



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORA EN QUÍMICA

***“DESARROLLO DE NUEVOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EN PRODUCTOS
APÍCOLAS. EMPLEO DE SISTEMAS ELECTROQUÍMICOS”***

Bioquímica Gabriela Krepper

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2018

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora 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 15 octubre de 2013 y el 30 de noviembre de 2018, bajo la dirección de la Dra. María Susana Di Nezio, Profesora Adjunta de Química Analítica y la Co-dirección del Dr. Marcelo Fabián Pistonesi, Profesor Adjunto de Química Analítica.

Bioquímica Gabriela Krepper

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p>
<p>La presente Tesis ha sido aprobada el / / , mereciendo la calificación de</p>	

AGRADECIMIENTOS

Gracias de corazón a mis directores de tesis la Dra. María Susana Di Nezio y el Dr. Marcelo F. Pistonesi, que me permitieron formar parte de su grupo de investigación y sin su cariño, estímulo y dedicación esta tesis doctoral no hubiera sido posible.

A la Dra. María Eugenia Centurión por sus palabras, impulso y apoyo constante.

A la Universidad Nacional del Sur y a CONICET por las becas otorgadas.

A todos los miembros del grupo de investigación del que formo parte, aquellos que estuvieron y los que continúan, por el buen compañerismo y los consejos brindados.

A todos los docentes del Área de Química Analítica que, de alguna manera u otra, han colaborado en mi trabajo y formación.

A los amigos que me dejó el paso por esta instancia, Marina, Dani, Gastón y Mati, que siempre estuvieron presentes.

En especial dedico esta tesis a mi marido Fabio y mi mamá Betty, que siempre me alentaron a seguir adelante en mis momentos de flaqueza, a mi papá Carlos, que siempre me apoyó y aconsejó a la distancia, a toda mi familia que me brinda su amor y comprensión, y a mis amigos de la vida que son uno de mis pilares.

¡A todos MUCHAS GRACIAS de corazón!

RESUMEN

Argentina se ha convertido en el país con mayor producción apícola del hemisferio sur e intenta transformarse en líder del mercado mundial. Una de las problemáticas que puede perjudicar su producción y comercialización, es la exposición de las colmenas a contaminantes generados por actividades antropogénicas, poniendo en riesgo la salud de los consumidores.

Por ello, este trabajo de Tesis está orientado al desarrollo de métodos electroanalíticos que permitan evaluar la calidad higiénico-sanitaria de productos apícolas de la provincia de Buenos Aires.

Se realizaron los siguientes trabajos:

- Se diseñó y fabricó en el laboratorio un electrodo de bismuto sólido para la determinación de cadmio en muestras de polen corbicular y propóleos bruto. Para esto, se empleó Voltamperometría de Redisolución Anódica de Onda Cuadrada como técnica electroanalítica.
- Se desarrolló un electrodo de film de antimonio generado "*in-situ*" para la determinación de tetraciclinas en muestras de miel, empleando Voltamperometría de Redisolución Catódica de Onda Cuadrada.
- Se empleó un electrodo de carbono vítreo activado electroquímicamente y Voltamperometría de Redisolución Adsorptiva de Onda Cuadrada para la determinación de amitraz, a partir de su metabolito final, 2,4 dimetilanilina, en muestras de miel.

Los métodos propuestos son sencillos, rápidos, de bajo costo y generación de residuos, siendo una buena alternativa respecto a las normativas vigentes para la determinación de estos analitos en productos apícolas. Asimismo, los resultados obtenidos fueron satisfactoriamente validados empleando ensayos de recuperación.

ABSTRACT

Argentina is a beekeeping country and one of the drawbacks is the exposure of the hives to pollutants. Therefore, the aim of this Thesis is the development of an electroanalytical methods to evaluate the hygienic-sanitary quality of bee products of Buenos Aires province.

The following works were performed:

- A "lab-made" solid bismuth electrode was designed for cadmium determination in corbicular pollen and raw propolis samples. For this proposed, Square Wave Anodic Stripping Voltammetry was used as electroanalytical technique.
- An "in-situ" antimony film electrode was developed for tetracyclines residues determination in honey samples, using Square Wave Cathodic Stripping Voltammetry.
- The use of an electrochemically activated glassy carbon electrode and Square Wave Adsorptive Stripping Voltammetry was implemented for the amitraz determination from its final metabolite, 2,4 dimethylaniline, in honey samples.

The proposed methods are simple, fast, low cost and may be a good alternative for the determination of these analytes in bee products. Furthermore, the results obtained were satisfactorily validated using recovery study.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados

Firma del director

Firma del codirector

INDICE GENERAL

Motivación y Objetivos

Motivación.....	2
Objetivos.....	3

Capítulo 1. Introducción

1.1 El rol de las abejas.....	5
1.1.1 Polinización cruzada.....	5
1.1.2 Bioindicadores de contaminación ambiental.....	5
1.1.3 Productos de la colmena.....	6
1.2. Apicultura en la Argentina actual.....	8
1.2.1. Plan Estratégico Argentina Apícola 2030.....	8
1.3 Control de calidad de productos apícolas.....	9
1.3.1 Técnicas electroanalíticas.....	10
1.3.1.1 Voltamperometría cíclica.....	11
1.3.1.2 Técnicas de pulso.....	12
1.3.1.3.1 Voltamperometría de onda cuadrada.....	13
1.3.1.3 Voltamperometría de redisolución.....	14
1.3.1.3.1 Voltamperometría de redisolución anódica.....	15
1.3.1.3.2 Voltamperometría de redisolución catódica:.....	15
1.3.1.3.3 Voltamperometría de redisolución adsortiva:.....	16
1.4 Bibliografía.....	17

Capítulo 2. Origen y recolección de las muestras apícolas

2.1 Origen y recolección de las muestras analizadas.....	211
2.1.1 Miel:.....	211
2.1.2 Propóleos bruto:.....	233
2.1.3 Polen corbicular.....	244
2.2 Bibliografía.....	266

Capítulo 3. Desarrollo de un electrodo de bismuto sólido para la determinación de cadmio en muestras apícolas empleando Voltamperometría de Redisolución Anódica de Onda Cuadrada

3.1 Objetivos.....	288
--------------------	-----

3.2	Introducción	299
3.3	Materiales y métodos.....	311
3.3.1	Reactivos y soluciones	311
3.3.2	Instrumentación	311
3.3.3	Preparación del electrodo de bismuto sólido	311
3.3.4	Determinación del área electroactiva.....	322
3.3.5	Procedimineto.....	333
3.3.6	Preparación de las muestras	344
3.3.6.1	Propóleos bruto	344
3.3.6.2	Polen de abeja	344
3.4	Resultados y discusión.....	355
3.4.1	Optimización de los parámetros de voltamperometría de onda cuadrada con redisolución anódica	355
3.4.2	Parámetros analíticos	40
3.4.3	Interferentes.....	422
3.4.4	Aplicación a muestras de polen de abeja y propóleos bruto.....	423
3.5	Conclusiones parciales.....	433
3.6	Bibliografía.....	455

Capítulo 4. Aplicación de un electrodo de film de antimonio “in situ” para la determinación de tetraciclinas en muestras de miel empleando Voltamperometría de Redisolución catódica de Onda Cuadrada

4.1	Objetivos.....	50
4.2	Introducción	511
4.3	Materiales y métodos.....	544
4.3.1	Reactivos y soluciones	544
4.3.2	Instrumentación	555
4.3.3	Procedimiento.....	555
4.3.3.1	Voltamperometría de onda cuadrada con redisolución catódica (VOCRC)	555
4.3.3.2	Preparación de las muestras de miel	566
4.4	Resultados y discusión.....	57
4.4.1	Reducción electroquímica de las TCs	577
4.4.2	Comportamiento de adsorción.....	577

4.4.3	Respuesta electroquímica del EFSb vs CV	588
4.4.4	Optimización de los parámetros analíticos	599
4.4.4.1	Optimización de valores de pH y concentración de antimonio	599
4.4.4.2	Optimización parámetros electroanalíticos	60
4.4.5	Film de antimonio “in-situ” generado en las condiciones optimas 655	
4.4.6	Parámetros analíticos.....	655
4.4.7	Oxígeno disuelto	677
4.4.8	Aplicación a muestras de miel.....	688
4.5	Conclusiones parciales.....	699
4.6	Bibliografía.....	70

Capítulo 5. Aplicación de Voltamperometría de Redisolución Adsorptiva de Onda Cuadrada para la determinación de amitraz a partir de su metabolito final en muestras de miel

5.1	Objetivos.....	777
5.2	Introducción	788
5.3	Materiales y métodos.....	811
5.3.1	Reactivos y soluciones.....	811
5.3.2	Instrumentación.....	822
5.3.3	Procedimiento	822
5.3.3.1	Tratamiento de muestra.....	822
5.3.3.2	Hidrólisis de amitraz	833
5.3.3.3	Voltamperometría de redisolución adsorptiva de onda cuadrada	833
5.4	Resultados y discusión	844
5.4.1	Oxidación electroquímica de 2,4 dimetilanilina	844
5.4.2	Comportamiento de adsorción de 2,4 dimetilanilina y su producto de oxidación.....	854
5.4.3	Voltamperometría de redisolución adsorptiva de onda cuadrada empleando un ECV sin y con activación electroquímica.....	877
5.4.4	Optimización de los parámetros analíticos	888
5.4.4.1	Optimización de pH y tiempo de acumulación	888

5.4.4.2 Optimización de los parámetros de voltamperometría de onda cuadrada.....	899
5.4.4.3 Optimización del tiempo de acumulación	944
5.4.5 Hidrólisis de amitraz	955
5.4.5.1 Estudio de la concentración de HCl.....	966
5.4.5.2 Efecto de la temperatura y acción microondas	977
5.4.6 Parámetros analíticos.....	988
5.4.7 Aplicación a muestras de miel.....	999
5.5 Conclusiones parciales	100
5.6 Bibliografía.....	1011
Capítulo 6. Conclusiones	
Conclusiones generales.....	1077
Apéndice I. Productividad de la Tesis	1099
Apéndice II. Becas Obtenidas	113

Motivación y Objetivos

“Le pedí miel al naranjo y el naranjo contestó:

-Yo no soy panal, que naranjo soy.

Le pedí miel al tomillo y el tomillo contestó:

-Yo no soy panal, que tomillo soy.

Le pedí miel al romero y el romero contestó:

-Yo no soy panal, que romero soy.

Con qué generosidad, además de darme miel, en su miel me dio el panal algo de tomillo, algo de romero, algo de azahar.”

Manuel Benítez Carrasco

Bioquímica Gabriela Krepper
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

MOTIVACIÓN

Esta Tesis forma parte de una línea de investigación iniciada en el año 2009 en el Área de Química Analítica del Departamento de Química de la Universidad Nacional del Sur. El grupo conformado, posee una interacción interdisciplinaria con Investigadores de Universidades Nacionales e Internacionales, de Química Analítica y otras disciplinas, así como también con el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Asimismo, integra la Cooperativa de Trabajo Apícola Pampero Ltda. en el marco del Convenio de Cooperación entre dicha Cooperativa y la Universidad Nacional del Sur. Los estudios interdisciplinarios tienden a favorecer la transferencia de las investigaciones al sector productivo. En forma particular la provincia de Buenos Aires presenta un amplio crecimiento en la actividad apícola generando nuevos polos productivos e incrementado la comercialización de los productos de la colmena, tanto en el mercado interno como para su exportación. Por ello, en el año 2013 surge el proyecto de trabajo de Tesis, orientado al empleo de técnicas electroanalíticas que permitan evaluar la calidad higiénico-sanitaria de productos apícolas de la provincia de Buenos Aires. Esto permite seguir los lineamientos del Plan Estratégico Argentina Apícola 2017 y continuar trabajando en las expectativas del sector apícola, en función del Plan Estratégico Argentina Apícola 2030.

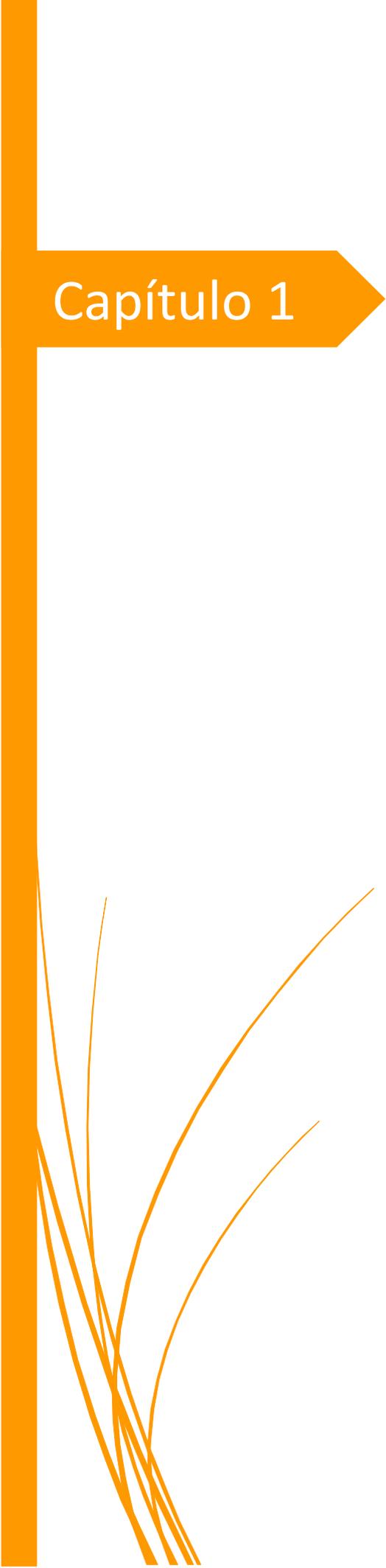
OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral radica en desarrollar e implementar nuevos métodos electroanalíticos, simples, rápidos, de bajo costo y amigables con el medio ambiente. Se utilizan diferentes electrodos de trabajo, para llevar a cabo la determinación de residuos de metales, antibióticos e insecticidas en miel de abeja, polen corbicular y propóleos bruto, provenientes de la provincia de Buenos Aires.

Para cumplir con el objetivo planteado se pretende:

- Recolectar muestras apícolas de la provincia de Buenos Aires para su posterior estudio.
- Desarrollar un electrodo de bismuto sólido para la determinación de cadmio en muestras de polen corbicular y propóleos bruto empleando Voltamperometría de Redisolución Anódica de Onda Cuadrada.
- Emplear un electrodo de film de antimonio "*in-situ*" para la determinación de tetraciclinas en muestras de miel empleando Voltamperometría de Redisolución Anódica de Onda Cuadrada.
- Implementar la técnica de Voltamperometría Adsorbtiva de Onda Cuadrada para la determinación de amitraz a partir de su metabolito final en muestras de miel.

La evaluación de los parámetros higiénico-sanitarios empleando los métodos electroanalíticos desarrollados, repercutirá favorablemente en la cadena de producción y comercialización de los productos apícolas de la provincia de Buenos Aires.

A thick orange vertical bar runs down the left side of the page. A horizontal orange arrow points to the right from the middle of this bar, containing the text 'Capítulo 1'.

Capítulo 1

Introducción



1.1 El rol de las abejas

La especie de abeja más explotada comercialmente a nivel mundial para la producción de miel y otros productos de la colmena es la *Apis mellifera*, comúnmente llamadas abeja melífera. Estos insectos cumplen diferentes roles en el ecosistema, participando en la *polinización cruzada* (intercambio de polen entre distintas flores), actuando como *bioindicadores de contaminación ambiental* y, además, brindando los *productos de la colmena*.

1.1.1 *Polinización cruzada*

Las abejas visitan más de mil flores de la misma especie en una sola jornada, con la finalidad de recolectar el polen floral. De esta forma, el polen es transportado a través de sus pelos de una flor a otra, favoreciendo el contacto entre los elementos femeninos y masculinos de las mismas, y así la generación de una nueva semilla. Este proceso de polinización conlleva a una mayor y mejor producción agrícola. Por ejemplo, se puede mencionar las plantaciones de árboles frutales, donde el 86% de la polinización cruzada es causada por insectos y de los cuales, el 80% corresponde a la polinización ocasionada por abejas melíferas. Debido a su elevada importancia, en la actualidad se emplean colmenas en cultivos de frutales, alfalfa, girasol, entre otros, con el fin de lograr una mejor polinización [1].

1.1.2 *Bioindicadores de contaminación ambiental*

Con el fin de evaluar el estado de la contaminación ambiental, desde hace algunos años se ha difundido el empleo del monitoreo biológico o biomonitoreo como mecanismo de vigilancia. Para esto, se emplean especies vegetales o animales sensibles o capaces de expresar información útil sobre la exposición a distintos factores ambientales. Las abejas son consideradas muy buenos bioindicadores, debido a que pueden acumular contaminantes tanto sobre su cuerpo como en los productos de la colmena. Estos insectos, poseen la ventaja de ser fáciles de criar, tener un promedio de vida corto y una alta tasa de reproducción, lo que permite una renovación rápida y continúa de la colmena. Las abejas presentan todo su cuerpo cubierto de pelos, permitiéndole retener en

ellos los materiales y sustancias con los que han entrado en contacto. Durante sus numerosos vuelos diarios, las abejas melíferas no solo toman contacto con la fauna y vegetación circundante, sino que también lo hacen con el aire, suelo y agua del territorio, muestreando así también estos recursos. En la Figura 1.1, puede observarse detalladamente cómo se relacionan estas interacciones [2]. Se ha demostrado que las abejas y sus productos han sido empleados con éxito para el monitoreo de metales pesados [3], insecticidas y pesticidas [4].

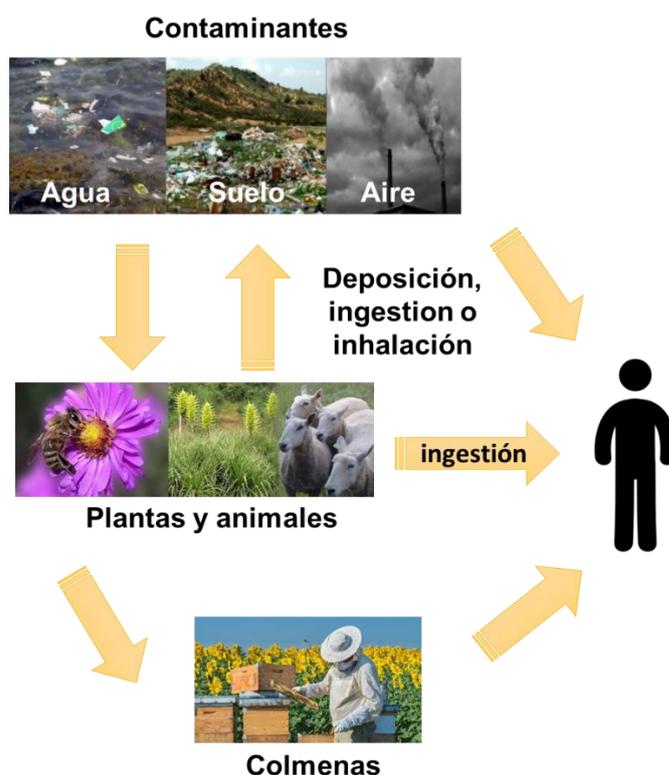


Figura 1.1. Esquema de difusión de contaminantes en el ambiente y su llegada a la colmena y al hombre.

1.1.3 Productos de la colmena

Las abejas melíferas proporcionan una amplia variedad de productos con propiedades nutricionales beneficiosas. Muchos de estos, pueden consumirse como tales o son empleados como ingredientes en otros productos, en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica.

Dentro de los principales productos apícolas de puede mencionar [5]:

➤ *Miel*

La miel es el alimento básico de las abejas. Éstas lo producen a partir del néctar que recolectan de las flores y, gracias a su gran contenido de hidratos de carbono, le brindan la energía necesaria para desarrollar todas las actividades dentro de la colmena.

➤ *Polen*

El polen floral es el elemento masculino de las flores, que es recolectado por las abejas y mediante secreciones salivales lo aglutinan en forma de bolitas y de esta forma lo transportan a la colmena como polen corbicular, también llamado polen apícola, es una sustancia fundamental para la alimentación de la colmena al poseer un alto contenido de aminoácidos, proteínas e hidratos de carbono, y ser además fuente de lípidos, vitaminas y minerales.

➤ *Propóleos*

El propóleos es una sustancia resinosa, elaborada por las abejas a partir de exudado de plantas. Dentro de la colmena es empleado para su construcción, sellado de grietas y prevención de enfermedades, gracias a sus propiedades bactericidas y fungicidas.

➤ *Cera*

Es producida por las abejas jóvenes, entre los 13 y 18 días de edad, a través de sus glándulas céreas y miel como materia prima. La cera es una sustancia grasa que segregan las abejas como líquido a través de sus glándulas cereras. Al tomar contacto con el aire, la cera se solidifica en forma de pequeñas escamas, que luego emplean para construir la estructura rígida de los panales hexagonales. Las pequeñas celdillas generadas en el panal serán utilizadas para almacenar polen y miel, y para depositar los huevos de la abeja reina. La cera también es empleada por las abejas para cubrir u opercular las celdas una vez que se encuentran llenas de miel madura y también para proteger aquellas que contengan las pupa o nifas.

➤ *Jalea Real*

Es una sustancia segregada por las abejas jóvenes, entre los 4 a 12 días de edad, producida a través de las glándulas hipofaríngeas, a base de polen, miel y agua. La jalea real es rica en vitaminas del grupo B y es producida con el fin de

alimentar a la reina a lo largo de toda su vida y a las larvas en sus primeros días de edad.

➤ *Apitoxina*

Es producida por el cuerpo de las abejas obreras y empleada solo como mecanismo de defensa ante agentes externos. En la actualidad, es utilizada para el tratamiento de enfermedades reumáticas.

1.2. Apicultura en la Argentina actual

El término apicultura, deriva del latín *Apis* (abeja) y *Cultura* (cultivo o crianza), es la actividad dedicada a la crianza y cuidado de las abejas, para la obtención de los productos de la colmena.

Hoy en día la apicultura se desarrolla en todo el territorio nacional, a excepción de la provincia de Tierra del Fuego. Tal es así, que Argentina se ha convertido en el país con mayor producción apícola del hemisferio sur, con aproximadamente 25 mil productores y 3 millones de colmenas. El auge de producción se generó a partir de los años 2000 y 2004, donde el país logró ser uno de los mayores exportadores de miel y productos apícolas a nivel mundial. En el año 2017, Argentina produjo para exportación 66.692 toneladas de productos apícolas, correspondiéndose 65.998 toneladas a miel natural. La explotación de colmenas melíferas se ubicó mayoritariamente en la región de la pampa húmeda, principalmente en la provincia de Buenos Aires (53 %), seguida por las provincias de Santa Fe (15 %), Córdoba (12 %), La Pampa (10 %) y Entre Ríos (8 %). Finalmente, con una producción menor se encontraron las demás provincias del país [6]. La producción apícola anual, se exportó principalmente a Estados Unidos, seguido por países de la Unión Europea como Alemania, Italia, Francia, Bélgica, Reino Unido, entre otros. De los países no europeos, el principal destino de exportación fue Japón, seguido por Arabia Saudita, Australia, Indonesia y Marruecos [7].

1.2.1. *Plan Estratégico Argentina Apícola 2030*

Con la finalidad de transformar al país en un líder del mercado mundial en producción apícola, en el año 2008 se aprobó el Plan Estratégico Argentina

Apícola 2017 [8]. Este, vincula toda la cadena apícola con el objetivo principal de alcanzar un producto de valor agregado para competir con los principales países productores, como Estados Unidos y China. Dicho plan, persigue cuatro objetivos estratégicos: comercialización, producción, promoción y valor agregado. La **comercialización** impulsa a incrementar el valor agregado de los productos apícolas argentinos incorporando la identificación de origen. La **producción** plantea el aumento de la calidad y cantidad de producción mediante la innovación tecnológica y la comunicación entre todos los actores de la cadena de producción. La **promoción** fomenta las normas de calidad y adaptación de la producción a las exigencias del mercado internacional y por último el **valor agregado** promueve garantizar la calidad, a través de sistemas de gestión de calidad e inocuidad, e identificar y caracterizar todos los productos de la colmena. En el transcurso del año 2018, los organismos correspondientes junto a representantes de la actividad apícola se encuentran desarrollando las bases para el próximo Plan Estratégico Argentina Apícola 2030.

1.3 Control de calidad de productos apícolas

En la actualidad, los entes reguladores estipulan de forma limitada los parámetros de calidad de los **productos apícolas**, así como también los métodos establecidos para su cuantificación.

Para **productos agrícolas** en general, el Código Alimentario Argentino establece en su Resoluciones Mercosur N° 014/95, que los residuos de plaguicidas en los mismos deben adoptar las normas del Codex Alimentarius FAO/OMS, sobre residuos de plaguicidas para el comercio de productos agrícolas entre los estados partes del Mercosur [9]. Para la determinación de pesticidas o residuos veterinarios, las metodologías comúnmente empleadas involucran las técnicas cromatográficas, con la principal desventaja de requerir instrumental costoso y en muchos casos, tiempos de análisis prolongados.

En forma particular, el plan CREHA (Plan Nacional de Control de Residuos e Higiene en Alimentos, dependiente de SENASA), recopila anualmente los datos obtenidos sobre la presencia de residuos y contaminantes en diferentes materias primas y matrices alimentarias [10]. Este plan incluye y regula el control de contaminantes químicos en **miel**, su nivel de acción y la concentración de

sustancia residual a partir de la cual se toman medidas correctivas. Establece también los métodos de análisis para la determinación de cada uno de los compuestos. Por ejemplo, para la determinación de residuos de metales pesados indica el uso de técnicas de voltamperometría anódica o espectroscopía de absorción atómica (AAS). En el caso de antibióticos y acaricidas propone el empleo de técnicas cromatográficas.

Respecto del **propóleo bruto y el extracto de propóleos**, el CAA (Capítulo XVI, Correctivos y coadyuvantes) los considera como insumos para la industria alimentaria [11]. Establece las concentraciones máximas solamente para metales como plomo y arsénico, e indica que no deben contener residuos de plaguicidas y antibióticos. Los métodos de ensayo están regulados por las Normas Argentina IRAM-INTA 15935-1 y 15935-2, para propóleos bruto y el extracto de propóleos, respectivamente [12]. Estas normativas establecen para la determinación de plomo y arsénico, métodos espectrofotométricos, que resultan poco sensibles y selectivos, y generan gran cantidad de residuos tóxicos.

El CAA (Capítulo X) establece, que el **polen** apto para el consumo no debe contener residuos de plaguicidas, sin embargo, no hace referencia al contenido de metales [13].

La necesidad de resolver los problemas o limitaciones que presentan las técnicas habituales y de realizar estrictos análisis de calidad de los productos apícolas, de forma rápida, económica y compatible con el medio ambiente, hace replantear las metodologías establecidas por la normativa vigente.

1.3.1 Técnicas electroanalíticas

Las técnicas electroanalíticas en las últimas décadas, han demostrado ser realmente útiles para el monitoreo y control de calidad de productos en la industria alimenticia. Estas metodologías poseen grandes ventajas frente a otras para la identificación o cuantificación de analitos, por su elevada sensibilidad, selectividad de especies electroactivas, rapidez de medición, instrumentación relativamente económica y que pueden ser combinadas a otras metodologías, como por ejemplo electrodos enzimáticos o detectores electroquímicos

acoplados a HPLC, entre otras [14-15]. Por lo tanto, sería beneficioso el desarrollo de nuevas metodologías electroanalíticas para evaluar la presencia de sustancias contaminantes en productos de la colmena.

Se desarrollan en forma breve los conceptos teóricos más relevantes de las técnicas voltamperométricas empleadas en esta Tesis: voltamperometría cíclica y voltamperometría de pulso de onda cuadrada con redisolución anódica y catódica.

1.3.1.1 *Voltamperometría cíclica*

Una de las técnicas voltamperométricas más empleadas para la obtención rápida de información cualitativa, como el estudio de mecanismos de reacción redox, reacciones químicas acopladas, procesos de adsorción y parámetros termodinámicos, es la voltamperometría cíclica. En esta técnica, se varía el potencial en forma triangular en función del tiempo entre un valor de potencial inicial (E_i) y otro final (E_f), conocidos como potenciales de inversión, a una misma velocidad de barrido (Figura 1.3 a)). Se trabaja sobre un electrodo estacionario, estático y sin agitación. El intervalo de potenciales entre E_i y E_f , debe incluir el potencial de oxidación y/o reducción de él o los analitos en estudio. Cuando el barrido de potenciales se realiza en el sentido más negativo, ocurre la reducción de la especie electroactiva ($O + ne^- \rightarrow R$) y se conoce como barrido catódico o directo. Cuando ocurre en la dirección inversa, hacia potenciales más positivos, tiene lugar la oxidación de la especie ($R + ne^- \rightarrow O$) y se llama barrido anódico o indirecto. La variación de corriente medida en función del potencial aplicado se conoce como voltamperograma cíclico, Figura 1.3 b). En el inicio del ciclo, la especie se encuentra completamente en su estado oxidado y a medida que los potenciales comienzan a desplazarse en el sentido catódico, la especie comienza a reducirse hasta el final de la mitad del ciclo, donde toda la especie se encuentra en su estado reducido. En el barrido inverso, la especie vuelve a su forma completamente oxidada al finalizar el ciclo. En este clásico ejemplo, se distingue un solo ciclo de barridos de potenciales aplicado a una cupla redox completamente reversible, registrando un pico de oxidación y uno de reducción, a potenciales característicos y valores de corriente máxima de pico.

La corriente obtenida puede relacionarse de forma directamente proporcional con la concentración del analito en estudio mediante la ecuación de Randles-Sevcik. A una temperatura de 25 °C, la expresión es:

$$I_p = (2,69 \times 10^5) n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C$$

donde n es el número de electrones que intervienen en la reacción redox, A es el área del electrodo de trabajo, D el coeficiente de difusión de la especie electroactiva, v la velocidad de barrido y C la concentración del analito [16-17].

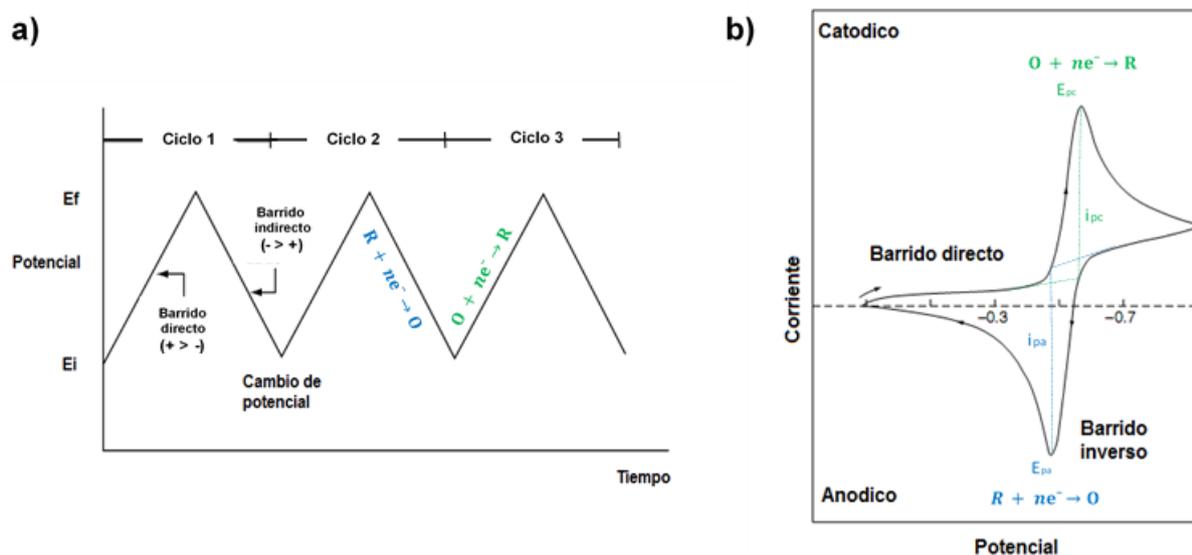


Figura 1.3. Variación del potencial aplicado en el tiempo **a)** y voltamperograma típico de una cupla redox completamente reversible **b)** en voltamperometría cíclica.

