

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Licenciatura en Ciencias Químicas**

**PERFILADO MULTIELEMENTAL DE VINOS
ARGENTINOS MEDIANTE FLUORESCENCIA DE RAYOS
X POR REFLEXIÓN TOTAL**

Autor: Luciano Sebastián Mauri (1401-2496)

Directora: Dra. Paola Babay

Codirectora: Lic. Florencia González

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fluorescencia de Rayos X,
Centro Atómico Constituyentes, Comisión Nacional de Energía
Atómica (CNEA)

Buenos Aires, 2023

Resumen

El vino resulta ser una de las bebidas más importantes del país tanto cultural como económicamente, por lo que la presencia de metales en estas bebidas resulta ser fundamental para el control de calidad, dado que algunas de las especies pueden generar efectos adversos en el organismo en pequeñas cantidades, afectar a las propiedades organolépticas del vino o bien pueden ser indicadores de genuinidad de los mismos. En este trabajo se llevó a cabo la validación de un método analítico multielemental por Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total para la cuantificación de metales en vino. Además, se realizó el análisis de los métodos de pretratamiento de deposición directa, dilución 1:10, digestión in situ y digestión asistida con horno microondas, con la finalidad de determinar aquel método que mejor se adecúe según sus cifras de mérito. El método de pretratamiento elegido en base a los requerimientos analíticos y estadísticos, fue el de deposición directa, donde solo se lleva a cabo la adición del estándar interno, dado que al analizarse las lecturas de concentración del vino de referencia, se encontró que no se presentaban discrepancias significativas entre los niveles cuantificados de los elementos en comparación a los demás métodos analizados. En cuanto a relación señal analítica/fondo, se evidencia que en el método de deposición directa, la proporción de cuentas por segundo provenientes de la muestra es mayor a las cuentas de *background* al compararse con los otros métodos de pretratamiento, resultando en una mejor relación señal/ruido. La reproducibilidad de las mediciones, al depositarse de manera directa la muestra, es aceptable para todos los elementos de interés listados en esta investigación. Al compararse los límites de detección y cuantificación, se observa que el método de digestión por horno microondas posee límites apenas menores que los observados en deposición directa, siendo el primero el método que posee los límites más bajos para su detección. Los ensayos de recuperación arrojaron resultados satisfactorios según el criterio de la AOAC. Si bien el análisis del sesgo de la técnica al compararse con un método de referencia como ICP-MS, indicó que existe un ligero sesgo entre ambos métodos analíticos, cabe mencionar que solo se estimaron los coeficientes de variación de las mediciones y no las incertidumbres de cada método utilizado en el proceso analítico, además de que el sesgo entre las técnicas no supera el 12,4%. Para el análisis de los vinos de distintas regiones se utilizó el método de deposición directa, donde se detectó que todas las muestras cumplían con los requerimientos de niveles máximos de metales estipulados tanto por los organismos internacionales como nacionales. También se pudo realizar distinciones entre las concentraciones de algunos elementos según la región. En síntesis, el análisis multielemental por TXRF no solo resultó ser reproducible, preciso y aplicable a la cuantificación a niveles sub traza para los elementos de interés de esta investigación, sino que, al utilizarse el método de pretratamiento de deposición directa, se disminuyen los tiempos de análisis y se evita el empleo de instrumentos costosos y reactivos

de muy alta pureza, además de simplificar el procedimiento y reducir las fuentes de error humano y fuentes de incertidumbre inherentes del método.

Palabras clave: TXRF, Vinos argentinos, Perfilado multielemental, Cuantificación, Métodos de pretratamiento.

Abstract

Wine is one of the most important beverages of the country both economically and culturally speaking, which is why the presence of metals in the drink happens to be of paramount importance for the quality control, due to the fact that some species in small quantities can provoke adverse effects on the organism, modify some desired organoleptic properties of the wine and in some cases, these elements can be used as indicators of authenticity. In this research, the validation of a multi-elemental method of analysis for wines was conducted by Total Reflection X-ray Fluorescence. Furthermore, the direct deposition, 1:10 dilution, In Situ digestion and microwave-assisted digestion pretreatment methods were analyzed in order to establish which technique fits with the established the figures of merit for this inquiry. The direct deposition method was the pretreatment technique chosen, due to the fact that it met the established analytical and statistical criteria for this research. In terms of analytical signal-to-noise ratio, it was found that using the direct deposition technique, resulted in a higher proportion of counts per second to background counts. The reproducibility of the measures happened to be satisfactory for all the elements of interest listed in this research while using the direct deposition method. After comparing the limits of quantification and detection, it was observed that the microwave-assisted digestion method had somewhat lower limits than the ones estimated for the direct deposition technique, being the former one that had the lowest detection limits of all four investigated techniques. The recovery experiments carried in this research delivered results that were satisfactory according to the AOAC criteria. After performing the bias analysis, which was conducted with a reference method, in this case, through ICP-MS, it was found that there was a slight bias in the concentration lectures between both instrumental methods of analysis. It is important to remind that only the variation coefficients were taken into account, and not the uncertainties of each method throughout the entirety of the analytical process, however, the bias between both techniques does not exceeds 12.4%. For the analysis of wine samples from several regions of Argentina, the pretreatment method of direct deposition was the one used for measurements, all of which comply with the required levels of metals in the beverage, according to both national and international wine regulations. It was also possible to create links between wines from the same region by comparing the concentrations of some elements in the beverage. In summary, the elemental analysis of wines by TXRF not only happened to be reproducible, precise and quantifiable for elements of interest in sub-trace levels, it also reduces the time of analysis, sample preparation, cost of ultra-pure reactants and expensive instruments. Moreover, the treatment of the samples is simplified from an operation standpoint, reducing the sources of human error and uncertainty from the sample treatment process.

Key words: TXRF, Argentinian wines, Multi-elemental Profile, Quantification, Methods of Pretreatment.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Paola Babay y a la Lic. Florencia González por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, en el cual me transmitieron su pasión por la ciencia con su guía, conocimientos, tiempo y paciencia.

A la Comisión Nacional de Energía Atómica, por proveer el espacio y recursos para poder llevar a cabo este trabajo.

A mi familia, por todo el apoyo y amor que me han dado durante la carrera.

Índice

1.	Introducción	3
1.1.	Antecedentes.....	4
1.2.	Marco teórico.....	5
1.2.1.	Fluorescencia de Rayos X	5
1.2.2.	Fluorescencia de Rayos X por Reflexión total	5
1.2.3.	Métodos de pretratamiento.....	7
1.2.4.	Métodos de referencia.....	8
1.2.5.	Análisis multielemental de vinos.....	9
1.2.6.	Relevancia del problema.....	11
2.	Objetivos	13
2.1.	Objetivo general	14
2.2.	Objetivos específicos.....	14
3.	Materiales y métodos	15
3.1.	Materiales.....	16
3.1.1.	Equipos.....	16
3.1.2.	Reactivos	16
3.1.3.	Elementos de laboratorio	16
3.1.4.	Muestras analizadas	16
3.2.	Métodos.....	18
3.2.1.	Métodos de pretratamiento.....	18
3.2.2.	Ensayos	19
3.2.3.	Cifras de mérito y ecuaciones utilizadas.....	21
3.2.4.	Procesamiento de datos.....	24
4.	Resultados	25
4.1.	Métodos de pretratamiento.....	26
4.1.1.	Concentración.....	26
4.1.2.	Cuentas netas.....	28
4.1.3.	Background o fondo espectral.....	30

4.1.4.	Reproducibilidad	31
4.1.5.	Límites de detección (LOD).....	37
4.1.6.	Límite de cuantificación (LOQ)	39
4.1.7.	Recuperación.....	40
4.2.	Sesgo	49
4.3.	Pros y contras de cada método	56
4.4.	Análisis de vinos argentinos	60
4.4.1.	Cobre	60
4.4.2.	Hierro	61
4.4.3.	Manganeso	62
4.4.4.	Níquel	63
4.4.5.	Zinc	63
4.4.6.	Arsénico	64
4.4.7.	Cromo	64
4.4.8.	Plomo.....	64
4.4.9.	Fósforo.....	65
4.4.10.	Calcio	65
4.4.11.	Potasio	66
4.4.12.	Rubidio	67
4.4.13.	Estroncio	68
4.4.14.	Bromo.....	69
4.4.15.	Azufre.....	69
5.	Discusión	71
5.1.	Consideraciones finales y Prospectos futuros.....	72
6.	Conclusiones.....	73
7.	Bibliografía	76

1. Introducción

1.1. Antecedentes

La autenticidad y origen de productos alimenticios son campos de gran interés en la industria alimenticia. El vino es un producto consumido alrededor del mundo y ha sido investigado de manera exhaustiva. Su análisis multielemental es fundamental en su control y la concentración de diversos elementos puede presentar variaciones de acuerdo a su origen.

En un estudio realizado por Di Paola-Naranjo et al. se encuentra que existe una mayor concentración de litio en vinos de la provincia de San Juan y menor en muestras procedentes de Córdoba; con respecto al manganeso, los valores de concentración más altos pertenecen a la región de Córdoba, mientras que en el caso del cobre, se nota una proporción más alta en la región de Mendoza. (Di Paola-Naranjo, Baroni, Podio, Rubinstein, Fabani, Badini, Inga, Osters, Cagnoni, Gallegos, Gautier, Peral-García, Hoogewerff, Wunderlin, 2011)

El trabajo expuesto por Dalipi et al., ilustra sobre algunas características instrumentales y analíticas de la técnica de Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF), tales como el rango de concentración de algunos elementos en vino que opera el instrumento, el tiempo de medición empleado y algunos métodos de optimización para mejorar la cuantificación de los elementos. Además, se comparó la medición de vinos tintos y blancos por TXRF con Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-OES), esta última siendo una técnica analítica con una sensibilidad en términos de cuantificación similar a la observada por TXRF, en donde se encontró una buena concordancia entre los elementos medidos, excepto en los de bajo peso atómico como K (Dalipi, Marguá, Borgese, Bilo, Depero, 2016).

Tariba expone en su review sobre el impacto de los metales en vinos y cómo estos afectan a la calidad del mismo y a la salud de los consumidores, además de detallar el rol de estas especies como catalizadores para reacciones químicas, su toxicidad, su origen y los métodos de análisis utilizados para la determinación multielemental. También se agrupan los distintos elementos mencionados según sus propiedades de mayor incidencia en estas bebidas, tales como modificadores de propiedades organolépticas y su toxicidad (Tariba, 2011).

1.2. Marco teórico

1.2.1. Fluorescencia de Rayos X

La Fluorescencia de Rayos X (FRX) es un método de análisis espectroscópico que se basa en la irradiación de muestras con haces de rayos X que excitan los átomos presentes en dicha matriz, estos átomos luego emiten radiación en forma de rayos X que son captadas por un detector y transcritas en forma de espectro. En la Figura 1 se muestra un esquema de emisión de FRX. La energía de los haces emitidos es característica de los elementos presentes, a esto se lo denominan líneas o picos espectrales y en conjunto con la cantidad de fotones recibidos por el detector, nos provee la información sobre los elementos presentes en forma cualitativa y cuantitativa (Klockenkamper, von Bohlen, 2015).

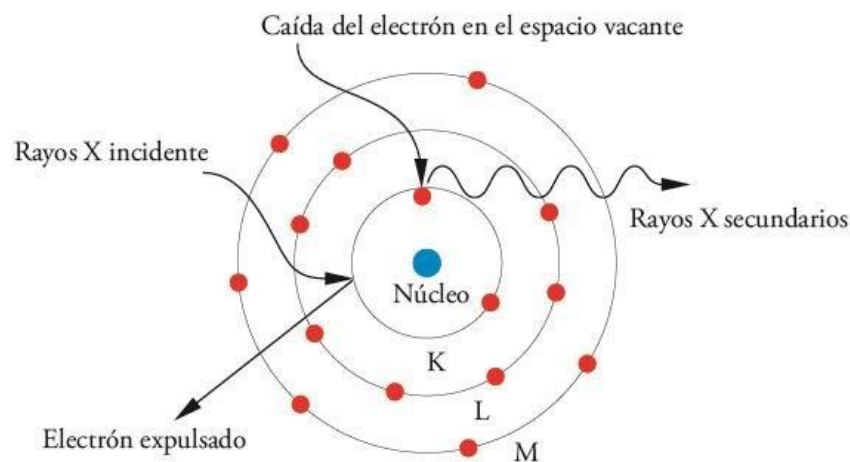


Figura 1. Esquema de emisión de fotones en FRX (Padilla-Cuevas, Yee-Madeira, Merino-García, Hidalgo, Etchevers, 2020).

Teniendo en cuenta los fundamentos del funcionamiento de la técnica es necesario entender que este tipo de análisis espectroscópico de fluorescencia posee distintas variantes según las características instrumentales empleadas, algunas de estas son Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de Energía (EDXRF), Espectroscopia de Rayos X por Dispersión de longitud de onda (WDXRF) y TXRF (Potts, Webb, 1992).

1.2.2. Fluorescencia de Rayos X por Reflexión total

Esta técnica espectroscópica multielemental deriva de la antes mencionada Fluorescencia de Rayos X por Dispersión de Energía. A diferencia de EDXRF, en este método analítico se aplica el fenómeno óptico conocido como reflexión total, ilustrado en la Figura 2, donde se irradia la muestra sobre un portamuestras a un ángulo tal que el haz de rayos X no penetra

prácticamente en el medio del reflector, formando una interfase que se comporta como un espejo ideal y reflejando el haz incidente al primer medio, que en este caso, sería el aire. Consecuentemente, se forma un campo de ondas estacionarias de rayos X que genera una interferencia constructiva, aumentando la intensidad de la excitación, dado que los átomos presentes en la muestra se ven excitados tanto por el haz incidente como por el haz reflejado (Fernandez-Ruiz, 2010).

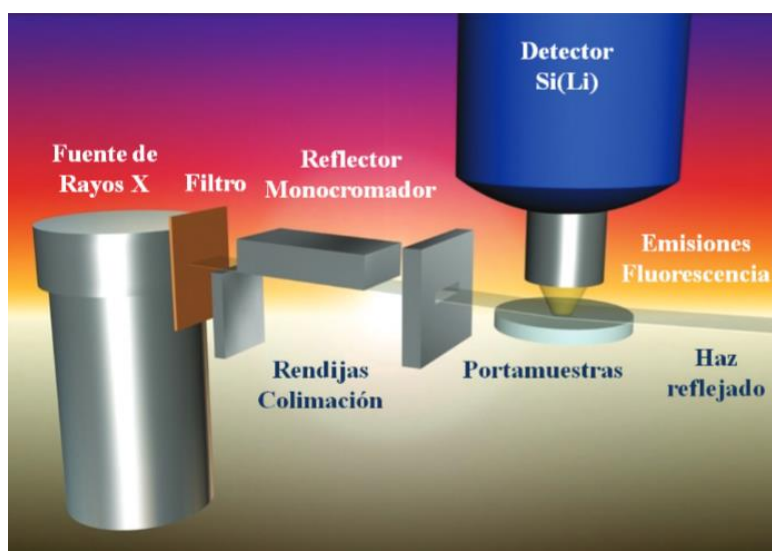


Figura 2. Esquema básico del funcionamiento de un Espectrómetro de TXRF (Fernandez-Ruiz, 2010).

Al ser una técnica micro analítica, se analizan pequeñas cantidades de muestra (0,1-100 μg), depositándose una capa delgada con un grosor de 0,1-10 μm sobre un reflector. Tales propiedades permiten disminuir los efectos de absorción y excitación secundaria, dando la posibilidad de aplicar el modelo de lámina infinitamente delgada y despreciar el efecto matriz.

A diferencia de otras técnicas tales como EDXRF, en TXRF la muestra debe analizarse en forma líquida o en suspensión en forma de films delgados, los sólidos deben disolverse o digerirse antes de llevar a cabo la deposición de la muestra. En comparación a EDXRF y WDXRF, TXRF requiere menores cantidades de muestra en el reflector, llegando a detectarse para algunos elementos masas en el rango de los picogramos (Fernandez-Ruiz, 2010). En cuanto a los reflectores, podemos encontrarlos en varios materiales, tales como cuarzo, carbono vítreo, zafiro y vidrio de acrílico (Bruker, 2011).

Si bien el primer espectrómetro de FRX comercial fue desarrollado en 1981, la técnica de TXRF no se consolidó hasta 1986 y desde entonces, la cantidad de publicaciones ha crecido de manera exponencial, al igual que sus aplicaciones (Yang, Fan, Zhou, 2020).

Es ampliamente utilizada en el campo medioambiental, principalmente en el estudio de la contaminación, especialmente en aguas, donde existe una mínima necesidad de pretratamiento de muestras y una sensibilidad que ronda las partes por billón, como se ha visto en el caso de aguas potables (Prange, Knoth, Strossel, Bodeker, Kramer, 1987), aguas de ríos (Strossel, Prange, 1985), aguas de lluvia (Prange, Bodeker, Kramer, 1993), aguas de mar y lodos contaminados (Prange, Knochel, Michaelis, 1985).

Dentro del campo medioambiental, se puede incluir el monitoreo de suelos en zonas que puedan presentar contaminación al estar próximas a minas (Alsecz, Osan, Kurunczi, Alfoeldy, Varhegyi, Toeroek, 2007) o de bioindicadores de contaminación como especies arbóreas (Sirito de Vives, Moreira, Brienza, Medeiros, Tomazello Filho, Zucchi, do Nascimento Filho, Barroso, 2007).

En el campo biomédico, resulta ser muy útil también, dado que es posible analizar los elementos a niveles traza que puedan afectar a los sistemas biológicos. Algunas de las matrices para las cuales se han desarrollado metodologías por TXRF son orina (Zarkadas, Karydas, Paradellis, 2001), sangre (Matsuoka, Hosokawa, Hino, Tsuji, Sugimoto, 2005) y fluidos amnióticos (Carvalho, Custodio, Reus, Prange, 2001), además de haberse desarrollado un método para el análisis de tejidos ligados al Alzheimer (Marco, Greaves, Alvarado, 1999) y el cáncer (Carvalho, Magalhaes, Becker, von Bohlen, 2007).

Esta técnica predomina principalmente en el campo industrial, donde se utiliza en microelectrónica (Hellin, De Gendt, Rip, Vinckier, 2005), análisis de procesos catalíticos (Fernandez-Ruiz, Larese, Cabello Galisteo, Lopez Granados, Mariscal, Fierro, 2006) y síntesis de nuevos materiales (Fernandez-Ruiz, Bermudez, 2005), entre otros. Se ha utilizado en arqueología (Von Bohlen, 2004) y en análisis de pinturas y tintas en manuscritos con la finalidad de identificar falsificaciones o metodologías de uso de las mismas según los autores (Klockenkamper, Von Bohlen, Moens, 2000).

En la industria vitivinícola ha ganado bastante terreno también, donde se emplea para el análisis de metales contaminantes en vinos (Carvalho, Barreiros, Costa, Ramos, 1996). Particularmente, en esta investigación se pondrá el foco sobre dicha industria, donde se buscará ampliar y profundizar sobre las aplicaciones de la técnica en este campo.

1.2.3. Métodos de pretratamiento

En algunos trabajos se han descrito métodos de pretratamiento de muestra para el análisis por TXRF, donde también se comparan las ventajas y desventajas de cada tipo de preparación. De esta manera, se exhibe la versatilidad del método para ajustarse al tipo de muestra, ya que se

permite analizar en pequeñas cantidades de manera rápida con bajos efectos de matriz. En gran cantidad de casos, no es necesario un pretratamiento, ya que dependiendo de la naturaleza de la muestra, se puede analizar de manera directa. Las estrategias de preconcentración son necesarias para lidiar con casos donde la concentración de un elemento resulta ser demasiado baja o resulta contar con una matriz que presente demasiadas interferencias (De La Calle, Cabaleiro, Romero, Lavilla, Bendicho, 2013).

1.2.4. Métodos de referencia

Los métodos de referencia son métodos analíticos con una precisión conocida que nos permiten contrastar la incertidumbre de las mediciones realizadas durante la validación de un tipo de análisis con respecto a las mediciones de referencia, en nuestro caso, mediante Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) (Miller, Miller, 2014).

ICP-MS es una técnica analítica que puede llevar a cabo el análisis elemental a niveles traza y sub traza. Resulta ser particularmente útil ya que permite realizar determinaciones multielementales de manera simultánea a niveles de detección muy bajos en poco tiempo y en un solo análisis, además de necesitar poco volumen de muestra y ofrecer muy buena resolución espectral.

El funcionamiento de este equipo queda ilustrado en la Figura 3, donde se requiere que las muestras sean digeridas o se encuentren diluidas para luego ser nebulizadas, creando un aerosol que posteriormente es tratado con plasma de argón, atomizando e ionizando la muestra. Estos iones luego son extraídos en la región de interfase, pasando por un conjunto de lentes electrostáticos que redirigen el haz de iones a un cuadrupolo de masas, este último se encarga de separar los iones acorde a la relación masa-carga para luego ser contados con un detector multiplicador de electrones (S. Wilschefski, Baxter, 2019).

