



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

*“DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA EVALUACIÓN
DE PARÁMETROS DE CALIDAD DE PROPÓLEOS”*

Lic. Gastón Darío Pierini

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2014

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 10 de agosto de 2010 y el 29 de diciembre de 2014, bajo la dirección de la Dra. María Eugenia Centurión, Profesora Asociada de Química Analítica y la Co-dirección de la Dra. María Susana Di Nezio, Profesora Adjunta de Química Analítica.

Licenciado en Química, Pierini Gastón



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente Tesis ha sido aprobada el .../.../..... , mereciendo la calificación de

AGRADECIMIENTOS

A CONICET, por las becas otorgadas.

A la Universidad Nacional del Sur, por brindarme las instalaciones para poder desarrollar la presente tesis doctoral.

A la Dra. María Eugenia Centurión y la Dra. María Susana Di Nezio, mis más sinceros agradecimientos por guiarme y apoyarme durante estos 5 años.

Al Dr. Marcelo Fabián Pistonesi, por los consejos y charlas.

A Mati, Mari, Gabi y Dani, por brindarme su amistad.

A Caro, Marcos y Nati por los momentos compartidos.

A Adriana Debbaudt y Mirta Montero por su apoyo.

A los profesores que colaboraron con el desarrollo de esta tesis, en especial a los Dres. Héctor Fernández, María Alicia Zón y Nelio Vettorazzi de la UNRC y la Dra. Marisa Frechero por abrirme las puertas de su laboratorio tan generosamente.

Al Dr. Julio S. Rebouças.

Al Dr. Adrian Marcelo Granero por su ayuda y amistad.

Esta tesis doctoral va especialmente dedicada a mis padres (Diana y Darío) y hermana (Florencia), por su constante e incondicional apoyo.

A todos MUCHAS GRACIAS!!!

RESUMEN

El propóleo es un producto de consistencia viscosa, elaborado por las abejas a partir de ciertas especies vegetales y presenta en su composición numerosos minerales (zinc, cobre, calcio, hierro, etc.). Por otro lado, puede contener metales potencialmente tóxicos (plomo, cadmio y arsénico) provenientes de la contaminación ambiental. El empleo de propóleos bruto y productos derivados en diversas industrias como la alimenticia y farmacéutica, ha crecido considerablemente durante los últimos años, debido a sus propiedades antioxidantes, antisépticas, antifúngicas, etc. Por ello, la determinación de metales que contemplen las características nutricionales e higiénico-sanitarias de estos productos y que contribuyan a su control de calidad, es de interés. Los métodos empleados usualmente para la determinación de estos metales, son laboriosos, consumen tiempo y emplean gran cantidad de reactivos y muestra. Es por ello que surge la necesidad de implementar métodos analíticos rápidos, simples, de bajo costo y que sean amigables con el medio ambiente para llevar a cabo el control de calidad de estos productos. Éste es el principal objetivo de esta Tesis Doctoral, que dieron lugar a los siguientes trabajos:

En una primera instancia, se desarrolló una metodología electroanalítica para la determinación de plomo en muestras de propóleos de la Provincia de Buenos Aires, empleando electrodos de bismuto. El método incluyó la modificación de un electrodo de trabajo de carbono vítreo con nanotubos de carbono y un polímero conductor (Nafion), empleando la técnica de Redisolución Anódica con Voltamperometría de Onda Cuadrada. Los resultados obtenidos con este método fueron validados mediante el empleo de la técnica EEA-API mostrando una buena concordancia entre ambos.

Como segundo trabajo de Tesis, se procedió a la determinación simultánea de zinc, cadmio, plomo y cobre en muestras de propóleos, empleando las técnicas de Redisolución Anódica con Voltamperometría de Onda Cuadrada y Calibración Multivariada. Se usó un diseño de experimento de tipo Box-Behnken, combinado con la función de deseabilidad, con el fin de optimizar los

parámetros de la técnica electroanalítica empleada. Se usaron métodos de calibración lineal (PLS) y no lineal (ANN) para predecir la concentración de los cuatro metales en las muestras analizadas. Se realizaron ensayos de recuperación para validar el método, obteniéndose muy buenos resultados.

Por otro lado, se sintetizaron nuevos materiales empleando óxidos de telurio y vanadio y micropartículas de grafito para ser utilizados como electrodos de trabajo compuestos en técnicas electroanalíticas. La síntesis de estos electrodos resultó ser sencilla, rápida y de bajo costo. La superficie del electrodo así generada no requiere pretratamientos para su utilización. Se estudió su comportamiento electroquímico empleando Voltamperometría Cíclica, empleando cuplas redox de ferrocianuro de potasio y ácido ascórbico. Los resultados fueron comparados con los obtenidos con electrodos comerciales de carbono vítreo y carbono pirolítico altamente ordenado, empleando las mismas cuplas, observándose un comportamiento similar.

Finalmente se llevó a cabo la determinación espectrofluorimétrica de zinc en extractos etanólicos comerciales de propóleos. Se desarrolló un método sencillo, económico y rápido, basado en la formación de un complejo entre el zinc y la tetracarboxifenil porfirina. Además, el método desarrollado presenta la ventaja de no requerir pretratamiento de la muestra. Los resultados obtenidos con este método fueron validados empleando la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica, obteniéndose resultados satisfactorios.

ABSTRACT

Propolis is a product of viscous consistency, made by bees from certain plants species and which has in its composition many minerals (calcium, iron, zinc, copper, etc.). On the other hand, may contain potentially toxic metals (lead, cadmium and arsenic), from environmental pollution. The use of raw propolis and their products in many industries such as food and pharmaceutical, has grown considerably in recent years due to its antioxidant, antiseptic and antifungal properties, etc. For this reason, the determination of metals that include nutritional and hygienic properties of these products that contribute to their quality control features, it is of interest. Some of the methodologies used in the determination of these metals are laborious, time consuming, employ large amount of reagents and samples. Then, new analytical methods must be proposed. This is the main objective of this Thesis resulting to the following research:

An electroanalytical method for the determination of lead in Argentina raw propolis based on bismuth electrodes was developed. A glassy carbon electrode was modified with carbon nanotubes and Nafion. The obtained results by the proposed method were validated using the ICP-AES method, showing good agreement.

A simultaneous determination of Zn, Cd, Pb and Cu in raw propolis samples, employing square wave anodic stripping voltammetry and chemometrics tools, was developed. In order to optimize the parameters of square wave voltammetry a Box-Behnken design combined with desirability function was used. Linear calibration (PLS) and nonlinear methods (ANN) were used to predict the concentration of the four metals in the samples. The results were validated employed a recovery assays.

On the other hand, a low cost composite electrodes employing tellurite oxide, vanadium oxide and micrometric granular graphite (NWE), were designed as an alternative to be used as working electrode in voltammetry techniques. The

synthesis of these composite electrodes is carried out easily, in a short time and their surface does not require previous preparation. The electrochemical properties of NWE were studied using potassium hexacyanoferrate (II) and ascorbic acid system.

Finally, a fluorimetric determination of zinc in commercial ethanol extracts of propolis was developed. A simple, economic and fast method, based on the formation of a complex between the zinc and tetra carboxyphenyl porphyrin is proposed. This method shows the advantage that it does not require sample pretreatment. The obtained results by the proposed method were validated using AAS method, showing good agreement.

Índice

Capítulo 1: Introducción

1.1. Apicultura y su historia	1
1.2. Productos Apícolas	3
1.3. Rol de la apicultura en Argentina	4
1.4. Productos apícolas como (bio)indicadores medioambientales	5
1.5. El propóleo	6
1.5.1. Definición	6
1.5.2. Producción	7
1.5.3. Función dentro de la colmena	8
1.5.4. Composición y propiedades	8
1.5.5. El propóleo como bioindicador	9
1.5.6. Contenido de metales en el propóleo	9
1.6. Referencias	11

Objetivo general

Objetivo general	15
------------------------	----

Capítulo 2: Cosecha y caracterización de propóleos

2.1. Objetivo	16
2.2. Introducción	16
2.3. Materiales y métodos	19
2.3.1. Toma de muestra	19
2.3.2. Acondicionamiento de las muestras	24
2.3.3. Caracterización de las muestras	25
2.4. Resultados y discusión	28
2.5. Conclusiones parciales	34
2.6. Referencias	35

Capítulo 3: Determinación de metales en muestras de propóleos empleando técnicas electroquímicas

3.1. Objetivo	36
3.2. Introducción	36
3.2.1. Técnicas electroquímicas	36
3.2.2. Voltamperometría de onda cuadrada	38
3.2.3. Voltamperometría de redisolución	40
3.2.4. Electrodo de bismuto	41

Capítulo 3 Parte A: Determinación del contenido de plomo, empleando electrodos de bismuto y Voltamperometría de Redisolución Anódica de onda cuadrada

3.3.1. Introducción	44
3.3.2. Materiales y método	45
3.3.2.1. Instrumentación.....	45
3.3.2.2. Preparación de la muestra	45
3.3.2.3. Reactivos y soluciones.....	45
3.3.2.4. Preparación del electrodo de trabajo.....	46
3.3.2.5. Procedimiento	47
3.3.3. Resultados y discusión.....	48
3.3.3.1. Optimización de las variables experimentales	48
3.3.3.2. Parámetros analíticos.....	50
3.3.3.3. Estudio de interferentes.....	52
3.3.3.4. Aplicación a muestras de propóleos	55
3.3.4. Conclusiones parciales	56

Capítulo 3 Parte B: Determinación simultánea de Zn, Cd, Pb y Cu empleando Voltamperometría de Redisolución Anódica de onda cuadrada y técnicas quimiométricas

3.4.1. Introducción	57
3.4.2. Materiales y métodos	57
3.4.2.1. Instrumentación.....	57
3.4.2.2. Preparación de la muestra	58
3.4.2.3. Reactivos y soluciones.....	58
3.4.2.4. Preparación del electrodo de trabajo.....	58
3.4.3.5. Procedimiento	60
3.4.3. Resultados y discusión.....	60
3.4.3.1. Selección de la mina de lápiz	60
3.4.3.2. Optimización de los parámetros de onda cuadrada.....	61
3.4.3.3. Diseño del set de calibración.....	66
3.4.3.4. Preprocesamiento de datos.....	67
3.4.3.5. Análisis de los modelos de calibración	68
3.4.3.6. Redes neuronales (Modelado no lineal)	71
3.4.3.7. Aplicación a muestras de propóleos	74
3.4.4. Conclusiones parciales	76
3.5. Referencias.....	77

Capítulo 4: Desarrollo de un electrodo compuesto para ser aplicado en técnicas voltamperométricas

4.1. Objetivo.....	82
4.2. Introducción	82
4.2.1. Electrodo de trabajo	82

4.2.2. Electrodos Compuestos	83
4.3. Materiales y métodos	84
4.3.1. Instrumentación.....	84
4.3.2. Reactivos y soluciones.....	85
4.3.3. Síntesis del sistema vítreo.....	86
4.4. Resultados y discusión	87
4.4.1. Caracterización del grafito.....	87
4.4.2. Caracterización del sistema vítreo.....	89
4.5. Conclusiones parciales	103
4.6. Referencias.....	104
Capítulo 5: Determinación de zinc en extractos etanólicos de propóleos mediante Espectroscopia de Fluorescencia Molecular	
5.1. Objetivo.....	107
5.2. Introducción	107
5.2.1. Importancia del zinc a nivel biológico	107
5.2.2. Porfirinas.....	109
5.2.3. Tetracarboxifenilporfirina (TCPP)	110
5.3. Materiales y métodos	111
5.3.1. Instrumentación.....	111
5.3.2. Reactivos y soluciones.....	112
5.3.3. Método de Referencia	112
5.3.4. Procedimiento	112
5.4. Resultados y discusión	113
5.4.1. Estudios espectrométricos	113
5.4.2. Parámetros analíticos.....	118
5.4.3. Aplicación a muestras de propóleos.....	119
5.5. Conclusiones parciales	121
5.6. Referencias.....	122
Capítulo 6: Conclusiones Generales	
Conclusiones Generales.....	125
Apéndice I.....	1257
Apéndice II.....	131

Capítulo 1

Introducción

1.1. Apicultura y su historia

La palabra apicultura proviene del latín *Apis* (abeja) y *Cultura* (cultivo), es decir, la ciencia que se dedica al cultivo o cría de las abejas. La Real Academia Española define a la apicultura como el “*Arte de criar abejas para aprovechar sus productos*” [1]. Una definición más completa, define a la apicultura como “*la ciencia aplicada que estudia a las abejas melíferas y mediante el uso de la tecnología se obtienen beneficios económicos*” [2].

La existencia de la abeja melífera data de tiempos anteriores a la existencia del hombre y las primeras evidencias de contacto entre ambos llegan a través de pinturas rupestres. En las cercanías de Toghwana Dam, en Matopo Hills, Zimbabwe, puede encontrarse una pintura rupestre, que data del período paleolítico, aproximadamente 30.000 a 10.000 a.C. (Figura 1.1 a). Otro ejemplo, es una pintura correspondiente al período mesolítico (7.000 a.C.) situada en una caverna, cerca de la ciudad de Valencia, España (Figura 1.1 b).

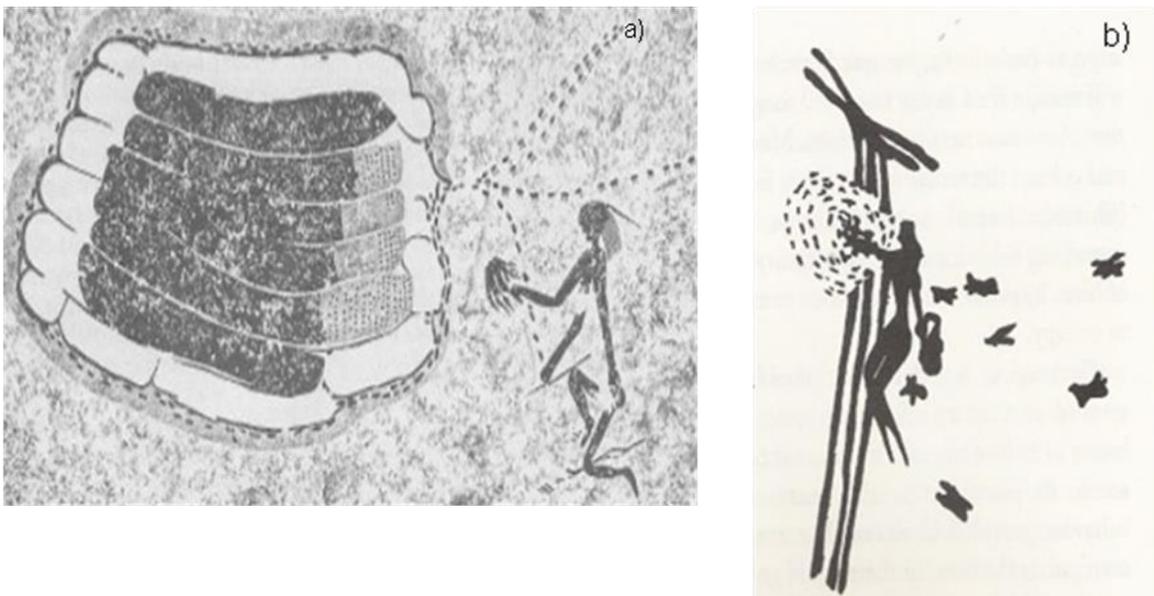


Figura 1.1. Pinturas rupestres correspondientes a los períodos: a) Paleolítico b) Mesolítico.

Las distintas civilizaciones de la historia utilizaron diferentes materiales y diseños para alojar a las colonias de abejas. Los egipcios utilizaban recintos

cilíndricos hechos de barro (3.000 a 2.000 a.C.) y las culturas aborígenes americanas, empleaban la arcilla como material para instalar enjambres.

La apicultura propiamente dicha, comenzó cuando el hombre aprendió a proteger, cuidar y controlar las colonias de abejas que encontraba, por ejemplo, en árboles. A partir del siglo XVI, el hombre comienza a preocuparse por la producción de miel, el cuidado de la colmena y el estudio biológico de las abejas. En el año 1851, Langstroth revolucionó la apicultura, diseñando una colmena con techo desmontable y cuadros móviles, dispositivos fundamentales en la apicultura moderna [3]. Con el creciente aumento en la producción apícola, llega al continente americano, originaria de Europa, la especie melífera de abejas "*Apis mellífera* L.", que asumió el rol prioritario en la apicultura, merced a su poca agresividad y gran capacidad de producción melífera. Dentro de la colonia de abejas del género *Apis*, existen tres tipos, las cuales llevan a cabo distintas tareas en la colmena (Figura 1.2):

- La reina: es la madre de todas las abejas. Su tamaño es mayor al de una abeja obrera y es más larga que un zángano. Su función radica en poner huevos. Nace de una celda de cría, "celda real" y se alimenta de "jalea real".
- Zángano: los zánganos nacen de huevos sin fecundar, son de mayor tamaño que las abejas obreras y no poseen aguijón. Su función es la de fecundar a la reina.
- Obreras: las abejas obreras son las más numerosas de la colmena, variando su población de acuerdo a la época del año. En época de cosecha de miel, se pueden albergar alrededor de 80.000 abejas, reduciéndose este número a la mitad en otoño-invierno.



Figura 1.2. Fotografía de la abeja del género *Apis*: a) Obrera b) Reina c) Zángano.

1.2. Productos Apícolas

Los principales productos apícolas, según el Código Alimentario Argentino [4 - 7] son:

- **Miel:** es el producto dulce elaborado por las abejas obreras a partir del néctar de las flores que las mismas recogen y almacenan en panales, donde madura hasta completar su formación.
- **Polen:** es el elemento masculino de las flores, recogido por las abejas obreras depositado en la colmena y aglutinado en granos por sustancias elaboradas por las mismas abejas.
- **Jalea real:** es el alimento de la larva de la abeja reina hasta el tercer o cuarto día de vida y está constituido por la secreción de las glándulas de la cabeza de abejas jóvenes (5 - 15 días de vida).

- **Propóleos:** es una sustancia de consistencia viscosa, compuesto por resinas, ceras, aceites esenciales y polen, con olor y sabor característico, que cumple diferentes funciones dentro de la colmena.

Entre otros productos de la colmena, se pueden mencionar:

- **Cera de abeja:** es un producto segregado por las glándulas ceríferas de las abejas, de composición muy compleja, que solidifica en la colmena. Se lo utiliza como ingrediente para ungüentos, velas y jabones, y como agente impermeabilizante para la madera y el cuero.
- **Apitoxina:** es el veneno de la abeja, incoloro y soluble en agua. En la actualidad se estudian sus propiedades medicinales.

1.3. Rol de la apicultura en Argentina

La apicultura y sus productos ocupan un rol importante en la economía de Argentina, siendo la miel y la cera los principales productos exportados. El aporte económico de la exportación de propóleos, depende de las necesidades de otros países y de la producción interna. En el año 2012 la exportación de propóleos disminuyó notablemente y en los años 2013 y 2014 no se registraron exportaciones de este producto. Debido a una merma en la obtención de divisas correspondientes a los productos obtenidos de la colmena, se propulsó el lanzamiento del programa “Plan Estratégico Argentina 2017” el cual pretende aumentar rápidamente los beneficios sectoriales tanto en lo productivo, como en lo comercial que la apicultura brinda. El objetivo de este Plan es transformar a la Argentina en el líder mundial en el mercado de productos de la colmena altamente valorados. Para ello, es de vital importancia el estudio y la caracterización de cada producto proveniente de la actividad apícola.

Las abejas y sus productos son afectados por diversos contaminantes, como elementos radiactivos, contaminantes orgánicos (pesticidas, insecticidas), metales pesados, etc. [8 - 10]. Algunos de los contaminantes orgánicos estudiados en las abejas y sus productos, son compuestos organofosforados, piretroides, triazoles [11]. En diversos trabajos se han utilizado los productos derivados de la colmena como indicadores de la presencia de metales pesados. Lambert y col. determinaron la concentración de plomo en abejas, miel y polen recolectados en 18 apiarios distintos. La mayor cantidad de este metal se encuentra presente en las abejas y el polen, presentando la miel una cantidad mucho menor [12]. Perugini y col., determinaron mercurio, cadmio, cromo y plomo en apiarios del centro de Italia, utilizando las abejas como indicadoras [13]. Algunos productos apícolas han sido empleados como (bio)indicadores de la concentración de hidrocarburos policíclicos aromáticos, encontrándose que la miel es el producto menos afectado por estos contaminantes, siendo las abejas y el polen los más afectados [14].

1.5. El propóleo

1.5.1. Definición

En el Artículo 1308 bis del Código Alimentario Argentino, se define al propóleo *“como el producto compuesto de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, ceras, aceites esenciales y polen, de consistencia viscosa, elaborado por las abejas (Apis mellifera) a partir de ciertas especies vegetales, que son transportadas al interior de la colmena y modificadas parcialmente con sus secreciones salivares”* [7].

La composición de los propóleos varía dependiendo de las especies vegetales de origen y de la función de los propóleos dentro de la colmena. La Figura 1.4 muestra una imagen de propóleos procesado recolectado durante el transcurso de esta Tesis Doctoral.



Figura 1.4. Fotografía de una muestra de propóleos.

1.5.2. Producción

Las abejas pecoreadoras mediante un proceso bioselector, detectan a través de sus antenas la resina en la fuente vegetal. Seguidamente, valiéndose de sus mandíbulas, de la secreción de las glándulas salivares-mandibulares (ácido 10-hidrodecenoico) y el primer par de patas, la ablandan, trituran y transportan a las cestillas o corbículas. Las abejas realizan las operaciones de recolección de resinas en general en días calurosos, con temperaturas superiores a 20° C, temperatura a la cual la resina se encuentra maleable.

La capacidad de producción de propóleos varía en función de las necesidades de la colmena y de factores externos. Por ejemplo, una colmena carente de reservas alimenticias, priorizará la recolección de néctar y no de resinas. En cuanto a las variables externas, dependerá de la disponibilidad de fuentes de resinas cercanas, que está relacionado también con la época del año. La raza de la abeja, también influye en la cantidad de propóleos producido por la colmena ya que hay razas que tienen mayor tendencia a la producción de propóleos que otras. Se puede estimar, que en Argentina, se puede cosechar

un promedio que varía entre 150 y 300 gramos de propóleos por colmena por año [15].

1.5.3. Función dentro de la colmena

El propóleos cumple diversas funciones dentro de la colmena. Una de ellas, es de tipo estructural, es decir, cubrir grietas y orificios, reparar las paredes, recubrir la entrada de la piquera, fijar los cuadros, etc. También es usado como una sustancia embalsamante para cubrir los pequeños animales invasores, que las abejas han eliminado y no pueden transportarlos fuera de la misma. Esta sustancia recubre la colmena protegiéndola de bacterias y hongos [16].

1.5.4. Composición y propiedades

La composición del propóleos difiere de las resinas vegetales, debido a la participación de la abeja, pudiendo considerarse por lo tanto, un producto de origen mixto, vegetal y/o animal, de acuerdo de la legislación vigente en cada país [17]. El propóleos está compuesto en líneas generales por un 45 % de resinas (dentro de las cuales se encuentran mayoritariamente los compuestos activos), 30 % de ceras, 5 % de polen, 10% de ácidos aromáticos y sus correspondientes esteres y un 10 % de otros compuestos [18 - 21]. Dentro del porcentaje correspondiente a las resinas, se pueden identificar una gran cantidad de compuestos bioactivos, como polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus esteres isoflavonoides, terpenos, chalconas) [22, 23] y aminoácidos [24 - 27]. Como consecuencia de su variada composición, el propóleos posee propiedades beneficiosas, no solo para la colmena sino también para el hombre. Estas propiedades se conocieron en el año 1950 cuando en la Unión de Repúblicas Socialistas Soviéticas (URSS) y países de Europa del Este, emplearon el propóleos para tratamientos en afecciones de la salud [28]. Entre las propiedades beneficiosas, se puede resaltar su poder antioxidante [29 - 34] y los constituyentes responsables de esta actividad son principalmente los flavonoides. Se han realizado estudios que identifican alrededor de unos 2000 flavonoides diferentes en muestras de propóleos [35].

La capacidad antibacteriana que presentan frente a diversos microorganismos, es otra de las propiedades de este producto de la colmena. Esta propiedad es debida a la presencia de compuestos fenólicos, especialmente los flavonoides, ácidos fenólicos y sus esteres [36 - 38] y está estrechamente relacionada con su origen geográfico [39 - 45]. Además de las propiedades descritas anteriormente, el propóleo presenta capacidad antiviral, antiséptica, antimicótica, astringente, espasmolítico, antiinflamatorio, etc. [46 - 48].

Se puede destacar también, que el propóleo es una fuente de macro y micro elementos esenciales para el buen funcionamiento del cuerpo humano, y que participan y regulan diversas reacciones biológicas [49, 50]. Los elementos que se encuentran generalmente en mayor proporción son: Ca, Al, Mg, K, Fe, Na, Zn y Cu [51, 52].

1.5.5. El propóleo como bioindicador

El propóleo puede estar contaminado, al igual que el resto de los productos apícolas, debido a su exposición al medio ambiente. Existen trabajos, donde se determinaron diversos tipos de agentes contaminantes en el propóleo tales como tetraciclinas [53], hidrocarburos policíclicos aromáticos [54, 55], pesticidas [56, 57], etc. Por otro lado, la determinación de metales pesados es de interés, por su alta toxicidad y efectos nocivos para la salud.

1.5.6. Contenido de metales en el propóleo

Actualmente, se conocen pocos trabajos donde se determina la cantidad de metales esenciales y tóxicos presentes en los propóleos. Serra Bonvehí y col. cuantificaron la presencia de elementos esenciales y tóxicos, en veinticinco muestras de propóleos de España. La técnica utilizada fue Espectroscopia de Emisión Atómica con acoplamiento de plasma inductivo (EEA-API) para determinar veintitrés macro y micro elementos y un analizador de mercurio para su cuantificación [52]. Por otra parte, Korn y col. determinaron Ba, Ca, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, y Zn en propóleos de Brasil empleando

Espectroscopia de Emisión Atómica con Acoplamiento de Plasma Inductivo (EEA-API) [51]. Gong y col, utilizaron la misma técnica (EEA-API) para determinar quince elementos (Ca, Al, Mg, K, Fe, Na, Zn, Mn, Sr, Cu, Cr, Ni, As, Cd y Pb) en treinta muestras de propóleos de China y una de Estados Unidos [49].

En cuanto a la determinación de metales en propóleos argentinos, Sales y col, comparan la influencia de los distintos métodos de cosechas de propóleos en la concentración final de plomo. Para su determinación emplearon Espectroscopia de Emisión Atómica con horno electrotérmico y la Espectrometría de Absorción Molecular UV-Vis. Los resultados obtenidos demuestran que el contenido de plomo es mayor, empleando la metodología de cosecha de raspado [58]. Por otro lado, se empleó la técnica de Análisis por Activación de Neutrón (AAN) para determinar catorce elementos (As, Br, Ce, Co, Cr, Eu, Fe, La, Rb, Sb, Sc, Sm, Th, Zn) en noventa y seis muestras de propóleos [50].

En los últimos años ha aumentado notablemente el empleo de propóleos bruto y extracto de propóleos como insumos en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética. Surge de esta manera, la necesidad de implementar nuevos métodos analíticos que permitan evaluar la composición de metales en estos productos.

1.6. Referencias

- [1] Real Academia Española. *Diccionario de la lengua española*, (2001).
- [2] S. Guzzetti, A. Santi, *Apicultura para principiantes*, 1 ed. Argentina: Ed. Continente, Capítulo 1.
- [3] D. Cramp, *A Practical Manual of Beekeeping*, 1th ed. United Kingdom: Spring Hill, chapter 4.
- [4] Código Alimentario Argentino, artículo 782 - (Res 2256, 16.12.85).
- [5] Código Alimentario Argentino, artículo 785 - (Res 1550, 12.12.90).
- [6] Código Alimentario Argentino, artículo 784 - (Res 3363, 30.10.79).
- [7] Código Alimentario Argentino, artículo 1308 bis – (Res 357/2008).
- [8] S. Bogdanov, *Apidologie*, 37 (2006) 1.
- [9] C. Porrini, A. G. Sabatini, S. Girotti, S. Ghini, P. Medrzycki, F. Grillenzoni, L. Bartolotti, E. Gattavecchia, G. Celli, *Apiacta*, 38 (2003) 63.
- [10] A. B. Bénéteau, A. Benneveau, F. Gélet, H. Delatte, N. Becker, J.L. Brunet, B. Reynaud, L.P. Belzunces, *Environment International*, 60 (2013) 31.
- [11] S. Ruschioni, P. Riolo, R. L. Minuz, M. Sunta, M. Cannella, C. Porrini, N. Isidoro, *Biological Trace Element Research*, DOI 10.1007/s12011-013-9732-6.
- [12] O. Lambert, M. Piroux, S. Puyo, C. Thorin, M. Larhantec, F. Delbac, H. Pouliquen, *Environmental Pollution*, 170 (2012) 254.
- [13] M. Perugini, M. Manera, L. Grotta, M. Abete, R. Tarasco, M. Amorena, *Biological Trace Element Research*, 140 (2011) 170.
- [14] O. Lambert, B. Veyrand, S. Durand, P. Marchand, B. Bizec, M. Piroux, S. Puyo, C. Thorin, F. Delbac, H. Pouliquen, *Chemosphere*, 86 (2012) 98.
- [15] E. Bedascarrasbure, L. Maldonado, W. Fierro Morales, A. Alvarez, *Propóleos*, 1th ed. Argentina: MAGNA, 2006 Capítulo I - III.
- [16] E. L. Ghisalberti, *Bee World* 60, (1978) 59.
- [17]] V. Bankova, *Journal of Ethnopharmacology*, 100 (2005) 114.
- [18] G. Negri, M. C. Marcucci, A. Salatino, M. L. F. Salatino, *Apidologie*, 29 (1998) 305.
- [19] F. Kheiri, R.E. Sabzi, E. Jannatdoust, E. Shojaeefar, H. Sedghi, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 (2011) 4457.

- [20] A. M. Gómez-Caravaca, M. Gómez-Romero, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41 (2006) 1220.
- [21] P. G. Pietta, C. Gardana, A. M. Pietta, *Fitoterapia*, 73 Suppl.1 (2002) S7 – S20.
- [22] T. Zhang, R. Omar, W. Siheri, S. Al Mutairi, C. Clements, J. Fearnley, R. Edrada-Ebel, D. Watson, *Talanta*, 120 (2014) 181.
- [23] B. López, E. Schmidt, M. N. Eberlin, Al. C. H. F. Sawaya, *Food Chemistry*, 146 (2014) 174.
- [24] L. Xu, S. Yan, C. Cai, *Food Chemistry*, 141 (2013) 4132.
- [25] F. Pellati, F. Prencipe, S. Benvenuti, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 84 (2013) 103.
- [26] V. A. Isidorov, L. Szczepaniak, S. Bakier, *Food Chemistry*, 142 (2014) 101.
- [27] P. Walker, E. Crane, *Apidologie*, 4 (1987) 327.
- [28] T. Matsuno, C. Chen, P. Banet, *Medical Science Research*, 25 (1997) 583.
- [29] M. Jug, M. Z. Končić, I. Kosalec, *LWT - Food Science and Technology*, 57 (2014) 530.
- [30] J. F. Campos, U. P. Santos, L. F. B. Macorini, A. M. M. F. Melo, J. B. P. Balestieri, E. J. P. Gamero, C. A. L. Cardoso, K. P. Souza, E. L. Santos, *Food and Chemical Toxicology*, 65 (2014) 374.
- [31] N. I. Potkonjak, S. Veselinović, M. M. Novaković, S. Ž. Gorjanović, L. L. Pezo, D. Ž. Sužnjević, *Food and Chemical Toxicology*, 50 (2012) 3614.
- [32] C. O. S. Frozza, C. S. C. Garcia, G. Gambato, M. D. O. Souza, M. Salvador, S. Moura, F. F. Padilha, F. K. Seixas, T. Collares, S. Borsuk, O. A. Dellagostin, J. A. P. Henriques, M. Roesch-Ely, *Food and Chemical Toxicology*, 52 (2013) 137.
- [33] A. A. Lopes, T. S. Ferreira, R. T. Nesi, M. Lanzetti, K. M. P. Pires, A. M. Silva, R. M. Borges, A. J. R. Silva, S. S. Valença, L. C. Porto, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21 (2013) 7570.
- [34] H. Y. Chang, Y. B. Lee, H. A. Bae, J. Y. Huh, S. H. Nam, H. S. Sohn, H. J. Lee, S. B. Lee, *Food Chemistry*, 122 (2010) 233.
- [35] E. Grotewold, *The Science of Flavonoids*, 1th ed. E.U.A: Springer, Chapter 1 and chapter 8.

-
- [36] S. Sharaf, A. Higazy, A. Hebeish, *International Journal of Biological Macromolecules*, 59 (2013) 408.
- [37] F. A. Santos, E. M. A. Bastos, M. Uzeda, M. A. R. Carvalho, L. M. Farias, E. S. A. Moreira, F. C. Braga, *Journal of Ethnopharmacology*, 80 (2002) 1.
- [38] M. I. N. Moreno, M. I. Isla, N. G. Cudmani, M. A. Vattuone, A. R. Sampietro, *Journal of Ethnopharmacology*, 68 (1999) 97.
- [39] A. Kujumgiev, I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov, S. Popov, *Journal of Ethnopharmacology*, 64 (1999) 235.
- [40] Y. Onlen, C. Tamer, H. Oksuz, N. Duran, M. Enes Altug, S. Yakan, *Microbiological Research*, 162 (2007) 62.
- [41] J. M. Sforcin, A. Fernandes, C. A. M. Lopes, V. Bankova, S. R. C. Funari, *Journal of Ethnopharmacology*, 73 (2000) 243.
- [42] E. Basim, H. Basim, M. Özcan, *Journal of Food Engineering*, 77 (2006) 992.
- [43] L. L. Chaillou, M. A. Nazareno, *LWT - Food Science and Technology*, 42 (2009) 1422.
- [44] M. Popova, S. Silici, O. Kaftanoglu, V. Bankova, *Phytomedicine*, 12 (2005) 221.
- [45] R. M. Ordóñez, I. C. Zampini, M. I. Nieva Moreno, M. I. Isla, *Microbiological Research*, 166 (2011) 578.
- [46] C. Gardana, M. Scaglianti, P. Pietta, P. Simonetti, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45 (2007) 390.
- [47] M. Amoros, F. Sauvager, L. Girre, M. Cormier, *Apidologie* 23 (1992) 231.
- [48] G. A. Burdock, *Food and Chemical Toxicology*, 36 (1998) 347.
- [49] S. Gong, L. Luo, W. Gong, Y. Gao, M. Xie, *Food Chemistry*, 134 (2012) 583.
- [50] M. A. Cantarelli, J. M. Camiña, E. M. Pettenati, E. J. Marchevsky, R. G. Pellerano, *LWT - Food Science and Technology*, 44 (2011) 256.
- [51] M. G. A. Korn, M. A. B. Guida, J. T. P. Barbosa, E. A. Torres, A. P. Fernandes, J. C. C. Santos, K. d. G. F. Dantas, J. A. Nóbrega, *Food Analytical Methods*, 6 (2013) 872.
- [52] J. Serra Bonvehí, F. J. Orantes Bermejo, *Environmental Monitoring and Assessment*, 185 (2013) 6035.