1.3.1.2 Técnicas de pulso

Barker y Jenking presentaron por primera vez las técnicas de pulso en el año 1952, con el objetivo de disminuir aún más los límites de detección de las medidas voltamperométricas, permitiendo detecciones por debajo de 10^{-8} M [18]. En las técnicas de pulso, se mide la corriente generada luego de aplicar un pulso de potencial durante un tiempo establecido [19].

Las técnicas de pulso (pulso normal, pulso diferencial, escalonada y de onda cuadrada) se diferencian en la forma de modular el potencial aplicado sobre el electrodo de trabajo y como se determina la corriente generada [20].

1.3.1.2.1 Voltamperometría de onda cuadrada

En el desarrollo de este trabajo de Tesis, se empleó voltamperometría de onda cuadrada para la determinación de los distintos analitos en estudio. En esta técnica, la forma de modulación del potencial implica una onda cuadrada simétrica, con un impulso directo y uno reverso sobre una escalera de potencial base, tal como se observa en la Figura 1.4. El parámetro ΔE_p es la amplitud del pulso de la onda cuadrada, ΔE_s es el incremento o salto de potencial al final de cada ciclo. Cada ciclo o período (τ) está dado por dos veces el tiempo de pulso (t_p), que es el tiempo durante el cual es aplicado el potencial. El t_p , puede ser expresado también en forma de frecuencia (f), donde se define $f = 1/(2 t_p)$. La corriente es medida al final de cada pulso en dos puntos, al final de la onda directa y reversa. La corriente directa (i_d) surge del primer pulso, en el sentido del barrido, y la corriente reversa (i_r) al final del segundo pulso, en dirección inversa. Finalmente, la corriente neta registrada en el voltamperograma está dada por la diferencia de estas dos corrientes, calculada como: $\Delta i = i_d - i_r$ [21]. En la Figura 1.5 se muestra un voltamperograma de onda cuadrada teórico para una cupla redox reversible.

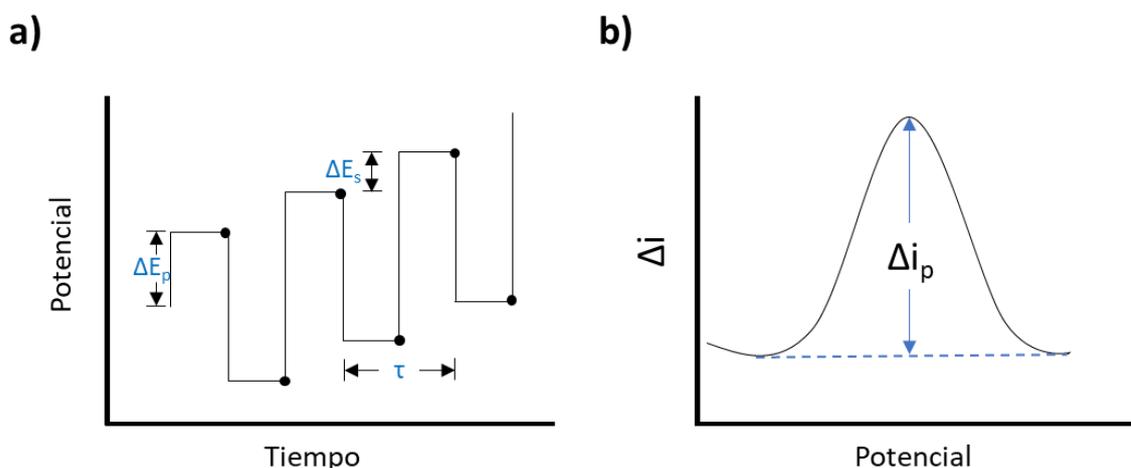


Figura 1.4. Esquema característico de la forma de aplicación del potencial en el tiempo **a)** y su voltamperograma típico **b)** para la técnica voltamperometría de onda cuadrada.

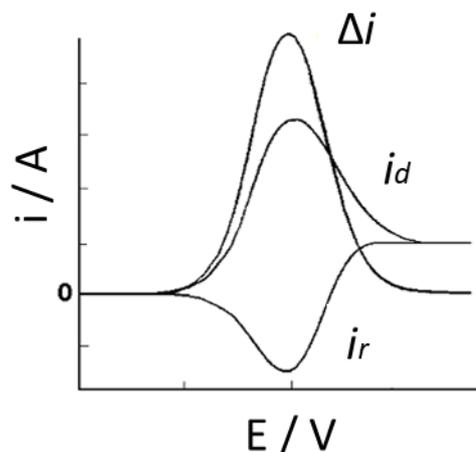


Figura 1.5. Voltamperograma de onda cuadrada teórico para una cupla redox reversible.

Una de las principales ventajas de la técnica es la elevada velocidad de barrido: $v = f\Delta E_s$. La intensidad de corriente para un sistema reversible está dada por:

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

donde Δi es la corriente medida en cada pulso, n el número de electrones transferidos, F la constante de Faraday ($96485 \text{ A s mol}^{-1}$), A el área superficial del electrodo (cm^2), D el coeficiente de difusión de la especie en estudio ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), C la concentración de la especie en el seno de la solución (mol cm^{-3}), t_p el tiempo del pulso (s) y ψ la función adimensional de corriente que depende de los parámetros de la onda cuadrada ΔE_s y ΔE_{sw} [22]. De esta última relación matemática, se puede evidenciar que Δi resulta directamente proporcional al $t_p^{-1/2}$ y por lo tanto a $f^{1/2}$. Es decir, aumentos en los valores de frecuencia de la onda cuadrada, que se verán evidenciados en un aumento en las velocidades de barrido ($v = f\Delta E_s$), proporcionarán valores de respuesta (Δi) mayores.

1.3.1.3 Voltamperometría de redisolución

La voltamperometría de redisolución involucra dos etapas, una primera etapa de electrodeposición o preconcentración y una segunda de redisolución y determinación. Es una de las técnicas electroanalíticas más eficiente para la cuantificación de analitos a nivel de trazas, ya que permite alcanzar bajos límites de detección, debido a su etapa de preconcentración, donde el analito se

acumula en la superficie del electrodo de trabajo. Este paso puede diferenciarse en si el proceso de preconcentración ocurre de forma electrolítica (anódica o catódica) o adsortiva. La etapa de redisolución puede ocurrir de forma tal que el analito acumulado en la superficie del electrodo de trabajo sufra una reacción de oxidación, si existe un barrido de potenciales en sentido anódico, o ocurra una reacción de reducción del analito, si el barrido de potenciales es en sentido catódico. Por otro lado, para la determinación, esta metodología puede ser acoplada a distintas técnicas electroanalíticas de detección, como son las técnicas voltamperométricas [23].

Dentro del grupo de las técnicas de redisolución voltamperométricas, se pueden mencionar la voltamperometría de redisolución anódica (ASV), la voltamperometría de redisolución catódica (CSV) y la voltamperometría de redisolución adsortiva (AdSV) [24]:

1.3.1.3.1 Voltamperometría de redisolución anódica

El término voltamperometría de redisolución anódica fue el primero en emplearse para la determinación de metales, que lograban formar amalgamas con el mercurio o depositarse sobre electrodos de carbono o metales nobles. En una primera etapa, los analitos se acumulan por electrodeposición, al aplicar un potencial 0,3 a 0,4 V menor que el potencial de oxidación de la primera especie en estudio, durante un tiempo determinado. La sensibilidad depende directamente del tiempo que es aplicado el potencial, pudiendo variar desde unos pocos segundos a minutos. La convección también favorece esta etapa, al emplear electrodos rotatorios o agitando de forma mecánica la solución en el interior de la celda electroquímica. Con la finalidad de obtener resultados reproducibles se deben controlar estrictamente las condiciones de trabajo. Luego, se detiene la agitación entre 5 a 30 segundos y finalmente, ocurre la redisolución y medida, a través de alguna técnica electroanalítica. En la Figura 1.6 a) se detalla esquemáticamente las etapas que involucran esta técnica.

1.3.1.3.2 Voltamperometría de redisolución catódica

Se emplea para la determinación de especies inorgánicas y orgánicas. Durante la etapa de acumulación la especie a determinar se deposita anódicamente o por

adsorción. Luego, ocurre la etapa de redisolución y determinación del analito a través de alguna técnica electroanalítica, que genera una señal de corriente catódica al aplicar un barrido de potencial negativo.

1.3.1.3.3 Voltamperometría de redisolución adsortiva

Esta técnica, a diferencia de las anteriores, no lleva a cabo una etapa de preconcentración electrolítica, sino que se produce la acumulación por adsorción física del analito sobre la superficie del electrodo de trabajo. Este proceso muchas veces puede verse favorecido al aplicar un determinado potencial. Esta modalidad, se aplica mayormente a especies orgánicas, pero también permite analizar metales a través de la formación de complejos con un ligando orgánico (ML) que se adsorben y logran su preconcentración. Una vez cumplida la etapa de adsorción, se lleva a cabo la de redisolución. En la Figura 1.6 b) se detalla esquemáticamente las etapas que involucran esta técnica.

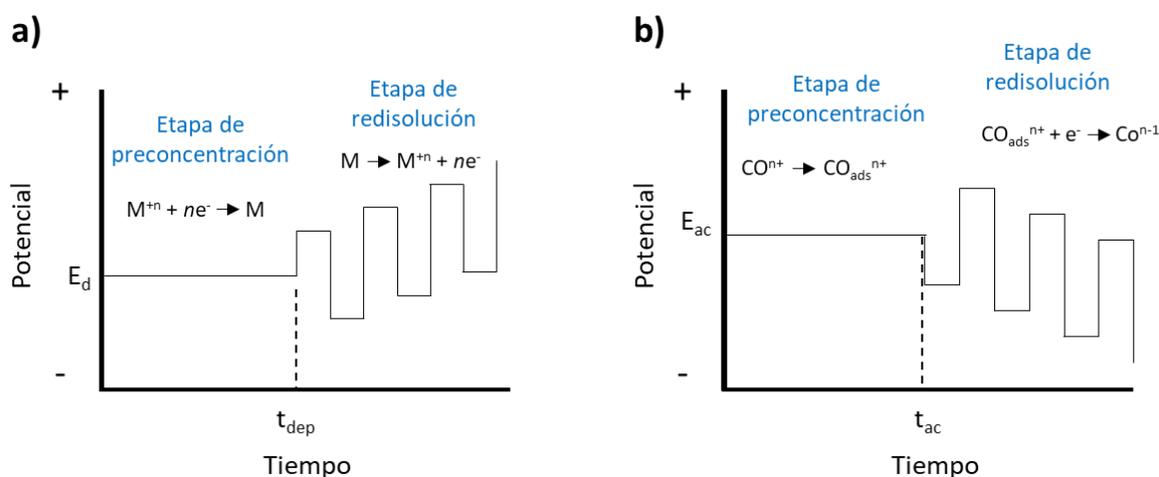


Figura 1.6. Esquema que detalla las etapas y procesos se involucran la **a)** Voltamperometría de redisolución anódica, donde E_d es el potencial de deposición aplicado, t_{dep} el tiempo de deposición, M el metal a determinar, y en **b)** Voltamperometría de redisolución adsortiva, donde E_{ac} es el potencial de acumulación en el caso de ser empleado, t_{ac} el tiempo de acumulación y CO el compuesto orgánico.

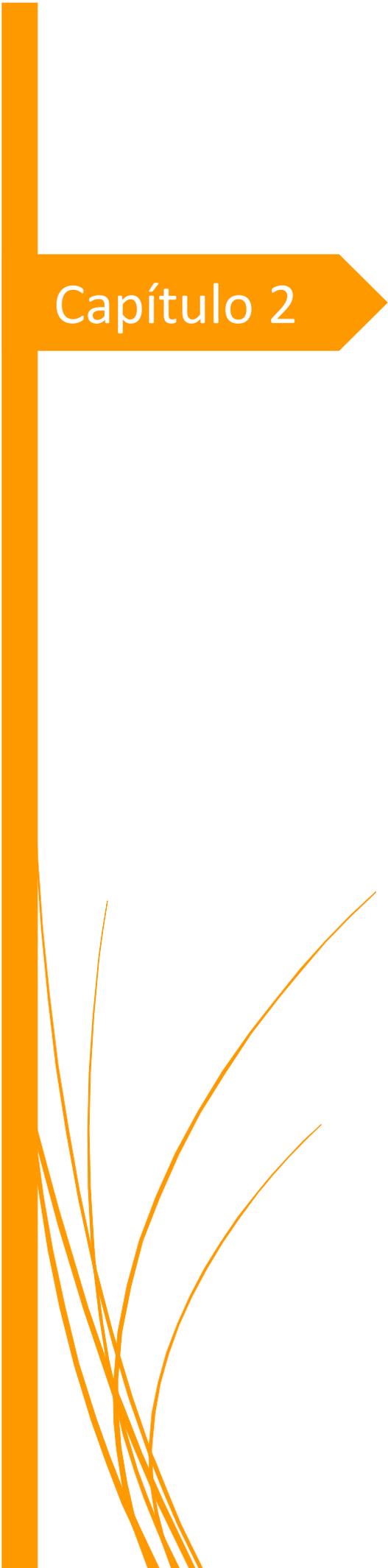
1.4 Bibliografía

- [1] BASUALDO M., BEDASCARRASBURE E., Rol de las abejas en la polinización de cultivos, *Revista IDIA XXI*, 2003, 5, 18-22.
- [2] PORRINI C., GLORIA SABATINI A., GIROTTI S., GHINI S., MEDRZYCKI P., GRILLENZONI F., BORTOLOTTI L., GATTAVECCHIA E., CELLI G., Honey bees and bee products as monitors of the environmental contamination, *APIACTA*, 2003, 38, 63-70.
- [3] LEITAI L., MUHLBACHOVA G., CESCO S., BARBATRINI R., MONDINI C., Investigation of the use of honey bees and honey bee products to assess heavy metals contamination, *Environmental Monitoring and Assessment*, 1996, 43, 1, 1-9.
- [4] JOHANSEN C. A., MAYER D. F., EVES J. D., KIOUS C. W., Pesticides and Bees, *Environmental Entomology*, 1983, 12, 5, 1513-1518.
- [5] CARON D. M., Manual práctico de apicultura, 2010. Disponible en: <http://food4farmers.org/wp-content/uploads/2012/08/MANUALDEWEY.pdf>
- [6] RABAGLIO M. D., CASTIGNANI H., Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), <https://inta.gob.ar/documentos/exportaciones-apicolas-por-provincia-origen>, Consulta: 20 de febrero de 2018.
- [7] RABAGLIO M. D., CASTIGNANI H., Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), <https://inta.gob.ar/documentos/consulta-de-exportaciones-por-pais-destino>, Consulta: 20 de febrero de 2018.
- [8] MINISTERIO DE PRODUCCIÓN, SECRETARÍA DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y ALIMENTOS, Plan Estratégico Argentina Apícola 2017, http://www.infoleg.gob.ar/basehome/actos_gobierno/actosdegobierno20-7-2009-1.htm. Consulta: 20 de febrero de 2018.
- [9] CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO, (CAA) Resolución GMC N° 14/95-“Residuos de Plaguicidas en Productos Agropecuarios Alimenticios In Natura”, Buenos Aires, 1995.
- [10] SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (SENASA), *Plan de Control de Residuos e Higiene de Alimentos. Resumen de Resultados 2016*, Marzo 2017. Disponible en: http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/ABEJAS

[/PROD PRIMARIA/PLAN CREHA/CTROL RES/resumen resultados plan creha_2016.pdf](#)

- [11] CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO (CAA), Capítulo XVI, Correctivos y coadyuvantes, 2005.
- [12] Normas Argentina IRAM-INTA, PROPOLEOS EN BRUTO 15935-1 y EXTRACTOS DE PROPÓLEOS 15935-2, Buenos Aires, IRAM-INTA, 2008.
- [13] CÓDIGO ALIMENTARIO ARGENTINO (CAA), Capítulo X, Alimentos azucarados, 2004.
- [14] SKOOG D. A., HOLLER F. J., NIEMAN T. A., Principios de análisis instrumental, 5ta edición, Ed. McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U, Madrid, 2001.
- [15] HARVEY D., Analytical Chemistry 2.0, McGraw-Hill Higher Education, 2008, Capítulo 11, página 745.
- [16] NICHOLSON R. S., SHAIN I., Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. Analytical Chemistry, 1964, 36, 706-723.
- [17] BARKER G. C., JENKINS I. L., Square-wave polarography, Analyst, 1952, 77, 685-696.
- [18] AOKI K., OSTERYOUNG J., OSTERYOUNG R. A., Differential normal pulse voltammetry-theory, Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry, 1980, 110, 1-18.
- [19] OSTERYOUNG J., OSTERYOUNG R., Square wave voltammetry, Analytical Chemistry, 1985, 57, 1, 101-110.
- [20] RAMALEY L., KRAUSER M. S. Jr., Theory of square wave voltammetry, Analytical Chemistry, 1969, 41, 11, 1362-1365.
- [21] BARD A. J., FAULKNER L. R., ELECTROCHEMICAL METHODS: Fundamentals and Applications, 2da Edición, Ed. John Wiley & Sons, 2001, Capítulo 7, páginas 293-297.
- [22] WANG J., Stripping Analysis, En: Encyclopedia of Electrochemistry, Editor UNWIN P., New Mexico, U.S.A, Capítulo 2.3, página 125-133. Disponible en: <https://archive.org/details/EncyclopediaOfElectrochemistry>
- [23] FOGG A. G., WANG J., Terminology and convention for electrochemical stripping analysis, IUPAC, Pure and Applied Chemistry, 1999, 71, 5, 891-897.

[24] HABIB I.H.I., WESHAHY S. A., TOUBAR S., EL-ALAMIN M. M. A., Cathodic Stripping Voltammetric Determination of Losartan in Bulk and Pharmaceutical Products, *Portugaliae Electrochimica Acta* 2008, 26, 4, 315-324.

A thick orange vertical bar runs down the left side of the page. A horizontal orange arrow points to the right from the top of this bar, containing the text 'Capítulo 2'.

Capítulo 2

Origen y recolección de las muestras apícolas



2.1 Origen y recolección de las muestras analizadas

A lo largo de este trabajo de Tesis se trabajó con tres productos de la colmena: miel, propóleos bruto y polen corbicular.

2.1.1 Miel:

Las muestras de miel se obtuvieron de apiarios ubicados en seis localidades distintas del oeste y sudoeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina: Coronel Dorrego, 30 de Agosto, Sierra de la Ventana, Pedro Luro, Coronel Suarez y Médanos. En la Figura 2.1 se muestra la ubicación geográfica de estas localidades. Las muestras de miel de la localidad de Pedro Luro pertenecían a un apiario ecológico, exento de aditivos químicos. En estas localidades las especies vegetales predominantes son *Diplotaxis tenuifolia* (L.) DC. (comúnmente llamada “Flor amarilla”, de la familia Brassicaceae), *Centaurea* sp (de la familia Asteraceae) y *Eucalyptus* sp (de la familia Myrtaceae) [1].



Figura 2.1. Mapa de la provincia de Buenos Aires con la ubicación geográfica de los seis apiarios.

La cosecha de miel se llevó a cabo teniendo en cuenta las buenas prácticas apícolas [2]. Para esto, se seleccionan los panales sin crías y celdillas

operculadas en un 75% como mínimo. En este proceso, las abejas obreras protegen a las celdillas de los panales con una finísima capa de cera densa e impermeable cuando la miel presenta la humedad adecuada, y de esta forma se asegura un menor riesgo a la fermentación, (Figura 2.2 a)). En la sala de extracción, se lleva a cabo el desoperculado utilizando un cuchillo de acero inoxidable. Luego, se emplean extractores centrífugos automáticos o de manivela, que permiten separar la miel de los cuadros desoperculados y cae al fondo del extractor (Figura 2.2 b)). La miel colectada, es sometida a un proceso de filtración para eliminar trozos de panal, cera u otras impurezas que pudieran estar presentes tras el proceso de extracción. Finalmente, las muestras destinadas a la venta al por mayor, son envasadas en tambores “aptos para estar en contacto con alimentos” [2]. Aquellas muestras destinadas a la venta al por menor son fraccionadas en envases bromatológicamente aptos de plásticos o de vidrio de menor contenido. Las condiciones de humedad y temperatura deben ser controladas durante todo el periodo de transporte y almacenamiento. En la Figura 2.2 c) se muestra una imagen de las muestras empleadas, en sus envases destinados a la venta. Se deben cumplir siempre en todas estas etapas las pautas establecidas por las buenas prácticas apícolas y de manufactura.



Figura 2.2. Fotografía de un panal operculado **a)**, un extractor de miel automático **b)** y de las muestras de miel utilizadas **c)**.

2.1.2 *Propóleos bruto:*

Las muestras de propóleos bruto se obtuvieron de apicultores provenientes de dos localidades del sudoeste de la provincia de Buenos Aires, Bahía Blanca e Hilario Ascasubi. La cosecha del propóleos bruto se llevó a cabo en el mes de abril de 2015, empleando el método de malla. En este método, se colocan mallas plásticas entre la parte superior de los cuadros de la última alza (o media alza) y la tapa de la colmena como puede observarse en la Figura 2.3. Las abejas propolizan los huecos entre los cuadros y llenan la malla de propóleos. El apicultor debe ir desplazando la malla para permitir cubrir los espacios que quedaron sin propolizar. Cuando la malla se encuentra cubierta como mínimo en un 40% de su totalidad, se retira y es remplazada por una malla nueva. Todas las mallas cosechadas de un mismo apiario se colocan en una bolsa de nylon limpia y seca, y son almacenadas en un lugar fresco hasta ser remitidas al laboratorio. Allí, las mallas son congeladas entre -10 °C y -20 °C, para lograr la rigidez del propóleos y facilitar su extracción de la malla. Una vez realizada esta etapa, se recomienda embalar el propóleos bruto en partidas de 1 Kg como máximo, de modo de no apelmazarlo, preferentemente en frascos de vidrio de color ámbar. Para una mejor conservación, se debe almacenarlo, en un lugar fresco (15° C), seco y al resguardo de la luz. Pueden emplearse también bolsas de polietileno sin inscripciones [3].



Figura 2.3. Fotografías de una malla plástica tipo “mosquitero” para la recolección de propóleos colocada en la última alza de una colmena **a** y **b**) y una de las muestras de propóleos bruto cosechadas **c**).

2.1.3 *Polen corbicular*

El polen corbicular utilizado en esta Tesis fue recolectado en la localidad de Hilario Ascasubi en el mes de marzo de 2015, utilizando una trampa de polen colocada a la entrada de la colmena. Esta trampa bloquea la entrada con una rejilla, obligando a las abejas a pasar por orificios circulares de 5 mm de diámetro. La dificultad del paso a través de estos orificios ocasiona que las abejas dejen caer los granos de polen que llevan almacenados en las corbículas del tercer par de patas. Estos granos caen en un depósito colector colocado en la parte inferior que luego se recolecta (Figura 2.4). Posteriormente, el polen debe ser sometido inmediatamente a un proceso de secado a una temperatura entre 40 y 42 °C durante 12 a 15 horas, para lograr disminuir los niveles de humedad a un valor máximo de 8% y evitar y/o retrasar la proliferación de microorganismos [4]. La etapa de secado también es crucial y sumamente importante para eliminar las larvas de polillas que pudieran estar presentes y asegurar una conservación segura. Una vez seco y antes de ser envasado, se realiza una limpieza manual o mecánica, con el fin de eliminar las partículas extrañas que pudieran estar presentes, como restos de insectos o sus fragmentos, polvo, hierbas, entre otros. En el envasado, es sumamente importante que la temperatura del polen sea igual o menor a la del ambiente,

para evitar la condensación sobre la superficie de las cargas de polen. Los recipientes empleados deben ser herméticos, de vidrio, plástico o envasado al vacío. El polen ya envasado debe ser almacenado en un lugar fresco, seco y al resguardo de la luz.

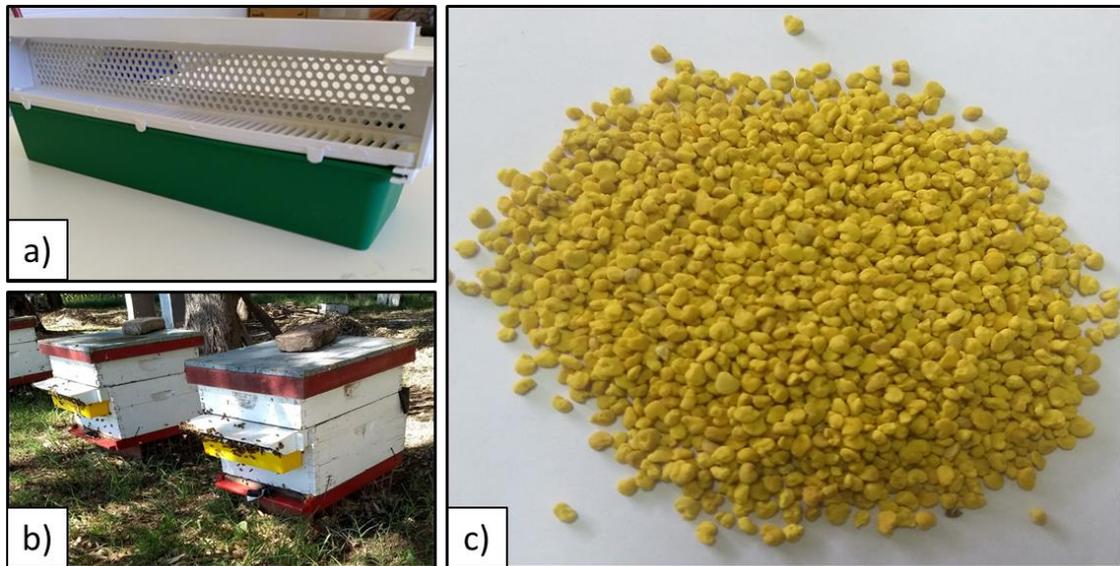


Figura 2.4. Fotografía de una trampa de polen de polietileno **a)**, colmenas con trampas de polen colocadas a la entrada de la colmena **b)** y una de las muestras de polen corbicular cosechadas **c)**.

2.2 Bibliografía

[1] VALLE A., ANDRADA A., ARAMAYO E., GIL M., LAMBERTO S., A Melissopalynological map of the south and southwest of the Buenos Aires Province, Argentina, *Spanish Journal of Agricultural Research*, 2007, 5, 2, 172-180.

[2] CONSEJO NACIONAL DE APICULTURA, Protocolo Nacional de Calidad de Miel N° 1/2004, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos, Subsecretaría de Política Agropecuaria y Alimentos, Buenos Aires, 2004. Disponible en: http://sipan.inta.gov.ar/productos/ssd/vc/bariloche/ap/pdf/Protocolo_Miel.pdf

[3] MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y PESCA, REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY, DIRECCIÓN GENERAL DE LA GRANJA (DIGEGRA), Pautas para una adecuada producción de propóleos, Cartilla N° 1, Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/cartillapautasparaunaadecuadaproducciondepropoleos.pdf>

[4] CORONEL B. B., GRASSO D., CHAVES PEREIRA S., FERNÁNDEZ Gonzalo, Caracterización bromatológica del polen apícola argentino, *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 2004, 15, 29, 145-181.



Capítulo 3

Desarrollo de un electrodo de bismuto sólido para la determinación de cadmio en muestras apícolas empleando Voltamperometría de Redisolución Anódica de Onda Cuadrada



3.1 Objetivos

Evaluar la factibilidad del empleo de un electrodo de bismuto sólido diseñado y fabricado en el laboratorio para la determinación de residuos de cadmio en muestras de polen corbicular y propóleos bruto de apiarios del sudoeste de la provincia de Buenos Aires. Para ello, se emplea voltamperometría de redisolución anódica con detección de onda cuadrada como técnica electroquímica. Para la optimización de los parámetros electroanalíticos, se utiliza un diseño de experimentos factorial 2^5 .

3.2 Introducción

Las abejas son insectos voladores conocidos por su rol en la polinización de los cultivos agrícolas y en la producción de productos naturales. El principal producto de la abeja explotado en todo el mundo es la miel, no sólo por ser un endulzante y conservante natural, sino también por sus propiedades biológicas utilizadas por la medicina alternativa [1]. Hoy en día, el uso de otros productos apícolas, como el propóleo bruto y el polen de abeja, ha ido en aumento debido a sus propiedades medicinales y a su empleo en apiterapia. A causa de su alto contenido en compuestos fenólicos y flavonoides, que les brindan actividad antimicrobiana y antioxidante, son ampliamente utilizados por las industrias alimentaria y farmacéutica [2 - 3]. En la actualidad, el aumento en el consumo de productos nutracéuticos y alimentos funcionales, que proporcionan beneficios nutricionales y sobre la salud humana, condujo a un incremento en la explotación de estos productos apícolas [4]. Sin embargo, la exposición de las colmenas a contaminantes generados por las propias prácticas apícolas o desde el medio ambiente, es una de las problemáticas que enfrentan los apicultores hoy día. Las abejas pecoreadoras sobrevuelan el área circundante a la colmena recolectando el polen de las flores, el néctar floral y extrafloral, resinas vegetales y los contaminantes que estos hayan adquirido del ambiente. En el proceso de recolección, las abejas también toman contacto con otros recursos naturales, como el aire y el suelo, y de esta forma con los contaminantes que pudieran estar presentes en ellos. Al retornar a la colmena, también lo hacen con los contaminantes que han tenido contacto. Por esta razón, tanto las abejas como sus productos han sido utilizados como biomarcadores para el monitoreo de plaguicidas, metales pesados y otros [5 - 6]. Dentro de los metales, el cadmio proveniente de fuentes naturales (rocas, sedimentos, suelos) y antropogénicas (minería, metalurgia, industrias, fertilizantes fosfatados, etc.) es liberado al aire, agua y tierra en forma de partículas y puede permanecer en el medio ambiente durante periodos prolongados de tiempo [7]. Sin embargo, sólo un pequeño porcentaje se incorpora a la colmena por vía aérea. Por otro lado, el cadmio proveniente de las emisiones industriales se deposita en suelo y agua al adherirse a la materia orgánica e inorgánica, contaminando el néctar o melaza de las plantas. Las abejas al recoger el polen y el néctar lo trasladan a la colmena

Capítulo 3. Desarrollo de un electrodo de bismuto

y así a sus productos [5]. Teniendo en cuenta que estos productos apícolas son destinados al consumo, debe evaluarse su contenido ya que puede acumularse en órganos vitales como el riñón, hígado y en los huesos, ocasionando trastornos sobre la salud humana [8 - 9].

