% de confianza). La fórmula se recoge en la Ecuación 7:

$$LOQ = \frac{BC+10SD}{b} \cdot FD \quad \text{Ecuación 7}$$

En la Tabla 9 se muestran los límites de detección y cuantificación obtenidos los dos métodos de extracción empleados.



Tabla 9. Límites de detección y cuantificación para la digestión ácida (MAE) y la hidrólisis enzimática asistida con energía de microondas (EH-MAE).

Metal	LOD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		LOQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
	MAE	EH-MAE	MAE	EH-MAE
<b>Na/23</b>	1,49	0,60	2,09	0,84
<b>Mg/24</b>	1,52	0,61	3,58	1,43
<b>P/31</b>	2,30	0,92	6,22	2,49
<b>K/39</b>	8,00	3,20	10,4	4,15
<b>Ca/44</b>	6,59	2,63	14,2	5,68
<b>Ti/47</b>	0,02	0,01	0,04	0,02
<b>Cr/52</b>	0,011	0,005	0,004	0,002
<b>Mn/55</b>	0,004	0,002	0,009	0,004
<b>Fe/57</b>	0,32	0,13	0,64	0,25
<b>Ni/58</b>	0,03	0,01	0,05	0,02
<b>Co/59</b>	0,03	0,01	0,09	0,04
<b>Cu/63</b>	0,04	0,02	0,07	0,03
<b>Zn/64</b>	1,03	0,41	1,74	0,69
<b>Se/82</b>	0,78	0,31	1,84	0,73
<b>Rb/85</b>	0,01	0,005	0,025	0,01
<b>Sr/88</b>	0,16	0,05	0,29	0,11
<b>Ba/137</b>	1,37	0,57	3,27	1,31

Se observa que para todos los metales se consiguen unos límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) más bajos con el método extracción mediante EH-MAE que para MAE. Esto es debido fundamentalmente a los factores de dilución, ya que los extractos ácidos están más diluidos que los enzimáticos.



## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Valores de referencia para las nueces de Brasil y otros alimentos

Para evaluar la aplicabilidad de la extracción de metales en nueces de Brasil mediante EH-MAE, se debería emplear un material de referencia de nueces con valores certificados para las concentraciones de cada uno de los metales estudiados. Debido a que no se dispone de dicho material, se emplean las concentraciones de metales obtenidas por digestión ácida (MAE) como valores de referencia. Este método de extracción con posterior cuantificación en ICP-MS (sección 4.6 y 4.8) fue validado mediante su aplicación a diversos materiales de referencia tales como: lechuga de mar (BCR-279)<sup>39</sup>, atún (BCR-627)<sup>40</sup>, tejido de mejillón (GBW-0871)<sup>41</sup>, hojas de aceitunas (BCR-62)<sup>41</sup> y pelo humano (GBW07601)<sup>42</sup>.

Las diferentes fracciones de las nueces de Brasil (nuez sin desgrasar, nuez desgrasada y su grasa) se digieren y analizan con dicho método. Los valores obtenidos se recogen en la Tabla 10 para aquellos metales cuyas concentraciones se encuentran por encima del límite de cuantificación del método.

Tabla 10. *Concentración de metales extraídos mediante digestión ácida en nueces de Brasil, en nueces de Brasil desgrasadas y en su grasa.*

Metal	Concentración de metal en $\mu\text{g g}^{-1}$ (RSD)			Rec (%)
	Nuez Brasil	Nuez Brasil desgrasada	Grasa nuez Brasil	
<b>Na/23</b>	2,20 (24,30)	5,20 (2,00)	0,84 (32,00)	117
<b>Mg/24</b>	2618 (1)	7850 (4)	9,55 (3,96)	120
<b>P/31</b>	63890 (7)	14280 (2)	45,3 (3,4)	90,4
<b>K39</b>	7220 (5)	20020 (6)	15,3 (8,4)	111
<b>Ca/44</b>	544 (5)	1442,7 (2,4)	2,1 (4,0)	106
<b>Ti/47</b>	1520 (14)	3550 (4)	<LOD	93,7
<b>Cr/52</b>	0,07 (6,30)	0,17 (5,10)	<LOD	98,9
<b>Mn/55</b>	21,5 (6,1)	56,2 (2,3)	0,39 (9,90)	106
<b>Fe/57</b>	29,6 (7,9)	75,2 (2,8)	<LOD	102
<b>Ni/58</b>	4,13 (5,80)	10,1 (4,2)	<LOD	97,6
<b>Co/59</b>	1,13 (5,20)	3,05 (7,40)	<LOD	108
<b>Cu/63</b>	17,0 (4,6)	41,8 (2,5)	<LOD	98,4
<b>Zn/64</b>	28,8 (9,1)	64,2 (3,9)	0,04 (2,00)	89,2
<b>Se/82</b>	20,2 (5,7)	51,8 (3,4)	<LOD	103
<b>Rb/85</b>	71,8 (5,1)	190 (3)	0,15 (7,89)	107
<b>Sr/88</b>	127,4 (5,1)	333 (2)	0,24 (7,96)	105
<b>Ba/137</b>	2480 (8)	7400 (4)	8,84 (6,86)	120

Se puede apreciar que la fracción de metales asociados a la grasa es muy pequeña, por lo que podemos concluir que estos metales se encuentran ligados a la fracción no grasa del fruto seco. Los datos bibliográficos disponibles indican que la mayor proporción de metales en los frutos secos se encuentra ligada a la fracción proteica<sup>43</sup>, que en el caso de las nueces de Brasil supone un 17%. Por este motivo, es adecuada la selección de la enzima (proteasa) para la extracción de los metales mostrados en la Tabla 10.

