

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

**Método para Análisis de Pb y Cd por Medio de Voltametría
Anódica de Redisolución en Leche**

Juan Fernando Santos Estrada

&

Fabio Xavier Tutiven Puente

Ingeniería Química

Trabajo de Fin de Carrera Presentado como Requisito
para la Obtención del Título de
Ingeniero Químico

Quito, 13 de mayo de 2022

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Método para Análisis de Pb y Cd por Medio de Voltametría Anódica de
Redisolución en Leche**

Juan Fernando Santos Estrada

&

Fabio Xavier Tutiven Puente

Nombre del profesor, Título académico

David Egas, Ph.D.

Quito, 13 de mayo de 2022

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Juan Fernando Santos Estrada & Fabio Xavier Tutiven Puente

Código: 00201672 & 00201498

Cédula de identidad: 092382170-6 & 092449753-0

Lugar y fecha: Quito, 13 de mayo de 2022

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias por darnos la oportunidad de estudiar y apoyarnos a lo largo de esta etapa.

A nuestro profesor acompañante por guiarnos durante el desarrollo de la investigación y el proyecto.

A nuestros directores, profesores e instructores de la carrera por todas las enseñanzas a lo largo de estos años.

Y a nuestros amigos por el apoyo incondicional brindado durante toda la carrera.

RESUMEN

El método de Espectrofotometría de Absorción Atómica (AAS), recomendado para cuantificar Plomo (Pb) y Cadmio (Cd) en leches, no tiene la sensibilidad necesaria para detectar concentraciones cercanas a los límites establecidos por las normas nacionales e internacionales en alimentos y bebidas. Es por ello que en el presente proyecto se propuso utilizar el método de Voltametría Anódica de Redisolución con film de mercurio delgado (ASV-TFME) como alternativa. Se evaluaron distintos parámetros de operación para maximizar la sensibilidad y reproducibilidad de los análisis en este tipo de matriz. Se probó la efectividad del método analizando 10 muestras de leche, tomadas en el cantón Quinindé en sendas haciendas ganaderas. Se pudo detectar Pb en 8 y Cd en 2 de las muestras, en un rango de concentración 2 a 28 partes por billón (ppb), siendo el límite de Pb permitido por las normas de 20 ppb. El método desarrollado presentó límites de detección (LOD) de 0.094 ppb para Pb y 0.077 ppb para Cd, siendo alrededor de 1200 y 1500 veces más sensible que los LOD de dichos metales en AAS respectivamente.

Palabras clave: Metales Pesados, Voltametría Anódica de Redisolución, Electroquímica, Leche, Film de Mercurio, Ganado, AAS, Elementos Traza.

ABSTRACT

The Atomic Absorption Spectrophotometry method (AAS), which is recommended for the quantification of Lead (Pb) and Cadmium (Cd) in milk, does not have the required sensibility to detect concentrations close to the limits established by national and international regulations in foods and beverages. Hence, Anodic Stripping Voltammetry method with a thin film mercury electrode (AVS-TFME) was proposed as an alternative. Different operation parameters were evaluated to maximize the sensibility and reproducibility of the analysis in this type of matrix. The performance of the method was tested by analyzing 10 milk samples, obtained from the “Cantón Quinindé”, in cattle farms. Pb was detected in 8 and Cd in 2 of the 10 samples, ranging in concentrations from 2 to 28 parts per billion (ppb) while the limit established by the norms is 20 ppb. The limits of detection (LOD) for the developed method were 0.094 ppb for Pb and 0.077 ppb for Cd, being around 1200 and 1500 times more sensitive than the LOD for these metals in AAS.