En la región del sudoeste de la provincia de Buenos Aires en la última década, surge una alerta por indicios de la presencia de cadmio en productos apícolas debido la cercanía del polo industrial [10]. De allí la importancia creciente de realizar un seguimiento de los niveles del mismo en estos productos, ya que su presencia está relacionada con el área geográfica donde se localizan los apiarios. Sin embargo, en el Código Alimentario Argentino el contenido de cadmio en productos apícolas aún no está regulado.

La determinación de residuos de cadmio se realiza comúnmente por técnicas costosas como espectroscopía de absorción atómica (AAS) [11], espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) [12] o espectroscopía atómica de fluorescencia (AFS) [13]. Como una alternativa más económica, rápida y de elevada sensibilidad, se pueden emplear técnicas electroquímicas con diferentes electrodos de trabajo.

El uso de electrodos de bismuto, material amigable con el medio ambiente, surge para reemplazar a los electrodos de película y de gota colgante de mercurio en el análisis electroquímico. Su baja toxicidad, adaptabilidad y bajo costo, los convierten en una excelente opción desde el año 2000 y alcanzaron su auge en el año 2008 [14]. El bismuto tiene las ventajas de tener una amplia ventana de potencial, poder formar aleaciones con otros metales pesados y tener un alto potencial de descarga de hidrógeno [15 - 17]. Distintos materiales se han empleado para generar electrodos de películas de bismuto y electrodos revestidos de bismuto, tales como carbono vítreo [18 - 20], mina de lápiz [21] y metales nobles [22 - 23]. Sin embargo, los electrodos de bismuto sólido también deben ser considerados como una alternativa exitosa, debido a las ventajas de ser económicos, fácil de fabricar, estables y de presentar señales electroquímicas reproducibles [24]. Hasta el momento, los electrodos de bismuto sólido solo se utilizaron satisfactoriamente para la determinación de metales pesados en muestras de aguas residuales y agua de lagos, mares, ríos, agua de consumo y de lluvia empleando voltamperometría de redisolución anódica con detección de onda cuadrada y pulso diferencial [25 - 27].

Capítulo 3. Desarrollo de un electrodo de bismuto

Debido a las razones anteriormente planteadas, en este trabajo se presenta la aplicación de un electrodo de bismuto sólido fabricado en el laboratorio para la determinación de cadmio en muestras de polen de abeja y propóleos bruto empleando voltamperometría de redisolución anódica con detección de onda cuadrada. Mediante el desarrollo de esta metodología se pretende dar respuesta a la problemática que presenta el sector apícola en cuanto al control del contenido de cadmio en estas muestras. De esta manera se contribuye con el Plan Estratégico Argentina Apícola 2030 para lograr productos de valor agregado que puedan competir en el mercado internacional.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 *Reactivos y soluciones*

Todos los reactivos empleados fueron calidad analítica y las soluciones se prepararon usando agua ultra pura (18M Ω).

- ✓ Solución de trabajo de cadmio: se preparó mediante una dilución apropiada de la solución patrón (1,001 mgmL⁻¹, MERK).
- ✓ Solución de electrólito de soporte: Buffer ácido acético (MERK) - acetato de sodio (Cicarelli) 0,1 M pH 4,50.

3.3.2 *Instrumentación*

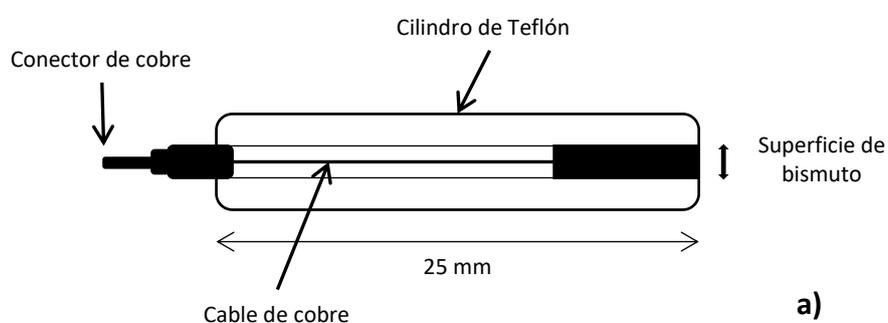
Todos los experimentos se llevaron a cabo a 23 \pm 2 °C y sin remoción del oxígeno disuelto. Las medidas voltamperométricas se realizaron con un potenciostato Epsilon (BASi-Bioanalytical System, USA) controlado por el software de electroanálisis del equipo. Se empleó una celda electroquímica de 25,0 mL y una configuración de tres electrodos, utilizando un electrodo de bismuto sólido como electrodo de trabajo, un electrodo de Ag / AgCl (NaCl 3M) como electrodo de referencia, y un espiral de platino como contraelectrodo.

3.3.3 *Preparación del electrodo de bismuto sólido*

El electrodo de bismuto sólido (EBi) fue diseñado y fabricado en el laboratorio. Un esquema y una imagen fotográfica del EBi se muestran en la Figura 3.1. Para su construcción, una pequeña cantidad de perdigones de bismuto metálico (Belmont) se fundieron a 271 °C y se volcó dentro de un capilar de cuarzo de

Capítulo 3. Desarrollo de un electrodo de bismuto

aproximadamente 1,8 mm de diámetro y una longitud de 2,1 cm. Luego, se dejó enfriar dentro del molde de cuarzo hasta temperatura ambiente. Posteriormente se extrajo del capilar el cilindro de bismuto sólido y en un extremo del mismo, se soldó un conector de cobre. Se procedió a su limpieza con alcohol etílico y se insertó bajo presión dentro de un tubo de Teflón de 6 mm de diámetro externo, empleado como cubierta para una mejor manipulación del electrodo. Una vez montada la estructura, la cara expuesta de bismuto se pulió con un papel de lija resistente al agua (1500 grit) hasta obtener una superficie del metal completamente lisa. A continuación, se realizó un pulido adicional con alúmina (Sigma-Aldrich) de 0,3 μm y 0,05 μm de tamaño de partícula y se enjuagó con abundante agua ultra pura.



b)

Figura 3.1. Esquema del electrodo de bismuto sólido fabricado en el laboratorio **a)** e imagen fotográfica de su superficie y cuerpo **b)**

3.3.4 Determinación del área electroactiva

El área real electroquímica del EBi se obtuvo empleando la técnica cronoamperometría [28]. Para ello, se utilizó una solución de una especie electroactiva de concentración y coeficiente de difusión conocidos: $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ $2,5 \cdot 10^{-3}$ M en KCl 0,1 M, D_0 : $0,75 \cdot 10^{-5}$ $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$. Los cronoamperogramas registraron la respuesta de la intensidad de corriente (I) en el tiempo (t), luego de aplicar un salto de potencial desde -50 a 800 mV. Estos

parámetros se relacionan según la Ecuación de Cottrell (1) para un electrodo plano:

$$I(t) = \frac{nFAC_o^*D_o^{1/2}}{\pi^{1/2}t^{1/2}} \quad (1)$$

donde I es la corriente límite de difusión (A), n el número de electrones transferidos, A el área de trabajo (cm^2), C_o^* la concentración de la especie electroactiva (mol cm^{-3}), D_o el coeficiente de difusión ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) y F la constante de Faraday ($96500 \text{ A s mol}^{-1}$)

El valor de la superficie activa que posee el electrodo de trabajo se puede estimar teniendo en cuenta que la relación lineal de I en función del $t^{-1/2}$ posee un valor del pendiente dado por la ecuación (2):

$$P_{\text{pend}} = \frac{nFAC_o^*D_o^{1/2}}{\pi^{1/2}} \quad (2)$$

De los datos experimentales obtenidos de cinco cronoamperogramas registrados, se calculó una superficie activa promedio del EBi de $0,0258 \text{ cm}^2$.

3.3.5 Procedimiento

Los experimentos se llevaron a cabo en una celda electroquímica de 25,0 mL con los tres electrodos sumergidos en la solución de buffer ácido acético-acetato de sodio pH 4,50. En una primera etapa, se realizó una voltamperometría cíclica de dos ciclos consecutivos entre -1,5 y 1,0 V, con el fin de generar una fina capa de óxido de bismuto (III) sobre la superficie del electrodo y aumentar la conductividad del mismo [17]. Para los análisis de voltamperometría de onda cuadrada con redisolución anódica (VOCRA) se utilizó un potencial de deposición de -1,4 V durante 180 s, bajo condiciones de agitación. Luego de un tiempo de espera de 10 s sin agitación, se registraron los voltamperogramas entre -1,4 V y -0,4 V. Los parámetros óptimos de voltamperometría de onda cuadrada seleccionados fueron: salto de pulso (ΔE_s) 6 mV, frecuencia (f) de 20 Hz y amplitud de la onda cuadrada (ΔE_{sw}) 40 mV. Finalmente, se llevó a cabo

una etapa de limpieza en la misma celda, mediante la aplicación de 0,30 V durante 30 s bajo condiciones de agitación, con el propósito de limpiar la superficie del electrodo de trabajo entre las medidas realizadas.

3.3.6 *Preparación de las muestras*

Las muestras de propóleos bruto y polen de abeja se obtuvieron de apicultores provenientes de dos localidades del sudoeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina: Bahía Blanca e Hilario Ascasubi. Las muestras de propóleos bruto empleadas fueron cosechadas por el método de malla en el mes de abril de 2015 y el polen analizado fue recolectado de una trampa de polen colocada a la entrada de la colmena, en el mes de marzo del mismo año. En base a la bibliografía existente se realizaron los siguientes tratamientos a las muestras seleccionadas:

3.3.6.1 *Propóleos bruto*

Para la mineralización de las muestras de propóleos bruto, se llevó a cabo la metodología establecida por la norma conjunta IRAM-INTA 15935-1 [29]. Para esto, se pesó una cantidad adecuada de propóleos ($2,00 \pm 0,01$ g) y se calcinó en una mufla a una temperatura de 400 ± 25 ° C durante 2 horas. Luego, las cenizas blancas obtenidas fueron retomadas con una solución de ácido nítrico (Cicarelli) al 20 % (v / v), se filtraron con un papel de filtro Whatman N° 40 y se completó hasta un volumen final de 25,0 mL con agua.

3.3.6.2 *Polen de abeja*

En el caso de las muestras de polen de abeja, se eligió emplear una digestión húmeda [30]. Para su procedimiento, se pesó una cantidad adecuada de polen seco ($2,50 \pm 0,01$ g) y se trató con 25 mL de ácido nítrico concentrado (Cicarelli). Se calentó durante 20 minutos empleando una placa calentadora, procurando que la solución no se seque ni se carbonice. A continuación, las muestras se filtraron con un papel de filtro Whatman N° 40 y se completó hasta 25,0 mL de volumen final con agua.

3.4 Resultados y discusión

3.4.1 *Optimización de los parámetros de voltamperometría de onda cuadrada con redisolución anódica*

Los diseños de superficie de respuesta factorial 2^k (con k factores) son frecuentemente utilizados para estudios de optimización [31]. Para evaluar el efecto de un factor sobre una respuesta, se debe variar el nivel de cada factor al menos en dos niveles diferentes. Es decir, que el diseño para k factores (parámetros que pueden ser controlados por el investigador) resulta en 2^k ensayos distintos. En estos diseños, se selecciona un valor máximo y mínimo para cada parámetro y así establecer el dominio experimental. En este trabajo se realizó la optimización de los parámetros de VOCRA, mediante un experimento factorial completo. Dicho diseño estadístico incluye todas las combinaciones posibles entre los distintos niveles seleccionados para los factores de experimentación y el estudio de interacción entre una o más variables de interés [32]. La señal de corriente de pico neta obtenida por la oxidación del cadmio se selecciona como variable respuesta. El diseño estudia la variación de la respuesta en base a los distintos factores de la técnica. Así, permite encontrar un modelo tal que explique la naturaleza de las reacciones, seleccionar cuales son las variables significativas y a qué nivel, y hallar las condiciones experimentales óptimas. La función o modelo que ajuste el diseño experimental no necesariamente es lineal, puede ser cuadrática o polinómica.

En esta Tesis se utilizó el software Statgraphics Plus 5.1 para la construcción del diseño experimental y su análisis. Se llevó a cabo un diseño factorial 2^5 en estrella con un $\alpha = 1,72$ y puntos centrales para un mejor estudio de los factores de los parámetros electroquímicos. Se empleó como valor de respuesta la intensidad de corriente de pico neta. Los 5 factores a evaluar fueron: frecuencia (f), salto de potencial (ΔE_s) y amplitud de la onda cuadrada (ΔE_{sw}), potencial de deposición (E_{dep}), y tiempo de deposición (t_{dep}). Los dos niveles estudiados -1 y $+1$, los puntos estrella $-\alpha$ y $+\alpha$, y el valor de los puntos centrales para cada parámetro en estudio figuran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Valores experimentales para cada nivel en estudio.

Factor	-α	-1	0	+1	+α
E_{dep} (mV)	-1400	-1340	-1250	-1160	-1100
f (Hz)	20	24	30	36	40
ΔE_s (mV)	2	3	4	5	6
ΔE_{sw} (mV)	20	24	30	36	40
t_{dep} (s)	30	60	105	150	180

Se llevaron a cabo en total 45 experimentos: 42 correspondientes al diseño en estrella y 3 al punto central. Las medidas se realizaron al azar para evitar errores sistemáticos y los resultados fueron analizados empleando ANOVA. Las condiciones experimentales para cada uno de los ensayos se detallan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Parámetros experimentales para cada experimento empleados en el diseño de optimización

Experimento	E_{dep} (mV)	f (Hz)	ΔE_s (mV)	ΔE_{sw} (mV)	t_{dep} (s)
1	-1340	24	3	24	60
2	-1160	24	3	24	60
3	-1340	36	3	24	60
4	-1160	36	3	24	60
5	-1340	24	5	24	60
6	-1160	24	5	24	60
7	-1340	36	5	24	60
8	-1160	36	5	24	60
9	-1340	24	3	36	60
10	-1160	24	3	36	60
11	-1340	36	3	36	60
12	-1160	36	3	36	60
13	-1340	24	5	36	60
14	-1160	24	5	36	60
15	-1340	36	5	36	60
16	-1160	36	5	36	60
17	-1340	24	3	24	150
18	-1160	24	3	24	150
19	-1340	36	3	24	150
20	-1160	36	3	24	150
21	-1340	24	5	24	150
22	-1160	24	5	24	150
23	-1340	36	5	24	150
24	-1160	36	5	24	150
25	-1340	24	3	36	150
26	-1160	24	3	36	150
27	-1340	36	3	36	150
28	-1160	36	3	36	150
29	-1340	24	5	36	150
30	-1160	24	5	36	150
31	-1340	36	5	36	150
32	-1160	36	5	36	150
33	-1405	30	4	30	105
34	-1095	30	4	30	105
35	-1250	20	4	30	105
36	-1250	40	4	30	105
37	-1250	30	2	30	105
38	-1250	30	6	30	105
39	-1250	30	4	20	105
40	-1250	30	4	40	105
41	-1250	30	4	30	30
42	-1250	30	4	30	180
43	-1250	30	4	30	105
44	-1250	30	4	30	105
45	-1250	30	4	30	105

El gráfico de Pareto obtenido tras el análisis de los datos experimentales se presenta en la Figura 3.2, e indica los factores e interacciones que resultan importantes o estadísticamente significativos. Se puede observar que tanto los factores E_{dep} , f , ΔE_{sw} , t_{dep} , como sus interacciones resultan significativos para un valor del nivel de significación de 0,05. Se puede evaluar también, que como la interacción entre E_{dep} y ΔE_s resulta significativa, estos factores no se comportan como factores independientes. Del análisis del gráfico de Pareto se puede concluir que los factores más significantes resultaron ser E_{dep} y t_{dep} . Además, ΔE_{sw} y t_{dep} presentan un efecto positivo sobre la respuesta de la intensidad de pico de oxidación del cadmio. Por lo contrario, el incremento de los valores de E_{dep} genera una disminución de la señal analítica.

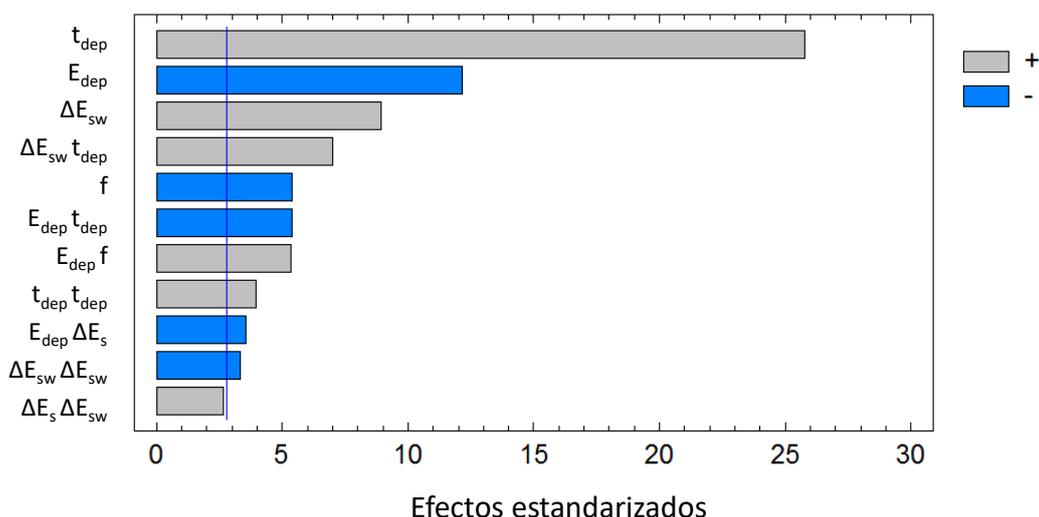


Figura 3.2. Diagrama de Pareto de los efectos principales estandarizados para un diseño factorial completo 2^5 . El nivel de significación $\alpha = 0,05$ se indica con la línea vertical.

Del diseño surge como resultado, una superficie de respuesta representada por la ecuación:

$$\begin{aligned}
 I_{p,n} = & -6.91 \times 10^3 - 6.53 \times 10^{-4} E_{dep} + 6.02 \times 10^{-1} f - 3.25 \Delta E_s + 2.45 \times 10^{-1} \Delta E_{sw} - 1.29 \times \\
 & 10^{-1} t_{dep} + 5.17 \times 10^{-4} E_{dep} f - 2.04 \times 10^{-3} E_{dep} \Delta E_s - 6.90 \times 10^{-5} E_{dep} t_{dep} + 2.32 \times 10^{-2} \\
 & \Delta E_s \Delta E_{sw} - 6.79 \times 10^{-3} \Delta E_{sw}^2 + 1.34 \times 10^{-3} \Delta E_{sw} t_{dep} + 1.43 \times 10^{-4} t_{dep}^2
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

Capítulo 3. Desarrollo de un electrodo de bismuto

El modelo se ajusta con un coeficiente de correlación $R^2 = 0,921$, indicando un buen modelo de ajuste. Las correspondientes superficies de respuesta obtenidas por el modelo se presentan en la Figura 3.3. Como se puede observar, los valores óptimos seleccionados para ΔE_s , f , ΔE_{sw} , E_{dep} and t_{dep} corresponden a extremos de la superficie. Sin embargo, se logró evaluar que valores menores de f y mayores de ΔE_s , no generaban cambios significativos en la respuesta analítica. Así también, el valor de $\Delta E_{sw} = 40$ mV fue seleccionado como óptimo, debido a que estudios presentados por Liu et al. (2008) demostraron que valores mayores a 50 mV podrían ocasionar un desdoblamiento de la señal de pico [33]. Con respecto al E_{dep} , valores más negativos que -1,40 V no fueron evaluados, debido a la formación de burbujas de hidrógeno que provocan una disminución en la selectividad del electrodo [34]. Asimismo, valores de tiempo de deposición mayores a 180 s no fueron estudiados, dado que causarían extensos tiempos de análisis. Los valores óptimos hallados por el modelo se representan en la Tabla 3.3.

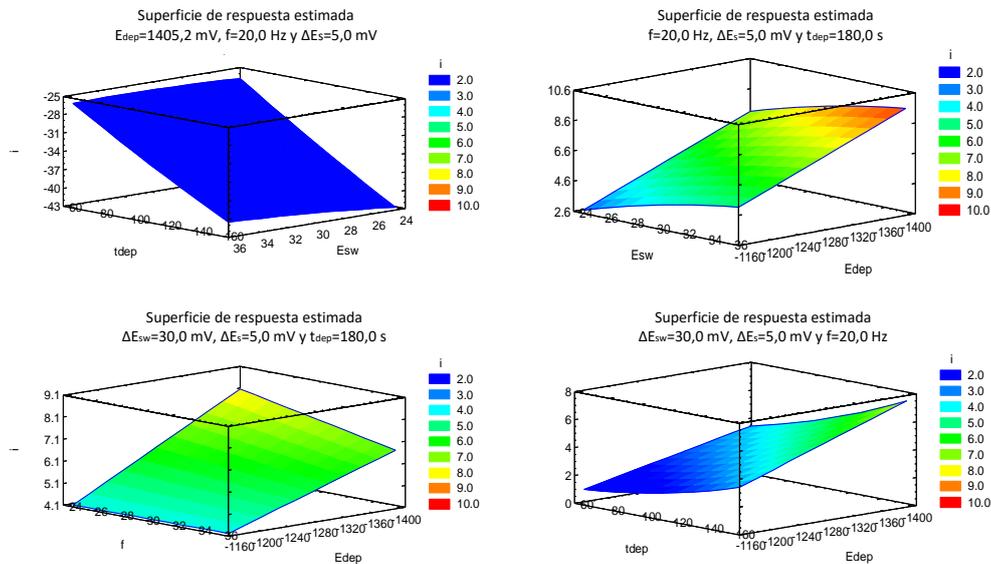


Figura 3.3. Superficies de respuesta obtenidas para el diseño factorial 2^5

Tabla 3.3. Valores óptimos hallados por el diseño experimental para cada parámetro electroquímico.

<i>Factor</i>	<i>Valores óptimos</i>
<i>E_{dep} (mV)</i>	-1400
<i>f (Hz)</i>	20,0
<i>ΔE_s (mV)</i>	6,0
<i>ΔE_{sw} (mV)</i>	40,0
<i>t_{dep} (s)</i>	180,0

3.4.2 Parámetros analíticos

Como se puede observar en la Figura 3.4, bajo las condiciones experimentales óptimas se obtuvo un comportamiento lineal entre 2,0 a 100,0 μgL^{-1} de cadmio. La ecuación de la curva de calibrado obtenida fue $I_{p,n} = (0,268 \pm 0,051) + (0,374 \pm 0,001) C^*_{\text{Cd}}$, donde $I_{p,n}$ representa la corriente de pico neta en unidades de μA y C^*_{Cd} la concentración de cadmio en unidades de μgL^{-1} . El coeficiente de correlación lineal (R^2) obtenido fue de 0,999. Los límites de detección (LDD) y de cuantificación (LDQ) fueron de 0,78 μgL^{-1} y 2,61 μgL^{-1} , estimados como 3 y 10 veces $S_{y/x}$ /pendiente respectivamente [35]. En la Tabla 3.4 puede observarse que el LDD obtenido resulta menor con respecto a otros métodos electroquímicos encontrados en la literatura, donde el cadmio fue determinado como único analito [34] o en simultáneo con plomo [36 - 37] y zinc [38]. La repetitividad resultó del 8,03%, calculada como el porcentaje de variación relativa estándar de 8 medidas independientes de una solución de cadmio 30 μgL^{-1} .

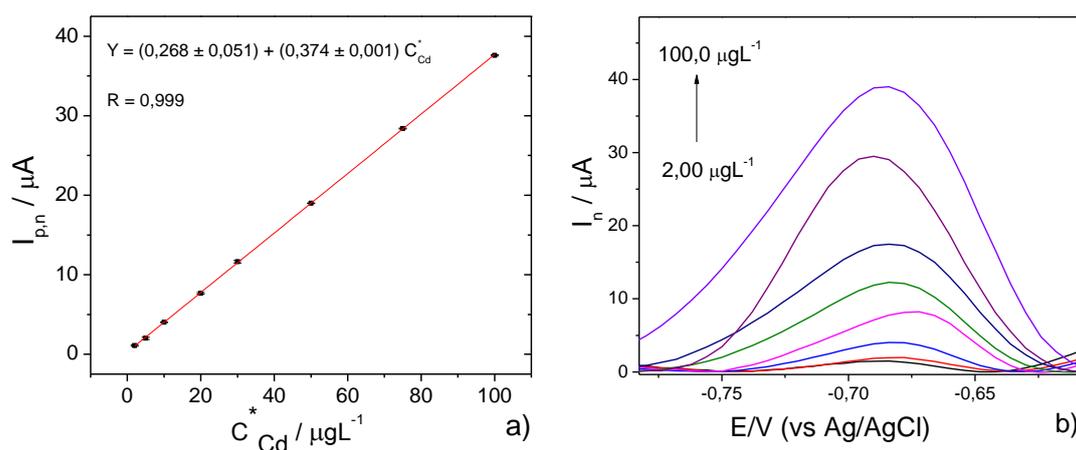


Figura 3.4. a) Curva de calibrado b) Voltamperogramas obtenidos bajo las condiciones óptimas de VOCRA.

Tabla 3.4. Comparación del método propuestos con otros hallados en la literatura.

ELECTRODO	Método	Rango lineal (μg L⁻¹)	LDD (μg L⁻¹)	Referencia
BDD (Electrodo de boro dopado)	VRAOC ^a	19,80 – 243,9	1,0	[39]
P(DPA-co-2ABN)/GC-ME (Electrodo de carbono vítreo modificado con película de Poly(diphenilamina-co-2-aminobenzonitrilo)	VRAPD ^b	1,26 x 10 ³ - 9,07 x 10 ⁵	2,55 x 10 ²	[36]
PANI/GCE (Electrodo de carbono vítreo modificado con un revestimiento conductor de polianilina)	VRAOC ^a	0 – 224,8	14,61	[37]
BDD (Película fina de diamante dopada con boro)	VRAPD ^b	1-1000	1,0	[38]
Hg-GC (Electrodo de carbono vítreo revestido con mercurio)	VRAPD ^b	1-1000	1,0	
EBi (Electrodo de bismuto sólido)	VRAOC ^a	2,00 – 100,0	0,78	Método propuesto

^a Voltamperometría de Redisolución Anódica de Onda Cuadrada

^b Voltamperometría de Redisolución Anódica de Pulso Diferencial

3.4.3 Interferentes

El propóleos bruto y polen de abeja son muestras complejas con una amplia cantidad de elementos minerales en su composición. En algunos casos, contienen otros metales además del Cd (II), como lo son el Zn (II), Pb (II) y Cu (II) que, con el bismuto, pueden formar aleaciones intermetálicas [40]. Por ello, se estudiaron sus posibles interferencias en función de las concentraciones encontradas usualmente en estas muestras, empleando soluciones de cadmio de $30,0 \mu\text{gL}^{-1}$ y $6,0 \mu\text{gL}^{-1}$ para propóleos bruto y polen respectivamente. Los resultados indican que no se evidencian efectos sobre la señal del cadmio con una concentración de Pb (II) y Cu (II) 10 veces mayor y 20 veces superior para el Zn (II).

En la Figura 3.5 se muestran los voltamperogramas de VOCRA registrados para una muestra de polen corbicular a) y una de propóleos bruto b) con adición de $20 \mu\text{gL}^{-1}$ y $30 \mu\text{gL}^{-1}$ cadmio respectivamente. Asimismo, se grafican los voltamperogramas de las correspondientes soluciones testigo.

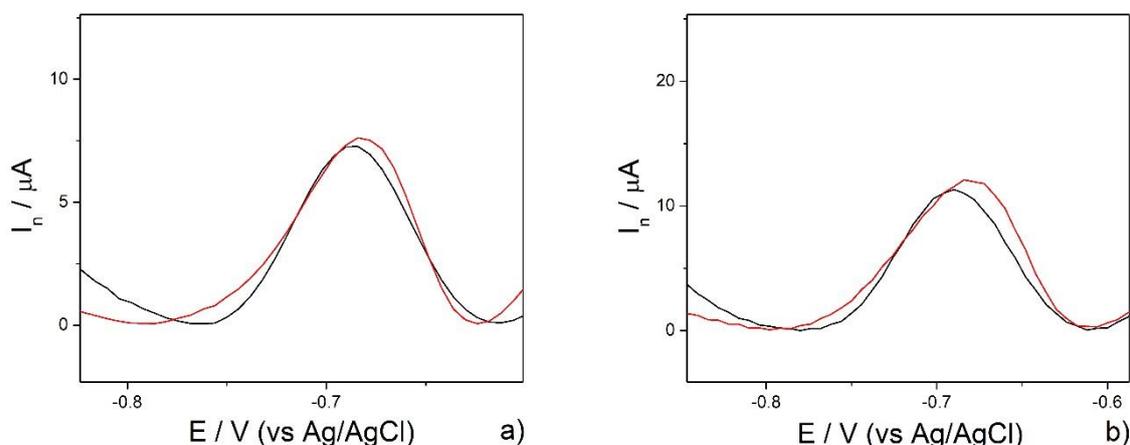


Figura 3.5. Voltamperogramas de VOCRA en una solución de buffer ácido acético - acetato de sodio 0,1 M pH 4,50, **a)** de una muestra de polen de corbicular con el agregado de $20,0 \mu\text{gL}^{-1}$ Cd (línea negra) y su testigo correspondiente (línea roja), y **b)** de una muestra de propóleos bruto con adición de $30,0 \mu\text{gL}^{-1}$ Cd (línea negra) y su testigo correspondiente (línea roja).

3.4.4 Aplicación a muestras de polen de abeja y propóleos bruto

El método propuesto fue empleado para la determinación de cadmio en muestras de propóleos brutos y polen de abeja, empleando las condiciones óptimas

experimentales de VOCRA. En las muestras analizadas no se detectó la presencia de este analito. Esto fue corroborado empleando la técnica de espectroscopía de emisión atómica de plasma inductivo (ICP-AES), análisis realizado por el Laboratorio de Análisis Químicos, LANAQUI (CERZOS, UNS-CONICET). Por este motivo, teniendo en cuenta los posibles niveles de cadmio en las muestras provenientes de la provincia de Buenos Aires, Argentina, se adicionaron diferentes alícuotas del analito en estudio. Las muestras con agregados de cadmio fueron analizadas por triplicado y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Análisis de muestras reales

<i>Muestra</i>	<i>Agregado</i> (μgL^{-1})	<i>Encontrado</i> (μgL^{-1}) \pm s	<i>Recuperación</i> %
<i>Propóleos bruto^a</i>			
<i>Bahía Blanca</i>	30,0	31,9 \pm 2,84	106,3
<i>H. Ascasubi</i>	30,0	27,8 \pm 2,20	92,7
<i>Polen de abeja^a</i>			
<i>H. Ascasubi 1</i>	6,00	6,07 \pm 0,57	101,1
	10,0	9,29 \pm 0,29	92,9
<i>H. Ascasubi 2</i>	20,00	19,13 \pm 2,19	95,6

^aLas muestras fueron analizadas por triplicado.