Además, conociendo la concentración de grasa de las nueces de Brasil (en torno a un 60%) se realizó el balance de masas para cada metal. La fórmula empleada para el cálculo de la recuperación para cada metal, utilizada para establecer dicho balance, es la siguiente:

$$Rec (\%) = \frac{0,4 \times [Metal]_{NBD} + 0,6 \times [Metal]_{GNB}}{[Metal]_{NB}} \times 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

Siendo:  $[Metal]_{NBD}$  la concentración del metal en la nuez de Brasil desgrasada;  $[Metal]_{GNB}$  la concentración del metal en la grasa de la nuez de Brasil; y  $[Metal]_{NB}$  la concentración de dicho metal en la nuez de Brasil sin desgrasar. Los resultados de dicho balance fueron adecuados, lo que confirma la exactitud del método utilizado.

Tabla 11. Concentraciones de metales obtenidas mediante digestión ácida (MAE) para diferentes alimentos.

Metal	Concentración de metal en $\mu\text{g g}^{-1}$ (RSD)			Rec (%) <sup>a</sup>	Concentración de metal en $\mu\text{g g}^{-1}$ (RSD)	
	Baya Inca (BI)	Baya Inca desgrasada (BID)	Grasa Baya Inca (GBI)		Açaí	Palmito
<b>Li/7</b>	0,02 (5,72)	0,01 (10,7)	<LOD	71,8	<LOD	<LOD
<b>Na/23</b>	12,9 (24,4)	14,3 (18,5)	12,6 (4,7)	110	334 (4,16)	18400 (3,16)
<b>Mg/24</b>	870 (10,7)	1120 (9,26)	7,20 (7,35)	122	57,9 (3,96)	1360 (3,21)
<b>Al/27</b>	<LOD	5,36 (1,46)	<LOD	-	<LOD	<LOD
<b>P/31</b>	1850 (7,3)	1780 (7,37)	16, (13,4)	90,4	67,2 (0,42)	4780 (11,79)
<b>K/39</b>	22200 (2,69)	24300 (5,75)	13,0 (3,3)	103	494 (4,59)	22400 (12,1)
<b>Ca/44</b>	80,6 (11,26)	88,7 (17,8)	<LOD	103	78,5 (15,4)	960 (3,9)
<b>Ti/47</b>	821 (17,4)	1880 (7)	<LOD	114	357 (8,9)	1690 (15,1)
<b>V/51</b>	<LOD	0,62 (0,2)	<LOD	-	<LOD	<LOD
<b>Cr/52</b>	0,12 (6,14)	0,11 (6,31)	<LOD	85	1,43 (10,2)	0,91 (6,3)
<b>Mn/55</b>	10,4 (0,55)	10,4 (0,17)	0,13 (17,4)	94,2	1,42 (1,09)	26,6 (11,9)
<b>Fe/57</b>	39,7 (6,65)	45,5 (5,27)	1,36 (21,0)	108	16,2 (12,5)	32,5 (9,97)
<b>Ni/58</b>	0,70 (10,1)	0,78 (4,53)	<LOD	105	0,41 (9,56)	1,96 (12,2)
<b>Co/59</b>	0,06 (4,30)	0,07 (8,00)	<LOD	103	0,02 (13,4)	0,04 (3,34)
<b>Cu/63</b>	5,36 (0,34)	6,16 (15,6)	0,31 (1,10)	108	<LOD	9,45 (14,4)
<b>Zn/64</b>	152 (8,70)	183 (10,4)	0,35 (18,6)	113	<LOD	23 (10,8)
<b>Se/82</b>	0,21 (9,60)	0,27 (4,20)	<LOD	120	0,05 (1,44)	0,7 (3,70)
<b>Rb/85</b>	12,4 (1,58)	13,6 (6,56)	<LOD	103	0,48 (0,82)	24,0 (12,8)
<b>Sr/88</b>	1,91 (11,6)	2,46 (22,3)	0,16 (10,5)	120	0,93 (4,00)	21,7 (13,2)
<b>Cd/111</b>	<LOD	<LOD	<LOD	-	<LOD	0,14 (14,6)
<b>Sn/118</b>	<LOD	<LOD	<LOD	-	<LOD	2,95 (15,7)
<b>Ba/137</b>	4,14 (5,3)	4,98 (2,79)	2,27 (18,5)	116	0,68 (10,6)	22,5 (12,0)
<b>Pb/208</b>	<LOD	<LOD	<LOD	-	<LOD	0,03 (16,6)

$$^a Rec (\%) = \frac{0,94 \times [Metal]_{BID} + 0,06 \times [Metal]_{GBI}}{[Metal]_{BI}} \times 100$$

En las mismas condiciones fueron extraídos y analizados los otros alimentos. En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos.

Al igual que para las nueces de Brasil, la fracción de metales asociados a la grasa de la baya inca es muy pequeña y el balance obtenido es adecuado (valores comprendidos entre 71 y 121 %).

## 6.2. Estudio de variables implicadas en EH-MAE

A continuación, se optimiza (mediante diseño de experiencias) un método verde de extracción de metales en nueces de Brasil desgrasadas por EH-MAE. Dado que el contenido metálico se encuentra fundamentalmente asociado a la fracción no grasa de la nuez, la enzima seleccionada para este estudio fue la proteasa. Se consideró la adición de un activador enzimático (DTT) para favorecer la actividad enzimática<sup>24</sup>.