Key words: Heavy Metals, Anodic Stripping Voltammetry, Electrochemistry, Milk, Mercury Film, Livestock, AAS, Trace elements.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 15 |
| 2. METODOLOGIA..... | 18 |
| 2.1 Repaso General del Funcionamiento de ASV | 18 |
| 2.2 Preparación del Sistema de Trabajo | 19 |
| 2.3 Evaluación de las Variables de Medición | 21 |
| 2.3.1 Método de Preconcentración | 21 |
| 2.3.2 Medio de Solución | 21 |
| 2.3.3 Velocidad de Barrido | 21 |
| 2.3.4 Tiempo de Deposición..... | 22 |
| 2.4 Definición del Límite De Detección del Método | 22 |
| 2.5 Determinación de Reproducibilidad de las Curvas..... | 22 |
| 2.6 Digestión Ácida de las Muestras | 22 |
| 2.7 Análisis de las Muestras | 23 |
| 2.8 Comparación de Sensibilidad de ASV y AAS..... | 23 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUCIONES | 24 |
| 3.1 Variables de Medición..... | 24 |
| 3.1.1 Método de Preconcentración | 24 |
| 3.1.2. Medio de Solución | 25 |

| | |
|--|----|
| 3.1.3. Velocidad de Barrido | 26 |
| 3.1.4 Tiempo de Deposición..... | 28 |
| 3.2 Límite de Detección..... | 30 |
| 3.3. Reproducibilidad de las Curvas | 31 |
| 3.4 Digestión Ácida de las Muestras | 33 |
| 3.5 Análisis de las Muestras | 34 |
| 3.6 Comparación de Sensibilidad de ASV con AAS | 36 |
| 4. OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES..... | 37 |
| 5. CONCLUSIONES | 40 |
| REFERENCIAS..... | 41 |
| ANEXOS..... | 45 |
| Anexo A: Instrumentación y Teoría | 45 |
| Anexo B: Curvas de Calibración | 48 |
| Anexo C: Información de Muestras | 52 |
| Anexo D: Voltametrías de Muestras Analizadas | 53 |
| Anexo E: Matlab..... | 59 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Ecuación y coeficiente de correlación obtenidos de las curvas de calibración de Cd y Pb | 32 |
| Tabla 2. Concentración de Pb y Cd en las 10 muestras analizadas usando ASV | 35 |
| Tabla 3: Límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) de los instrumentos AAS y ASV..... | 36 |

ÍNDICE DE TABLAS EN ANEXOS

| | |
|---|----|
| Tabla 4. Información estadística de las muestras..... | 52 |
|---|----|

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Diagrama de la celda de ASV ²⁶ | 18 |
| Figura 2. Sistema de trabajo conectado a electrodo de trabajo (izquierda) electrodo de referencia (centro) y contraelectrodo (superior). | 20 |
| Figura 3. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de estándar combinado de 20 ppb de Cd y Pb en medio iónico de fosfato de sodio 0.3 M pH=6 a una velocidad de barrido de 50 mV/s por 15 minutos con film de mercurio (línea continua) y sin film de mercurio (línea discontinua). | 24 |
| Figura 4. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de estándar combinado de 15 ppb de Cd y Pb a una velocidad de barrido de 50 mV/s por 15 minutos con film de mercurio en medio iónico de fosfato de sodio 0.3 M pH=6 (línea continua) y medio de agua destilada (línea discontinua) | 25 |
| Figura 5. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de estándar combinado de 20 ppb de Cd y Pb en medio iónico de fosfato de sodio 0.3 M pH=6, con film de mercurio, por 20 minutos, a velocidades de barrido de 10 mV/s (línea de punteada), 50 mV/s (línea discontinua) y 80 mV/s (línea continua). | 26 |
| Figura 6. A & B: Áreas bajo las curvas de corriente vs voltaje (cuantificado como unidades de potencia uP) correspondientes a Cd (A) y Pb (B). C & D: Valor de corriente en el pico de la señal vs velocidad de barrido para Cd (C) y Pb (D). | 27 |
| Figura 7. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de estándar combinado de 20 ppb de Cd y Pb en medio iónico de fosfato de sodio 0.3 M pH=6, con film de mercurio, a una velocidad de barrido de 80 mV/s por 10 (línea punteada), 15 (línea discontinua) y 20 (línea continua) minutos. | 28 |

Figura 8. A & B: Valores de área bajo las curvas voltamétricas vs. el tiempo de deposición para Cd (A) y Pb (B). C & D: Valores de corriente máxima versus el tiempo de deposición para Cd (C) y Pb (D).....29

Figura 9. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de estándar de Pb, a una velocidad de barrido de 50 mV/s, por 20 minutos, con film de mercurio, en medio iónico de fosfato de sodio 0.3 M pH=6, con concentraciones de 1 ppb (línea discontinua) y 10 ppb (línea continua)30