3.5 Conclusiones parciales

En esta Tesis se logró con éxito diseñar y fabricar en el laboratorio un electrodo de trabajo de bismuto sólido (EBi) de un área electroquímica de 0,0258 cm² a partir de perdigones de bismuto, material amigable con el medio ambiente y de baja toxicidad. Este electrodo surge como sustituto de los electrodos de mercurio comúnmente empleados y presenta ventajas tales como bajo costo y fabricación sencilla siendo una alternativa para ser considerado en el empleo de técnicas voltamperométricas. El EBi se empleó para la determinación de residuos de cadmio en productos apícolas argentinos, como propóleos brutos y polen

Capítulo 3. Desarrollo de un electrodo de bismuto

corbicular empleando voltamperometría de onda cuadrada con redisolución anódica (VOCRA). Para la optimización de los parámetros electroanalíticos de VOCRA, se utilizó un diseño de experimentos factorial 2^5 . El método propuesto presentó un rango lineal de 2,00 a 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd (II), con un límite de detección (LDD) de 0,78 $\mu\text{g L}^{-1}$ y de cuantificación (LDQ) de 2,61 $\mu\text{g L}^{-1}$. Además, este método obtuvo una repetitividad de 8,03 %. Los resultados obtenidos con el método propuesto fueron satisfactoriamente validados empleando un ensayo de recuperación.

Evaluando los datos experimentales se puede concluir que el método propuesto resultó ser una buena alternativa para el control de calidad de metales pesados como el cadmio.

3.6 Bibliografía

- [1] AL M. L., DANIEL D., MOISE A., BOBIS O., LASLO L., BOGDANOV S., Physico-chemical and bioactive properties of different floral origin honeys from Romania, *Food Chemistry*, 2009, 112, 4, 863-867.
- [2] BANKOVA V., Chemical diversity of propolis and the problem of standardization, *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 100, 114-117.
- [3] PASCOAL A., RODRIGUES S., TEIXEIRA A., FEÁS X., ESTEVINHO L. M., Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory, *Food and Chemical Toxicology*, 2014, 63, 233-239.
- [4] VIUDA-MARTOS M., RUIZ-NAVAJAS Y., FERNÁNDEZ-LÓPEZ J., PÉREZ-ALVAREZ J. A., Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly, *Journal of Food Science*, 2008, 73, 9, 117-124.
- [5] BOGDANOV S., Contaminants of bee products, *Apidologie*, 2006, 37, 1, 1-18.
- [6] CONTI M. E., BOTRÈ F., Honeybees and Their Products as Potential Bioindicators of Heavy Metals Contamination, *Environmental Monitoring and Assessment*, 2001, 69, 3, 267-282.
- [7] SÁNCHEZ BARRÓN Gara, “*Ecotoxicología del cadmio, riesgo para la salud por la utilización de suelos ricos en cadmio*”. Director: Miguel Ángel Casermeiro Martínez. Tesis de grado, Facultad de Farmacia, Universidad complutense, Madrid, 2016.
- [8] SINGH A., SHARMA R. K., AGRAWAL M., MARSHALL F. M., Health risk assessment of heavy metals via dietary intake of foodstuffs from the wastewater irrigated site of a dry tropical area of India, *Food and Chemical Toxicology*, 2010, 48, 2, 611-619.
- [9] DURUIBE J. O., OGWUEGBU M. O. C., EGWURUGWU J. N., Heavy metal pollution and human biotoxic effects, *International Journey of Physical Sciences* 2007, 2, 5, 112-118.
- [10] GORZA Gustavo E., “*Biomonitoreo con Abejas: Estaciones Gemelas con Análisis Simultáneos*”. Directora: Liliana M. Gallez. Tesis de grado, Departamento de Agronomía Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, 2007.

- [11] TUZENA M., SILICIB S., MENDILA D., SOYLAK M., Trace element levels in honeys from different regions of Turkey, *Food Chemistry*, 2007, 103, 2, 325-330.
- [12] CZIPA N., ANDRÁSI D., KOVÁCS B., Determination of essential and toxic elements in Hungarian honeys, *Food Chemistry*, 2015, 175, 536-542.
- [13] LU Y.K., SUN H.W., YUAN C.G., YAN X.P., Simultaneous Determination of Trace Cadmium and Arsenic in Biological Samples by Hydride Generation-Double Channel Atomic Fluorescence Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 2002, 74, 7, 1525-1529.
- [14] ŠVANCARA I., PRIOR C., HOČEVAR S. B., WANG J., A Decade with Bismuth-Based Electrodes in Electroanalysis, *Electroanalysis*, 2010, 22, 13, 1405-1420.
- [15] WANG J., LU J., HOCEVAR S. B., FARIAS P. A. M., Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry, *Analytical Chemistry* 2000, 72, 14, 3218-3222.
- [16] WANG J., LU J., KIRGÖZ Ü. A., HOCEVAR S. B., OGOREVC B., Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes, *Analytica Chimica Acta* 2001, 434, 1, 29-34.
- [17] PAULIUKAITE R., HOČEVAR S. B., OGOREVC B., J. WANG, Characterization and Applications of a Bismuth Bulk Electrode, *Electroanalysis* 2004, 16, 9, 719-723.
- [18] HOČEVAR S. B., ŠVANCARA I., VYTRĀS K., OGOREVC B., Novel electrode for electrochemical stripping analysis based on carbon paste modified with bismuth powder, *Electrochimica Acta* 2005, 51, 4, 706-710.
- [19] XIAO L., XU H., ZHOU S., SONG T., WANG H., LI S., GAN W., YUAN Q., Simultaneous detection of Cd(II) and Pb(II) by differential pulse anodic stripping voltammetry at a nitrogen-doped microporous carbon/Nafion/bismuth-film electrode, *Electrochimica Acta* 2014, 143, 143-151.
- [20] NIUA P., FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ C., GICHA M., AYORAC C., ROIGA A., Electroanalytical Assessment of Heavy Metals in Waters with Bismuth Nanoparticle-Porous Carbon Paste Electrodes, *Electrochimica Acta* 2015, 165, 155-161.
- [21] PIERINI G. D., PISTONESI M. F., DI NEZIO M. S., CENTURIÓN M. E., A pencil-lead bismuth film electrode and chemometric tools for simultaneous

determination of heavy metals in propolis samples, *Microchemical Journal* 2016, 125, 266-272.

[22] ASBAHR D., FIGUEIREDO-FILHO L. C. S., VICENTINI F. C., OLIVEIRA G. G., FATIBELLO-FILHO O., BANKS C. E., Differential pulse adsorptive stripping voltammetric determination of nanomolar levels of methotrexate utilizing bismuth film modified electrodes, *Sensors and Actuators B: Chemical* 2013, 188, 334-339.

[23] SÁ É. S., DA SILVA P. S., JOST C. L., SPINELLI A., Electrochemical sensor based on bismuth-film electrode for voltammetric studies on vitamin B2 (riboflavin), *Sensors and Actuators B: Chemical* 2015, 209, 423-430.

[24] ARMSTRONG K. C., TATUM C. E., DANSBY-SPARKS R. N., CHAMBERS J. Q., XUE Z., Individual and simultaneous determination of lead, cadmium, and zinc by anodic stripping voltammetry at a bismuth bulk electrode, *Talanta* 2010, 82, 2, 675-680.

[25] BI Z., CHAPMAN C. S., SALAÜN P., VAN DEN BERG C. M. G., Determination of Lead and Cadmium in Sea- and Freshwater by Anodic Stripping Voltammetry with a Vibrating Bismuth Electrode, *Electroanalysis* 2010, 22, 24, 2897-2907.

[26] DE LA GALA MORALES M., PALOMO MARN M. R., CALVO BLÁZQUEZ L., PINILLA GIL E., Performance of a Bismuth Bulk Rotating Disk Electrode for Heavy Metal Analysis: Determination of Lead in Environmental Samples, *Electroanalysis* 2012, 24, 5, 1170-1177.

[27] WEGIEL K., JEDLINSKA K., BAS B., Application of bismuth bulk annular band electrode for determination of ultratrace concentrations of thallium(I) using stripping voltammetry, *Journal of Hazardous Materials* 2016, 310, 199-206.

[28] BARD A. J., FAULKNER L. R., *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2^{da} Edición, Estados Unidos, Editorial John Wiley & Sons, Inc, 2001.

[29] Norma Argentina IRAM-INTA 15935-1-Propóleos en bruto (2008).

[30] FORMICKI G., GREŃ A., STAWARZ R., ZYŚK B., GAŁ A., Metal Content in Honey, Propolis, Wax, and Bee Pollen and Implications for Metal Pollution Monitoring, *Polish Journal of Environmental Studies* 2013, 22, 1, 99-106.

[31] HANRAHAN G., LU K., Application of Factorial and Response Surface Methodology in Modern Experimental Design and Optimization, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2006, 36, 3, 141-151.

- [32] BARROS NETO B., SCARMINIO I. S., BRUNS R. E., *Como Fazer Experimentos*, Ed. UNICAMP, Campinas SP, 2007.
- [33] LIU B. Z., LU L. Y., WANG M., ZI Y. Q., A Study of Nafion-Coated Bismuth-Film Electrode for the Determination of Zinc, Lead, and Cadmium in Blood Samples, *Electroanalysis* 2008, 20, 21, 2363-2369.
- [34] KROLICKA A., BOBROWSKI A., KOWAL.A., Effects of Electroplating Variables on the Voltammetric Properties of Bismuth Deposits Plated Potentiostatically, *Electroanalysis* 2006, 18, 17, 1649-1657.
- [35] MILLER J.C., MILLER J. N., *Estadística y quimiometría para química analítica*, 4^{ta} edición, Pearson Education, Madrid, 2002.
- [36] PHILIPS M. F., GOPALAN A. I., LEE K., Development of a novel cyano group containing electrochemically deposited polymer film for ultrasensitive simultaneous detection of trace level cadmium and lead, *Journal of Hazardous Materials* 2012, 237-238, 46-54.
- [37] WANG Z., LIU E., ZHAO X., Glassy carbon electrode modified by conductive polyaniline coating for determination of trace lead and cadmium ions in acetate buffer solution, *Thin Solid Films* 2011, 519, 15, 5285-5289.
- [38] McGAW E. A., SWAIN G. M., A comparison of boron-doped diamond thin-film and Hg-coated glassy carbon electrodes for anodic stripping voltammetric determination of heavy metal ions in aqueous media, *Analytical Chimica Acta* 2006, 575, 2, 180-189.
- [39] ZHANG T., LI C., MAO.B., AN Y., Determination of Cd²⁺ by ultrasound-assisted square wave anodic stripping voltammetry with a boron-doped diamond electrode, *Ionics* 2015, 21, 6, 1761-1769.
- [40] WANG W., CAI Y., LI B., ZENG J., HUANG Z., CHEN X., A voltammetric sensor for simultaneous determination of lead, cadmium and zinc on an activated carbon fiber rod, *Chinese Chemical Letters* 2018, 29, 1, 111–114.



Capítulo 4

Aplicación de un electrodo de film de antimonio “in situ” para la determinación de tetraciclinas en muestras de miel empleando Voltamperometría de Redisolución Catódica de Onda Cuadrada



4.1 Objetivos

En este trabajo se pretende emplear por primera vez, un electrodo de película de antimonio preparado "*in-situ*", para la determinación de residuos de antibióticos de la familia de las tetraciclinas (tetraciclina y oxitetraciclina) en mieles de abeja del oeste y sudoeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Para llevar a cabo la determinación de estos antibióticos se emplea voltamperometría de onda cuadrada con redisolución catódica como técnica electroquímica. Se emplea con éxito un diseño Draper Lin para la optimización de los parámetros de onda cuadrada de redisolución catódica.

4.2 Introducción

Las tetraciclinas, pertenecen a una familia de antibióticos con un amplio espectro de acción [1-2]. Pueden ser obtenidas de forma natural, a partir de las bacterias del género *Actinomyces* (clortetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina), o de forma semisintética (metaciclina, demeclocina, doxiciclina, minociclina, limeciclina, rolitetraciclina y tigeciclina). Son ampliamente utilizadas, en el tratamiento de enfermedades bacterianas humanas y veterinarias, especialmente en el ganado destinado al consumo humano [3-4] y apicultura [5-7]. Actualmente, su uso como medicamento veterinario está prohibido en la Unión Europea, pero todavía continúa siendo ampliamente utilizado en países como Estados Unidos, Canadá, Australia y la India [8]. En Argentina, es común el empleo de dos tipos de tetraciclinas en las actividades ganaderas y apícolas, tetraciclina y oxitetraciclina, a las que nos referiremos como TCs. Los apicultores emplean estos antibióticos para el tratamiento de enfermedades bacterianas Loque Americana (*Paenibacillus larvae*) y Loque Europea (*Mellisococcus pluton*), y otras bacterias asociadas, que afectan gravemente las larvas de abeja y la producción de la colmena [9]. Comúnmente en la actividad apícola, la aplicación de antibióticos sobre la colmena debe llevarse a cabo al término de la cosecha de miel. De lo contrario, los antibióticos pueden persistir en la misma y en otros productos de la colmena como el propóleo, polen y jalea real. Estos antibióticos pueden presentar un efecto residual significativo en los productos apícolas destinados al consumo humano, que puede causar reacciones alérgicas en personas susceptibles, toxicidad crónica y resistencia a los antimicrobianos [10-12].

Las TCs poseen una estructura química común formada por cuatro anillos bencénicos fusionados (núcleo naftacen-carboxamídico) unidos a diferentes sustituyentes, tal como puede observarse en la Figura 4.1. Tienen la característica de poseer protones dissociables, que no solo le permiten formar quelatos con iones metálicos di y trivalentes, sino que también pueden ser oxidados o reducidos electroquímicamente. Presentan tres valores de pKa que corresponden a los grupos enona conjugados (un grupo ceto y un doble enlace C=C) en las posiciones C1-C3 (pKa₁), C11-C12 (pKa₂) y a el grupo dimetilamonio del C4 (pKa₃) [13-14]. Los valores de pKa para los distintos grupos se indican en la Tabla 4.1.

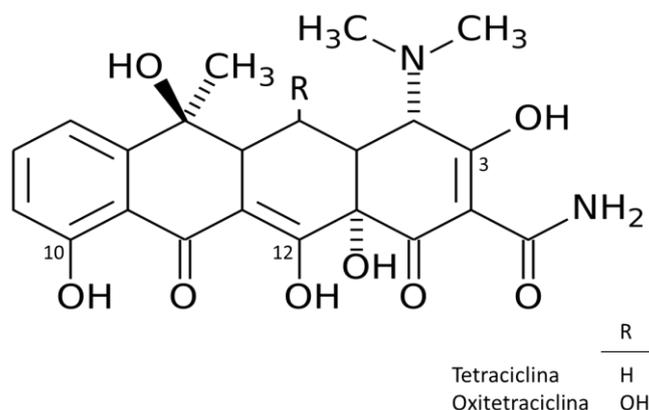


Figura 4.1. Estructura química de la tetraciclina y oxitetraciclina (TCs).

Tabla 4.1. Valores de pKa

<i>Compuesto</i>	<i>pKa₁</i>	<i>pKa₂</i>	<i>pKa₃</i>
<i>Tetraciclina</i>	3,3	7,7	9,7
<i>Oxitetraciclina</i>	3,3	7,3	9,1

En la actualidad existen varios métodos para determinar el contenido residual de tetraciclinas en miel de abeja. Dentro de ellos, comúnmente se emplea la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) acoplada a un espectrómetro de masas, detectores de quimioluminiscencia, UV-Vis o de fluorescencia. Asimismo, la técnica de electroforesis capilar también se utiliza en la determinación de tetraciclina en muestras de miel. Estos métodos requieren de un equipamiento de costo elevado, preprocesamientos de muestra laboriosos, analistas experimentados y un gran consumo de reactivos, que no los hacen compatibles con la filosofía de la química verde [15-19]. Otras metodologías utilizadas para este propósito son los ensayos inmunoabsorbentes ligado a enzimas (ELISA), que son afectados por la presencia de interferentes orgánicos e inorgánicos cuando se aplican en muestras de miel. Aun así, la incorporación del sistema avidina-biotina al ensayo de ELISA, ha logrado reducirlos [20]. Por otro lado, las técnicas voltamperométricas como pulso diferencial, onda cuadrada y voltamperometría de redisolución adsortiva, fueron presentadas y empleadas como una alternativa simple y de bajo costo para la determinación de

Capítulo 4. Aplicación de un electrodo de film de antimonio

tetraciclina en muestras de aguas residuales, agua de río, orina artificial, fármacos y leche [21-23]. Solo unos pocos trabajos han logrado determinar tetraciclinas en una matriz compleja como la miel de abejas. Como ejemplo se puede mencionar la determinación de clortetraciclina empleando un electrodo de oro modificado con ciclodextrina, nanotubos de carbono de paredes múltiples, dímeros nanocompuestos de poliamida-aminas, nanopartículas de oro y derivados de quitosano, con el fin de mejorar su señal analítica [24]. Para la determinación del contenido de tetraciclina en miel de abeja, también se ha trabajado con la modificación de la superficie de un electrodo de trabajo de oro con nanopartículas de oro y polímeros molecularmente impresos. [25]. Así mismo, se han empleado electrodos comerciales serigrafiados de carbono modificados con grafeno para cuantificar tetraciclina en la miel [26]. Entre las desventajas que presentan estos métodos podemos mencionar la necesidad de un gran número de pasos laboriosos para lograr la modificación de los electrodos de trabajo, además del empleo de electrodos y reactivos costosos. Debido a estos motivos, estas metodologías se tornan inconvenientes para ser utilizadas en los análisis de control de calidad de rutina.

Los electrodos de película de bismuto y antimonio fueron desarrollados como una alternativa al empleo de electrodos de película de mercurio y de gota colgante de mercurio a partir del año 2000 y 2007 respectivamente [27, 28]. Este tipo de electrodos de película presentan la ventaja de poder ser generados tanto de forma "*in-situ*" como "*ex-situ*" sobre varios tipos de superficies, tales como carbón vítreo, pasta de carbono, fibra de carbono, diamante dopado con boro [29-31]. Para la generación del film "*ex-situ*", los iones son depositados sobre el soporte mediante la aplicación de un potencial lo suficientemente negativo empleando una solución buffer que contenga el metal. Una vez formado, se pone en contacto el electrodo de trabajo con la solución que contiene el analito. En la metodología "*in-situ*", el film se genera conjuntamente en presencia del o los analitos de interés, es decir, empleando la misma solución de electrolito soporte [32]. Estos electrodos, poseen además una amplia ventana de potencial, no se ven afectados por la presencia de oxígeno disuelto y su preparación resulta rápida y sencilla, especialmente en las preparaciones "*in-situ*". El electrodo de película de bismuto generado "*ex-situ*", ha sido presentado satisfactoriamente

Capítulo 4. Aplicación de un electrodo de film de antimonio

como una alternativa para el uso de los electrodos de gota colgante y de película de mercurio para la determinación de tetraciclina en cápsulas comerciales [33]. A diferencia del electrodo de bismuto, los electrodos de película de antimonio (EFSb) permiten el uso de soluciones de electrolito soporte ácidas, con $\text{pH} \leq 2,0$ y una amplia ventana de potencial. Este electrodo ha sido utilizado con éxito para la determinación metales pesados (Cd (II), Pb (II), Ni (II), Zn (II), Cu (II)) empleando voltamperometría de redisolución anódica [29-31]. Sin embargo, sólo unos pocos trabajos de los encontrados en bibliografía determinan compuestos orgánicos con EFSb. En 2011, se preparó y utilizó por "primera vez" un EFSb "*ex situ*" para la determinación de sulfasalazina, un compuesto farmacéutico, en comprimidos comerciales de liberación retardada [34]. Pocos años después, Nigovic y Hocevar informaron la determinación de pantoprazol en preparados farmacéuticos empleando el mismo electrodo de trabajo, con resultados analíticos exitosos [35].

Es importante destacar que no se ha registrado hasta el momento, en bibliografía el uso de EFSb preparado "*in-situ*" para la determinación de compuestos orgánicos. Algunas de las ventajas de la preparación de la película en forma "*in-situ*", son una mejora de la sensibilidad, selectividad y reproducibilidad en las técnicas voltamperométricas de redisolución. Este procedimiento consiste en añadir directamente iones Sb (III) en la misma solución electrolítica que contiene la muestra. De esta forma, en la misma celda electroquímica es generada una nueva superficie reproducible en cada análisis.

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Reactivos y soluciones

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica y las soluciones preparadas con agua ultra pura (18M Ω). Los desechos de las soluciones empleadas fueron posteriormente separados y colectados en un recipiente hermético provisto por el servicio de Seguridad e Higiene de la Universidad Nacional del Sur para su correcto tratamiento.

- ✓ Solución patrón de antimonio: se preparó mediante la dilución apropiada de una solución patrón (1,001 mg mL⁻¹, Merck).

Capítulo 4. Aplicación de un electrodo de film de antimonio

- ✓ Solución de electrólito soporte 0,01 M HCl/NaCl: se preparó una solución de ácido clorhídrico 0,01 M (Merck) y se ajustó el pH hasta un valor de 2,50 empleando una solución de hidróxido de sodio 0,1 M (Merck).
- ✓ Solución patrón de tetraciclina y oxitetraciclina: se prepararon las soluciones de antibióticos ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) pesando la cantidad apropiada ($\geq 98.0\%$ w/w Sigma-Aldrich) y llevando a volumen con metanol (Cicarelli). Luego fueron conservadas a 4°C en frascos color ámbar. Estas soluciones correctamente almacenadas resultan estables durante un mes [36].

4.3.2 Instrumentación

Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ y sin remoción del oxígeno disuelto, empleando un potenciostato Epsilon (BASi-Bioanalytical System, USA) controlado por su software de electroanálisis. Se utilizó el módulo RDE-2 Rotating Disk Electrode (BASi-Bioanalytical System, USA) para el control rotatorio del electrodo de trabajo durante las medidas experimentales. La celda electroquímica presentó una configuración de tres electrodos, empleando un electrodo de trabajo de carbono vítreo ($0,0707 \text{ cm}^2$ de área), un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M NaCl) y espiral de platino como electrodo auxiliar.

Las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) fueron llevadas a cabo en un microscopio LEO, modelo EVO-40 XVP y detector SE1.

4.3.3 Procedimiento

4.3.3.1 Voltamperometría de onda cuadrada con redisolución catódica (VOCRC)

La superficie del electrodo de carbono vítreo (CV) fue pulida manualmente con dos grados de alúmina ($0,3 \mu\text{m}$ y $0,05 \mu\text{m}$) de forma consecutiva. Posteriormente, se sónico la superficie en un baño de ultrasonido por un minuto y finalmente fue enjuagada rigurosamente con agua ultra pura. Antes de cada experimento, con el fin de estabilizar la superficie del electrodo de trabajo, se realizaron voltamperogramas cíclicos entre $-1,000$ y $-0,600 \text{ V}$ empleando la solución de

Capítulo 4. Aplicación de un electrodo de film de antimonio

electrolito soporte, a una velocidad de 100 mV s^{-1} . Las medidas voltamperométricas de onda cuadrada con redisolución catódica (VOCRC), se llevaron a cabo empleando un electrodo de film de antimonio preparado “*in-situ*” sobre la superficie del electrodo de carbono vítreo.

La celda electroquímica empleada fue de 25,0 mL, donde se sumergieron los tres electrodos en una solución de electrolito soporte 0,01 M HCl/NaCl, pH 2,50 y $2000 \mu\text{gL}^{-1}$ de Sb (III). Los experimentos de VOCRC, se llevaron a cabo empleando un potencial de deposición de -0,600 V durante 7 s y una velocidad de rotación del electrodo de trabajo de 6000 rpm. Luego de un tiempo de espera de 10 s, se registraron los voltamperogramas correspondientes desde -0,600 V a -1,000 V. Los parámetros de VOCRC fueron: salto de potencial (ΔE_s) de 4 mV, frecuencia (f) de 130 Hz y amplitud de onda (ΔE_{sw}) de 160 mV. Finalmente, con el objetivo de limpiar la superficie del electrodo de trabajo de los compuestos que hubieran quedaron adheridos, se aplicó un potencial de 0,20 V durante 30 s bajo condiciones de agitación de 6000 rpm y se pulió nuevamente la superficie. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en presencia de oxígeno sin verse afectada la formación del film de antimonio [31, 37, 38].

4.3.3.2 *Preparación de las muestras de miel*

Se analizaron seis muestras de miel provenientes de apicultores regionales de diferentes localidades de la provincia de Buenos Aires, Argentina. La procedencia de las muestras correspondió a apiarios ubicados en las localidades de Coronel Dorrego (M1), 30 de Agosto (M2), Sierra de la Ventana (M3), Pedro Luro (M4), Coronel Suarez (M5) y Médanos (M6). Para la extracción de tetraciclinas de las muestras de miel, se empleó una extracción con acetona [39]. Para este fin, a 1,0 g de miel se le adicionaron 6,0 mL de acetona, se homogenizó manualmente con una varilla y se sometió a un baño de ultrasonido de 50 W durante 30 minutos. Este procedimiento se repitió dos veces consecutivas y luego se dejó evaporar el solvente a temperatura ambiente bajo campana. Finalmente, el extracto seco fue resuspendido en 10,0 mL de la solución de electrolito soporte.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Reducción electroquímica de las TCs

La reacción de reducción en medio ácido de los grupos enonas, cetonas α,β -insaturadas, involucran una transferencia electrónica de $2e^-$ en una sola etapa [40]. La estructura de las TCs presenta dos grupos enonas susceptibles a su reducción electroquímica. Se propone que el grupo carbonilo en el C₁₁ de la dienona, dienos conjugados con un carbonilo, corresponde al grupo reducido electroquímicamente debido a ser el grupo con mayor conjugación y genera como resultado un alcohol insaturado [41].

En una primera etapa, se estudió la respuesta de reducción electroquímica de las TCs sobre el EFSb. Para este fin, se analizaron los voltamperogramas cíclicos de cada antibiótico a una concentración 10 μ M de cada uno, entre -1,100 a -0,600 V a una velocidad de 100 $mV s^{-1}$ en 0,01M HCl/NaCl (pH 2,50). Como puede observarse en la Figura 4.2 a), la reducción electroquímica de la tetraciclina y oxitetraciclina resulta irreversible para ambos casos y presentan un pico de reducción a $-0,980 \pm 0,005$ V con intensidades de corriente similares. Debido a esto, los siguientes estudios se realizaron empleando el antibiótico tetraciclina como analito.

4.4.2 Comportamiento de adsorción

Para evaluar el comportamiento de adsorción de la tetraciclina sobre la superficie del electrodo de trabajo, se sumergió el mismo en una solución 10 μ M de tetraciclina en 0,01M HCl/NaCl (pH 2.50) por un minuto bajo condiciones de agitación y luego fueron registrados cuatro voltamperogramas cíclicos sucesivos. Como puede ser evaluado en la Figura 4.2 b), se produjo un descenso en la intensidad de corriente del pico de reducción de la tetraciclina al aumentar el número de ciclos. Este comportamiento puede ser adjudicado a la adsorción del producto de reducción, tetraciclina reducida, sobre la superficie del electrodo [42]. Además, el estudio de distintas velocidades de barrido, entre 25 y 300 mVs^{-1} demostró una relación lineal entre la corriente de pico de reducción (I_{pr}) y la velocidad de barrido (v), indicando que el proceso presenta un comportamiento

controlado por adsorción [44]. La relación lineal entre I_{pr} (A) y v (mVs^{-1}) está dada por la siguiente ecuación: $-I_{pr} = (4,7 \pm 0,2) \times 10^{-10} v - (1,0 \pm 0,3) \times 10^{-8}$, $R^2 = 0,994$.

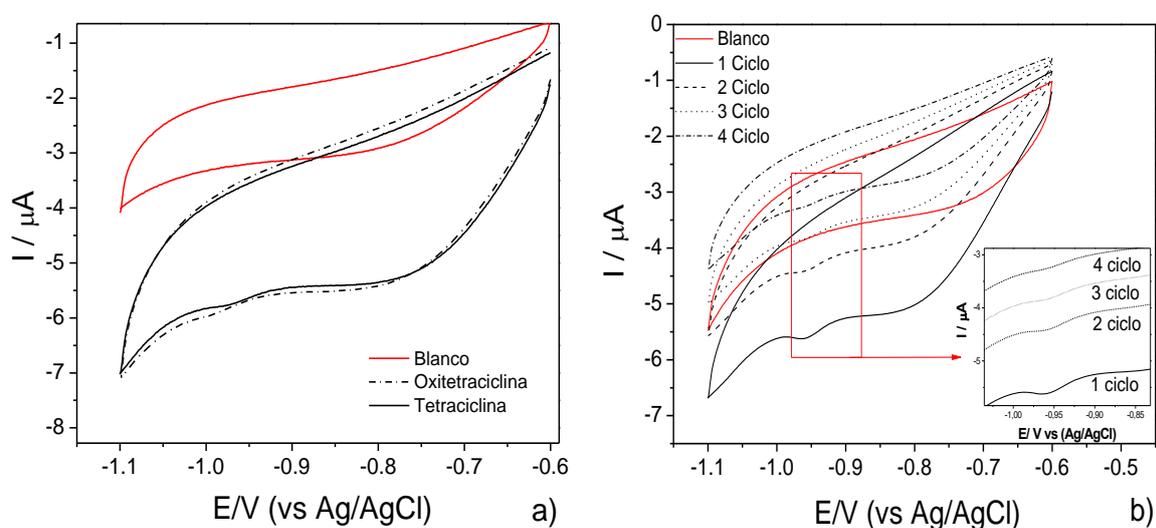


Figura 4.2 a) Voltamperogramas de una solución 10 μM de tetraciclina y oxitetraciclina en 0,01M HCl/NaCl (pH 2,50) empleando el EFSb y una velocidad de barrido de 100 $mV s^{-1}$. **b)** Cuatro voltamperogramas cíclicos sucesivos de la misma solución sobre EFSb, empleando una velocidad de barrido de 100 $mV s^{-1}$. El recuadro inferior derecho muestra una ampliación de la región seleccionada en rojo.

4.4.3 Respuesta electroquímica del EFSb vs CV

En este trabajo también se llevó a cabo un estudio comparativo de la respuesta del EFSb sobre una solución de tetraciclina 1,0 μM en 0,01 M HCl/NaCl (pH 2,50), en comparación con la respuesta obtenida por un electrodo de carbono vítreo (CV) sin modificar en la misma solución. Los voltamperogramas de onda cuadrada con redisolución catódica (VOCRC) obtenidos se muestran en la Figura 4.3, donde se puede observar que, si bien ambos electrodos de trabajo poseen respuesta hacia la reducción de la TCs, el EFSb registra una señal considerablemente mayor de la intensidad de pico de reducción de ésta, bajo las mismas condiciones de trabajo. En la misma figura se puede contemplar que el EFSb además de ser adecuado para la determinación de TCs, sufre un corrimiento de su potencial de reducción a valores menos negativos ($-0,864 \pm 0,005$ V) en comparación con el CV ($-0,904 V \pm 0,005$ V). Este desplazamiento de potencial sugiere una reacción de transferencia electrónica más rápida

debido al efecto electrocatalítico que genera la modificación de la superficie del electrodo del EFSb [35].