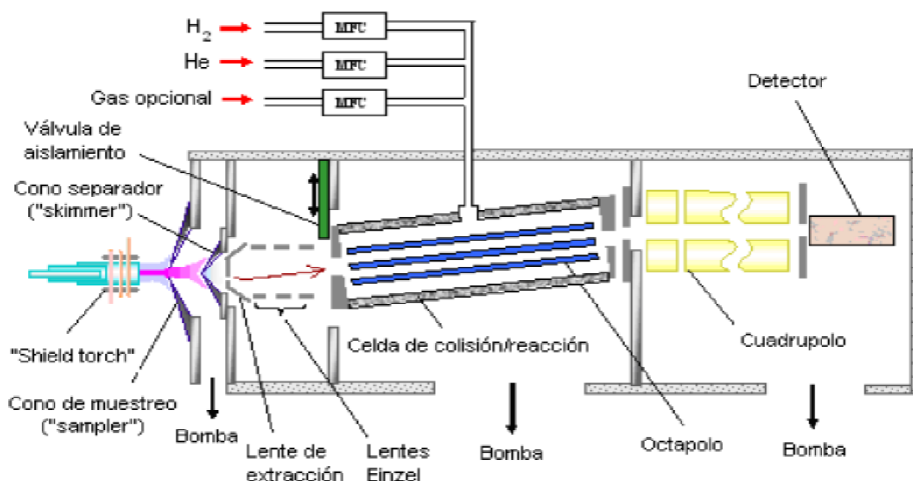


Figura 3. Esquema básico del funcionamiento de un Espectrómetro de Masa con Plasma Acoplado Inductivamente (Barreiro Grille, 2015).

La aplicabilidad de la técnica a distintas matrices, la alta sensibilidad y la disminución en los costos de adquisición y operación de los equipos en las últimas décadas, ha llevado a que dicho método de análisis se haya expandido en varios campos de trabajo. Los más predominantes resultan ser los análisis ambientales, biomédicos, geoquímicos, de semiconductores, nucleares, alimenticios, metalúrgicos y petroquímicos (Thomas, 2008).

En el caso del análisis de vinos mediante esta técnica, la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), que se encarga de regular la industria vitivinícola en el campo científico-técnico, llevó a cabo una validación de análisis multielemental de vinos mediante ICP-MS, por lo que la técnica puede utilizarse como método de referencia (OIV Resolución 344/2010, 2010).

1.2.5. Análisis multielemental de vinos

Si bien los vinos se encuentran compuestos principalmente de agua y materia orgánica en forma de azúcares y metabolitos derivados de la uva, poseen también una parte inorgánica que puede provenir de dos fuentes posibles: naturales y antropogénicas. La primera resulta estar relacionada a la composición del suelo de los viñedos, suministrando los iones a las uvas mediante la absorción en las raíces, siendo la fuente mayoritaria de las especies inorgánicas presentes en el producto final. En cambio, las fuentes antropogénicas de materia inorgánica provienen de factores tales como la contaminación proveniente de industrias aledañas, fertilizantes y pesticidas utilizados durante el proceso de producción agrícola, además de aplicación de aditivos, utilización de maquinaria y otros elementos relacionados al método de cosecha de la materia prima (Pessanha, Carvalho, Becker, von Bohlen, 2010).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, es importante entender el rol de las especies inorgánicas en vinos. Algunos elementos pueden modificar las propiedades organolépticas de la bebida mediante reacciones químicas entre estas especies y ciertos compuestos orgánicos en el vino; por otro lado, existen elementos que poseen una elevada toxicidad a bajas concentraciones, por lo que su análisis elemental es crítico para el control de calidad y las posibles implicancias en la salud. Por último, ciertos metales pueden ser indicadores de genuinidad o de origen geográfico según la concentración de los mismos (Tariba, 2011).

El análisis multielemental de vinos puede ser llevado a cabo mediante diferentes técnicas instrumentales, tales como Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES) (Lara, Cerutti, Salonia, Olsina, Martínez, 2005), ICP-MS (Di Paola-Naranjo, Baroni, Podio, Rubinstein, Fabani, Badini, Inga, Ostera, Cagnoni, Gallegos, Gautier, Peral-García, Hoogerwerf, Wunderlin, 2011), Espectroscopia de Emisión Atómica con Atomización Electrotérmica (ETAAS) (Lara, Cerutti, et al., 2005), TXRF (Dalipi et al. 2016) y EDXRF (Pessanha, Carvalho, et al. 2010), entre otros. Estos son algunos métodos de análisis que pueden identificar y cuantificar gran cantidad de elementos a niveles traza.

La OIV es el organismo que se encarga de los aspectos técnico-científicos de la viticultura y la vinificación. En este caso, estipula los valores máximos aceptables de algunos elementos en vinos. Las concentraciones máximas establecidas pueden variar según la legislación del país de procedencia del vino, sin embargo, las establecidas en Argentina por el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) resultan seguir los mismos valores establecidos por la OIV, excepto en el caso de Pb, donde el instituto argentino indica que el máximo aceptable es 0.1 mg/L (INV, 2021).

En las Tablas 1 y 2 se listan los valores guía para los elementos de interés en esta investigación, aunque aquellos cuyos valores de concentración no se encuentran listados en sus respectivas normativas son indicados como "-" (no disponible).

Elemento	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	As	Pb	Cr	P	Ca	K	Br
Concentración (mg/L)	1	-	-	-	5	0,2	0,15	-	-	-	-	1

Tabla 1. Límites máximos aceptados de elementos en vino por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2021).

Elemento	Cu	Fe	Mn	Ni	Zn	As	Pb	Cr	P	Ca	K	Br
Concentración (mg/L)	1	-	-	-	5	0,2	0,1	-	-	-	-	1

Tabla 2. Límites máximos aceptados de elementos en vino por el Instituto Nacional de Vitivinicultura Argentina (INV, 2021).

1.2.6. Relevancia del problema

Esta investigación se basó en el análisis de elementos que resultan de fundamental importancia en la determinación de especies presentes en vinos, ya que bien pueden modificar las propiedades organolépticas de la bebida, poseer niveles de toxicidad elevados o servir de parámetros para la caracterización de suelos según su región, además de ser indicadores de autenticidad.

Acorde al estudio realizado por Tariba en 2011, los metales que pueden modificar las propiedades organolépticas son Al, Cu, Fe, Mn, Zn y Ni. Estos metales tienden a participar en los procesos de añejamiento del vino mediante la promoción de levaduras en el mosto y el desarrollo de reacciones de óxido-reducción durante la etapa de maduración. Algunos elementos como Al, Cu, Fe, Zn y Ni forman complejos con las antocianinas y taninos, otorgando una apariencia turbia y modificando el color del vino. Ocurre algo similar en el caso del Mn, Cu y Fe, donde forman complejos estables con aminoácidos y polifenoles. Estos procesos se dan durante la etapa de maduración del vino, infiriendo sobre el aroma, sabor y color de la bebida.

Según Tariba (2011), dentro de la categoría de metales pesados se encuentran As, Cd, Pb y Cr. Los primeros 3 elementos mencionados no poseen valor nutricional alguno. Si bien el Cr posee un rol en el organismo como oligoelemento en procesos metabólicos de lípidos y azúcares, también cuenta con niveles de toxicidad similares a los elementos listados bajo esta categoría. Tanto As como Cd poseen la particularidad de estar ampliamente presentes en los suelos y acumularse en el organismo humano durante largos períodos de tiempo. Aunque el consumo de vino durante períodos prolongados no produce intoxicación crónica, es recomendable mantener las concentraciones de estos metales tan bajas como sean posibles para evitar una ingesta excesiva de estos elementos.

Entre los elementos que pueden ser indicadores de las características del suelo donde se localizan los viñedos se encuentran P, Mg, Si, Ca y K. Esto puede resultar importante en el análisis a la hora de distinguir y caracterizar vinos según su región de origen, siendo que los suelos no suelen ser químicamente uniformes a lo largo de un determinado territorio. En algunos casos, pueden funcionar como parámetros de autenticidad (Tariba, 2011).

Teniendo en cuenta los 15 elementos mencionados, es necesario señalar que las lecturas de Al, Cd, Mg y Si por TXRF resultan ser problemáticas para su cuantificación, por lo que no serán analizados en este estudio. Por ende, los 11 elementos considerados en este trabajo fueron los siguientes, agrupados según las distintas propiedades mencionadas a continuación:

Modificadores de propiedades organolépticas.

- Cobre
- Hierro
- Manganeso
- Níquel
- Zinc

De elevada toxicidad.

- Arsénico
- Plomo
- Cromo

Indicadores de origen geográfico.

- Fósforo
- Calcio
- Potasio

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Obtener un método de análisis para elementos relevantes en vinos argentinos por Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar si existen diferencias significativas en los resultados del análisis elemental al pre-tratar las muestras de vino mediante disgregación asistida con horno de microondas, deposición directa, dilución y digestión in situ, con la finalidad de elegir aquel método que se adecúe mejor a los criterios analíticos deseados.
- Comparar la practicidad de los métodos de pretratamiento en base a los costos de los reactivos, tiempo de realización, interferencias generadas, manejo de los instrumentos y reactivos, entre otros factores.
- Analizar y crear comparaciones entre los resultados de las cifras de mérito obtenidas de las mediciones.
- Determinar la aplicabilidad de la técnica utilizada para el análisis de los elementos listados en vinos argentinos.
- Estimar el sesgo de las mediciones por Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total al compararse con un método de análisis de referencia, en este caso, por Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente.
- Verificar si la técnica elegida puede medir de manera fidedigna los elementos listados por los organismos internacionales que regulen la calidad de la bebida por debajo de las concentraciones máximas estipuladas por esta.
- Analizar los perfiles elementales de vinos de un mismo varietal y de diferentes viñedos o zonas geográficas.

3. Materiales y métodos

3.1. Materiales

3.1.1. Equipos

- Espectrómetro TXRF S2 PICOFOX (Posee fuente de metal cerámico con ánodo de Mo, monocromador multicapa liso y detector de deriva de silicio (SSD)), Bruker Corporation.
- Horno Microondas Ethos UP MA-182, Milestone SRL.
- ICP-MS NexION-300X (Posee Cámara de nebulización ciclónica de cuarzo refrigerada y nebulizador de cuarzo Meinhard), PerkinElmer Incorporated.
- Autosampler ASX-520, Cetac Industries.
- Agitador Vortex, VELP Científica.
- Pipetas Automáticas Sartorius: 10-100 μL ; 2-20 μL ; 100-1000 μL .

3.1.2. Reactivos

- Agua Nanopure (obtenida con equipo Arium Comfort, Sartorius).
- Solución 30% v/v peróxido de hidrógeno, Emsure, Merck.
- Ácido nítrico sub-boiling.
- Solución patrón Galio 1000 mg/L Merck.
- Soluciones patrón de 1000 mg/L (Chemlab) de los siguientes elementos: Arsénico; Plomo; Cromo; Cadmio; Cobre; Manganeso; Níquel; Rubidio; Zinc; Estroncio.

3.1.3. Elementos de laboratorio

- Tubos de centrifuga 1,5 mL, Eppendorf
- Tips para pipeta automática 200 y 1000 μL , Eppendorf E.P. Tips
- Tubos tipo Falcon 15 mL, Citotest
- Reflectores portamuestras de cuarzo pulido, Bruker Nano Analytics
- Matraces aforados clase A de 10 mL, Glassco

3.1.4. Muestras analizadas

- Pont L'Évêque Malbec 2019 (Bodega Estrella de Los Andes, Luján de Cuyo, Mendoza).
- Emilia Malbec 2021 (Bodega Nieto Senetiner, Luján de Cuyo, Mendoza).
- Altos del Plata Malbec 2021 (Bodega Terrazas de los Andes, Luján de Cuyo, Mendoza).

- Nicasia Blend (90% Malbec, 4% Cabernet Sauvignon, 6% Petit Verdot) 2019 (Bodega Catena Zapata, Luján de Cuyo, Mendoza).
- Familia Gascón Malbec 2021 (Bodega Escorihuela Gascón, Luján de Cuyo, Mendoza).
- Szymanowsky Malbec 2019 (Bodega Szymanowsky, Luján de Cuyo, Mendoza).
- Dolores Malbec 2020 (Bodega Navarro Correas, Luján de Cuyo, Mendoza).
- Portillo Malbec 2021 (Bodega Salentein, Valle de Uco, Mendoza).
- Animal Malbec 2020 (Bodega Ernesto Catena, Valle de Uco, Mendoza).
- Cafayate Malbec 2021 (Bodega Etchart, Cafayate, Salta).
- Alma Mora Malbec 2020 (Finca Las Moras, Valle de Pedernal, San Juan).
- Puna Malbec 2020 (Bodega Puna, Cachi, Salta).
- Fin del Mundo Malbec 2020 (Bodega del Fin del Mundo, San Patricio del Chañar, Neuquén).
- Callia Malbec 2021 (Bodega Callia, Caucete, San Juan).
- Marcus Malbec 2021 (Bodega Humberto Canale, General Roca, Rio Negro).

3.2. Métodos

3.2.1. Métodos de pretratamiento

Para llevar a cabo la selección del método, se usó como muestra de referencia el vino ALMA MORA Malbec, vendimia 2020 (Finca Las Moras, San Juan, Argentina). Esto consistió en el análisis del vino de referencia pretratado de 4 maneras distintas repitiéndose 10 veces cada una, siendo estas la deposición directa, dilución 1:10, digestión in situ y digestión en horno microondas. Este paso en la investigación fue importante para poder determinar el tipo de pretratamiento que presentará mayor precisión en las mediciones, menor fondo espectral y mejores límites de detección. Se llevó a cabo también el análisis por ICP-MS de esta muestra.

3.2.1.1. Método de deposición directa

El método de deposición directa consistió en la toma de una alícuota de 10 μL de solución patrón de Ga 100 mg/L, seguido de 1 mL de vino en un tubo Eppendorf. Posteriormente se la llevó a un agitador vortex durante unos 30 segundos. Se tomó 5 μL de solución, se los depositó sobre un reflector de Cuarzo pulido y se los llevó a sequedad bajo lámpara infrarroja. Las 10 réplicas se analizaron en el espectrómetro S2 PICOFOX durante 300 segundos cada una.

3.2.1.2. Método de dilución 1:10

La dilución se llevó a cabo mediante la adición de 900 μL de agua nanopure a 10 μL de solución patrón de Ga 100 mg/L y 100 μL de vino en un tubo Eppendorf. La solución fue homogeneizada con un agitador vortex durante 30 segundos, se tomó 5 μL de muestra y se la depositó sobre un reflector de cuarzo pulido, que fue llevada a sequedad bajo una lámpara infrarroja. Este proceso se repitió 10 veces y todas las réplicas fueron analizadas en el S2 PICOFOX durante 300 segundos.

3.2.1.3. Método de digestión in situ

En este caso, se tomaron 10 μL de solución patrón de Ga 100 mg/L, a la cual se añadió 1 mL de vino, llevados a un tubo eppendorf y luego homogeneizados en un agitador vortex. La deposición en este caso consistió en la aplicación de 5 μL de solución sobre un reflector de cuarzo en conjunto con 5 μL de una solución de $\text{HNO}_3+\text{H}_2\text{O}_2$ 3:1, que posteriormente se llevó a sequedad debajo de una lámpara infrarroja. Repetido este procedimiento 10 veces, se analizó en el espectrómetro S2 PICOFOX durante 300 segundos por cada réplica.

3.2.1.4. Método de digestión por horno microondas

La digestión por horno microondas consistió en preparar 9 réplicas de 1 mL de vino en conjunto con una mezcla ácida de 3 mL de HNO₃ Sub-Boiling y 1 mL de H₂O₂. Por separado se debió realizar un blanco de digestión. Las 10 réplicas fueron depositadas y correctamente cerradas en vasos de teflón y llevadas al horno microondas ETHOS UP 182 durante 2 horas. Posteriormente, se trasvasó y enrasó en un matraz de 10 mL. Luego se depositó el contenido en tubos Falcon de 15 mL.

Se extrajo 1 mL de cada una de las muestras y se llevó a un Eppendorf con 10 µL de solución patrón de Ga 100 mg/L. Se homogeneizó el contenido con un agitador vortex durante 30 segundos, para luego tomar 5 µL de solución que se depositó en reflectores cuarzo y secó debajo de una lámpara infrarroja. Una vez secas las muestras, se las analizó en el espectrómetro S2 PICOFOX durante 300 segundos cada una.

3.2.2. Ensayos

3.2.2.1. Recuperación

La exactitud de un método es comprobable mediante la realización de ensayos de recuperación. Estas pruebas se llevan a cabo mediante la adición de una cantidad conocida de analito a la muestra de vino a analizar, para luego verificar el porcentaje de los elementos añadidos medidos por el método, siendo esta técnica denominada comúnmente como fortificación o *spiking*. Los elementos que se utilizan en el *spiking*, son aquellos que se encuentran en concentraciones por debajo del límite de detección en las muestras utilizadas, dado que nos permite conocer el porcentaje de recuperación de las especies que comúnmente no se encuentran en cantidades cuantificables; de esta manera, además de calcular la recuperación se puede estimar el límite de detección para los mismos.

Los elementos elegidos para el análisis de recuperación fueron As, Cr y Pb. La razón de la elección de estas especies se encuentra ligada a la detección en bajas cantidades en la muestra de vino utilizada durante el análisis elemental inicial de los tres métodos de pre-tratamiento, la imposibilidad de detección en muchas de las réplicas y la subsecuente incapacidad de cuantificación. Si bien estos inconvenientes se repiten para otros elementos, la elección de estas tres especies se encuentra también relacionada a la elevada toxicidad de los mismos y la necesidad de estimar la exactitud teniendo en cuenta la importancia de estas especies en productos de consumo humano.

Cabe destacar que, si bien la exactitud y el porcentaje de recuperación se pueden calcular con estos ensayos, también se pueden estimar los límites de detección para As, Cr y Pb.

La preparación de las muestras consistió en depositar 50 µL de patrones 100 mg/L de As, Cr y Pb en un matraz de 10 mL que se llevó a completar con vino ALMA MORA, que luego fue trasvasado a un tubo Falcon, de esta manera se obtuvo una concentración de 0,5 mg/L de los 3 elementos. Esta operación se repitió para las concentraciones de 0,1 mg/L, aunque usando 10 µL de cada uno de los patrones. Para los análisis de recuperación y límites de detección se procedió a analizar la muestra fortificada mediante los métodos de deposición directa, dilución 1:10 y digestión in situ.

Es necesario mencionar que se realizó un análisis para As y Pb por separado, debido a que al ser interferentes espectrales entre ambos, se podrían encontrar lecturas de concentración erróneas.

3.2.2.2. Análisis de método de referencia por ICP-MS

3.2.2.2.1. Calibración

Con el fin de calibrar el instrumento, se prepararon soluciones con los distintos elementos a determinar, siendo estos Mn, Cu, Zn, Rb, Sr, Ni, Pb, As, Cr, Cd y se las analizó por ICP-MS, de esta manera se trazaron las rectas de calibración. La dilución de las soluciones patrón consistió en la adición de 50 µL de cada solución estándar de 1000 mg/L, seguido de 1500 µL de HNO₃ sub-boiling, y luego se lo llevó a un volumen de 50 mL con agua nanopure, con el fin de obtener la solución madre con una concentración de 1 mg/L de cada elemento añadido. Posteriormente se prepararon los patrones de calibración correspondientes para trazar la curva de calibración, los cuales se realizaron a las siguientes concentraciones: 1 µg/L, 2 µg/L, 5 µg/L y 10 µg/L. Para todos los elementos listados, se obtuvieron rectas con un R²>0,99, de esta manera, obteniendo una calibración satisfactoria.

3.2.2.2.2. Medición

Para la medición del vino de referencia se llevó a cabo la digestión por horno microondas de 9 réplicas y un blanco de reactivos, utilizando el vino de referencia como muestra, según lo visto en el inciso 3.2.1.4 'Digestión por horno de microondas'. Una vez obtenidas las 9 réplicas digeridas y el blanco de digestión, se llevó a cabo una dilución 1:10 de las mismas, las cuales se depositaron en tubos Falcon de 15 mL e insertaron en un autosampler CETAC ASX-520, que inyectó las soluciones en el espectrómetro NEXION-300X. Cada muestra se analizó por 2,5 minutos.

3.2.3. Cifras de mérito y ecuaciones utilizadas

3.2.3.1. Cálculo de recuperación

Podemos entender la recuperación como el porcentaje de analito medido posterior al *spiking* o adición de un elemento en una concentración conocida, como se puede ver en la ecuación 1:

$$R = \left(\frac{C_e - C_o}{C_a} \right)$$

Ecuación 1. Cálculo de recuperación de un analito (Miller, Miller, 2014).

Donde:

R : Cantidad de analito recuperado

C_e : Concentración muestra enriquecida

C_o : Concentración muestra sin adicionar

C_a : Concentración adicionada a la muestra enriquecida

Los valores de recuperación aceptables según la Association of Official Analytical Chemists (AOAC) para el rango de concentraciones de 100 mg/L a 100 µg/L, debería rondar entre 80% - 110%. (Association of Official Analytical Chemists, 1998).

3.2.3.2. Reproducibilidad

Podemos entender la reproducibilidad interna como la precisión de las mediciones donde los análisis se realizan con un mismo método con la misma muestra, pero con diferentes condiciones de operadores u equipos en el mismo laboratorio. En este caso, se tomaron 10 muestras independientes para evaluar la reproducibilidad del método. Se la evaluó mediante el método de coeficiente de variación de Horwitz, expresado en la ecuación 2:

$$CV_h = 2^{(1-0,5)\log C}$$

Ecuación 2. Cálculo de coeficiente de variación de Horwitz (Miller, Miller, 2014).