-
- [53] J. Zhou, X. Xue, Y. Li, J. Zhang, F. Chen, L.Wu, L. Chen, J. Zhao, *Food Chemistry*, 115 (2009) 1074.
- [54] S. Dobrinas, S. Birghila, V. Coatu, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (2008) 71.
- [55] S. Moret, G. Purcaro, L. S. Conte, *Food Chemistry*, 122 (2010) 333.
- [56] L. Pareja, M. Colazzo, A. Pérez-Parada, S. Niell, L.Carrasco-Letelier, N. Besil, M. V. Cesio, H. Heinzen, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8 (2011) 3844.
- [57] A. Pérez-Parada, M. Colazzo, N. Besil, L. Geis-Asteggiante, F. Rey, H. Heinzen, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 5852.
- [58] A. Sales, A. Alvarez, M. Rodriguez Areal, L. Maldonado, P. Marchisio, M. Rodríguez, E. Bedascarrasbure, *Journal of Hazardous Materials A*, 137 (2006) 1352.

Objetivo General

El objetivo de esta Tesis Doctoral se basa en la implementación de nuevos métodos analíticos, que permitan evaluar la composición de metales como parámetro de calidad desde el punto de vista nutricional e higiénico-sanitaria, en muestras de propóleos bruto y extractos etanólicos de propóleos, para ser utilizados como ingredientes en diferentes productos farmacéuticos, cosméticos y/o alimenticios. Estos métodos deben ser simples, rápidos, de bajo costo y amigables con el medio ambiente. Para ello, se llevaron a cabo los siguientes trabajos:

- ✓ Cosecha y caracterización de muestras de propóleos bruto.
- ✓ Empleo de Voltamperometría de Redisolución Anódica con Onda Cuadrada empleando electrodos de bismuto para la:
 - Determinación de plomo.
 - Determinación simultánea de zinc, cadmio, plomo y cobre.
- ✓ Desarrollo de un electrodo de trabajo compuesto para ser aplicado en Técnicas Voltamperométricas.
- ✓ Determinación de zinc en extractos etanólicos de propóleos mediante Espectroscopia de Fluorescencia Molecular.

La concreción de estos objetivos repercutirá favorablemente en la producción interna y en una exportación sostenida, mejorando la actividad apícola de la región.

Capítulo 2

**Cosecha y caracterización
de muestras de propóleos**

2.1. Objetivo

El objetivo principal de éste capítulo fue adquirir práctica en la toma de muestra de propóleos bruto y su correspondiente caracterización. Para ello:

- Se trabajó primeramente con un pequeño grupo de muestras cedidas por productores apícolas (grupo A). Posteriormente se procedió a su caracterización.
- Se trabajó conjuntamente con INTA Bordenave y la Cooperativa de Trabajo Apícola Pampero Ltda. para la obtención de muestras de propóleos bruto de apiarios del sudoeste de la provincia de Buenos Aires (grupo B). Las mismas fueron cosechadas por el método de malla. Asimismo, se realizó un relevamiento de esos apiarios a fin de conocer las zonas más productivas y los productos de control fitosanitarios que se emplean.

2.2. Introducción

El apicultor ha desarrollado diversos métodos para cosechar el propóleos, basado en la tendencia que posee la abeja de rellenar huecos o fijar componentes de la colmena, como por ejemplo los techos. En Argentina se emplean los siguientes:

- **Método Artesanal o de Raspado:** este método consiste en pasar por sobre la colmena una pinza o espátula (de acero inoxidable) en los lugares donde se acumula propóleos. Esta forma de recolectar el producto mediante el raspado, posee una serie de inconvenientes tales como: consumo de tiempo por parte del apicultor, mayor probabilidad de contaminar el producto final debido a la presencia de cuerpos extraños o la ruptura de colmena, selección de manera cuidadosa del lugar de la colmena a raspar, etc. La recolección del propóleos se debe realizar con las manos y espátulas libres de miel, cera, tierra, o cualquier otro agente externo que pueda contaminar el producto final. Otra consideración en este tipo de muestreo, es la de no exponer el producto a la incidencia de los rayos solares, debido a que pueden degradar los principales

compuestos activos. En la Figura 2.1 se ilustra la metodología desarrollada en este ítem.



Figura 2.1. Recolección de propóleos empleando la metodología de raspado y el producto recolectado.

- **Método de Mallas:** este método consiste en colocar una malla matrizada de tipo mosquitero, entre el techo y el alza, siempre por encima de los cuadros de cría (Figura 2.2). Se pueden utilizar diferentes tipos de mallas: fibra de vidrio, metálicas y polietileno. Las de fibra de vidrio tienden a romperse con facilidad. A diferencia de las mallas metálicas, las de polietileno son las más adecuadas ya que no contaminan el producto. Los espacios disponibles de las mallas son cubiertos por la abeja con propóleos. Una vez depositado el propóleos en los espacios que quedan entre los cuadros de la colmena (ver Figura 2.2), es conveniente desplazar la malla para generar nuevos espacios libres donde las

abejas propolicen. Posteriormente, se procede a retirar la malla de la colmena y para extraer el propóleo de la misma, se debe congelar entre $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. De esta forma, se logra la rigidez del propóleo, facilitando su separación de la malla. Esta metodología evita el contacto directo del mismo con materiales contaminantes como las espátulas, etc.



Figura 2.2. Recolección de propóleos empleando el método de malla (tejido mosquitero) y el producto recolectado.

- **Colector de propóleos inteligente (CPI):** esta metodología se basa en aumentar el instinto propolizador de las abejas a través de la apertura lateral de la colmena, para generar huecos regulares con el fin de incentivar la producción del propóleo por parte de la abeja. Con este dispositivo (Figura 2.3) se pueden obtener grandes cantidades de propóleos (hasta 600 gramos). La desventaja que posee, es que no puede ser utilizado en zonas frías, ya que las bajas temperaturas provocan la muerte de la colmena.



Figura 2.3. Fotografía de un colector de propóleos inteligente.

2.3. Materiales y métodos

2.3.1. Toma de muestra

En Argentina, la época de cosecha de propóleos varía entre los meses de septiembre a marzo. Las muestras utilizadas en esta Tesis se recolectaron de manera diferente dando lugar a dos grupos:

Grupo A

Este grupo incluye muestras de nueve apiarios de la Provincia de Buenos Aires, Argentina, provistas por productores apícolas. Las mismas se

recolectaron utilizando como métodos de cosecha, el de raspado y malla (tipo mosquitero de polietileno). La procedencia de las muestras y el método utilizado para su cosecha se muestran en la Tabla 2.1. En la Figura 2.4 se observa la ubicación geográfica de los nueve apiarios. La muestra de propóleos N° 2 (Buenos Aires, Punta Indio) es una muestra comercial adquirida en un apiario denominado “ecológico”, ubicado en una zona alejada del tránsito vehicular y considerada por el productor como libre de contaminantes. Las muestras restantes fueron cedidas por productores apícolas de la zona.

Tabla 2.1. Procedencia y método de cosecha de diferentes muestras

Número de muestra	Procedencia	Método de cosecha
1	Bahía Blanca	Malla
2	Buenos Aires (Pta. Indio)	Malla
3	Tornquist	Raspado
4	Hilario Ascasubi	Malla
5	Gral. Daniel Cerri	Raspado
6	Pehuen-Có	Raspado
7	Médanos	Malla
8	Pedro Luro	Raspado
9	Caruhé	Raspado



Figura 2.4. Mapa con la ubicación de los apiarios donde fueron cosechadas las muestras

Grupo B

Se realizó un muestreo de propóleos bruto en once partidos del sudoeste de la provincia de Buenos Aires (Figura 2.5), empleando el método de malla. Los partidos seleccionados fueron: Adolfo Alsina, Bahía Blanca, Coronel Dorrego, Coronel Suárez, Coronel Rosales, Guaminí, Púan, Coronel Pringles, Saavedra, Tornquist y Villarino.



Figura 2.5. Mapa los partidos seleccionados para realizar la toma de muestra

En cada uno de estos partidos se seleccionaron cinco apiarios a criterio del apicultor. Los productores apícolas recibieron un “*kit de muestreo*” que contenía:

- 5 mallas mosquiteras para cosechar propóleos
- 5 bolsas de polietileno transparente
- Una bolsa de polietileno de color negro (para evitar que la luz incida directamente sobre las muestras) para colocar las 5 mallas
- Una planilla para completar con los datos del apiario

Los “*kits de muestreo*” fueron preparados en el laboratorio. Las mallas mosquiteras fueron cortadas a medida según las dimensiones de la colmena, acondicionadas y numeradas. Esto permitió controlar la cantidad de propóleos

cosechado por malla. La planilla se confeccionó de manera tal de obtener la mayor información posible de la muestra recolectada para su posterior análisis. En la Figura 2.6 se muestra un ejemplo de la planilla distribuida.

FICHA PARA EL ENVIO DE MUESTRAS DE PROPOLEOS

1. Datos del productor **Kit N°:**

Nombre y Apellidos del apicultor:	
Dirección:	
Localidad:	
Código postal:	
Teléfono:	
Fax:	
Email:	

2. Cosecha

Fecha de recolección:	
Cantidad de colmenas cosechadas:	
Total cosechado:	
Zonas de la colmena desde donde extrajo:	
Fecha en que realizó la anterior cosecha:	

3. Método de recolección utilizado (marque con una x)

<input type="checkbox"/> Raspado	<input type="checkbox"/> Malla
----------------------------------	--------------------------------

En caso de haber utilizado mallas, por favor indique:

Tipo de malla:	
Origen:	
Costo aproximado:	

4. Datos del apiario

Ubicación del apiario:	
Cantidad total de colmenas:	
Productos utilizados para control sanitario:	
Flora predominante en la zona:	
Fitosanitarios utilizados en los alrededores:	
Distancia de los centro urbanos más próximos:	
Distancia de las rutas más cercanas:	
Tipo de tránsito:	<input type="checkbox"/> Liviano <input type="checkbox"/> Pesado

Figura 2.6. Planilla en los “kits de muestreo”

Se distribuyeron 5 “kits de muestreo” por partido, y teniendo en cuenta que se estudiaron once partidos, el total de mallas mosquiteras distribuidas en el sudoeste de la Provincia de Buenos Aires fue de 275.

2.3.2. Acondicionamiento de las muestras

Las muestras del Grupo A y B, se sometieron a un paso de limpieza, principalmente las cosechadas por el método de raspado. En esta etapa se procedió a extraer cuerpos extraños que no forman parte de la composición del propóleos, como restos de abejas, trocitos de madera, hojas, etc. Las muestras recolectadas por el método de mallas se mantuvieron a -20°C durante 24 h. De esta manera se puede retirar el propóleos de las mallas, ya que a esa temperatura se torna quebradizo y se facilita su extracción. En las Figuras 2.7 y 2.8 se observan muestras de propóleos de diferentes partidos, antes y después de retirarlo de las mallas. Los colores varían desde tonalidades gris oscuro, verdosas, amarillentas a rojizas.

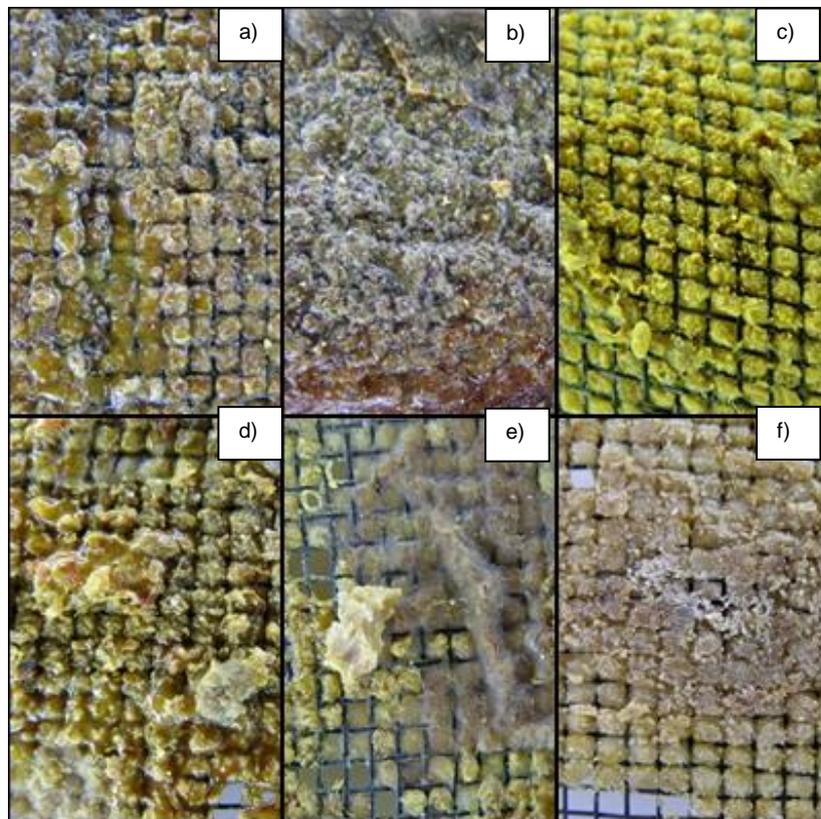


Figura 2.7. Fotografía de las mallas correspondientes a los partidos a) Bahía Blanca, b) Coronel Rosales, c) Coronel Suárez, d) Guaminí, e) Saavedra y f) Tornquist.

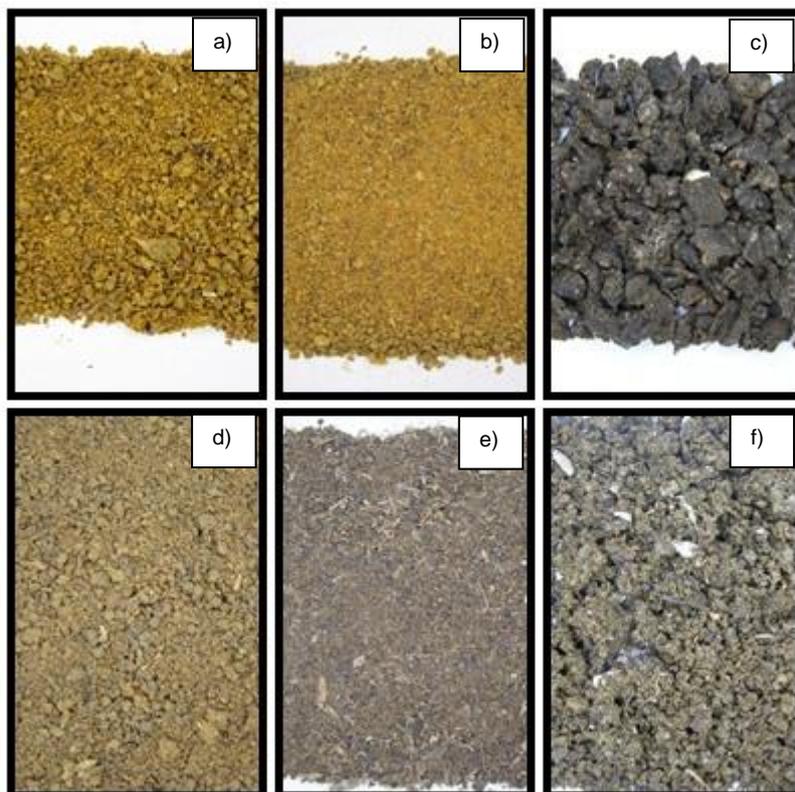


Figura 2.8. Fotografías correspondientes a propóleos de: a) Bahía Blanca, b) Buenos Aires, c) Tornquist, d) Gral. Daniel Cerri, e) Pehuen – Cό y f) Caruhé.

2.3.3. Caracterización de las muestras

Se realizó la caracterización de las muestras del Grupo A, que fueron recibidas en el laboratorio durante los meses de mayo-junio de 2010, a fin de verificar si cumplen los requisitos fisicoquímicos establecidos en el Código Alimentario Argentino [1]. Estos ensayos se realizaron de acuerdo a lo establecido por la Norma IRAM-INTA 15935-1:2008 [2].

Humedad

Para la determinación de la pérdida por calentamiento (humedad) se pesaron 4 gramos de propóleos y se colocan en estufa a $100\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta peso constante.

Cenizas

En la determinación de cenizas, se emplearon las muestras libres de humedad. Se calienta la muestra en mechero bajo campana hasta que se forma un residuo carbonoso. Posteriormente, se coloca en mufla a $550\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta peso constante. En la Figura 2.9 se ilustran algunos de las etapas para la determinación de cenizas.

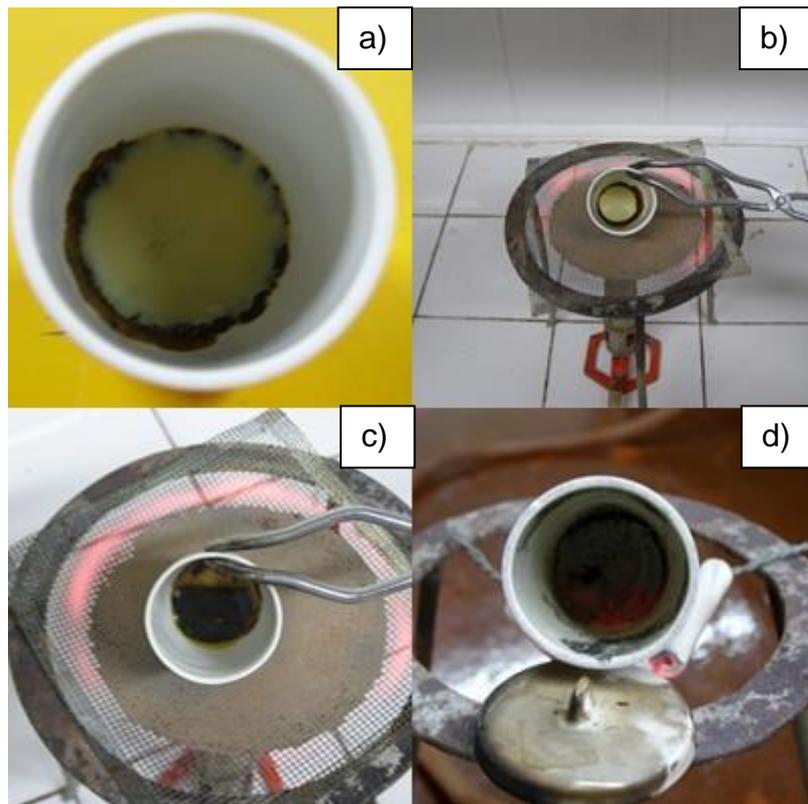


Figura 2.9. Determinación de cenizas

Sustancias extraíbles en n-hexano

Se pesaron 2 gramos de la muestra de propóleos bruto en un cartucho de celulosa que se coloca en el cuerpo del extractor del Soxhlet. La extracción de cera se realiza con n-hexano durante 6 horas. Finalmente se evapora el solvente y se pesa el contenido del balón. Los resultados se expresan en función de 100 gramos de propóleos.

Sustancias extraíbles en etanol

El cartucho utilizado en la determinación de ceras, se coloca en el cuerpo del extractor Soxhlet. Se emplea etanol como solvente y la extracción de resinas se realiza durante 6 horas. El remanente del cartucho se reserva para la posterior determinación de impurezas mecánicas. Se evapora el solvente y se pesa el contenido del balón. Los resultados se expresan en función de 100 gramos de propóleos.

Índice de Oxidación

A una solución hidroalcohólica de propóleos, se la acidifica con ácido sulfúrico y se le adiciona permanganato de potasio, registrando el tiempo en segundos que tarda en decolorarse, indicando la actividad antioxidante de la muestra.

Compuestos fenólicos totales

Esta determinación se realiza mediante el método de Folin-Ciocalteu, empleando ácido gálico como patrón. Se registra la absorbancia a 765 nm. Se expresa el resultado como gramos de fenoles totales en 100 gramos de propóleos, expresado como su equivalente en ácido gálico.

Flavonoides totales

La determinación de flavonoides totales se realiza espectrofotométricamente a 425 nm empleando una solución patrón de quercetina. El contenido de flavonoides totales de propóleos bruto, se expresa como gramos en 100 gramos de propóleos, expresado en su equivalente de quercetina dihidratada.

Además, se determinaron los metales mayoritarios empleando la técnica de Espectrometría de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo (EEA-ICP) de cuatro de las muestras: Buenos Aires, Hilario Ascasubi, Tornquist y Bahía Blanca. Para ello se empleó un equipo Shimadzu 9000.

2.4. Resultados y discusión

Grupo A

Los resultados obtenidos de la caracterización fisicoquímica de las muestras del grupo A se muestran en las Tablas 2.2 y 2.3.

Tabla 2.2. Parámetros fisicoquímicos de muestras de la provincia de Buenos Aires.

Muestra	Humedad [% p/p]*	Impurezas mecánicas [% p/p]	Cenizas [% p/p]	Ceras [% p/p]	Resinas [% p/p]	Índice de oxidación [s]
1	2,8	4,5	2,1	28,0	64,2	1,9
2	2,6	4,2	0,9	26,4	66,0	1,1
3	3,7	21,8	10,3	61,4	11,6	3,3
4	2,4	3,5	1,3	29,1	64,4	0,7
5	4,7	12,4	2,8	51,4	35,5	0,5
6	4,1	26,2	11,2	34,8	39,3	1,3
7	5,4	6,2	1,9	26,6	66,1	1,0
8	4,2	9,1	3,7	66,4	20,7	2,0
9	2,3	13,7	5,6	33,7	51,5	1,4

* g/100g

Tabla 2.3. Contenido de resinas, fenoles y flavonoides.

Muestra	Flavonoides [% p/p]	Fenoles [% p/p]	Relación Fenoles/Resinas	Relación Flavonoides/Fenoles
1	4,2	40,0	0,6	0,1
2	2,7	31,3	0,5	0,1
3	0,4	2,40	0,2	0,2
4	2,4	24,3	0,4	0,1
5	1,4	11,1	0,3	0,1
6	1,0	12,1	0,3	0,1
7	2,5	26,2	0,4	0,1
8	0,4	3,48	0,2	0,1
9	2,4	17,6	0,3	0,1

De los datos presentados en las tablas 2.2 y 2.3 se puede concluir que el contenido de cenizas, impurezas mecánicas y sustancias extraíbles en n-hexano es mayor en los propóleos obtenidos por el método de raspado respecto al de mallas. Esto es coherente con lo expuesto en la bibliografía, ya que este tipo de método de cosecha, brinda un producto con mayor cantidad de impurezas. Además, algunas de las muestras analizadas (Tornquist (M3) y Pedro Luro (M8)) no cumplen con los requisitos fisicoquímicos establecidos en el Código Alimentario Argentino (por ejemplo, contenido de fenoles totales y flavonoides totales). Esto puede deberse a la escasez de especies vegetales capaces de generar resinas, en las cercanías del apiario.

En la Tabla 2.4 se muestran los resultados obtenidos del contenido de minerales presentes en las cuatro muestras analizadas. Los valores se encuentran expresados en mg / Kg de propóleos.

Tabla 2.4. Contenido de metales en cuatro muestras de propóleos.

Muestra	Cd [mg Kg ⁻¹]	Cr [mg Kg ⁻¹]	Cu [mg Kg ⁻¹]	Ni [mg Kg ⁻¹]	Pb [mg Kg ⁻¹]	Zn [mg Kg ⁻¹]
Hilario Ascasubi	< 0,031	0,45	2,19	0,55	2,94	15,06
Buenos Aires	< 0,031	0,47	2,87	0,39	1,89	35,31
Tornquist	< 0,031	1,06	3,56	0,92	9,94	60,44
Bahía Blanca	< 0,031	0,29	2,37	0,54	7,69	14,19

Grupo B

Del total de las 275 mallas distribuidas, solamente fueron recuperadas 87 en el mes de mayo de 2011. Esto se debió a que los productores no participaron activamente en el muestreo planteado. En estas muestras se realizó un relevamiento de cantidad de propóleos cosechado en la región del sudoeste de la provincia de Buenos Aires. En la Tabla 2.5 se muestra la cantidad de propóleos cosechado correspondiente a cada partido. Los partidos de Coronel Pringles, Coronel Dorrego, Villarino y Puan no fueron incluidos en la tabla ya que los productores no entregaron los “*kit de muestreo*”.

Tabla 2.5. Relevamiento de las mallas entregadas

Partido	N° de campos cosechados	N° de mallas entregadas	Neto de propóleos en el partido/g	Promedio de propóleos por malla	Kit de mallas	Neto de propóleos por kit de malla [g]	Promedio por malla de propóleos [g]
Adolfo Alsina	4	17	670,47	39,44	A1	403,96	80,792
					A2	102,59	34,20
					A3	53,13	13,28
					A4	110,79	22,15
					A5	nr	nr
Bahía Blanca	1	5	283,4	56,68	B1	nr	nr
					B2	nr	nr
					B3	nr	nr
					B4	nr	nr
					B5	283,4	56,68
Coronel Rosales	1	5	63,3	12,66	D1	nr	nr
					D2	nr	nr
					D3	63,3	12,66
					D4	nr	nr
					D5	nr	nr
Coronel Suárez	3	15	527,01	35,13	E1	357,22	71,44
					E2	147,51	29,502
					E3	222,28	44,46
					E4	nr	nr
					E5	nr	nr
					G1	404,2	80,84

Guamini	2	10	88,42	8,84	G2	37,88	7,58
					G3	nr	nr
					G4	nr	nr
					G5	nr	nr
Saavedra	3	15	405,9	27,06	I1	216,83	43,37
					I2	74,97	14,99
					I3	114,10	22,82
					I4	nr	nr
					I5	nr	nr
Tornquist	4	20	634,32	31,72	K1	175,71	35,14
					K2	nr	nr
					K3	164,92	41,23
					K4	241,32	48,26
					K5	52,37	13,09

nr: mallas no recibidas

La Figura 2.10, representa la cantidad promedio de propóleos cosechado por malla, en cada partido. Se puede evidenciar que el partido de mayor producción de propóleos por malla, fue el de Bahía Blanca, seguido por Adolfo Alsina. A su vez, el partido de menor producción, fue el de Guamini, seguido por Coronel Rosales. Esto puede deberse a distintos factores, como la flora local, las condiciones climatológicas de ese apiario en particular, el estado de la colmena (cantidad de abejas), etc.

Estos datos son los correspondientes al periodo de cosecha comprendido entre octubre de 2010 hasta mayo de 2011, pudiendo variar el promedio de cosecha de propóleos por malla, año a año, dependiendo de las condiciones climáticas, etc.

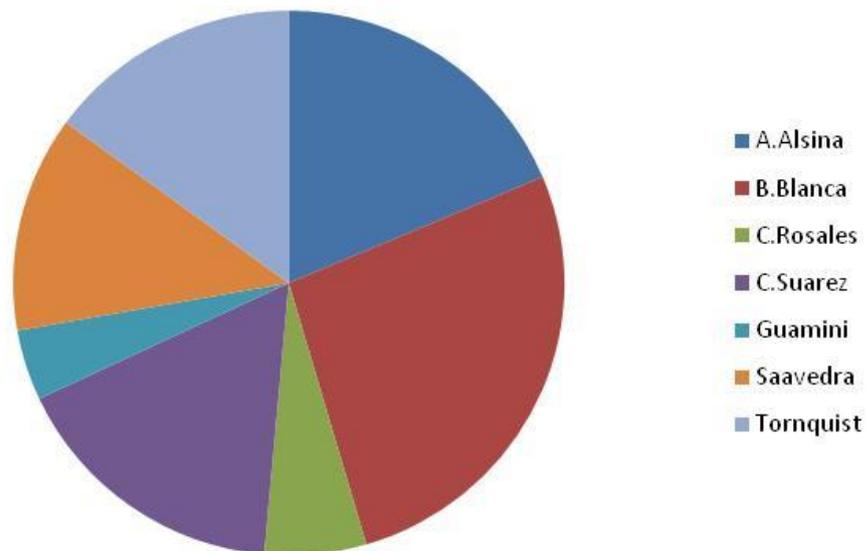


Figura 2.10. Gráfico representativo de la producción de propóleos por partido

Considerando los datos obtenidos de la planilla entregada oportunamente a los diferentes apiarios (Figura 2.3), se obtuvo información adicional que permite conocer las condiciones de obtención del propóleos en cada apiario:

- Los principales productos utilizados para el control sanitario fueron: flumetrina, amitraz, oxitetraciclina, ácido oxálico, empleados para el control de varroasis y loque americana.
- Los productos fitosanitarios utilizados para el control de malezas en los alrededores de los apiarios fueron: glifosato (N-fosfometilglicina), 2-4 D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), y metsulfuron (Metil-2[(((4-metoxi-6 metil-1,3,5 triazin-2-il) amino) carbonil) amino) sulfonil] benzoato).
- La flora en los diferentes partidos es variada, pudiéndose encontrar girasol, flor amarilla, acacia, alfalfa, eucaliptus, abrepuño, tamarisco, pino, cardo, álamo, chañar, flor morada, brusquilla, salix, olivo.

2.5. Conclusiones parciales

Esta primera etapa del trabajo de Tesis, permitió adquirir experiencia en el manejo adecuado del propóleos bruto y de los distintos métodos de cosecha. También se logró caracterizar las muestras obtenidas (grupo A), pudiendo concluir que solo dos (las correspondientes a los partidos de Tornquist y Pedro Luro) no cumplen los requisitos que deben presentar los propóleos bruto, según lo establecido por el Código Alimentario Argentino. Por otra parte, a partir de la muestras del grupo B, se realizó un relevamiento de la producción de propóleos en el sudoeste de la Provincia de Buenos Aires, del tipo de flora de la región y del empleo de productos fitosanitarios por parte de los productores.

El exhaustivo trabajo de toma de muestra realizado, permitió un acercamiento a los productores de la región del sudoeste de la Provincia de Buenos Aires. Esto posibilitó brindarles información acerca de las potenciales aplicaciones de este producto, desaprovechados hasta el momento por ellos. La participación con la Cooperativa de Trabajo Apícola Pampero Ltda. permitirá un mayor acercamiento con los productores, para transferir al medio los resultados obtenidos en esta Tesis.

2.6. Referencias

[1] Código Alimentario Argentino, Capítulo XVI, Correctivos y Coadyuvantes, artículo 1308 bis (2008).

[2] Norma IRAM-INTA 15935-1-PROPOLEOS BRUTO.

Capítulo 3

**Determinación de metales en
muestras de propóleos empleando
técnicas electroquímicas**

3.1. Objetivo

El objetivo general de este capítulo fue el empleo de métodos electroanalíticos que contemplen los principios de la Química Verde para la determinación de metales en muestras de propóleos de la Provincia de Buenos Aires. Para ello, se utilizó la técnica de Voltamperometría de Redisolución Anódica con Onda Cuadrada, empleando un electrodo de trabajo de bismuto en reemplazo del tradicional electrodo de mercurio. Para cumplir con los objetivos planteados se desarrollaron los siguientes trabajos:

Parte A

Determinación del contenido de plomo, empleando electrodos de bismuto y Voltamperometría de Redisolución Anódica de Onda Cuadrada.

Este trabajo se desarrolló en forma conjunta con el grupo de investigación de los Dres. Héctor Fernández y María Alicia Zón, del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Parte B

Determinación simultánea de zinc, cadmio, plomo y cobre empleando Voltamperometría de Redisolución Anódica de Onda Cuadrada y Técnicas quimiométricas (Artificial Neural Networks).

3.2. Introducción

3.2.1. Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas poseen un gran número de ventajas con respecto a otras técnicas, entre las cuales podemos mencionar: elevada sensibilidad,

selectividad para especies electroactivas, un amplio intervalo lineal de concentraciones, rapidez, bajo costo de la instrumentación y presentan la posibilidad de diseñar equipos de campo [1].

Dentro de las técnicas electroquímicas se pueden diferenciar dos grandes grupos: las potenciométricas y las potencioestáticas. En las técnicas potenciométricas, se realizan medidas de potencial, mientras que las técnicas potencioestáticas (potencial controlado) son las que realizan el estudio de la medida de transferencia de carga que ocurre en la interface electrodo-solución. Desde el punto de vista cuantitativo se puede obtener una respuesta de corriente relacionada con la concentración del analito en estudio. Existen diversas formas de generar el potencial necesario para que se produzca el proceso redox sobre la superficie del electrodo, lo que da origen a las distintas técnicas potencioestáticas, dentro de las cuales podemos nombrar: Cronoamperometría, Voltamperometría de Barrido lineal, Voltamperometría Cíclica y las técnicas de pulso (Pulso Normal, Pulso Diferencial y Onda Cuadrada).

Una de las técnicas electroquímicas más usadas es la voltamperometría cíclica ya que brinda información cualitativa y cuantitativa de la reacción electroquímica estudiada. Esta técnica provee rápida información de la termodinámica de la reacción redox, de su cinética de transferencia de carga, de reacciones químicas acopladas, de procesos de adsorción presentes, etc. Se aplica un potencial lineal de forma triangular como el que se muestra en la Figura 3.1.a. El gráfico de corriente en función del potencial obtenido (Figura 3.1.b) se conoce como voltamperograma cíclico. Se ve en la figura 3.1.b la respuesta de una cupla redox reversible a un solo ciclo de potencial aplicado. Inicialmente solo la especie oxidada está presente y luego de recorrer potenciales hasta llegar a la mitad del ciclo, toda la especie se redujo. Después se produce el barrido catódico, en el cual, la especie reducida se transforma nuevamente en la especie oxidada, generando de esta manera, el pico que se observa en la Figura 3.1.b.