El diseño de experiencias Plackett-Burman incluye 8 variables relacionadas con el proceso de hidrólisis enzimática, lo que implica la realización de 12 experiencias diferentes. Las variables a estudio (así como sus valores altos y bajos) y la matriz de diseño experimental se muestran en las Tablas 12 y 13, respectivamente. Los valores para las diferentes variables se seleccionan teniendo en cuenta las condiciones de actividad de la proteasa (37°C y pH fisiológico) y datos proporcionados por la bibliografía. Las etapas fueron programadas de tal forma que no se excediera dicha temperatura, ya que la enzima podría desnaturalizarse y perder su función. En cuanto a la masa de proteasa y de DTT se selecciona unos valores altos y bajos que cubran los encontrados en fuentes bibliográficas<sup>43</sup>.

Tabla 12. Variables estudiadas para el método de extracción de metales por EH-MAE.

Código	Variable	Valor bajo (-)	Valor alto (+)
A	Etapas	1	3
B	M <sub>proteasa</sub> (mg)	25	50
C	pH	7	8
D	[Tris] (mM)	30	60
E	V <sub>Tris</sub> (mL)	3	6
F	M <sub>DTT</sub> (mg)	0	25
G	Fantasma 1	-1	+ 1
H	Fantasma 2	-1	+ 1

A continuación, se muestran los detalles de los programas de microondas empleados para una etapa (Tabla 14 y Figuras 11 y 12) y tres etapas de extracción (Tabla 15 y Figuras 13 y 14).

Tabla 13. Matriz de diseño experimental resultante de las condiciones seleccionadas para la extracción de metales por EH-MAE.

Exp.	Etapas	M <sub>proteasa</sub> (mg)	pH	[Tris] (mM)	V <sub>Tris</sub> (mL)	M <sub>DTT</sub> (mg)	Fantasma 1	Fantasma 2
1	3	25	8	30	3	0	1	1
2	3	50	7	60	3	0	-1	1
3	1	50	8	30	6	0	-1	-1
4	3	25	8	60	3	25	-1	-1
5	3	50	7	60	6	0	1	-1
6	3	50	8	30	6	25	-1	1
7	1	50	8	60	3	25	1	-1
8	1	25	8	60	6	0	1	1
9	1	25	7	60	6	25	-1	1
10	3	25	7	30	6	25	1	-1
11	1	50	7	30	3	25	1	1
12	1	25	7	30	3	0	-1	-1

Tabla 14. Programa de microondas de una etapa de extracción empleado para la extracción de metales mediante EH-MAE.

Etapas	P <sub>inicial</sub> (W)	t (min)	P <sub>final</sub> (W)	Ventilación
1	50	15	50	3
2	0	20	0	3

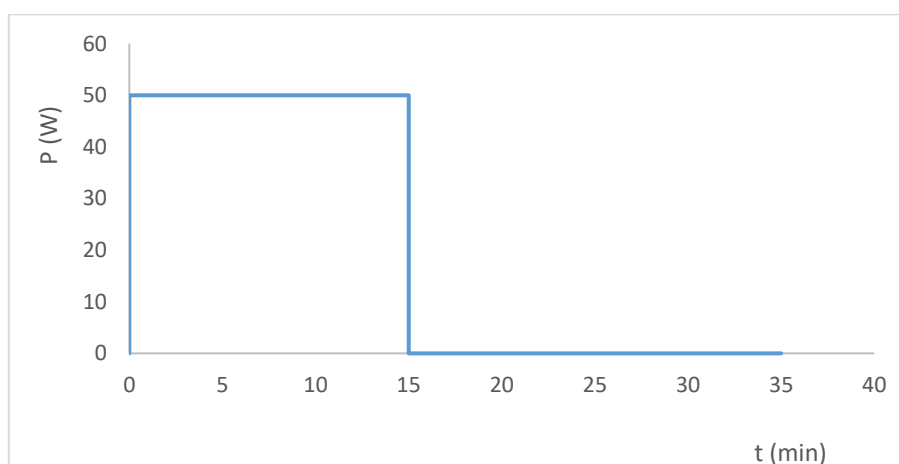


Figura 11. Gráfico de potencia para una etapa de extracción mediante EH-MAE.

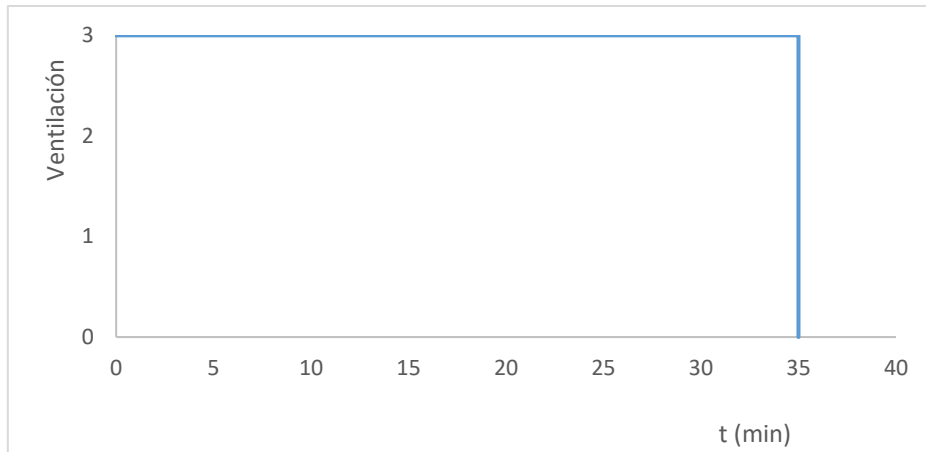


Figura 12. Gráfico de ventilación para una etapa de extracción mediante EH-MAE.