Donde:

CV_h %: Coeficiente de variación de Horwitz

C : Concentración del analito, expresado en potencia de 10

Para una serie de mediciones con un determinado método, se considera que el $CV_{RI}\%$ (o coeficiente de variación de las mediciones) debe ser menor a $2*CV_h\%/3$, para considerar la precisión del método como 'aceptable', como se indica en la ecuación 3:

$$CV_{RI}\% < \frac{2CV_h\%}{3}$$

Ecuación 3. Cálculo de aceptabilidad de la precisión de un método analítico (Miller, Miller, 2014).

3.2.3.3. Cálculo del límite de detección

El límite de detección en Fluorescencia de Rayos X de Reflexión Total, se puede calcular mediante parámetros instrumentales detectados durante la medición de las muestras en el S2 PICOFOX, expresado en la ecuación 4.

$$NWG_i = \frac{3C_i\sqrt{N_{BG}}}{N_i}$$

Ecuación 4. Cálculo del límite de detección de un analito (Bruker, 2011).

Donde:

NWG_i : Límite de detección del elemento i

C_i : Concentración del elemento i

N_i : Área del pico de fluorescencia en cuentas

N_{BG} : Área del fondo situado bajo el pico de fluorescencia

3.2.3.4. Cálculo del límite de cuantificación

El límite de cuantificación, como se puede apreciar en la ecuación 5, puede ser comprendido como el límite de detección de un determinado analito multiplicado por tres.

$$LOQ = NWG_i * 3$$

Ecuación 5. Cálculo del límite de cuantificación de un analito (Bruker, 2011).

Donde:

NWG_i : Límite de detección del analito

LOQ : Límite de cuantificación del analito

3.2.3.5. Cálculo del sesgo

El sesgo se define como la diferencia entre el resultado de un ensayo o una medición y el valor verdadero o de referencia, expresado en la ecuación 6. Es una manera de determinar la veracidad, o el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y el valor aceptado de referencia.

$$s = X - X_a$$

Ecuación 6. Estimación del sesgo (Miller, Miller, 2014).

Donde:

s: Sesgo

X_a : Valor certificado o de referencia.

X: Valor observado o promedio de valores observados.

Para determinar si el sesgo entre métodos de análisis difiere significativamente, se deben comparar mediante el test t de student; si el parámetro t calculado es mayor al t tabulado, se debe rechazar la hipótesis nula y admitir una hipótesis alternativa, la que sugiere que los datos presentados presentan diferencias significativas, y por ende, se encuentran sesgados. Los parámetros de tabla corresponden a los grados de libertad expresados a continuación, con un intervalo de confianza al 95% ($\alpha=0,05$). En este caso, con el fin de calcular el sesgo entre las mediciones de referencia y las experimentales, se recurre a la ecuación 7:

$$t_{calculado} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\left(\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}} \right)}$$

Ecuación 7. Cálculo del parámetro t de student experimental (Miller, Miller, 2014).

Donde:

$t_{calculado}$: Coeficiente t de student calculado.

\bar{x} : Promedio de concentración.

s: Desvío estándar de las mediciones realizadas.

n: Cantidad de muestras analizadas.

En este caso, la estimación de los grados de libertad se realiza en base a la ecuación 8:

$$G. L = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2 - 1)}\right)}$$

Ecuación 8. Estimación de los grados de Libertad para n muestras tomadas (Miller, Miller, 2014).

Donde:

G. L: Grados de libertad (se redondea para arriba si el decimal es igual o mayor a .5)

s: Desvío estándar de las mediciones realizadas.

n: Cantidad de muestras analizadas.

Los grados de libertad deben ser números enteros, requisito fundamental para estimar el parámetro *t* de Tabla, por lo que se redondean los resultados siempre para abajo. Posteriormente, se verifica este coeficiente acorde al porcentaje de confianza (95%) de dos colas y el grado de libertad correspondiente, con la finalidad de contrastar el argumento *t* tabulado y el experimental.

Por ende:

$$\text{Si } t_{\text{experimental}} \geq t_{\text{tabulado}}$$

Se rechaza H_0 y se asume que existe un sesgo entre las mediciones.

$$\text{Si } t_{\text{experimental}} < t_{\text{tabulado}}$$

Se acepta H_0 y se asume que no existe un sesgo significativo entre las mediciones.

3.2.4. Procesamiento de datos

Los programas utilizados para el procesamiento de datos a lo largo de este trabajo fueron los siguientes:

- Microsoft Excel 2007, Microsoft Corporation
- Minitab 17, Minitab Incorporated
- PerkinElmer Syngistix, PerkinElmer Incorporated
- Picofox S2, Bruker Industries

4. Resultados

4.1. Métodos de pretratamiento

4.1.1. Concentración

Tras realizar el análisis para cada método de pretratamiento por decuplicado, se calcularon los promedios de las concentraciones observadas para cada elemento detectado.

Concentración en mg/L				
Elemento	Directa	Diluida	In situ	Digestión
P	217	227	215	223
S	107	142	134	148
Cl	166	166	20,5	-
K	1343	1372	1569	1422
Ca	68,2	74,6	68,9	79,7
Cr	-	-	-	-
Mn	1,36	1,43	1,38	1,63
Fe	2,03	2,20	2,53	6,49
Ni	-	-	-	-
Cu	0,093	0,129	0,094	0,311
Zn	0,763	0,953	0,849	1,60
As	-	-	-	-
Br	0,094	0,079	0,086	-
Rb	0,864	0,824	1,04	0,832
Sr	1,17	1,20	1,24	1,10
Pb	-	-	-	-

Tabla 3. Concentraciones promedio para cada elemento según el método de pretratamiento.

Las muestras fueron tomadas del vino ALMA MORA Malbec para todos los casos listados en la Tabla 3. Los elementos Si y Ar no se cuantifican por este método ya que el Si es el componente principal en los portamuestras empleados para esta investigación (y por ende, se obtendrían las señales provenientes del mismo y no del vino), mientras que el Ar es un elemento presente en el aire. El Ga, posee un valor conocido de 1 mg/L, siendo esta la concentración añadida al cumplir como estándar interno. Finalmente, el Mo no se puede cuantificar dado que la lámpara emisora de fotones está compuesta principalmente de este elemento, por lo que las lecturas obtenidas en el espectro de esta especie provendrían de la excitación de la lámpara.

En la Figura 4, contamos con un espectro típico de TXRF donde se analiza el vino Alma Mora, proveniente de San Juan. Podemos apreciar la presencia de la zona de emisión de Mo, que proviene de la lámpara emisora, situada entre 16 y 18 keV, de Ga entre 9 y 10 keV, la de Ar a 3 keV aproximadamente, y un pico de Si con una entre 1 y 2 keV con aproximadamente $4 \cdot 10^3$ cuentas por segundo (cps). Además de esto, se puede observar que se cuenta con escasa cantidad de cps para los elementos As, Pb, Cr y Ni, lo que denota la baja concentración de estos elementos en la muestra.

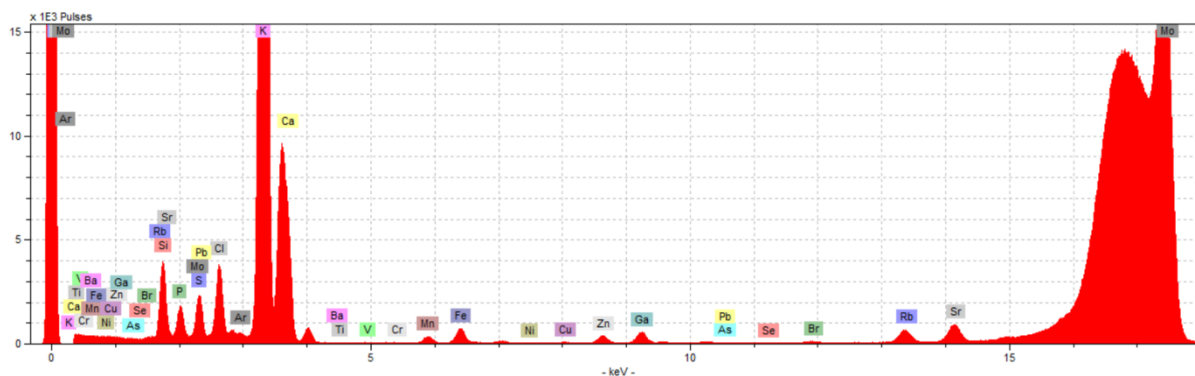


Figura 4. Espectro de TXRF del vino Alma Mora (San Juan).

En cuanto a Ti, V, Se y Ba, al no ser de interés para la investigación y no detectarse concentraciones apreciables de estos elementos, se los decidió excluir de la Tabla 3, en conjunto con Si, Ar, Mo y Ga, según lo explicado en el párrafo anterior. Existen algunos casos donde no se detectaron cantidades apreciables para un dado elemento en un determinado método de pretratamiento, por lo que a estas mediciones se las señaló como "-" (no detectable) en dicha Tabla, estas especies son incluidas en la Tabla 3 ya que son elementos de interés para esta investigación.

La comparación que se puede realizar en base a los métodos de pretratamientos utilizados depende de las lecturas para cada elemento medido. Al observar los resultados de las concentraciones obtenidas por TXRF al pretratar la muestra con digestión asistida por horno de microondas, se verifica que para el caso del Zn, Cu, Fe y Ca las lecturas fueron mayores (incluso hasta 3 veces superiores) en comparación a los otros tres métodos; además, el Br y el Cl no se pudieron detectar en la totalidad de las muestras medidas, por ende, la determinación de estos elementos no fue lo suficientemente fiable para ser incluida dentro de los parámetros de aceptabilidad.

El método de dilución de las muestras 1:10 no presentó grandes variaciones con respecto a los métodos de deposición directa y digestión in situ, exceptuando algunos valores que resultaron ser ligeramente mayores para elementos como Cu y Ca. Al haberse realizado el análisis del método de deposición directa, las lecturas no mostraron muchas discrepancias con los demás

métodos, salvo para S, donde la concentración fue entre 30-40 mg/L menor a los demás procedimientos analíticos.

4.1.2. Cuentas netas

Las cuentas netas, también expresadas como cps (*counts per second*) son la cantidad de pulsos generados de determinada energía en el detector provenientes de los fotones emitidos durante el proceso de FRX por segundo. Cabe recordar que todos los elementos poseen una determinada energía de emisión de fotones que resultan ser característicos. Por ende, las cuentas netas están relacionadas a la cantidad de analito presente.

Algunos elementos pueden emitir fotones a partir de la eyección de los electrones de distintas capas electrónicas, particularmente los de mayor peso molecular, que poseen mayor cantidad de niveles electrónicos. Se van a tomar los valores de las líneas principales K (K_{α}) y L (L_{α}) para la cuantificación

Cuentas netas en cps									
Elemento	Directa	Diluida	In Situ	Digestión	Elemento	Directa	Diluida	In Situ	Digestión
P	23950	4247	18118	884	Cu	802	178	619	118
S	28265	6352	27064	1419	Zn	7911	1719	6490	539
Cl	59197	10053	5781	306	As	135	7	176	12
K	1211902	207673	1048507	45112	Se	1	4	1	11
Ca	91477	16528	68951	3857	Br	1528	220	1099	33
Ti	27	9	45	54	Rb	15297	2459	13525	509
V	74	26	92	11	Sr	20941	3578	16504	699
Cr	69	36	89	33	Mo	2284161	520586	2062183	144153
Mn	5819	1025	4446	234	Ba	1	19	6	38
Fe	12180	2157	10028	1015	Pb	33	11	14	29
Ni	70	34	48	33	Ga	11116	18745	8944	4209

Tabla 4. Cuentas netas según método de pretratamiento por elemento. Los valores resaltados en naranja son las líneas de los elementos que se tomarán en cuenta para la cuantificación.

Acorde a lo visto en la Tabla 4, se pueden ver los efectos de algunas variables propias del instrumento, de los métodos del pretratamiento y posibles fuentes de error. Esta medición se realizó por decuplicado para deposición directa, dilución 1:10 y digestión in situ, mientras que para digestión asistida por horno microondas, se llevó a cabo con nueve muestras y un blanco.

Los valores indicados en naranja son aquellos elementos cuyas concentraciones se pudieron medir de manera precisa (véase inciso 4.1.1 'Concentración', Tabla 3).

A simple vista, resulta que el método de deposición directa es el que más cuentas por segundo produce, aunque es necesario mencionar que al compararse con la dilución 1:10, la última posee una cantidad de cps solo entre 4 y 6 veces menor, no 10 como se esperaría, acorde al factor de dilución. Esto podría deberse a que el fondo espectral de las muestras diluidas es menor en comparación a las soluciones de vino no diluidas depositadas directamente sobre el portamuestra, observándose una reducción del efecto matriz de la muestra diluida que, consecuentemente, aumenta la respuesta instrumental del analito, en este caso, en forma de cuentas por segundo.

En digestión in situ, se obtuvieron cps similares a las observadas en deposición directa, aunque ligeramente menores; esto puede provenir del hecho que al utilizarse soluciones ácidas o soluciones con matrices complejas, se pueden producir corrimientos o expansiones de la gota al momento de depositar las muestras en el portamuestra. Al haber una mayor área de la solución líquida, la cantidad de analito en el área de detección disminuye, explicando de esta manera la disminución de las cps para un determinado elemento. La razón por la cual la concentración observada no disminuye es por la presencia del estándar interno, en este caso, el Ga. Las cuentas de Ga nos pueden indicar si se produjo un corrimiento de gota o bien, puede funcionar como indicador de la complejidad de la matriz.

En el caso de la dilución 1:10 las cuentas de Ga no son proporcionales al factor de dilución ya que la solución patrón fue añadida posterior a la adición del agua destilada, también es el método de pretratamiento que más cuentas de Ga mostró, esto se debe al fondo espectral reducido por la dilución y por el hecho de que la gota no se desplazó en el portamuestra. Al observarse los datos de la digestión asistida con horno microondas, se observan disminuciones en las cps de un orden de magnitud menor al compararse con el método de dilución 1:10, esto puede provenir del hecho que la solución no solo se encuentra diluida, si no que la gota también puede expandirse en el reflector por la presencia de los ácidos en la solución.

Por ende, se puede decir que el orden creciente de las cps según el método de tratamiento es el siguiente:

Deposición directa > Digestión in situ > Dilución 1:10 > Digestión asistida con horno microondas

4.1.3. Background o fondo espectral

El *background* o fondo espectral se lo puede entender como las señales residuales que bien pueden originarse de la matriz de la muestra, del reflector o del ambiente. Los reflectores de cuarzo fueron elegidos en este caso con la finalidad de obtener el menor fondo espectral posible proveniente del portamuestra, con el fin de aumentar la cantidad de cuentas de los analitos y obtener un menor límite de detección en las mediciones.

Background en cps									
Elemento	Directa	Diluida	In Situ	Digestión	Elemento	Directa	Diluida	In Situ	Digestión
P	8057	1902	6413	525	Cu	2118	546	1929	163
S	8078	1941	6517	513	Zn	2154	570	1972	168
Cl	7827	1916	6418	498	As	2386	590	2144	169
K	6492	1557	5221	404	Se	2535	609	2327	167
Ca	5114	1236	4188	326	Br	2923	727	2747	205
Ti	2437	598	2133	182	Rb	4996	1292	4845	366
V	2356	579	2038	172	Sr	7414	1947	7111	571
Cr	2310	574	2016	171	Mo	7737	2122	6843	800
Mn	2273	582	2027	168	Ba	2415	593	2124	181
Fe	2250	572	1996	161	Pb	2187	540	1968	155
Ni	2117	539	1929	156	Ga	7651	1781	6327	510

Tabla 5. Cuentas de fondo espectral para cada elemento según el método de pretratamiento. Los valores resaltados en naranja son las líneas de los elementos que se tomarán en cuenta para la cuantificación.

Acorde a los datos de fondo espectral obtenidos en la Tabla 5, la metodología de digestión in situ no fue del todo efectiva para reducir el background de la muestra. La razón principal por la cual se añadió la mezcla ácida fue para disminuir estas cuentas que pueden llegar a interferir en las mediciones de concentración, por lo que la adición de los reactivos no resultó ser satisfactoria en el caso de los vinos, donde la reducción del fondo espectral fue menor al 10% en la mayoría de los elementos analizados. Estos datos fueron comparados con el método de deposición directa, que presenta la mayor cantidad de cuentas de background y que tampoco fue sometido a tratamiento alguno.

Las cuentas de fondo en el método de dilución 1:10 resultan ser múltiples veces menores a los pretratamientos de digestión in situ y deposición directa, aunque en promedio, triplican los resultados obtenidos en el método de digestión asistida por microondas. Cabe destacar que el primero de los pretratamientos disminuye el fondo mediante la adición de agua destilada,

mientras que el método de digestión no solo cuenta con una dilución, sino que, al añadir la mezcla ácida, la materia orgánica es destruida, disminuyendo las fuentes de background.

Por ende, se listan de mayor fondo espectral a menor los métodos de pretratamiento a continuación:

Deposición directa > Digestión in situ > Dilución 1:10 > Digestión asistida por horno microondas

4.1.4. Reproducibilidad

Se analizó el vino de referencia y se compararon los diversos métodos de pretratamiento utilizados, deposición directa, dilución 1:10, digestión in situ y digestión asistida por horno de microondas, con la finalidad de dilucidar que método resulta ser el más reproducible.

4.1.4.1. Deposición directa

Posterior al análisis por deposición directa del vino ALMA MORA, que se tomó como referencia para los métodos de pretratamiento, se calcularon los promedios de concentración, su desvío estándar, el coeficiente de variación y se estimó la precisión intermedia de las mediciones para los distintos elementos analizados. Si bien se eliminaron algunos datos individuales en las mediciones de Fe, P y S, dado que presentaron diferencias significativas en comparación con los demás datos obtenidos, se encontraron precisiones intermedias aceptables para estos tres elementos, como se describe en la Tabla 6. Al igual que en el inciso 4.1.1 'Concentración', se omitieron de la Tabla los elementos Ti, V, Se, Ba, Si, Ar, Mo y Ga, ocurrencia que se repetirá para el análisis de reproducibilidad de cada método de pretratamiento.

Elemento	Promedio (mg/L)	Desvío	CV%	CV Horwitz	Precisión Intermedia
P	217	6,42	2,96	7,12	Aceptable
S	107	4,16	3,88	7,92	Aceptable
Cl	166	15,6	9,41	7,41	No aceptable
K	1343	56,8	4,23	5,41	No aceptable
Ca	68,8	2,82	4,1	8,46	Aceptable
Cr	-	-	-	-	-
Mn	1,36	0,047	3,5	15,3	Aceptable
Fe	2,03	0,091	4,5	14,4	Aceptable
Ni	-	-	-	-	-
Cu	0,093	0,011	11,8	22,9	Aceptable
Zn	0,763	0,041	5,33	16,7	Aceptable
As	-	-	-	-	-
Br	0,094	0,013	14,1	22,8	Aceptable
Rb	0,864	0,038	4,45	16,4	Aceptable
Sr	1,17	0,043	3,72	15,6	Aceptable
Pb	-	-	-	-	-

Tabla 6. Parámetros estadísticos análisis deposición directa.

Como se puede apreciar en la Tabla 6, aquellos elementos no detectables están marcados en rojo, las precisiones intermedias marcadas en amarillo hacen referencia a aquellos elementos cuya reproducibilidad resulta ser insatisfactoria al usarse el método de deposición directa, mientras que los elementos con precisión aceptable están marcados en verde.

El criterio de aceptación de las precisiones intermedias está determinado por la diferencia entre el coeficiente de Horwitz y el coeficiente de variación, según lo descrito en el inciso 3.2.3 'Cifras de mérito'.

En este método de deposición encontramos una reproducibilidad satisfactoria para los elementos Br, Sr, Rb, Cu, Zn, Mn, Fe, Ca, S y P. Los dos elementos que no se pueden cuantificar con buena reproducibilidad son Cl y K. Si bien K posee una precisión intermedia no aceptable, es necesario destacar que su bajo coeficiente de variación, el cual es inferior al 5%, no impide cuantificar este elemento de manera fiable, dado que en este caso el modelo estadístico de Horwitz es particularmente riguroso con la medición de especies a altas concentraciones; sin embargo, se podría entender que las lecturas de K en este caso son fiables para nuestro objetivo experimental. Al analizarse Cl se encuentra una precisión

intermedia insatisfactoria, esto podría provenir del hecho de que al ser ligeramente volátil el elemento, se pierde parte del mismo durante la fase de secado del vino en el reflector.

Si bien se pudieron detectar y cuantificar de manera fiable 7 de los 11 elementos de interés para nuestra investigación (Fe, Zn, Cu, Mn, Ca, K, P), es necesario destacar que las otras 4 especies (Ni, Cr, As y Pb) se encontraban por debajo del límite de detección.

También se detectaron y midieron otros elementos que no resultan ser de fundamental interés para nuestro alcance experimental, estos nos pueden ayudar a determinar si las mediciones realizadas por TXRF son confiables, tales como en el caso de Rb y Sr. Estas especies son cuantificables de manera satisfactoria por medio de esta técnica, además de estar presentes en cantidades que rondan los 1000 µg/L en vinos. Por ende, serían buenos candidatos para calcular el sesgo entre mediciones o métodos analíticos.