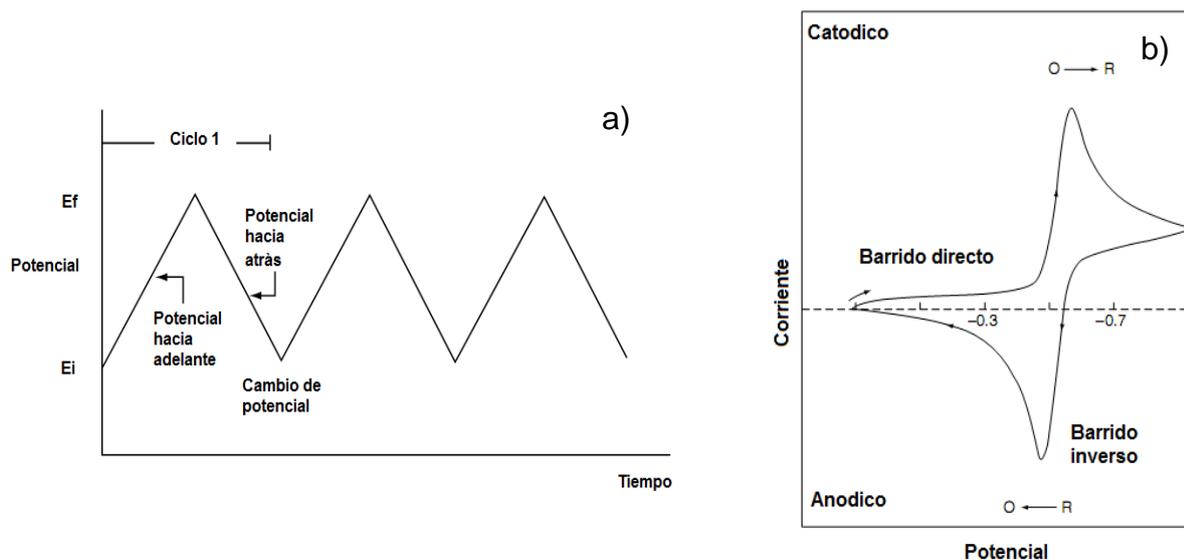


Figura 3.1. a) Esquema de la señal potencial-tiempo en voltamperometría cíclica. b) Voltamperograma cíclico típico.

Las técnicas de pulso fueron impulsadas por Barker y Jenkin [2] en el año 1950 y tuvieron un gran auge en la electroanalítica debido a los bajos límites de detección que se obtenían. Estas técnicas se basan en medir la corriente luego de aplicar un potencial durante un tiempo (cronoamperometría). Estas se pueden diferenciar dependiendo de cómo se determina la corriente además de la forma de aplicar el pulso. El hecho de poder registrar corriente en diferentes tiempos, permite minimizar el aporte de la corriente no faradaica a la señal electroquímica, con el consecuente aumento de la sensibilidad. De las técnicas de pulso, la voltamperometría de onda cuadrada, adquiere mayor relevancia que las demás (pulso normal y pulso diferencial), debido a su mayor rapidez y bajo límite de detección para sistemas reversibles.

3.2.2. Voltamperometría de onda cuadrada

Dentro de las técnicas electroquímicas, en esta Tesis se empleó para las determinaciones analíticas de metales en muestras de propóleos, la Voltamperometría de Onda Cuadrada (VOC). Esta técnica combina saltos de potencial en función del tiempo tipo escalera (señal escalonada), sobre un

escalonamiento de impulsos como se muestra en la Figura 3.2. El resultado de esta combinación es un voltograma donde se grafica diferencia de corriente en función del potencial aplicado.

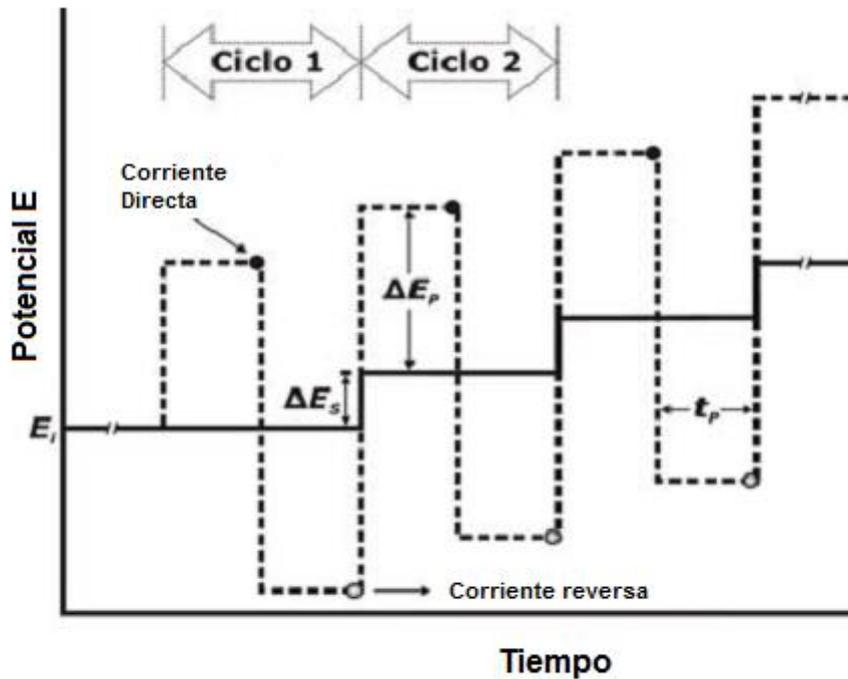


Figura 3.2. Esquema de pulso aplicado en la voltamperometría de onda cuadrada

El parámetro ΔE_p , caracteriza la amplitud del pulso, t_p es el tiempo durante el cual es aplicado el potencial y dado que el tiempo también puede ser expresado en frecuencia, se define $f = 1/2 t_p$. El experimento se inicia a un potencial E_i y al final de cada ciclo, se incrementa el potencial del ciclo en un ΔE_s . Consecuentemente la velocidad de barrido v queda definida como:

$$v = \Delta E_s f$$

En un sistema reversible, la función que determina la intensidad de corriente queda definida como:

$$i = [n F A D^{1/2} C^s / (\pi t_p)^{1/2}] \psi (\Delta E_s, E_{sw})$$

Donde i es la corriente medida en cada pulso, n el número de electrones transferidos, F la constante de Faraday, A el área del electrodo, D el coeficiente de difusión de la especie en estudio, C^s es la concentración de la especie en el seno de la solución, t_p el tiempo del pulso y ψ es la función adimensional de corriente que depende de los parámetros de la onda cuadrada [3]. De la ecuación anterior, se deduce que la corriente es directamente proporcional a $t_p^{-1/2}$ o $f^{1/2}$, por lo tanto aumentos en la frecuencia (velocidades de barrido más altas), proporcionarán señales analíticas mayores.

En un sistema reversible, la onda cuadrada, determina dos corrientes (corriente directa y reversa) y su diferencia define la corriente neta medida. En la Figura 3.3 se presentan los gráficos de corriente neta en función del potencial, para sistemas reversible e irreversible.

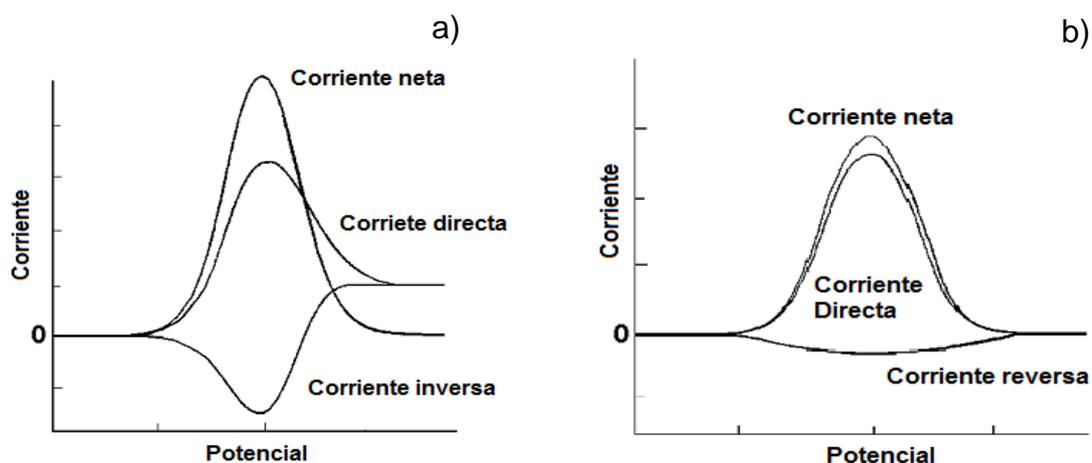


Figura 3.3. Corriente directa y reversa en voltamperometría de onda cuadrada para un sistema: a) reversible b) Irreversible

3.2.3. Voltamperometría de redisolución

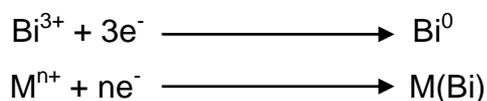
El empleo de las técnicas de redisolución es una opción muy interesante a ser explorada en la determinación metales. Estas técnicas constan de dos etapas. En la primera, se procede a la electrodeposición del analito, que se encuentra

en solución, sobre el electrodo. El potencial de deposición utilizado debe ser al menos 0,3 V menor al potencial de oxidación de la especie estudiada [1, 4 - 9]. En la segunda etapa o “etapa de medida” se procesa a la “redisolución” del analito, mediante el empleo de algunas de las técnicas electroanalíticas mencionadas. Existen diferentes variantes en este tipo de análisis dependiendo de la naturaleza de la deposición y de la etapa de medida. Teniendo en cuenta la naturaleza de la deposición, se pueden mencionar: Voltamperometría de redisolución anódica, Voltamperometría de redisolución adsorptiva, Voltamperometría de redisolución catódica, Voltamperometría de redisolución abrasiva. La etapa de medida se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas, ya sean de pulso o no. De todas estas técnicas en esta Tesis se empleó la redisolución anódica, con Voltamperometría de onda cuadrada. De esta manera se pueden obtener altas sensibilidades debido a que se logran factores de preconcentración que van del orden de los 100 a 1000 veces respecto de las técnicas que no emplean la redisolución, y se obtienen límites de detección de dos o tres órdenes de magnitud menor a los estimados con la voltamperometría lineal.

3.2.4. Electrodo de bismuto

Joseph Wang y col., en el año 2000 publicaron el primer trabajo donde se emplearon electrodos de bismuto para la determinación de plomo, cadmio y zinc, utilizando Voltamperometría de Redisolución Anódica, introduciéndolos como una alternativa a los electrodos de mercurio [10]. Los electrodos de bismuto presentan numerosas ventajas con respecto a los electrodos de mercurio (gota colgante, película fina), tales como señales no distorsionadas (picos bien definidos) y altamente reproducibles, resolución de picos próximos, amplio rango lineal. Por otro lado el bismuto utilizado en estos electrodos, presenta menor toxicidad que el mercurio [11]. Estas propiedades los convierten en una alternativa viable para ser empleados en las técnicas electroquímicas. Los electrodos de bismuto tienen la posibilidad de formar

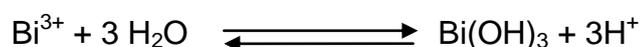
aleaciones multicomponentes, siguiendo el siguiente esquema de reacción del bismuto con el metal en estudio (M):



Estas aleaciones formadas entre el bismuto y el/los analito/s, pueden ser depositados en distintos soportes, como electrodos de carbono vítreo, pasta de carbono, grafito, minas de lápiz, electrodos de capa fina (screen printed) [12]. Existen tres formas de generar el film de bismuto sobre los diferentes soportes:

- 1) “ex-situ”
- 2) “in-situ”
- 3) Modificar un soporte con un precursor de bismuto (ej: Bi_2O_3)

En la metodología “ex-situ” se depositan los iones de bismuto sobre el soporte antes de poner en contacto el electrodo de trabajo con la solución que contiene el analito, es decir, se deposita sobre el soporte solamente bismuto. El modo “in-situ” consiste en generar el film de bismuto, conjuntamente con la presencia del/los analito/s de interés. La limitación de esta metodología es que solamente se puede trabajar en medios ácidos, ya que el bismuto es fácilmente hidrolizable:



De esta manera disminuye la concentración de iones Bi^{3+} en solución, con la consecuente pérdida de sensibilidad. El tercer método se basa en modificar un electrodo con un compuesto que aporte iones Bi^{3+} como por ejemplo el Bi_2O_3 . Este método está destinado para electrodos de pasta de carbono, en donde se mezcla el Bi_2O_3 con la pasta de carbono para generar el electrodo de trabajo.

Con el paso del tiempo se han encontrado numerosas aplicaciones a los electrodos de bismuto, no solamente para determinación de metales, como: Pb (II), Cd (II), Co (II), Ni (II), Cu (II), Mn (II), Fe (III), As (III), Mo (IV) sino también una gran cantidad de compuestos orgánicos [13]. Se pueden citar una gran cantidad de trabajos donde se utilizan los electrodos de bismuto, sobre distintos soportes, para la determinación de Pb (II) y Cd (II) [14 - 17]. También se determinaron los metales anteriores con el agregado de Zn (II), debido a la capacidad de formar aleaciones multicomponentes del bismuto [18 - 21].

Capítulo 3

Parte A

Determinación del contenido de plomo, empleando electrodos de bismuto y Voltamperometría de Redisolución Anódica de Onda Cuadrada

3.3.1. Introducción

Debido a su gran ductilidad y maleabilidad el plomo ha sido uno de los metales más utilizados por el hombre desde épocas antiguas y presenta un gran número de aplicaciones a nivel industrial [22]. El empleo de este metal generó grandes cantidades de residuos, los cuales pueden entrar en contacto con el hombre por diversas vías: respiratoria, oral y cutánea [23]. Este metal es causante de diversos problemas en la salud humana, entre los cuales podemos mencionar: afecciones del sistema nervioso central y renal, malformaciones de gestantes, efectos adversos sobre el sistema cardiovascular, efectos carcinogénicos, etc. [24].

Teniendo en cuenta que el propóleo es utilizado tanto en la industria farmacéutica como la alimentaria, debido a sus propiedades biológicas [25], el nivel de contaminantes presentes en esta matriz debe ser bajo. Uno de los principales contaminantes presentes en el propóleo es el plomo, debido principalmente a la contaminación automotriz. El Código Alimentario Argentino establece la máxima concentración de plomo en propóleo bruto de 2 mg/Kg.

En la literatura existen pocos trabajos que brindan información relacionada con la cuantificación de plomo en muestras de propóleos. Bogdanov establece que el plomo se encuentra presente en el propóleo, en mayor proporción respecto de la miel, cera y polen [26]. Sales y col. demostraron empleando la técnica de Absorción Atómica Electrotérmica y Espectrometría UV-Vis, que la presencia de plomo en estas muestras depende del tipo de recolección [27].

El método de la AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) para determinar plomo en muestras de alimentos, se basa en la determinación espectrométrica a 510 nm del complejo que forma con ditizona, utilizando una solución de citrato cianuro amoniacal. Esta metodología, resulta laboriosa, poco sensible y además emplea reactivos potencialmente tóxicos [28].

El desarrollo de nuevos métodos analíticos que permitan determinar la concentración de plomo en muestras de propóleo bruto, en forma rápida, sencilla y sin el uso de reactivos que puedan poner en riesgo la salud humana es de sumo interés.

3.3.2. Materiales y método

3.3.2.1. Instrumentación

Se empleó un potenciostato (BASi-Bioanalytical System, USA) y una configuración de tres electrodos. Como electrodo de trabajo se empleó un carbono vítreo (BASi), un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M NaCl) y un contraelectrodo de platino. Para los análisis de referencia se utilizó un Espectrómetro de Emisión Atómica con Acoplamiento de Plasma Inductivo (EEA-API) Shimadzu 9000.

3.3.2.2. Preparación de la muestra

Se emplearon muestras de apiarios ubicados cerca de zonas de tráfico pesado (Tornquist, Bahía Blanca, Hilario Ascasubi) y una muestra del apiario “ecológico” de Punta Indio - Buenos Aires. Las muestras fueron cosechadas por el método de raspado (Tornquist) y el de malla (Buenos Aires, Bahía Blanca, Hilario Ascasubi). A todas ellas se le removieron los agentes externos (patas de abejas, hojas, trozos de madera, etc.) y se procedió a la mineralización de las mismas en una mufla a 400 °C hasta cenizas blancas según lo establecido por la norma conjunta IRAM-INTA 15935-1 [29]. La temperatura debe controlarse rigurosamente ya que valores superiores a 425 °C pueden ocasionar pérdida de plomo por volatilización. Luego, las cenizas obtenidas se retomaron con una solución de ácido nítrico al 20 % (v/v) y se llevó a un volumen final de 25 mL con agua ultra pura.

3.3.2.3. Reactivos y soluciones

Todas las soluciones se prepararon con agua ultra pura (18 mΩ) y todos los reactivos químicos que se utilizaron fueron de grado analítico.

- Solución patrón de Bismuto: se preparó a partir de su sal de nitrato, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (99.999% Sigma-Aldrich). Para evitar que el bismuto se

hidrolise, la solución patrón se acidificó con 5 mL de ácido nítrico (20% v/v).

- Solución patrón de plomo: se preparó a partir de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Merck) acidificada con ácido nítrico.
- Nafion (Sigma Aldrich).
- Nanotubos de carbono de pared múltiple, (diámetro interno 110-170 nm y 5-9 μm de longitud) (Sigma Aldrich).
- N-N-dimetilformamida (Sigma Aldrich).
- Metanol (Sigma Aldrich).
- Etanol (Merck)
- Ferrocianuro de potasio (II) (Sigma Aldrich).

3.3.2.4. Preparación del electrodo de trabajo

Previamente a la modificación del electrodo de carbono vítreo (ECV), se procedió a pulirlo con alúminas de diferente tamaño de partícula (1, 0,5 y 0,03 μm). Entre cada paso de pulido se procedió a sonicar durante 30 segundos con el fin de eliminar cualquier resto de alúmina que pueda llegar a quedar depositada en la superficie del electrodo. Finalmente, se secó el electrodo con nitrógeno, para eliminar cualquier resto de agua.

Para preparar la dispersión de nanotubos de carbono de pared múltiple, en Nafion y N-N-dimetilformamida, primeramente se procedió a mezclar 2 mg de nanotubos (NTC, o en inglés, MWCNT, multi-walled carbon nanotubes) en 1 mL de N-N-dimetilformamida (DMF) y se sonicó esta mezcla durante 30 min. Para evitar la deposición de los NTC se tuvo la precaución de agitar cada 5 min la dispersión. Se toma una alícuota de 50 μL de la dispersión anterior y se mezclan con 450 μL de una solución al 5 % de Nafion disuelto en etanol. Dicha mezcla, es sonicada durante 30 min, teniendo la precaución de cada 5 min homogeneizar la dispersión (todas las dispersiones se realizaron por duplicado). Una alícuota de 10 μL de la dispersión anterior fue colocada sobre la superficie del ECV previamente pulida. Esta gota se dejó secar a temperatura ambiente (aproximadamente 1 hora), obteniéndose así el

electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono y Nafion (Figura 3.4.).

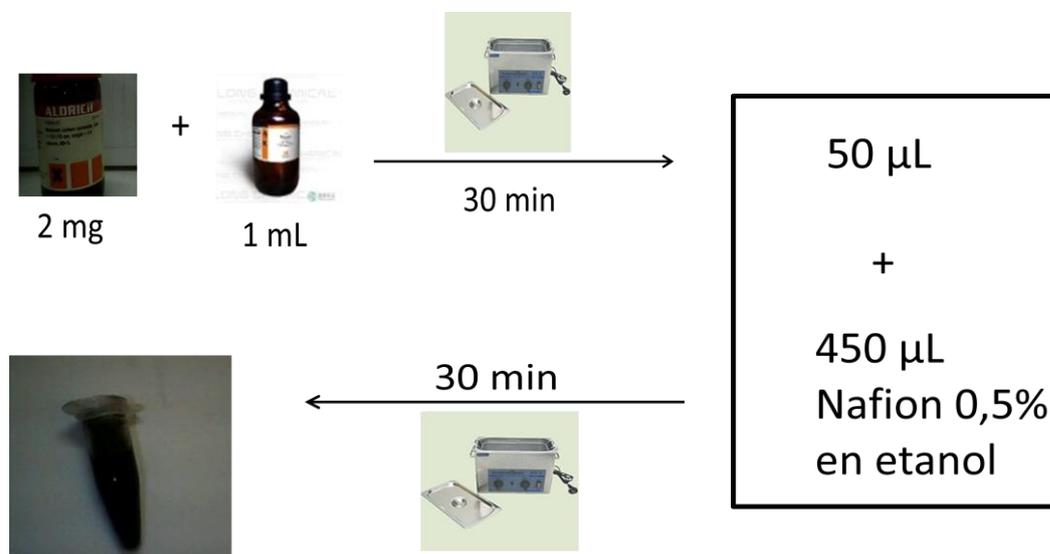


Figura 3.4. Esquema de las etapas para generar la dispersión de nanotubos de carbono en Nafion

3.3.2.5. Procedimiento

La película de NTC/N/DMF (nanotubos de carbono, Nafion y dimetilformamida) formada en la superficie del ECV debe recubrir toda la superficie del electrodo. Esto se verificó observando dicha película con una lupa. Luego se procedió a estabilizar esta superficie, aplicando voltamperometría cíclica en la solución de buffer acetato 0,1 M a una velocidad de barrido de $0,100 \text{ V s}^{-1}$ en un rango de potenciales de -1,4 V a 0,2 V.

Las medidas de Voltamperometría de Redisolución Anódica con Onda Cuadrada (VRAOC), se llevaron a cabo en una solución reguladora de acetato de sodio 0,1 M, pH 4,5 (electrolito soporte), conteniendo una cantidad de $1000 \mu\text{gL}^{-1}$ de Bi (III).

El film de bismuto se depositó sobre el electrodo de trabajo NTC/N/DMF aplicando un potencial de deposición de -1,4 V durante 120 s, bajo condiciones

de convección forzada (agitación). Luego de este tiempo la agitación se detiene, se esperan 10 s para realizar el paso determinativo empleando Voltamperometría de Onda Cuadrada. Las medidas se llevaron a cabo en el intervalo de potenciales entre -1,4 V hasta 0,2 V, salto de potencial (ΔE_s) 2 mV, frecuencia (f) 25 Hz y amplitud de la onda cuadrada (ΔE_{sw}) 40 mV, de esta manera se obtiene una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} . Luego de transcurrida la medida, se realiza un paso de limpieza para asegurar que no quede depositado bismuto o el analito. Para ello, se aplica un potencial de 0,2 V durante 30 s en condiciones de agitación mecánica. Todas las medidas se realizaron en presencia de oxígeno.

3.3.3. Resultados y discusión

3.3.3.1. Optimización de las variables experimentales

Los parámetros de onda cuadrada: ΔE_s , ΔE_{sw} , f, fueron seleccionados a partir de datos bibliográficos [30]. Para seleccionar la concentración de bismuto apropiada se empleó la técnica de Voltamperometría de Redisolución Anódica con Onda Cuadrada (VRAOC) trabajando con una concentración de plomo de $30 \mu\text{gL}^{-1}$. El intervalo de concentraciones de bismuto estudiadas fue entre 200 y $2000 \mu\text{gL}^{-1}$.

En la Figura 3.5 se observa la intensidad de la señal de plomo al aumentar concentración de bismuto (mayor espesor del film de bismuto). La concentración óptima de bismuto para la determinación de $30 \mu\text{gL}^{-1}$ de plomo, es de $1000 \mu\text{gL}^{-1}$. Cuando la concentración de bismuto es muy alta, se forma un film de gran espesor, dificultando la difusión del analito hacia el electrodo, disminuyendo así la sensibilidad del método [31, 32]. Con concentraciones menores no se logra un film adecuado presentando señales de plomo de baja intensidad.

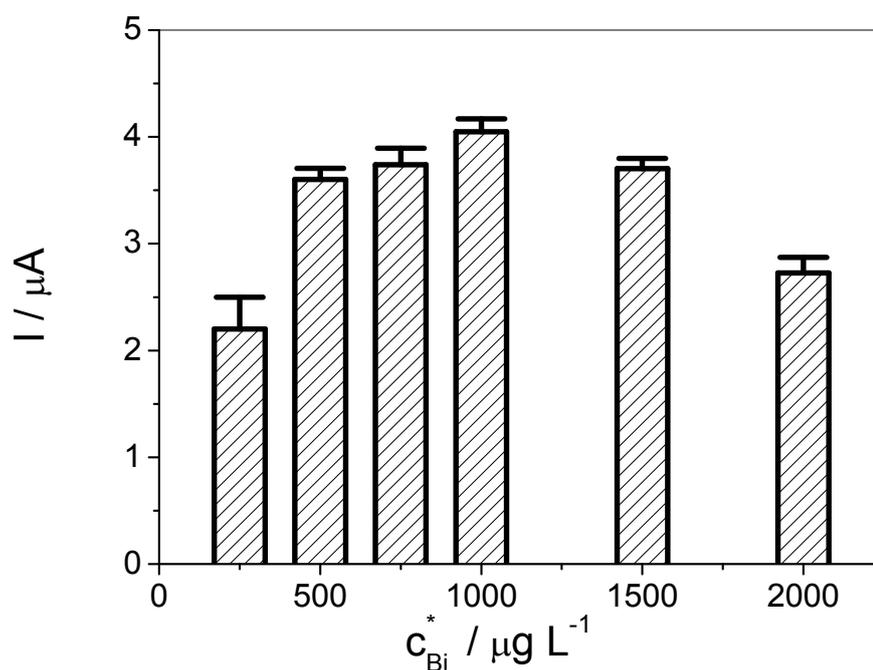


Figura 3.5. Efecto de la concentración de bismuto en la señal de $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de plomo

En la Figura 3.6 se muestra la señal característica para el plomo obtenida mediante Voltamperometría de Redisolución Anódica con Onda Cuadrada y film de bismuto. Las condiciones experimentales fueron: solución reguladora de acetato de sodio $0,1 \text{ M}$ ($\text{pH } 4,5$), con un tiempo de deposición de 120 s a $-1,4 \text{ V}$ con las siguientes condiciones de onda cuadrada: $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$, $f = 25 \text{ Hz}$ y $\Delta E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$. Se observan picos bien definidos para las señales de plomo ($-0,6 \text{ V}$) y bismuto ($-0,12 \text{ V}$).

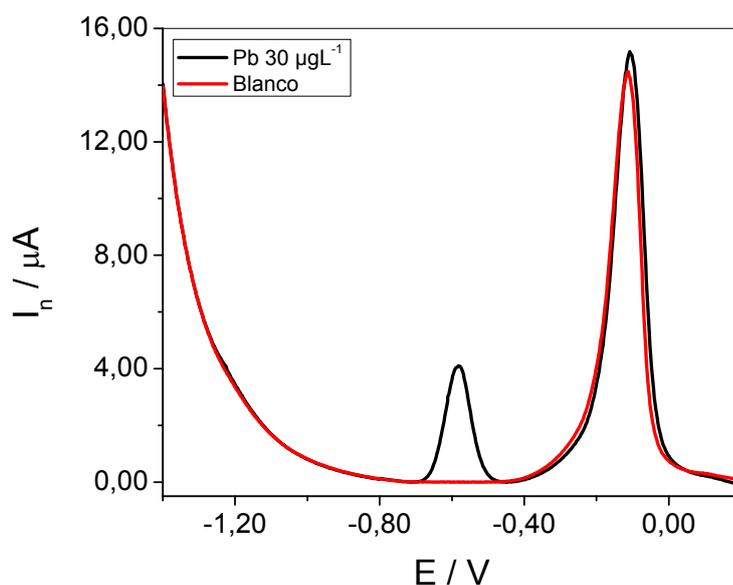


Figura 3.6. Voltamperogramas de onda cuadrada a) señal de Bi $1000 \mu\text{gL}^{-1}$ b) señal de Pb $30 \mu\text{gL}^{-1}$.

3.3.3.2. Parámetros analíticos

En la Figura 3.7 se observan los voltagramas obtenidos con las diferentes concentraciones de plomo. Con las condiciones experimentales óptimas se realizó la curva de calibrado en el intervalo de concentraciones entre 1 y $50 \mu\text{gL}^{-1}$: $I_{p,n} = (-0,021 \pm 0,034) + (0,135 \pm 0,007) c_{\text{Pb}}^*$, $r = 0,9963$ (Figura 3.8).

Los límites de detección y cuantificación fueron: $0,6 \mu\text{gL}^{-1}$ y $1,8 \mu\text{gL}^{-1}$, calculados con una relación señal ruido de 3:1 y 3:10 respectivamente [33]. Los valores de reproducibilidad se estimaron a partir de la variación porcentual de las pendientes de seis curvas de calibrado realizadas con seis dispersiones de nanotubos de carbono en Nafion y dimetilformamida (NTC/N/DMF) distintas (generadas en diferentes días). Para realizar el estudio de repetitividad, se realizaron seis curvas de calibrado, modificando el electrodo con una misma dispersión de NTC/N/DMF. Los resultados demuestran que los electrodos de bismuto presentan buena respuesta. En la Tabla 3.1 se presentan los parámetros analíticos obtenidos.

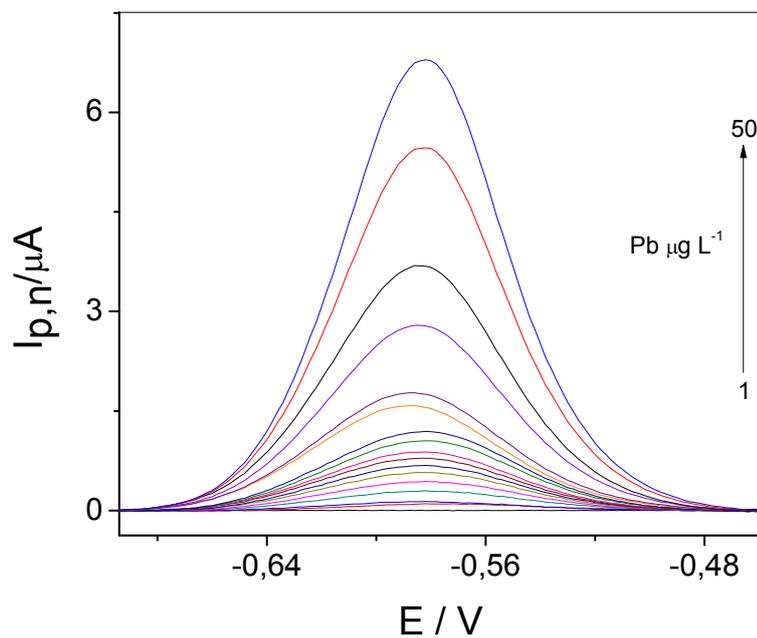


Figura 3.7. Voltamperogramas de onda cuadrada de soluciones de plomo en el intervalo de 1 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

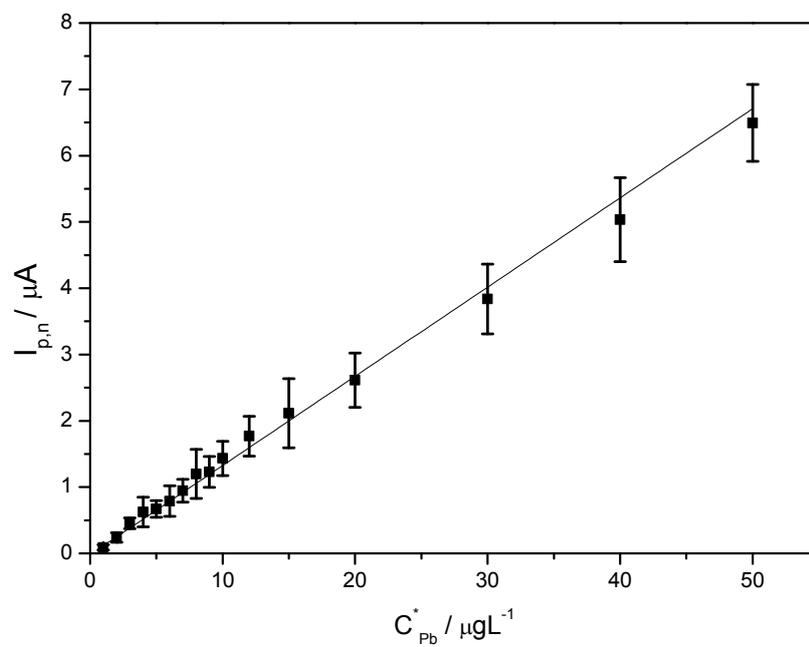


Figura 3.8. Curva de calibrado para Pb obtenida aplicando las condiciones óptimas

Tabla 3.1. Parámetros analíticos

Intervalo lineal (μgL^{-1})	LOD ^a (μgL^{-1})	LOQ ^b (μgL^{-1})	Reproducibilidad (n=6)	Repetitividad (n = 6)
1 - 50	0,6	1,8	7,4 %	7,0 %

^a LOD: Limite de detección

^b LOQ: Limite de cuantificación

3.3.3.3. Estudio de interferentes

El propóleos es una matriz compleja, en la cual se encuentran presentes una gran cantidad de elementos minerales en distintas concentraciones. Teniendo en cuenta que se emplea un film de bismuto para la determinación cuantitativa y que este metal puede formar aleaciones con algunos iones bivalentes como por ejemplo el Zn (II) y Cu (II), es necesario realizar un estudio de interferentes con estos metales. Por otro lado en el propóleos, el zinc se encuentra en mayor proporción que el plomo y el cobre puede también formar complejos intermetálicos con plomo [34 - 37].

Se estudió el efecto de zinc y cobre empleando una concentración de plomo de $30 \mu\text{gL}^{-1}$. La Figura 3.9, ilustra un voltograma empleando diferentes concentraciones de zinc, desde cero hasta una concentración treinta veces mayor a la de plomo. En la figura se observa que la señal de plomo permanece constante a pesar de que la concentración de zinc va aumentando, con lo cual se puede inferir que en el intervalo de concentraciones estudiadas, no hay interacción entre ambos metales.