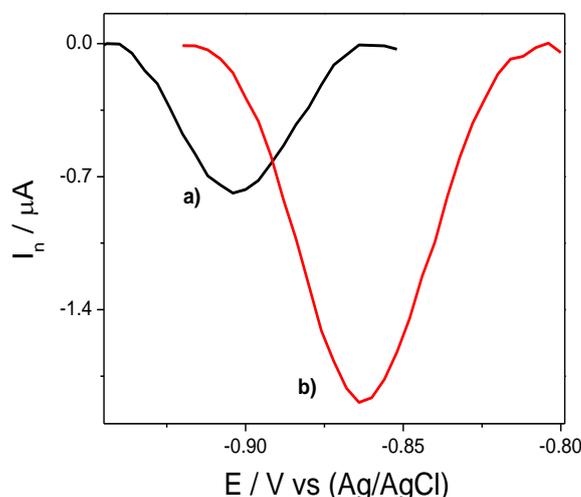


Figura 4.3. Voltamperogramas de VOCRC de una solución 1,0 μM de tetraciclina en 0,01 M HCl/NaCl (pH 2,5), C_{Sb}^* : 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$, $\Delta E_s = 4$ mV, $\Delta E_{\text{sw}} = 160$ mV, $f = 130$ Hz y tiempo de deposición = 7 s sobre un electrodo de a) CV y b) EFSb como electrodos de trabajo.

4.4.4 Optimización de los parámetros analíticos

4.4.4.1 Optimización de valores de pH y concentración de antimonio

La optimización de los parámetros analíticos como pH y concentración de antimonio, se llevaron a cabo mediante análisis univariado. Con la finalidad de seleccionar el pH óptimo, la respuesta de la reducción electroquímica empleando VOCRC de las TCs fue estudiada entre valores de pHs desde 1,50 a 3,00 en una solución de electrolito soporte HCl/NaCl empleando EFSb “*in-situ*” como electrodo de trabajo. En la Figura 4.4 a), se pueden observar los voltamperogramas obtenidos para un pH de 1,50, 2,00, 2,50 y 3,00. La figura muestra que a valores de pH mayores o menores a 2,50 se presenta una disminución de la corriente de pico de reducción, por lo cual se seleccionó para los siguientes análisis un valor de pH óptimo de 2,50. Si bien los electrodos de antimonio presentan su mejor performance a $\text{pH} \leq 2$, en el caso de la determinación de moléculas orgánicas se ha registrado en diversos trabajos una mejor respuesta electroquímica a pH mayores, debido a su naturaleza química [34-35].

Con respecto a la concentración de Sb (III), se estudiaron cuatro concentraciones por triplicado entre 1000 a 2500 μgL^{-1} . Como se muestra en la Figura 4.4 b), la señal de corriente del pico de reducción de las TCs aumenta hasta una concentración de Sb (III) de 2000 μgL^{-1} y luego comienza a decrecer nuevamente. Consecuentemente, el valor seleccionado como óptimo fue de 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Sb (III). Esto se debe a que, al igual que los electrodos de film de bismuto, concentraciones muy elevadas del metal o tiempos de deposición muy elevados generan un film de mayor espesor, que puede dificultar la difusión del analito hacia la superficie del electrodo y disminuye su sensibilidad. En caso contrario, concentraciones muy bajas no logran la formación del film [44-45].

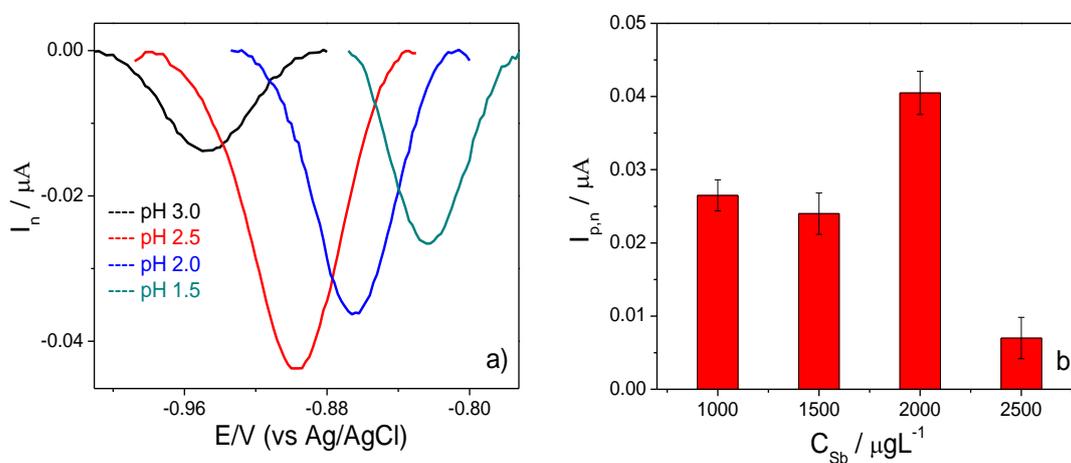


Figura 4.4 a) Voltamperogramas VOCRC de una solución de tetraciclina 10,0 μM en 0,01 M HCl/NaCl a distintos pH empleando un EFSb “*in-situ*” en las condiciones óptimas seleccionadas: $C_{\text{Sb}} = 2000 \mu\text{g L}^{-1}$, $\Delta E_s = 4 \text{ mV}$, $\Delta E_{\text{sw}} = 160 \text{ mV}$, $f = 130 \text{ Hz}$ y tiempo de deposición = 7 s. **b)** Histogramas de respuesta del EFSb en una solución de 10,0 μM en 0,01 HCl/NaCl M pH 2,50 bajo las condiciones óptimas de VOCRC y distintas concentraciones de antimonio.

4.4.4.2 Optimización parámetros

El uso de diseños experimentales para la optimización de parámetros electroanalíticos en voltamperometría de redisolución adsorbtiva catódica y voltamperometría de onda cuadrada, ya ha sido aplicado satisfactoriamente [46]. En este trabajo se presenta por primera vez el uso de un diseño experimental compuesto Draper Lin para la optimización de parámetros de VOCRC, que emplea un número más reducido de corridas experimentales para la optimización de las variables electroquímicas [47-48]. Este diseño experimental emplea la

Capítulo 4. Aplicación de un electrodo de film de antimonio

metodología de superficie de respuesta para estudiar en simultaneo la respuesta de más de un factor con un número reducido de experimentos [49-50].

Para este propósito, se estudió la variación en el tiempo de deposición (t), amplitud de la onda cuadrada (ΔE_{sw}), frecuencia (f) y salto de potencial (ΔE_s), empleando como señal de respuesta la corriente de pico neta de la reducción de la TCs. El diseño tuvo en cuenta 21 experimentos, incluyendo 16 experimentos para la formación del cubo y los puntos estrella, y 5 experimentos para los puntos centrales. El nivel extremo de puntos axiales fue seleccionado para un $\alpha = 1$, debido a que valores más altos de α conducían a valores negativos de frecuencia y tiempo de deposición. Los niveles para todas las variables fueron seleccionados en base a los resultados de estudios preliminares, donde se encontraron las condiciones y límites para cada factor. En la Tabla 4.2 se muestran los niveles elegidos para cada parámetro estudiado. Todos los experimentos, que pueden verse representados en la Tabla 4.3, se llevaron a cabo al azar y los datos experimentales obtenidos se analizaron mediante ANOVA. Este método estadístico puede ser empleado para evaluar las diferentes causas de la variación, ya sea por errores aleatorios en la medida o a lo que se denomina un factor controlado. Todos los experimentos de optimización del diseño compuesto Draper Lin se llevaron a cabo en una solución de tetraciclina 10,0 μM en 0,01 M HCl/NaCl pH 2,50. Las superficies de respuesta obtenidas en dicho diseño se muestran en la Figura 4.5.

Tabla 4.2. Valores experimentales de los parámetros electroanalíticos independientes estudiados en el diseño compuesto "Draper Lin".

<i>Variable independiente</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>
ΔE_s [mV]	3	7
ΔE_{sw} [mV]	80	160
f [Hz]	70	130
t [s]	5	45

Tabla 4.3. Valores detallados de cada parámetro de VOCRC en estudio para los 21 experimentos involucrados en el diseño de optimización compuesto "Draper Lin".

<i>Experimento</i>	ΔE_{sw} [mV]	ΔE_s [mV]	<i>f</i> [Hz]	<i>t</i> [s]
1	5	120	100	25
2	5	120	100	25
3	5	120	100	25
4	5	120	100	25
5	5	120	100	25
6	7	160	130	5
7	7	160	70	5
8	7	80	130	45
9	3	160	70	45
10	7	80	70	45
11	3	80	130	5
12	3	160	130	45
13	3	80	70	5
14	3	120	100	25
15	7	120	100	25
16	5	80	100	25
17	5	160	100	25
18	5	120	70	25
19	5	120	130	25
20	5	120	100	5
21	5	120	100	45

Capítulo 4. Aplicación de un electrodo de film de antimonio

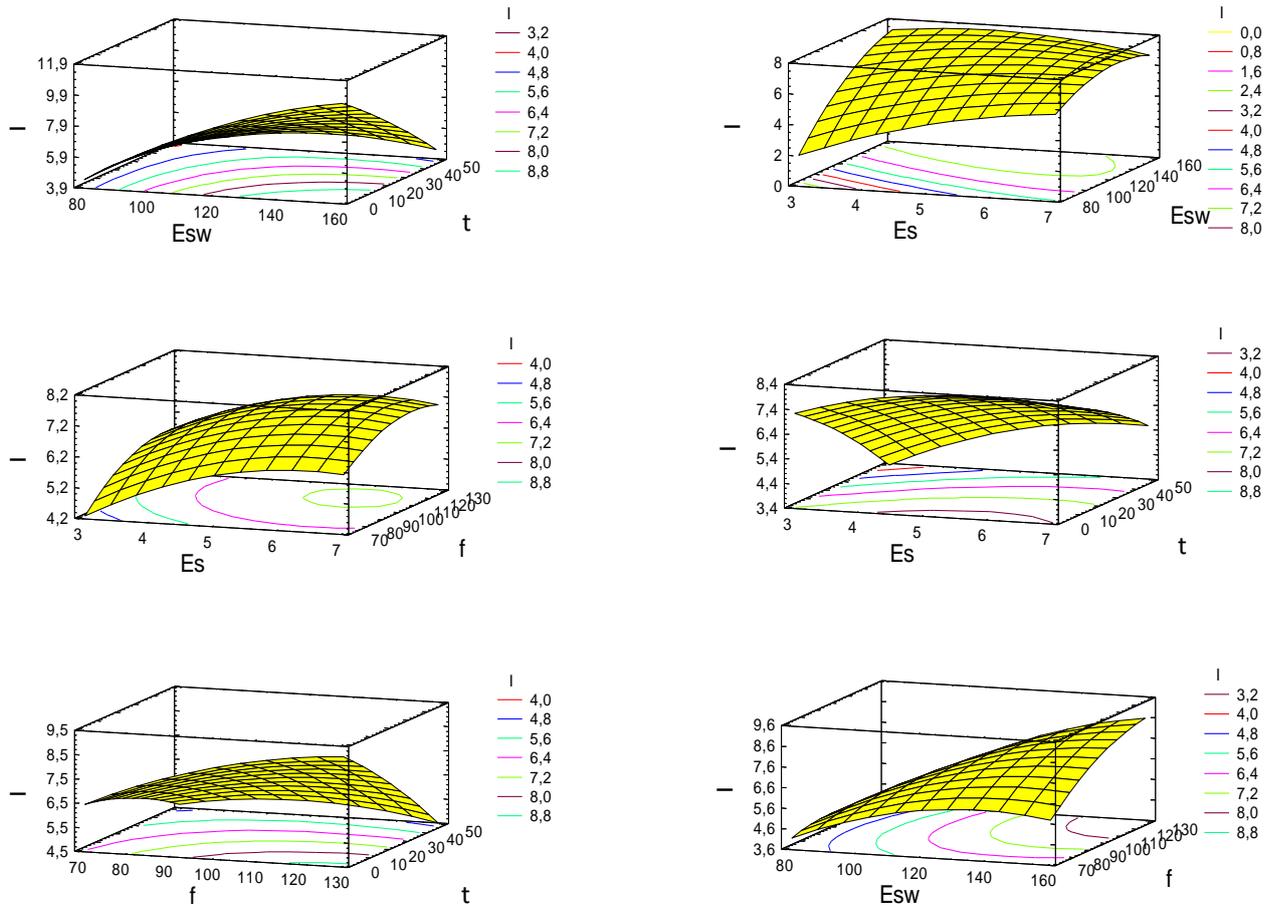


Figura 4.5. Superficies de respuesta del modelo "Draper Lin".

Las superficies pueden ser representadas por la ecuación:

$$\begin{aligned}
 I_{p,n} = & (6,94 \pm 0,17) + (1,51 \pm 0,65) \Delta E_s + (3,28 \pm 0,65) \Delta E_{sw} + (1,21 \pm 0,22) f - \\
 & (2,46 \pm 0,65) t - (1,28 \pm 0,58) \Delta E_s^2 - (2,15 \pm 0,73) \Delta E_s \Delta E_{sw} - (0,31 \pm 0,33) \Delta E_s f \\
 & + (0,56 \pm 0,76) \Delta E_s t - (1,77 \pm 0,58) \Delta E_{sw}^2 + (1,67 \pm 0,33) \Delta E_{sw} f - (2,10 \pm 0,73) \\
 & \Delta E_{sw} t - (1,05 \pm 0,58) f^2 - (1,09 \pm 0,33) f t - (0,31 \pm 0,58) t^2
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

Analizando tanto la ecuación (1), como el gráfico de Pareto que se presenta en la Figura 4.6, los efectos más significativos resultaron ser: la amplitud de pulso de la onda cuadrada (ΔE_{sw}), la frecuencia (f) y el tiempo de deposición (t). Los incrementos en los valores de frecuencia y amplitud de la onda cuadrada proporcionan un incremento de la corriente de pico neta, sin embargo, un aumento de los tiempos de deposición causa un decrecimiento de la señal

analítica. En concordancia con el análisis de residuos, el coeficiente de determinación obtenido de $R^2 = 0,989$ indica un muy buen ajuste del modelo.

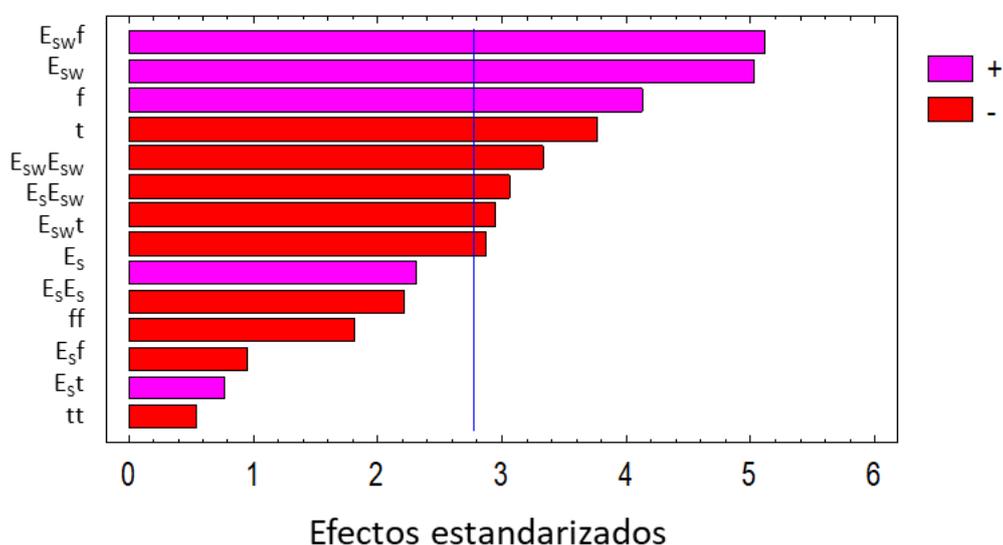


Figura 4.6. Diagrama de Pareto obtenido a partir del diseño de superficie de respuesta "Draper Lin".

Evaluando las correspondientes superficies de respuesta obtenidas que se presentan en la Figura 4.5, se puede observar que los valores óptimos para ΔE_{sw} y f se encuentran fuera de la región experimental. Sin embargo, se decidió seleccionar los valores correspondientes a los extremos de la superficie de respuesta para ΔE_{sw} y f , debido a que valores mayores de ΔE_{sw} ocasionan un desdoblamiento de la señal de pico [51] y mayores frecuencias no generan mejoras significativas de la señal analítica. Por lo tanto, los valores que fueron seleccionados como óptimos para los parámetros de VOCRC involucran un $\Delta E_s = 4$ mV, $\Delta E_{sw} = 160$ mV, $f = 130$ Hz y $t = 7$ s.

4.4.5 Film de antimonio “in-situ” generado en las condiciones óptimas

Con el fin de confirmar que la deposición de la película de antimonio se generó bajo las condiciones óptimas, se realizó una voltamperometría de onda cuadrada de redisolución anódica (VOCRA) entre -0,600 y 0,100 V. El pico correspondiente a la oxidación de antimonio a 0,00 V se muestra en la Figura 4.7 a), comprobando la formación de film sobre la superficie del electrodo. Asimismo, se obtuvieron imágenes de microscopía de barrido electrónico (SEM) de las superficies del electrodo de CV y EFSb. En la Figura 4.7 b) se puede observar, la superficie lisa del electrodo de CV. La Figura 4.7 c) muestra la deposición de antimonio bajo las condiciones óptimas, tal como se logra apreciar en el recuadro colorado inferior derecho.

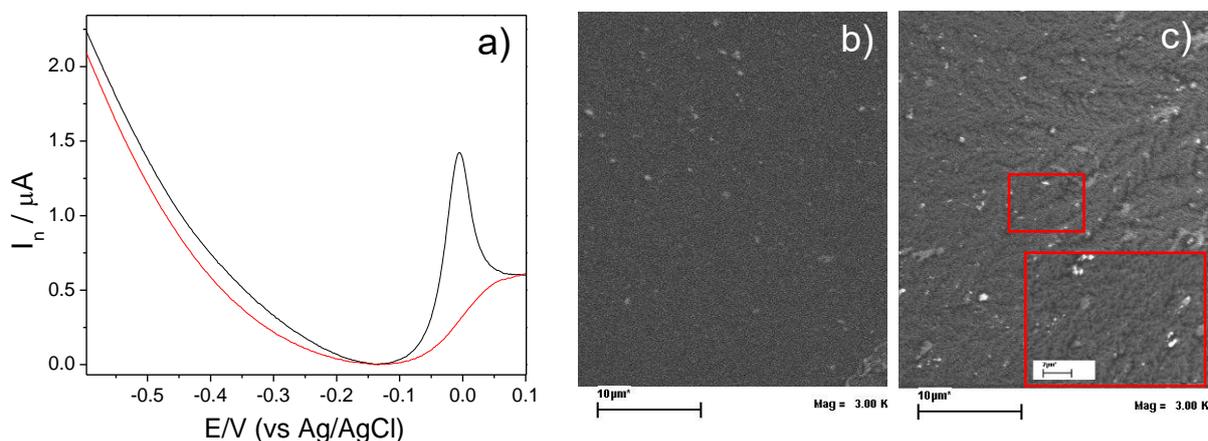


Figura 4.7 a) voltamperogramas de VOCRA sobre un EFSb en una solución de HCl 0,01M (pH 2,50), Sb (III) 2000 $\mu g L^{-1}$, $E_d = -0.60 V$ y $t = 7 s$, $\Delta E_s = 2 mV$, $\Delta E_{sw} = 40 mV$ y $f = 25 Hz$. Las imágenes de SEM de magnificación 3,000 x de la superficie del CV **b)** y del EFSb **c)** obtenidas bajo las condiciones electroanalíticas óptimas. El recuadro colorado inferior derecho, corresponde a una amplificación de 8000 x de magnificación de la imagen SEM para el EFSb.

4.4.6 Parámetros analíticos

En la Figura 4.8 a), se muestran los voltamperogramas de VOCRC de las soluciones de tetraciclina de concentraciones entre 0,40 a 3,00 μM , empleando un EFSb bajo las condiciones experimentales óptimas. La ecuación de regresión lineal obtenida se presenta en la Figura 4.8 b), donde $I_{p,n}$ representa la corriente máxima de pico y C^*_{Tc} la concentración de tetraciclina (μM). La ecuación de la recta de regresión presentó un valor de pendiente de $(1,46 \pm 0,02)$ y una

intercepción de $(-0,07 \pm 0,02)$, con un coeficiente de correlación (R) de 0,996. El límite de detección (LDD) fue de $0,15 \mu\text{M}$, estimado como 3 veces $S_{y/x}$ / pendiente [49]. Como puede verse en la Tabla 4.4, este valor resultó ser menor que algunos reportados en la literatura para sensores electroquímicos. La repetibilidad del EFSb se calculó como el porcentaje de variación de la desviación estándar relativa de seis mediciones independientes de una solución de tetraciclina de $1,50 \mu\text{M}$. El valor obtenido fue de 8,23% para la corriente de pico y 0,41% para el potencial de pico correspondiente.

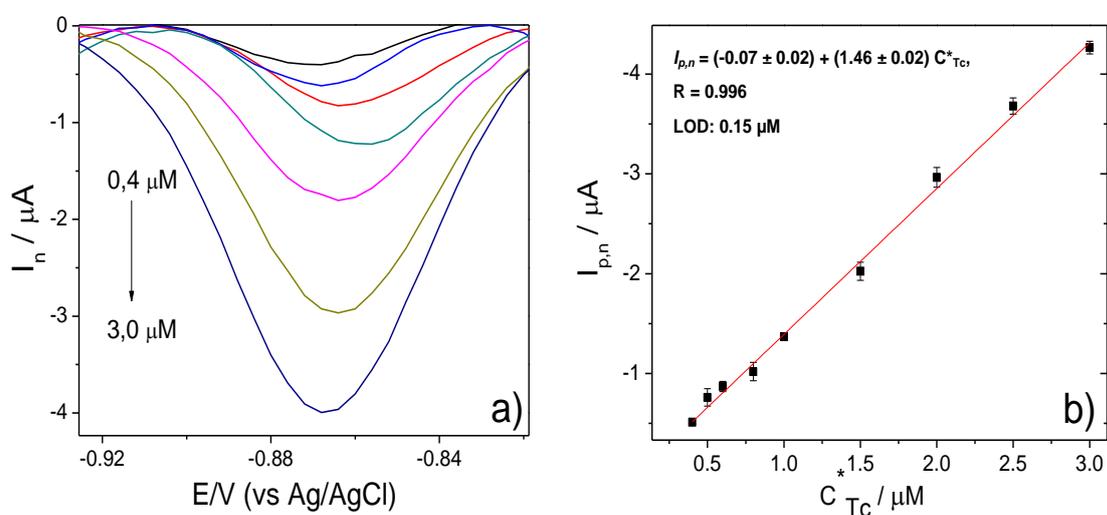


Figura 4.8 a) Voltamperogramas de VOCRC de solución de tetraciclina de 0,4 a $3 \mu\text{M}$ sobre un EFSb y **b)** Curva de calibración obtenida en las condiciones óptimas de VOCRC.

Tabla 4.4. Comparación del método propuesto con otros sensores electroquímicos encontrados en la literatura.

ELECTRODO	Rango lineal [μM]	Sensibilidad [$\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$]	LDD [μM]	Referencia
BiFE (Electrodo de film de bismuto)	500 - 6000	7,70	1,2	[33]
SPGE (Electrodos de oro Screen-printed)	1 – 500	$6,09 \times 10^{-4}$	0,96	[51]
CPE GO/MWCNT-COOH (Electrodos de pasta de carbono modificados)	20 – 310	$1,2 \times 10^{-2}$	0,36	[52]
GPU (Electrodos compuestos de grafito-poliuretano)	4,00 – 40,0	0,03	2,80	[53]
GPU (Electrodos compuestos de grafito-poliuretano)	3,8 – 38,0	0,02	2,60	[54]
GME (Microelectrodos de oro)	2,25 – 22,5	0,21	0,20	[55]
SbFE (Electrodo de film de antimonio “In-situ”)	0,40 – 3,00	1,46	0,15	Método propuesto

4.4.7 Oxígeno disuelto

Se estudió el efecto de la presencia de oxígeno disuelto en la determinación de TCs por el método propuesto. Para ello, se registraron los voltamperogramas cíclicos a una velocidad de 100 mVs^{-1} de una solución de electrolito soporte $0,01\text{M HCl/NaCl}$ y de una solución de TCs $10\mu\text{M}$ en presencia y ausencia de oxígeno (previo burbujeo con N_2 de la solución de electrolito soporte), luego de haber generado el EFSb “*in situ*”. Como se logra observar en la Figura 4.9, los voltamperogramas cíclicos no presentaron cambios significativos en ambos casos.

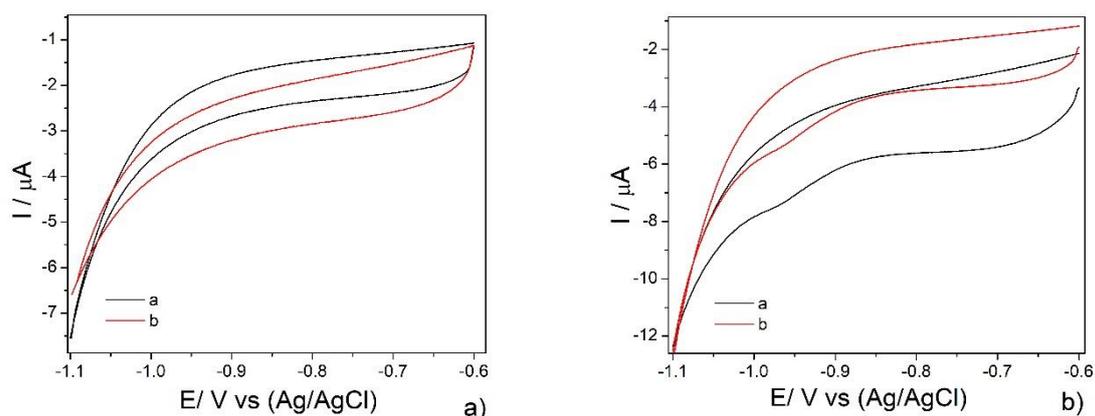


Figura 4.9. Voltamperogramas cíclicos a una velocidad de 100 mVs^{-1} de una solución de electrólito soporte $0,01 \text{ M HCl/NaCl}$ (blanco **a**) y de una solución de TC $10,0 \text{ μM}$ **b**), en presencia (a) y ausencia (b) de oxígeno disuelto.

4.4.8 Aplicación a muestras de miel

El método electroanalítico propuesto se aplicó para la determinación de TCs en seis muestras de miel, utilizando las condiciones óptimas experimentales. El contenido de TCs fue despreciable en las muestras de miel analizadas. Por lo tanto, se llevó a cabo un estudio de recuperación. Para ello, se realizaron agregados de TCs de concentración conocida. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Estudios de recuperación en muestras de miel con una concentración conocida de tetraciclina agregada.

Muestras	Agregado (μM)	Encontrado (μM) $\pm s$	% Recuperación
M1	1,000	$0,918 \pm 0,042$	91,81
M2	1,000	$1,097 \pm 0,043$	109,69
M3	1,000	$0,914 \pm 0,032$	91,46
M4	1,000	$1,055 \pm 0,011$	105,54
M5	1,000	$0,971 \pm 0,040$	97,12
M6	1,000	$0,992 \pm 0,050$	99,25

4.5 Conclusiones parciales

El presente trabajo fue la primera investigación en la que se utilizó un electrodo de película de antimonio "*in-situ*" para la determinación de moléculas orgánicas como TCs usando voltamperometría de onda cuadrada con redisolución catódica. Una de las principales ventajas de la síntesis de este film "*in-situ*" resultó ser que la película se prepara en tan solo siete segundos y en la misma solución que contiene al analito. Bajo las mismas condiciones experimentales, la respuesta del electrodo de film de antimonio "*in-situ*" muestra un aumento sustancial en la corriente de reducción de pico con respecto al carbono vítreo como electrodo de trabajo, con el consiguiente aumento de la sensibilidad. Es por esto, que el método propuesto resultó en un procedimiento analítico rápido, de bajo costo, con bajo consumo de reactivos y se convirtió en una alternativa atractiva a los ampliamente utilizados electrodos de mercurio y bismuto. Además, en este trabajo se demostró que los EFSb pueden utilizarse con éxito para la determinación de TCs en muestras de mieles argentinas.

4.6 Bibliografía

- [1] SRIRAM D., YOGESHWARI P., *Medicinal chemistry*, 2da edición, Nueva Delhi, Editorial Pearson, 2007.
- [2] CHOPRA I., ROBERTS M., Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2001, 65, 2, 232-60.
- [3] WINCKLER C., GRAFE A., Use of veterinary drugs in intensive animal production, *Journal of Soils and Sediments*, 2001, 1, 2, 66-70.
- [4] LANDERS T. F., COHEN B., WITTUM T. E., LARSON E. L., A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential, *Public Health Reports*, 2012, 127, 1, 4-22.
- [5] MARTEL A. C., ZEGANNE S., DRAJNUDEL P., FAUCON J. P., AUBERT M., Tetracycline residues in honey after hive treatment, *Food Additives and Contaminants*, 2006, 23,3, 265-273.
- [6] EVANS J. D., Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*, *Journal of Invertebrate Pathology*, 2003, 83, 1, 46-50.
- [7] Y. C. PENG, E. MUSSEN, A. FONG, M. A. MONTAGUE, T. TYLER, Effects of chlortetracycline of honey bee worker larvae reared in vitro. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1992, 60, 2, 127-133.
- [8] PRAKASH V., MARTIN-BELLOSO O., KEENER L., ASTLEY S., BRAUN S., MCMAHON H., LELIEVELD H., *Regulating Safety of Traditional and Ethnic Foods*, 1ra edición, Elsevier, Academic Press, 2015.
- [9] DE LA SOTA M., BACCI M., *Enfermedades de las abejas. Manual de procedimiento*, Buenos Aires, SENASA, 2005.
- [10] ZHOU J., XUE X. LI, ZHANG Y. J., CHEN F., WU L., CHEN L., ZHAO J., Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction, *Food Chemistry*, 2009, 115, 3, 1074-1080.
- [11] FORGRESEN A., SCHMELING D., QUIE P. G., Effect of Tetracycline on the Phagocytic Function of Human Leukocytes, *The Journal of Infectious Diseases*, 1974, 130, 4, 412-415.