Tabla 15. Programa de microondas de tres etapas de extracción empleado para la extracción de metales mediante EH-MAE.

Etapa	P <sub>inicial</sub> (W)	t (min)	P <sub>final</sub> (W)	Ventilación
1	50	15	50	3
2	0	20	0	3
3	50	15	50	3
4	0	20	0	3
5	50	15	50	3
6	0	20	0	3

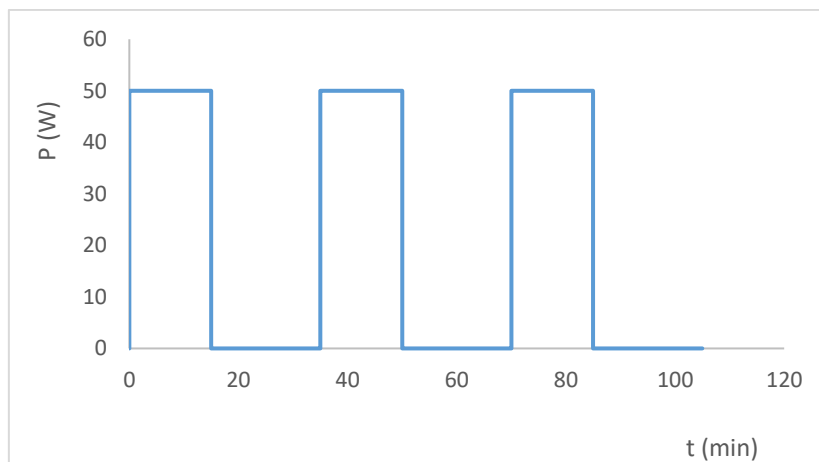


Figura 13. Gráfico de potencia para tres etapas de extracción mediante EH-MAE.

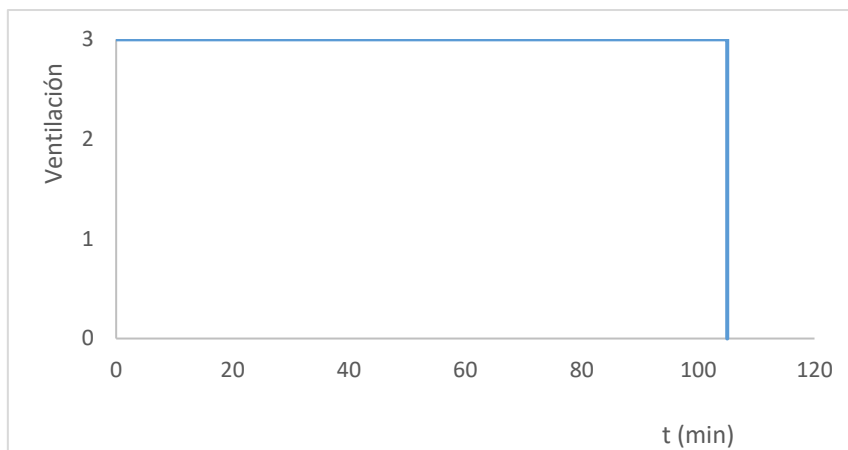


Figura 14. Gráfico de ventilación para tres etapas de extracción mediante EH-MAE.

En este diseño se calcula el porcentaje de recuperación de los metales extraídos de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{[Metal]_{EH-MAE}}{[Metal]_{MAE}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde:  $[Metal]_{EH-MAE}$  es la concentración obtenida mediante EH-MAE y  $[Metal]_{MAE}$  es la concentración obtenida mediante digestión ácida, ambas para un determinado metal.

Como variable respuesta del diseño de experiencias Plackett-Burman se selecciona el porcentaje de recuperación medio ( $\%R_M$ ), el cual se define para cada experiencia como:

$$\%R_M = \frac{\sum \%R_i}{n} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde:  $\sum \%R_i$  es el sumatorio de las recuperaciones analíticas de los metales analizados para una experiencia y  $n$  es el número total de metales analizados en la experiencia.

En la Tabla 16 se muestran los porcentajes de recuperación analítica de cada metal y recuperación analítica media (utilizada como variable respuesta) para cada una de las experiencias realizadas en el diseño Plackett-Burman.

Como puede observarse en la Tabla 16, para ciertos metales como el Co, Cu, K, Ni, Rb y Se, se alcanzan recuperaciones superiores al 65% en la mayoría de las experiencias implicadas en el diseño. Por el contrario, para el Ba, Cr, Fe, Na, Mg, Mn, P, y Sr las recuperaciones obtenidas son inferiores al 30% para todas las experiencias.



Tabla 16. Recuperación analítica para cada metal y porcentaje de recuperación media para cada experiencia realizada en el diseño Plackett-Burman.