Figura 10. A. Voltametrías Anódicas de estándar combinado de Pb y Cd con concentración de 0.1 ppb (línea continua) y blanco (línea discontinua), a velocidad de barrido de 80 mV/s, por 20 min, con film de mercurio, en medio iónico de fosfato de sodio 0.3 M pH=6. B. Voltametría del estandar de 0.1 ppb con blanco sustraído.....30

Figura 11: Ejemplos de curvas de calibración de áreas bajo los picos de Cd y Pb vs. concentración.31

Figura 12. Solución de una muestra de leche tras digestión, filtración y dilución.33

Figura 13. Concentraciones en ppb de Pb y Cd medidas en las muestras mediante el método ASV con sus intervalos de confianza al 95%34

ÍNDICE DE FIGURAS EN ANEXOS

| | |
|---|----|
| Figura 14. Electrodo de carbono vidriado con film de mercurio (izq.) y sin film de mercurio (der.)..... | 45 |
| Figura 15. Voltametrías de las etapas de deposición, equilibrio y redisolución (Extracto de Bard) ²⁵ | 45 |
| Figura 16. Corcho con los electrodos de trabajo colocados en forma de L..... | 46 |
| Figura 17. Sistema de baño de arena para digestión ácida de leches (izquierda) y filtración de solución tras digestión (derecha). | 46 |
| Figura 18. GCE antes y después de aplicar el voltaje de deposición en un medio con ácido nítrico y agua oxigenada | 47 |
| Figura 19. Voltametría anódica de la curva 6-08..... | 48 |
| Figura 20. Curva de calibración del 6-08 con Cd (Azul) y Pb (Naranja). | 48 |
| Figura 21. Curva de calibración del 17-08 con Cd (Azul) y Pb (Naranja). | 49 |
| Figura 22. Curva de calibración del 20-08 con Cd (Azul) y Pb (Naranja). | 49 |
| Figura 23. Curva de calibración del 10-09 con Cd (Azul) y Pb (Naranja). | 50 |
| Figura 24. Curva de calibración del 1-10 con Cd (Azul) y Pb (Naranja) | 50 |
| Figura 25. Curva de calibración del 21-02 con Cd (Azul) y Pb (Naranja). | 51 |
| Figura 26. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 1 con su blanco (línea punteada). | 53 |
| Figura 27. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 2 con su blanco (línea punteada). | 53 |

| | |
|---|----|
| Figura 28. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 3 con su blanco (línea punteada)..... | 54 |
| Figura 29. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 4 con su blanco (línea punteada)..... | 54 |
| Figura 30. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 5 con su blanco (línea punteada)..... | 55 |
| Figura 31. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 6 con su blanco (línea punteada)..... | 55 |
| Figura 32. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 7 con su blanco (línea punteada)..... | 56 |
| Figura 33. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 8 con su blanco (línea punteada)..... | 56 |
| Figura 34. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 9 con su blanco (línea punteada)..... | 57 |
| Figura 35. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 10 con su blanco (línea punteada)..... | 57 |
| Figura 36. Voltametría donde se visualiza un contaminante desconocido entre los picos de Cd y Pb | 58 |
| Figura 37. Gráfico generado por MATLAB® de una voltametría | 61 |
| Figura 38. Acercamiento a los picos de Cd y Pb en la voltametría del gráfico generado por MATLAB®..... | 62 |

1. INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, la ganadería representa un aporte muy importante a la economía¹. Dentro de esta industria, es una práctica común permitir que los animales puedan acceder a campos abiertos para poder alimentarse. Al estar estas zonas al aire libre, se puede presentar un riesgo de contaminación por metales pesados no esenciales, siendo los contaminantes más comunes el Plomo (Pb) y el Cadmio (Cd). Esto se debe a la cercanía que tienen estos campos con distintas actividades humanas que se ubican en zonas rurales y que generan este tipo de emisiones, como por ejemplo las vidrierías; la minería, principalmente la informal, y la cercanía a las carreteras^{2,3}. Adicionalmente, al encontrarse el Ecuador en una región con actividad volcánica relativamente frecuente, existe el riesgo de contaminación de suelos con estos metales⁴⁻⁶ por la caída de ceniza en los campos de pastoreo.