- [12] PHILLIPS I., CASEWELL M., COX T., DE GROOT B., FRIIS C., JONES R., NIGHTINGALE C., PRESTON R., WADDELL J., Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004, 54, 1, 276–278.
- [13] QIANG Z., ADAMS C., Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics, *Water Research*, 2004, 38, 12, 2874-2890.
- [14] DELGADO CIRILO A., MINGUILLÓN LLOMBART C., JOGLAR TAMARGO J., *Introducción a la química terapéutica*, 2da edición, Madrid, Ediciones Díaz de Santos S.A, 2004.
- [15] TAYAR PERESA G., RATHB S., REYES REYESA F. G., A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey, *Food Control* 2010, 21, 5, 620-625.
- [16] BARGANSKA Z., SLEBIODA M., NAMIESNIK J., Determination of antibiotic residues in honey, *Trends in Analytical Chemistry* 2011, 30, 7, 1035-1040.
- [17] LI J., CHEN L., WANG W., JIN H., DING L., ZHANG K., ZHANG H., Determination of tetracyclines residues in honey bay on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography, *Talanta* 2008, 75, 5, 1245-1252.
- [18] GALARINI R., SALUTI G., GIUSEPPONI D., ROSSI R., MORETTI S., Multiclass determination of 27 antibiotics in honey, *Food Control* 2015, 48, 12-24.
- [19] CASADO-TERRONES S., SEGURA-CARRETERO A., BUSI S., DINELLI G., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A., Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection, *Electrophoresis*, 2007, 28, 16, 2882-2887.
- [20] JEON M., PAENG I. R., Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay, *Analytica chimica acta*, 2008, 626, 2, 180-185.
- [21] WANG H., ZHAO H., QUAN X., CHEN S., Electrochemical Determination of Tetracycline Using Molecularly Imprinted Polymer Modified Carbon Nanotube-Gold Nanoparticles Electrode, *Electroanalysis* 2011, 23, 8, 1863-1869.
- [22] WONG A., SCONTRI M., MATERON E. M., LANZA M. R.V., SOTOMAYOR M. D.P.T., Development and application of an electrochemical sensor modified

with multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide for the sensitive and selective detection of tetracycline, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2015, 757, 15, 250-257.

[23] G. SHEN, Y. GUO, X. SUN, X. WANG, Electrochemical Aptasensor Based on Prussian Blue-Chitosan-Glutaraldehyde for the Sensitive Determination of Tetracycline, *Nano-Micro Letters* 2014, 6, 2, 143-152.

[24] LIAN W., HUANG J., YU J., ZHANG X., LIN Q., HE X., XING X., LIU S., A molecularly imprinted sensor based on b-cyclodextrin incorporated multiwalled carbon nanotube and gold nanoparticles-polyamide amine dendrimer nanocomposites combining with water-soluble chitosan derivative for the detection of chlortetracycline, *Food Control* 2012, 26, 2, 620-627.

[25] BOUGRINI M., FLOREA A., CRISTEA C., SANDULESCU R., VOCANSON F., ERRACHID A., BOUCHIKHI B., EL BARI N., JAFFREZIC-RENAULT N., Development of a novel sensitive molecularly imprinted polymer sensor based on electropolymerization of a microporous-metalorganic framework for tetracycline detection in honey, *Food Control* 2016, 59, 424-429.

[26] FILIK H., AVAN A. A., AYDAR S., OZYURT D., DEMIRATA B., Determination of Tetracycline on the Surface of a High-Performance Graphene Modified Screen-Printed Carbon Electrode in Milk and Honey Samples, *Current Nanoscience* 2016, 12, 4, 527-533.

[27] WANG J., LU J., HOCEVAR S. B., FARIAS P. A. M., Bismuth-Coated Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetry, *Analytical Chemistry* 2000, 72, 14, 3218-3222.

[28] HOCEVAR S. B., SRAVANCARA I., OGOREVC B., VYTRAS K., Antimony Film Electrode for Electrochemical Stripping Analysis, *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 22, 8639-8643.

[29] J. WANG, J. LUA, Ü. A. KIRGÖZ, S. B. HOCEVAR, B. OGOREVC, Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes, *Analytica Chimica Acta* 2001, 434, 1, 29-34.

[30] JOVANOVSKI V., HOCEVAR S. B., OGOREVC B., Ex Situ Prepared Antimony Film Electrode for Electrochemical Stripping Measurement of Heavy Metal Ions, *Electroanalysis* 2009, 21, 21, 2321-2334.

[31] E. TESAROVA, L. BALDRANOVA, S. B. HOCEVAR, I. SVANCARA, K. VYTRAS, B. OGOREVC, Anodic stripping voltammetric measurement of trace

heavy metals at antimony film carbon paste electrode, *Electrochimica Acta* 2009, 54, 5, 1506-1510.

[31] M. SLAVEC, S. B. HOCEVAR, L. BALDRANOVA, E. TESAROVA, I. SVANCARA, B. OGOREVC, K. VYTRASB, Antimony Film Microelectrode for Anodic Stripping Measurement of Cadmium(II), Lead(II) and Copper(II), *Electroanalysis* 2010, 22, 14, 1617-1622.

[32] ECONOMOU A., Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 2005, 24, 4, 334-340.

[33] S. SATTAYASAMITSATHIT, P. THAVARUNGKUL, P. KANATHARANAA, Bismuth Film Electrode for Analysis of Tetracycline in Flow Injection System, *Electroanalysis* 2007, 19, 4, 502-505.

[34] B. NIGOVIC, S. B. HOCEVAR, Antimony film electrode for direct cathodic measurement of sulfasalazine, *Electrochimica Acta* 2011, 58, 523-527.

[35] B. NIGOVIC, S. B. HOCEVAR, Square-wave voltammetric determination of pantoprazole using ex situ plated antimony-film electrode, *Electrochimica Acta* 2013, 109, 818-822.

[36] SELVAM A., ZHAO Z., LI Y., CHEN Y., LEUNG K. S., WONG J. W., Degradation of tetracycline and sulfadiazine during continuous thermophilic composting of pig manure and sawdust, *Environmental Technology* 2013, 34, 13-16, 2433-2441,

[37] SOPHA H., JOVANOVSKI V., HOCEVAR S. B., OGOREVC B., In-situ plated antimony film electrode for adsorptive cathodic stripping voltammetric measurement of trace nickel. *Electrochemistry Communications* 2012, 20, 23-25.

[38] YI W. J., LI Y., RAN G., LUO H. Q., LI N. B., Determination of cadmium(II) by square wave anodic stripping voltammetry using bismuth-antimony film electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2012, 166-167, 544-548.

[39] DIEGUEZ S., SORACI A., BEDASCARRASBURE E., LIBONATTI C., Metodología analítica para la detección de residuos de oxitetraciclina en miel, *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 2002, 31, 1, 159-166.

[40]. Boer H. S., VAN OORT W. J., ZUMAN P., Polarographic analysis of corticosteroids: Part 6. Mechanism of polarographic electroreduction of some Δ^4 -3-ketosteroids and $\Delta^{1,4}$ -3-ketosteroids, *Analytica Chimica Acta* 1981, 130, 1, 111-132.

- [41]. SMAJDOR J., PIECH R., PACZOSA-BATOR B. A Novel Method of High Sensitive Determination of Prednisolone on Renewable Mercury Film Silver Based Electrode, *Electroanalysis* 2016, 28, 394-400.
- [42] YIGIT A., YARDIM Y., ZORER Ö., SENTÜRK Z., Electrochemical determination of pterostilbene at a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode using square-wave adsorptive anodic stripping voltammetry in cationic surfactant media, *Sensors and Actuators B: Chemical* 2016, 231, 688-695.
- [43] COSTA J. M., BRILLAS E., CABOT P. L., *Trends in electrochemistry and corrosion at the beginning of the 21st century*, Barcelona, Ed. Universitat de Barcelona, 2004.
- [44] CAO L. Y., JIA J. B., WANG Z.H., Sensitive determination of Cd and Pb by differential pulse stripping voltammetry with in situ bismuth-modified zeolite doped carbon paste electrodes, *Electrochimica Acta* 2008, 53, 5, 2177-2182.
- [45] BALDRIANOVA L., SVANCARA I., VLCEK M., ECONOMOU A., SOTIROPOULOS S., Effect of Bi (III) concentration on the stripping voltammetric response of in situ bismuth-coated carbon paste and gold electrodes, *Electrochimica Acta*, 2006, 52, 2, 481-490.
- [46] LIU R., TANG Y., Tuber melanosporum fermentation medium optimization by Plackett–Burman design coupled with Draper–Lin small composite design and desirability function, *Bioresource Technology* 2010, 101,9, 3139-3146.
- [47] MIRESKI V., LOVRIC M., Split Square-Wave Voltammograms of Surface Redox Reactions, *Electroanalysis* 1997, 9, 16,1283-1287.
- [48] MILLER J. C., MILLER J. N., *Estadística y quimiometría para química analítica*, 4ta edición, Madrid, Ed. Pearson Education, 2002.
- [49] TARLEY C. R. T., SILVEIRA G., DOS SANTOS W. N. L., MATOS G. D., DA SILVA E. G. P., MIRÓ M. A. B., M., FERREIRA S. L. C., Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology, *Microchemical Journal* 2009, 92, 1, 58-67.
- [50] GÁMIZ-GRACIA L., CUADROS-RODRÍGUEZ L., ALMANSA-LÓPEZ E., SOTO-CHINCHILLA J. J., GARCÍA CAMPAÑA A. M., Use of highly efficient Draper/Lin small composite designs in the formal optimization of both operational and chemical crucial variables affecting a FIA-chemiluminescence detection system, *Talanta* 2003, 60, 2-3, 523-534.

- [51] MASAWAT P., SLATER J. M., The determination of tetracycline residues in food using a disposable screen-printed gold electrode (SPGE), *Sensors and Actuators B: Chemical* 2007, 124, 1, 127-132.
- [52] WONG A., SCONTRI M., MATERON E. M., LANZA M. R. V., SOTOMAYOR M.D.P.T., Development and application of an electrochemical sensor modified with multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide for the sensitive and selective detection of tetracycline, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2015, 757, 250-257.
- [53] CALIXTO C. M. F., CERVINI P., CAVALHEIRO É. T. G., Determination of tetracycline in environmental water samples at a graphite-polyurethane composite electrode, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 2012, 23, 5, 938-943.
- [54] FIORAMONTI CALIXTO C. M., GOMES CAVALHEIRO É. T., Determination of Tetracyclines in Bovine and Human Urine Using a Graphite-Polyurethane Composite Electrode, *Analytical Letters*, 2015, 48, 9, 1454-1464.
- [55] WANG H., ZHAO H., QUAN X., Gold modified microelectrode for direct tetracycline detection, *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 2012, 6, 3, 313-319.



Capítulo 5

Aplicación de
Voltamperometría de
Redisolución
Adsorbtiva de Onda
Cuadrada para la
determinación de
amitraz a partir de su
metabolito final en
muestras de miel



5.1 Objetivos

En este trabajo, se pretende desarrollar un método analítico empleando la técnica de voltamperometría de redisolución adsortiva de onda cuadrada (VAOC) y un electrodo de carbono vítreo activado electroquímicamente (ECVA) para determinar la concentración de amitraz a partir de su metabolito final, 2,4 dimetilanilina (2,4 DMA), en mieles de abeja argentinas. El método incluye un paso de tratamiento de muestra utilizando un horno microondas para favorecer la hidrólisis ácida del amitraz a su metabolito final. Para la optimización de los parámetros electroquímicos se emplea un diseño experimental Box-Benkhen.

5.2 Introducción

Actualmente, una de las principales problemáticas que se presenta a nivel mundial en la actividad agrícola es la disminución y el peligro de extinción de varios invertebrados que actúan como polinizadores, entre los cuales se encuentran las abejas melíferas conocidas como "*polinizadores universales*". Varios estudios indican que las prácticas agrícolas intensivas y el aumento en el empleo de pesticidas es una de las principales causas del descenso y afección en el desarrollo y supervivencia de estos insectos en las últimas décadas [1-4]. En Estados Unidos, se calculó que la polinización a través de las abejas melíferas proporciona un valor agregado de 15 mil millones de dólares a los cultivos de nueces, bayas, frutas y vegetales (Comité Directivo CCD, 2007).

El compuesto amitraz, cuya estructura química se muestra en la Figura 5.1, es un antiparasitario (insecticida y acaricida) perteneciente a la familia de las formamidinas. Es un medicamento ampliamente empleado en agricultura y ganadería, frente al tratamiento de distintos parásitos. En apicultura es comúnmente utilizado para el tratamiento de las colmenas contra la *varroosis*, una de las enfermedades más destructivas que afecta a las abejas *Apis mellifera* en todos sus estadios de desarrollo. La enfermedad es generada por el ácaro *Varroa jacobsoni* (*Varroa destructor*), originario de Asia [5].

El empleo de sustancias químicas como insecticidas, acaricidas, herbicidas y fungicidas a los que se ven sometidos los cultivos y las colmenas, han sido detectados en las abejas y en los productos de sus colmenas [6]. Asimismo, el uso terapéutico de amitraz contra la *varroosis*, a pesar de ser relativamente inocuo para las abejas, puede dejar residuos de metabolitos persistentes y tóxicos en la miel y cera de abeja. Estos residuos resultan muy peligrosos para las larvas en crecimiento, ya que pueden transferirse al polen acumulado que les sirve de alimento a las larvas y abejas adultas, así también como a los demás productos de la colmena [7]. La autoridad norteamericana United States Environmental Protection Agency clasifica al amitraz como un compuesto ligeramente tóxico (Clase III), siendo principalmente tóxico por vía inhalatoria, seguido por la vía dérmica y oral [8]. A pesar de esto, en nuestro país el amitraz continúa siendo ampliamente utilizado, en especial a partir del año 1998, cuando se comenzaron a registrar falta de efectividad y resistencia a los tratamientos

con el acaricida piretroide fluvalinato [9]. Sin embargo, desde el año 2005 su empleo se encuentra prohibido en la Unión Europea y su normativa fija un límite máximo de residuos (LMR) de amitraz en miel, incluyendo todos sus metabolitos, de 200 ppb (200 μg de amitraz Kg^{-1} de miel). A su vez, otros países también han estipulado su LMR en mieles. Países como Alemania, Suiza e Italia fijaron un valor de 0,01 mg Kg^{-1} , mientras que otros como Estados Unidos fija un valor mayor, de 1,0 mg Kg^{-1} [10]. En nuestro país, hasta el año 2011 se estipulaba como límites de residuos en alimentos de origen animal, los establecidos por organismos internacionales competentes. A partir de ese año, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) [11], fija al igual que la UE, para miel de abeja, un límite máximo de 200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de amitraz, incluidos todos sus metabolitos, utilizando como técnica de referencia la cromatografía gaseosa [12].

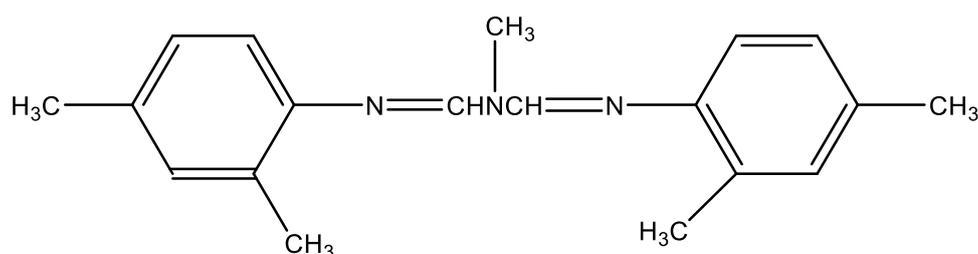


Figura 5.1. Estructura química del acaricida amitraz (N-metilbis (2,4-xililiminometil) amina)

La importancia del análisis de residuos de amitraz en alimentos, radica en que tanto éste como sus metabolitos pueden generar efectos tóxicos sobre la salud humana, por exposición por vía oral o dérmica. Dentro de los síntomas que ocasiona se pueden enumerar vómitos, distensión intestinal, depresión del sistema nervioso central, entre otros [13]. La presencia de residuos de amitraz y sus metabolitos ha sido estudiada en distintos productos alimenticios, tales como peras [14], pimienta, tomate, brócoli, cítricos, manzanas [15], viseras (hígado y riñón) de porcinos, bovinos y ovinos [16], y en productos apícolas, como la miel de abeja [17] y su cera [18]. También, se ha demostrado la presencia de residuos de metabolitos de amitraz sobre el cuerpo de abejas vivas, provenientes de distintas colmenas sometidas a los tratamientos sanitarios habituales [19].

Por otro lado, el mecanismo de degradación del amitraz en un sistema acuoso, planteado por Pierpoint y col., hasta llegar a su metabolito final, 2,4 DMA, se presenta en la Figura 5.2 [20]. En trabajos previos hallados en bibliografía, se

estudió la estabilidad del amitraz a distintos pHs de trabajo. Se ha demostrado que éste sufre una hidrólisis instantánea en condiciones de pH muy ácido (menor o igual a 2). Asimismo, se hidroliza a menores velocidades, a pHs entre 3 y 9, y resulta altamente estable a pH mayor que 9 [21].

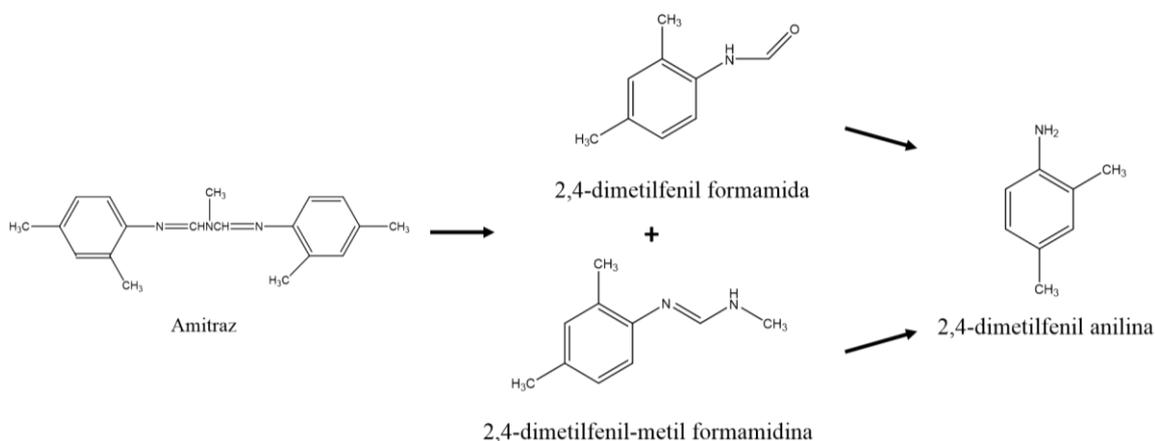


Figura 5.2. Mecanismo de degradación del amitraz y sus metabolitos

Para la determinación de residuos de pesticidas, la extracción y la preconcentración son etapas necesarias y cruciales. Dentro de las metodologías halladas en bibliografía para la extracción de pesticidas en miel de abeja, se pueden mencionar las extracciones con solventes, con fluidos supercrítico, extracciones en fase sólida, extracciones por dispersión de la matriz en fase sólida, microextracciones en fase sólida y extracciones por sorción con barras magnéticas [10]. Las extracciones con solventes son las técnicas más sencillas y económicas que pueden ser empleadas para la extracción de pesticidas en miel. Para esto, se utilizan varias y distintas combinaciones de solventes inmiscibles en agua, elegidos según la polaridad del pesticida de interés, que permitirá separarlo en una de las fases formadas. Entre los solventes comúnmente empleados se puede mencionar el diclorometano, acetato de etilo, y combinaciones de benceno:isopropanol, hexano:acetona, hexano:ácido acético y hexano:propanol. En particular, para la obtención de amitraz en miel se han utilizado como solventes de extracción mezclas de n-hexano:acetona 30:20 (v/v) [16], n-hexano, 2-propanol y amonio al 0,28% [22], entre otros.

Hasta el momento la determinación de este acaricida y sus metabolitos se ha llevado a cabo mediante distintas técnicas cromatográficas. Una de ellas es la

cromatografía líquida con detección ultravioleta (UV) [23] y espectroscopía de masas en tándem (MS/MS) [24]. Por otro lado, la técnica de cromatografía gaseosa ha sido ampliamente utilizada empleando detector termoiónico específico (TSD) [25], trampa de iones (ITD) [26], captura de electrones (ECD) [27] o espectrometría de masas (MS) [28]. También, se han registrado otras técnicas alternativas a las cromatográficas para la determinación de amitraz y/o sus metabolitos, como por ejemplo las técnicas voltamperométricas empleando distintos electrodos de trabajo. En tal sentido, se ha utilizado para la determinación de este analito en muestras enriquecidas de suelo y agua de riego, la técnica de voltamperometría adsorptiva de redisolución con detección por pulso diferencial empleando como electrodos de trabajo un electrodo de mercurio [29]. Asimismo, empleando la misma técnica electroquímica, se realizó su determinación en muestras de agua de consumo enriquecidas, empleando una amalgama de plata sólida como electrodo de trabajo [30]. También, se ha estudiado, empleando voltamperometría cíclica y un electrodo de carbono vítreo, el contenido de amitraz y su metabolito final, en muestras de miel y leche enriquecidas con cada uno de los analitos mencionados [22].

El amitraz en miel presenta una vida media que varía entre 12 a 55 horas, dificultando su cuantificación [28]. Por ello, en este trabajo se plantea como objetivo la determinación de residuos amitraz a partir de su metabolito final, 2,4 dimetilánilina en muestras de miel de abeja argentinas. Se emplea voltamperometría de redisolución adsorptiva con detección de onda cuadrada (VAOC) y un electrodo de carbono vítreo activado electroquímicamente como electrodo de trabajo.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Reactivos y soluciones

Todos los reactivos empleados fueron de calidad analítica y las soluciones preparadas con agua ultra pura (18M Ω). Los residuos generados fueron posteriormente separados y colectados en un recipiente hermético provisto por el servicio de Seguridad e Higiene de la Universidad Nacional del Sur para su correcto tratamiento.

- ✓ Solución patrón de amitraz: se preparó la solución de acaricida (1000 μM) diluyendo una cantidad apropiada de droga sólida ($\geq 98.0\%$ p/p Sigma-Aldrich) en acetonitrilo (Sintorgan). Luego se conservó a 4°C en oscuridad.
- ✓ Solución patrón de 2,4 dimetilnilina: se preparó una solución patrón del metabolito final (80,0 mM) mediante una dilución apropiada del mismo ($\geq 98.0\%$ v/v Sigma-Aldrich) en alcohol etílico (Sintorgan). Luego, la solución de trabajo (6,50 mM) se preparó a partir de la dilución de la solución patrón, en etanol.
- ✓ Solución de electrólito soporte 0,1 M acetato de sodio-ácido acético, pH 4,50: se preparó empleando ácido acético (Mallinckrodt) y acetato de sodio (Cicarelli).
- ✓ Solución de hidróxido de sodio 1,0 M (Cicarelli).

5.3.2 Instrumentación

Para las mediciones electroanalíticas se empleó un potenciostato Epsilon (BASi-Bioanalytical System, USA) controlado por su software de electroanálisis. Se utilizó el módulo RDE-2 Rotating Disk Electrode (BASi-Bioanalytical System, USA) para el control de la velocidad de rotación del electrodo de trabajo. La celda electroquímica presentó una configuración de tres electrodos, empleando un electrodo de trabajo de carbono vítreo (ECV) ($0,0707\text{ cm}^2$ de área) activado electroquímicamente, un electrodo de referencia de Ag/AgCl (3 M NaCl) y un espiral de platino como electrodo auxiliar.

5.3.3 Procedimiento

5.3.3.1 Tratamiento de muestra

Las muestras de miel analizadas provienen de un apiario ecológico ubicado en la localidad de Pedro Luro. Para extraer los residuos del acaricida amitraz y sus metabolitos, las muestras de miel (1,00 g) fueron tratadas con 3,0 mL de hexano y 1,5 mL de amoníaco 0,28 % (v/v) en propanol. Las soluciones se filtraron y se colectaron en un tubo de centrifuga con 2,0 mL de hexano y 2,5 mL de amoníaco 0,28 % (v/v) en agua. Luego, se centrifugaron a una velocidad de 2000 rpm

durante un minuto y se separó el sobrenadante (hexano) [31]. Este procedimiento de extracción con solventes se repitió dos veces consecutivas y luego se evaporó bajo campana.

5.3.3.2 *Hidrólisis de amitraz*

El extracto seco anteriormente obtenido fue reconstituido con 1,00 mL de HCl 2,5 M y sometido a la acción de microondas a una potencia de 1500 W durante 75 segundos para completar la hidrólisis del amitraz a su metabolito final, 2,4 dimetilánilina (2,4 DMA). Finalmente, se tomó una alícuota para su determinación electroquímica en 25,0 mL de electrolito soporte.

5.3.3.3 *Voltamperometría de redisolución adsortiva de onda cuadrada*

Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 23 ± 2 °C y sin remoción del oxígeno disuelto.

Antes de cada experimento, la superficie del electrodo de carbono vítreo se pulió manualmente y de forma consecutiva con dos grados distintos de alúmina, 0,3 μm y 0,05 μm . Luego, se sumergió el electrodo en un baño de ultrasonido durante un minuto y posteriormente se enjuagó rigurosamente con agua ultra pura.

En una primera etapa, se realizó la activación de la superficie del ECV tal como lo describe Anjo y col. [32], aplicando un potencial de 1200 mV durante 5 minutos en una solución de NaOH 1,0 M. Las medidas voltamperométricas se llevaron a cabo empleando una celda electroquímica de 25,0 mL, donde se sumergieron los tres electrodos en la solución reguladora de ácido acético - acetato de sodio 0,1 M de pH 4,50 como electrolito soporte. Los voltamperogramas se registraron desde 0,250 V a 1,000 V, empleando un tiempo de acumulación (t_{ac}) de 20 s a potencial abierto (E_{ac}) y una velocidad de rotación del electrodo de trabajo de 6000 rpm. Los parámetros de voltamperometría de onda cuadrada empleados fueron: salto de potencial (ΔE_s) 5 mV, frecuencia (f) de 50 Hz, amplitud de onda (ΔE_{sw}) 50 mV. Finalmente, con el objetivo de limpiar la superficie del electrodo de trabajo de los compuestos que quedaron adsorbidos, se aplicó un potencial de -0,100 V durante 30 s con una velocidad de rotación del electrodo de 6000 rpm. Posteriormente se pulió nuevamente la superficie.

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Oxidación electroquímica de 2,4 dimetilnilina

Se estudió la respuesta de oxidación electroquímica de 2,4 dimetilnilina (2,4 DMA) sobre el electrodo de carbono vítreo activado electroquímicamente (ECVA). Para este fin, se analizaron luego de 60 s a potencial abierto, los voltamperogramas cíclicos entre 0,250 a 1,200 V a una velocidad de 100 mV s^{-1} en ácido acético – acetato de sodio 0,1 M de pH 4,50, empleando una solución de 2,4 DMA $20,0 \mu\text{M}$. Como puede observarse en el voltamperograma cíclico que se muestra en la Figura 5.3, su oxidación resulta irreversible y presenta dos picos de oxidación, el primero a $474 \pm 5 \text{ mV}$ y el segundo a $713 \pm 5 \text{ mV}$.

Las señales electroquímicas obtenidas son características de las dimetilnilinas y corresponden a la oxidación electroquímica del grupo amino (NH_2) del 2,4 DMA. Marques y col. [33] estudiaron la oxidación de dimetilaminas en dimetilformamida como electrolito soporte, obteniendo dos picos anódicos. Adjudicaron el primer pico de oxidación a la transferencia de un e^- y la formación de un catión radical intermedio, y el segundo pico a la transferencia de un e^- y la formación del catión. La oxidación de las anilinas en soluciones de electrolito soporte acuosas involucra etapas de oxidación, reacciones de desprotonación y posterior polimerización [34, 35].

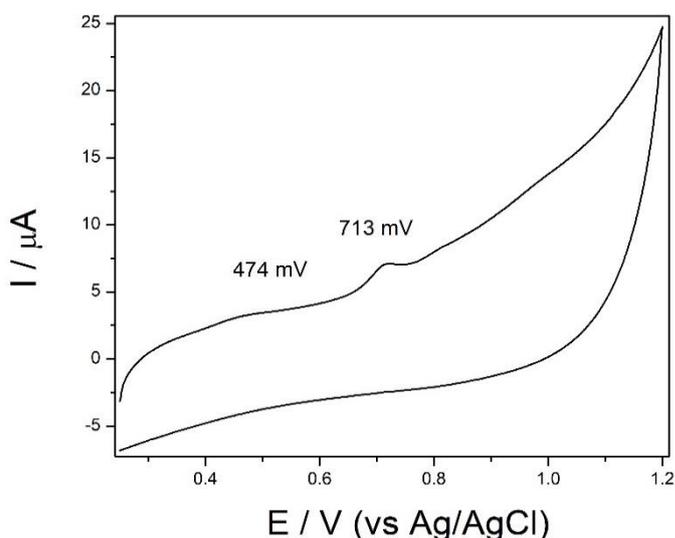


Figura 5.3 Voltamperograma cíclico de una de una solución 20,0 μM de 2,4 DMA en ácido acético – acetato de sodio 0,1 M (pH 4,50) sobre ECVA como electrodo de trabajo, luego de 60 s a potencial abierto, empleando una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1}

5.4.2 Comportamiento de adsorción de 2,4 dimetilanilina y su producto de oxidación

Para estudiar el comportamiento de adsorción de 2,4 DMA sobre la superficie del electrodo se realizaron los siguientes ensayos:

- a) *Pasivación del electrodo de trabajo debida a los productos de oxidación y la formación de un film de polianilina* [36]. El electrodo de trabajo se sumergió durante 60 s a potencial abierto en una solución 2,4 DMA 20,0 μM en ácido acético – acetato de sodio 0,1 M (pH 4,50) y se registraron cinco voltamperogramas cíclicos sucesivos. En la Figura 5.4a), se observa una disminución en la intensidad de corriente de los picos de oxidación al aumentar el número de ciclos. Este comportamiento puede ser adjudicado a la adsorción del producto de oxidación sobre la superficie del electrodo, que conduce a su pasivación, y la formación de un film de polianilina. Por este motivo se debe pulir el ECV luego de cada determinación.

- b) *Adsorción de 2,4 DMA*. El electrodo de trabajo se sumergió en una solución de 2,4 DMA 5,0 μM en ácido acético-acetato de sodio 0,1 M (pH 4,50). Se realizaron voltamperometrías cíclicas a 0 s y luego de permanecer 60 s a potencial abierto. Como se puede observar en la Figura 5.4b), el segundo voltamperograma (luego de los 60s a potencial abierto) registra un aumento en la intensidad de corriente de ambos picos de oxidación debido a la posible adsorción del analito sobre la superficie del electrodo.