Metal	% Recuperación de cada experiencia											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Na	6,30	-	-	17,7	11,8	6,50	6,80	0,70	24,7	8,1	12,6	1,40
Mg	23,1	29,1	20,2	23,3	26,3	23,4	22,5	18,5	21,4	32,6	27,5	12,1
P	3,20	2,40	1,10	2,20	2,20	1,60	1,60	1,20	3,10	7,80	2,40	1,70
K	70,6	82,1	57,8	75,3	74,8	64,5	64,1	43,3	57,1	83,2	71,8	27,1
Cr	-	7,90	2,90	8,60	7,60	4,00	5,30	1,20	3,10	4,40	8,00	-
Mn	-	-	0,90	-	-	-	1,20	2,20	1,60	0,30	-	-
Fe	-	-	-	-	-	-	0,20	1,10	-	-	-	-
Ni	98,8	100	99,9	100	100	98,0	100	99,4	100	100	100	-
Co	68,0	76,7	61,5	84,8	67,5	75,2	86,4	65,4	71,7	86,8	83,9	28,8
Cu	97,9	100	91,7	100	99,2	94,7	96,9	96,9	91,2	100,0	69,9	41,0
Rb	60,8	72,0	51,1	66,5	67,1	58,0	55,6	43,3	51,4	65,7	68,2	18,2
Sr	4,40	11,4	12,4	5,00	11,9	11,5	11,0	9,20	7,80	8,30	11,8	2,30
Ba	1,10	4,30	4,90	1,10	4,30	4,80	5,40	3,60	2,30	2,50	5,10	0,80
Se	82,8	96,3	93,0	103	86,1	86,6	70,5	82,4	44,3	53,1	62,9	89,6
%R <sub>M</sub>	36,9	41,6	35,5	42,0	39,9	37,8	37,7	33,5	34,3	39,5	37,4	15,9

### 6.3. Cartas Pareto de primer y segundo orden:

La evaluación estadística de los resultados obtenidos, al 95% de probabilidad y utilizando la recuperación media como variable respuesta, proporcionan una  $t_{crit}$  de 3,2 (calculado con el programa Statgraphics Plus 4.0) y la carta Pareto de primer orden mostrada en la Figura 15. Aquellas variables con  $t_{exp}$  superior a 3,2 son consideradas estadísticamente significativas. Como puede verse, ninguna de las variables estudiadas es estadísticamente significativa al 95% de probabilidad. Los efectos de todas las variables son positivos, lo que implica que un incremento en el valor de cada una de ellas incrementa el porcentaje de extracción. Cabe señalar la baja significación de las variables fantasmas (G y H), por lo que podemos concluir que no existen errores sistemáticos y que no existe ninguna variable “desconocida” no seleccionada que pueda afectar de manera importante.

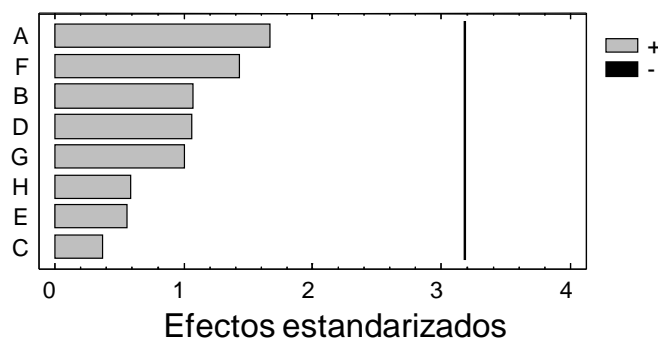


Figura 15. Carta Pareto de primer orden para las variables estudiadas: etapas (A), masa de proteasa (B), pH (C), concentración de Tris (D), volumen de Tris (E), masa de DTT (F), Fantasma 1 (G), Fantasma 2 (H).

Se realizan también las cartas Pareto de segundo orden (Figura 16) con el objetivo de eliminar las variables que puedan enmascarar la importancia de las variables más importantes.