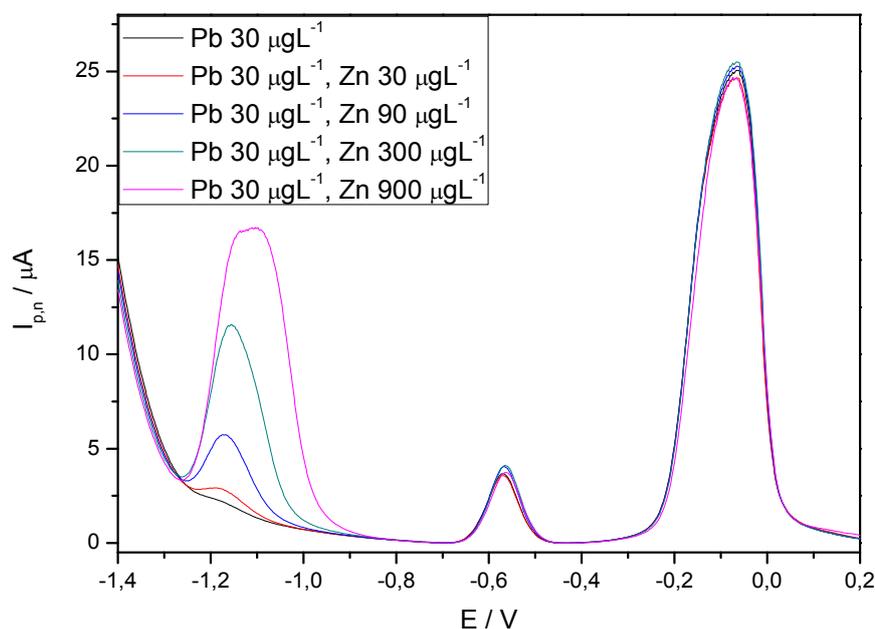


Figura 3.9. Influencia de distintas concentraciones de Zn, sobre la señal de Pb $30\ \mu gL^{-1}$.

Se determinó la influencia del cobre en la señal de $30\ \mu gL^{-1}$ de plomo, variando su concentración entre 0 a $120\ \mu gL^{-1}$. En la Figura 3.10 se observa que al aumentar la concentración de cobre, la señal de plomo disminuye significativamente. Por ello, se empleó una concentración 1mM de ferrocianuro de potasio como agente complejante del cobre [38], observándose la intensidad de la señal de plomo no es afectada. La Figura 3.11 presenta un voltagrama donde se muestran la señal de $30\ \mu gL^{-1}$ de plomo en ausencia y en presencia de $120\ \mu gL^{-1}$ de cobre. Por otro lado se puede observar el voltagrama luego del agregado de ferrocianuro de potasio a la solución anterior.

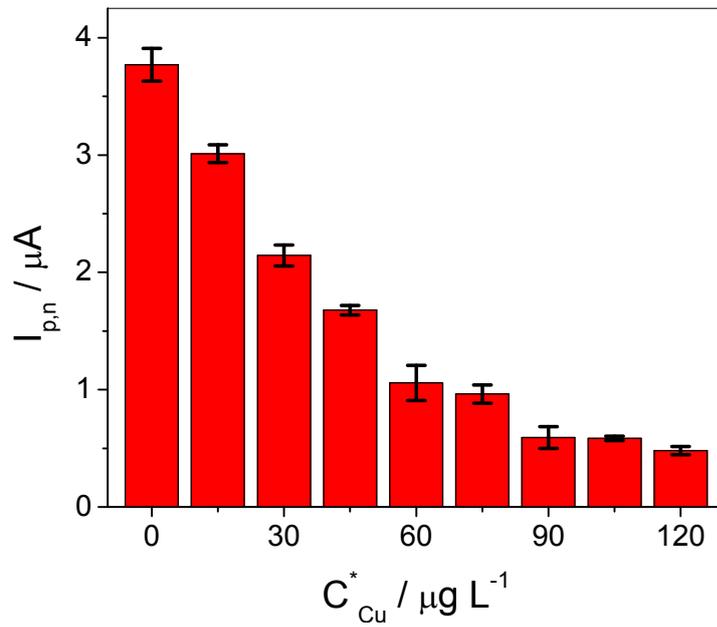


Figura 3.10. Variación de la señal de plomo $30 \mu\text{g L}^{-1}$ en función de un aumento de la concentración de cobre.

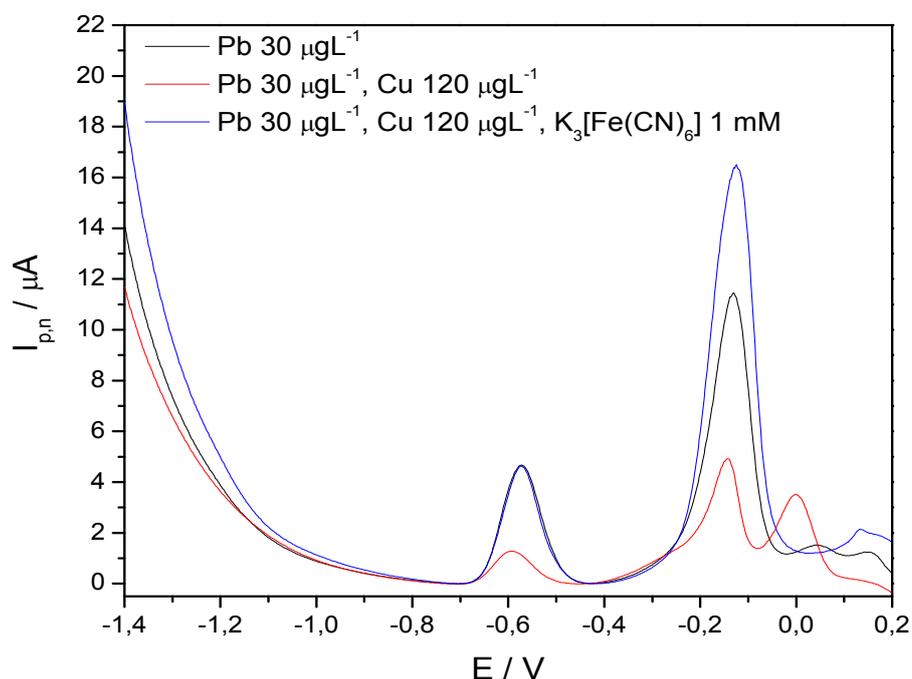


Figura 3.11. Voltamogramas de una solución de Pb ($30 \mu\text{gL}^{-1}$) en presencia de Cu ($120 \mu\text{gL}^{-1}$) y con el agregado de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

3.3.3.4. Aplicación a muestras de propóleos

El método desarrollado fue aplicado a la determinación de plomo en cuatro muestras de propóleos bruto. Los resultados obtenidos indican que la muestra de Buenos Aires cumple con la reglamentación del Código Alimentario Argentino, que establece como límite máximo una concentración de plomo de 2 mg Kg^{-1} . Por otro lado, las muestras de Bahía Blanca, Tornquist e Hilario Ascasubi, exceden este límite en 4, 5 y 0,5 veces respectivamente (Tabla 3.2). Para validar el método propuesto se empleó la técnica de espectroscopia de Emisión Atómica con Acoplamiento de Plasma Inductivo (EEA-API). Los resultados obtenidos pueden observarse en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Análisis de muestras reales

Muestras	Pb (II) mg Kg ⁻¹		Error Relativo %
	Método propuesto	ICP-EEA	
Bahía Blanca	7,81 ± 0,03*	7,69 ± 0,02*	+ 1,56
Tornquist	10,13 ± 0,03	9,94 ± 0,03	+1,86
Hilario Ascasubi	3,18 ± 0,01	2,94 ± 0,01	+8,16
Buenos Aires	1,70 ± 0,02	1,89 ± 0,02	-10,05

* n=3

Finalmente mediante la aplicación del test estadístico t Student (contraste t para datos de a pares) se confirmó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos mediante ambos métodos ($t_{\text{calculado}} = 0,93$; $t_{\text{crítico}} = 3,18$; $n = 3$ y $\alpha = 0,05$) [36].

3.3.4. Conclusiones parciales

El método propuesto empleado para la determinación de plomo en muestras de propóleos de la Provincia de Buenos Aires, presenta como característica innovadora la posibilidad de emplear un electrodo de carbono vítreo modificado con nanotubos de carbono y Nafion, lo cual mejora la sensibilidad electroquímica. Una de las principales características de este método es que tiene en cuenta los principios de la química verde ya que el tradicional electrodo de mercurio es reemplazado por un film de bismuto. Además, se logra la disminución del consumo de reactivos y muestra, y la generación de residuos.

Los resultados obtenidos con el método propuesto fueron validados utilizando Espectroscopia de Emisión Atómica con acoplamiento de plasma inductivo, mostrando buena concordancia entre ellos.

Este método es una buena alternativa en el control de calidad de las muestras de propóleos bruto, siendo una metodología promisoriosa que cumple con los principios de la química verde.

Capítulo 3

Parte B

**Determinación simultánea de zinc,
cadmio, plomo y cobre empleando
Voltamperometría de Redisolución
Anódica de Onda Cuadrada y
técnicas quimiométricas**

3.4.1. Introducción

El propóleo contiene gran número de macro y micro elementos, como por ejemplo zinc y cobre, que son fundamentales en gran número de procesos biológicos del organismo [35]. Por otro lado, la presencia de estos metales en exceso puede causar serios trastornos en la salud humana [39]. Además, pueden estar presentes como contaminantes, plomo y cadmio, metales tóxicos que pueden causar daños en el sistema nervioso, inmune, gastrointestinal y reproductivo [17]. Teniendo en cuenta que el Código Alimentario Argentino, considera al propóleo como suplemento dietario y puede estar presente en alimentos y productos farmacéuticos y cosmética, la determinación de estos metales es de interés. Actualmente, la determinación multielemental se lleva a cabo mediante espectroscopias de absorción y emisión atómica [34, 36, 40]. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de metodologías con menor costo instrumental y que permitan bajos límites de detección de estas muestras, siendo las técnicas electroanalíticas, una opción viable.

3.4.2. Materiales y métodos

3.4.2.1. Instrumentación

Se empleó un potenciostato Epsilon BASi con un módulo RDE-2 Rotating Disk Electrode (BASi-Bioanalytical System, USA) con una celada de tres electrodos. Como electrodo de trabajo se utilizó una mina de lápiz Faber-Castell, (0,7 mm de diámetro y 6 cm de largo, provista por una librería local) sobre la que se depositó el film de bismuto. Se utilizó como electrodo de referencia Ag/AgCl (3 M NaCl) y un contraelectrodo de platino.

3.4.2.2. Preparación de la muestra

Las muestras de propóleos bruto utilizadas corresponden al grupo B, a los partidos de Bahía Blanca (M1) y Tornquist (M2). Se pesó una cantidad apropiada de cada una de las muestras acondicionadas y se calcinó en una mufla a 400 °C hasta cenizas blancas según lo establecido por la norma conjunta IRAM-INTA 15935-1. La temperatura debe controlarse rigurosamente ya que valores superiores a 425 °C pueden ocasionar pérdida de plomo por volatilización. Las cenizas obtenidas se retomaron con una solución de ácido nítrico al 10 % (v/v), y se llevó a un volumen final con agua.

3.4.2.3. Reactivos y soluciones

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica y las soluciones se prepararon con agua ultra pura (18,3 MΩ, Barnstead, Dubuque, USA).

- Solución patrón de bismuto (III): se preparó disolviendo la cantidad apropiada de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (99.999% Sigma-Aldrich) en 5 mL de ácido nítrico al 20 % (v/v) y llevando a un volumen final de 25,0 mL con agua.
- Solución de trabajo de zinc, cadmio, plomo y cobre: se obtuvieron a partir de diluciones de las correspondientes soluciones estándar para absorción atómica (Merck).

3.4.2.4. Preparación del electrodo de trabajo

Con la finalidad de poder utilizar el electrodo de trabajo acoplado al módulo rotatorio del potencióstato, se diseñó un dispositivo para adaptar la mina de lápiz de 0,7 mm de diámetro y de composición HB, al equipo. El mismo consta de un cilindro de teflón de 2,5 cm de longitud, un orificio de 0,7 mm de diámetro con una rosca en el extremo superior para incorporarlo al módulo rotatorio. La mina de lápiz se coloca dentro del orificio del cilindro dejando expuesta 1 cm de la misma para introducirla en la solución de trabajo, resultando así un área geométrica igual a 0,228 cm² (Figura 3.12).

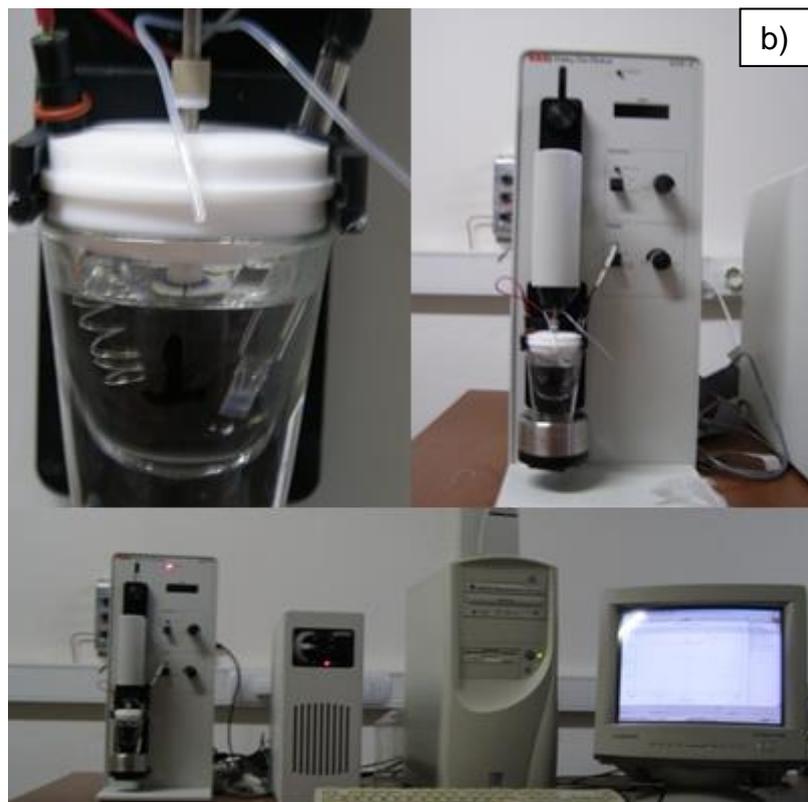
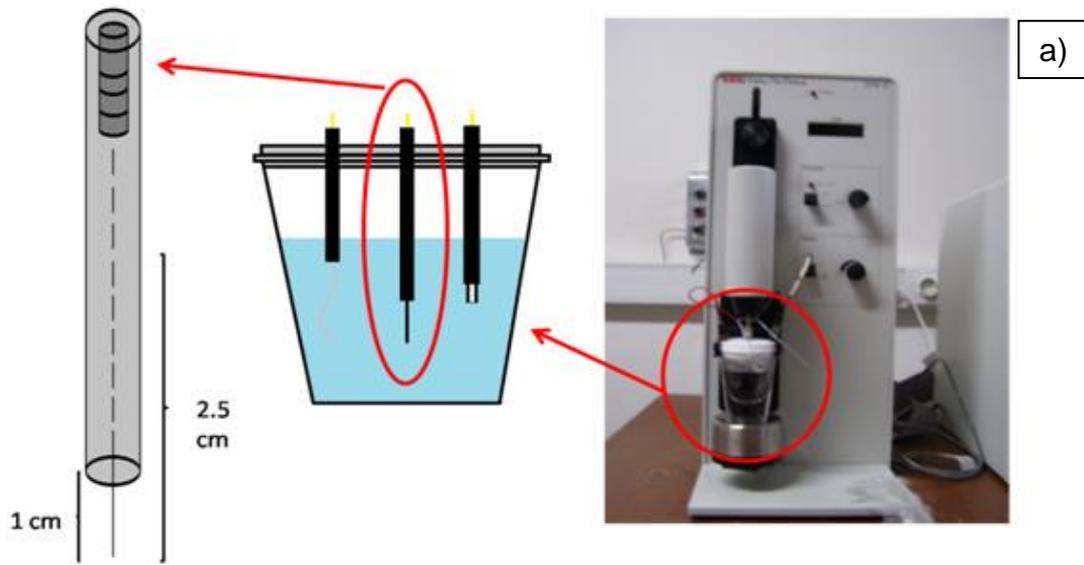


Figura 3.12. a) Representación esquemática del dispositivo empleado b) Fotografía de la celda electroquímica, el modulo rotatorio y el potenciostato utilizado para la determinación multielemental.

Para acondicionar la mina de lápiz se la trata suavemente con una lija de papel, y posteriormente es introducida en una solución de ácido nítrico al 20 % (v/v) durante 5 minutos. A fin de estabilizar la superficie de la mina, se realizaron 20 voltamperogramas cíclicos consecutivos entre -1,4 V a 0,5 V a una velocidad de barrido de $0,100 \text{ V s}^{-1}$, en 20 mL de solución reguladora 0,1 M de acetato de sodio, pH 4,5.

3.4.3.5. Procedimiento

Las determinaciones, se realizaron generando la deposición “in-situ” del bismuto sobre la mina de lápiz y la redisolución se llevó a cabo empleando la técnica de voltamperometría de onda cuadrada. Las medidas se realizaron en una celda electroquímica que contenía 25 mL de solución buffer de acetato de sodio 0,1 M pH 4,5 con los analitos y una concentración de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de bismuto.

El potencial de deposición utilizado (E_d) fue de -1,4 V, aplicado durante un tiempo (t_d) de 120 s, conjuntamente con una velocidad de rotación del electrodo de 8000 rpm. Luego de transcurrido el tiempo de deposición, el electrodo se detiene durante 10 s y posteriormente se realizó un barrido anódico desde -1,4 V hasta 0,5 V con salto de escalera de 0,003 V, amplitud de 0,070 V y frecuencia de 10 Hz. Finalizado el experimento, se procede a un paso de limpieza de la superficie del electrodo, el cual consiste en aplicar un potencial de 0,5 V durante 30 s, bajo condiciones de agitación (velocidad de rotación del electrodo de 8000 rpm). Todos los pasos mencionados anteriormente, fueron controlados mediante el software del instrumento.

3.4.3. Resultados y discusión

3.4.3.1. Selección de la mina de lápiz

Se probaron minas de diferentes diámetros y composiciones para ser utilizadas como electrodo de trabajo. Los diámetros de las minas utilizados fueron: 0,5;

0,7 y 2 mm. Las composiciones estudiadas varían en el grado de dureza, desde las más dura 2H hasta la más blanda 2B. En este caso se probaron composiciones: 2B, B, HB, H, 2H. Las minas de diámetro 0,5 mm y 2 mm no pudieron ser utilizadas debido a que en el primer caso presentaron gran fragilidad y las de mayor diámetro poseen una corriente capacitiva significativa. En el caso de las composiciones, las minas con mayor porcentaje de arcilla (H y 2H) presentan corrientes capacitivas elevadas. Por otra parte, las de menor porcentaje de arcilla (2B y B) presentaba una mayor fragilidad mecánica. Por lo tanto, se seleccionaron minas de 0,7 mm de diámetro y de composición HB, debido a que éstas fueron las que evidenciaron menores corrientes capacitivas y menor fragilidad mecánica.

3.4.3.2. Optimización de los parámetros de onda cuadrada

Para poder determinar los parámetros de Voltamperometría de Onda Cuadrada (VOC) que permitan obtener las mejores señales para las cuatro analitos en estudio, se realizó un diseño de experimento de 3 niveles y 3 factores Box-Behnken [41]. Los tres factores estudiados fueron: salto de potencial (ΔE_s), frecuencia (f) y amplitud de la onda cuadrada (ΔE_{sw}). Los niveles de estos 3 factores fueron fijados en función del trabajo realizado en la Parte A [42]. Los niveles elegidos para cada uno de los parámetros se muestran en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Niveles seleccionados para cada uno de los parámetros de VOC

Factores	Niveles		
Nivel codificado	-1	0	+1
ΔE_s (mV)	1	2	3
f (Hz)	10	20	30
ΔE_{sw} (mV)	50	60	70

Para realizar este estudio se fijaron las concentraciones de los cuatro analitos en $100 \mu\text{g L}^{-1}$ Zn, $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Cd, $40 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb y $30 \mu\text{g L}^{-1}$ Cu. Todos estos valores pertenecen al rango de concentraciones estudiados para cada metal. En la Tabla 3.4 se muestran las condiciones de voltamperometría de onda cuadrada utilizadas en cada experimento.

Tabla 3.4. Condiciones de Voltamperometría de Onda Cuadrada para cada experimento

Experimento N°	ΔE_s (mV)	ΔE_{sw} (mV)	f (Hz)
1	2	50	10
2*	2	60	20
3	3	60	30
4	2	70	10
5	1	60	10
6*	2	60	20
7*	2	60	20
8	3	50	20
9	1	50	20
10	2	70	30
11	2	50	30
12	3	60	10
13	1	60	30
14	1	70	20
15	3	70	20

*Réplicas del punto central del diseño.

En la Figura 3.13, se observan los quince voltogramas obtenidos a partir del diseño de la Tabla 3.3. La concentración de los analitos y del bismuto fue la misma en todos los experimentos, variando solamente los parámetros de onda cuadrada.

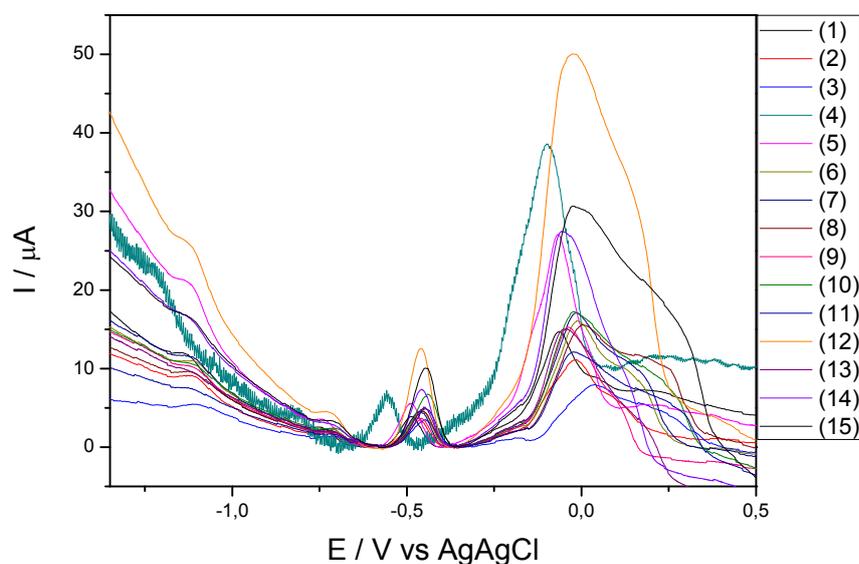


Figura 3.13. Voltamperogramas de onda cuadrada obtenidos del diseño de experimento Box-Behnken

Con el fin de obtener los parámetros óptimos de VOC, para realizar la determinación simultánea de los cuatro analitos, se hace uso de la función de deseabilidad, que permite englobar en una sola, la respuesta de los cuatro metales [43, 44].

El objetivo de la función de deseabilidad es convertir cada respuesta del sistema, a un valor de deseabilidad individual d_i que varía entre 0 a 1 (de no deseable a muy deseable) [45]. Luego a partir de las deseabilidades de cada una de las variables, se calcula la deseabilidad total "D", ponderando aquellas variables cuyo peso sea mayor o tengan mayor importancia en la determinación, según conocimientos previos del sistema en estudio:

$$D = (d_1 \times d_2 \times d_3 \dots \times d_n)^{1/n}$$

donde n es el número de respuestas que hay que optimizar en el experimento (en nuestro caso cuatro, para obtener los parámetros de onda cuadrada que brinden la mejor señal para el Zn, Cd, Pb y Cu).

Para lograr la deseabilidad total máxima y obtener una superficie de respuesta con un máximo, se define la deseabilidad como:

- $d_i = 0$ si la respuesta < valor mínimo.
- $0 \leq d_i \leq 1$ si la respuesta varía entre el valor mínimo y máximo.
- $d_i = 1$ si la respuesta > valor establecido como máximo.

La expresión de deseabilidad total para estimar los parámetros óptimos de onda cuadrada queda definida como:

$$D = [d_{Pb}] \cdot [d_{Zn}] \cdot [d_{Cd}]^{1/3} \cdot [d_{Cu}]^{1/4}$$

Se ponderó la señal del cadmio tres veces con respecto a la deseabilidad de plomo y zinc, ya que éste se encuentra en un intervalo de concentraciones mucho menor que los otros dos (ver sección 3.3.4.3.). El cobre se ponderó cuatro veces, ya que éste es el elemento que sufre más interacciones con el resto de los analitos, formando compuestos intermetálicos con el zinc, plomo y cadmio, como así también con bismuto.

En la Figura 3.14 se muestran las superficies de respuesta obtenidas. Estas superficies, están representadas mediante una ecuación polinómica de segundo orden:

$$D = 0,17 \pm 0,09 + 0,26 \Delta E_s \pm 0,11 + 0,16 \Delta E_{sw} \pm 0,11 - 0,35 f \pm 0,11 + 0,20 \Delta E_s^2 \pm 0,17 - 0,35 \Delta E_s f \pm 0,16 + 0,18 f^2 \pm 0,17$$

Donde D es el valor de respuesta (variable dependiente), en este caso el correspondiente a la deseabilidad total y ΔE_s , ΔE_{sw} , y f son las variables independientes. Se obtuvo un $R^2 = 83 \%$, lo cual significa que el modelo explica un 83% de varianza sobre D. Los valores óptimos fueron: ΔE_s : 3 mV, ΔE_{sw} : 70 mV, f : 10 Hz.

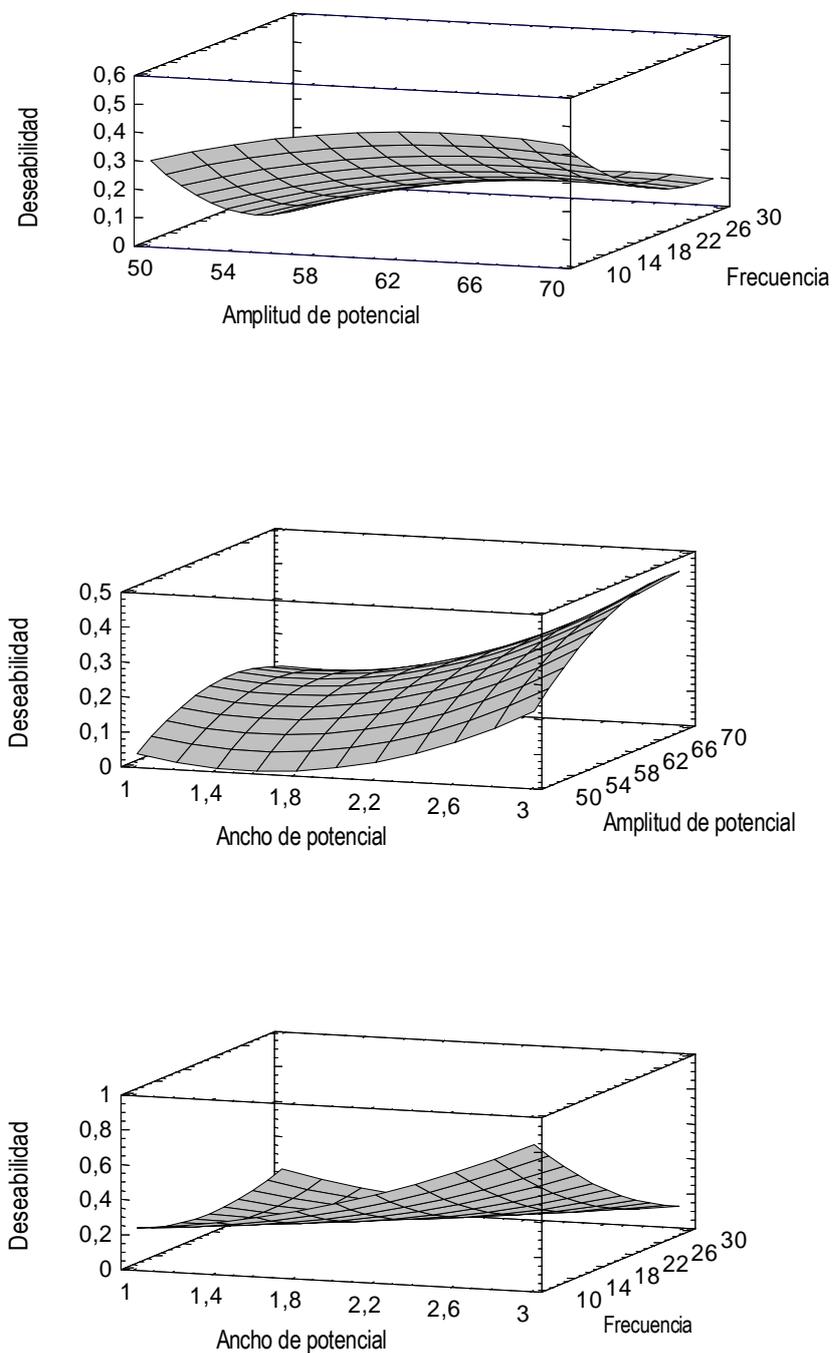


Figura 3.14. Superficie de respuesta obtenida para optimizar los parámetros de la voltamperometría de onda cuadrada.

3.4.3.3. Diseño del set de calibración

Se empleó un diseño de calibración ortogonal, de cinco niveles, para los cuatro analitos en estudio. Se seleccionó un generador cíclico de $1 \rightarrow 3 \rightarrow 4$, y un vector de permutación definido $\{0\ 2\ 1\}$ [46]. El set de calibración obtenido se presenta en la tabla 3.5.

Tabla 3.5. Set de calibración.

N° Experimento	Zn [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Cd [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Pb [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Cu [$\mu\text{g L}^{-1}$]
1	180	7	35	40
2	280	7	50	30
3	80	9	50	50
4	280	9	20	40
5	180	5	50	60
6	380	9	35	60
7	380	7	65	50
8	280	11	65	60
9	380	11	50	40
10	180	9	65	30
11	80	11	35	30
12	80	7	20	60
13	380	5	20	30
14	80	5	65	40
15	180	11	20	50
16	280	5	35	50

En la Figura 3.15, se observan los 16 voltagramas obtenidos, correspondiente al set de calibración.

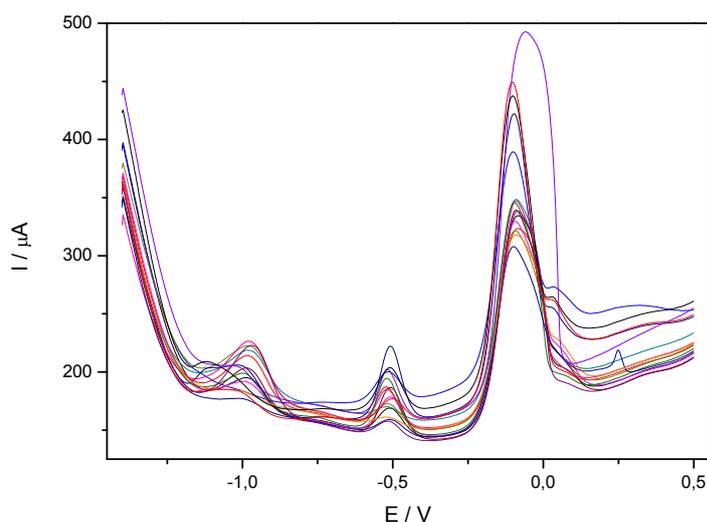


Figura 3.15. Voltagramas correspondientes al diseño de calibración sin preprocesar, obtenidos con las condiciones optimizadas de Box-Behnken, ΔE_s : 3 mV, ΔE_{sw} : 70 mV, f : 10 Hz y $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ Bi.

3.4.3.4. Preprocesamiento de datos

Con el fin de obtener mejores resultados, los voltagramas fueron pretratados con diferentes algoritmos para luego generar modelos de calibración. El preprocesamiento de datos es una parte esencial de las técnicas quimiométricas y se utilizan con el fin de eliminar o minimizar la variación indeseada en los datos, tales como ruido instrumental, corrimiento de señales, etc. [47].

Para la corrección de la línea de base se usó el algoritmo AsLS (Asymmetric Least Squares) [48, 49]. En este algoritmo, se varían dos parámetros, p para la asimetría de los datos y λ para el suavizado de los mismos. Para señales con picos positivos (como los obtenidos mediante VOC) los valores de p suelen variar entre $0,001 \leq p \leq 0,1$; mientras que los valores de λ suelen variar entre $10^2 \leq \lambda \leq 10^9$. El uso de este algoritmo es sencillo y consiste en ir variando ambos parámetros manualmente hasta obtener los datos con la línea de base corregida, en donde, normalmente la inspección visual es suficiente para determinar los valores de p y λ . En este trabajo, los valores que se

determinaron para ambos parámetros fueron: $\lambda = 1^5$ y $p = 0,001$. La ventaja del uso de este algoritmo es que normalmente, la corrección de la línea de base es un proceso semimanual, el cual consume tiempo y es poco reproducible. De esta manera, con el uso de AsLS se puede corregir la línea de base, de todos los voltogramas medidos, de una sola vez y bajo las mismas condiciones.

Al obtener datos empleando técnicas electroquímicas, es usual el desplazamiento de los valores de potencial de la señal de un analito, es decir no siempre la corriente de pico máxima se encuentra en el mismo potencial. Esto puede deberse al cambio del electrodo de referencia, la distinta disposición de los electrodos (en cuanto a distancia por ejemplo) o a inconvenientes con el potencióstato. Particularmente en los electrodos de film de bismuto, al formar una aleación con especies cargadas, existen fuerzas de atracción y repulsión, las cuales generan corrimientos o desplazamientos en los potenciales de oxidación de los analitos [50, 51]. Para poder resolver esto, se utilizó un algoritmo para “alinear” los potenciales de oxidación de los analitos. Con este fin, se empleó el COW (Correlation Optimized Warping) [52].