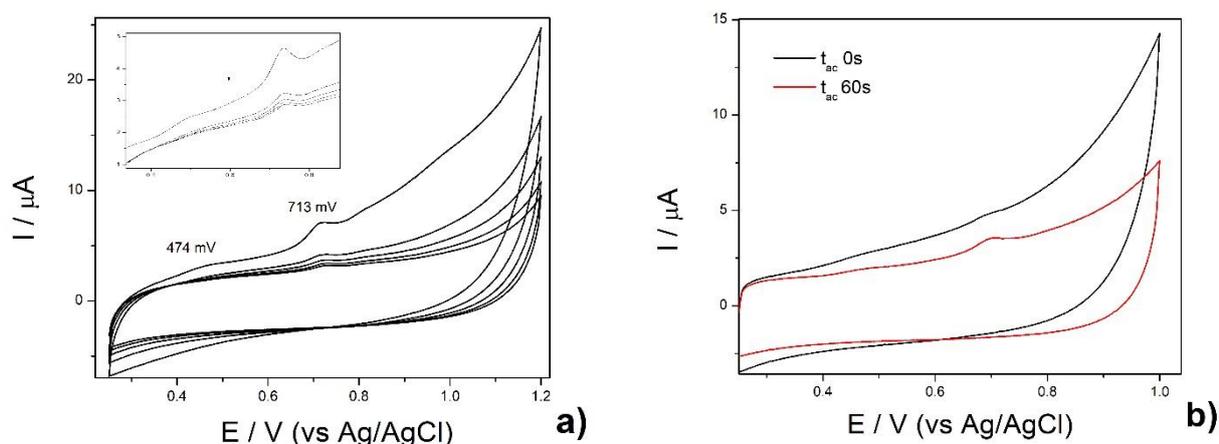


Figura 5.4. a) Cinco voltamperogramas cíclicos sucesivos de una solución 20,0 μM de 2,4 DMA y **b)** voltamperogramas cíclicos de una solución 5,0 μM de 2,4 DMA luego de 0 s y 60 s (t_{ac}) a potencial abierto en ácido acético – acetato de sodio 0,1 M (pH 4,50) sobre ECVA como electrodo de trabajo, empleando una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1}

c) *Estudio a diferentes velocidades de barrido.* Se empleó una solución 20,0 μM de 2,4 DMA en ácido acético – acetato de sodio 0,1 M (pH 4,50) y se registraron los voltamperogramas cíclicos a velocidades de barrido entre 25 y 300 mVs^{-1} , tal como se observa en la Figura 5.5 a). A velocidades mayores a las estudiadas se observó una relación señal/ruido baja. La corriente obtenida se relaciona de forma directamente proporcional con la concentración del analito en estudio y la velocidad de barrido mediante la ecuación de Randles-Sevcik. El estudio realizado, demostró una relación lineal entre la corriente de los picos de oxidación (I_{pn1} e I_{pn2}) y la velocidad de barrido (v).

Si la relación entre la corriente de pico redox (I_p) y la velocidad de barrido (v) es lineal, sugiere que el proceso presenta un comportamiento controlado por adsorción. En la Figura 5.5b), se observa la gráfica de $\log I_{pn}$ (μA) en función de $\log v$ (mVs^{-1}) para ambos picos. Ambos presentan un comportamiento lineal en el rango de velocidades de barrido estudiadas, con las correspondientes ecuaciones:

$$\log I_{pn2} = (0,993 \pm 0,041) \log v - (1,772 \pm 0,083)$$

$$\log I_{pn1} = (0,970 \pm 0,074) \log v - (2,207 \pm 0,151)$$

Los valores de las pendientes obtenidas son 0,970 y 0,993, con un $R^2 = 0,971$ y $R^2 = 0,991$, para I_{pn1} e I_{pn2} , respectivamente. Estos valores de pendiente experimentales cercanos al valor 1, indican que el proceso de oxidación de 2,4 DMA sobre el electrodo de ECVA, es un proceso controlado por adsorción [37-38].

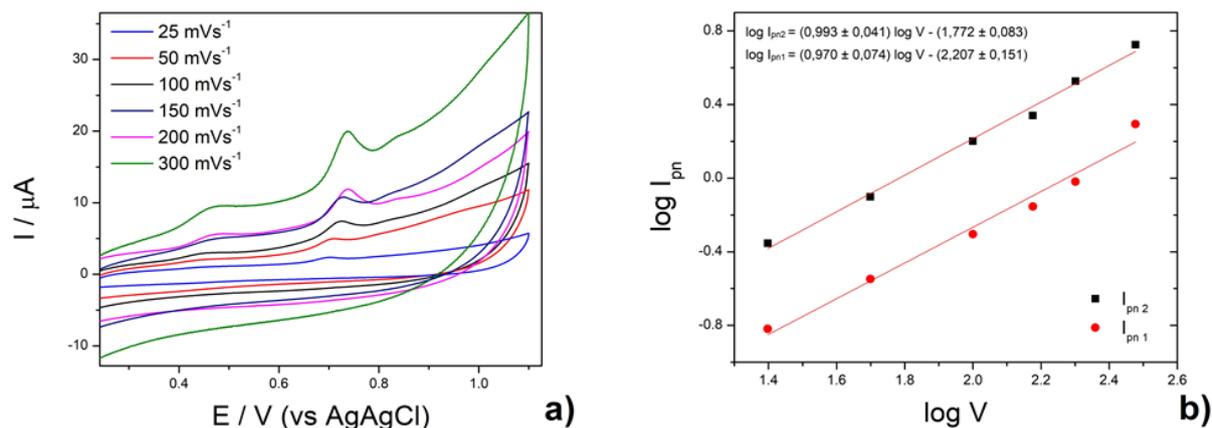


Figura 5.5. Voltamperogramas cíclicos a velocidades entre 25 y 300 mVs⁻¹ de solución 20,0 μM de 2,4 DMA en ácido acético – acetato de sodio 0,1 M (pH 4,50) sobre ECV activado como electrodo de trabajo **a)** y relación log I_{pn} vs log v **b)** para ambos picos de oxidación.

5.4.3 Voltamperometría de redisolución adsortiva de onda cuadrada empleando un ECV sin y con activación electroquímica.

Se llevó a cabo un estudio comparativo de la respuesta del ECV sin y con activación de la superficie tal como se indicó en la sección 5.3.3.3. Los voltamperogramas de VAOC obtenidos se muestran en la Figura 5.6, donde se puede observar que, si bien ambos electrodos de trabajo presentan respuesta a la oxidación de 2,4 DMA, el ECVA registra señales de intensidad de corriente mayores para ambos picos de oxidación, bajo las mismas condiciones de trabajo. Además, los potenciales de los máximos de oxidación se ven desplazados a valores menores. La activación electroquímica fue una de las primeras técnicas realizadas sobre electrodos de carbono para mejorar su respuesta. Este aumento en la señal se debe a la formación de óxidos de grafito sobre la superficie del electrodo, que aumentan su sensibilidad [39].

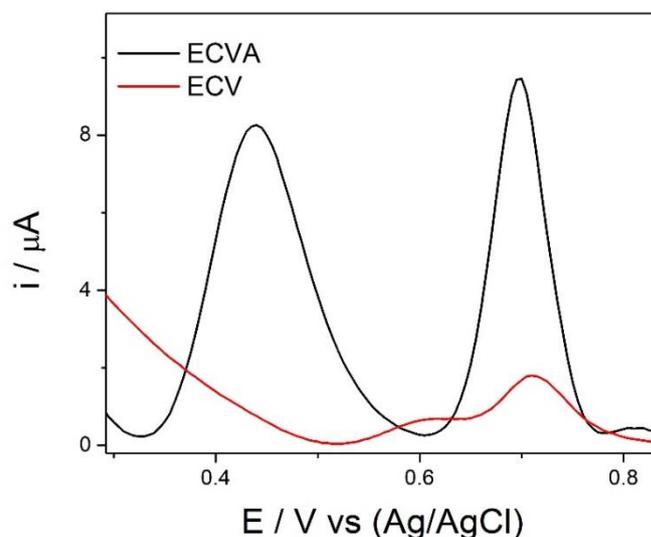


Figura 5.6. Voltamperogramas de VAOC de una solución 5,0 μM de 2,4 DMA en ácido acético – acetato de sodio 0,1 M (pH 4,50), $\Delta E_s = 5 \text{ mV}$, $\Delta E_{sw} = 50 \text{ mV}$, $f = 50 \text{ Hz}$ sobre un electrodo de carbono vítreo sin activar (línea roja) y activado (línea negra).

5.4.4 Optimización de los parámetros analíticos

5.4.4.1 Optimización de pH

La optimización del valor del pH de trabajo se llevó a cabo mediante un análisis univariado. Para esto, la respuesta de la oxidación electroquímica de 2,4 DMA se estudió a valores de pH 3,70, 4,50 y 5,30 empleando una solución reguladora de ácido acético – acetato de sodio y el ECVA como electrodo de trabajo. En la Figura 5.7, se pueden observar los valores de I_{pn} de los picos 1 y 2 obtenidos para los pHs estudiados. Se seleccionó para los siguientes análisis un valor de pH 4,50 debido a que se obtuvo la mayor intensidad de corriente para ambos picos. Este valor de pH coincide con la máxima capacidad reguladora de la solución, logrando mantener el pH en la celda electroquímica cuando se incorpora la muestra hidrolizada en HCl 2,5 M.

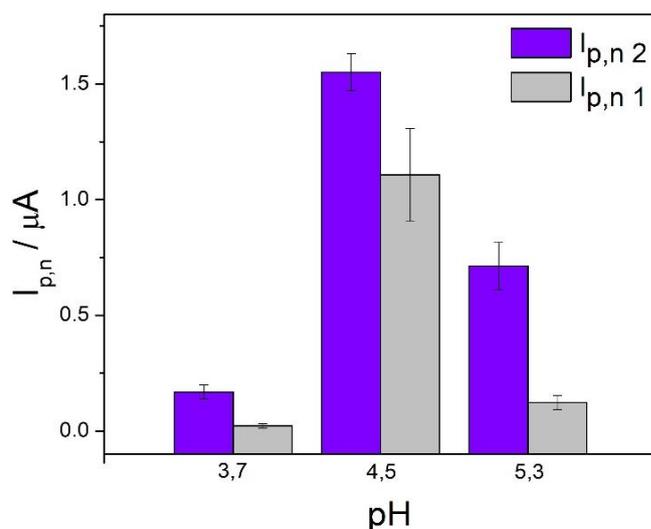


Figura 5.7. Valores de $I_{p,n 1}$ y 2 en función del pH empleando una solución de 2,4 DMA 5,0 μM DMA en ácido acético – acetato de sodio 0,1 M, $\Delta E_s = 2$ mV, $\Delta E_{sw} = 25$ mV, $f = 40$ Hz sobre un electrodo de ECVA.

5.4.4.2 Optimización de los parámetros de voltamperometría de onda cuadrada

Los parámetros de VAOC (ΔE_s , ΔE_{sw} y f), se seleccionaron a partir de un diseño de optimización Box-Benken, tomando como valor de respuesta la intensidad de corriente de pico neta tanto para el pico de oxidación 1 (474 mV), como el 2 (713 mV). Los niveles para todas las variables fueron seleccionados en base a estudios preliminares, donde se obtuvieron las condiciones y límites para cada factor (Tabla 5.1). En la Tabla 5.2 se indican los 15 experimentos realizados. Todos los experimentos se llevaron a cabo al azar, empleando una solución de 2,4 DMA 5,0 μM en ácido acético – acetato de sodio 0,1 M pH 4,50, y los datos experimentales obtenidos fueron analizados mediante ANOVA. Se realizaron dos análisis estadísticos, teniendo en cuenta cada uno de los picos de oxidación.

Tabla 5.1. Niveles estudiados en cada uno de los parámetros de VAOC.

<i>Variable independiente</i>	<i>Bajo</i>	<i>Medio</i>	<i>Alto</i>
ΔE_s [mV]	2	4	6
ΔE_{sw} [mV]	20	35	50
f [Hz]	20	35	50

Tabla 5.2. Valores detallados de cada parámetro de VAOC en estudio para los 15 experimentos involucrados en el diseño de optimización Box-Benkhen.

<i>Experimento</i>	ΔE_{sw} [mV]	ΔE_s [mV]	F [Hz]
1	4	35	35
2	6	35	50
3	4	50	50
4	4	20	20
5	4	50	20
6	4	20	50
7	2	20	35
8	4	34	35
9	2	50	35
10	2	35	50
11	6	20	35
12	6	50	35
13	2	35	20
14	6	35	20
15	4	35	35

Los diagramas de Pareto del diseño de optimización del modelo Box-Benkhen se presentan en la Figura 5.8. A partir de su análisis, se puede evaluar que los tres factores de onda cuadrada estudiados (ΔE_{sw} , ΔE_s y f), resultaron ser

estadísticamente significativos con un $\alpha=0,05$, para ambos picos de oxidación. En la Figura 5.8 a) se presenta el diagrama de Pareto correspondiente a la intensidad de corriente de pico 1 (I_{pn1}). En este, se observa que tanto incrementos en los parámetros de frecuencia como en la amplitud de la onda cuadrada proporcionan un incremento en la I_{pn1} . Asimismo, la interacción ΔE_{swf} resulta estadísticamente significativa e influyen de forma positiva, mientras que la interacción $\Delta E_s \Delta E_s$ lo hace negativamente. En la Figura 5.8 b) se presenta el diagrama de Pareto correspondiente a la intensidad de corriente del pico 2 (I_{pn2}). En este caso, la frecuencia y la interacción ΔE_{swf} son los parámetros estadísticamente significativos que influyen de forma positiva. Además, si bien el salto de pulso no resulta ser significativo, si lo es su interacción $\Delta E_s \Delta E_s$ e influye negativamente al valor de respuesta.

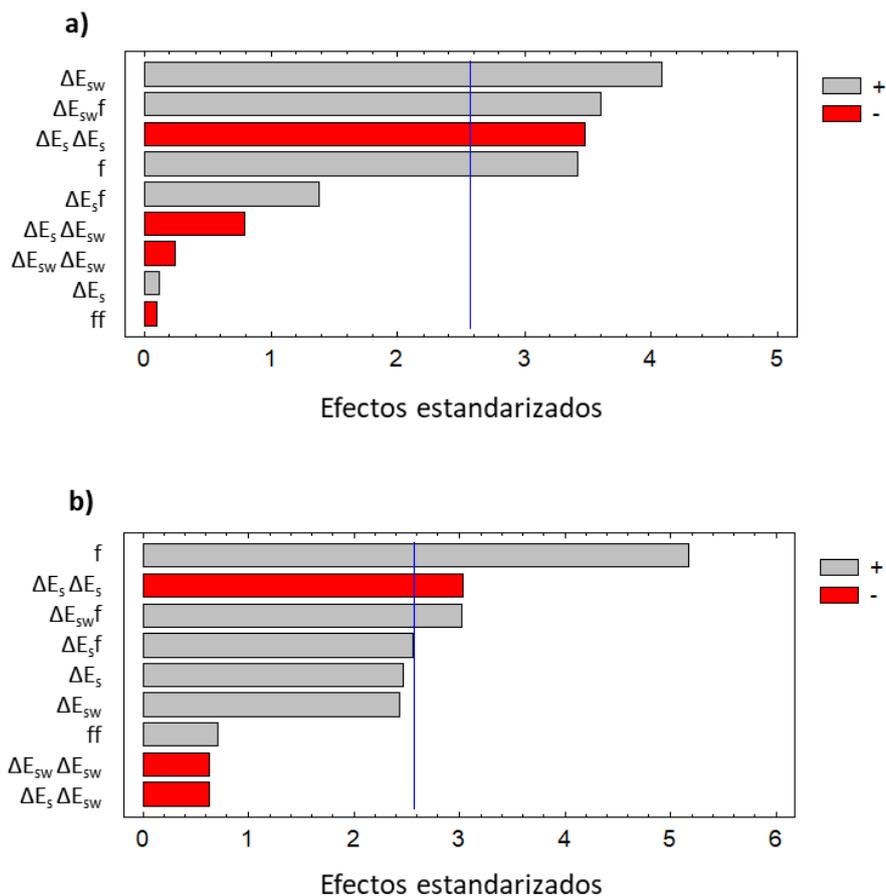


Figura 5.8. Diagrama de Pareto obtenido por el diseño de optimización del modelo Box-Benkhen para **a)** I_{pn1} como señal de respuesta y **b)** I_{pn2} como señal de respuesta. La línea vertical azul indica el nivel de significación $\alpha=0,05$.

Del diseño surge como resultado, las superficies de respuesta representadas por las ecuaciones:

$$I_{p,n1} = 8,98 \times 10^{-2} + 1,11 \Delta E_s - 3,08 \times 10^{-2} \Delta E_{sw} - 9,29 \times 10^{-2} f - 1,53 \times 10^{-1} \Delta E_s^2 - 4,48 \times 10^{-3} \Delta E_s \Delta E_{sw} + 7,81 \times 10^{-3} \Delta E_s f - 1,89 \times 10^{-4} \Delta E_{sw}^2 + 2,70 \times 10^{-3} \Delta E_{sw} f - 7,98 \times 10^{-5} f^2 \quad (1)$$

$$I_{p,n2} = 7,11 \times 10^{-1} + 8,49 \times 10^{-1} \Delta E_s - 1,19 \times 10^{-2} \Delta E_{sw} - 1,38 \times 10^{-1} f - 1,36 \times 10^{-1} \Delta E_s^2 - 3,59 \times 10^{-3} \Delta E_s \Delta E_{sw} + 1,47 \times 10^{-2} \Delta E_s f - 5,01 \times 10^{-4} \Delta E_{sw}^2 + 2,31 \times 10^{-3} \Delta E_{sw} f + 5,73 \times 10^{-4} f^2 \quad (2)$$

El modelo obtenido, en concordancia con el análisis de residuos, obtuvo un coeficiente de determinación de $R^2=0,9181$ para el análisis de I_{pn1} y $R^2=0,9289$ para I_{pn2} . Estos valores nos indican un ajuste aceptable por el modelo en ambos casos, tomando tanto I_{pn1} como I_{pn2} como señal de respuesta.

Las superficies de respuesta obtenidas por el modelo, para los picos de oxidación 1 y 2, se presentan en la Figura 5.9. Evaluando las correspondientes superficies, se puede observar que los valores hallados por ambos modelos como óptimos para ΔE_{sw} y f se encuentran fuera de la región experimental. Sin embargo, se decidió seleccionar los valores correspondientes a los extremos de la superficie de respuesta para ΔE_{sw} y f , debido a que valores mayores de ΔE_{sw} no generan mejoras significativas de la señal analítica y mayores frecuencias presentan voltamperogramas con mucho ruido. Los valores seleccionados como óptimos para los parámetros de VAOC, generando corrientes de pico más nítidas y definidas, involucran un $\Delta E_{sw} = 50$ mV y una $f = 50$ Hz para ambos picos de oxidación. En el caso del ΔE_s , los valores obtenidos como óptimos fueron de 4 mV y 5 mV, para el análisis de I_{pn1} e I_{pn2} , respectivamente. Finalmente, con el fin de decidir el valor óptimo de ΔE_s a seleccionar (4 mV ó 5 mV), se evaluaron ambas condiciones por triplicado empleando una solución de 2,4 DMA 5,0 μ M en ácido acético – acetato de sodio 0,1 M pH 4,50. Como se puede observar en

los voltamperogramas de VAOC obtenidos en la Figura 5.10, un valor de $\Delta E_s = 5$ mV presentó mayores señales de intensidad de corriente para ambos picos de oxidación. Por tales motivos se seleccionó finalmente como condiciones óptimas de VAOC: $\Delta E_{sw} = 50$ mV, $f = 50$ Hz y $\Delta E_s = 5$ mV. Los valores hallados por el modelo para cada pico de oxidación y los parámetros seleccionados como óptimos para las determinaciones experimentales se representan en la Tabla 5.3.

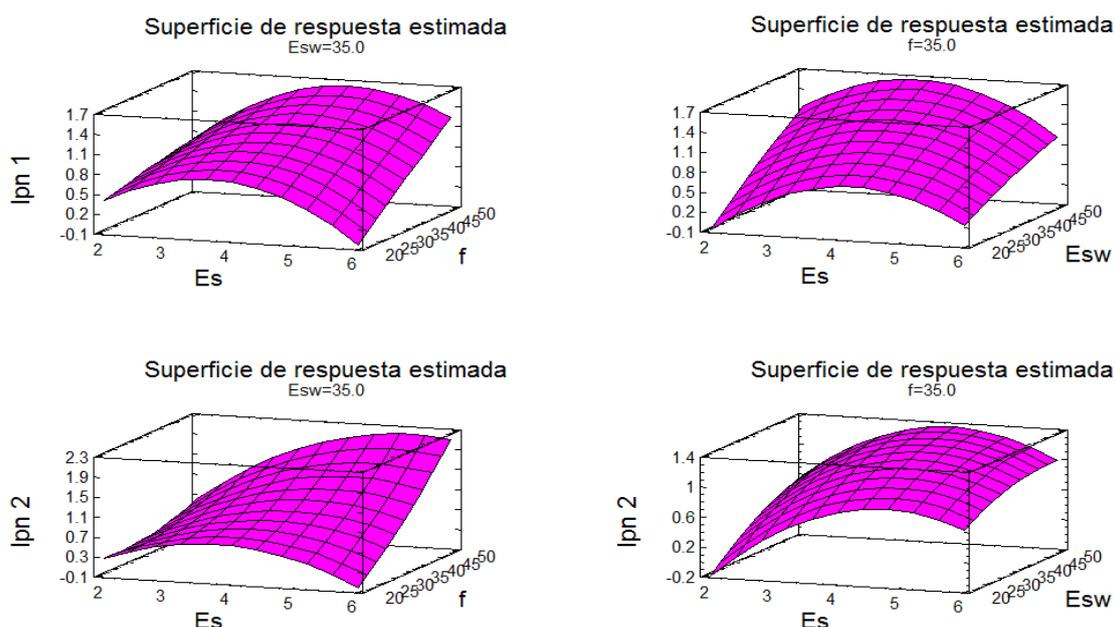


Figura 5.9. Superficies de respuestas obtenidas para el modelo Box-Benkhen en las distintas combinaciones de los parámetros estudiados para el primer y segundo pico de oxidación de 2,4 DMA.

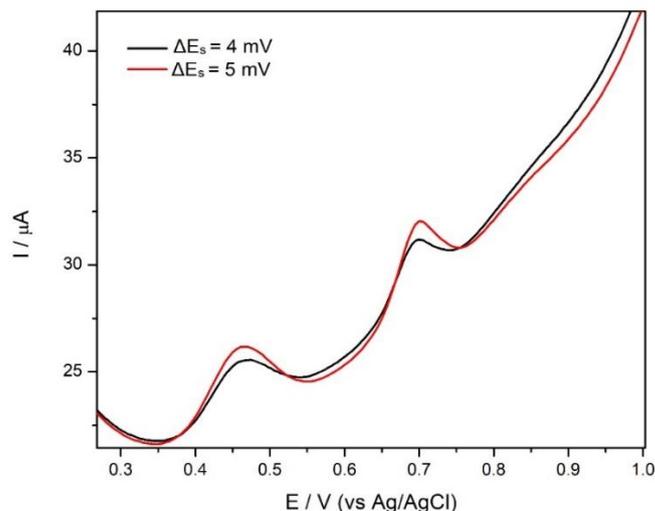


Figura 5.10. Voltamperogramas VAOC de una solución de 2,4 DMA 5 μM DMA en ácido acético – acetato de sodio 0,1 M pH 4,5, $\Delta E_{sw}= 50$ mV, $f = 50$ Hz y $\Delta E_s= 4$ mV (línea negra) ó $\Delta E_s= 5$ mV (línea roja).

Tabla 5.3. Valores óptimos hallados por el diseño experimental para cada parámetro electroquímico.

Factor	Óptimo (I_{pn1})	Óptimo (I_{pn2})	Óptimo
ΔE_{sw} (mV)	50,0	50,0 mV	50,0 mV
F (Hz)	50,0 Hz	50,0 Hz	50,0 Hz
ΔE_s (mV)	4,0 mV	5,0 mV	5,0 mV

5.4.4.3 Optimización del tiempo de acumulación

Por último, se evaluó el efecto del tiempo de acumulación (t_{ac}) sobre la adsorción del 2,4 DMA y las intensidades de pico netas (I_{pn1} e I_{pn2}). Para esto, la acumulación se llevó a cabo durante distintos tiempos a un potencial abierto y una agitación continua de 6000 rpm, y luego se registraron los voltamperogramas correspondientes bajo las condiciones de VAOC óptimas establecidas previamente. Como puede ser observado en la Figura 5.11, los mejores resultados para ambos picos de oxidación fueron obtenidos empleando un t_{ac} de 20s.

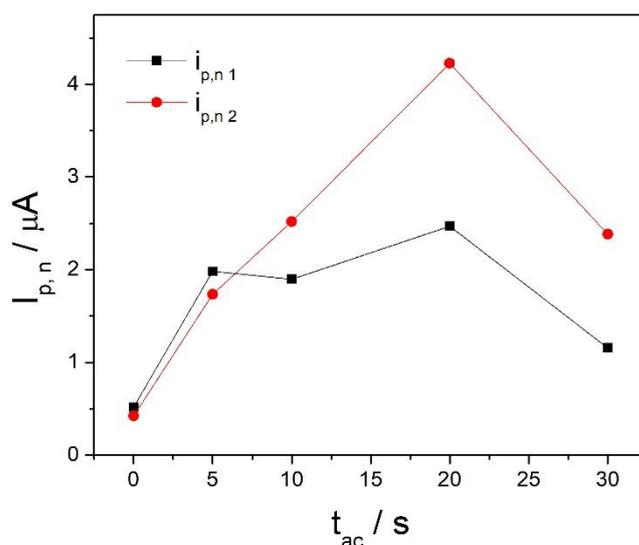


Figura 5.11. Dependencia de la corriente de pico neta ($I_{pn 1}$ e $I_{pn 2}$) en función del tiempo de acumulación (t_{ac}) bajo condiciones de agitación a 6000 rpm, empleando una solución de 2,4 DMA 5 μM DMA en ácido acético – acetato de sodio 0,1 M pH 4,50, E_{ac} : potencial abierto, $\Delta E_{sw} = 50$ mV, $f = 50$ Hz y $\Delta E_s = 5$ mV.

5.4.5 Hidrólisis de amitraz

La determinación de amitraz a través de sus metabolitos requiere hidrólisis alcalinas o ácidas que implican tiempos desde 30 minutos a 3 horas y bajo la acción de temperatura que va desde los 60 a 90 °C [18, 26, 25, 40]. Sin embargo, en los trabajos reportados no se ha empleado la acción microondas para disminuir los tiempos de hidrólisis.

Shamsipur y col. realizaron la determinación de amitraz en muestras de miel a partir de un ensayo de recuperación con el agregado de 2,4 DMA [25]. Por otro lado, se determinó el contenido de amitraz en muestras de miel realizando un ensayo de recuperación de este analito, sin considerar su vida media en esta matriz [40].

En este trabajo se analizaron muestras de miel provenientes de apiarios ecológicos, por lo tanto, no contenían residuos de amitraz ni sus metabolitos. Por tal motivo, a las muestras estudiadas se le realizaron agregados conocidos de amitraz. Tras ser sometidas a una hidrólisis con acción de microondas, se llevó a cabo la determinación de su metabolito final, 2,4 DMA. Las variables estudiadas para su hidrólisis son las siguientes:

5.4.5.1 Estudio de la concentración de HCl

Pruebas preliminares demostraron que la hidrólisis de amitraz realizada a pH ácido fue más eficiente que a pH alcalino. Esto puede deberse a la alta estabilidad del mismo a pHs mayores a 9 [21]. En una primera etapa, con el fin de optimizar las condiciones de la hidrólisis ácida del acaricida, se evaluó la acción de distintas concentraciones de HCl (0,5, 1,5 y 2,5 M) empleando una solución 2,5 μ M de amitraz durante 0 a 120 minutos a temperatura ambiente.

En la Figura 5.12 se observa que, trabajando con HCl 0,5 M, no se evidencian cambios relevantes para la I_{pn} en los tiempos estudiados. En el caso de emplear HCl 1,5 M las I_{pn1} y I_{pn2} aumentan con el tiempo de hidrólisis. El mismo comportamiento se obtiene para I_{pn1} , cuando la hidrólisis se realiza con HCl 2,5 M. Por otro lado, para I_{pn2} no se observan cambios significativos a 60 y 120 minutos. Analizando los datos obtenidos, se observan mejores resultados empleando una concentración de HCl 2,5 M y se evidencia una influencia del tiempo de hidrólisis. Para la obtención de los voltamperogramas se emplearon las condiciones óptimas de VAOC: $\Delta E_{sw} = 50$ mV, $f = 50$ Hz y $\Delta E_s = 5$ mV y un tiempo de acumulación (t_{ac}) de 20 s bajo condiciones de agitación a 6000 rpm.

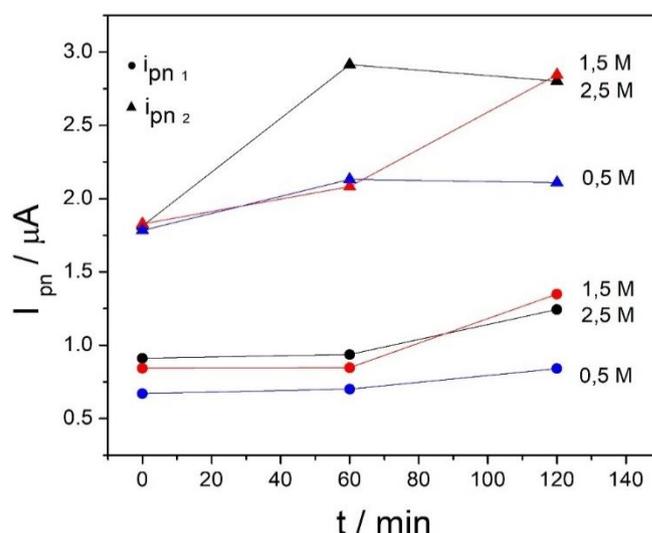


Figura 5.12. Señal de intensidad de pico neta (I_{pn1} e I_{pn2}) obtenida tras someter a una hidrólisis ácida en HCl 0,5, 1,5 y 2,5 M una solución 2,5 μ M de amitraz durante 0, 60 y 120 minutos a temperatura ambiente.

5.4.5.2 Efecto de la temperatura y acción microondas

Se evaluó el efecto de la temperatura en la hidrólisis de amitraz. Para esto, se estudió la hidrólisis ácida de una solución 2,5 μM de amitraz en HCl 2,5 M durante 60 min, sin calentamiento y calentando en baño termostatzado a 75 $^{\circ}\text{C}$ en función de los datos de bibliografía [25, 26]. Los resultados obtenidos indican un aumento en la señal de la corriente de ambos picos del metabolito final cuando se trabaja con temperatura. Por ello, se decidió estudiar la acción de microondas con el propósito de disminuir los tiempos de hidrólisis de amitraz. Se trabajó con un microondas convencional empleando cuatro potencias diferentes (800, 1000, 1200 y 1500 W), con tiempos de hidrólisis que variaron entre 60 y 90 segundos. A tiempos mayores a 80 s de exposición a microondas, se observaron pérdidas por volatilización. Las condiciones óptimas se obtuvieron a 1500W y 75 s. Como puede observarse en los voltamperogramas obtenidos en la Figura 5.13, la acción microondas logró reducir los tiempos y mejorar la hidrólisis con respecto al empleo de un baño termostatzado a 75 $^{\circ}\text{C}$. Las determinaciones de VAOC se realizaron en ácido acético – acetato de sodio 0,1 M pH 4,50, $\Delta E_{\text{sw}} = 50 \text{ mV}$, $f = 50 \text{ Hz}$ y $\Delta E_{\text{s}} = 5 \text{ mV}$ y $t_{\text{ac}} = 20 \text{ s}$, bajo condiciones de agitación a 6000 rpm.