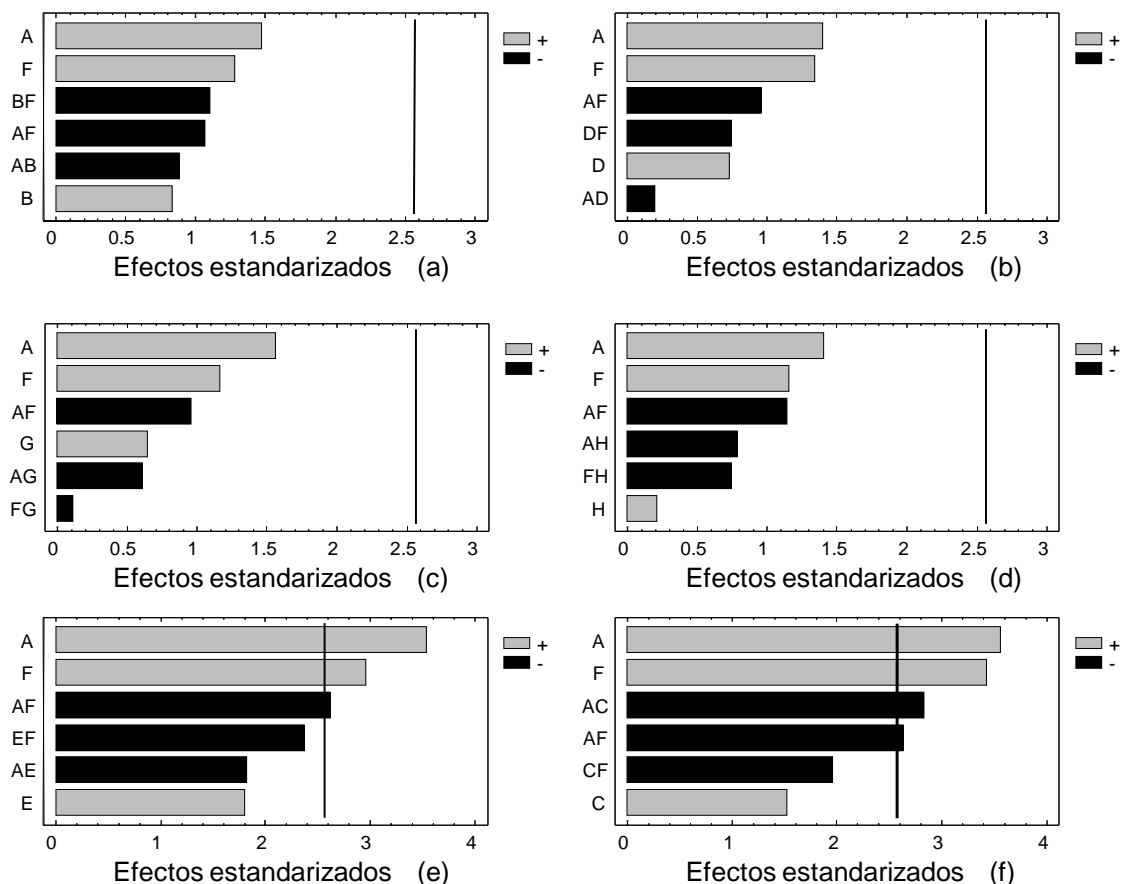


Figura 16. Cartas Pareto de segundo orden para las variables: etapas (A), masa de proteasa (B), pH (C), concentración de Tris (D), volumen de Tris (E), masa de DTT (F), Fantasma 1 (G), Fantasma 2 (H)

En las Figuras 16 (e) y (f) se puede apreciar como las variables A y F (Etapas de extracción y masa de DTT, respectivamente) cruzan el umbral de  $t_{crit}$ , por lo que se concluye que ambas variables son estadísticamente significativas al 95% de confianza.

Para aquellas variables estadísticamente no significativas (masa de proteasa, concentración de Tris, volumen de Tris y pH) se seleccionan los valores bajos con el fin de minimizar el consumo de reactivos. Para las variables significativas (etapas de extracción y masa de DTT) se procede a su optimización.

#### 6.4. Optimización de las variables estadísticamente significativas

Para optimizar las variables estadísticamente significativas del método de extracción EH-MAE, se realizan un total de 12 experiencias en las cuales se varían las etapas de extracción (entre 1 y 3) y las cantidades de DTT (entre 0 y 30 mg). Las experiencias realizadas en el proceso de optimización de dichas variables se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. *Experiencias realizadas para la optimización del número de etapas y la masa de DTT.*

Experiencia	Etapas	M <sub>DTT</sub> (mg)
1	1	0
2		10
3		20
4		30
5	2	0
6		10
7		20
8		30
9	3	0
10		10
11		20
12		30

En la Tabla 18 se muestran los porcentajes de recuperación media para cada una de las 12 experiencias realizadas.

Tabla 18. *Porcentajes de recuperación analítica media para cada una de las experiencias realizadas en el proceso de optimización.*

Etapas	M <sub>DTT</sub> (mg)			
	0	10	20	30
1	42,59%	49,41%	52,88%	50,46%
2	53,19%	51,72%	<b>54,34%</b>	54,48%
3	53,93%	54,29%	54,60%	54,03%

Se observa que para 2 y 3 etapas se consiguen similares recuperaciones, por lo que se selecciona como óptimo 2 etapas de extracción con el fin ahorrar energía y tiempo. Con respecto a la masa de DTT, se observa que su incremento influye positivamente en la recuperación media. Es necesario indicar que este efecto es importante cuando se utiliza una etapa de extracción. Para dos y tres etapas de extracción su influencia es menos relevante.

Hay que destacar que, en estas condiciones óptimas, los valores de recuperación analítica alcanzados para los metales Co, Cu, K, Ni, Se y Rb son cuantitativas (recuperación analítica superior al 95%).

A modo de resumen, en la Tabla 19 se muestran las condiciones finales seleccionadas para la extracción verde de metales mediante EH-MAE.

Tabla 19. *Condiciones óptimas para el método de extracción de metales mediante EH-MAE para nueces de Brasil*

Etapas	M <sub>DTT</sub> (mg)	M <sub>proteasa</sub> (mg)	pH	[Tris] (mM)	V <sub>Tris</sub> (mL)
2	20	25	7	30	3



## 7. Conclusiones

En esta sección se exponen las conclusiones más destacables del trabajo presentado en esta memoria:

Se proporciona información sobre la composición metálica de alimentos ricos en oligoelementos (nueces de Brasil, baya inca del Perú, fruto del açai y palmito) y se comprueba que el contenido metálico presente en las nueces de Brasil y bayas incas del Perú se asocian principalmente a la fracción no grasa del alimento.

Se propone un método analítico novedoso, simple, respetuoso con el ambiente y rápido para la extracción de metales en nueces de Brasil desgrasadas mediante EH-MAE y su determinación por ICP-MS.

Se estudiaron las variables estadísticamente significativas que afectan a la extracción de Ba, Ca, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Rb, Se, Sr, Ti y Zn mediante EH-MAE utilizando un diseño Plaket-Burman. Los resultados indican que las variables estadísticamente significativas al 95% de confianza (en el campo experimental seleccionado) son: etapas de extracción y masa de DTT.

Se optimizaron estas variables, concluyendo que el óptimo de extracción se consigue con 2 etapas de extracción y 20 mg de DTT, con una recuperación superior al 95% para los metales Co, Cu, K, Ni, Se y Rb.