3.4.3.5. Análisis de los modelos de calibración

Se aplicó PLS (Partial Least Square ó Mínimos Cuadrados Parciales) a los voltogramas obtenidos sin pretratar y luego del pretratamiento (AsLS-PLS y AsLS-COW-PLS).

En la tabla 3.6 se muestran los resultados de predicción obtenidos para los modelos quimiométricos PLS, AsLS-PLS y AsLS-COW-PLS, realizados para cada metal. Los parámetros estadísticos presentados en la tabla son: número de variables latentes (VL), error cuadrático medio en la validación cruzada (RMSECV), error cuadrático medio en la predicción (RMSEP), error sistemático de predicción (BIAS), desviación estándar de los residuales predichos (SEP) y coeficiente de correlación (r).

Tabla 3.6. Parámetros estadísticos para los distintos modelos generados.

Analito	Parámetro estadístico	PLS	AsLS-PLS	AsLS-COW-PLS
Zn (80 - 380) [$\mu\text{g L}^{-1}$]	VL	6	7	8
	RMSECV	20,90	17,94	22,18
	RMSEP	64,62	52,18	34,53
	BIAS	14,16	5,893	-7,223
	SEP	67,40	55,42	36,09
	r	0,7228	0,8686	0,9339
Cd (5 - 11) [$\mu\text{g L}^{-1}$]	VL	20	16	12
	RMSECV	0,8474	1,020	1,097
	RMSEP	3,216	2,094	1,697
	BIAS	0,4309	-1,583	-0,8595
	SEP	3,407	1,465	1,565
	r	-0,1481	0,5938	0,4294
Pb (20 - 65) [$\mu\text{g L}^{-1}$]	VL	8	7	8
	RMSECV	2,940	3,015	2,264
	RMSEP	6,560	4,432	3,627
	BIAS	-2,617	-2,496	0,665
	SEP	6,431	3,916	3,812
	r	0,9000	0,9881	0,9730
Cu (30 - 60) [$\mu\text{g L}^{-1}$]	VL	8	9	9
	RMSECV	3,080	2,811	9,001
	RMSEP	13,94	7,249	8,317
	BIAS	2,680	0,9589	2,630
	SEP	13,94	7,681	8,434
	r	-0,1034	0,604	0,580

De los valores de RMSEP, se observa que los mejores resultados se obtuvieron aplicando los modelos AsLS-COW-PLS con respecto a PLS. Esto puede deberse a que el tratamiento con COW, tiende a aumentar la linealidad de los datos [53]. Por otro lado, cadmio y cobre presentan un carácter no lineal mucho más marcado que el zinc y el plomo. A pesar de que el tratamiento con COW logra un aumento de la linealidad, no es suficiente como para modelarlos satisfactoriamente con PLS, AsLS-PLS ó AsLS-COW-PLS. Por lo tanto, se puede concluir que cadmio y cobre, no pueden ser modelados aplicando ninguno de los pretratamientos mencionados anteriormente (todos los modelos generados presentan valores de r menores a 0,8). En la Figura 3.16 se muestran los gráficos de valores predichos en función de valores de referencia

para el cadmio y cobre, donde se observa la falta de ajuste presentada para los modelos generados mediante AsLS-COW-PLS.

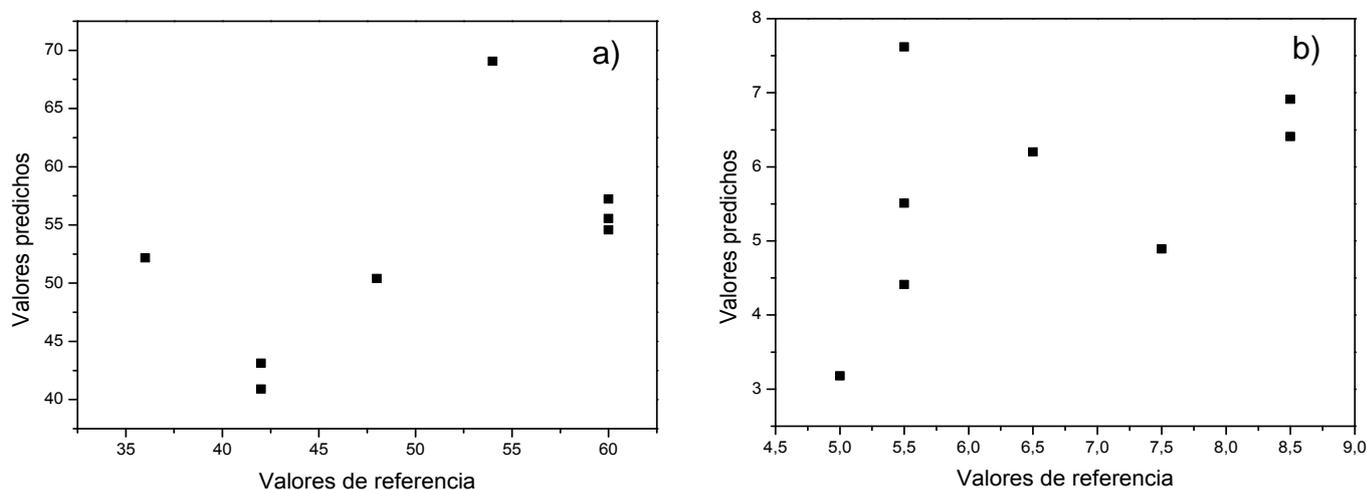


Figura 3.16. Gráficos de valores predichos en función de los de referencia para los modelos generados para a) cobre y b) cadmio con AsLS-COW-PLS

Por otra parte, también se puede concluir que el pretratamiento de los datos con AsLS-COW-PLS, genera un aumento en el poder de predicción de los modelos generados, para plomo y zinc. Esto se ve reflejado con la disminución de los valores de RMSEP y SEP. Una corrección en la línea de base (AsLS-PLS) provoca una disminución aproximada del 20% del RMSEP para el zinc y del 30% en el plomo (con respecto a PLS). El mejor pretratamiento resultó ser AsLS-COW-PLS, debido al aumento de la linealidad de los datos, obteniéndose valores de RMSEP aproximadamente un 50% menor que los obtenidos con PLS para el zinc y plomo.

La formación de compuestos intermetálicos en las técnicas electroquímicas, es una de las principales razones de pérdida de linealidad en los datos obtenidos, razón por la cual, resulta difícil obtener buenos resultados con los modelos PLS [54]. El bismuto, como se mencionó en la sección 3.2.4 de la Introducción de este Capítulo, tienen la capacidad de formar aleaciones con los analitos. Es de esperar, que al formar aleaciones multielementales, se produzca algún tipo de interacción entre los distintos elementos que conforman dicha aleación [54]. El

cobre forma compuestos intermetálicos con el cadmio, zinc y plomo [42, 55 - 57]. Además, cuando las relaciones molares entre el cobre y los demás metales es mayor a la unidad, las corrientes de pico se ven afectadas, observándose disminuciones en sus intensidades [58]. Debido a que el set de calibración fue diseñado considerando las concentraciones de los analitos en las muestras de propóleos, según los datos presentes en bibliografía, el intervalo de concentración de cadmio a estudiar fue de 5 a 11 $\mu\text{g L}^{-1}$, inferior al estudiado para cobre (30 a 60 $\mu\text{g L}^{-1}$). Esto conlleva a que la respuesta electroquímica de cadmio este muy influenciada por el cobre, no pudiendo de esta manera, ser modelado con PLS. Los modelos generados con PLS para el zinc y plomo, son apropiados a pesar de la existencia del cobre en solución. Esto puede deberse a dos motivos. Primeramente, PLS tolera cierta “no linealidad” en los datos, que con ayuda del algoritmo COW disminuye, mejorando así los resultados obtenidos. Por otra parte, los rangos de concentraciones estudiados para el zinc (80 – 380 $\mu\text{g L}^{-1}$) están muy por encima de las concentraciones estudiadas para el cobre y de esta manera, se ve menos influenciado por su presencia. El plomo, se estudió en un intervalo que varió entre 20 – 65 $\mu\text{g L}^{-1}$, una relación de concentraciones aproximadamente igual a la estudiada para el cobre. Sin embargo, con el empleo del algoritmo COW y la tolerancia que posee PLS a la falta de linealidad, pudo ser modelado.

Debido a la naturaleza “no lineal” de los datos obtenidos, se procedió a realizar un estudio comparativo entre PLS y ANN para los cuatro analitos estudiados.

3.4.3.6. Redes neuronales (Modelado no lineal)

Las Redes Neuronales Artificiales (Artificial Neural Networks, ANN), son utilizadas para modelar datos de carácter no lineal y pueden ser aplicadas en datos obtenidos de técnicas voltamperométricas [59].

Se generaron modelos quimiométricos empleando ANN, con datos sin preprocesar, con corrección de la línea de base (AsLS-ANN) y corrección de la línea de base y alineado (AsLS-COW-ANN). A fin de optimizar el número de neuronas empleadas en la capa oculta, se estudió la variación del RMSEP en

función del número de neuronas de la capa oculta (Figura 3.17). El número óptimo de neuronas de capa oculta fue 5 para zinc, 20 para cadmio, 10 para plomo y 10 para cobre. Las neuronas fueron entrenadas utilizando la propagación de Levenberg-Marquardt [60].

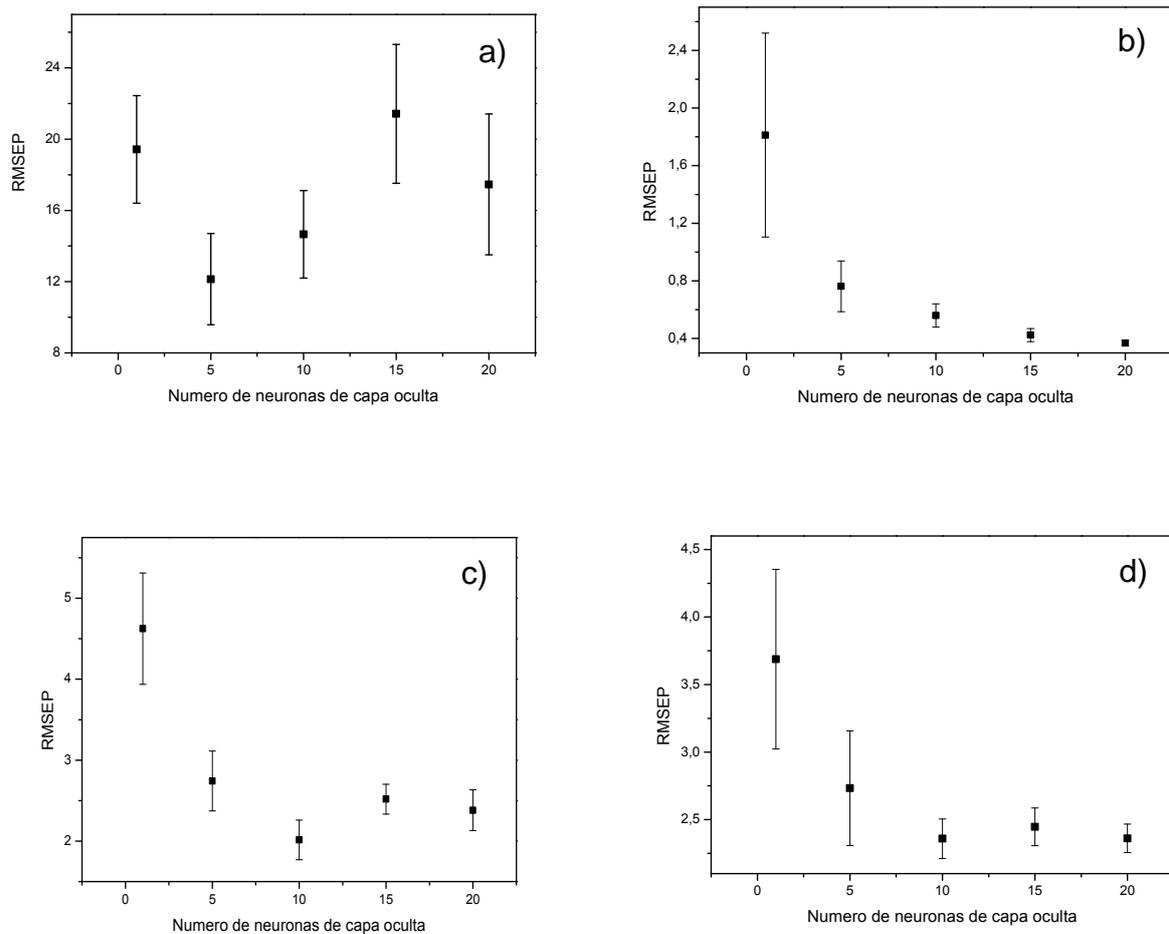


Figura 3.17. Gráfico de la variación del RMSEP en función del número de neuronas de la capa oculta para a) zinc, b) cadmio, c) plomo, y d) cobre.

Las predicciones fueron realizadas utilizando el número óptimo de neuronas en la capa oculta. Los resultados fueron evaluados en función del RMSEP obtenido por los distintos modelos generados. La Tabla 3.7 muestra los valores obtenidos de RMSEV, RMSEP, pendiente e intercepción y r_p , para cada

modelo generado con los distintos pretratamientos para cada analito. De los valores de RMSEP y r se confirma el comportamiento no lineal de todos los analitos. Además, la aplicación de una corrección a la línea de base mejora las predicciones. Cabe destacar, que un aumento en la linealidad de los datos, generado con el empleo del algoritmo COW, produce una disminución en el poder predictivo de los modelos generados con ANN. Se selecciona para este trabajo los modelos generados a partir de AsLS-ANN.

Tabla 3.7. Parámetros estadísticos para los distintos modelos generados dependiendo el pretratamiento utilizado en ANN.

Analito	Parámetro estadístico	ANN	AsLS-ANN	AsLS-COW-ANN
Zn (80 – 380) [$\mu\text{g L}^{-1}$]	RMSEV	12,80	4,921	17,65
	RMSEP	16,59	7,623	13,63
	Pendiente	0,9889	1,0094	0,9761
	Intercepción	4,500	2,7591	7,193
	r_p	0,995	0,997	0,996
Cd (5 – 11) [$\mu\text{g L}^{-1}$]	RMSEV	0,7144	0,2674	0,6237
	RMSEP	0,7926	0,4852	0,3718
	Pendiente	1,001	0,9627	1,036
	Intercepción	-0,08567	0,5797	-0,1562
	r_p	0,946	0,982	0,993
Pb (20 – 65) [$\mu\text{g L}^{-1}$]	RMSEV	5,172	3,087	4,157
	RMSEP	1,635	1,007	2,539
	Pendiente	0,9884	1,0158	0,929
	Intercepción	0,5744	0,2472	1,457
	r_p	0,997	0,998	0,987
Cu (30 – 60) [$\mu\text{g L}^{-1}$]	RMSEV	1,169	1,625	1,382
	RMSEP	1,931	1,455	2,338
	Pendiente	0,9232	1,0042	0,9814
	Intercepción	2,276	-0,2092	1,014
	r_p	0,982	0,991	0,975

3.4.3.7. Aplicación a muestras de propóleos

Esta metodología fue implementada en la determinación de zinc, cadmio, plomo y cobre en muestras de propóleos. Los resultados obtenidos fueron validados empleando ensayos de recuperación. En la Tabla 3.8, se muestran los contenidos de Zn, Cd, Pb y Cu en las dos muestras analizadas por el método propuesto.

Tabla 3.8. Valores obtenidos de la concentración de metales con el método propuesto

Muestra	Zn [mgKg ⁻¹]	Cd [mgKg ⁻¹]	Pb [mgKg ⁻¹]	Cu [mgKg ⁻¹]
M1	14,8	nd	7,73	2,45
M2	15,2	nd	3,05	2,09

nd: no detectado

En la tabla 3.9, se observan los resultados obtenidos del ensayo de recuperación.

Tabla 3.9. Ensayo de recuperación empleando AsLS-COW-PLS y AsLS-ANN para cada uno de los analitos.

Muestra	Zn [μgL^{-1}]			Zn [%]		Cd [μgL^{-1}]			Cd [%]	
	Adicionado	Encontrado AsLS-ANN	Encontrado AsLS- COW-PLS	Recuperado AsLS-ANN	Recuperado AsLS-COW- PLS	Adicionado	Encontrado AsLS-ANN	Encontrado AsLS- COW-PLS	Recuperado AsLS-ANN	Recuperado AsLS-COW- PLS
M1a	69,84	69,83	87,08	99,98	124,68	5,00	5,03	13,30	100,60	266,00
M1b	166,65	165,5	159,21	99,31	95,53	6,91	6,91	13,14	100,00	190,16
M2a	59,93	61,56	82,31	102,72	155,51	5,00	5,01	13,98	100,20	276,60
M2b	156,85	158,15	182,86	100,83	116,58	6,91	6,94	13,33	100,43	192,91

Muestra	Pb [μgL^{-1}]			Pb [%]		Cu [μgL^{-1}]			Cu [%]	
	Adicionado	Encontrado AsLS-ANN	Encontrado AsLS- COW-PLS	Recuperado AsLS-ANN	Recuperado AsLS-COW- PLS	Adicionado	Encontrado AsLS-ANN	Encontrado AsLS- COW-PLS	Recuperado AsLS-ANN	Recuperado AsLS-COW- PLS
M1a	9,98	9,47	5,9	94,88	59,12	9,64	9,78	23,30	101,42	241,75
M1b	19,47	19,6	21,65	100,66	111,97	18,54	18,12	35,64	97,76	192,26
M2a	19,95	19,86	25,41	99,55	127,37	9,88	10,21	32,82	103,38	332,23
M2b	29,37	29,56	36,33	100,65	123,70	19,02	19,78	51,71	103,98	271,87

3.4.4. Conclusiones parciales

En este trabajo se logró la determinación simultánea de zinc, cadmio, plomo y cobre en muestras de propóleos bruto cosechado mediante el método de malla, empleando Voltamperometría de Redisolución Anódica de Onda Cuadrada combinada con Redes Neuronales (Artificial Neural Networks). Se utilizó como electrodo de trabajo un film de bismuto depositado “in situ” sobre una mina de lápiz comercial. Los parámetros de Onda Cuadrada se optimizaron empleando un diseño de experimento Box-Behnken y la función de deseabilidad.

Se analizaron muestras de propóleos provenientes del sudoeste de la Provincia de Buenos Aires y los resultados obtenidos fueron validados empleando un ensayo de recuperación, lográndose resultados satisfactorios.

El método propuesto es simple y de bajo costo, debido al empleo de una mina de lápiz comercial como electrodo de trabajo, que requiere un mínimo tratamiento de su superficie. Por otro lado, el método contribuye con los objetivos de la Química Verde ya que emplea bismuto para la etapa de electrodeposición de los metales, siendo este compuesto de baja toxicidad. Además, presenta las ventajas de bajo consumo de reactivos y muestra, y mínima generación de residuos.

3.5. Referencias

- [1] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, 3th ed., WILEY-VCH 2006 Capítulo I.
- [2] G. C. Barker, I. L. Jenkins, *Analyst*, 77 (1952) 685.
- [3] J. Osteryoung, R. Osteryoung, *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 101.
- [4] L. C. Martiniano, V. R. Abrantes, S. Y. Neto, E. P. Marques, T. C. O. Fonseca, L. L. Paim, A. G. Souza, N. R. Stradiotto, R. Q. Aucélio, G. H. R. Cavalcante, A. L.B. Marques, *Fuel*, 103 (2013) 1164.
- [5] N. Serrano, J. M. Diaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 560 (2003) 105.
- [6] A. H. Rahier, S. Lunardi, F. Nicolle, S. M. George, *Talanta*, 82 (2010) 1839.
- [7] J. A. Rodrigues, C. M. Rodrigues, P. J. Almeida, I. M. Valente, L. M. Goncalves, R. G. Compton, A. A. Barros, *Analytica Chimica Acta*, 701 (2011) 152.
- [8] C. M. A. Brett, A. M. Oliveira Brett, F. M. Matysik, S. Matysik, S. Kumbhat, *Talanta*, 43 (1996) 7015.
- [9] E. Fischer, C. M.G. Van Den Berg, *Analytica Chimica Acta*, 385 (1999) 273.
- [10] J. Wang, J. Lu, S. B. Hocevar, P. A. M. Farias, *Analytical Chemistry*, 72 (2000) 3218.
- [11] J. Wang, *Electroanalysis*, 17 (2005) 1341.
- [12] A. Economou, *Trends in Analytical Chemistry*, 24 (2005) 334.
- [13] I. Svancara, C. Prior, S. B. Hocevar, J. Wang, *Electroanalysis*, 22 (2010) 1405.
- [14] D. Yang, L. Wang, Z. Chen, M. Megharaj, R. Naidu, *Electrochimica Acta*, 132 (2014) 223.
- [15] K. Keawkim, S. Chuanwatanakul, O. Chailapakul, S. Motomizu, *Food Control*, 31 (2013) 14.
- [16] W. Siriangkhawut, S. Pencharee, K. Grudpan, J. Jakmunee, *Talanta*, 79 (2009) 1118.
- [17] Z. Wang, H. Wang, Z. Zhang, G. Liu, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 199 (2014) 7.
- [18] G. H. Hwang, W. K. Han, J. S. Park, S. G. Kang, *Talanta*, 76 (2008) 301.

- [19] Y. Wu, N. B. Li, H. Q. Luo, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 133 (2008) 677.
- [20] K. C. Armstrong, C. E. Tatum, R. N. Dansby-Sparks, J. Q. Chambers, Z. L. Xue, *Talanta*, 82 (2010) 675.
- [21] H. Xu, L. Zeng, D. Huang, Y. Xian, L. Jin, *Food Chemistry*, 109 (2008) 834.
- [22] B. K. Lee, *Safety and Health at Work*, 2 (2011) 87.
- [23] R. E. Green, D. J. Pain, *Food and Chemical Toxicology*, 50 (2012) 4180.
- [24] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs379/es/>
- [25] R. A. Laskar, I. Sk, N. Roy, N. A. Begum, *Food Chemistry*, 122 (2010) 233.
- [26] S. Bogdanov, *Apidologie*, 37 (2006) 1.
- [27] A. Sales, A. Alvarez, M. Rodriguez Areal, L. Maldonado, P. Marchisio, M. Rodríguez, E. Bedascarrasbure, *Journal of Hazardous Materials A*, 137 (2006) 1352.
- [28] AOAC – Association of Official Analytical Chemists, *Official Methods of Analysis*, 15th ed. AOAC International, Gaithersburg, 1993 Methods 934.07.
- [29] Norma IRAM-INTA 15935-1-PROPOLEOS BRUTO.
- [30] F. Torma, M. Kadar, K. Toth, E. Tatar, *Analytica Chimica Acta*, 619 (2008) 173.
- [31] L. Y. Cao, J.B. Jia, Z.H. Wang, *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 2177.
- [32] L. Baldrianova, I. Svancara, M. Vlcek, A. Economou, S. Sotiropoulos, *Electrochimica Acta*, 52 (2006) 481.
- [33] J. C. Miller, J. N. Miller, *Estadística para química analítica*, 2th ed. E.U.A.:Addison-Wesley Iberoamericana , S.A., Wilmington, Delaware, 1993 Capítulo 5.
- [34] J. Serra Bonvehí, F.J. Orantes Bermejo, *Environmental Monitoring and Assessment*, 185 (2013) 6035.
- [35] M. G. A. Korn, M. A. B. Guida, J. T. P. Barbosa, E. A. Torres, A. P. Fernandes, J. C. C. Santos, K. G. F. Dantas, J. A. Nóbrega, *Food Analytical Methods*, 6 (2013) 872.
- [36] S. Gong, L. Luo, W. Gong, Y. Gao, M. Xie, *Food Chemistry*, 134 (2012) 583.
- [37] M. A. Cantarelli, J. M. Camiña, E. M. Pettenati, E. J. Marchevsky, R. G. Pellerano, *LW T - Food Science and Technology*, 44 (2011) 256.

- [38] K. Crowley, J. Cassidy, *Electroanalysis*, 14 (2002) 1077.
- [39] W. Maret, H. H. Sandstead, *J. of trace elem. in med. and biology*, 20 (2006) 3.
- [40] D. Finger, I. Kelte Filho, Y. R. Torres, S. P. Quinaia, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 92 (2014) 259.
- [41] G. E. P Box, D. W. Behnken, *Technometrics*, 2 (1960) 455.
- [42] G. D. Pierini, A. M. Granero, M. S. Di Nezio, M. E. Centurión, M. A. Zon, H. Fernandez, *Microchemical Journal*, 106 (2013) 102.
- [43] G. Derringer, R. Suich, *Journal of Quality Technology*, 12 (1980) 214.
- [44] G. Derringer, *Quality Progress*, 6 (1994) 51.
- [45] M. Azharul Islam, Vasilios Sakkas, Triantafyllos A. Albanis, *Journal of Hazardous Materials*, 170 (2009) 230.
- [46] J. Aybar Munoz, R.G. Brereton, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 43 (1998) 89.
- [47] J. Engel, J. Gerretzen, E. Szymańska, J. J. Jansen, G. Downey, L. Blanchet, L. M.C. Buydens, *Trends in Analytical Chemistry*, 50 (2013) 96.
- [48] P.H.C. Eilers, *Analytical Chemistry*, 76 (2004) 404.
- [49] J. Peng, S. Peng, A. Jiang, J. Wei, C. Li, J. Tan, *Analytica Chimica Acta*, 683 (2010) 63.
- [50] V. Mirceski, B. Sebez, M. Jancovska, B. Ogorevc, S. B. Hocevar, *Electrochimica Acta*, 105 (2013) 254.
- [51] V. Mirceski, S. B. Hocevar, B.r Ogorevc, R. Gulaboski, I. Drangov, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 4429.
- [52] N. Vest Nielsen, J. M.I Carstensen, J. Smedsgaard, *Journal of Chromatography A*, 805 (1998) 17.
- [53] G. Tomasi, F. van den Berg, C. Andersson, *Journal of Chemometrics*, 18 (2004) 231.
- [54] A. C. Olivieri, H. C. Goicochea, *La calibración en Química Analítica*, Centro de Publicaciones de la Universidad Nacional del Litoral, Capitulo 7.
- [55] W. J. Yi, Y. Li, G. Ran, H. Q. Luo, N. B. Li, *Sensors and Actuators B*, 167 (2012) 544.
- [56] J. H. Luo, X. X. Jiao, N. B. Li, H. Q. Luo, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 689 (2013) 130.

- [57] H. Li, J. Li, Z. Yang, Q. Xu, C. Hou, J.n Peng, X. Hu, *Journal of Hazardous Materials*, 191 (2011) 26.
- [58] D. Yang, L. Wang, Z. Chen, M. Megharaj, R. Naidu, *Electroanalysis*, 25 (2013) 2637.
- [59] S. N. Robledo, V. G. L. Zachetti, M. A. Zon, H. Fernández, *Talanta*, 116 (2013) 964.
- [60] B. G. Kermani, S. S. Schiffman, H. T. Nagle, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 110 (2005) 13.

Capítulo 4

**Desarrollo de un electrodo
compuesto para ser aplicado en
técnicas voltamperométricas**

4.1. Objetivo

El objetivo de este trabajo consistió en desarrollar un electrodo compuesto de bajo costo y que requiera mínimo acondicionamiento de su superficie, para ser utilizado en técnicas voltamperométricas. Para ello, se sintetizó un sistema vítreo a partir de óxidos de telurio y vanadio con micropartículas de grafito.

4.2. Introducción

4.2.1. Electrodo de trabajo

La elección de un electrodo de trabajo adecuado para ser utilizado en técnicas electroquímicas, es de gran importancia. Este debe proporcionar una elevada relación señal/ruido y respuestas reproducibles. Se deben tener en cuenta además algunos factores tales como el comportamiento redox del analito y de la corriente de base, la conductividad eléctrica del electrodo, reproducibilidad de la superficie, propiedades mecánicas, costo, disponibilidad y toxicidad. Otro factor importante de los electrodos de trabajo, es su geometría [1, 2].

Los materiales más utilizados como electrodos de trabajo son: mercurio [3, 4], carbón [5, 6] y metales nobles (principalmente oro y platino) [7, 8]. En la Figura 4.1 se presenta la ventana de potencial para algunos electrodos de trabajo en distintos solventes.

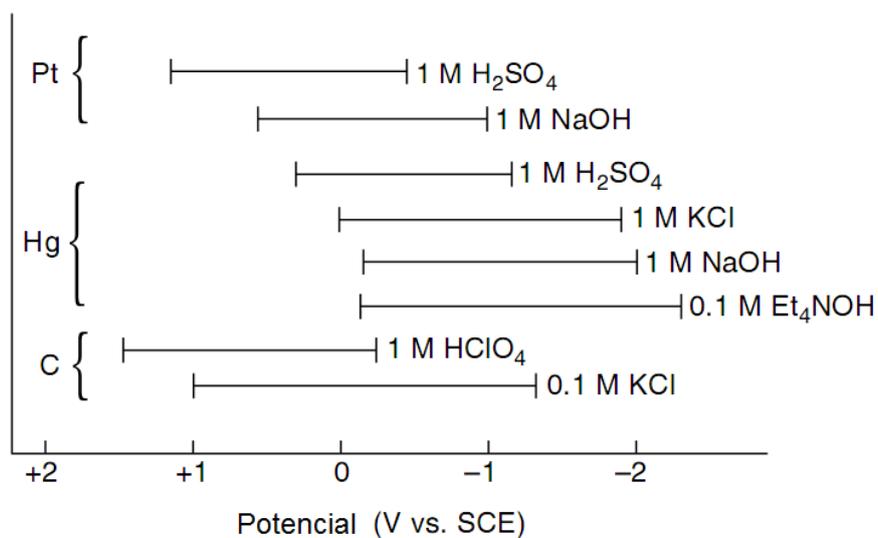


Figura 4.1. Ventana de potencial para distintos electrodos de trabajo en distintos electrolitos soporte

Un factor importante a tener en cuenta en el uso de los electrodos sólidos es la dependencia que posee la respuesta (intensidad de corriente) con respecto al estado de la superficie del electrodo. Estos electrodos requieren superficies reproducibles por lo que es necesario realizar pretratamientos antes de ser utilizados. La naturaleza de estos pretratamientos depende de los materiales, pudiendo involucrar procesos de pulido mecánico como el pulido con pasta de diamante o alúmina, las activaciones electroquímicas (aplicando sucesivos ciclos con voltamperometría cíclica), o las activaciones térmicas o termoquímicas [9].

4.2.2. Electrodos Compuestos

En la modificación de la superficie de los electrodos de trabajo para mejorar sus propiedades intrínsecas y la detección (aumento del área electroquímica, mayor sensibilidad y selectividad, etc.), se emplean varios compuestos tales como nanotubos de carbón [10], líquidos iónicos [11], nanotubos de titanio [12],

quitosano [13], bismuto [14], nanopartículas [15], grafito [16] y polímeros conductores [17, 18], etc.

Existe en la literatura gran cantidad de trabajos donde emplean materiales compuestos para el desarrollo de electrodos de trabajo [19 - 21], con el consecuente beneficio de un aumento de la sensibilidad y selectividad. Se pueden definir a los electrodos compuestos como un material que consiste en al menos una fase conductora y una fase aislante, con diferentes propiedades complementarias (químicas, mecánicas y físicas). Las ventajas de estos electrodos incluyen su versatilidad para obtener diferentes tamaños, formas y configuraciones y muestran una alta relación señal/ruido con respecto al electrodo conductor puro correspondiente [1]. El diseño de este tipo de electrodos, usando nuevos materiales que sean económicos, fáciles de preparar y que no requieran pretratamiento, sería un importante aporte al desarrollo de la electroanalítica, pudiendo reemplazar a los electrodos de trabajo convencionales. Dentro de estos materiales, los sistemas vítreos formados por óxido de telurio y óxidos de metales de transición, como V_2O_3 , MoO_5 , CuO , muestran apropiadas propiedades eléctricas y pueden aumentar la conductividad iónica, etc. [22 - 24]. Estos materiales son una alternativa para su empleo como electrodos de trabajo.

4.3. Materiales y métodos

4.3.1. Instrumentación

Para las medidas electroquímicas se empleó un potenciostato Epsilon, (BASi-Bioanalytical System, USA) con una celada de tres electrodos. Como electrodo de trabajo se utilizaron los diferentes sistemas vítreos desarrollados, un electrodo de carbono vítreo (BAS) y un electrodo de carbono pirolítico altamente ordenado (HPGO). Se utilizó como electrodo de referencia, en todos los casos $Ag/AgCl$ (3 M NaCl) y un contraelectrodo de platino. Las medidas de

impedancia se realizaron en un Impedancímetro Agilent 4284A LCR meter con un rango de frecuencias de 20 Hz a 1 MHz.

Se utilizó para caracterizar el sistema vítreo un Difractómetro de Rayos-X PW1710 BASED con ánodo de cobre. Las muestras fueron expuestas a la radiación Cu K α ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) a temperatura ambiente en un rango de 2θ : $3^\circ - 60^\circ$. Por otro lado para realizar las medidas de fluorescencia de Rayos-X se empleó un Espectrómetro de Fluorescencia de Rayos-X PANalytical MagiX (ánodo de rodio, atmosfera de helio, y cristales de LiF 200 y 220, PX1, PX4, PE).

Se tomaron imágenes de los sistemas vítreos, utilizando un microscopio óptico de luz polarizada Nikon Eclipse E-200 POL.

La determinación del tamaño de partícula del grafito se realizó con un Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950.