4.1.4.2. Dilución 1:10

Para el caso del método de dilución de vino en proporción 1:10 con agua destilada, se procedió acorde a lo descrito en el inciso 3.2.1.2 de Materiales y Métodos para la preparación de la muestra. En este caso, se debió eliminar la totalidad de los datos obtenidos en la muestra 1, dado que todos los elementos presentaban datos discordantes, la fuente de error probablemente se originó en el laboratorio durante la preparación de la muestra. Se debieron eliminar además algunos datos significativamente discordantes para los elementos Zn, Cu y Fe.

Elemento	Promedio (mg/L)	Desvío	CV%	Horwitz	Precisión Intermedia
P	227	7,95	3,50	7,07	Aceptable
S	142	4,39	3,10	7,59	Aceptable
Cl	166	10,6	6,39	7,41	No aceptable
K	1372	41,3	3,01	5,39	Aceptable
Ca	74,6	2,54	3,40	8,36	Aceptable
Cr	-	-	-	-	-
Mn	1,43	0,063	4,37	15,2	Aceptable
Fe	2,2	0,158	7,20	14,2	Aceptable
Ni	-	-	-	-	-
Cu	0,129	0,011	8,75	21,8	Aceptable
Zn	0,953	0,054	5,72	16,1	Aceptable
As	-	-	-	-	-
Br	0,079	0,021	27,22	23,5	No aceptable
Rb	0,824	0,041	4,968	16,5	Aceptable
Sr	1,198	0,036	3,033	15,6	Aceptable
Pb	-	-	-	-	-

Tabla 7. Parámetros estadísticos análisis dilución 1:10.

Según lo visto en la Tabla 7, para Cl se observa una reproducibilidad pobre, dada la posible pérdida de masa de este elemento en la fase de secado de la gota en el reflector, además de la baja sensibilidad en TXRF para dicho elemento. El Br resulta ser el otro elemento en esta lista que no presenta una precisión intermedia satisfactoria, este inconveniente se da debido a que, al realizar la dilución y la eventual medición en el espectrómetro, las lecturas obtenidas se encuentran cerca del límite de detección. En los resultados de concentración promedio de la Tabla 7 se encuentra multiplicado el factor de dilución.

Es entonces que, al realizar una dilución a muestras con pequeñas cantidades de un dado elemento, se puedan observar valores con desvíos significativos entre los mismos o incluso no ser detectados en absoluto por el instrumento.

4.1.4.3. Digestión in situ

Con el fin de disminuir el fondo espectral de la matriz al momento de realizar las mediciones, se sometió a la muestra de vino depositada en el reflector a una mezcla ácida de HNO₃ + H₂O₂ 3:1, tal como se describe en el inciso 3.2.2.2 del apartado de Materiales y Métodos.

Es necesario mencionar que solo se debió eliminar un valor de las diez muestras medidas para solo dos elementos. A lo largo del experimento se verificó que, al añadir la mezcla ácida, se producía un corrimiento de la gota, aumentando el diámetro de la muestra tratada en el reflector, resultando en una disminución en la cantidad de cuentas por segundo obtenidas. En la Tabla 8 se presentan los datos estadísticos obtenidos en base a las mediciones realizadas:

Elemento	Promedio (mg/L)	Desvío	CV%	Horwitz	Precisión Intermedia
P	218	9,35	4,30	7,12	Aceptable
S	134	6,35	4,74	7,66	Aceptable
Cl	20,5	3,41	16,6	10,2	No aceptable
K	1569	227	14,5	5,29	No aceptable
Ca	68,9	1,71	2,49	8,46	Aceptable
Cr	-	-	-	-	-
Mn	1,38	0,051	3,70	15,2	Aceptable
Fe	2,53	0,642	25,4	13,9	No aceptable
Ni	-	-	-	-	-
Cu	0,09	0,011	11,7	23,0	Aceptable
Zn	0,849	0,071	8,32	16,4	Aceptable
As	-	-	-	-	-
Br	0,086	0,011	12,5	23,1	Aceptable
Rb	1,04	0,199	19,1	15,9	No Aceptable
Sr	1,24	0,057	4,61	15,5	Aceptable
Pb	-	-	-	-	-

Tabla 8. Parámetros estadísticos análisis digestión in situ.

Tanto Rb, Fe, K y Cl presentan coeficientes de variación elevados, lo que nos indica que las mediciones de reproducibilidad no son aceptables; si bien las razones de los desvíos de K y Cl fueron explicadas previamente, es necesario señalar que a comparación de los demás métodos de pretratamiento (excepto digestión asistida por horno microondas), la variación de las mediciones de K es estadísticamente mayor en el caso de digestión in situ, donde se observa un CV% cercano al 15%, esto es probablemente atribuible a la contaminación de los reactivos utilizados para la digestión.

La contaminación de los blancos de ataque puede influir también en Rb y Fe, ambos elementos cuya reproducibilidad al usar este método es insatisfactoria. Las variaciones de los valores medidos pueden estar relacionadas al tamaño de gota y la expansión de la misma en el reflector, tal como se mencionó anteriormente. Estas dos fuentes de error pueden influir en los

valores de los coeficientes estadísticos para varios elementos medidos por digestión in situ, donde se presentan valores de CV% mayores en algunos casos.

4.1.4.4. Digestión asistida por horno microondas

Para este método de pretratamiento se tomaron 9 muestras del vino de referencia, en conjunto con un blanco de reactivos, tal cual se describió en el inciso 3.2.2.3 de Materiales y Métodos. Es por esta razón que se añadió el parámetro de blanco de reactivos al cuadro de resultados obtenidos, con el fin de considerar las concentraciones de los elementos en el vino de referencia y en los reactivos utilizados, para así verificar si existen fuentes de contaminación que influyan en las lecturas obtenidas por el instrumento.

Elemento	Promedio (mg/L)	Blanco (mg/L)	Desvío	CV%	Horwitz	Precisión Intermedia
P	223	-	18,5	8,31	7,09	No aceptable
S	148	-	9,462	6,38	7,54	No aceptable
Cl	-	0,702	-	-	-	-
K	1422	0,278	59,3	4,17	5,37	No aceptable
Ca	79,7	0,814	7,14	8,96	8,28	No aceptable
Cr	-	-	-	-	-	-
Mn	1,63	0,009	0,245	15,0	14,9	No aceptable
Fe	6,49	0,102	3,87	59,6	12,1	No aceptable
Ni	-	0,01	-	-	-	-
Cu	0,311	0,012	0,056	18,1	19,1	No aceptable
Zn	1,60	0,064	0,467	29,2	14,9	No aceptable
As	-	-	-	-	-	-
Br	-	-	-	-	-	-
Rb	0,832	-	0,097	11,7	16,4	No aceptable
Sr	1,10	-	0,156	14,1	15,8	No aceptable
Pb	-	0,005	-	-	-	-

Tabla 9. Parámetros estadísticos análisis digestión asistida por horno microondas.

Al realizar el tratamiento de los datos obtenidos, se encontró y listó en la Tabla 9, que ningún elemento posee una reproducibilidad satisfactoria, dado que los coeficientes de variación se encuentran por encima de la proporción del coeficiente de Horwitz deseada, expresadas en las ecuaciones 2-3 del inciso 3.2.3 'Cifras de mérito'.

Algunos elementos como Sr, Rb, P y S poseen concentraciones en los blancos de digestión en concentraciones por debajo del límite de detección. Para los primeros dos, la variación entre muestras podría provenir del hecho que se debió diluir cada muestra en una relación 1:10 para realizar las mediciones, por lo que los datos obtenidos corresponderían a valores diez veces menores, encontrándose cerca del límite de detección, lo que resultaría en una cuantificación menos precisa de estos dos elementos.

En el caso del P y S, la variación entre muestras podría provenir de una contaminación en los instrumentos y reactivos utilizados; pese a esto, los coeficientes de variación se encuentran debajo del 10%, si bien se calcularon estos coeficientes en conjunto con el de Horwitz para verificar la reproducibilidad y su aceptabilidad, usualmente estos porcentajes resultan ser satisfactorios en la validación de métodos. Dicho caso resulta ser similar para K, donde se nota un coeficiente de variación porcentual que ronda el 4%, aunque en este caso, la concentración de dicho elemento en el blanco de ataques es ligeramente mayor a los de P y S.

Para Pb y Ni se encontró que estas especies están presentes en pequeñas cantidades en el blanco de ataque, aunque no se haya podido detectar estos elementos a lo largo de las 9 muestras tomadas, lo que indicaría que las concentraciones rondaban el límite de detección; la concentración detectada en el blanco también se encuentra alrededor de este límite, por lo que la cuantificación de la misma no sería fiable. La fuente de variación entre muestras podría provenir de contaminaciones debido al equipamiento utilizado en el horno de microondas, como también ocurre en el caso del Mn, Fe, Cu y Zn, donde la precisión intermedia resulta ser insatisfactoria. Es por esto, que al comparar los datos observados con el método de pretratamiento de dilución con agua destilada en proporción 1:10, se encuentra que el CV% es menor al observado en digestión asistida por horno microondas.

4.1.5. Límites de detección (LOD)

En todo método analítico, el límite de detección para un determinado analito es fundamental para la elección de dicho método en base a la sensibilidad requerida para la detección de una determinada especie en bajas concentraciones. Si bien el límite de detección se puede estimar mediante diversos cálculos estadísticos, en TXRF es estimable en base a los datos obtenidos en el espectro, más precisamente por la concentración del analito, las cuentas obtenidas y el fondo espectral del mismo. Dicho cálculo se encuentra enunciado en la ecuación 4 (sección 3.2.3.3).

Los límites de detección de los elementos presentes se estimaron para cada método de pretratamiento utilizado, para ello se calcularon las concentraciones, las cuentas netas y el

fondo espectral promedio de cada elemento analizado. Los resultados se encuentran listados en la Tabla 10.

Límites de Detección en mg/L				
Elemento	Directa	Diluida	In situ	Digestión
P	2,69	7,02	3,03	2,03
S	1,12	2,96	1,27	0,837
Cl	0,824	2,19	0,941	-
K	0,299	0,787	0,338	0,221
Ca	0,182	0,48	0,207	0,136
Cr	-	-	-	-
Mn	0,037	0,102	0,045	0,037
Fe	0,029	0,08	0,035	0,029
Ni	-	-	-	-
Cu	0,017	0,048	0,021	0,015
Zn	0,015	0,042	0,018	0,013
As	-	-	-	-
Br	0,011	0,029	0,014	-
Rb	0,013	0,036	0,017	0,011
Sr	0,016	0,045	0,02	0,014
Pb	-	-	-	-

Tabla 10. Límites de detección de cada elemento según el método de pretratamiento.

Teniendo en cuenta los parámetros espectrales utilizados para calcular el límite de detección de los elementos, se determinó que el método de pretratamiento donde la concentración del analito debe ser mayor para ser detectada, es el método de dilución 1:10. Si bien los demás métodos poseen límites de detección menores, cabe mencionar que al pretratar la muestra con una digestión asistida con horno de microondas, se obtiene el límite de detección más bajo, aunque no se pueden detectar con confianza Br y Cl, pese a que éste último elemento sea poco reproducible en el análisis para todos los métodos de pretratamiento.

Los pretratamientos de deposición directa y digestión in situ poseen límites de detección similares, siendo el primero ligeramente más efectivo a la hora de aumentar la sensibilidad del método para cuantificar los elementos presentes en vino.

Por ende, el orden de los límites de detección de manera creciente es el siguiente:

Digestión asistida por horno microondas < Deposición directa < Digestión In situ < Dilución 1:10

4.1.6. Límite de cuantificación (LOQ)

El límite de cuantificación resulta ser el parámetro que determina a partir de qué concentración el valor informado presenta una incertidumbre aceptable, y su manera de calcularlo es multiplicar el valor de los límites de detección anteriormente listados por tres, indicado en la ecuación 5 del inciso 3.2.3.3 de cifras de mérito. Al ser proporcionales a los límites de detección observados en la Tabla 10, los límites de cuantificación guardan su relación entre los distintos métodos de pretratamiento.

Límites de Cuantificación en mg/L				
Elemento	Directa	Diluida	In situ	Digestión
P	8,08	21,1	9,1	6,09
S	3,37	8,87	3,82	2,51
Cl	2,47	6,57	2,82	-
K	0,897	2,36	1,01	0,663
Ca	0,546	1,44	0,621	0,408
Cr	-	-	-	-
Mn	0,111	0,306	0,135	0,111
Fe	0,087	0,24	0,105	0,087
Ni	-	-	-	-
Cu	0,051	0,144	0,063	0,045
Zn	0,045	0,126	0,054	0,039
As	-	-	-	-
Br	0,033	0,087	0,042	-
Rb	0,039	0,108	0,051	0,033
Sr	0,048	0,135	0,06	0,042
Pb	-	-	-	-

Tabla 11. Límites de cuantificación de cada elemento según el método de pretratamiento.

Acorde a lo visto en la Tabla 11, se determina que los límites de cuantificación según el método de pretratamiento cumplen con el siguiente orden de menor a mayor LOQ:

Digestión asistida por horno microondas < Deposición directa < Digestión In situ < Dilución 1:10

4.1.7. Recuperación

Los ensayos de recuperación se realizaron acorde al procedimiento descrito en el inciso 3.2.2.1 'Recuperación', mediante la fortificación del vino ALMA MORA con Cr, As y Pb, donde se llevó a cabo la adición de 0,5 mg/L y 0,1 mg/L de cada analito para 3 métodos de pretratamiento. Se exceptuó el de digestión por horno de microondas ya que, al presentar una pobre reproducibilidad, los resultados que se podrían haber observado no tendrían la precisión requerida para realizar los cálculos de recuperación de manera confiable.

A continuación, se muestran las Tablas 12 a 17, donde veremos los valores de recuperación observados según la cantidad de analito añadida:

Elemento	Medida 1 (mg/L)	Medida 2 (mg/L)	Medida 3 (mg/L)	Promedio (mg/L)	Cantidad Añadida (mg/L)	Cantidad Inicial (mg/L)	Factor de recuperación n	% R
Cr	0,672	0,564	0,517	0,584	0,5	n/a	1,17	117
As	0,599	0,6	0,607	0,602	0,5	n/a	1,20	120
Pb	0,416	0,427	0,42	0,421	0,5	n/a	0,842	84,2

Tabla 12. Fortificación 0,5 mg/L deposición directa.

Elemento	Medida 1 (mg/L)	Medida 2 (mg/L)	Medida 3 (mg/L)	Promedio (mg/L) *	Cantidad Añadida (mg/L)	Cantidad Inicial (mg/L)	Factor de recuperación n	% R
Cr	0,065	0,051	0,058	0,58	0,5	n/a	1,16	116
As	0,058	0,055	0,059	0,573	0,5	n/a	1,15	115
Pb	0,04	0,039	-	0,397	0,5	n/a	0,793	79,3

Tabla 13. Fortificación 0,5 mg/L en dilución 1:10.

** El valor promedio es corregido por el factor de dilución.*

Elemento	Medida 1 (mg/L)	Medida 2 (mg/L)	Medida 3 (mg/L)	Promedio (mg/L)	Cantidad Añadida (mg/L)	Cantidad Inicial (mg/L)	Factor de recuperación n	% R
Cr	0,568	0,589	0,531	0,563	0,5	n/a	1,13	113
As	0,588	0,624	0,632	0,615	0,5	n/a	1,23	123
Pb	0,495	0,407	0,382	0,428	0,5	n/a	0,856	85,6

Tabla 14. Fortificación 0,5 mg/L en digestión in situ.

Elemento	Medida 1 (mg/L)	Medida 2 (mg/L)	Medida 3 (mg/L)	Promedio (mg/L)	Cantidad Añadida (mg/L)	Cantidad Inicial (mg/L)	Factor de recuperación n	% R
Cr	0,099	0,121	0,127	0,116	0,1	n/a	1,16	116
As	0,142	0,145	0,131	0,139	0,1	n/a	1,39	139
Pb	0,044	0,051	0,113	0,069	0,1	n/a	0,693	69,3

Tabla 15. Fortificación 0,1 mg/L deposición directa.

Elemento	Medida 1 (mg/L)	Medida 2 (mg/L)	Medida 3 (mg/L)	Promedio (mg/L) *	Cantidad Añadida (mg/L)	Cantidad Inicial (mg/L)	Factor de recuperación	% R
Cr	0,012	-	0,029	0,205	0,1	n/a	-	-
As	0,014	0,013	-	0,135	0,1	n/a	-	-
Pb	-	-	0,009	0,09	0,1	n/a	-	-

Tabla 16. Fortificación 0,1 mg/L en dilución 1:10.

** El valor promedio es corregido por el factor de dilución.*

Elemento	Medida 1 (mg/L)	Medida 2 (mg/L)	Medida 3 (mg/L)	Promedio (mg/L)	Cantidad Añadida (mg/L)	Cantidad Inicial (mg/L)	Factor de recuperación n	% R
Cr	0,111	0,122	0,123	0,119	0,1	n/a	1,19	119
As	0,133	0,137	0,159	0,143	0,1	n/a	1,43	143
Pb	0,092	0,071	0,076	0,08	0,1	n/a	0,797	79,7

Tabla 17. Fortificación 0,1 mg/L en digestión in situ.

Tras realizar el procesamiento de datos, encontramos que se detectaron concentraciones apreciables en todos los tratamientos para todos los elementos medidos en cada uno de los ensayos listados previamente, con la excepción de la preparación diluida 1:10 fortificada con 0,1 mg/L, según lo visto en la Tabla 16. Esto se debe al hecho de que se diluyó a una décima parte la solución fortificada, arrojando valores cercanos al límite de detección y haciendo la cuantificación muy dificultosa con el instrumento utilizado a estos niveles de concentración.

Los valores de recuperación resultaron ser satisfactorios para Cr y As, arrojando en la mayoría de los casos porcentajes de recuperación cercanos a 110%. Cabe destacar que, al haberse realizado la fortificación sobre una muestra de vino, los valores de recuperación son ligeramente más altos que los máximos estipulados por la AOAC para estos dos elementos. La razón detrás del incremento en el porcentaje se debe a que el *spiking* se efectuó sobre muestras de vinos que poseían una cantidad de Cr y As que, si bien se encontraban en cantidades cercanas al límite de detección, no resultaron despreciables.

En el caso de Pb, los porcentajes de recuperación se encuentran alrededor del mínimo aceptable por la AOAC o incluso por debajo del mismo, que resulta ser del 80%. La técnica de TXRF detecta satisfactoriamente este elemento para la matriz dada, acorde a la bibliografía existente. Es por ello que se debería llevar a cabo la recalibración de la sensibilidad de Pb del equipo S2 PICOFOX, utilizado para la medición de las muestras.

Tanto Pb y As resultan ser dos elementos cuyas energías de emisión están muy próximas entre sí, por lo que resultan ser interferentes espectrales; esto queda evidenciado en las Figuras 5 y 6, extraídas del análisis del vino de referencia Alma Mora (San Juan).

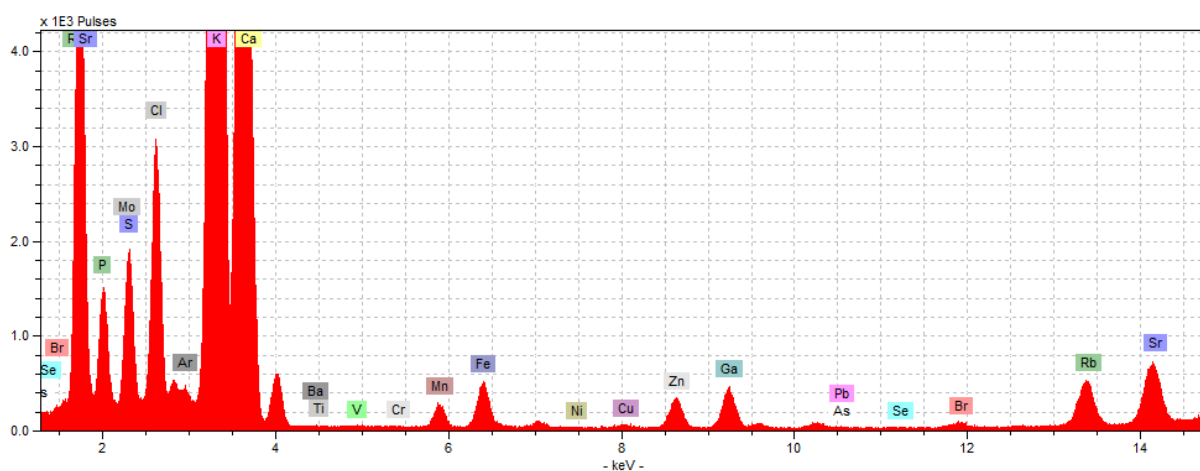


Figura 5. Ejemplo de espectro de TXRF de vino Alma Mora (San Juan) con sus respectivas zonas de emisión para cada elemento.