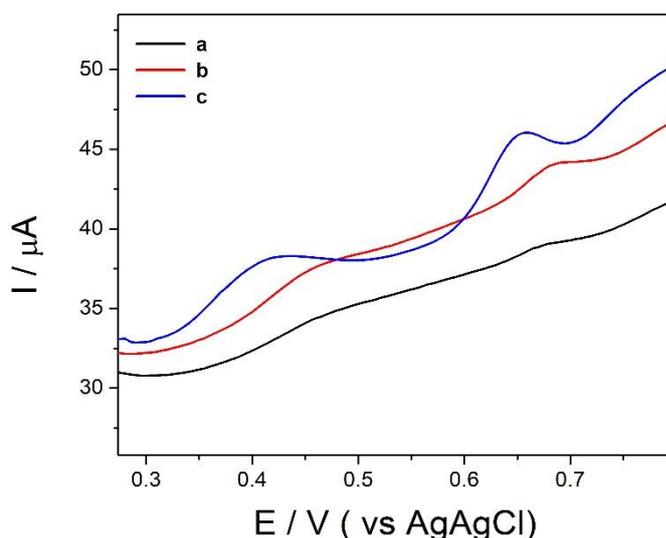


Figura 5.13. Voltamperogramas VAOC de una solución 2,5 μM de amitraz luego de ser sometida a una hidrólisis ácida en una solución en HCl 2,5 M sin calentamiento (a) y a 75 $^{\circ}\text{C}$ (b) durante 1 h, y tras la acción microondas (1500 W) durante 75 s (c)

5.4.6 Parámetros analíticos

En la Figura 5.14 a), se detallan los voltamperogramas VAOC de soluciones de amitraz en el rango de concentraciones de 0,25 a 2,50 μM hidrolizadas a 2,4 DMA, empleando un ECVA bajo las condiciones experimentales óptimas. Las ecuaciones de regresión lineal obtenidas para ambos picos de oxidación del 2,4 DMA se presentan en la Figura 5.14 b), donde $I_{p,n}$ representa las corrientes de pico (μA) y C^*_{Amitraz} la concentración (μM). Las ecuaciones de las rectas de regresión presentaron un valor de pendiente de $(0,878 \pm 0,040)$ y $(1,448 \pm 0,043)$ $\mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$, con una intercepción de $(-0,587 \pm 0,058)$ y $(-0,202 \pm 0,059)$ μA para I_{pn1} e I_{pn2} , respectivamente. Los coeficientes de correlación (R) obtenidos fueron de 0,990 para I_{pn1} y 0,993 para I_{pn2} . La I_{pn2} para la concentración de 0,25 μM no se pudo incluir en la curva de calibrado ya que se encuentra fuera del intervalo lineal. Los límites de detección (LDD) fueron de 0,26 μM y 0,19 μM , estimados como 3 veces $S_{y/x}$ / pendiente [41] para I_{pn1} e I_{pn2} , respectivamente. La repetibilidad se calculó como el porcentaje de variación de la desviación estándar relativa de seis mediciones independientes de una solución 2,50 μM de amitraz hidrolizada. Los valores obtenidos fueron de 15,18 % y 5,33 % para la corriente de pico neta, y de 0,24 % y 0,12 % para el potencial de pico, correspondientes al pico 1 y 2, respectivamente.

Luego de analizar los resultados obtenidos con ambos picos de oxidación de 2,4 DMA, se consideró como mejor opción continuar las determinaciones de amitraz analizando la respuesta de I_{pn2} , ya que presentaba mayor sensibilidad y menor LOD.

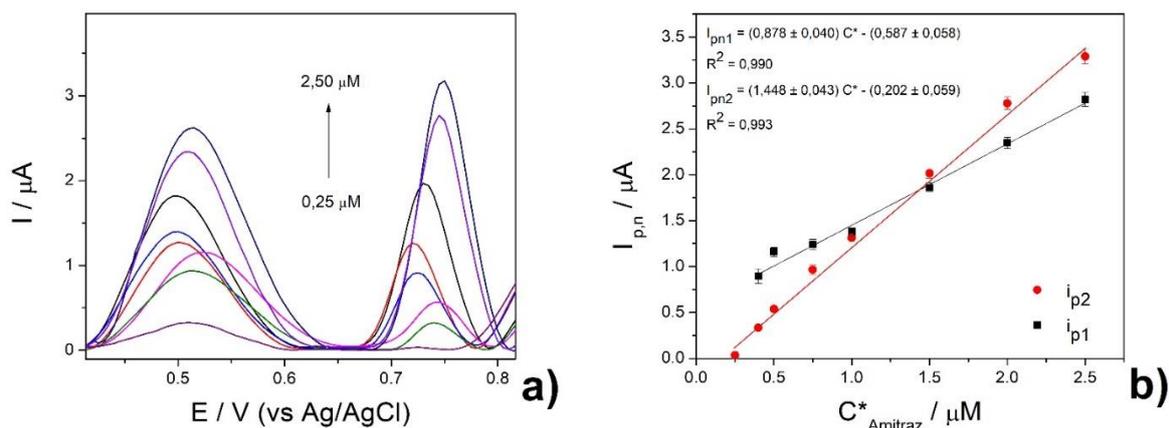


Fig 5.14. a) VAOC de los testigos en las condiciones óptimas para ambos picos de oxidación del 2,4 DMA resultante de la hidrólisis del amitraz y **b)** las curvas de calibrado correspondientes en el rango de 0,40 a 2,50 μM para el I_{pn1} y de 0,25 a 2,50 μM para el I_{pn2} .

5.4.7 Aplicación a muestras de miel

El método electroanalítico propuesto se aplicó para la determinación de amitraz en tres muestras de miel, utilizando las condiciones óptimas experimentales. Las muestras analizadas no contenían amitraz por ser muestras adquiridas en un apiario ecológico, por ello se les realizaron adiciones conocidas del acaricida previo a su determinación. Las muestras se analizaron por triplicado y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.4, empleando las señales de I_{pn2} como respuesta.

Tabla 5.4. Análisis en muestras reales. Estudios de recuperación en muestras de miel con una concentración agregada de Amitraz conocida.

<i>Muestras^a</i>	<i>Agregado (μM)</i>	<i>Encontrado (μM) \pm s</i>	<i>% Recuperación</i>
M1	0,35	0,32 \pm 0,00 ₅	91,4
	0,75	0,80 \pm 0,01	106,6
	1,00	0,97 \pm 0,00 ₅	97,0
M2	0,35	0,34 \pm 0,00 ₅	97,14
	0,75	0,81 \pm 0,01	108,0
	1,00	1,07 \pm 0,02	107,0
M3	0,35	0,38 \pm 0,00 ₁	108,6
	0,75	0,73 \pm 0,01	97,3
	1,00	0,98 \pm 0,01	98,5

^a Muestras analizadas por triplicado.

5.5 Conclusiones parciales

El presente trabajo permitió la determinación de amitraz a partir de su metabolito final, 2,4 dimetilnilina (2,4 DMA), en muestras de miel de la localidad de Pedro Luro usando voltamperometría de redisolución adsorbtiva de onda cuadrada (VAOC) como técnica electroquímica y un electrodo de carbono vítreo activado electroquímicamente (ECVA) como electrodo de trabajo. El uso de un ECVA permite aumentar la sensibilidad de respuesta del electrodo comercial, con una etapa sencilla de activación. Para la optimización de los parámetros electroanalíticos de VAOC, se logró emplear con éxito un diseño experimental Box-Benken. Por otro lado, una de las principales ventajas que se planteó en este trabajo, es la hidrólisis del acaricida empleando un horno microondas, logrando así reducir los tiempos de hidrólisis a tan solo 75 segundos. Los resultados logrados fueron satisfactoriamente validados empleando un ensayo de recuperación. Evaluando los datos experimentales obtenidos se puede concluir que, si bien el método propuesto no logra alcanzar los límites de detección de las técnicas cromatográficas de referencia, resulta ser una alternativa más económica, rápida, sencilla y amigable con el medio ambiente.

5.6 Bibliografía

- [1] THOMPSON H. M. Behavioural Effects of Pesticides in Bees—Their Potential for Use in Risk Assessment. *Ecotoxicology*, 2003, 12, 1, 317-330.
- [2] HLADIK M. L., VANDEVER M., SMALLING K. L., Exposure of native bees foraging in an agricultural landscape to current-use pesticides. *Science of the Total Environment*, 2016, 542, 469-477.
- [3] CRESSWELL J. E, DESNEUX N., VANENGELSDORP D., Dietary traces of neonicotinoid pesticides as a cause of population declines in honey bees: an evaluation by Hill's epidemiological criteria. *Pest Management Science*, 2012, 68, 6, 819-827.
- [4] OSBORNE J. L., WILLIAMS I. H., CORBET S. A, Bees, Pollination and Habitat Change in the European Community. *Bee World*, 1991, 72, 3, 99-116.
- [5] BOECKING O., GENERSCH E., Varroosis – the Ongoing Crisis in Bee Keeping, *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*, 2008, 3, 2, 221-228.
- [6] CHAUZAT M. P., FAUCON J. P., Pesticide residues in beeswax samples collected from honey bee colonies (*Apis mellifera* L.) in France. *Pest Management Science* 2007, 63, 11, 1100-1106.
- [7] KORTA E., BAKKALI A., BERRUETA L. A., GALLO B., VICENTE F., KILCHENMANN V., BOGDANOV S., Study of acaricide stability in honey. Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49, 12, 5835-5842.
- [8] UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, OFFICE OF PREVENTION, PESTICIDES AND TOXIC SUBSTANCES, *Reregistration eligibility decision amitraz, list A, case 0234*. WASHINGTON, D.C, 1996.
Disponible en: <https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/0234red.pdf>
- [9] ELZEN P. J., BAXTER J. R., SPIVAK M., WILSON W. T., Control of *Varroa jacobsoni* Oud. resistant to fluvalinate and amitraz using coumaphos, *Apidologie*, 2000, 31, 3, 437-441.
- [10] RIAL-OTERO R., GASPAR E. M., MOURA I., CAPELO J. L., Chromatographic-Based methods for pesticide determination in honey: an overview, *Talanta*, 2007, 71, 2, 503-514.

- [11] MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA, PESCA Y ALIMENTACIÓN, SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (Senasa), *Productos Veterinarios*, Resolución 559/2011, Bs As, 2011. Disponible en: http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/INFORMACION/NORMATIVA/RESOL_Y_ANEXOS/rs-559-2011_apruebense_los_limites_de_residuos_en_alimentos_de_origen_animal.pdf
- [12] SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA (SENASA), *Plan de Control de Residuos e Higiene de Alimentos. Resumen de Resultados 2016*, Marzo 2017. Disponible en: http://www.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/ABEJAS/PROD_PRIMARIA/PLAN_CREHA/CTROL_RES/resumen_resultados_plan_creha_2016.pdf
- [13] GAO X., TAN Y., GUO H., Simultaneous determination of amitraz, chlordimeform, formetanate and their main metabolites in human urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 1052, 27-33, 2017.
- [14] HEPPELLE J., MACK D., SIGALOV I., SCHÜLER S., ANASTASSIADES M., Analysis of “Amitraz (sum)” in pears with incurred residues – Comparison of the approach covering the individual metabolites via LC–MS/MS with the approach involving cleavage to 2,4-dimethylaniline, *Food Chemistry* 2015, 166, 240-247.
- [15] GARCÍA-REYES J. F., MOLINA-DÍAZ A., FERNÁNDEZ-ALBA A. R., Identification of Pesticide Transformation Products in Food by Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry via “Fragmentation-Degradation” Relationships, *Analytical Chemistry*, 2007, 79, 307-321.
- [16] YU H., TAO Y., LEB T., CHEN D., ISHSAN A., LIU Y., WANG Y., YUAN Z., Simultaneous determination of amitraz and its metabolite residue in food animal tissues by gas chromatography-electron capture detector and gas chromatography–mass spectrometry with accelerated solvent extraction, *Journal of Chromatography B*, 2010, 878, 1746–1752.

- [17] CALDOW M., FUSSELL R. J., SMITH F., SHARMAN M., Development and Validation of an Analytical Method for Total Amitraz in Fruit and Honey with Quantification by Gas Chromatography-Mass Spectrometry, *Food Additives and Contaminants*, 2007, 24, 3, 280-284.
- [18] JIMÉNEZ J. J., BERNAL J. L., DEL NOZAL M. J., ALONSO C., Extraction and clean-up methods for the determination of amitraz total residues in beeswax by gas chromatography with electron capture detection, *Analytica Chimica Acta*, 2004, 524, 1-2, 271–278.
- [19] KILJANEK T., NIEWIADOWSKA A., GAWEŁ M., SEMENIUK S., BORZEŃKA M., POSYNIAK A., POHORECKA K., Multiple pesticide residues in live and poisoned honeybees – Preliminary exposure assessment, *Chemosphere*, 2017, 175, 36-44.
- [20] PIERPOINT A. C., HAPEMAN C. J., TORRENTS A., Kinetics and Mechanism of Amitraz Hydrolysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45, 5, 1937-1939.
- [21] BRIMECOMBE R. D., LIMSON J. L., Electrochemical Investigation of the Effect of pH and Solvent on Amitraz Stability, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54, 8139-8143.
- [22] BRIMECOMBE R., LIMSON J., Voltammetric analysis of the acaricide amitraz and its degradant, 2,4-dimethylaniline, *Talanta* 2007, 71, 3, 1298-1303.
- [23] XU J. Z., MIAO J. J., LIN H., DING T., ZHAO Z. Y., WU B., SHEN C. Y., JIANG Y., Determination of amitraz and 2,4-dimethylaniline residues in honey by using LC with UV detection and MS/MS, *Journal of Separation Science*, 2009, 32, 23-24, 4020-4024.
- [24] GUO H., ZHANG P., WANG J., ZHENG J., Determination of amitraz and its metabolites in whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, 2014, 951-952, 89-95.
- [25] SHAMSIPUR M., HASSAN J., SALAR-AMOLI J., YAMINI Y., Headspace solvent microextraction-gas chromatographic thermionic specific detector determination of amitraz in honey after hydrolysis to 2,4-dimethylaniline, *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, 21, 3, 264-270.
- [26] LENÍČEK J., SEKYRA M., NOVOTNÁ A. R., VÁŠOVÁ E., TITĚRA D., VESELÝ V., Solid phase microextraction and gas chromatography with ion trap

detector (GC-ITD) analysis of amitraz residues in beeswax after hydrolysis to 2,4-dimethylaniline, *Analytica Chimica Acta* 2006, 571, 1, 40-44.

[27] TACCHEO M. B., DE PAOLI M., SPESSOTTO C., Determination of Total Amitraz Residue in Honey by Electron Capture Capillary Gas Chromatography- A Simplified Method, *Pesticide Science*, 1988, 23, 1, 59-64.

[28] KORTA E., BAKKALI A., BERRUETA L. A., GALLO B., VICENTE F., BOGDANOV S., Determination of amitraz and other acaricide residues in beeswax, *Analytica Chimica Acta* 2003, 475, 1-2, 97-103.

[29] IBRAHIM M. S., EL-MAAZAWI M. S., AL-MAGBOUL K. M., KAMAL M. M., Determination of Amitraz Pesticide by Adsorptive Stripping Voltammetry on the Hanging Mercury Drop Electrode, *Microchimica Acta* 2001, 137, 3-4, 215-220.

[30] NOVÁKOVÁ K., HRDLIČKA V., NAVRÁTIL T., HARVILA M., ZIMA J., BAREK J., Application of silver solid amalgam electrode for determination of formamidine amitraz, *Monatshefte für Chemie*, 2016, 147, 1, 181-189.

[31] Martel, AC., Zeggane, S., Aurières, C., DRAJNUDEL P., FAUCON J. P., AUBERT M., Acaridae residues in honey and wax after treatment of honey bee colonies with Apivar or Asuntol 50. *Apidologie*, 2007, 38, 6, 534-544.

[32] ANJO D. M., KAHR M., KHODABAKHSH M. M., NOWINSKI S., WANGER M., Analytical Chemistry, 1989, 61, 23, 2603-2608.

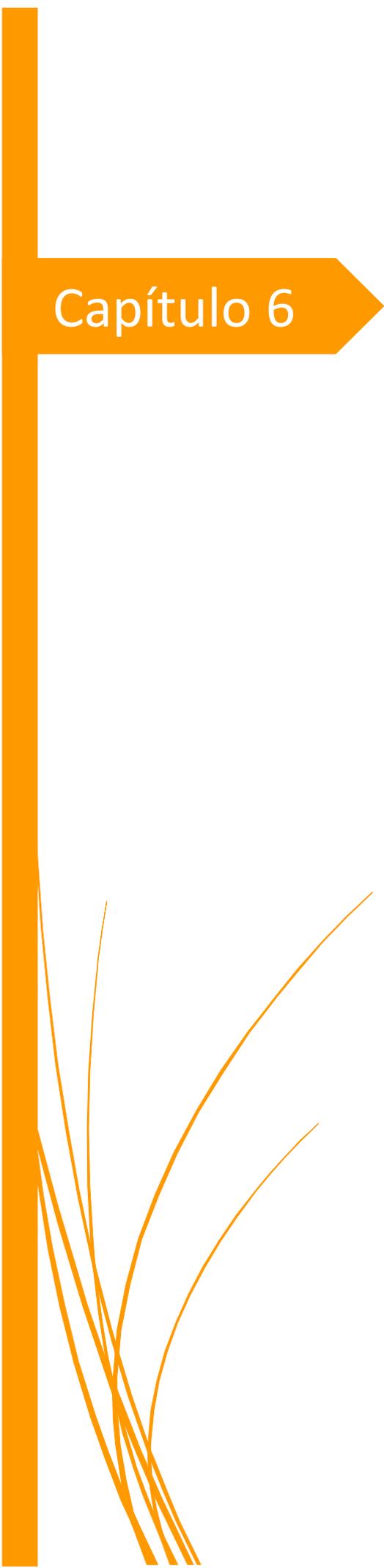
[33] MARQUES M. M., MOURATO L. L. G., AMORIM M. T., SANTOS M. A., MELCHIOR W. B., BELAND F. A., Effect of Substitution Site upon the Oxidation Potentials of Alkylanilines, the Mutagenicities of N-Hydroxyalkylanilines, and the Conformations of Alkylaniline-DNA Adducts, *Chemical Research in Toxicology* 1997, 10, 11, 1266-1274.

[34]. MITADERA M., SPATARU N., FUJISHIMA A., Electrochemical oxidation of aniline at boron-doped diamond electrodes, *Journal of Applied Electrochemistry* 2004, 34, 249-254.

[35]. MIZOGUCHI T., ADAMS R.N., Anodic Oxidation Studies of Dimethylaniline. I. Voltammetric and Spectroscopic Investigations at Platinum Electrodes. *Journal of the American Chemical Society* 1962, 84, 2058-2061.

[36] MITADERA M., SPATARU N., FUJISHIMA A., Electrochemical oxidation of aniline at boron-doped diamond electrodes, *Journal of Applied Electrochemistry* 2004, 34, 3, 249-254.

- [37] WANG H., ZHANG A., CUI H., LIU D., LIU R., Adsorptive stripping voltammetric determination of erythromycin at a pretreated glassy carbon electrode, *Microchemical Journal* 2000, 64, 1, 67-71.
- [38] WANG J., TUZHI P., LIN M. S., TAPIA T., Trace measurements of the antineoplastic agent methotrexate by adsorptive stripping voltammetry, *Talanta* 1986, 33, 9, 707-712.
- [39] BEILBY A. L., SASAKI T. A., STEM H. M., Electrochemical Pretreatment of Carbon Electrodes as a Function of Potential, pH, and Time, *Analytical Chemistry* 1995, 67, 5, 976-980.
- [40] BASHIRI-JUYBARI M., Determination of Amitraz in the Honey Samples by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by Gas Chromatography—Flame Ionization Detection, *American Journal of Analytical Chemistry*, 2011, 2, 5, 632-637.
- [41] MILLER J.C., MILLER J. N., *Estadística y quimiometría para química analítica*, 4^{ta} edición, Pearson Education, Madrid, 2002.

A thick orange vertical bar runs down the left side of the page. A horizontal orange arrow points to the right from the top of this bar, containing the text 'Capítulo 6'.

Capítulo 6

Conclusiones Generales

CONCLUSIONES GENERALES

Respondiendo a los objetivos planteados, en esta Tesis se desarrollaron tres métodos electroanalíticos que permiten evaluar la calidad higiénico-sanitaria de productos apícolas de la provincia de Buenos Aires:

- 1) Para la determinación de residuos cadmio en propóleos bruto y polen corbicular, se diseñó y fabricó en el laboratorio un electrodo de bismuto sólido que presenta diversas ventajas tales como baja toxicidad, bajo costo y un proceso de fabricación sencillo. Se empleó como técnica electroquímica Voltamperometría de Onda cuadrada con Redisolución Anódica (VOCRA).
- 2) Se desarrolló un electrodo de película de antimonio preparado "*in-situ*", para la determinación de residuos de antibióticos de la familia de tetraciclinas (tetraciclina y oxitetraciclina), en miel de abeja. La metodología "*in-situ*" permitió preparar la película en siete segundos, siendo ésta la principal ventaja. Se utilizó como técnica determinativa, Voltamperometría de Onda Cuadrada con Redisolución Catódica.
- 3) Se determinó la concentración de residuos de amitraz a partir de a su metabolito final (2,4 dimetilanilina). Para ello, se logró con éxito:
 - a) Disminuir el tiempo de hidrólisis de amitraz a 2,4 dimetilanilina, en 75 segundos, empleando un horno microondas.
 - b) Emplear la técnica de Voltamperometría de Redisolución Adsorbtiva de Onda Cuadrada, con un electrodo de carbono vítreo activado electroquímicamente.

En todos los casos se logró optimizar las variables experimentales a través del diseño experimental. Asimismo, los resultados obtenidos fueron satisfactoriamente validados empleando ensayos de recuperación.

Los métodos desarrollados en esta Tesis Doctoral en Química contribuyen a evaluar la calidad de los productos apícolas, favoreciendo al desarrollo del sector productivo de la provincia de Buenos Aires.



Apéndice I

Productividad



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

PUBLICACIONES EN REVISTAS CIENTÍFICAS

- ✓ **Determination of cadmium residues in bee products using a 'lab-made' bismuth bulk electrode.** Gabriela Krepper, Paula B. Resende de Cerqueira, Marcelo F. Pistonesi, María S. Di Nezio, María E. Centurion. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 96 (2016) 1331-1340. DOI: [10.1080/03067319.2016.1250893](https://doi.org/10.1080/03067319.2016.1250893).
- ✓ **"In-situ" antimony film electrode for the determination of tetracycline residues in Argentinian honey samples.** Gabriela Krepper, Gastón D. Pierini, Marcelo F. Pistonesi, María S. Di Nezio. *Sensors & Actuators B* 241 (2017) 560-566. DOI: [10.1016/j.snb.2016.10.125](https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.10.125).
- ✓ **Determination of amitraz in Argentine honeys using Square Wave Voltammetry.** Gabriela Krepper, Marcelo F. Pistonesi, María S. Di Nezio. *En redacción*.
- ✓ **Determination of fat content in chicken hamburgers using NIR spectroscopy and the Successive Projections Algorithm for interval selection in PLS regression (iSPA-PLS).** Krepper, Gabriela; Romeo, Florencia; Fernandes, David Douglas de Sousa; Diniz, Paulo Henrique Gonçalves Dias; de Araújo, Mário César Ugulino; Di Nezio, María Susana; Pistonesi, Marcelo Fabián; Centurión, María Eugenia. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 189 (2018) 300-306. DOI: [10.1016/j.saa.2017.08.046](https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.08.046)
- ✓ **Quantification and identification of adulteration in the fat content of chicken hamburgers using digital images and chemometric tools.** David Douglas de Souza Fernandes, PhD; Florencia Romeo; Gabriela Krepper; María Susana Di Nezio, PhD; Marcelo Fabián Pistonesi, PhD; María Eugenia Centurión, PhD; Mário César Ugulino de Araújo, PhD; Diniz, Paulo Henrique Gonçalves Dias, PhD.

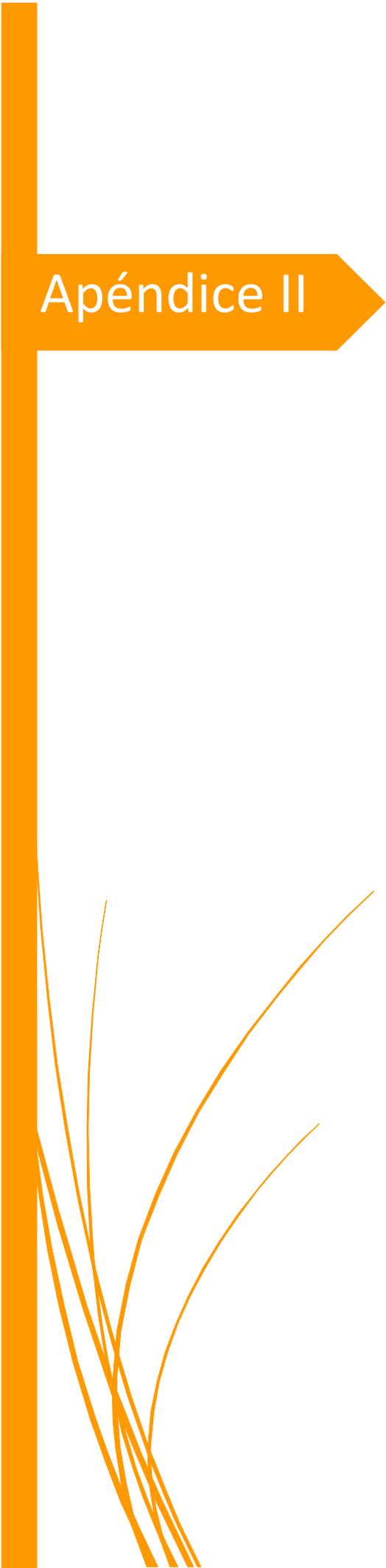
LWT - Food Science and Technology, artículo aceptado 13 de Octubre 2018. DOI: [10.1016/j.lwt.2018.10.034](https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.034)

PRESENTACIÓN EN REUNIONES CIENTÍFICAS

- ✓ **8vo. Congreso Argentino de Química Analítica. La Plata, 3 al 6 de noviembre de 2015.** “Sistema Flow-Batch para la determinación simultánea de fenoles, flavonoides y actividad antioxidante en extractos de propóleos comerciales empleando sonoquímica”. Gabriela Krepper, Fermín Fueyo, Federico Fuentes, Rodrigo Santos, María E. Centurión, María S. Di Nezio, Marcelo F. Pistonesi. Libro de resúmenes, pag. 134. ISBN 978-950-34-1279-4.
- ✓ **8vo. Congreso Argentino de Química Analítica. La Plata, 3 al 6 de noviembre de 2015.** “Sistema automático Flow-Batch para la determinación de tetraciclinas en productos apícolas empleando electrodos de film de antimonio”. Gabriela Krepper, Gastón D. Pierini, Marcelo F. Pistonesi, María S. Di Nezio. Libro de resúmenes, pag.184. ISBN 978-950-34-1279-4.
- ✓ **31° Congreso Argentino de Química. Bs As, 25 al 28 de octubre 2016.** “Determinación de cadmio en polen y propóleos argentinos empleando un electrodo de bismuto sólido fabricado en el laboratorio”. Gabriela Krepper, Paula B. Resende de Cerqueira, Marcelo F. Pistonesi, María S. Di Nezio, María E. Centurión. The Journal of The Argentine Chemical Society 103 (1-2) 2016, 01-022. ISSN: 1852 -1207.
- ✓ **VIII Workshop de Quimiometria. Salvador, Brasil, 24 al 27 de Abril de 2017.** “Determinacao do teor de gordura em hambúrguer de frango usando espectroscopia NIR e o Algoritmo das Projecoies Sucessivas para selecao de intervalos em regressao PLS (iSPA-PLS)”. Gabriela Krepper, Florencia Romeo, David Douglas de Sousa Fernandes, María Susana Di Nezio, Marcelo Fabián Pistonesi, Paulo Henrique Goncalves Dias Diniz, Mario Cesar Ugulino de Araujo, María Eugenia Centurión.
- ✓ **XVII Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados. San Carlos de Bariloche, 22 al 24 de Mayo 2017.** “Síntesis y caracterización de nanopartículas de Ag-Au empleando un sistema automático Flow-Batch e

imágenes digitales”. Krepper G., Springer V., Fernandes D. D. S., Araújo M.C.U., Centurión M.E., Pistonesi M.F., Di Nezio M.S.

- ✓ **IV Congreso Internacional Científico y Tecnológico de la Provincia de Buenos Aires. Universidad Nacional de Quilmes, 1 de septiembre de 2017.** “Caracterización fisico-química de propóleos argentinos para su uso como biofungicida agrícola”. Irene L. Cibanal, Gabriela Krepper, Leticia A. Fernández, Liliana M. Gallez. <https://digital.cic.gba.gob.ar/handle/11746/6778>
- ✓ **21st International Congress of Nutrition. Buenos Aires, 15 al 20 de Octubre 2017.** “Propolis ethanolic extract as natural bee pollen load preservative”. Soledad García Paoloni, Gabriela Krepper, Irene L. Cibanal, Leticia A. Fernández, María E. Centurión, María S. Di Nezio, Marcelo F. Pistonesi.
- ✓ **9° Congreso Argentino de Química Analítica. Río Cuarto, 7 al 10 de noviembre de 2017.** “Determinación de amitraz en mieles de abeja empleando voltamperometría de onda cuadrada”. Gabriela Krepper, Marcelo F. Pistonesi, María S. Di Nezio. Libro de resúmenes / M. E. Lorenzo ... [et al.] ; compilado por Héctor Fernández ; María Alicia Zon. - 1a ed. - Río Cuarto: UniRío Editora, 2017, pag. 156 . ISBN 978-987-688-238-5.
- ✓ **VII International Conference on Composite Materials. Bahía Blanca, 25 al 27 de Abril 2018.** “Desarrollo de un prototipo automático capturador de imágenes digitales para el estudio de la cinética de síntesis de nanopartículas bimetálicas”. G. Krepper, V. Springer, E. Binsak, R. M. Santos, M. S. Di Nezio, M. F. Pistonesi.
- ✓ **VI Jornadas Bahienses de Seguridad Alimentaria y Taller de Botulismo. Bahía Blanca, 6 al 8 de Setiembre de 2018.** “Nuevas tendencias para el control de calidad de productos apícolas”, Krepper Gabriela.

A thick orange vertical bar runs down the left side of the page. A horizontal orange arrow points to the right from the top of this bar, containing the text 'Apéndice II'.

Apéndice II

Becas obtenidas

BECAS OBTENIDAS

- ✓ **Beca Interna de Iniciación a la Investigación para graduados UNS.** Tema: "Nuevas metodologías de tratamiento de muestra para la determinación de metales en productos apícolas de la región de Bahía Blanca" | Julio 2013 – Marzo 2014. Directora: María Susana Di Nezio

- ✓ **Beca interna de posgrado Tipo I (5 años) CONICET.** Tema: "Desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación de contaminantes en productos apícolas empleando técnicas electroquímicas y análisis multivariado" | Abril 2014 – Marzo 2019: María Susana Di Nezio

- ✓ **Estancia de investigación doctoral externa en el Laboratorio de Automatización e Instrumentación en Química Analítica/Quimiometría-LAQA, Departamento de Química de la Universidad Federal de Paraíba, Brasil.** Enmarcada dentro del programa de cooperación bilateral- Nivel II, CONICET-CNPq. Título del proyecto: "Desarrollo de nuevos métodos analíticos para la determinación de insecticidas, antibióticos y metales en productos apícolas de Argentina y Brasil". Directores: Dr. Julio C. Podestá, INQUISUR (UNS-CONICET), Argentina, y Prof. Dr. Mario Ugulino de Araújo, UFPB, Brasil. Duración: del 17 de Noviembre de 2016 hasta el 12 de Enero de 2017.