## 7. Conclusións

Nesta sección expóñense as conclusións máis destacables do traballo presentado nesta memoria:

Achégase información sobre a composición metálica de alimentos ricos en oligoelementos (noces do Brasil, baga inca do Perú, fruto do açai e palmito) e compróbase que o contido metálico presente nas noces do Brasil e nas bagas incas do Perú atópase asociado principalmente á fracción non graxa do alimento.

Propónse un método analítico novo, doado, respectuoso co ambiente e rápido para a extracción de metais en noces do Brasil desgraxadas mediante EH-MAE e a súa determinación por ICP-MS.

Estudáronse as variables estatisticamente significativas que afectan á extracción de Ba, Ca, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Rb, Se, Sr, Ti e Zn mediante EH-MAE empregando un diseño Plaket-Burman. Os resultados indican que as variables estatisticamente significativas ó 95% de confianza (no campo experimental seleccionado) son: etapas de extracción e masa de DTT.

Optimizáronse ditas variables, concluíndo que o óptimo de extracción conséguese con 2 etapas de extracción e 20 mg de DTT, cunha recuperación superior ó 95% para os metais Co, Cu, K, Ni, Se y Rb.

## 7. Conclusions

The main conclusions derived from this study are summarized as follows:

Major and trace metal data in food (Brazil nuts, Inca berry, açai fruit and palmito) was provided. Metals are mainly bounded to non-fat fraction of Brazil nut and Inca berry.

A novel, simple, rapid and environmentally friendly analytical method is proposed for metal extraction in Brazil nuts by EH-MAE and determination by ICP-MS.

Statistically significant variables for metal (Ba, Ca, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, P, Rb, Se, Sr, Ti and Zn) extraction were assessed by a Plackett-Burman design. Results show that the statistically significant variables (at 95% interval confidence) are: extraction steps and DTT mass.

These variables were optimized: 2 extraction steps and 20 mg of DTT mass were the optimum values achieved. By using these conditions, high analytical recoveries (> 95%) were assessed for Co, Cu, K, Ni, Se and Rb.





## 8. Bibliografía

- <sup>1</sup>Mertz, W. (1981). The essential trace elements. *Science*, 213(4514), 1332-1338
- <sup>2</sup>Fang, A. M. (1996). An introduction to monitoring the environmental and human risk assessment of metals. *Toxicology of metals*, Boca Ratón, Florida.
- <sup>3</sup>Vallet, M., Faus, J., García, E., y Moratal, J. (2003). Introducción a la química bioinorgánica. Madrid: Síntesis.
- <sup>4</sup>Wedepohl, K. H. (1991). The composition of the upper earth's crust and the natural cycles of selected metals. Metals in natural raw materials. Natural sources. *Metals and their Compounds in the Environment*, Weinheim, Alemania.
- <sup>5</sup>Fang, A. M. (1996). An introduction to monitoring the environmental and human risk assessment of metals. *Toxicology of metals*, Boca Ratón, Florida.
- <sup>6</sup>Stoker, H. S., y Seager, S. L. (1981). *Química Ambiental: Contaminación del aire y del agua*. Barcelona: Blume.
- <sup>7</sup>Mas, A., y Azcue, J. M. (1993). *Metales en sistemas biológicos*, Barcelona, PPU.
- <sup>8</sup>Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN). (02/10/15). Metales pesados. Recuperado de: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/metales\\_pesados.shtml](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/metales_pesados.shtml)
- <sup>9</sup>Moreda-Piñeiro, J., Hermelo-Herbello, P., Domínguez-González, R., Bermejo-Barrera, P., y Moreda-Piñeiro, A. (2016). Bioavailability assessment of essential and toxic metals in edible nuts and seeds. *Food Chemistry*, 205, 146–154
- <sup>10</sup>Anzano, J. M, y González, P. (2000). Determination of iron and copper in peanuts by flame atomic absorption spectrometry using acid digestion. *Microchemical Journal*, 64, 141-145.
- <sup>11</sup>Chang, J., Guentemann, W., Reid, C., y Lisk, D. (1995). Selenium content of Brazil nuts from two geographic localizations in Brazil. *Chemosphere*, 30, 801-802.
- <sup>12</sup>Juranovic, I., Breinhoelder, P., y Steffan, I. (2003). Determination of trace elements in pumpkin seed oils and pumpkin seeds by ICP-AES. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18, 54-58.
- <sup>13</sup>Naozuka, J., Marana, S. R., y Oliveira, P. V. (2010). Water-soluble Cu, Fe, Mn and Zn species in nuts and seeds. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 78-85.
- <sup>14</sup>Momen, A. A., Zachariadis, G. A., Anthemidis, A. N., y Stratis, J. A. (2007). Use of fractional design for optimization of digestion procedures followed by multi-element determination of essential and non-essential elements in nuts using ICP-OES technique. *Talanta*, 71, 443-451.
- <sup>15</sup>Moondley, R., Kindness, A., y Jonnalagadda, S. B. (2007). Elemental composition and chemical characteristics of five edible nuts (almond, Brazil, pecan, Macadamia and walnut) consumed in Southern Africa. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 42, 585-591.