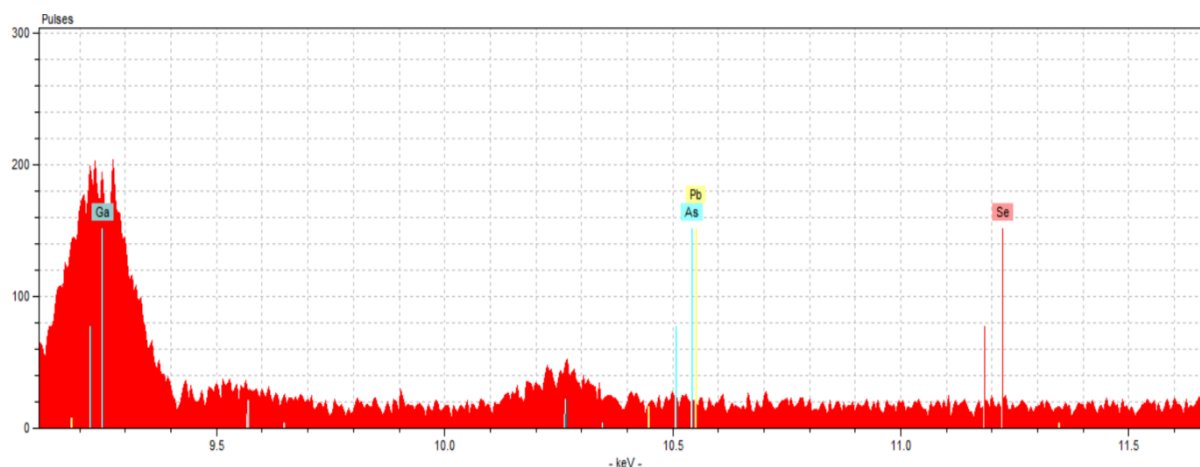


Figura 6. Espectro de TXRF en la zona de emisión de As y Pb.

Como podemos ver en la Figura 6, ambos elementos presentan sus picos de emisión de energía entre 10,53 y 10,55 keV.

Teniendo esto en cuenta se llevaron a cabo los ensayos de fortificación individuales para As y Pb, ambos con un añadido de 0,1 mg/L para los 3 métodos de pretratamiento. Los resultados de estos ensayos quedan evidenciados en las Tablas 18 a 20.

Elemento	Medida 1 (mg/L)	Medida 2 (mg/L)	Medida 3 (mg/L)	Promedio (mg/L)	Cantidad Añadida (mg/L)	Cantidad Inicial (mg/L)	Factor de recuperación n	% R
As	0,118	0,116	0,115	0,116	0,1	n/a	1,16	116
Pb	0,111	0,072	0,083	0,089	0,1	n/a	0,887	88,7

Tabla 18. Fortificación 0,1 mg/L deposición directa.

Elemento	Medida 1 (mg/L)	Medida 2 (mg/L)	Medida 3 (mg/L)	Promedio (mg/L) *	Cantidad Añadida (mg/L)	Cantidad Inicial (mg/L)	Factor de recuperación n	% R
As	0,011	0,007	0,01	0,093	0,1	n/a	0,933	93,3
Pb	0,003	0,01	-	-	0,1	n/a	-	-

Tabla 19. Fortificación 0,1 mg/L en dilución 1:10.

** El valor promedio es corregido por el factor de dilución.*

Elemento	Medida 1 (mg/L)	Medida 2 (mg/L)	Medida 3 (mg/L)	Promedio (mg/L)	Cantidad Añadida (mg/L)	Cantidad Inicial (mg/L)	Factor de recuperación n	% R
As	0,134	0,107	0,105	0,115	0,1	n/a	1,15	115
Pb	0,068	0,061	0,082	0,07	0,1	n/a	0,703	70,3

Tabla 20. Fortificación 0.1 mg/L en digestión in situ.

Tras estos ensayos no se encontró una mejoría en la detección de los dos elementos al pretratarse la muestra de vino mediante una dilución 1:10, como podemos observar en la Tabla 19, en comparación a la Tabla 16. Los valores de recuperación en este caso no concuerdan con aquellos de deposición directa y digestión in situ, dado que los valores observados de As y Pb en el caso de la solución diluida, se encuentran cerca del límite de detección. En el caso de deposición directa, visto en la Tabla 18, encontramos un incremento notorio en el porcentaje de recuperación de Pb comparado con las muestras fortificadas de 0,1 mg/L de los 3 elementos previamente analizados, evidenciado en la Tabla 15, mientras que el porcentaje de recuperación de As se mantiene a un nivel similar que en los métodos antes mencionados.

En el caso de la digestión in situ (Tabla 20), para Pb se encuentra un considerable decrecimiento del porcentaje de recuperación, rondando el 70%, mientras que para As se encuentra una variación del 30% entre los dos ensayos.

De esta manera se evidencia con las mediciones obtenidas que al someterse la muestra a los métodos de deposición directa o digestión In situ previo a su análisis, los porcentajes de recuperación de analitos resultan ser satisfactorios, teniendo en cuenta los rangos de valores aceptables según la AOAC. A diferencia de estos dos métodos, al diluirse la muestra previa a su análisis, se evidencian valores de recuperación menores, o incluso indetectables en algunos casos, dado que se diluye la muestra hasta evidenciarse un décimo de la concentración original de los analitos en las lecturas realizadas.

4.1.7.1 Límites de detección y cuantificación

Los ensayos de fortificación no solamente nos permitieron calcular la exactitud del método analítico y de pretratamiento utilizados en este trabajo, también nos permitieron estimar los límites de detección y cuantificación a partir de la concentración, cuentas y cálculos de fondo espectral obtenidos con las mediciones realizadas. Ambas estimaciones fueron determinadas a partir de los argumentos matemáticos expresados en las ecuaciones 4 y 5 del Inciso 3.2.3 'Cifras de Mérito', de esta manera, los resultados para ambos límites quedan calculados para cada método de pretratamiento en las Tablas 21 a 26.

Elemento	Cuentas (cps)	Fondo (cps)	Promedio (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Cr	3005	3396	0,584	0,029	0,087
As	12899	3637	0,602	0,007	0,021
Pb	6437	3336	0,421	0,013	0,04

Tabla 21. Fortificación 0,5 mg/L deposición directa.

Elemento	Cuentas (cps)	Fondo (cps)	Promedio (mg/L) *	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Cr	361	540	0,58	0,097	0,29
As	1444	580	0,573	0,025	0,075
Pb	722	531	0,397	0,048	0,144

Tabla 22. Fortificación 0,5 mg/L en dilución 1:10.

* El valor promedio es corregido por el factor de dilución.

Elemento	Cuentas (cps)	Fondo (cps)	Promedio (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Cr	2074	2657	0,563	0,037	0,112
As	9445	2934	0,615	0,009	0,026
Pb	4623	2692	0,428	0,017	0,051

Tabla 23. Fortificación 0,5 mg/L en digestión in situ.

Elemento	Cuentas (cps)	Fondo (cps)	Promedio (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Cr	527	2802	0,116	0,03	0,09
As	2514	2914	0,139	0,006	0,019
Pb	1043	2677	0,069	0,015	0,045

Tabla 24. Fortificación 0,1 mg/L deposición directa.

Elemento	Cuentas (cps)	Fondo (cps)	Promedio (mg/L) *	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Cr	74	524	0,205	-	-
As	329	526	0,135	-	-
Pb	56	481	0,09	-	-

Tabla 25. Fortificación 0,1 mg/L en dilución 1:10.

* El valor promedio es corregido por el factor de dilución.

Elemento	Cuentas (cps)	Fondo (cps)	Promedio (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Cr	470	2848	0,119	0,034	0,102
As	2293	3076	0,143	0,007	0,022
Pb	908	2822	0,08	0,018	0,053

Tabla 26. Fortificación 0,1 mg/L en digestión in situ.

Dado que Cr no presenta interferencias espectrales con otros elementos, se puede realizar la estimación de los límites en base a los datos obtenidos de las fortificaciones ilustradas en las Tablas 21-26. Aunque en el caso del As y Pb, dado que resultan ser interferentes entre sí, se debe llevar a cabo un *spiking* de los dos elementos de manera individual en una concentración de 0,1 mg/L para estimar los límites de detección y cuantificación de los mismos, según lo observado en las Tablas 27-29.

Elemento	Cuentas (cps)	Fondo (cps)	Promedio (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
As	2557	3957	0,116	0,009	0,026
Pb	1010	2222	0,089	0,012	0,037

Tabla 27. Fortificación 0,1 mg/L deposición directa.

Elemento	Cuentas (cps)	Fondo (cps)	Promedio (mg/L) *	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
As	277	628	0,093	0,027	0,081
Pb	83	448	0	-	-

Tabla 28. Fortificación 0,1 mg/L en dilución 1:10.

*El valor promedio es corregido por el factor de dilución.

Elemento	Cuentas (cps)	Fondo (cps)	Promedio (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
As	1336	2342	0,115	0,011	0,033
Pb	940	2950	0,07	0,017	0,051

Tabla 29. Fortificación 0,1 mg/L en digestión in situ.

Las Figuras 7 a 9 comparan los límites de detección y cuantificación para los 3 elementos analizados durante el ensayo, según el método de pretratamiento utilizado:

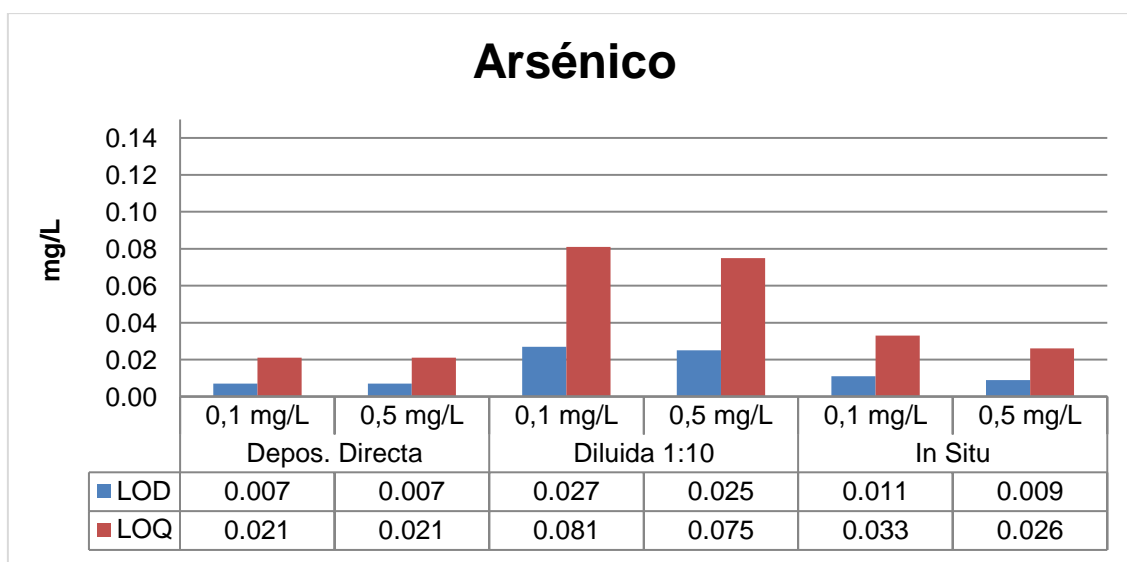


Figura 7. LOD y LOQ de As en vino fortificado.

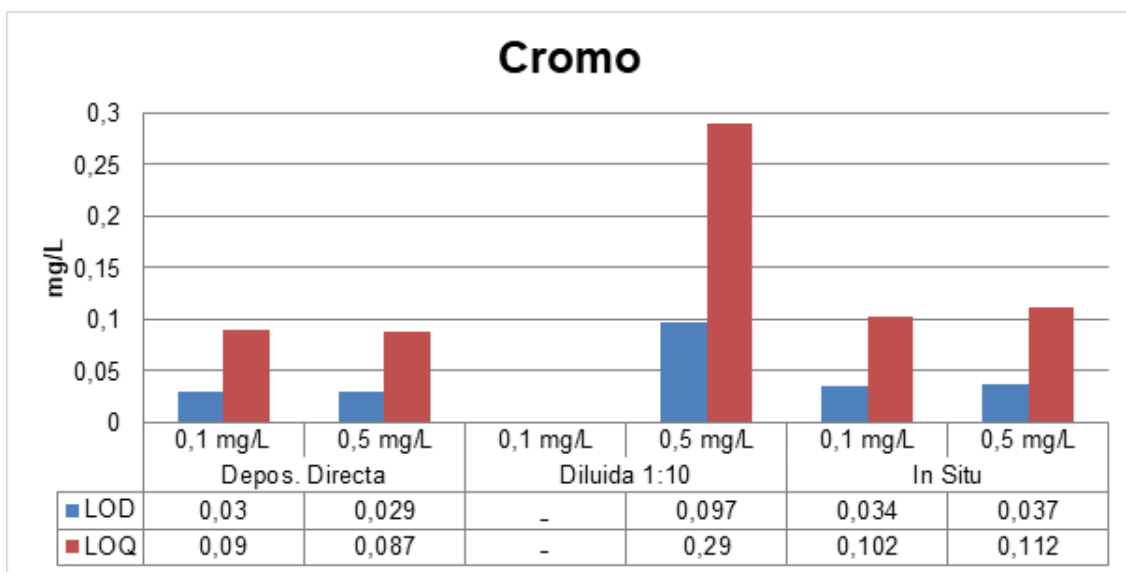


Figura 8. LOD y LOQ de Cr en vino fortificado.

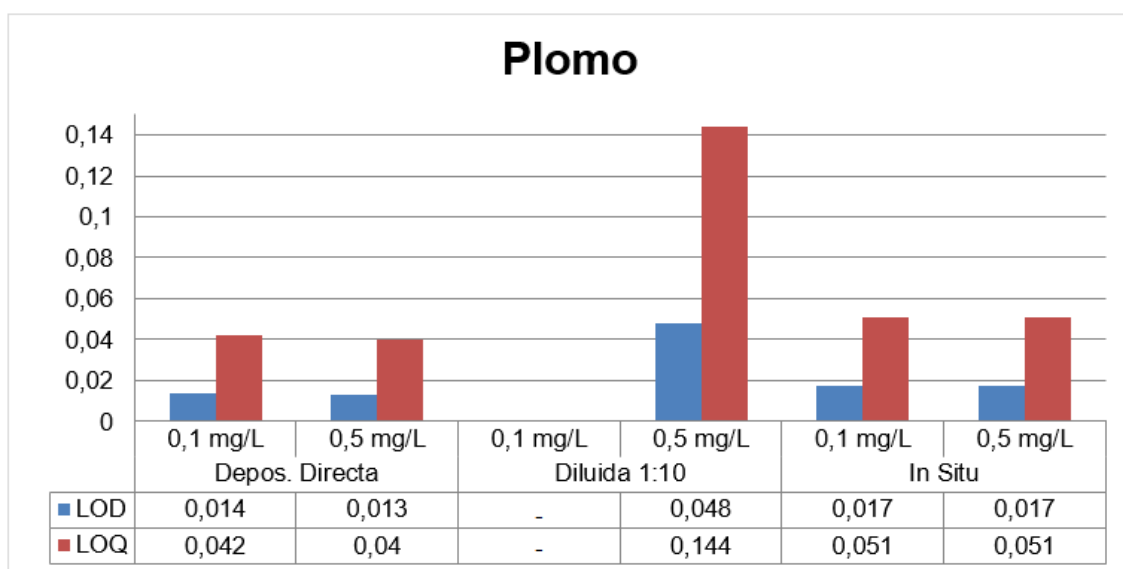


Figura 9. LOD y LOQ de Pb en vino fortificado.

De esta manera, queda evidenciado que el método de deposición directa es el método cuyos límites de detección y cuantificación son los más bajos, como queda ilustrado en las Figuras 7-9. Si bien las mediciones obtenidas utilizando la deposición directa presentan un mayor fondo espectral, también resulta ser el método que, al utilizarse, más cuentas detecta el espectrómetro. Al haber llevado a cabo una digestión in situ se redujo considerablemente el fondo espectral y se redujeron ligeramente las cuentas detectadas por el instrumento en comparación al método de deposición directa.

El método de dilución presenta un fondo espectral mucho menor a los otros dos métodos mencionados, dada la dilución 1:10 que se le realizó a la muestra, lo que llevó a que solo se analizase un 10% de la solución inicial y llevando al equipo a medir algunos elementos por debajo del límite de detección o cuantificación.

Es por entonces que al depositar directamente una muestra de vino sobre el reflector y llevarlo a secado para su posterior medición en el equipo, se evita la contaminación proveniente de reactivos impuros, además de prevenir el corrimiento de gota depositada, que esparce la muestra por el reflector, disminuyendo la concentración en la zona de irradiación de los rayos X incidentes como ocurre en el caso de las digestiones in situ. Si bien en deposición directa se obtiene un fondo espectral mucho mayor a los demás métodos, nos aseguramos que se puede detectar mayor cantidad de muestra por unidad de área, obteniendo lecturas de cuentas mayores, resultando en límites de detección y cuantificación más bajos que en los otros dos métodos.

4.2. Sesgo

La estimación del sesgo se llevó a cabo tomando los valores de referencia del vino ALMA MORA por ICP-MS.

Este método espectrométrico fue elegido dada su elevada sensibilidad y precisión en las mediciones. Comúnmente es elegido como método analítico de referencia, por lo que es útil para esta investigación la utilización del mismo, ya que al comparar los resultados obtenidos con el método estudiado de ICP-MS, se puede estimar la veracidad de las mediciones tomadas por TXRF.

Cabe destacar que, si bien el método de referencia posee límites de detección más bajos que TXRF, posee algunos puntos desfavorables tales como la imposibilidad de medir algunos elementos de manera fiable. Desafortunadamente, dentro de este grupo de especies, se encuentran ciertos elementos que resultan de interés para esta investigación. De los 11 elementos listados inicialmente, solo 7 se pudieron analizar con resultados satisfactorios, siendo estos Mn, Cu, Zn, Ni, Pb, As y Cr. Tanto Fe, P y Ca no se pueden cuantificar por la formación de interferencias inherentes del método.

Existen algunos casos donde a elevadas concentraciones, ciertos elementos saturan los detectores, imposibilitando su cuantificación. Un ejemplo de esto es el caso de K, que se presenta en la mayoría de los vinos analizados a concentraciones superiores a 1000 mg/L. De analizar esta especie, se deberían realizar diluciones sucesivas, disminuyendo la concentración de los otros elementos presentes en la muestra digerida a niveles por debajo del límite de detección, por lo que se prefirió no analizar K en este experimento.

Si bien los otros elementos analizados por ICP-MS no forman parte de la lista inicial, presentan cierto interés para esta investigación. En el caso del Rb y Sr, resultan ser especies que se encuentran comúnmente en suelos y consecuentemente en vinos, y que también presentan muy buena precisión intermedia en el análisis por TXRF e ICP-MS. En el caso de Cd, el interés no radica en la comparación entre métodos (recordemos que no se puede cuantificar por TXRF), si no en verificar los niveles esperados de este elemento en vinos. El análisis arrojó los siguientes datos expresados en la Tabla 30:

Nro. réplica	As 75 (µg/L)	Cd 111 (µg/L)	Cr 52 (µg/L)	Cu 63 (µg/L)	Mn 55 (µg/L)	Ni 60 (µg/L)	Pb 208 (µg/L)	Rb 85 (µg/L)	Sr 88 (µg/L)	Zn 66 (µg/L)
Blanco	0,078	0,023	0,127	0,8	-0,015	0,309	0,71	0,168	0,272	1,16
1	0,178	0,012	3,20	1,39	14,2	1,94	0,804	9,66	13,1	10,4
2	0,204	0,007	3,38	1,20	14,2	0,308	0,482	9,71	13,2	6,49
3	0,191	0,009	3,58	1,34	14,3	0,614	0,464	9,39	14,3	7,00
4	0,177	0,007	-	1,23	14,1	2,55	0,275	9,48	12,9	8,88
5	0,231	0,009	3,27	-	14,3	0,429	0,301	9,74	13,2	7,58
6	-	0,039	3,60	1,79	14,6	1,02	5,74	10,6	13,4	9,43
7	-	0,048	3,38	1,26	14,5	0,475	2,02	9,79	13,6	9,91
8	0,185	0,014	3,58	1,26	14,3	0,356	0,659	9,73	13,2	7,43
9	0,168	0,015	3,26	1,72	14,5	0,484	0,939	9,89	13,4	9,80

Promedio (µg/L)	0,191	0,018	3,41	1,40	14,3	0,907	1,30	9,77	13,4	8,55
Desvío	0,021	0,015	0,16	0,23	0,142	0,798	1,75	0,332	0,399	1,45
Horwitz	20,5	29,4	13,3	15,2	10,7	16,2	15,4	11,4	10,8	11,6
CV%	11,2	84,9	4,70	16,4	0,992	88,0	135	3,40	2,99	16,9
Precisión	Aceptable	No aceptable	Aceptable	No aceptable	Aceptable	No aceptable	No aceptable	Aceptable	Aceptable	No aceptable
Conc. (mg/L)	0,019	0,002	0,341	0,14	1,43	0,09	0,129	0,977	1,34	0,855

Tabla 30. Resultados del análisis multielemental de vinos digeridos por ICP-MS. Para cada elemento se indica la relación m/z utilizada en la cuantificación.

Acorde a los datos obtenidos en la Tabla 30, podemos considerar a los elementos Cr, Mn, Sr y Rb como parámetros para calcular el sesgo entre los dos métodos. Es necesario mencionar que los elementos que se deben elegir en este caso deben cumplir con algunos requerimientos analíticos, tales como baja concentración en el blanco de ataque, buena precisión intermedia y lectura de concentraciones por encima del límite de cuantificación. Es posible que se presenten datos anómalos que deban ser eliminados en mediciones de elementos que presenten buena precisión intermedia (en la Tabla 30 son aquellos marcados en rojo). En la última fila de resultados, podemos apreciar las concentraciones que encontraríamos en el vino previo a la dilución, en mg/L.