La contaminación aguda con plomo dentro del cuerpo provoca efectos adversos, como cansancio, dolor de cabeza y pérdida de la memoria⁷. La exposición al Cd en grandes cantidades puede causar efectos similares, y escalar a vómito y diarrea en caso de ingesta, o daños en los pulmones y posible muerte en caso de inhalación⁸. Exposición crónica al plomo puede causar hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares e infertilidad⁷. Para el cadmio, en cambio, puede causar osteoporosis por la similitud de este elemento al calcio^{9,10}. Ambos metales también pueden provocar insuficiencia renal y cáncer por exposición prolongada^{7,8}.

Para garantizar la seguridad de los productos alimenticios, se los debe someter a un análisis para determinar si estos metales se encuentran presentes, y, de ser así, si existe una concentración potencialmente dañina de los mismos. Existen normas nacionales¹¹ e internacionales¹²⁻¹⁴ que establecen los límites de concentración y/o ingesta permisible de estos metales. La concentración permisible de plomo en leche según el INEN¹¹ y el Codex Alimentarius¹⁴ es de 0.02 partes por millón (ppm) o 20 partes por billón (ppb). No existe un

límite permisible de concentración para Cadmio en leche, sin embargo, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) estableció un límite de ingesta diaria de este metal de 2.5 mg por kg de peso corporal por semana o 2.5 ppm/semana¹².

Se puede utilizar la concentración permisible de Cd en agua mineral, que es de 3 ppb según el Codex Alimentarius, para considerar qué concentración de este metal puede ser dañina en la leche, utilizando como referencia la razón del límite de plomo en estas dos sustancias. Esta indica que el límite de plomo en agua es 10 ppb y para la leche es 20 ppb¹⁴. Siendo así el límite de concentración permisible de Cd sería de 6 ppb en la leche.

El método más común utilizado para detectar cantidades bajas de estos metales en muestras de leche tanto en investigaciones^{2,3,15,16} como en normas nacionales para control de calidad¹⁷ es la Espectrometría por Absorción Atómica (AAS). Dependiendo del tipo de AAS (por llama -FAAS- o por horno de grafito -GF-AAS-), el modelo y el año de fabricación, los límites de detección (LOD) de Pb y Cd rondan los 50 y 8 ppb respectivamente^{2,15,18}. Los límites de detección en el equipo de FAAS de la USFQ son 80 ppb para Pb y 10 ppb para Cd¹⁹.

Al hacer una comparación entre los límites permisibles por las normas y los límites de detección de AAS se encontró con el problema que este método tiene, en promedio, un LOD 2.5 veces mayor al límite permisible para el Pb y 1.2 veces mayor para Cd. Adicionalmente, hay que tomar en cuenta que se debe realizar un tratamiento previo a las muestras orgánicas para su análisis, así mismo como se debe tener un volumen mínimo de las mismas para que el análisis sea estadísticamente significativo. Todo esto requiere que las muestras se diluyan por lo que se exige aún más sensibilidad para detectar los niveles de estos metales.

Por lo tanto, hoy en día existe una necesidad de un método analítico estandarizado que permita cuantificar los niveles de Pb y Cd que estén por debajo del LOD del AAS, pero por encima del nivel permitido por la norma en leches^{2,15,20-22}.

Este proyecto propone un método basado en análisis electroquímico por medio de Voltametría Anódica de Redisolución (ASV) con film de mercurio, para detectar los niveles de Pb y Cd en muestras de leches. A nuestro conocimiento, este tipo de análisis no ha sido utilizado para medir estos metales en leches en el Ecuador. En otros países, se han utilizado métodos voltamétricos para detectar estos contaminantes en leches^{20,21,23,24}, sin embargo, estas investigaciones presentan muchas variaciones entre los electrodos utilizados, sus parámetros de operación, y sensibilidad, por lo que no hay una metodología estandarizada registrada en la literatura.

Se ha demostrado en la literatura que el método de ASV provee la sensibilidad suficiente para detectar niveles de Pb y Cd cercanos a los límites permisibles más estrictos y que pueden encontrarse por debajo del límite de cuantificación (LOQ) de AAS^{2,20}, inclusive tras realizar las diluciones necesarias para el tratamiento de las muestras.