- <sup>16</sup>Gentile, C., Allegra, M., Angileri, F., Pintaudi, A. M., Livrea, M. A., y Tesoriere, L. (2012). Polymeric proanthocyanidins from Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L.) nut extract inhibit lypopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW 264. 7 cells. *European Journal of Nutrition*, 51, 353-363.
- <sup>17</sup>Ip. C., y Lisk, D. (1994). Bioactivity of Selenium from Brazil nut for cancer prevention and selenoenzyme maintenance. *Nutrition and Cancer*, 21, 203-212.
- <sup>18</sup>Kendall, C. W., Josse, A. R., Esfahani, A., y Jenkins, D. J. (2010). Nuts, metabolic syndrome and diabetes. *British Journal of Nutrition*, 104, 465-473.
- <sup>19</sup>Rajaei, A., Barzegar, M., Mobarez, A. M., Sahari, M. A., y Esfahani, Z. H. (2010). Antioxidant, anti-microbial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) Green hull extract. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 107-112.
- <sup>20</sup>Domènech, X. (2005). *Química verde*. Barcelona: Rubes Editorial.
- <sup>21</sup>Dean, J. R. (2003). *Methods for environmental trace analysis*. Newcastle: Wiley.
- <sup>22</sup>Carpenter, R. C. (1981). The Determination of Cadmium, copper, lead and thallium in human liver and kidney tissue by flame atomic absorption spectrometry after enzymatic digestion. *Analytica Chimica Acta*, 125, 209-213.
- <sup>23</sup>Peña-Ferfal, C., Moreda-Piñeiro, J., Bermejo-Barrera, P., Bermejo-Barrera, A., Pinochet-Cancino, H., y Gregori-Henríquez, I. (2004). Use of enzymatic hydrolysis for the multi-element determination in mussel soft tissue by inductively coupled plasma-atomic absorption spectrometry, *Talanta*, 64, 671-681.
- <sup>24</sup>Moreda-Piñeiro, A., Barciela-Alonso, M. C., Domínguez-González, R., Peña-Vázquez, E., Herbello-Hermelo, y P., Bermejo-Barrera, P. (2009). Alternative solid simple pre-treatment methods in Green analytical atomic spectroscopy. *Spectroscopy Letters*, 42, 397-417.
- <sup>25</sup>Moreda-Piñeiro, A., Moreda-Piñeiro, J., Bermejo-Barrera, P. (2013). Sample Pre-treatment Methods for Organometallic Species Determination. En Bakirdere, S., *Speciation Studies in Soil, Sediment and Environmental Samples* (pp. 147-149). CRC Press
- <sup>26</sup>Chiarotti, M. (1993). Overview on extraction procedures. *Forensic Science International*, 63, 161-170.
- <sup>27</sup>Skoog, D. A., Holler, F.J., y Crouch, S.R. (2007). *Principios de análisis instrumental*. Santa Fe: Cengage Learning.
- <sup>28</sup>Harris, D. C. (1999). *Quantitative Chemical Analysis*. Nueva York: W.H. Freeman and Company.
- <sup>29</sup>Vilalta, R., Gullín, J. J., y Varela, A. (2011). *Diccionario de Química*. A Coruña: Universidade da Coruña.
- <sup>30</sup>Rubinson, K. A., Rubinson, y J. F. (2001). *Análisis Instrumental*. Madrid: Pearson Educación.
- <sup>31</sup>A primer of 7700 series Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Agilent Technologies.

- <sup>32</sup>Muynck, D., Cloquet, C., Vanhaecke, F. (2008). Development of a new method for Pb isotopic analysis of archaeological artefacts using single-collector ICP-dynamic reaction cell-MS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 23, 62-71.
- <sup>33</sup>Miller, N., y Miller, C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Madrid: Pearson Educación.
- <sup>34</sup>Moscoso Pérez, C. (2003). *Determinación de metales formadores de vapor mediante generación de hidruros acoplada a espectroscopia de absorción y fluorescencia atómica* (Tesis doctoral inédita), Universidade da Coruña, A Coruña.
- <sup>35</sup>Type, H. (2004), Application of statistical 'design of experiments' methods in drug Discovery. *Drugs Discovery Today*, 9(11), 485-491
- <sup>36</sup>Montgomeri, D. C. (2003). *Diseño y análisis de experimentos*. México DF: Limusa.
- <sup>37</sup>Fergusson, J. E. (1990). *The heavy elements: Chemistry, environmental impact and health effects*. Nueva Zelanda: Pergamon Press.
- <sup>38</sup>Reglamento (CE) N° 1881/2006, Diario Oficial de la Unión Europea, 19 de diciembre de 2006.
- <sup>39</sup>Rey-Rubio, R., Moreda-Piñeiro, J., Rodríguez-Alonso, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D. (2012). Trace metal determination of edible seaweeds by pressurized hot water extraction and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Atomic Spectroscopy*, 33 (6).
- <sup>40</sup>Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeira, A., Romarís-Hortas, V., Domínguez-González, R., Alonso-Rodríguez, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Bermejo-Barrera, P. (2012). Trace metals in marine foodstuff: Bioavailability estimation and effect of major food constituents. *Food Chemistry*, 134, 339-345.
- <sup>41</sup>Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, A., Bermejo-Barrera, P., Moreda-Piñeiro, J., Alonso-Rodríguez, E., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D. (2007). Feasibility of pressurization to speed up enzymatic hydrolysis of biological materials for multielement determinations. *Analytical Chemistry*, 79, 1797-1805.
- <sup>42</sup>Moreda-Piñeiro, J., Alonso-Rodríguez, E., López-Mahía, P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P. (2007). Determination of major and trace elements in human hair by pressurized-liquid extraction with acetic acid and inductively coupled plasma-optical-emission spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 338, 441-449.
- <sup>43</sup>Welna, M., Szymczycha-Madeja, A. (2014). Improvement of a simple preparation procedure for multi-elemental determination in Brazil nuts by ICP-OES. *Food additives and contaminants*, 31(4), 658-665.