4.3.2. Reactivos y soluciones

Todas las soluciones se prepararon disolviendo la cantidad correspondiente de cada reactivo en agua ultra pura ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtenida mediante un sistema Milli-Q. Además, todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

- Óxido de telurio (99,999 % de pureza, Sigma-Aldrich)
- Óxido de vanadio (99.9% de pureza, CERAC)
- Ferrocianuro de potasio tri-hidratado (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de potasio (Merck)
- Ácido ascórbico (Sigma)
- Fosfato monobásico de sodio y fosfato di básico de potasio (Sigma) fueron utilizados para preparar una solución reguladora de fosfato de sodio 0,050 M (pH 7,4)
- Grafito, obtenido de un comercio local

4.3.3. Síntesis del sistema vítreo

Para realizar la síntesis del sistema vítreo conformado por óxido de telurio, óxido de vanadio y partículas micrométricas de grafito, se utilizó la metodología de “*quenching*” [25]. Se desarrollaron los electrodos correspondientes a los sistemas $x\text{C}$ [$0,6\text{V}_2\text{O}_5$ $0,4\text{TeO}_2$], donde x es la proporción de grafito comercial. Se estudiaron sistemas con valores de x de 0,1, 2, 3, 4, 6 y 8 % [22, 23]. Para obtener el sistema vítreo, se mezclaron en un crisol de porcelana, las cantidades adecuadas de los óxidos inorgánicos y grafito a fin de obtener un peso total de 2 gramos. Se mezcla en forma vigorosa y se coloca el crisol en una mufla a $850\text{ }^\circ\text{C}$ durante 45 minutos. Se debe tener la precaución de homogeneizar la mezcla cada 15 minutos. El procedimiento desarrollado se puede observar en la Figura 4.2.

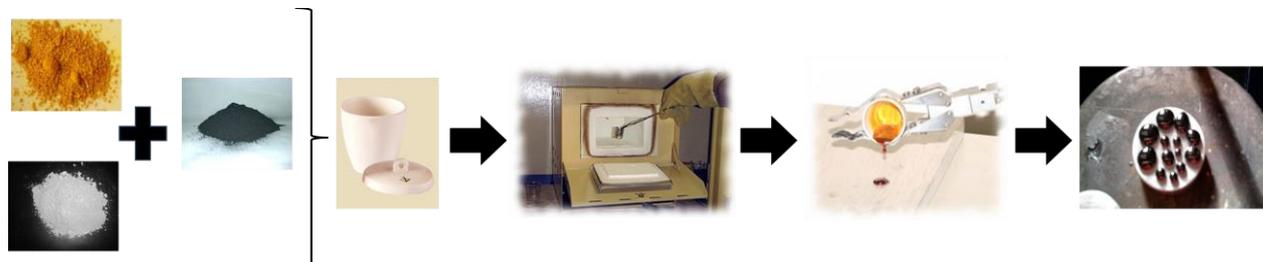


Figura 4.2. Representación esquemática del proceso de síntesis del sistema vítreo.

Transcurridos los 45 minutos, se dejan caer unas gotas del material sobre una placa de aluminio que se encuentra a temperatura ambiente para obtener pequeñas “gotas”. Estas serán utilizadas para realizar la caracterización estructural (Fluorescencia de Rayos-X, Rayos-X y Microscopía óptica), previa molienda en mortero de ágata. Para obtener los electrodos de trabajo (New Working Electrode NWE), se calienta un alambre de platino, de manera que al

ponerlo en contacto con una porción del material, el mismo se adhiera generándose una gota en el extremo del alambre. De esta forma se obtuvieron los electrodos de trabajo con diferentes porcentajes de grafito: NWE0, NWE1, NWE2, NWE3, NWE 4, NWE6 y NWE8.

A fin de realizar las medidas de conductividad en el Impedancímetro, las gotas de material obtenidas se pulen con una lija al agua, hasta obtener una pastilla de un espesor menor a 1mm.

4.4. Resultados y discusión

4.4.1. Caracterización del grafito

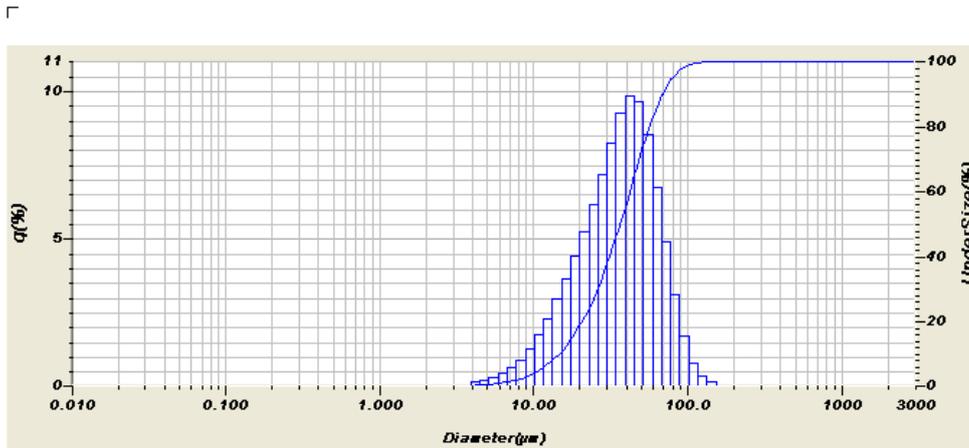
Para determinar el tamaño promedio de las partículas de grafito comercial, se utilizó la técnica de Scattering Particle Size Distribution (distribución de partículas). El tamaño de partícula medio obtenido fue de 36,7 micrómetros, como se puede apreciar en la Figura 4.3.

2012.12.07 15:04:03

HORIBA

Laser Scattering Particle Size Distribution Analyzer LA-950

Sample Name	: grafito comercial	Median Size	: 36.70486(µm)
ID#	: 201212071458857	Mean Size	: 39.90418(µm)
Data Name	: grafito comercial	Variance	: 469.82(µm ²)
Feeder	: OFF	Std.Dev.	: 21.6754(µm)
Form of Distribution	: Auto	Mode Size	: 42.0967(µm)
Distribution Base	: Volume	Geo.Mean Size	: 33.9875(µm)
Material	: Mara	Geo.Variance	: 1.1685(µm ²)
Lot Number	:	D(v,0.1)	: 14.79239(µm)
Remarks 1	:	D(v,0.5)	: 36.70486(µm)
		D(v,0.9)	: 69.09335(µm)
		Chi Square	: 0.007232



No.	Blave (µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Blave (µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Blave (µm)	q(%)	UnderSize(%)	No.	Blave (µm)	q(%)	UnderSize(%)
1	0.011	0.000	0.000	25	0.296	0.000	0.000	49	7.697	0.399	1.553	73	200.000	0.000	100.000
2	0.013	0.000	0.000	26	0.339	0.000	0.000	50	8.816	0.869	2.422	74	229.075	0.000	100.000
3	0.015	0.000	0.000	27	0.389	0.000	0.000	51	10.097	1.229	3.651	75	262.376	0.000	100.000
4	0.017	0.000	0.000	28	0.445	0.000	0.000	52	11.565	1.701	5.352	76	300.518	0.000	100.000
5	0.020	0.000	0.000	29	0.510	0.000	0.000	53	13.246	2.272	7.624	77	344.206	0.000	100.000
6	0.022	0.000	0.000	30	0.584	0.000	0.000	54	15.172	2.921	10.545	78	394.244	0.000	100.000
7	0.025	0.000	0.000	31	0.669	0.000	0.000	55	17.377	3.630	14.175	79	451.696	0.000	100.000
8	0.029	0.000	0.000	32	0.766	0.000	0.000	56	19.904	4.389	18.565	80	517.200	0.000	100.000
9	0.034	0.000	0.000	33	0.877	0.000	0.000	57	22.797	5.213	23.778	81	592.387	0.000	100.000
10	0.039	0.000	0.000	34	1.005	0.000	0.000	58	26.111	6.129	29.907	82	678.604	0.000	100.000
11	0.044	0.000	0.000	35	1.151	0.000	0.000	59	29.907	7.149	37.056	83	777.141	0.000	100.000
12	0.051	0.000	0.000	36	1.318	0.000	0.000	60	34.285	8.237	45.293	84	890.116	0.000	100.000
13	0.058	0.000	0.000	37	1.510	0.000	0.000	61	39.234	9.247	54.540	85	1019.515	0.000	100.000
14	0.067	0.000	0.000	38	1.729	0.000	0.000	62	44.938	9.809	64.380	86	1167.725	0.000	100.000
15	0.076	0.000	0.000	39	1.981	0.000	0.000	63	51.471	9.616	73.965	87	1337.481	0.000	100.000
16	0.087	0.000	0.000	40	2.269	0.000	0.000	64	58.953	8.517	82.482	88	1531.914	0.000	100.000
17	0.100	0.000	0.000	41	2.599	0.000	0.000	65	67.523	6.892	89.174	89	1754.613	0.000	100.000
18	0.115	0.000	0.000	42	2.976	0.000	0.000	66	77.339	4.877	94.051	90	2009.687	0.000	100.000
19	0.131	0.000	0.000	43	3.409	0.000	0.000	67	88.583	3.097	97.148	91	2301.841	0.000	100.000
20	0.150	0.000	0.000	44	3.905	0.000	0.000	68	101.460	1.695	98.803	92	2636.467	0.000	100.000
21	0.172	0.000	0.000	45	4.472	0.111	0.111	69	116.210	0.755	99.598	93	3000.000	0.000	100.000
22	0.197	0.000	0.000	46	5.122	0.173	0.284	70	133.103	0.317	99.876				
23	0.226	0.000	0.000	47	5.867	0.266	0.590	71	152.453	0.124	100.000				
24	0.259	0.000	0.000	48	6.720	0.403	0.954	72	174.616	0.000	100.000				

Figura 4.3. Determinación del tamaño de la partícula de grafito

4.4.2. Caracterización del sistema vítreo

4.4.2.1. Estudios estructurales

Se corroboró el estado amorfo de las muestras vítreas sintetizadas mediante la técnica de Rayos X. En la Figura 4.4 se muestran los difractogramas de un sistema vítreo sin grafito y los correspondientes a dos proporciones diferentes del mismo.

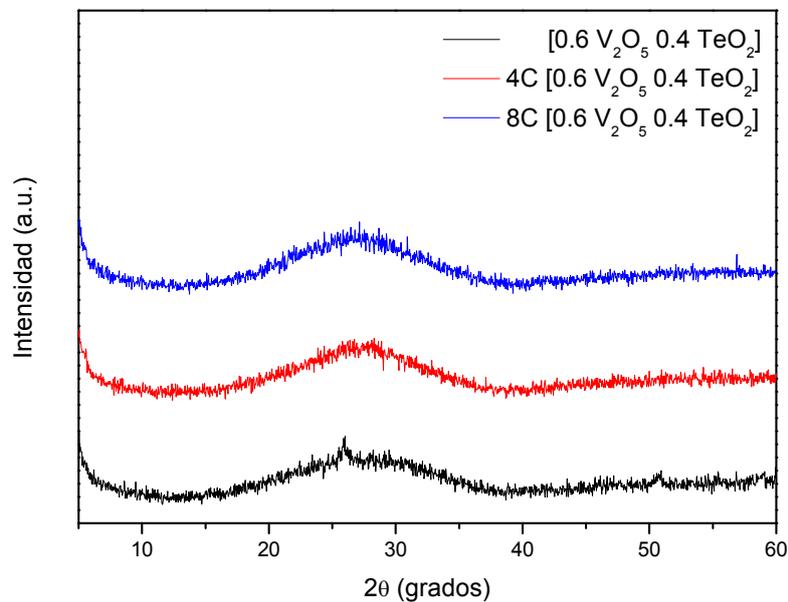
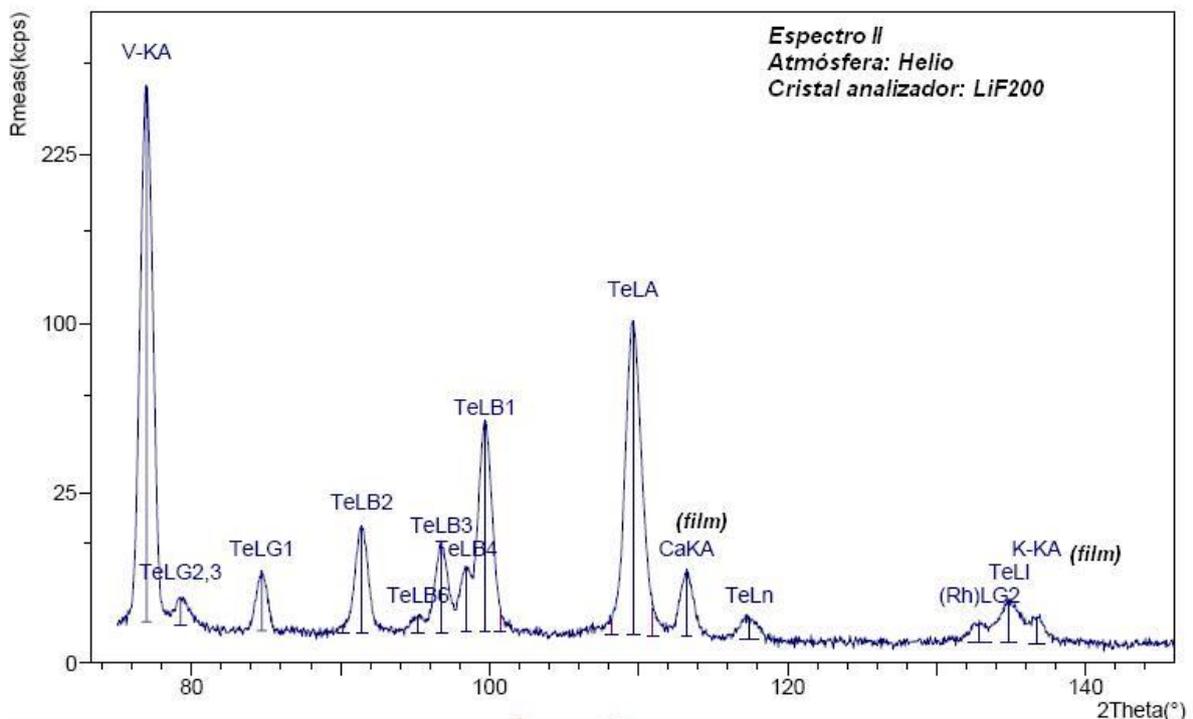
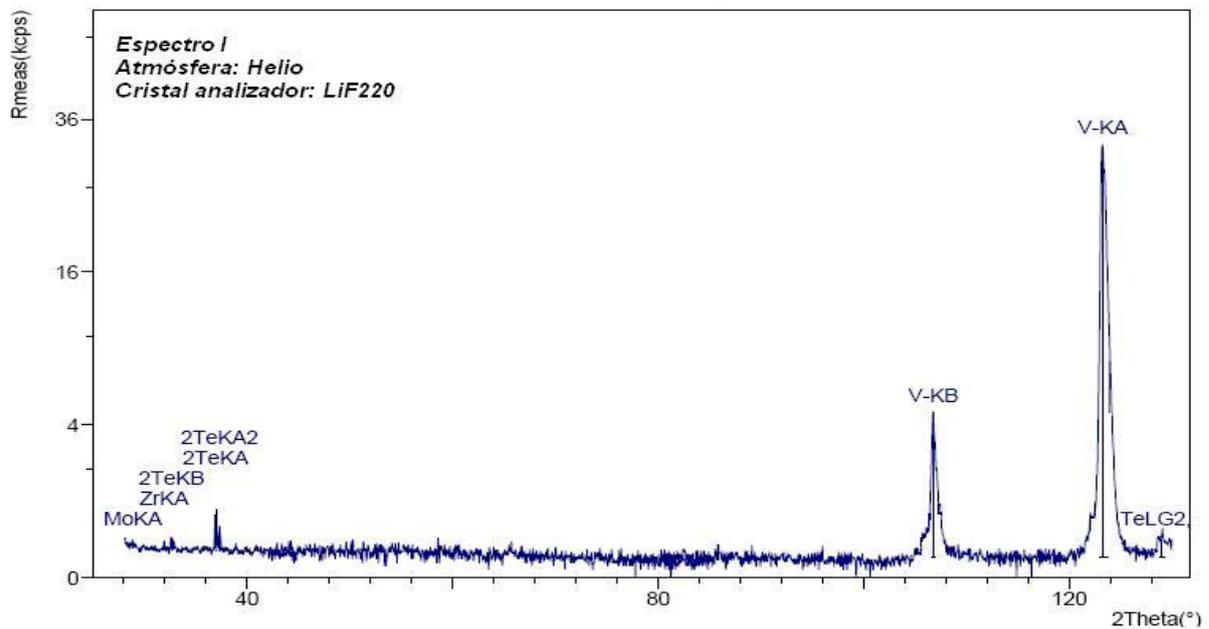


Figura 4.4. Difractograma de rayos X para tres sistemas sintetizados

La carencia de picos intensos y agudos, denota la ausencia de cualquier tipo de estructura cristalina. Por lo tanto, la inclusión de grafito en la síntesis de éste tipo de vidrio, no modifica la estructura del mismo. En el difractograma no se observa el pico característico del grafito (que presenta estructura cristalina), debido a que se encuentra en bajas concentraciones y la sensibilidad de la técnica no permite verificar su presencia en la matriz vítreo.

A fin de determinar la composición elemental de los vidrios sintetizados, se realizó un análisis de los sistemas vítreos $[0,6V_2O_5 0,4 TeO_2]$ y $4C [0,6V_2O_5 0,4 TeO_2]$, empleando espectroscopia de Fluorescencia de Rayos X, observándose la presencia de vanadio y telurio, que son los compuestos predominantes en la matriz del sistema. Además, se detectó también molibdeno, zirconio, silicio, como impurezas del grafito comercial utilizado. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.5 y Figura 4.6 para las muestra estudiadas.



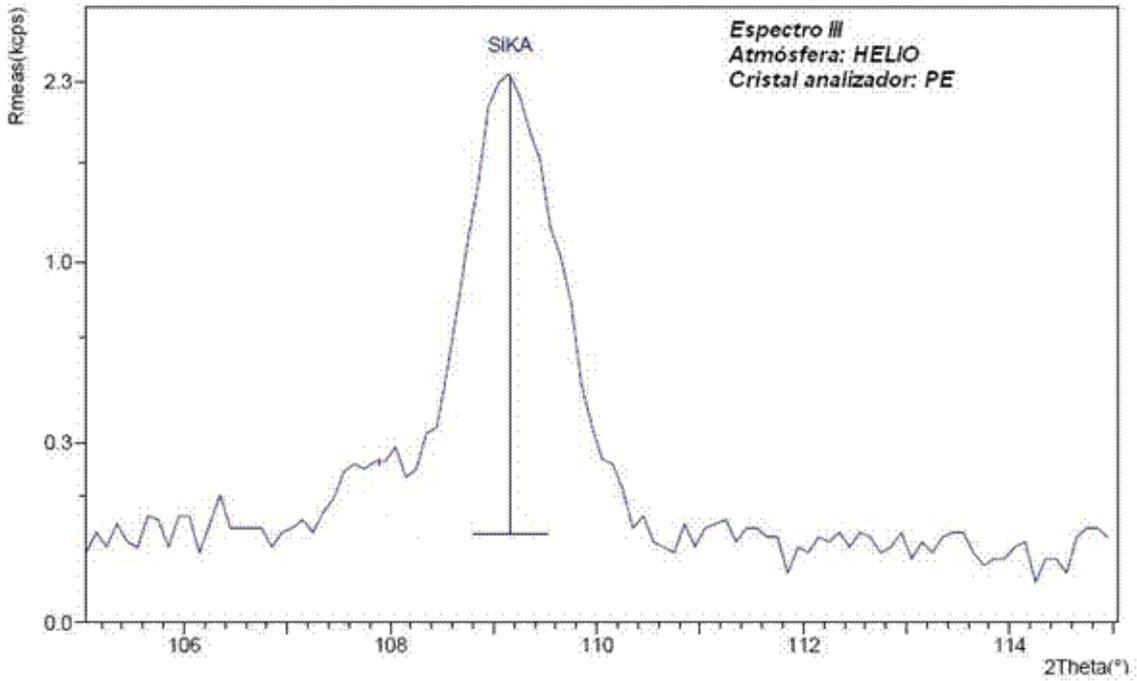
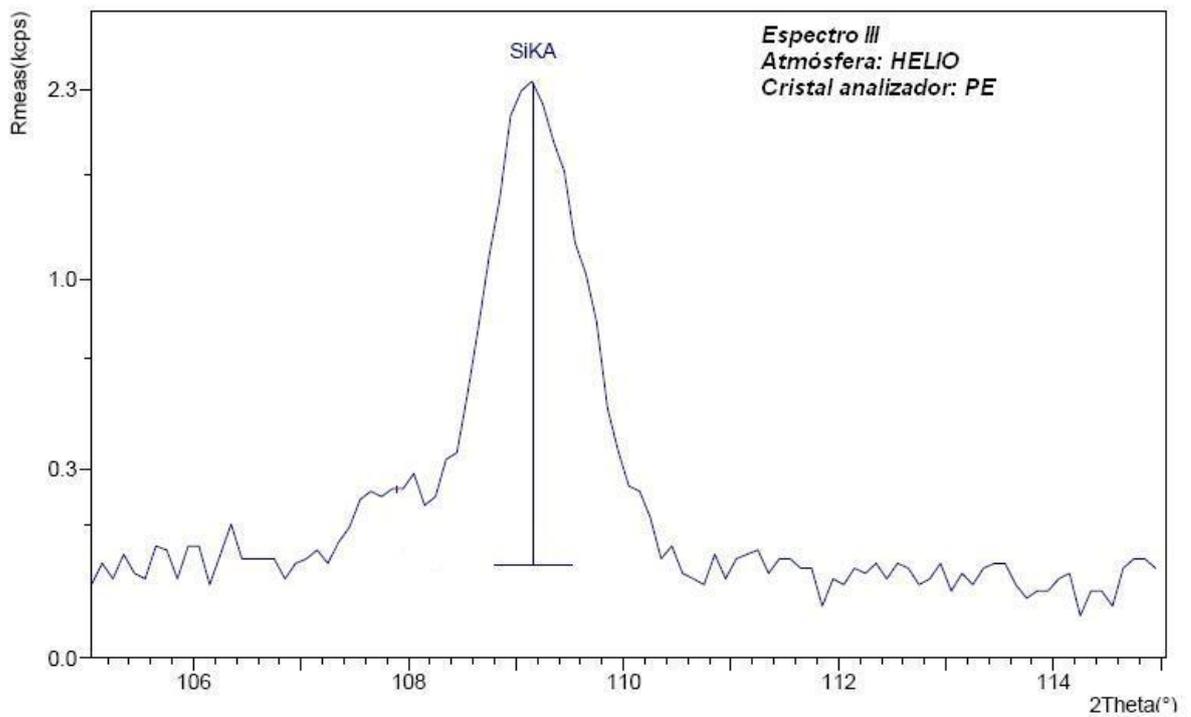


Figura 4.5. Espectros de Fluorescencia de Rayos-X para la muestra con 0% de grafito con distintos cristales analizadores.



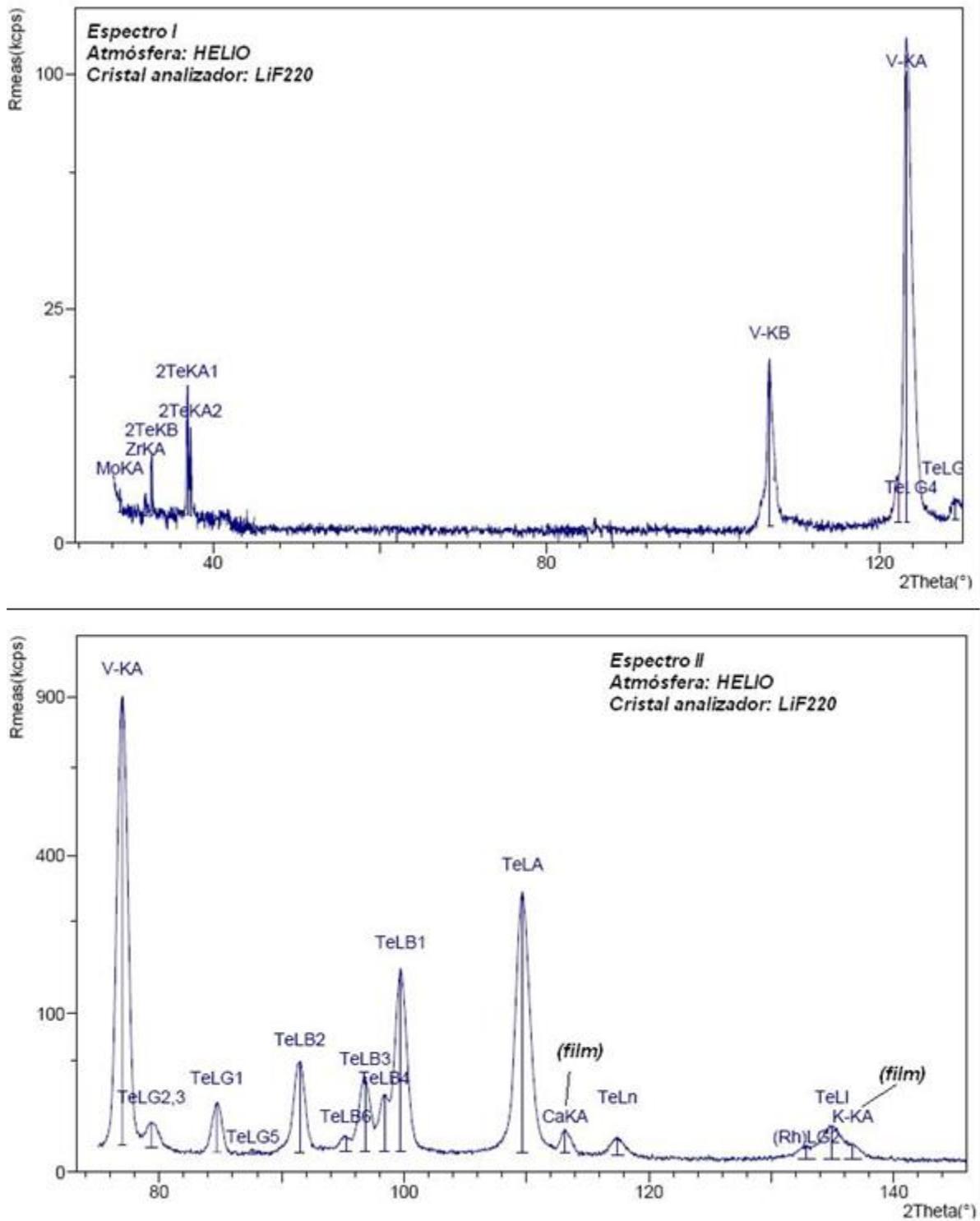


Figura 4.6. Espectros de Fluorescencia de Rayos-X para la muestra con 4% de grafito con distintos cristales analizadores.

Por otro lado se tomaron fotografías empleando un Microscopio de Luz Polarizada acoplado a una cámara fotográfica NIKKON, observándose la presencia de grafito en la matriz vítrea. En la Figura 4.7 a modo de ejemplo, se muestra una fotografía donde se observa las micropartículas de grafito distribuidas al azar en el sistema vítreo.

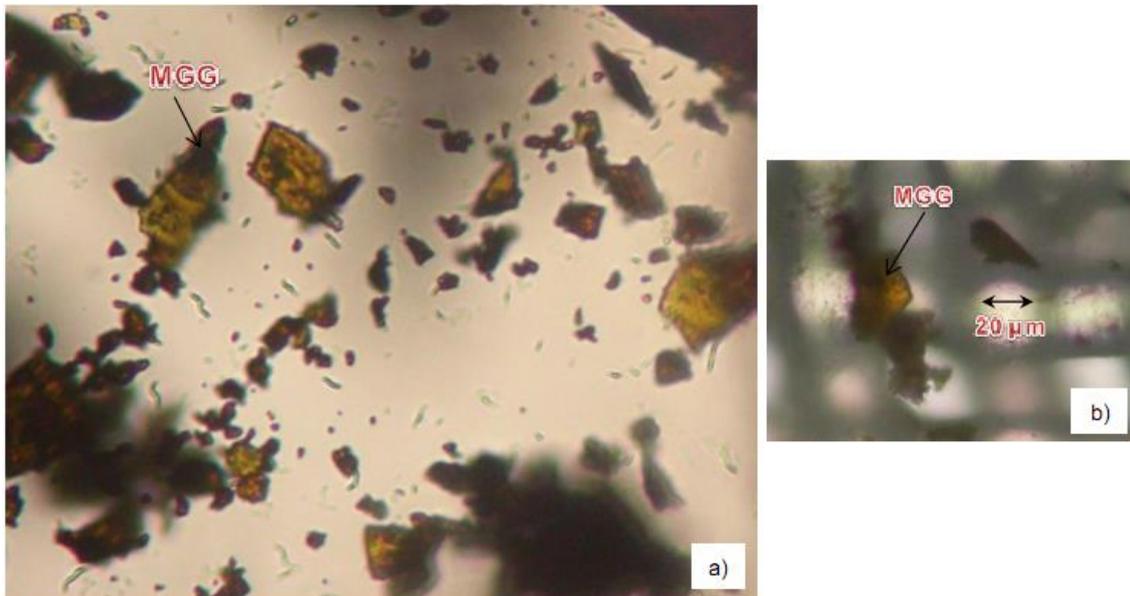


Figura 4.7. a) Micrografía del sistema vítreo 4% donde se observa las micropartículas de grafito (MGG) con 400X. de magnificación b) Sistema vítreo dispuesto sobre una malla de tamaño de poro de aproximadamente 20 µm.

Para determinar las propiedades eléctricas de los sistemas vítreos desarrollados, se realizaron medidas de Módulo de impedancia (Z) en función del ángulo de fase (ϕ) para cada sistema en función de la frecuencia. Estas medidas se realizaron variando la temperatura, debido a que este tipo de sistemas vítreos semiconductores, presentan una dependencia de la conductividad eléctrica en función de la temperatura del tipo Arrhenius [26]:

$$\sigma_{dc} = \frac{\sigma_0}{T} e^{-\left(\frac{E_a}{KT}\right)}$$

Donde E_a es la energía de activación del proceso de conducción, σ_0 es el factor preexponencial, K la constante de Boltzmann y T es la temperatura (expresada en Kelvin). Para analizar la dependencia de la conductividad en función de la temperatura, se realizaron diagramas de Nyquist para los distintos sistemas vítreos desarrollados. Según el comportamiento de Arrhenius, a medida que aumenta la temperatura, disminuye la resistencia del sistema.

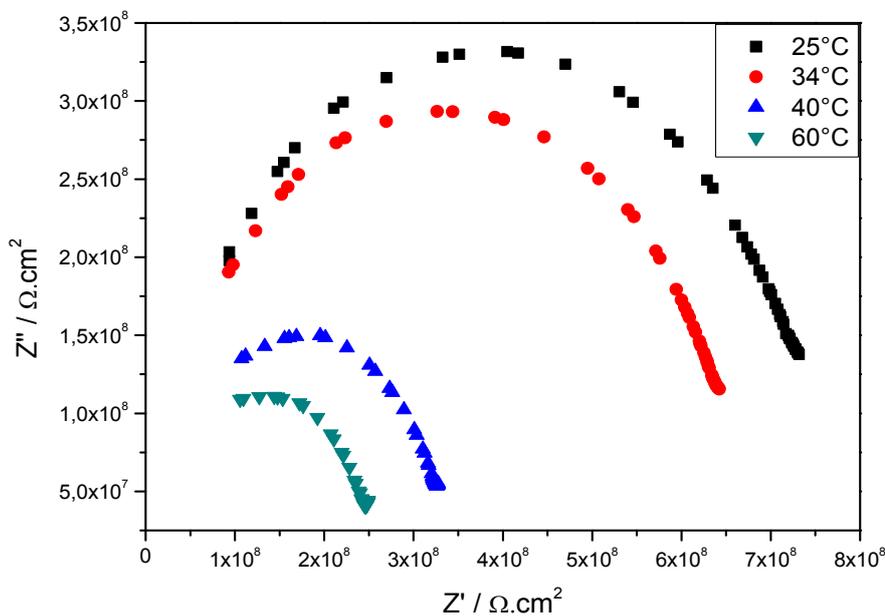


Figura 4.8. Diagrama de Nyquist a diferentes temperaturas para el sistema $x\text{C}[0,6\text{V}_2\text{O}_5\ 0,4\ \text{TeO}_2]$

De la Figura 4.8 se obtuvieron los valores de resistencia para cada sistema a la temperatura de medida. A partir de este dato y con el valor de la constante geométrica de la celda se puede calcular el valor de la conductividad del sistema ($\sigma_T = \text{factor geométrico de la celda} \times R^{-1}_T$) [26]. Se observa también, que un aumento en la temperatura (de 25°C a 60°C), provoca una disminución de la resistencia de aproximadamente 4 veces. En la Figura 4.9, se representa la isoterma de conductividad en función de la fracción molar de grafito.

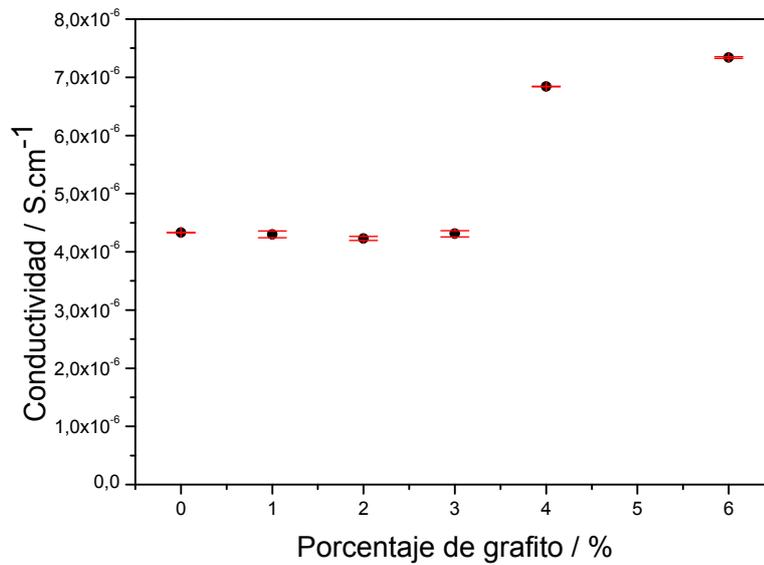


Figura 4.9. Isoterma de conductividad a 298 K en función de la fracción molar de grafito

Los resultados expuestos anteriormente confirman que a medida que se aumenta la proporción de grafito en la matriz vítrea, se produce un aumento en los valores de conductividad obtenidos, por lo tanto el sistema que contiene un 6 % de grafito es el de mayor conductividad. Los valores de conductividad obtenidos con estos nuevos sistemas, no difieren mucho de los valores obtenidos para materiales de carbón de uso común como electrodos de trabajo [27]. Rui y col., observaron el mismo comportamiento cuando se añade baja concentración de carbón en un sistema vítreo [28]. Los valores de conductividad correspondientes a un porcentaje de grafito mayor a 8% no se pudieron obtener ya que presentan alta fragilidad mecánica, lo que dificultó realizar las medidas.