Con esto en mente, este proyecto evaluó las variables de operaciones que afectan al método de ASV con film de mercurio; priorizando la obtención de una alta sensibilidad para permitir la cuantificación de concentraciones en el LOD permisible, tomando en cuenta el tratamiento de la muestra, y manteniendo una especificidad alta entre los metales.

Para probar la efectividad del método desarrollado se realizaron mediciones de muestras correspondientes al proyecto de investigación de la USFQ para la “Determinación de Metales Pesados en Leche de Ganaderías del Cantón Quinindé, Esmeraldas” (Código HUBi: 17035). Para el cual se tienen muestras de bajo volumen (≤ 2 mL) en las que el método de AAS no es aplicable debido a la baja concentración esperada de las muestras tras su tratamiento y dilución.

Con la información recopilada a partir de estas mediciones se realizó una comparación estadística entre los resultados obtenidos a partir de AAS y ASV para poder determinar si el método desarrollado realmente se diferencia del ya establecido

2. METODOLOGIA

2.1 Repaso General del Funcionamiento de ASV

La Voltametría Anódica de Redisolución (Anodic Stripping Voltammetry) consiste en la deposición de cationes en una solución sobre la superficie de un electrodo de trabajo que subsecuentemente son redisueltos por oxidación, lo cual genera una señal de corriente medible que se puede relacionar con la concentración del elemento²⁵. El electrodo de trabajo es acompañado por un electrodo de referencia que sirve para fijar el voltaje “0” y un contraelectrodo que suministra la corriente necesaria para el proceso de reducción, como se observa en la Figura 1.

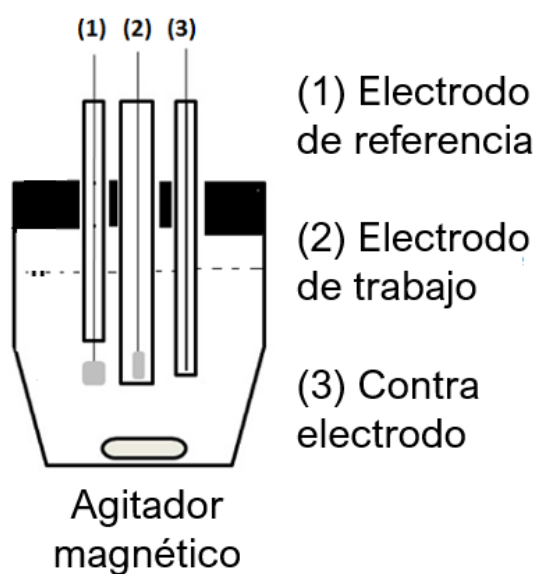


Figura 1. Diagrama de la celda de ASV²⁶

El análisis inicia con una limpieza de la superficie del electrodo de trabajo (electrodo de carbono vidriado, GCE), puliéndolo para remover cualquier tipo de impureza y deshacerse de cualquier imperfección con el objetivo de mantener el área superficial completamente plana y uniforme. En este trabajo se utiliza además la superficie de este electrodo de trabajo cubierta con un film delgado de mercurio (TFME) que fue previamente preparado, como se observa en la Figura 14 en el anexo A de anexos. A continuación, se procede al acondicionamiento de este

en un voltaje positivo para desorber cualquier elemento que sea oxidable en dicho voltaje sin liberar el film de mercurio.

Posteriormente, se procede a la deposición (también conocida como preconcentración) aplicando un voltaje negativo respecto al electrodo de referencia por un tiempo determinado, con agitación. Los cationes se adsorben en la superficie del electrodo de trabajo por efecto de reducción y amalgamado con el film de mercurio. Se debe mantener un periodo de equilibrio sin agitación para que la concentración en el film se homogenice por efectos de difusión. Seguido de una elevación del voltaje en electrodo a una velocidad determinada, se realiza un barrido lineal, lo cual permite que se oxiden nuevamente los metales hacia la solución. En la Figura 15 en el anexo A de anexos se puede apreciar una voltametría de estas etapas. Se debe realizar una limpieza exhaustiva de los materiales antes y después de cada análisis debido a que residuos de los estándares y las muestras pueden interferir en los análisis posteriores.