Si bien el As cuenta con dos outliers (muestras 6 y 7), posee una precisión intermedia aceptable, acorde a lo descrito en los cálculos de coeficiente de Horwitz (ver Inciso 3.2.3.2 'Reproducibilidad') en relación al coeficiente de variación de las mediciones, aunque se decidió no utilizar este elemento en el cálculo del sesgo. La razón de esta decisión proviene del hecho

que el blanco de ataques posee una concentración de As de 0,078 µg/L, mientras que la concentración promediada en las muestras es de 0,191 µg/L, lo que indicaría que existe una contaminación en los reactivos o materiales utilizados. Por ende, si bien la reproducibilidad es satisfactoria, la concentración medida no es lo suficientemente fiable para ser considerada en el análisis del sesgo, además de que en ninguna medición ejecutada por TXRF se presentaron mediciones por encima del LOD para este elemento, por lo que hubiese sido imposible comparar el sesgo entre el método de referencia y el elegido para esta investigación.

El Cd por ICP-MS no pudo ser cuantificable, dado que se encuentra cerca del límite de detección para este método, esto queda evidenciado por la elevada variación entre muestras analizadas y la discordancia de valores entre estas y el blanco de ataques, aunque este puede provenir por la contaminación del blanco con Cd. Si bien se ha mencionado antes, este elemento no se puede cuantificar por TXRF, imposibilitando aún más la estimación del sesgo de ambos métodos con este elemento.

En el caso de Cr, encontramos una precisión intermedia aceptable y un coeficiente de variación bajo, pese a la eliminación de un dato discordante (réplica 4). Al igual que el As, el Cr no se pudo cuantificar satisfactoriamente por TXRF dado que las concentraciones medidas en vinos se encontraban por debajo del límite de cuantificación, por ende, no es posible calcular el sesgo entre estos dos métodos analíticos para esta especie.

Es necesario señalar una particularidad de esta medición por ICP-MS, en donde el Cr presenta una concentración que ronda los 3 µg/L, teniendo en cuenta que la dilución realizada en esta medición fue de 1:100, la concentración de este elemento en el vino debería rondar los 0,3 mg/L, cuando en la mayoría de las mediciones realizadas por TXRF se encuentran por debajo de 0,1 mg/L, incluso menor al límite de detección, el cual es sustancialmente menor a esta última concentración de Cr.

Este parámetro queda evidenciado no solo por las mediciones de concentración realizadas según el método de pretratamiento por TXRF, si no que queda respaldado por los ensayos de recuperación, donde el porcentaje de recuperación del Cr no excede el 120% al ser fortificado el vino con una solución patrón de este elemento. Sería conveniente realizar estudios futuros al respecto con el fin de localizar el origen de la incompatibilidad y evitar esta discordancia.

Al analizarse Ni, Pb y Cu, se encuentra una concentración alta de estos en el blanco de ataques en relación a los valores obtenidos en las muestras, lo que, sumado a su precisión intermedia insatisfactoria, resultan ser elementos no aptos para la comparación de métodos analíticos.

Para Zn notamos una elevada concentración del elemento en el blanco de ataques y una precisión intermedia no aceptable, tal como se describió en el caso de Ni, Pb y Cu. Al realizarse una comparación rápida con los valores obtenidos por TXRF, se encuentra que los valores de Zn en vinos son el doble al analizarse en esta última técnica si se pre-trata la muestra mediante digestión asistida con horno microondas, aunque tanto en deposición directa como en dilución 1:10 e in situ, los valores obtenidos se asemejan a los obtenidos por ICP-MS.

Por ende, los tres elementos que nos podrían permitir calcular el sesgo del método son Mn, Rb y Sr, pese a que estos últimos dos no formen parte de la lista inicial de los elementos de interés para esta investigación. Todos ellos presentaron una precisión intermedia satisfactoria y una concentración en el blanco de ataque lo suficientemente baja para no interferir con las mediciones. En el caso del Mn, por ejemplo, se puede apreciar una concentración negativa de éste en el blanco, esto es obviamente imposible, dado que es un error de software, aunque se lo interpreta como una concentración muy baja del elemento en una muestra dada.

En base a estos datos, se estimó el sesgo mediante la diferencia entre el valor obtenido con el método de referencia de los elementos elegidos y los valores de concentración promedio de los mismos por TXRF según los diferentes métodos de pretratamientos utilizados. En conjunto con el desvío estándar de las mediciones estimadas por TXRF, se utilizó el tratamiento estadístico t de student, utilizado para discernir si los valores de dos poblaciones distintas difieren significativamente entre sí. De esta manera, se determinó si algunos de los métodos de pretratamiento previos al análisis por TXRF influyeron sobre las lecturas de concentración de los analitos.

Para calcular el coeficiente estadístico t experimental, se contrastaron los valores de referencia para los tres elementos seleccionados anteriormente (Mn, Rb y Sr), con el fin de compararlo con el valor del coeficiente tabulado. En las Tablas 31 a 34 se incluye el desvío estándar de las mediciones realizadas por TXRF según el método de pretratamiento utilizado, ya que nos sirvió para calcular el parámetro t experimental para cada uno.

Elemento	Referencia (mg/L)	Concentración TXRF (mg/L)	Sesgo	Desvío Ref	Desvío Exp	Sesgo %
Mn	1,43	1,36	-0,078	0,014	0,047	-5,44
Rb	0,977	0,864	-0,113	0,033	0,038	-11,6
Sr	1,34	1,17	-0,166	0,040	0,043	-12,4

Tabla 31. Sesgo de las lecturas por método de deposición directa.

Elemento	Referencia (mg/L)	Concentración TXRF (mg/L)	Sesgo	Desvío Ref	Desvío Exp	Sesgo %
Mn	1,43	1,43	-0,002	0,014	0,063	-0,140
Rb	0,977	0,824	-0,153	0,033	0,041	-15,7
Sr	1,34	1,20	-0,138	0,040	0,036	-10,3

Tabla 32. Sesgo de las lecturas por método de dilución 1:10.

Elemento	Referencia (mg/L)	Concentración TXRF (mg/L)	Sesgo	Desvío Ref	Desvío Exp	Sesgo %
Mn	1,43	1,38	-0,051	0,014	0,051	-3,56
Rb	0,977	1,04	0,065	0,033	0,199	6,65
Sr	1,34	1,24	-0,099	0,04	0,057	-7,42

Tabla 33. Sesgo de las lecturas por método de digestión in situ.

Elemento	Referencia (mg/L)	Concentración TXRF (mg/L)	Sesgo	Desvío Ref	Desvío Exp	Sesgo %
Mn	1,43	1,63	0,201	0,014	0,245	14,0
Rb	0,977	0,832	-0,145	0,033	0,097	-14,8
Sr	1,34	1,10	-0,232	0,040	0,156	-17,4

Tabla 34. Sesgo de las lecturas por método de digestión asistida con horno microondas.

Acorde a los datos listados anteriormente, se procedió a estimar los grados de libertad, el coeficiente t tabulado y el coeficiente t experimental, según lo descrito en el inciso 3.2.3.5 'Sesgo', determinados en la Tabla 35. Cabe recordar que los valores de grados de libertad deben ser siempre números enteros, de no serlo, se redondean los decimales para abajo en todos los casos.

Elemento	Directa (n=10)	Diluida (n=9)	In situ (n=10)	Digestión (n=9)
Mn	10,7	8,79	10,5	8,05
Rb	17,0	15,3	9,55	9,83
Sr	17,0	15,8	16,1	9,05

Tabla 35. Grados de libertad para cada método y elemento analizado.

En base a los grados de libertad y el porcentaje de confianza estipulados en la sección de ecuaciones utilizadas, se tomaron los siguientes datos de la Tabla 36 para cada tratamiento realizado:

Elemento	Directa (n=10)	Diluida (n=9)	In situ (n=10)	Digestión (n=9)
Mn	2,228	2,306	2,228	2,306
Rb	2,120	2,131	2,262	2,262
Sr	2,120	2,131	2,120	2,262

Tabla 36. Resultados de t tabulados para cada elemento y método analizado.

Ya calculados los t de tabla, se llevó a cabo la estimación experimental de este parámetro. En la Tabla 37, los valores experimentales que superen los tabulados, se encuentran resaltados en rojo, mientras aquellos que se encuentren por debajo de su t de tabla correspondiente, se encuentran señalados en verde. Se deben entender estos valores de manera absoluta independientemente de si son positivos o negativos.

Elemento	Directa (n=10)	Diluida (n=9)	In Situ (n=10)	Digestión (n=9)
Mn	-5,00	-0,108	-3,03	2,59
Rb	-6,93	-8,71	1,02	-4,45
Sr	-8,73	-7,67	-4,41	-4,54

Tabla 37. Resultados de t experimental para cada elemento y método analizado.

De esta manera se comprueba que las mediciones de los elementos realizadas por TXRF según los distintos métodos poseen sesgos significativos en todos los casos excepto para Mn en dilución 1:10 y Rb en digestión in situ, dado que sus valores experimentales de coeficiente t son menores a los tabulados correspondientes en la Tabla 36.

El argumento estadístico t de student considera como única fuente de incertidumbre el desvío estándar de las muestras analizadas según el método analítico utilizado. Si bien es una aproximación fidedigna para estimar si dos poblaciones muestrales difieren significativamente entre sí, es necesario recordar que la incertidumbre de un método analítico no solo depende del desvío estándar instrumental de las mediciones, sino que también dependen de las fuentes de incertidumbre que se presentan a lo largo del análisis, de los instrumentos y de los métodos empleados.

En el caso de ICP-MS, si bien se utiliza como método analítico de referencia, se requieren de sucesivas diluciones de la muestra y una digestión previa, lo que puede influir en la

incertidumbre de la medición. Esto significa que el sesgo no depende solamente del promedio de concentración y del desvío estándar de las muestras, sino de la incertidumbre del método también.

Si bien existe un sesgo entre el método analítico de referencia y el experimental, cabe recordar que el sesgo porcentual solo supera el 15% en dos tratamientos (Rb en dilución 1:10 y Sr en digestión asistida con horno de microondas). Los datos obtenidos con un porcentaje menor al 15% resultaron ser aceptables para los objetivos de nuestra investigación, por lo que se decidió no rechazar los métodos experimentales analizados en base a este argumento estadístico, que se encuentren por debajo de dicho porcentaje.

En resumen, se observó que todos los métodos de pretratamiento se encuentran sesgados para los tres elementos que presentaron una reproducibilidad aceptable en el análisis de ICP-MS, sin embargo, la corrección del sesgo se puede realizar mediante la calibración de los equipos utilizados. Sólo dos elementos en determinados métodos de pretratamiento de este análisis se encontraron mínimamente sesgados. Sin embargo, como se describió anteriormente, la fuente de variación provenía exclusivamente de los desvíos estándares de las mediciones, si bien esta fuente de error es comúnmente utilizada a la hora de validar los métodos analíticos, al usarse diversos instrumentos en los laboratorios, se debe tomar en cuenta también la incertidumbre de los mismos. Por ende, aunque se presente un sesgo en el análisis por TXRF, podemos considerar que los datos de concentración obtenidos pueden ser aceptados, dado que el sesgo porcentual no supera el 17% en ninguno de los tipos de pretratamiento utilizado (Tablas 31-34).

4.3. Pros y contras de cada método

Con el fin de determinar el mejor método de pretratamiento para el análisis de vinos por TXRF, se crearon tablas comparativas de los métodos probados en este trabajo, descritas en las Tablas 38 a 41. Para ello, se tomaron los pros y contras de cada tipo de pretratamiento utilizado, en base a lo observado durante el desarrollo de esta investigación.

Pros	Contras
<ul style="list-style-type: none">• Requiere menos tiempo.• No se necesitan reactivos (excepto estándar interno).• Método menos costoso.• No requiere dilución de ningún tipo.• Segundo método con menor LOD y LOQ.• Método que más cuentas por segundo detecta el instrumento para todos los elementos excepto Ga.• Las mediciones presentan una buena precisión intermedia para la mayoría de los elementos detectados.	<ul style="list-style-type: none">• Método que mayor fondo espectral produce.• La muestra se seca en su totalidad con mayor dificultad.• La gota depositada puede correrse con facilidad.

Tabla 38. Pros y contras del método de deposición directa.

Pros	Contras
<ul style="list-style-type: none"> • Método con 2do fondo espectral más bajo. • Solo requiere agua destilada como reactivo adicional. • Método que más cuentas de Ga detecta el instrumento. • La gota depositada en el reflector se seca más rápidamente, además de evitar su corrimiento. • Las mediciones presentan una buena precisión intermedia para casi todos los elementos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Método con LOD y LOQ más altos. • La dilución afecta a la detección de los elementos en bajas concentraciones. • Cuentas bajas para todos los elementos excepto Ga. • La contaminación se puede ver amplificada al multiplicarse por diez la concentración observada de los elementos.

Tabla 39. Pros y contras del método de dilución 1:10.

Pros	Contras
<ul style="list-style-type: none"> • Leve disminución del fondo espectral. • LOD y LOQ similares a deposición directa. • A diferencia de la digestión asistida por horno de microondas, su operación es más rápida. 	<ul style="list-style-type: none"> • Requiere de reactivos muy puros. • Leve disminución en las cuentas por segundo detectadas. • Resulta ser más caro al necesitarse reactivos muy puros. • La mezcla ácida aumenta el desplazamiento de la gota en el reflector. • El fondo espectral no disminuye de manera considerable (~20%), considerando el fundamento del método. • Reacciona con Cl, disminuyendo las cuentas por segundo detectadas del mismo considerablemente. • Presenta una precisión intermedia insatisfactoria para 4 de los 12 elementos detectados en las mediciones.

Tabla 40. Pros y contras del método de digestión in situ.

Pros	Contras
<ul style="list-style-type: none"> • Método que menor fondo espectral produce en las mediciones. • Método con valores de LOD y LOQ más bajos. • Eliminación de interferencias en forma de sustancias orgánicas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Presenta una repetibilidad insatisfactoria para todos los elementos analizados. • Las cuentas se reducen considerablemente. • Es el método más costoso. • Se requiere de equipamiento adicional. • Los reactivos deben ser de muy buena calidad. • Se debe diluir la muestra. • No sirve para elementos en bajas concentraciones. • No se detectan elementos que en otros métodos de pretratamiento si. • Requiere de varias horas de preparación. • La deposición de la muestra puede ser problemática por la presencia de ácidos que desplazan la gota en el reflector.

Tabla 41. Pros y contras del método de digestión asistida por horno de microondas.

Si bien durante un procedimiento analítico lo ideal sería obtener un método que cumpla con todos los parámetros esperados de manera óptima, esto no resulta ser posible, por lo que se recurre a la elección de un método que no solo cumpla con la mayoría de los parámetros estadísticos, sino que también resulte ser práctico, accesible y fácil de utilizar.

Es por esto, que al estudiar los puntos a favor y en contra, se pueden analizar tanto las cuestiones analíticas como prácticas del método. Como se puede observar en la sección 4.4 'Análisis de vinos argentinos', el tipo de pretratamiento escogido fue el de deposición directa. La razón detrás de esta elección se basó en el hecho que las mediciones presentan una reproducibilidad satisfactoria para la mayoría de los elementos analizados, límites de detección y cuantificación a niveles similares a los de digestión asistida por horno microondas, además de ser el método más rápido y barato de los cuatro analizados en este trabajo. De esta manera obtenemos un método analítico que no solamente resulta realizable en la mayoría de los

laboratorios que cuenten con un espectrómetro de TXRF, sino que es el método que mejor se ajusta a los parámetros de rigor analítico.

4.4. Análisis de vinos argentinos

Cabe destacar que si bien el objetivo inicial se basó en el análisis de diversos vinos de un mismo varietal, pero de distintas bodegas y zonas geográficas, se decidió realizar un análisis más exhaustivo sobre los viñedos localizados en la provincia de Mendoza. La abundancia de las bebidas procedentes de la región de Luján de Cuyo radica en el hecho que la mayoría de los viñedos de varietal Malbec provienen de esta zona de la provincia. Se analizaron algunos vinos de diversas provincias del territorio argentino, tales como Neuquén, Río Negro, Salta y San Juan, con la finalidad de verificar si existen diferencias preliminares entre las concentraciones de los elementos presentes según su región geográfica.

A continuación, se presentarán los valores de concentración para algunos de los 11 elementos listados inicialmente; aquellas muestras procedentes de la provincia de Mendoza se encuentran identificadas con el color azul en los gráficos, mientras que los vinos provenientes de otras provincias, se encuentran en rojo. Además de otros elementos que, si bien no forman parte de la lista inicial, pueden ser de particular interés para esta investigación. También se incluyen en los gráficos de manera preliminar las incertidumbres para las mediciones de cada elemento, en base al coeficiente de variación obtenido en la Tabla 6 del Inciso 4.1.4.1 'Deposición directa'.

En el caso de As, Cr, Pb y Ni, no se encontraron valores que superen el límite de cuantificación para estas especies, acorde a los datos listados en las Figuras 7-9 del inciso 4.1.7.1 'Límites de detección y cuantificación'. De esta manera, se puede concluir que todos los vinos analizados cumplen con los valores máximos permitidos según la OIV y el INV para estos elementos, exceptuando el Ni, el cual no cuenta con una concentración máxima establecida en dichas legislaciones.

4.4.1. Cobre

Al haberse analizado Cu en vinos de Mendoza, se encontraron dos valores significativamente distintos al resto de la población. Si bien se encuentran por debajo de los niveles máximos estipulados por la OIV y el INV, sería interesante conocer la fuente de esta variación en la concentración.

El valor promedio visto en la Figura 10 para los vinos de Mendoza resultó ser de 0,203 mg/L, mientras que el rango observado fue de 0,481 mg/L. En el caso de las muestras de diversas regiones, se encontró que los vinos Fin del Mundo (Neuquén) y Marcus (Río Negro) poseen

más de dos veces la cantidad de Cu que el vino Alma Mora (San Juan) y cerca del cuádruple para el vino Callia (San Juan).

Al realizarse el promedio de las 5 muestras provenientes de zonas ajenas a la provincia de Mendoza, se encuentra que el valor es de 0,137 mg/L, con un rango de 0,157 mg/L, aunque algunos valores observados son varias veces mayores a otros.

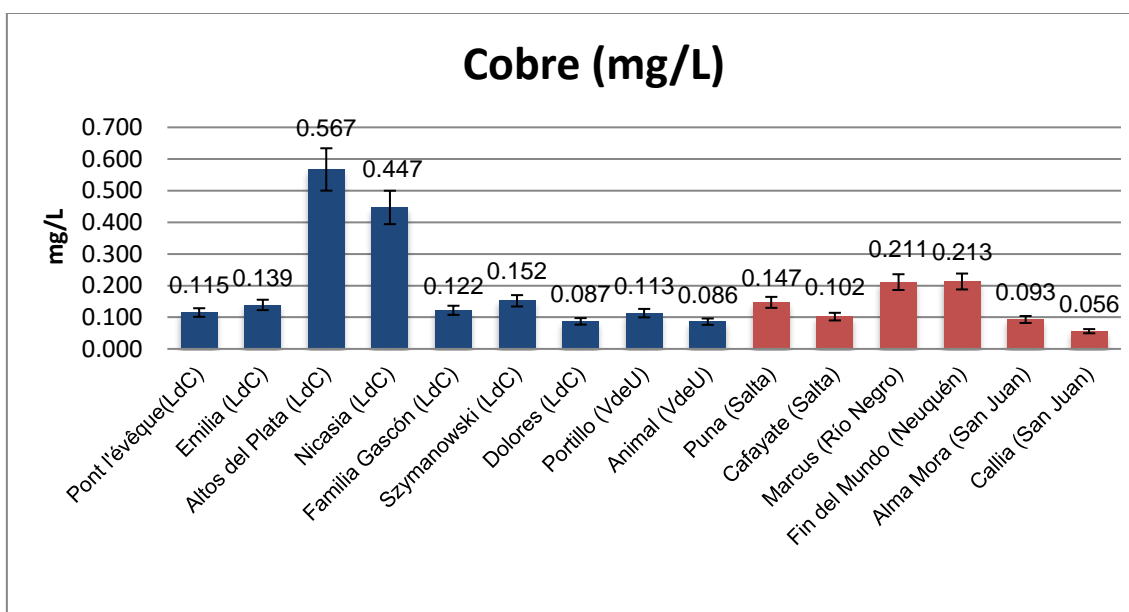


Figura 10. Valores de Cu en los distintos vinos analizados.

4.4.2. Hierro

Al haberse analizado Fe en muestras de la provincia de Mendoza, se encuentra una dispersión de datos relativamente amplia (rango de 1,67 mg/L) y una cantidad promedio de 2,09 mg/L.

Este rango de datos indicaría que la presencia del Fe podría depender no solo de la región y el suelo, sino de factores antrópicos durante las diversas etapas de producción de la bebida. Acorde a la Figura 11, las muestras de las otras provincias presentaron una dispersión de 0,92 mg/L y una concentración promedio de 2,46 mg/L.