4.4.2.2. Caracterización electroquímica

A fin de caracterizar la respuesta electroquímica de los nuevos electrodos diseñados, se estudiaron las siguientes cuplas redox: ferrocianuro de potasio y ácido ascórbico.

- **Ferrocianuro de potasio**

Se estudió la respuesta de estos nuevos electrodos diseñados, frente a una solución de ferrocianuro de potasio 2,5 mM en 0,1 M de cloruro de potasio como electrolito soporte, empleando voltamperometría cíclica. Se analizó la respuesta de estos nuevos electrodos de trabajo (NWE) en función de la velocidad de barrido (10 - 100 mV s⁻¹).

Los parámetros obtenidos (Potencial de pico anódico (E_{pa}), Potencial de pico catódico (E_{pc}), Densidad de corriente del pico anódico (J_{pa}), Densidad de corriente del pico catódico (J_{pc}), Diferencia de potencial entre el pico anódico y el pico catódico (ΔE)) de los voltogramas correspondientes a cada sistema NWE4, NWE6 y NWE8, en función de las diversas velocidades de barrido estudiadas, se presentan en la Tabla 4.1.

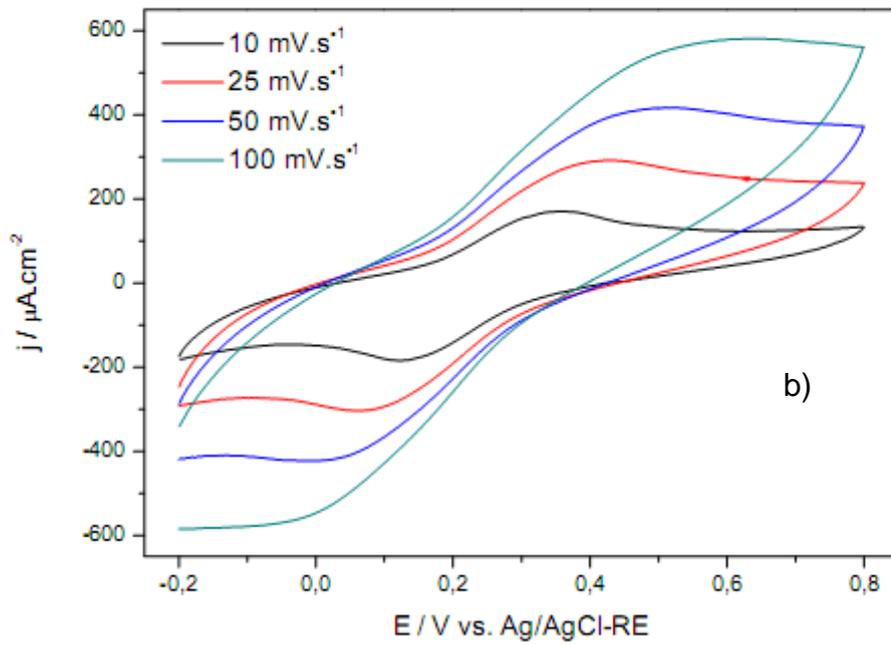
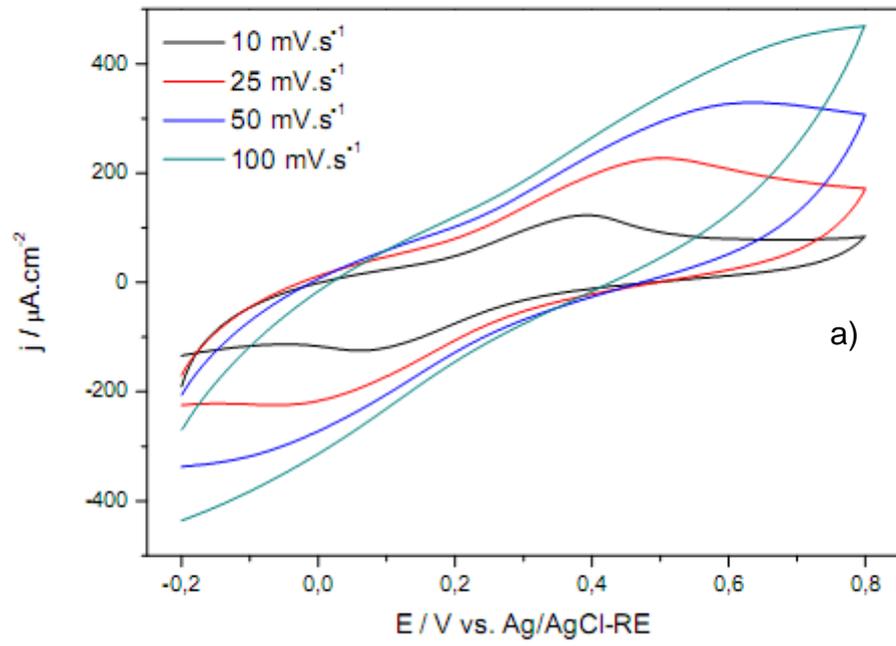
Tabla 4.1. Valores de E_{pa} , E_{pc} , J_{pa} , J_{pc} , ΔE , en función de las velocidades de barrido, empleando ferrocianuro de potasio

	NEW 4					NEW 6					NEW 8				
Velocidad de barrido [mV s ⁻¹]	E_{pa} [V]	E_{pc} [V]	ΔE [V]	J_{pa} [μA cm ⁻²]	J_{pc} [μA cm ⁻²]	E_{pa} [V]	E_{pc} [V]	ΔE [V]	J_{pa} [μA cm ⁻²]	J_{pc} [μA cm ⁻²]	E_{pa} [V]	E_{pc} [V]	ΔE [V]	J_{pa} [μA cm ⁻²]	J_{pc} [μA cm ⁻²]
10	0,392	0,0601	0,33	123	-125	0,358	0,125	0,23	170	-184	0,324	0,140	0,18	113	-101
25	0,503	-0,0697	0,51	227	-225	0,435	0,0610	0,37	292	-304	0,381	0,100	0,28	191	-171
50	0,634	-0,173	0,81	328	-334	0,518	-0,0136	0,53	418	-423	0,442	0,0393	0,40	270	-250
100	0,773	-0,192	0,97	465	-433	0,636	-0,144	0,78	581	-582	0,526	-0,0421	0,57	383	-352

Analizando los valores obtenidos, se observa que a medida que aumenta la velocidad de barrido, la diferencia de potencial entre el pico anódico y catódico (ΔE) aumenta. Esto se debe a que el material desarrollado, tiene una lenta transferencia de carga, generando a mayores velocidades de barrido, un incremento en el ΔE . También se observa que un aumento en la concentración de grafito en el sistema, genera una disminución en el ΔE , a una determinada velocidad de barrido. Esto indica que en el electrodo NWE8, la reacción es más reversible y posee mayor velocidad de transferencia electrónica.

Para todos los sistemas en estudio, se observó que la corriente de pico anódica es proporcional a la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, indicando que el proceso redox del ferrocianuro de potasio está controlado por difusión. Por ejemplo, para el NWE6, la ecuación de la recta que se obtiene de graficar I_{pa} vs $v^{1/2}$ es: $I_{pa} = 0,061 v^{1/2} - 0,015$ ($R^2 = 0,999$). Además, la relación entre las corrientes de pico anódico y catódico (I_{pa}/I_{pc}) fue cercana a la unidad para todas las velocidades de barrido.

En la Figura 4.10 se presentan los voltogramas registrados para la cupla del ferrocianuro de potasio, para los distintos sistemas vítreos obtenidos en función de la velocidad de barrido. Para poder comparar las corrientes obtenidas para cada electrodo, se trabajó con la densidad de corriente "J" (corriente/área). Todos los voltogramas se realizaron entre -0,2 V a 0,8 V (vs Ag/AgCl-RE).



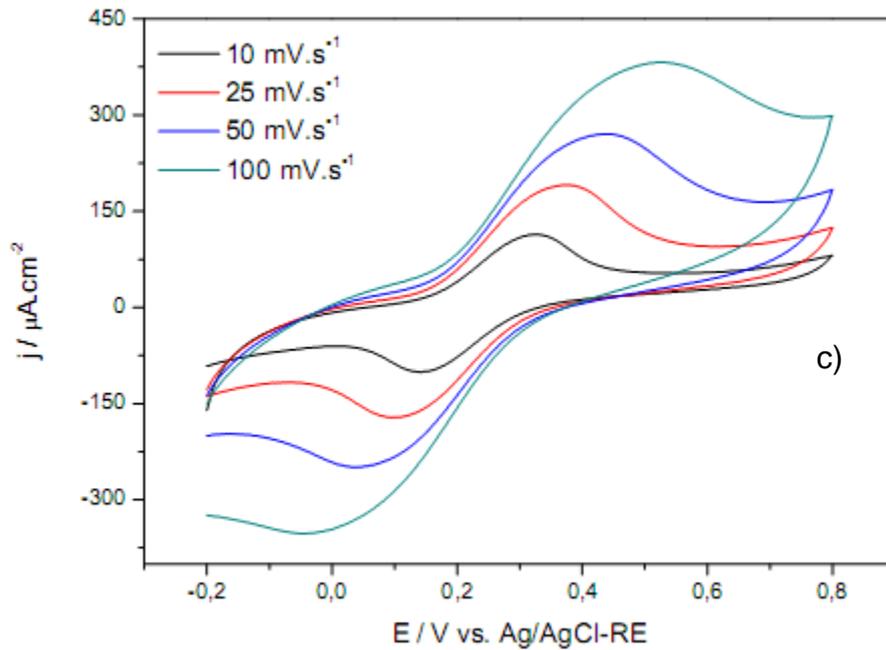


Figura 4.10. Voltagramas cíclicos de los diferentes NWE a diferentes velocidades de barrido para el sistema ferrocianuro de potasio a) NWE4 b) NWE6 c) NWE8

Los voltagramas correspondientes a los sistemas NWE0, NWE1, NWE2, NWE3, no presentaron respuesta electroquímica. Esto puede deberse a la baja concentración de grafito en los mismos, siendo de esta manera, menos conductores (Figura 4.9).

En la Tabla 4.2, se muestran las respuestas obtenidas a la cupla ferrocianuro de potasio utilizando un electrodo de carbono vítreo y un electrodo de carbono pirolítico altamente ordenado, ambos de procedencia comercial.

Tabla 4.2. Valores de E_{pa} , E_{pc} , J_{pa} , J_{pc} , ΔE , en función de las velocidades de barrido, empleando la cupla ferrocianuro de potasio para electrodos comerciales

Velocidad de barrido [mV s ⁻¹]	Carbono pirolítico altamente ordenado					Carbono vítreo				
	E_{pa} [V]	E_{pc} [V]	ΔE [V]	J_{pa} [μA cm ⁻²]	J_{pc} [μA cm ⁻²]	E_{pa} [V]	E_{pc} [V]	ΔE [V]	J_{pa} [μA cm ⁻²]	J_{pc} [μA cm ⁻²]
10	0,277	0,181	0,096	167	-135	0,254	0,185	0,069	156	-126
25	0,286	0,172	0,11	257	-210	0,254	0,182	0,072	221	-221
50	0,295	0,168	0,13	373	-288	0,257	0,186	0,071	406	-368
100	0,310	0,155	0,15	524	-392	0,258	0,184	0,074	582	-510

Los resultados presentados en las Tablas 4.1. y 4.2., indican que los valores de densidad de corriente obtenidos con los electrodos diseñados son comparables a los electrodos comerciales.

- **Ácido Ascórbico**

Se trabajó con una solución de ácido ascórbico 1 mM y como electrolito soporte una solución reguladora de fosfato de sodio de concentración 0,01 M (pH 7,40) para analizar el comportamiento del sistema irreversible de ácido ascórbico sobre los electrodos NWE4, NWE6, NW8. Por otro lado, se compararon las señales obtenidas con este sistema, empleando un electrodo de carbón vítreo y un electrodo de carbón pirolítico altamente ordenado. Los estudios se realizaron a velocidades de barrido entre 10 y 100 mV s⁻¹. En la Tabla 4.3 se presentan los valores obtenidos de Potencial de pico anódico (E_{pa}), Densidad de corriente del pico anódico (J_{pa}), sobre los distintos electrodos de trabajo.

Tabla 4.3. E_{pa} , J_{pa} , para los distintos electrodos de trabajo utilizados a diferentes velocidades de barrido, para el sistema de ácido ascórbico

Velocidad de barrido [mV s ⁻¹]	G C*		HPGO*		N.W.E. 4		N.W.E. 6		N.W.E. 8	
	E_{pa} [V]	J_{pa} [μ A cm ⁻²]	E_{pa} [V]	J_{pa} [μ A cm ⁻²]	E_{pa} [V]	J_{pa} [μ A cm ⁻²]	E_{pa} [V]	J_{pa} [μ A cm ⁻²]	E_{pa} [V]	J_{pa} [μ A cm ⁻²]
10	0,224	75,9	0,225	69,1	0,195	94,2	0,206	92,2	0,241	103
25	0,264	115	0,261	137	0,224	130	0,309	153	0,259	139
50	0,276	143	0,286	190	0,246	155	0,351	182	0,293	167
100	0,290	209	0,343	263	0,260	185	0,394	182	0,318	221

*G C: Electrodo de Carbono vítreo

*HPGO: Electrodo de Carbono pirolítico altamente ordenado

Los resultados presentados en la Tabla 4.3, indican que en todos los casos la oxidación del ácido ascórbico, ocurre mediante un mecanismo irreversible. En todos los electrodos solo se observó oxidación, pero no reducción. Los valores obtenidos para el potencial de oxidación y la densidad de corriente, son similares entre los electrodos comerciales y los electrodos desarrollados, demostrando la factibilidad en el uso de este tipo de materiales para la determinación de ácido ascórbico. Además, se apreció una relación lineal entre la corriente de pico anódica y la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, indicando que el proceso está controlado por difusión. A modo de ejemplo, se presenta la ecuación de la recta obtenida para el NWE6, $I_{pa} = 3,37 v^{1/2} - 0,34$ ($R^2 = 0,996$). En la Figura 4.11 se representan los voltogramas obtenidos en la oxidación del ácido ascórbico a diferentes velocidades de barrido para el NWE8.

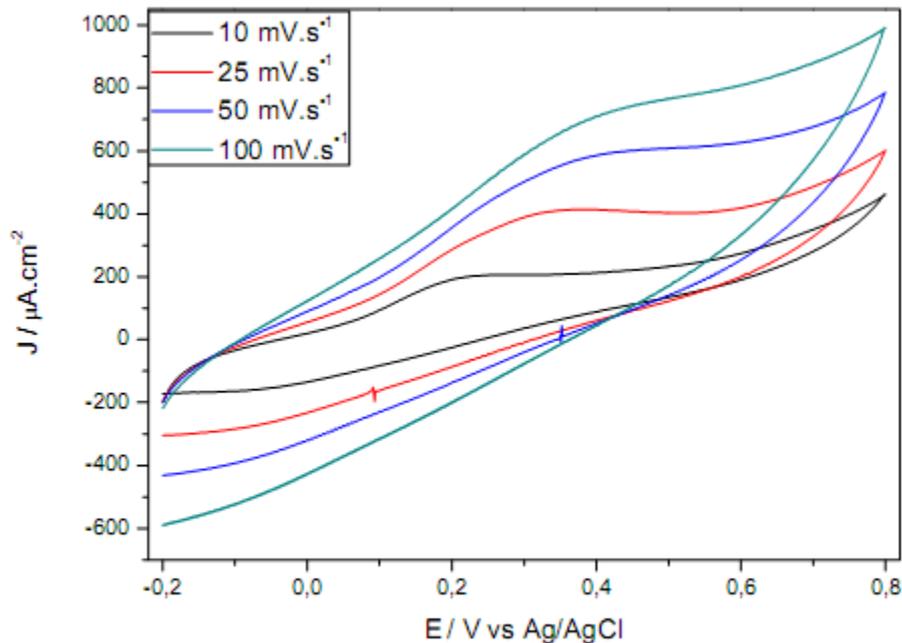


Figura 4.11. Voltamogramas cíclicos del NWE8 a diferentes velocidades de barrido para el sistema del ácido ascórbico

4.5. Conclusiones parciales

Se desarrolló y caracterizó (morfológicamente y electroquímicamente) un novedoso sistema vítreo formado por óxido de telurio, óxido de vanadio y micropartículas de grafito para ser utilizado en el diseño de electrodos compuestos (NWE, New Working Electrode). Las respuestas electroquímicas empleando la técnica de Voltamperometría Cíclica que presentaron los NWE para los sistemas de ferrocianuro de potasio y ácido ascórbico fueron comparables a los obtenidos por los electrodos comerciales de carbono vítreo y carbono pirolítico altamente ordenado. Estos NWE son fáciles de sintetizar y para su utilización no requieren activación previa de la superficie. Una ventaja adicional de estos electrodos, es que su síntesis resulta unas 200 veces más económica que los electrodos comerciales de carbono vítreo. Los estudios realizados confirman que estos electrodos son una buena alternativa para ser empleados como electrodos de trabajo en técnicas voltamperométricas.

4.6. Referencias

- [1] J. Wang, *Analytical Electrochemistry*, third ed., J. Wiley & Sons, New Jersey, 2006.
- [2] INSTRUCTION MANUAL FOR BAS EPSILON FOR ELECTROCHEMISTRY, Version 1.60.70, © 2000-2005 Bioanalytical Systems, Inc. All rights reserved.
- [3] R. Večerková, L. Hernychová, P. Dobeš, J. Vrba, B. Josypčuk, M. Bartošik, J. Vacek, *Analytica Chimica Acta*, 830 (2014) 23.
- [4] L. C. Martiniano, V. R. Abrantes, S. Y. Neto, E. P. Marques, T. C. O. Fonseca, L. L. Paim, A. G. Souza, N. R. Stradiotto, R. Q. Aucélio, G. H. R. Cavalcante, A. L. B. Marques, *Fuel*, 103 (2013) 1164.
- [5] A. Babaei, A. R. Taheri, *Sensors and Actuators B*, 176 (2013) 543.
- [6] A. Kumaravel, M. Chandrasekaran, *Sensors and Actuators B*, 174 (2012) 380.
- [7] M. Kopanica, L. Novotny, *Analytica Chimica Acta*, 368 (1998) 211.
- [8] R. Feeney, S. P. Kounaves, *Talanta*, 58 (2002) 23.
- [9] D. M. Anjo, M. Kahr, M. M. Khodabakhsh, S. Nowinski, M. Wanger, *Analytical Chemistry*, 61 (1989) 2603.
- [10] G. D. Pierini, A. M. Granero, M. S. Di Nezio, M. E. Centurión, M. A. Zon, H. Fernández, *Microchemical Journal*, 106 (2013) 102.
- [11] M. Opaloo, A. Lesniewski, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 656 (2011) 2.
- [12] H. Dai, H. Xu, X. Wu, Y. Lin, M. Wei, G. Chen, *Talanta*, 81 (2010) 1461.
- [13] F. Kuralay, T. Vural, C. Bayram, E. Baki Denkbaz, S. Abaci, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 87 (2011) 18.
- [14] G. Hwang, W. Han, J. Park, S. Kang, *Sensors and Actuators B*, 135 (2008) 309.
- [15] A. M. Ashrafi, S. Cerovac, S. Mudric, V. Guzsvány, L. Husáková, I. Urbanová, K. Vytras, *Sensors and Actuators B*, 191 (2014) 320.
- [16] A. R. Khaskheli, J. Fischer, J. Barek, V. Vyskocil, Sirajuddin, M.I. Bhangar, *Electrochimica Acta*, 101 (2013) 238.

- [17] M.Huang, Y.Ding, X. Li, *Analyst*, 138 (2013) 3820.
- [18] X. Li, H. Feng, M. Huang, G. Gu, M. G. Moloney, *Analytical Chemistry*, 84 (2012) 134.
- [19] J. Manso, M.L. Mena, P. Yáñez-Sedeño, J. Pingarrón, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 603 (2007) 1.
- [20] J. Ping, Y. Wang, J. Wu, Y. Ying, F. Ji, *Food Chemistry*, 135 (2012) 362.
- [21] I. Cesarino, V. Cesarino, M. R.V. Lanza, *Sensors and Actuators B*, 188 (2013) 1293.
- [22] E. C. Cardillo, R.A. Montani, M.A. Frechero, *Journal of Non-Crystalline Solids*, 356 (2010) 2760.
- [23] N. Lebrum, M. Levy, J.L. Souquet, *Solid State Ionics*, 40 & 41 (1990) 718.
- [24] E.C. Cardillo, S. Terny, M.A. Frechero, *Thermochimica Acta*, 566 (2013) 10.
- [25] M. K. Narayanan, H.D. Shashikala, *Procedia Materials Science*, 5 (2014) 303.
- [26] J. F. Shackelford, *Introduction to Materials Science for Engineers*, Sixth ed., Pearson Education, NJ. 2005.
- [27] R. L. McCreery, *Chemical Reviews*, 108 (2008) 2646.
- [28] X. Rui, Q. Yana, M. Skyllas-Kazacos, T. M. Lim, *Journal of Power Sources*, 258 (2014) 19.

Capítulo 5

**Determinación de zinc en extractos
etanólicos de propóleos mediante
Espectroscopia de Fluorescencia
Molecular**

5.1. Objetivo

El objetivo de este trabajo estuvo enfocado en el desarrollo de un nuevo método para la determinación del contenido de zinc en extractos etanólicos de propóleos comerciales, que no requiera pretratamiento de la muestra, empleando Espectroscopia de Fluorescencia Molecular como técnica de detección.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Compuestos de Coordinación y Química de las Superficies (LCCQS), João Pessoa, Paraíba, Brasil, en el marco de una pasantía de investigación llevada a cabo durante el período comprendido entre los meses de enero y julio de 2013.

5.2. Introducción

5.2.1. Importancia del zinc a nivel biológico

El zinc es un metal de interés biológico por sus propiedades antioxidantes y antiinflamatorias [1]. En la literatura se pueden encontrar un gran número de artículos donde se mencionan los beneficios del zinc en el organismo humano. Mocchegiani y col., sugieren que el zinc tiene un rol preponderante en muchos procesos relacionados con el envejecimiento del cerebro y la aparición de las enfermedades neurodegenerativas. El cerebro contiene en promedio una concentración de zinc de aproximadamente $150 \mu\text{molL}^{-1}$ (10 veces más que en sangre). El zinc es un metal levemente tóxico para el cerebro, comparado con otros metales como el hierro y el manganeso, sin embargo, un incremento en la concentración de zinc, podría generar diversos trastornos tales como rápido aumento de neurotoxinas, degeneración de neuronas del hipotálamo, etc. [2]. Por otro lado, la deficiencia de zinc en la dieta afecta alrededor de 2 billones de personas en todo el mundo. Alrededor de 300 enzimas requieren de la presencia de zinc para su activación y otros 2000 factores de transcripción lo requieren para la expresión genética [3]. Las manifestaciones de la deficiencia de zinc incluyen alopecia, diarrea, trastornos emocionales, pérdida de peso,

hipogonadismo, desordenes neurosensoriales y problemas con la cicatrización de úlceras [4]. Por lo tanto, el consumo de alimentos, suplementos dietarios, etc., que aporten este micronutriente son esenciales para la nutrición humana. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (Food and Agriculture Organization) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) sugieren un consumo entre 6 y 12 mg de zinc por día. Entre los alimentos que son fuentes principales de zinc se pueden mencionar alimentos a base de carnes, lácteos, legumbres, cereales, etc. [5]. Por otro lado, el propóleo bruto contiene diversos metales, siendo el zinc uno de los mayoritarios. A partir de éste producto se obtienen soluciones etanólicas de propóleo comerciales, caramelos y mieles, suplementos dietarios, que en los últimos años son utilizadas con fines terapéuticos. Por ello surge la necesidad de evaluar el contenido de zinc en muestras comerciales de propóleo con la finalidad de verificar si el empleo de estos productos aportan los niveles requeridos para el organismo. La cuantificación de zinc en diferentes muestras de propóleo bruto generalmente se realiza empleando técnicas de espectroscopia atómica. En la Tabla 5.1 se detallan muestras de diferente procedencia empleando estas técnicas y su correspondiente intervalo de concentraciones de zinc. Dichas técnicas presentan ventajas tales como bajo límite de detección, robustez, etc. La instrumentación empleada es costosa y en algunos casos no está disponible en los laboratorios de rutina. Sin embargo, ninguna de estas técnicas estudia el contenido de zinc en extractos etanólicos de propóleo comerciales, que actualmente se expenden en comercios de productos dietéticos (Argentina) y farmacias (Brasil). Por ello, surge la necesidad de desarrollar métodos analíticos rápidos, sencillos y económicos que permitan determinar zinc en este tipo de muestras.

Tabla 5.1. Concentración de zinc encontrada en muestras de propóleos bruto de distintos orígenes.

Técnica de detección	Origen de la muestra	Intervalo de concentración de Zn [mg/kg]	Referencia
EEA-API ¹	España	163 – 1364	2013 [6]
EEA-API ¹	Brasil	1,32 – 139	2013 [7]
EAA ²	Polonia	17,7 – 71,5	2013 [8]
EEA-API ¹	China	35,1 – 386,4	2012 [9]
NAA ³	Argentina	11,0 – 105,0	2011 [10]
EEA ⁴	Croacia	80,14 – 9325	2008 [11]

¹Espectroscopia de emisión atómica con acoplamiento de plasma inductivo

²Espectroscopia de absorción atómica

³Análisis de activación de neutrones

⁴Espectroscopia de emisión atómica

5.2.2. Porfirinas

La palabra porfirina proviene del griego “porphura”, que significa “pigmento púrpura”. La estructura básica de la porfirina consiste en cuatro anillos pirrólicos unidos mediante cuatro puentes de metino. En la Figura 5.1, se presenta la estructura básica de una porfirina, numerando los átomos constituyentes según lo indica la IUPAC [12].

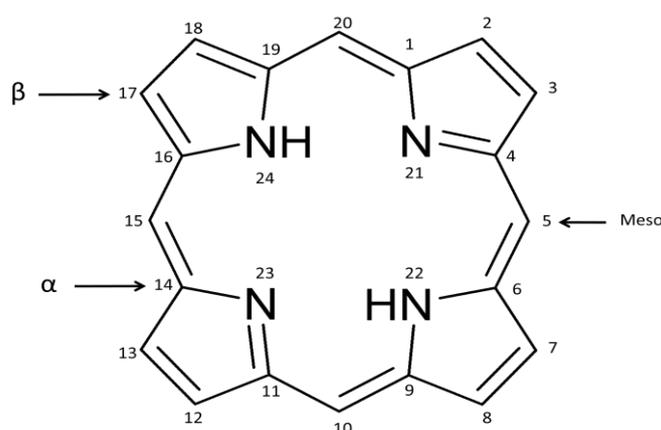


Figura 5.1. Estructura de la porfirina con numeración del sistema según IUPAC

Las porfirinas presentan una intensa banda de absorción en la región UV-Vis alrededor de 400 nm, denominada banda "Soret" y bandas más débiles entre 450-700 nm (bandas "Q"). Estas bandas pueden modificarse en función de los sustituyentes del anillo pirrólico o a la presencia de un ión metálico dando origen a una metaloporfirina.

5.2.3. Tetracarboxifenilporfirina (TCPP)

La tetracarboxifenilporfirina ó 5,10,15,20-tetraquis (4-carboxifenil) porfirina (TCPP) es una porfirina que posee grupos carboxifenilos en las posiciones meso. Esta porfirina también se denomina 5,10,15,20-tetraquis(4-ácido benzoico) porfirina y su estructura se presenta en la Figura 5.2.

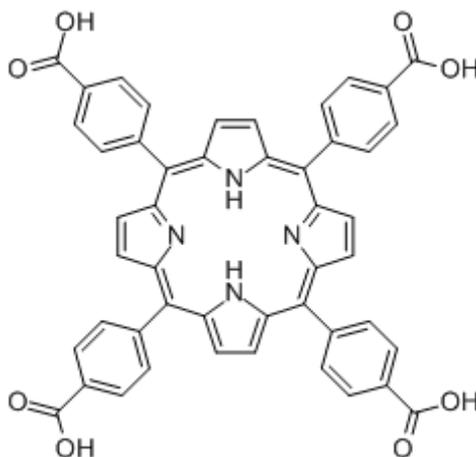


Figura 5.2. Estructura de la TCPP

La TCPP es una porfirina soluble en agua, muy utilizada en el campo de la química analítica. Awawdeh y col., realizaron la determinación espectrofotométrica de pentaclorofenol en agua usando porfirinas hidrosolubles [13]. Para la determinación de manganeso en aguas, Chiswell y col. emplearon la formación del complejo entre el metal y la porfirina TCPP [14]. Por otro lado, Ishi y col., determinaron manganeso (II) en muestras de té empleando TCPP, trabajando a temperatura ambiente [15]. Rebouças y col., desarrollaron una metodología basada en la formación del complejo Mn-TCPP catalizada por la presencia de cadmio, para determinar exceso de manganeso en reactivos comerciales de porfirinas metaladas con manganeso [16]. Kilian y col., realizaron un estudio mediante Espectroscopia de Absorción Molecular de los complejos formados entre Hg (II), Cd (II), Pb (II) y Zn (II), y la 5,10,15,20-tetraquis-(4-carboxifenil)porfirina (TCPP) [17].

Teniendo en cuenta la importancia del zinc desde el punto de vista nutricional, siendo este metal el mayoritario en muestras de propóleos bruto y debido a su capacidad de formar complejos con tetracarboxifenilporfirina (TCPP), surge como alternativa su cuantificación empleando la técnica de Espectroscopia de Fluorescencia Molecular.

5.3. Materiales y métodos

5.3.1. Instrumentación

Las medidas de Fluorescencia Molecular se realizaron empleando un espectrofluorímetro FLUOROLOG 3- HORIBA, con monocromadores dobles SPEX 1692 y con una fuente de excitación de lámpara de Xenón de 450 W, perteneciente a la Universidad Federal de Paraíba (Brasil) y un Espectrofluorímetro SHIMADZU RF5301 de la Universidad Nacional del Sur (Argentina). Las medidas de Absorción Atómica se realizaron utilizando un Espectrómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer Precisely A. Analyst 200.

5.3.2. Reactivos y soluciones

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y las soluciones se prepararon disolviendo la cantidad correspondiente de cada reactivo en agua ultra pura ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtenida mediante un sistema Milli-Q.

- Solución patrón de zinc: se preparó disolviendo la cantidad apropiada de acetato de zinc (Sigma-Aldrich) en agua.
- Solución reguladora tris (hidroximetil) aminometano (TRIS) 0,15 M pH 7,40: se preparó a partir de ácido clorhídrico (Sigma) y tris (hidroximetil) aminometano (Merck).
- TCPP (tetra-carboxi-fenil-porfirina) fue sintetizada en el Laboratorio de Compuestos de Coordinación y Química de la Superficie (LCCQS), Universidad Federal de Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil, desarrollada por Rebouças y col. [18].

5.3.3. Método de Referencia

La determinación de zinc en las muestras de extractos etanólicos de propóleos empleando el método de referencia requiere la mineralización de la misma (según lo indicado en Norma Argentina IRAM-INTA 15935-2) [19]. Para ello se tomaron 10 mL del extracto, se adicionó 10 mL de HNO_3 (1:4) y se calentó durante aproximadamente 4 horas. Finalizada la digestión se filtra y se lleva a un volumen final de 25 mL con agua. Posteriormente se procede a la cuantificación del metal empleando Espectroscopia de Absorción Atómica a una longitud de onda de 213,86 nm.

5.3.4. Procedimiento

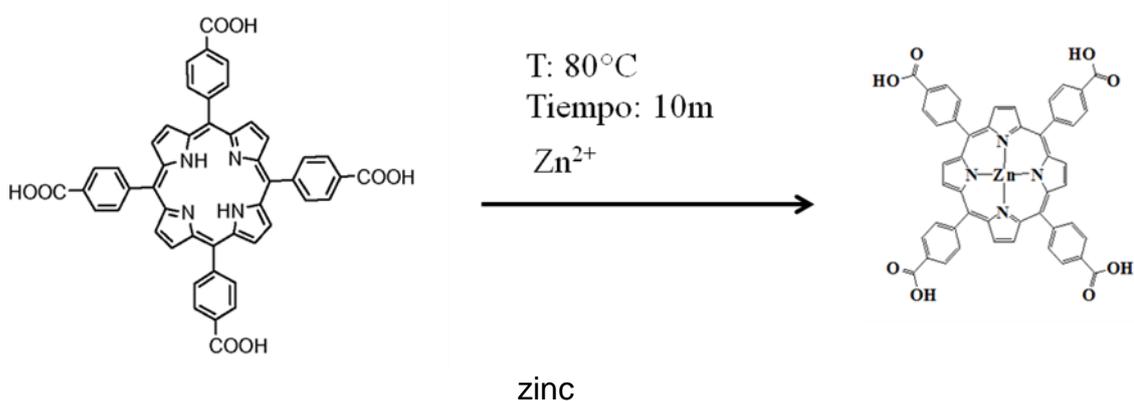
El complejo Zn-TCPP, se prepara disolviendo una cantidad apropiada de porfirina (TCPP) para obtener una concentración final de $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, en

buffer TRIS y se adiciona la solución de zinc, llevando a volumen final con agua [16]. La formación del complejo se lleva a cabo luego de transcurridos 10 minutos a 80 °C. Luego se realiza una dilución 1:10 y se obtienen las medidas de Fluorescencia Molecular trabajando a una longitud de onda de excitación de 422 nm y de emisión de 608 nm. El intervalo de concentraciones de Zn estudiadas varió entre 6,60 nM y 100 nM.

Para realizar la determinación de zinc en las muestras comerciales se realiza una dilución del extracto etanólico de propóleos en agua y se procede de manera similar a lo detallado anteriormente.

En la Figura 5.3 se muestra un esquema de la reacción de la porfirina TCPP con Zn en las condiciones experimentales empleadas.