El área debajo de la curva de la corriente generada es proporcional a la concentración de cationes liberados, diferenciándose las señales de distintos metales por encontrarse en su respectivo potencial de oxidación. Es importante recalcar que el objetivo de la agitación es únicamente la homogenización de la muestra durante la etapa de deposición, esta no debe estar presente en la etapa de equilibrio ni redisolución, debido a que la presencia de convección afectaría al análisis.

2.2 Preparación del Sistema de Trabajo

El sistema de trabajo incluyó un vaso de plástico de 25 mL, un corcho de caucho, una barra magnética para agitación, un electrodo de trabajo de carbono vidriado *CHI 104 Glassy Carbon Disk Working Electrode, CH Instruments Inc. Texas, USA.* (GCE), un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata *TG273, RE-1B (RE)*, un contraelectrodo de platino *CHI 115 Platinum Wire Counter Electrode, CH Instruments Inc. Texas, USA.* (CE) y el instrumento

de medición que fue un equipo DropSens μ Stat400 (Asturias, España) con el software DropView 8400 (Version 2.1 13B1017, 2013).

Se realizaron 3 orificios en el corcho para poder introducir los electrodos, con una forma de L, teniendo en el centro el electrodo de trabajo y manteniendo el electrodo de referencia lo más cerca posible del electrodo de trabajo para minimizar la resistencia no compensada de la solución y ubicando el contraelectrodo en una línea recta con el electrodo de trabajo para suministrar los electrones requeridos en el proceso de oxidación-reducción, pero no estando en la misma línea del de referencia para evitar la polarización de este (ver Figura 16 en el anexo A de anexos). En la Figura 2 se puede apreciar una foto del sistema utilizado en esta investigación.

Adicionalmente, todas las soluciones fueron degasificadas por un equipo de ultrasonido Branson 5510R-DTH ultrasonic cleaner (St. Lois, USA) operado en modo DEGAS durante 10 minutos antes de ser analizadas para evitar la presencia de oxígeno que pudiese interferir con el análisis.

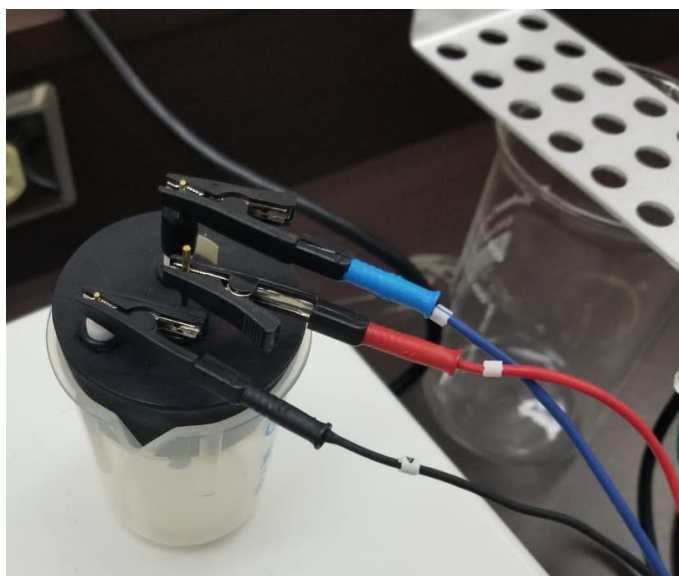


Figura 2. Sistema de trabajo conectado a electrodo de trabajo (izquierda) electrodo de referencia (centro) y contraelectrodo (superior).

2.3 Evaluación de las Variables de Medición

2.3.1 Método de Preconcentración

Se realizaron mediciones de estándares de Pb (Solución de Pb concentración 1000 mg/L Matriz: 2% HNO₃, CPA chem 2021) y Cd (Solución de Cd concentración 1000 mg/L Matriz: 2-5% HNO₃, AccuStandard 2021) con deposición directamente sobre la superficie del electrodo y utilizando un film de mercurio que fue preparado con un voltaje negativo de -1.5 voltios durante 20 minutos con una solución de 100 ppm de mercurio (Solución de Hg concentración 1000 mg/L Matriz: 10% HNO₃, AccuStandard 2021) (Hg²⁺).