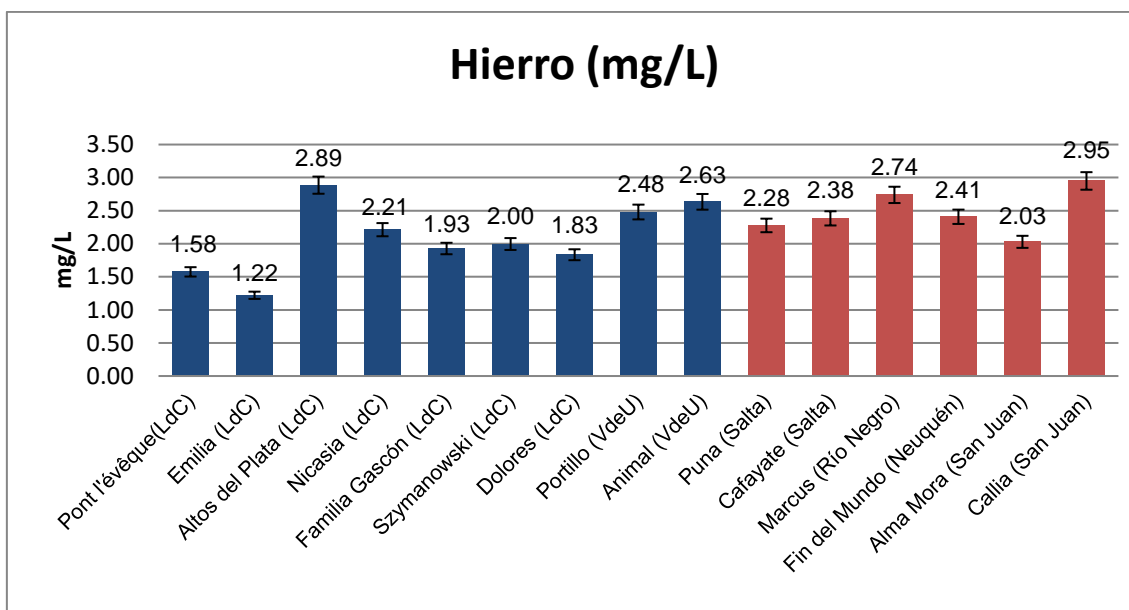


Figura 11. Valores de Fe en los distintos vinos analizados.

4.4.3. Manganeseo

Según lo listado en la Figura 12, los vinos mendocinos presentan una cantidad de Mn promedio de 1,18 mg/L y un rango de 0,54 mg/L, mientras que los vinos de otras provincias promedian una cantidad de 1,18 mg/L con un rango de datos de 0,79 mg/L.

Es necesario recordar que según lo visto en el estudio realizado por Tariba (2011), el límite máximo aceptable para Mn en vinos no se encuentra definido por la OIV o por las legislaciones de la mayoría de los países con actividad vitivinícola. La presencia de este elemento suele estar ligada a la composición de los suelos, por lo que varía geográficamente. A modo de crear comparaciones en ausencia de límites aceptables establecidos, se encuentra que en muestras de vinos de Uruguay, los rangos de concentración de este elemento oscilan entre 0,74-2,2 mg/L, mientras que en vinos de Italia, Serbia y España, se encuentran en el rango de 1,25-2,33 mg/L, 0,4-3,65 mg/L y 0,186-0,7 mg/L respectivamente.

De manera preliminar, se podría afirmar que la cantidad de Mn no posee una gran variación según la región, dada la pequeña diferencia entre los valores observados. Para estimar si existe una discrepancia significativa, sería prudente analizar varios vinos según distintas regiones y comparar estadísticamente las diferencias en concentración.

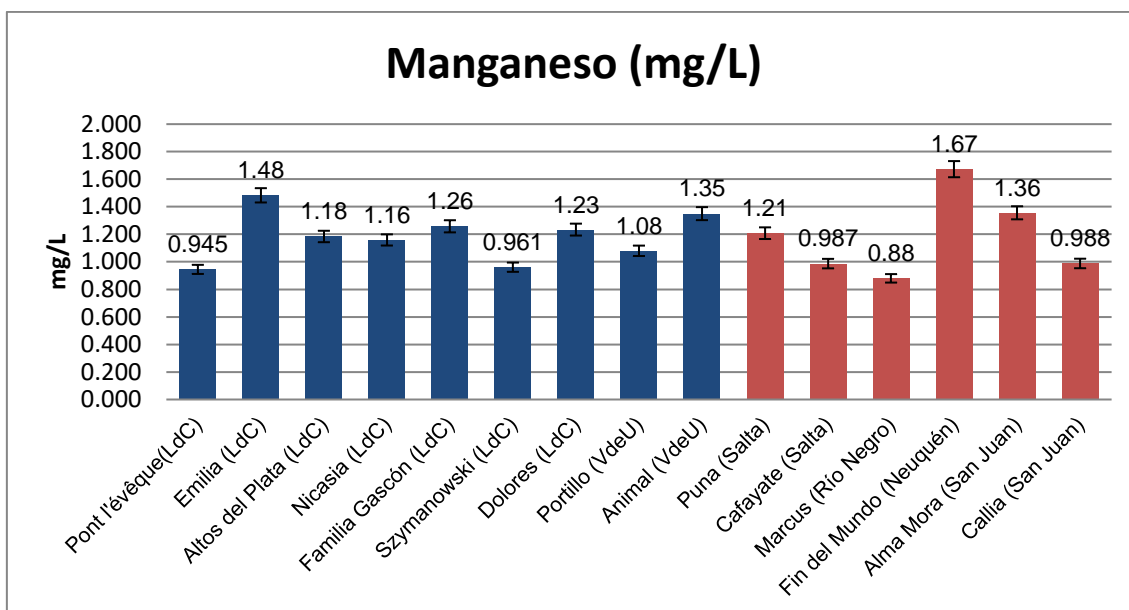


Figura 12. Valores de Mn en los distintos vinos analizados.

4.4.4. Níquel

No se detectó Ni en las muestras de vino analizadas en este inciso. Si bien no se estimaron los límites de detección o cuantificación para este elemento, a modo de estimar los valores posibles, se encuentra que en vinos de otros países tales como en Francia y República Checa, las concentraciones observadas se sitúan en el rango de $5.4 \cdot 10^{-3}$ –0.0879 mg/L y 0.0198–0.0345 mg/L respectivamente (Tariba, 2011).

4.4.5. Zinc

Los niveles de Zn promedio en las muestras analizadas de procedencia mendocina corresponden a una concentración de 0,621 mg/L, además de tener un rango de 0,284 mg/L, de esta manera, se encuentran cantidades de Zn que no fluctúan demasiado entre los distintos vinos analizados. En cambio, para los vinos de las otras provincias se encontró una concentración promedio de 0,76 mg/L y un rango de 0,871 mg/L.

El dato que es imperioso remarcar en la Figura 13 resulta ser el del vino Fin del Mundo, procedente de Neuquén, el cual posee más del doble del promedio encontrado en los vinos mendocinos.

Al compararse las mediciones obtenidas, ningún vino supera los niveles máximos estipulados para Zn según la OIV.

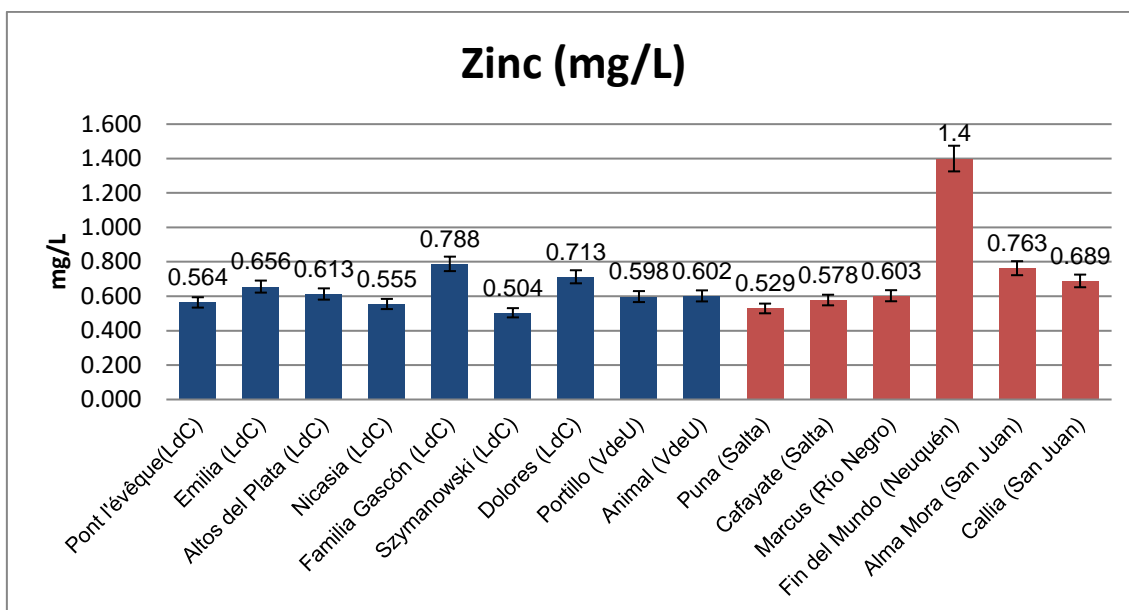


Figura 13. Valores de Zn en los distintos vinos analizados.

4.4.6. Arsénico

Las concentraciones de As no solo se encontraron por debajo de los niveles máximos aceptables según la OIV (0,2 mg/L, Tabla 2), sino que en los vinos Altos del Plata, Nicasia, Familia Gascón, Szymanowski, Dolores, Portillo, Animal, Cafayate, Fin del Mundo y Callia se detectó As aunque por debajo del LOQ (0,021 mg/L). Esto es ciertamente una ocurrencia positiva, dado que el As es detectable en niveles inferiores al máximo estipulado, de modo que todos los vinos analizados cumplen con los parámetros establecidos por el ente regulador.

4.4.7. Cromo

En el caso de Cr, se detectó en solo 5 muestras (Szymanowski, Portillo, Cafayate, Fin del Mundo y Callia) ninguna de las cuales se encontraron por encima del LOQ (0,09 mg/L), cumpliendo con los parámetros establecidos por la INV y OIV para este elemento.

4.4.8. Plomo

No se ha detectado Pb, siendo 14 µg/L valor del LOD. Cabe recordar que el nivel máximo definido por la OIV resulta ser de 0.15 mg/L, mientras que para la INV es de 0,1 mg/L, por lo que todos los vinos analizados cumplen con las especificaciones según dichas organizaciones.

4.4.9. Fósforo

Se encontró P, acorde a la Figura 14, en todas las muestras de vinos mendocinos. Las concentraciones corresponden a un valor promedio de 214 mg/L y un rango muestral de 67 mg/L. Con respecto a las muestras de otras zonas, la cantidad promedio de P encontrada fue de 237 mg/L con un rango de 71 mg/L; a simple vista, se observa que los valores de P son ligeramente mayores, aunque considerando que provienen de regiones diferentes, se requeriría de mayor cantidad de muestras de diversas zonas para realizar una comparación estadística fidedigna. Esta ocurrencia se presenta para todos los elementos estimados a continuación:

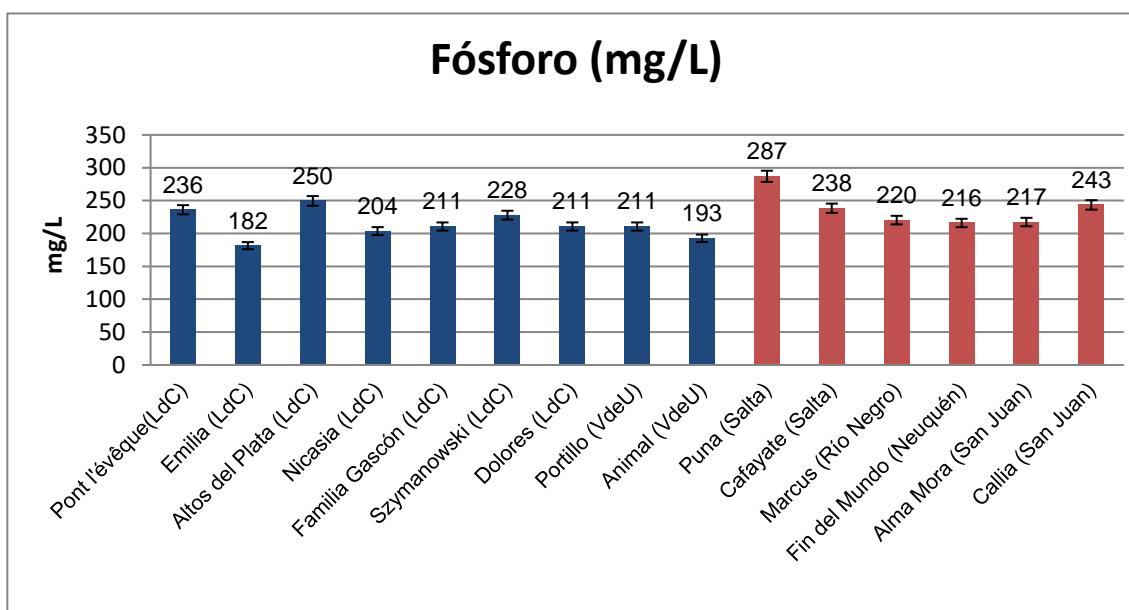


Figura 14. Valores de P en los distintos vinos analizados.

4.4.10. Calcio

En el caso del Ca, el valor promedio de concentración para los vinos mendocinos es de 61,4 mg/L, con un rango de 16,3 mg/L, mientras que el promedio entre los 5 vinos ajenos a esta provincia resultó ser de 58,3 mg/L, presentando un rango de 26,9 mg/L.

Es necesario resaltar la diferencia observada en la Figura 15 entre el valor promedio de los vinos mendocinos en comparación a los de otras provincias, que presentan cantidades de Ca variables, lo que podría indicar una diferencia en la cantidad de Ca en suelos de otras provincias en comparación a los de Mendoza, aunque con el número de mediciones realizadas, no es posible confirmar dicho postulado.

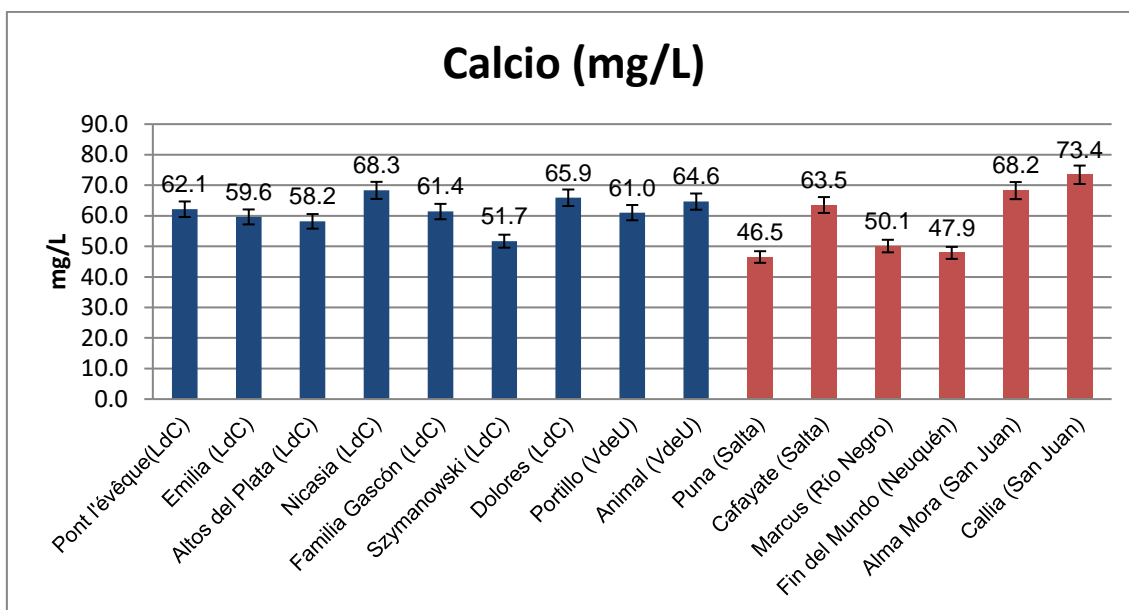


Figura 15. Valores de Ca en los distintos vinos analizados.

4.4.11. Potasio

Los vinos mendocinos presentaron una concentración de K promedio de 1216 mg/L y un rango muestral de 413 mg/L. En el caso de los vinos de San Juan, Salta, Río Negro y Neuquén, el valor promedio resultó ser de 1207 mg/L con un rango estadístico de 373 mg/L.

Si bien los valores de concentración observados en la Figura 16 no varían entre sí a simple vista, se debería llevar a cabo un análisis más exhaustivo para los vinos de cada provincia con el fin de dilucidar si existen discrepancias significativas entre las regiones, dado que de manera preliminar, el coeficiente de variación de los valores promediados resulta ser de alrededor del 5%.

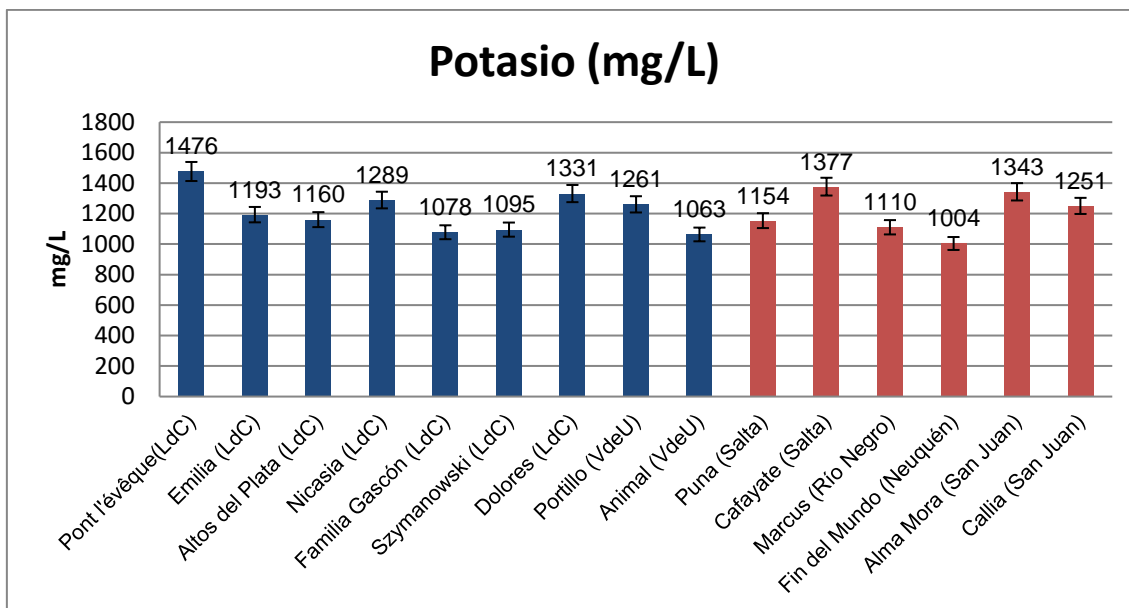


Figura 16. Valores de K en los distintos vinos analizados.

4.4.12. Rubidio

Si bien las mediciones realizadas hasta este punto corresponden a las especies listadas inicialmente, se optó también por analizar otros elementos de interés secundario, siendo estos Br (dada la presencia de este en los niveles máximos estipulados por la OIV), Rb y Sr por su utilidad en el cálculo del sesgo analítico y su utilidad en la comparación de mediciones, y S por su potencial utilidad en análisis bromatológicos.

Al haberse analizado Rb, se encuentra en la Figura 17 que los valores de los vinos mendocinos son, en promedio 0,754 mg/L, mientras que los de las otras zonas del país son de 1,18 mg/L. Los rangos fueron de 0,245 mg/L y 1,92 mg/L, respectivamente.

Esto podría sugerir que los valores de Rb son muy dependientes del suelo o de los factores ambientales donde se lleve a cabo la actividad vitivinícola, como ha sido reportado por Di Paola-Naranjo et al. (2011), ya que en nuestra investigación, los valores de los vinos de las distintas zonas difieren entre sí considerablemente, y a la vez, estos difieren también de los vinos mendocinos. Los vinos sanjuaninos, a simple vista guardan cierta relación con las concentraciones encontradas en las muestras provenientes de Mendoza. Sería beneficioso realizar los análisis de vinos de las diversas provincias para poder determinar si este elemento puede ser indicador de las diversas regiones vitivinícolas, según la cantidad del mismo en la bebida, teniendo en cuenta que Rb no posee fuentes de contaminación en laboratorio y posee un bajo LOQ (39 µg/L), como se ha visto en la Tabla 11.

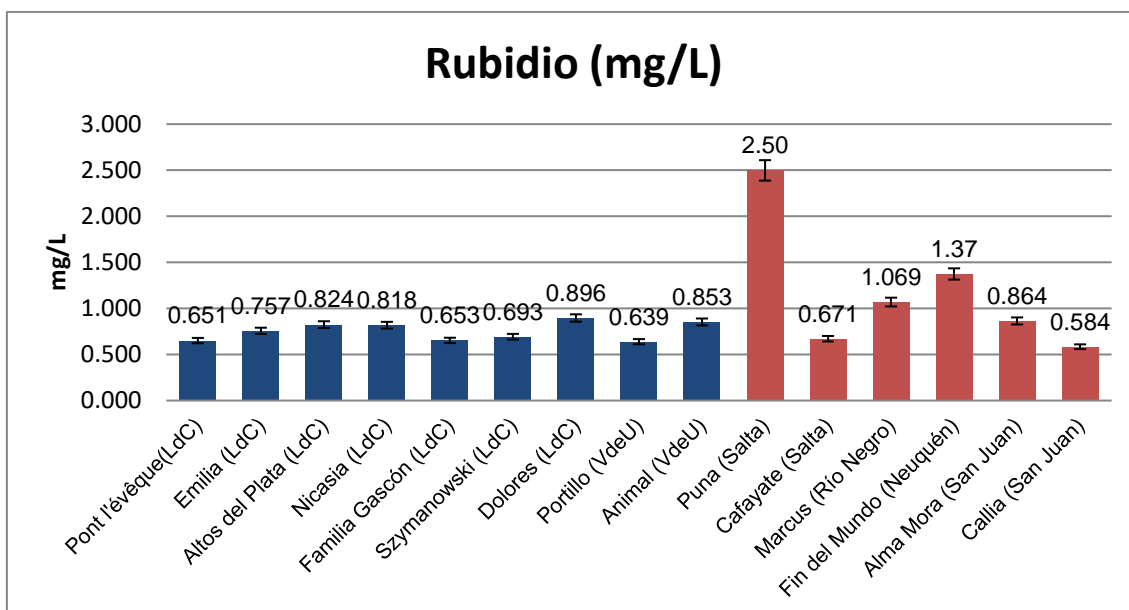


Figura 17. Valores de Rb en los distintos vinos analizados.