Figura 5.3. Esquema de la reacción de metalación de la porfirina TCPP con



5.4. Resultados y discusión

5.4.1. Estudios espectrométricos

a) Absorción Molecular UV-Vis

Se realizó el estudio mediante la técnica de Absorción Molecular UV-Vis de la porfirina TCPP y del complejo Zn-TCPP.

- **Porfirina TCPP**

En la Figura 5.4 se presenta un espectro típico de la porfirina TCPP a pH 7,40 observándose su “banda Soret” a 414 nm. Puede observarse también un

gráfico ampliado de las cuatro bandas de menor intensidad, denominadas bandas “Q”.

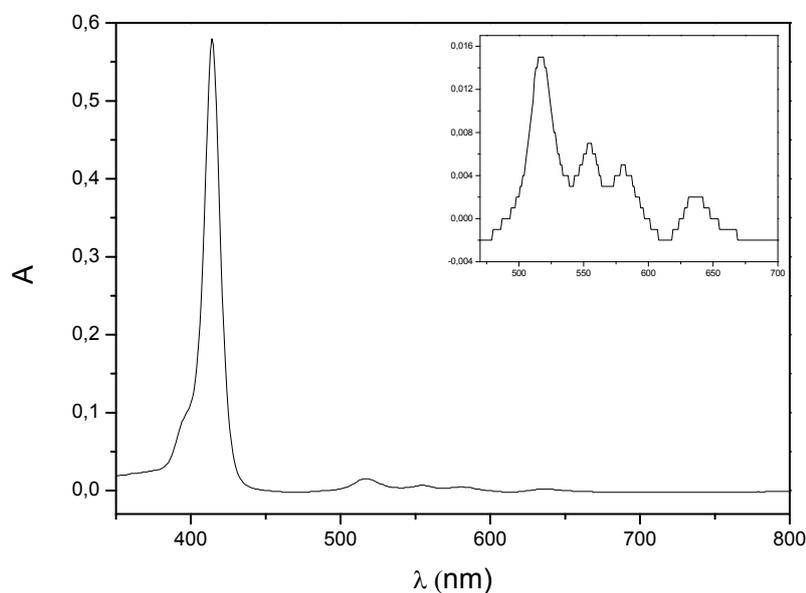


Figura 5.4. Espectro de absorción molecular correspondiente a la TCPP

- **Complejo Zn-TCPP**

En la Figura 5.5 se observa que cuando se produce la metalación de la porfirina con zinc, ocurre un desplazamiento de la banda Soret de 414 nm a 422 nm. También se puede ver una modificación en las bandas “Q”, las cuales disminuyen de cuatro (para la porfirina sin metalar) a tres (para el complejo Zn-TCPP). Es importante aclarar que la longitud de onda a la que se encuentra la banda Soret, es característica de la porfirina o del complejo metal-porfirina [17].

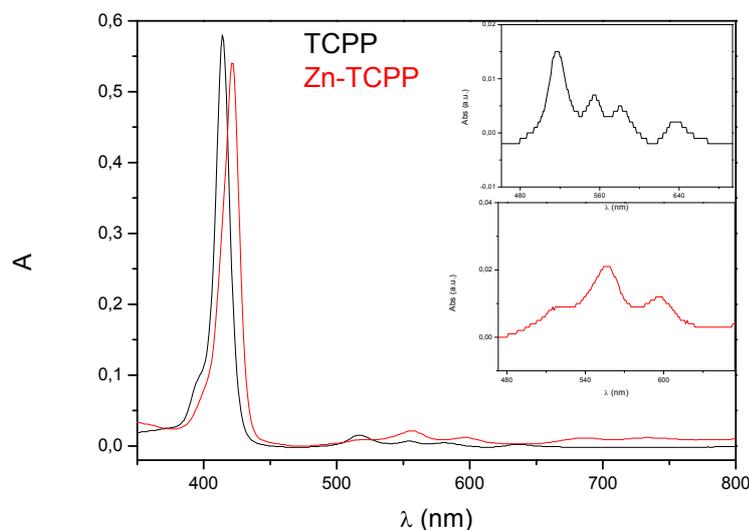


Figura 5.5. Espectro de absorción de la porfirina base libre y la porfirina metalada.

Se estudiaron las condiciones necesarias para la formación del complejo Zn-TCPP. Una de las variables que afecta la formación de este complejo es la temperatura. Para ello se realizaron estudios a 25, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 °C. En todos los casos la concentración de TCPP fue 1×10^{-6} M, la de zinc 1×10^{-6} M trabajando en un medio de buffer TRIS 0,15 M, pH 7,40.

A temperaturas comprendidas entre 25 y 70 °C se observó la formación parcial del complejo luego de transcurrida una hora de reacción. En la Figura 5.6 se muestra a modo de ejemplo trabajando a 50 °C, que a medida que transcurre el tiempo de reacción, el valor de absorbancia a 414 nm va disminuyendo, debido a la formación del complejo Zn-TCPP y comienza a observarse un corrimiento hacia mayores longitudes de onda. Por otro lado, trabajando a 80 °C se observa la formación del complejo Zn-TCPP a los ocho minutos de reacción. A 90 y 100 °C, no se obtenían medidas reproducibles. Por lo tanto, se decidió trabajar a 80 °C calentando durante diez minutos, para asegurar la completa metalación de zinc en las muestras. Debido a que el complejo Zn-TCPP es muy estable [17], una vez que se produce la metalación de la porfirina, no es necesario mantener el calentamiento durante más tiempo.

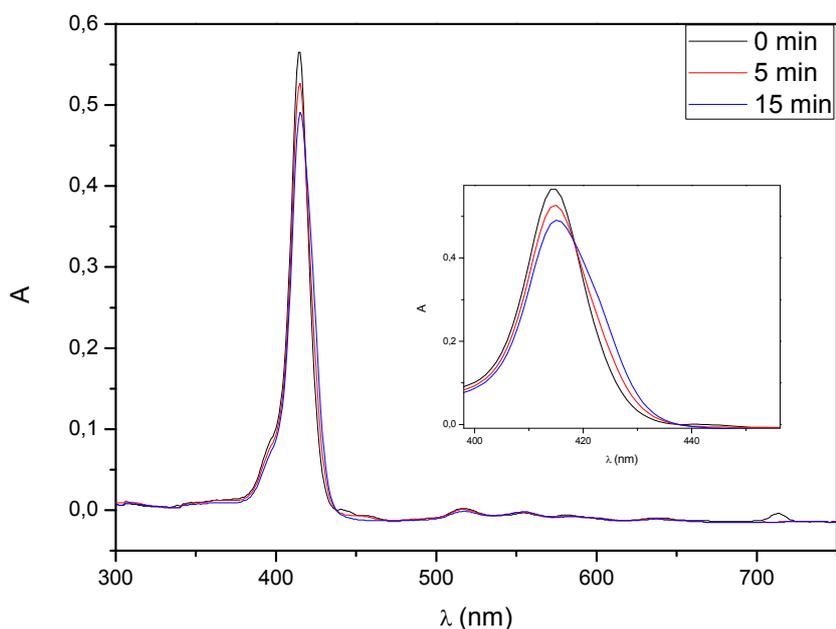


Figura 5.6. Metalación de la TCPP a 50 °C

Por otra parte, se realizaron estudios de la posible formación de los complejos entre TCPP con otros metales presentes en muestras de propóleos tales como cobre, cadmio, plomo y níquel, en las mismas condiciones experimentales establecidas. En ninguno de los casos anteriores, luego de calentar durante diez minutos y a 80 °C se observó un desplazamiento de la banda Soret de la TCPP (414 nm), que correspondería a la formación del complejo metal-porfirina.

Los estudios preliminares realizados demuestran que la técnica de Absorción Molecular no es apropiada para la determinación de zinc teniendo en cuenta el solapamiento de las bandas "Soret" de TCPP y Zn-TCPP y la baja absorptividad de las bandas "Q" del complejo Zn-TCPP a las concentraciones estudiadas (Figura 5.5). Por ello y teniendo en cuenta que estos compuestos presentan características fluorescentes [20], se procedió a realizar un estudio mediante la técnica de Fluorescencia Molecular.

b) Fluorescencia Molecular

Se realizaron los espectros de Fluorescencia Molecular correspondientes a la porfirina TCPP y el complejo Zn-TCPP preparado en buffer TRIS 0,15 M, pH 7,40 a 80 °C durante diez minutos. En la Figura 5.7 se muestran los espectros de excitación y emisión de la porfirina TCPP 1×10^{-6} M y los del complejo Zn-TCPP con una concentración de 1×10^{-6} M de zinc. En la figura se observa que la porfirina TCPP presenta una banda de excitación con un máximo a una longitud de onda de 422 nm. Además en la región comprendida entre 550 y 700 nm se observan dos bandas de emisión con máximos en 608 y 650 nm. Por otro lado, la formación del complejo Zn-TCPP produce un aumento considerable de la banda de excitación a 422 nm y de la banda de emisión a 608 nm respecto de la TCPP. También, se puede observar la disminución de la banda de emisión de 650 nm. Las longitudes de onda seleccionadas fueron 422 nm (longitud de onda excitación) y 608 nm (longitud de onda emisión).

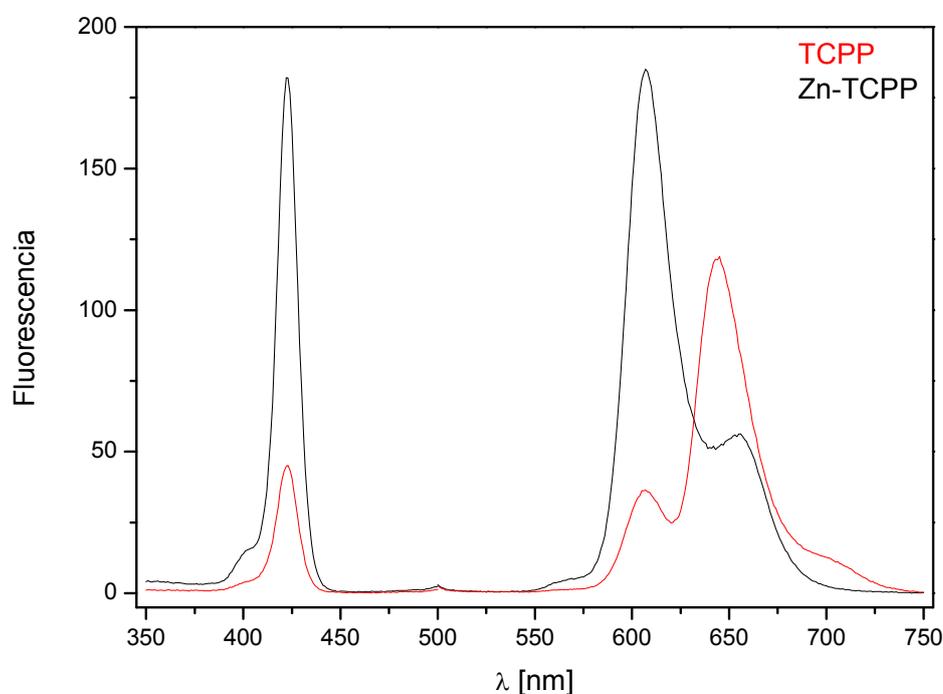


Figura 5.7. Espectro de excitación (λ_{em} : 608nm) y espectro de emisión (λ_{ex} : 422nm) de la porfirina base libre (TCPP) y la porfirina metalada (Zn-TCPP)

5.4.2. Parámetros analíticos

Con las condiciones experimentales óptimas y utilizando una concentración de TCPP 1×10^{-6} M, se realizó la curva de calibrado en el intervalo de concentraciones de zinc entre 6,60 nM a 100 nM (Figura 5.8). La ecuación de la recta obtenida es U.F. = $(2233 \pm 1053) + (12082 \pm 260) \times C_{Zn}^*$, $R^2 = 0,9968$.

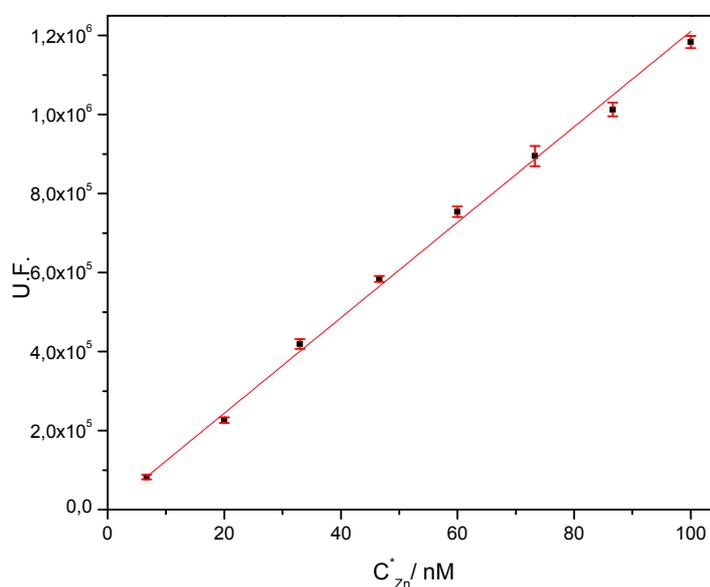


Figura 5.8. Curva de calibrado para el complejo Zn-TCPP obtenida aplicando las condiciones óptimas.

Los límites de detección y cuantificación fueron 6,22 nM y 19 nM, calculados con una relación señal ruido de 3:1 y 3:10 respectivamente [21]. La reproducibilidad se calculó como la variación porcentual de las pendientes de siete curvas de calibrado realizadas distintos días. La repetitividad fue calculada como la variación porcentual de las pendientes de siete curvas de calibrado realizadas el mismo día. Los parámetros analíticos obtenidos se presentan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Parámetros analíticos

Intervalo lineal [nM]	LOD ^a [nM]	LOQ ^b [nM]	Reproducibilidad ^c [%]	Repetitividad ^c [%]
6,60 - 100	6,22	19	6,75	4,61

^aLOD: relación señal : ruido 3:1

^bLOQ: relación señal : ruido 10:1

^cn=7

5.4.3. Aplicación a muestras de propóleos

Se procedió a aplicar el método desarrollado en la determinación del contenido de zinc en extractos etanólicos de propóleos comerciales de distintos estados de Brasil. Para ello a una alícuota de la solución comercial de propóleos se le agregó la cantidad apropiada de porfirina TCPP, buffer TRIS y se llevó a volumen con agua. Para la formación del complejo se calentó la solución durante 10 minutos a 80 °C. La procedencia de las muestras analizadas se presentan en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Procedencia de las muestras

Muestra	Procedencia
M1	Sao Gabriel - Rio Grande do Sul
M2	Belo Horizonte - Mina Gerais
M3	Belo Horizonte- Mina Gerais.
M4	Gazeta de Alagoas - Maceió
M5	Riberirao Preto - Sao Pablo

En la Figura 5.9 se muestran a modo de ejemplo los espectros de excitación a una longitud de onda de emisión de 608 nm, del complejo Zn-TCPP (86,6 nM) y de una muestra de propóleos con y sin agregado de TCPP.

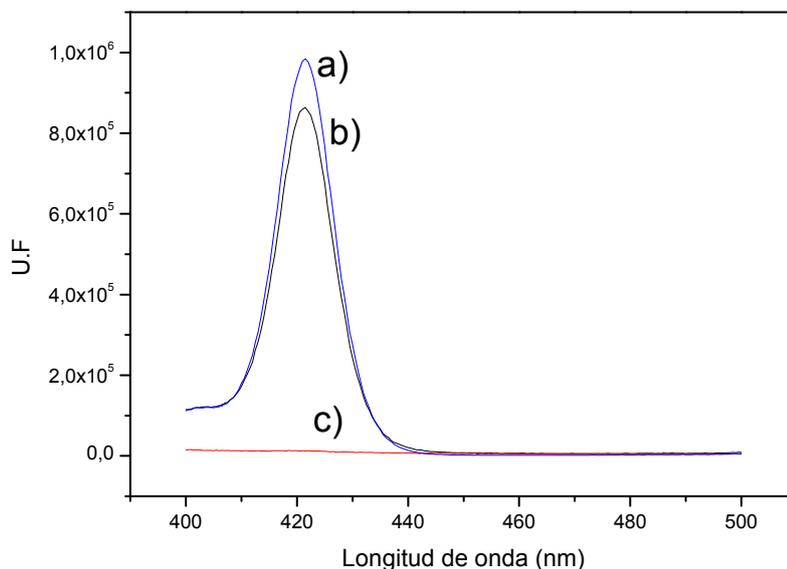


Figura 5.9. Espectros de excitación de a) Complejo Zn-TCPP, b) Muestra de propóleos con TCPP, c) Muestra de propóleos sin TCPP

En la Tabla 5.4 se observan los resultados del contenido de zinc obtenidos con el método propuesto y los obtenidos mediante el método de Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA).

Tabla 5.4. Análisis de muestras de extracto etanólico de propóleos

Muestras	Zn [mg / 100 mL]		Error Relativo [%]
	Método Propuesto*	EAA*	
M1	0,416 ± 0,001	0,398 ± 0,001	-4,52
M2	0,344 ± 0,001	0,358 ± 0,002	3,91
M3	0,329 ± 0,002	0,325 ± 0,002	-1,23
M4	0,797 ± 0,003	0,817 ± 0,001	2,45
M5	0,527 ± 0,002	0,530 ± 0,001	0,57

*n=3

Mediante la aplicación del test estadístico t Student se confirmó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos mediante ambos métodos. ($t_{\text{calculado}}=0,45$; $t_{\text{crítico}}=2,78$; $n=5$; y $\alpha=0,05$) [21].

5.5. Conclusiones parciales

Se desarrolló un método analítico empleando Fluorescencia Molecular como técnica de detección para la determinación de zinc en extractos etanólicos de propóleos comerciales. Para ello se empleó la tetracarboxifenil porfirina (TCPP) que forma un complejo con el zinc cuando se trabaja a 80°C durante diez minutos. El intervalo lineal de concentraciones varió entre 6,60 y 100 nM de zinc. La reproducibilidad y repetitividad del método fueron de 6,75% y 4,61 % respectivamente. Los límites de detección y cuantificación fueron de 6,22 nM y 19 nM respectivamente. Los resultados obtenidos fueron validados empleando la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA), observándose resultados satisfactorios.

El método desarrollado es sencillo, no requiere instrumentación costosa y es selectivo a la determinación de zinc en las condiciones experimentales empleadas. Por otro lado, presenta la gran ventaja de no tener que realizar pretratamiento de la muestra, a diferencia del método de referencia (EAA) que requiere varias etapas y un tiempo aproximado de cuatro horas.

Por lo tanto, si bien estas muestras comerciales de extractos etanólicos de propóleos no aportan los niveles requeridos de zinc para el organismo, el método propuesto es una alternativa viable para su determinación.

5.6. Referencias

- [1] A. S. Prasad, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28 (2014) 364.
- [2] E. Mocchegiani, C. Bertoni-Freddari, F. Marcellini, M. Malavolta, *Progress in Neurobiology*, 75 (2005) 367.
- [3] B.L. Vallee, K. H. Falchuk, *Physiological Reviews*, 73 (1993) 79.
- [4] N. F. Krebs, *Journal of Nutrition*, 130 (2000) 1374.
- [5] D. L. Romaña, C. Castillo, D. Diazgranados, *Revista Chilena de Nutrición*, 37 (2010) 234.
- [6] J. Serra Bonvehí, F. J. Orantes Bermejo, *Environmental Monitoring and Assessment*, 185 (2013) 6035.
- [7] M. Gr. A. Korn, M. A. B. Guida, J. T. P. Barbosa, E. A. Torres, A. P. Fernandes, J. C. C. Santos, K. G. F. Dantas, J. A. Nóbrega, *Food Analytical Methods*, 6 (2013) 872.
- [8] G. Formicki, A. Gren, R. Stawarz, B. Zysk, A. Gal, *Polish Journal of Environmental Studies*, 22 (2013) 99.
- [9] S. Gong, L. Luo, W. Gong, Y. Gao, M. Xie, *Food Chemistry*, 134 (2012) 583.
- [10] M. A. Cantarelli, J. M. Camiña, E. M. Pettenati, E. J. Marchevsky, R. G. Pellerano, *LW T - Food Science and Technology*, 44 (2011) 256.
- [11] J. Cvek, M. Medic-Saric, D. Vitali, I. Vedrinar-Dragojevic, Z. Smit, S. Tomic, *Journal Apicultural Research*, 47 (2008) 35.
- [12] G.P. Moss, *Pure and Applied Chemistry*, 59 (1987) 779.
- [13] A. M. Awawdeh, H. J. Harmon, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 (2005) 1595.
- [14] B. Chiswell, R. O'Halloran, *Talanta*, 38 (1991) 641.
- [15] H. Ishi, H. Koh, K. Satoh, *Analytica Chimica Acta*, 136 (1982) 347.
- [16] J. S. Rebouças, I. Kos, Z. Vujaskovic, I. Batinic-Haberle, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50 (2009) 1088.
- [17] K. Kilian, K. Pyrzynska, *Talanta*, 60 (2003) 669.

[18] J. S. Reboucas, I. Spasojevic, I. Batinic-Haberle, *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 13 (2008) 289.

[19] [2] Norma Argentina IRAM-INTA 15935-2-Extractos de Propóleos.

[20] W. Zheng, N. Shan, L. Yu, X. Wang, *Dyes and Pigments*, 77 (2008) 153.

[21] J.C. Miller, J.N. Miller, *Estadística para química analítica*, 2th ed. E.U.A. Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., Wilmington, Delaware, 1993.

Capítulo 6

Conclusiones Generales

Las conclusiones que se extraen del presente trabajo de Tesis son las siguientes:

- ✓ Se logró adquirir experiencia en los diferentes métodos de cosecha y en las técnicas de caracterización de propóleos bruto. Además, se realizó un relevamiento de las zonas más productivas del sudoeste de la Provincia de Buenos Aires. Se tomó conocimiento de los productos sanitarios empleados en el control de enfermedades de la colmena, además de conocer los productos plaguicidas más empleados en el control de malezas. Por otro lado, se logró un contacto directo con los productores apícolas que permitirá un futuro trabajo en conjunto, que redundará en beneficios para ambas partes.
- ✓ A partir del empleo de electrodos de bismuto y la técnica de Voltamperometría de Redisolución Anódica con Onda Cuadrada, se evaluó el contenido de metales en muestras de propóleos bruto del sudoeste de la Provincia de Buenos Aires, desarrollándose dos trabajos, que contribuyen con los principios de la Química Verde:

Parte A: se modificó un electrodo de carbono vítreo con nanotubos de carbono de pared múltiple y Nafion, a fin de mejorar la sensibilidad electroquímica para la cuantificación de plomo. Una de las ventajas del método desarrollado es el reemplazo del tradicional electrodo de mercurio, por uno de menor toxicidad como el bismuto. A su vez, se logró un menor consumo de reactivos y muestra, produciendo así menor cantidad de desechos. Los resultados obtenidos, muestran una buena concordancia con los provenientes del método de referencia.

Parte B: se empleó un electrodo de bismuto y Voltamperometría de Redisolución Anódica, combinada con técnicas quimiométricas para la determinación simultánea de zinc, cadmio, plomo y cobre en muestras de propóleos. El método desarrollado resultó ser sencillo y económico ya que se empleó una mina de lápiz como electrodo de trabajo que necesita un

sencillo acondicionamiento de su superficie. El ensayo de recuperación realizado indicó elevados porcentajes de recuperación.

- ✓ Se logró diseñar un nuevo electrodo de trabajo, de bajo costo, con la posibilidad de ser empleado en técnicas electroanalíticas. El mismo se generó a partir de óxidos de telurio y vanadio y micropartículas de grafito, resultando de esta manera, un material que no requiere de pretratamiento para ser utilizado, con la consecuente ventaja que esto implica. Además, el sistema vítreo sintetizado resultó ser aproximadamente unas 200 veces más económico que los electrodos comerciales y presentó respuestas electroquímicas similares a estos frente a cuplas redox conocidas como ferrocianuro de potasio y ácido ascórbico.
- ✓ Se desarrolló un método analítico empleando Fluorescencia Molecular como técnica de detección para la determinación de zinc en extractos etanólicos de propóleos comerciales de Brasil. El método desarrollado es sencillo, no requiere instrumentación costosa y es selectivo a la determinación de zinc en las condiciones experimentales empleadas. Por otro lado, presenta la gran ventaja de no tener que realizar pretratamiento de la muestra a diferencia del método de referencia que requiere de un tiempo aproximado de cuatro horas. Se llevó a cabo la validación del método mediante Espectroscopia de Absorción Atómica (EAA), observándose resultados satisfactorios.

Los métodos propuestos permitieron evaluar la composición de metales como parámetro de calidad desde el punto de vista higiénico-sanitario y nutricional, en muestras de propóleos bruto y extracto etanólicos de propóleos. Estos métodos presentan en general las ventajas de ser simples, económicos, requieren tiempos de análisis cortos, bajo consumo de reactivos y mínima generación de residuos, contribuyendo de esta manera a los principios de la Química Verde.

Apéndice I

Productividad

Durante el periodo comprendido en esta Tesis, se obtuvo la siguiente productividad:

✓ Trabajos Publicados en Revistas Científicas:

- AN INNOVATIVE MICROMETRIC GRANULAR GRAPHITE-GLASS SYSTEM COMPOSITE ELECTRODE "READY TO USE" IN VOLTAMMETRY TECHNIQUES. **Gastón D. Pierini**, Jimena M. Presa, Marisa A. Frechero, María E. Centurión, María S. Di Nezio. **Sensors and Actuators B**, 2014, 202, 433-439. Elsevier Science. ISSN: 0925-4005.
- DEVELOPMENT OF AN ELECTROANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF LEAD IN PROPOLIS BASED ON BISMUTH ELECTRODES. **Gastón D. Pierini**, Adrián M. Granero, María S. Di Nezio, María E. Centurión, María A. Zon, Héctor Fernández. **Microchemical Journal**, 2013, 106, 102-106. Elsevier Science. ISSN 0026-265x.
- SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ACESULFAME-K AND ASPARTAME USING LINEAR SWEEP VOLTAMMETRY AND MULTIVARIATE CALIBRATION. **Gastón D. Pierini**, Natalia E. Llamas, Wallace D. Fragoso, Sherlan G. Lemos, María S. Di Nezio, María E. Centurión. **Microchemical Journal**, 2013, 106, 347-350. Elsevier Science. ISSN 0026-265x.

✓ Trabajos en etapa de redacción:

- SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ZINC, CADMIUM, LEAD AND COPPER IN PROPOLIS SAMPLES WITH BISMUTH FILM PENCIL LEAD ELECTRODE AND CHEMOMETRICS TOOLS. **Gastón D. Pierini**, Marcelo F. Pistonesi, María S. Di Nezio, María E. Centurión.
- FLUORESCENT DETERMINATION OF ZINC IN ETHANOLIC EXTRACTS OF PROPOLIS. **Gastón D. Pierini**, Clarissa G. C. Maia,

Julio S. Rebouças, Wallace D. Fragoso, María S. Di Nezio, María E. Centurión.

✓ Presentaciones en Reuniones Científicas:

- XIX Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Buenos Aires del 12 al 15 de abril de 2015. "Síntesis y caracterización de nuevos sistemas vítreos formados a partir de óxidos inorgánicos. Aplicaciones en electroanalítica". **G. D. Pierini**, P. di Pratula, M. S. Di Nezio, M. E. Centurión, M. A. Frechero.
- II Jornada de Intercambio de Becarios y Tesistas del CONICET Bahía Blanca. "Salud y Alimentación. Bahía Blanca, Argentina, 25 de Agosto de 2014. "Desarrollo de una metodología electroanalítica para la determinación de plomo en propóleos basada en electrodos de bismuto". **G. D. Pierini**, A. M. Granero, M. S. Di Nezio, M. E. Centurión, M. A. Zón, H. Fernández.
- II Jornada de Intercambio de Becarios y Tesistas del CONICET Bahía Blanca. "Salud y Alimentación. Bahía Blanca, Argentina, 25 de Agosto de 2014. "Determinación simultanea de Zn (II), Cd (II), Pb (II) y Cu (II) en muestras de propóleos empleando electrodos de bismuto y calibración multivariada". **G. D. Pierini**, M. F. Pistonesi, M. S. Di Nezio, M. E. Centurión.
- VII Congreso Argentino de Química Analítica. Mendoza del 1 al 4 de octubre de 2013. "Determinación fluorescente de Zinc en Extractos Etanólicos de propóleos". **G. D. Pierini**, C. G. C. Maia, V. H. A. Pinto, J. S. Rebouças, W. D. Fragoso, M. S. Di Nezio, M. E. Centurión.
- VI. Workshop de Quimiometría. Hotel Corais de Carapibus, Conde-Paraíba, Brasil del 23 al 26 de abril de 2013. "Aplicación del algoritmo

- icoshift* en datos electroquímicos, para la determinación simultánea de Zn, Cd, Pb y Cu en muestras de propóleos”. **G. D. Pierini**, W. D. Fragoso, M. F. Pistonesi, M. S. Di Nezio, M. E. Centurion.
- XVIII Congreso Argentino de Fisicoquímica y Química Inorgánica. Rosario, 9 al 12 de abril de 2013. “Aplicaciones electroquímicas de vidrios de óxido de telurio con dispersión de micropartículas de grafito”. **G. D. Pierini**, J. M. Presa, E. C. Cardillo, M. E. Centurion, M. S. Di Nezio, M. A. Frechero.
 - IV Congreso Nacional de Materia Blanda. Bahía Blanca, Buenos Aires, 21 al 23 de noviembre de 2012. “Diferentes metodologías electroquímicas para la síntesis de nanopartículas de oro. Comparación y ventajas”. **G. D. Pierini**, A. M. Granero, M. S. Di Nezio, M. E. Centurión, N. R. Vettorazzi, M. A. Zon, H. Fernández.
 - IV Congreso Nacional de Materia Blanda. Bahía Blanca, Buenos Aires, 21 al 23 de noviembre de 2012. “Desarrollo de un nuevo sistema vítreo con aplicaciones en electroanalítica”. **G. D. Pierini**, J. M. Presa, E. Cardillo, M. A. Frechero, M. S. Di Nezio, M. E. Centurión.
 - 5to. Congreso Iberoamericano de Química Analítica, 2do. Congreso Uruguayo de Química Analítica. Montevideo, Uruguay- 7 al 10 de octubre de 2012. “Determinación simultánea de aspartamo y acesulfame-K empleando voltamperometría hidrodinámica y PLS”. **G. D. Pierini**, N. E. Llamas, W. D. Fragoso, S. G. Lemos, M. S. Di Nezio, M. E. Centurión.
 - 5to. Congreso Iberoamericano de Química Analítica, 2do. Congreso Uruguayo de Química Analítica. Montevideo, Uruguay- 7 al 10 de octubre de 2012. “Determinación simultánea de metales en muestras de propóleos de Argentina empleando electrodos de bismuto y calibración

multivariada”. **G. D. Pierini**, M. F. Pistonesi, M. S. Di Nezio, M. E. Centurión.

- 97° REUNION NACIONAL de FISICA de la ASOCIACION FISICA ARGENTINA. Villa Carlos Paz– 25 al 28 de septiembre de 2012. “Estudio comparativo sobre la capacidad de distintos materiales en su empleo como electrodos de trabajo”. **G. D. Pierini**, S. Terny, M. S. Di Nezio, M. E. Centurion, M. A. Frechero.
- VI Congreso Argentino de Química Analítica. Santa fe – 26 al 29 de septiembre de 2011. “Desarrollo de una metodología electroanalítica para la determinación de plomo en propóleos basada en electrodos de bismuto”. **G. D. Pierini**, A. M. Granero, M. S. Di Nezio, M. E. Centurión, M. A. Zón, H. Fernández.

✓ TRABAJOS DE DIVULGACION

Desarrollo de un método electroanalítico para la determinación de plomo en propóleo a granel de argentina basado en electrodos de bismuto. Gastón D. Pierini, Adrián M. Granero, María S. Di Nezio, María E. Centurión, María A. Zon, Héctor Fernández.

- -Noticias apícolas. Apinews, Noviembre de 2012
<http://www.apinews.com/es/noticias/item/20402>
- -Beatriz Achával Noticias apícolas y otras yerbas, 2012
<http://beatrizachaval.blogspot.com.ar/2012/11/noticias-apinews-52012.html>

Apéndice II

Becas obtenidas

✓ **Beca interna de postgrado tipo I - CONICET**

Lugar de trabajo: INQUISUR (Instituto de Química del Sur), Universidad Nacional del Sur.

Tema: Determinación de parámetros de calidad de productos a base de propóleos.

Director: Dra. Maria E. Centurión

Período: 1 de Abril de 2010 al 1 de Abril de 2013

✓ **Beca interna de postgrado tipo II - CONICET**

Lugar de trabajo: INQUISUR (Instituto de Química del Sur), Universidad Nacional del Sur.

Tema: Determinación de parámetros de calidad de productos a base de propóleos.

Director: Dra. Maria E. Centurión

Período: 1 de Abril de 2013 al 1 de Abril de 2015

✓ **Beca interna postdoctoral – CONICET**

Lugar de trabajo: UNRC, Universidad Nacional de Río Cuarto

Tema: "Sistemas eletroquímicos automáticos portátiles para la determinación de subproductos provenientes de la degradación del adenosíntrifosfato(ATP) en pescados"

Director: Dr. Héctor Fenández

Co-Director: Dra. María Susana Di Nezio

Período: 1 de Abril de 2015 al 1 de Abril de 2017

- ✓ **Pasantía de investigación:** realizada en el Laboratorio de Compuestos de Coordinación y Química de Superficies en el Centro de Ciencias Exactas y Naturales del Dpto. de Química de la UNIERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA, Joao Pessoa, Paraíba, Brasil, bajo la dirección del Prof. Dr. Wallace Duarte Fragoso y el Prof. Dr. Julio Santos Rebouças, durante el periodo comprendido entre el 01 de febrero de 2013 hasta el 12 de julio de 2013.

- ✓ Participación en el PROYECTOS DE COOPERACIÓN INTERINTITUCIONAL: **Programa Inter-U**, para realizar estudios de Investigación: 08/08/2011-24/09/2011, 10/10/2011-16/12/2011, en el Laboratorio de Electroquímica del Dpto. de Química, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Córdoba, Argentina, bajo la Dirección del Dr. Héctor Fernández y la Dra. María Alicia Zón.