4.4.13. Estroncio

Los niveles observados de Sr en las muestras de Mendoza ilustrados en la Figura 18 arrojan un valor promedio de 1,13 mg/L y un rango de 0,33 mg/L, mientras que los vinos de diversas provincias marcan un promedio de concentración de 0,980 mg/L y un rango de 0,538 mg/L; en este caso, el vino Puna (Salta) presenta una concentración de Sr menor que los demás.

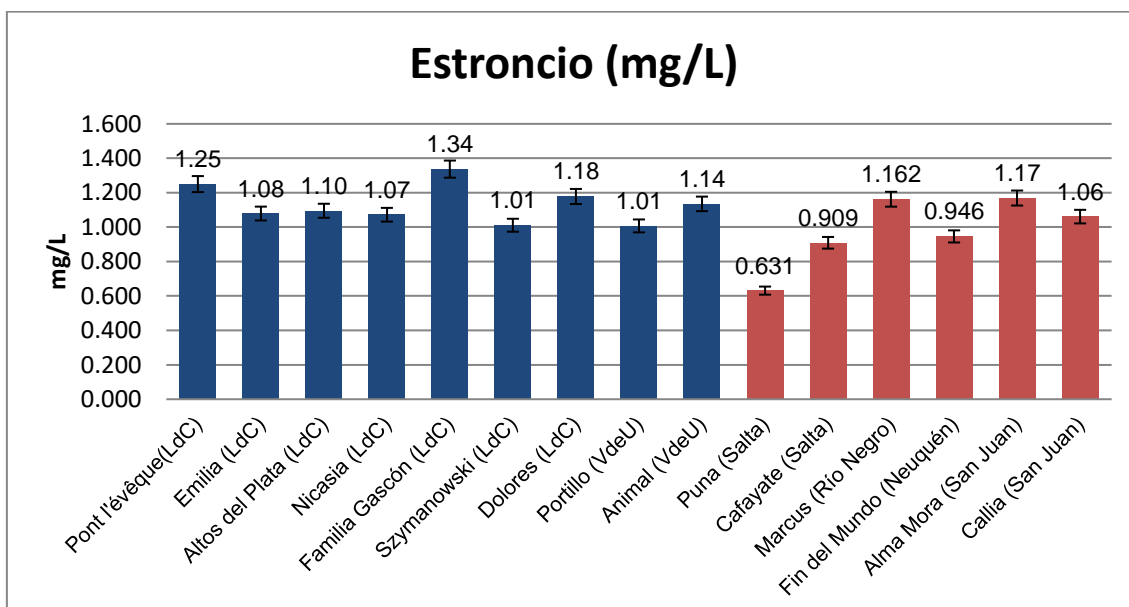


Figura 18. Valores de Sr en los distintos vinos analizados.

4.4.14. Bromo

El Br posee un nivel máximo permitido de 1 mg/L y como veremos en la Figura 19, ninguna de las muestras analizadas supera este nivel establecido, sumado a esto, el límite de cuantificación es inferior a las lecturas de todas las muestras analizadas, por lo que se pudo cuantificar muestras de alrededor de 30 µg/L.

El promedio de las mediciones obtenidas correspondientes a la provincia de Mendoza resultó ser de 0,095 mg/L, con un rango de 0,142 mg/L. Como vemos, se encuentra una elevada variación entre las concentraciones medidas, lo que podría indicar que exista uno o más factores, además del suelo, que influyan en las concentraciones de Br en vinos de esta región. Las muestras de vino de diversas provincias muestran cierta variación también, con un rango de 0,177 mg/L y una cantidad de Br promedio de 0,097 mg/L.

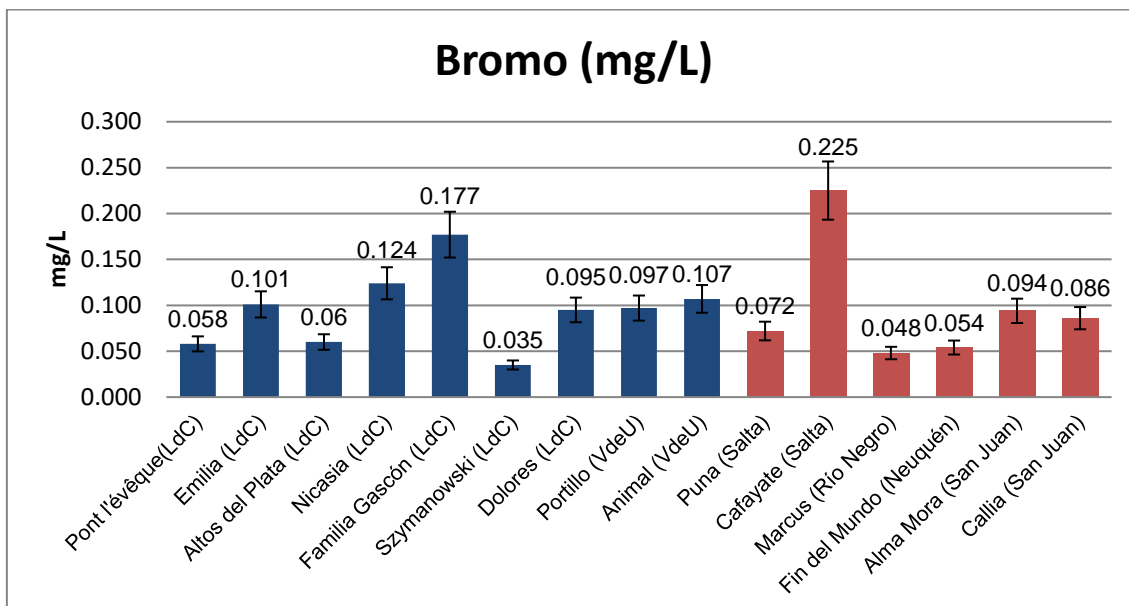


Figura 19. Valores de Br en los distintos vinos analizados.

4.4.15. Azufre

El análisis realizado para las muestras de Mendoza indica que el promedio de concentración de S encontrado es de 117 mg/L, además de observar un rango de 57,4 mg/L, mientras que en las muestras de otras provincias se encontró una cantidad promedio de 101 mg/L y un rango muestral de 54,3 mg/L.

Un dato interesante de la Figura 20 que cabe remarcar es la significativa diferencia de S en el vino neuquino con respecto a los demás.

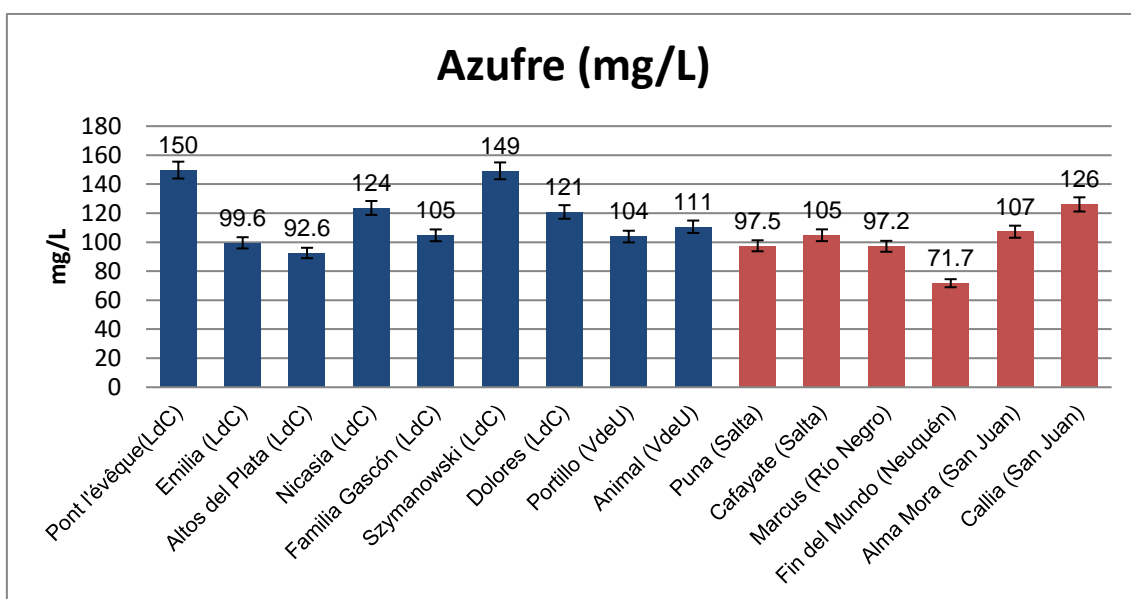


Figura 20. Valores de S en los distintos vinos analizados.

5. Discusión

5.1. Consideraciones finales y Prospectos futuros

Se presenta un método de análisis de vinos que resulta ser rápido, muy reproducible, asequible y que también posee la suficiente sensibilidad para determinar la presencia de elementos por debajo del límite máximo establecido por las organizaciones de actividad vitivinícola.

Si bien esta investigación resultó en el desarrollo de un método analítico para vinos que cumplió con varias de las metas propuestas, es necesario listar otras ideas que podrían ser fructíferas para investigaciones futuras:

- Realización de ensayos de fortificación para determinar el LOD y LOQ para otros elementos de posible interés.
- Realización de ensayos de fortificación en métodos de referencia para contrastar el análisis por TXRF y calcular el sesgo de los elementos en concentraciones bajas en vino.
- Analizar fuentes de incertidumbre.
- Cálculo del sesgo entre métodos mediante la utilización de parámetros que consideren la incertidumbre observada a lo largo del análisis, tal como el test Z.
- Repetir los ensayos de digestión con los reactivos más puros posibles.
- Comparar los resultados obtenidos con varios vinos de otras regiones del país.
- Estudiar posibles fuentes de variación en la concentración de los elementos entre distintas regiones.

6. Conclusiones

Teniendo en cuenta el trabajo realizado a lo largo de la investigación, podemos concluir que:

- Esta técnica espectroscópica resulta ser útil para el análisis elemental de vinos, donde queda evidenciado que las lecturas de concentración estimadas se pueden detectar y cuantificar a niveles sub-traza.
- Permite obtener información sobre las concentraciones de las especies presentes de manera confiable por debajo de los niveles máximos permitidos de estos elementos según las diversas organizaciones que regulan la actividad vitivinícola.
- Se logró el trazado de comparaciones de las cifras de mérito entre los distintos métodos de pretratamiento con los argumentos estadísticos planteados al comienzo de la investigación de manera satisfactoria.
- El método de pretratamiento que mejor se adecua a la naturaleza de las muestras resultó ser la deposición directa tanto desde el punto de vista analítico como práctico. Analíticamente posee niveles de detección y cuantificación bajos comparados con los otros métodos, cuenta con una precisión intermedia para la lectura de la concentración de los elementos satisfactoria y además resulta ser el método que permite la detección de cuentas por segundo en mayor cantidad de los 4 métodos estudiados. La practicidad de este método radica en la rapidez y bajo costo de operación, dado que no se precisa de equipamiento como hornos digestores, o reactivos de elevada pureza.
- Tanto el método de pretratamiento como la técnica instrumental elegida resultan ser aptos para crear comparaciones entre las concentraciones de elementos en vinos producidos de diversas regiones geográficas.
- La técnica posee potencial para realizar un perfilado multielemental de vinos según su región.
- El método de espectrometría por TXRF provee resultados confiables con menor cantidad de recursos y con mayor rapidez que otras técnicas espectrométricas.
- Todos los elementos de interés listados pueden ser cuantificados de manera satisfactoria.
- Se comprobó la existencia de un sesgo con respecto al método de análisis de referencia, que no superó el 12,4%.
- Fue posible estimar los LOD y LOQ de los elementos As y Pb, que resultan ser interferentes espectrales entre sí, mediante el ensayo de fortificación.
- Todos los vinos analizados a lo largo de esta investigación resultaron cumplir con los niveles guía establecidos por las legislaciones tanto nacionales como internacionales.
- A lo largo de esta tesina, se aprendió sobre como operar un espectrómetro de TXRF, los distintos tipos de pretratamiento de muestra disponibles y en que situaciones utilizar cada uno, además de la interpretación de los gráficos y datos obtenidos a partir de este método analítico.

- También se ilustró sobre la utilidad y finalidad de los métodos analíticos de referencia, su importancia a la hora de validar un método y como realizar las comparaciones pertinentes entre los mismos.

Como se ha visto a lo largo de esta investigación, se desarrolló este trabajo con la finalidad de validar este método con el mayor rigor científico posible, para ello se debió recurrir a técnicas de elevada sensibilidad con la finalidad de comparar la precisión del método, como fue el caso de ICP-MS, además de experimentar con varias metodologías de pretratamiento con la finalidad de encontrar las variaciones, pros y contras de cada una. Cabe destacar también que los ensayos realizados en este trabajo estuvieron basados en las investigaciones previamente citadas que funcionaron de fundamental importancia para la realización de no sólo los experimentos, si no de los procedimientos científicos para llevar a cabo la estructura de la tesis, tanto desde el lado estructural como procedimental.

De esta manera se concluye que el análisis de vinos argentinos mediante la técnica instrumental de TXRF en conjunto con el método de pretratamiento de deposición directa se adecúa con lo pautado en el objetivo general de la investigación y los objetivos específicos de manera satisfactoria, en base a las conclusiones listadas en este inciso.

7. Bibliografía

Alsecz, A., Osán, J., Kurunczi, S., Alföldy, B., Várhegyi, A., & Török, S. (2007). Analytical performance of different X-ray spectroscopic techniques for the environmental monitoring of the recultivated uranium mine site. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62(8), 769–776.

AOAC International, AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures (1998), Rockville, MD, USA.

Barreiro Grille, T. (2015). Medida de Impurezas Metálicas y Relaciones Isotópicas de Plomo en Muestras Arqueológicas Mediante ICP-MS [Tesis de Maestría, Universidad de Oviedo]. Repositorio de la Universidad Nacional de Oviedo.

Bruker Corporation (2011). *S2 Picofox Manual*.

Carvalho, M. L., Barreiros, M. A., Costa, M. M., Ramos, M. T., & Marques, M. I. (1996). Study of heavy metals in Madeira wine by total reflection X-ray fluorescence analysis. *X-Ray Spectrometry*, 25(1), 29–32.

Carvalho, M. L., Custódio, P. J., Reus, U., & Prange, A. (2001). Elemental analysis of human amniotic fluid and placenta by total-reflection x-ray fluorescence and energy-dispersive X-ray fluorescence: Child weight and maternal age dependence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 56(11), 2175–2180.

Carvalho, M. L., Magalhães, T., Becker, M., & von Bohlen, A. (2007). Trace elements in human cancerous and healthy tissues: A comparative study by EDXRF, TXRF, synchrotron radiation and PIXE. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62(9), 1004–1011.

Dalipi, R., Marguá, E., Borgese, L., Bilo, F., & Depero, L. E. (2016). Analytical performance of Benchtop Total Reflection X-ray fluorescence instrumentation for multielemental analysis of wine samples. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 120, 37–43.

De La Calle, I., Cabaleiro, N., Romero, V., Lavilla, I., & Bendicho, C. (2013). Sample pretreatment strategies for total reflection X-ray fluorescence analysis: A tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 90, 23–54.

De Vives, A. E., Moreira, S., Brienza, S. M., Medeiros, J. G., Filho, M. T., Zucchi, O. L., do Nascimento Filho, V. F., & Barroso, R. C. (2007). Species arboreal as a bioindicator of the environmental pollution: Analysis by SR-TXRF. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 579(1), 494–498.

Di Paola-Naranjo, R. D., Baroni, M. V., Podio, N. S., Rubinstein, H. R., Fabani, M. P., Badini, R. G., Inga, M., Ostera, H. A., Cagnoni, M., Gallegos, E., Gautier, E., Peral-García, P., Hoogewerff, J., & Wunderlin, D. A. (2011). Fingerprints for main varieties of Argentinean wines: Terroir differentiation by inorganic, organic, and stable isotopic analyses coupled to chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(14), 7854–7865.

Fernández-Ruiz, R., & Bermúdez, V. (2005). Determination of the Ta and Nb ratio in Linb1–XTAXO3 by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60(2), 231–235.

Fernández-Ruiz, R., (2010). Fluorescencia de Rayos X por Reflexión Total (TXRF): Una gran desconocida. *Anales de Química*. 106. 5-12.

Fernández-Ruiz, R., Galisteo, F. C., Larese, C., Granados, M. L., Mariscal, R., & Fierro, J. L. (2006). TXRF analysis of aged three way catalysts. *The Analyst*, 131(4), 590.

Hellin, D., Rip, J., Geens, V., Delande, T., Conard, T., De Gendt, S., & Vinckier, C. (2005). Remediation for TXRF saturation effects on microdroplet residues from preconcentration methods on semiconductor wafers. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20(7), 652.

Klockenkämper R., & von Bohlen, A. (2015). *Total-reflection X-ray fluorescence analysis and related methods*. John Wiley & Sons, Inc.

Klockenkämper, R., von Bohlen, A., & Moens, L. (2000). Analysis of pigments and inks on oil paintings and historical manuscripts using total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *X-Ray Spectrometry*, 29(1), 119–129.

Lara, R., Cerutti, S., Salonia, J. A., Olsina, R. A., & Martínez, L. D. (2005). Trace element determination of Argentine wines using ETAAS and USN-ICP-OES. *Food and Chemical Toxicology*, 43(2), 293–297.

Marcó, L. M., Greaves, E. D., & Alvarado, J. (1999). Analysis of human blood serum and human brain samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry applying Compton Peak Standardization. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 54(10), 1469–1480.

Matsuoka, Y., Hosokawa, Y., Hino, M., & Tsuji, K. (2005). Study of the sampling method of blood samples for total-reflection X-ray fluorescence. *Bunseki Kagaku*, 54(9), 749–753.

Miller, J., & Miller, J. C. (2014). *Statistics and chemometrics for Analytical Chemistry*. Pearson Education Ltd.

OIV Resolución 344/2010, 2010.

Padilla-Cuevas, J., Yee-Madeira, H., Merino-García, A., Hidalgo, C., & E tchevers, J. (2020). Análisis de los elementos minerales esenciales y tóxicos en tejidos vegetales. *Agrociencia*, 54.413-434.

Pessanha, S., Carvalho, M. L., Becker, M., & von Bohlen, A. (2010). Quantitative determination on heavy metals in different stages of wine production by total reflection x-ray fluorescence and energy dispersive X-ray fluorescence: Comparison on two vineyards. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 65(6), 504–507.

Potts, P. J., & Webb, P. C. (1992). X-ray fluorescence spectrometry. *Journal of Geochemical Exploration*, 44(1-3), 251–296.

Prange, A., Böddeker, H., & Kramer, K. (1993). Determination of trace elements in river-water using total-reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 48(2), 207–215.

Prange, A., Knöchel, A., & Michaelis, W. (1985). Multi-element determination of dissolved heavy metal traces in sea water by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 172, 79–100.

Prange, A., Knoth, J., Stöbel, R.-P., Böddeker, H., & Kramer, K. (1987). Determination of trace elements in the water cycle by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 195, 275–287.

Stoessel, R. P., & Prange, A. (1985). Determination of trace elements in rainwater by total-reflection X-ray fluorescence. *Analytical Chemistry*, 57(14), 2880–2885.

Tariba, B. (2011). Metals in wine—impact on wine quality and health outcomes. *Biological Trace Element Research*, 144(1-3), 143–156.

Thomas, R. (2013). *Practical guide to ICP-MS: A tutorial for beginners*. CRC Press.

Tolerancias analíticas Y resoluciones reglamentarias. Argentina.gob.ar. (2021). Visitada el 27 de octubre, 2022, en <https://www.argentina.gob.ar/inv/vinos/consultas/tolerancias-analitic>.

Von Bohlen, A., Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry- A versatile tool for ultra-micro analysis of objects of cultural heritage, *e-Preservation Science*, 2004, 1, 23-34.

Wilschefski, S., & Baxter, M. (2019). Inductively coupled plasma mass spectrometry: Introduction to analytical aspects. *Clinical Biochemist Reviews*, 40(3), 115–133.

Yang, T., Fan, X., & Zhou, J. (2020). Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy. *Open Access Library Journal*, 7, 1-12.

Zarkadas, C., Karydas, A. G., & Paradellis, T. (2001). Determination of uranium in human urine by total reflection X-ray fluorescence. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 56(12), 2505–2511.