Se preparó la solución de Hg con un volumen de 250 mL a partir del cual se tomaron alícuotas de 25 mL para la preparación de cada film de mercurio, con el objetivo de mantener reproducibilidad en la formación de los mismos.

2.3.2 Medio de Solución

Para elegir el mejor medio en el cual realizar el análisis, se realizaron mediciones de estándares de 1 ppm de Pb utilizando agua destilada y en un medio iónico, para lo cual se preparó un buffer de fosfato (Fosfato de Sodio monobásico monohidratado, Mallinckrodt) con pH 6 y fuerza iónica total de 0.3 molar (M).

2.3.3 Velocidad de Barrido

Se midieron estándares de 20 ppb de Pb utilizando tres velocidades de barrido diferentes, siendo estas 10, 50 y 80 milivoltios por segundo (mV/s).

2.3.4 Tiempo de Deposición

Para definir un tiempo adecuado de deposición de los metales se analizaron estándares combinados de 20 ppb de Pb y Cd con 5, 10, 15 y 20 minutos de deposición.

2.4 Definición del Límite De Detección del Método

Para definir el LOD del método se realizaron la medición de estándares de Pb y Cd bajando desde 10 ppb, disminuyendo en 10 veces la concentración del estándar hasta 0.1 ppb.

2.5 Determinación de Reproducibilidad de las Curvas

Se realizó alrededor de seis curvas de calibración de Pb y Cd para determinar si las señales obtenidas para cada film en diferentes días de análisis mantenían la misma relación con las concentraciones de los estándares utilizados, es decir, la misma pendiente en las curvas de calibración. Cinco de las curvas se realizaron en el periodo de agosto a diciembre 2021 utilizando la misma solución de Hg para hacer el film de mercurio y una curva en el mes de febrero 2022 para ser utilizada como referencia para el análisis de las muestras, con una solución de Hg nueva.

Las curvas se realizaron con cuatro a cinco puntos correspondientes a estándares de 0.1 a 100 ppb. Para realizar las curvas de calibración se tomó como señal al área debajo de los picos correspondientes a plomo y cadmio.

2.6 Digestión Ácida de las Muestras

Para realizar las digestiones de las muestras de leche se utilizó el método propuesto por Peters²⁷, colocando las muestras en balones de calentamiento con núcleos de ebullición, utilizando un baño de arena, como se ve en la Figura 17 en el anexo A de anexos, y aumentando la temperatura hasta 180 °C, dejándolas secar por completo. También se digirieron junto a las muestras 3 mL de estándar de Pb y Cd con una concentración c.a. 417 ppb. Tras la digestión,

se colocó c.a. 15 mL de buffer en los balones y se dejó en ultrasonido por 15 minutos para solubilizar cualquier metal existente en las paredes del recipiente. Se filtró la solución en un balón de 25 mL y se aforó con buffer.

Para la obtención de los factores de recuperación se utilizó el estándar digerido, que al diluirse a 25 mL debería resultar c.a. 50 ppb, comparándolo con un estándar fresco c.a. 50 ppb.

2.7 Análisis de las Muestras

Se prepararon 10 muestras de leche mediante el procedimiento de la sección anterior y se analizaron. Estas muestras fueron tomadas del proyecto de investigación de la USFQ (HUBi: 17035).

2.8 Comparación de Sensibilidad de ASV y AAS

Se determinaron los LOD y LOQ del equipo de Absorción Atómica (BUCK SCIENTIFIC 210 VGP ATOMIC ABSORPTION SPECTROPHOTOMETER) y del método de ASV desarrollado. Se midieron blancos para cada método (15 mediciones para AAS y 8 para ASV) y se obtuvieron los valores de LOD y LOQ mediante las siguientes ecuaciones:

$$LOD = 2\sigma$$

$$LOQ = 10\sigma$$

Siguiendo el procedimiento recomendado por Robinson²⁸.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Variables de Medición

3.1.1 Método de Preconcentración

Resultados preliminares de voltametrías demostraron que las corridas sin film de mercurio y sin buffer no presentaron ningún tipo de señal reconocible, incluso por encima de los 100 ppb. Por ello se optó realizar las pruebas del método de concentración utilizando buffer y las pruebas de buffer utilizando film de mercurio.

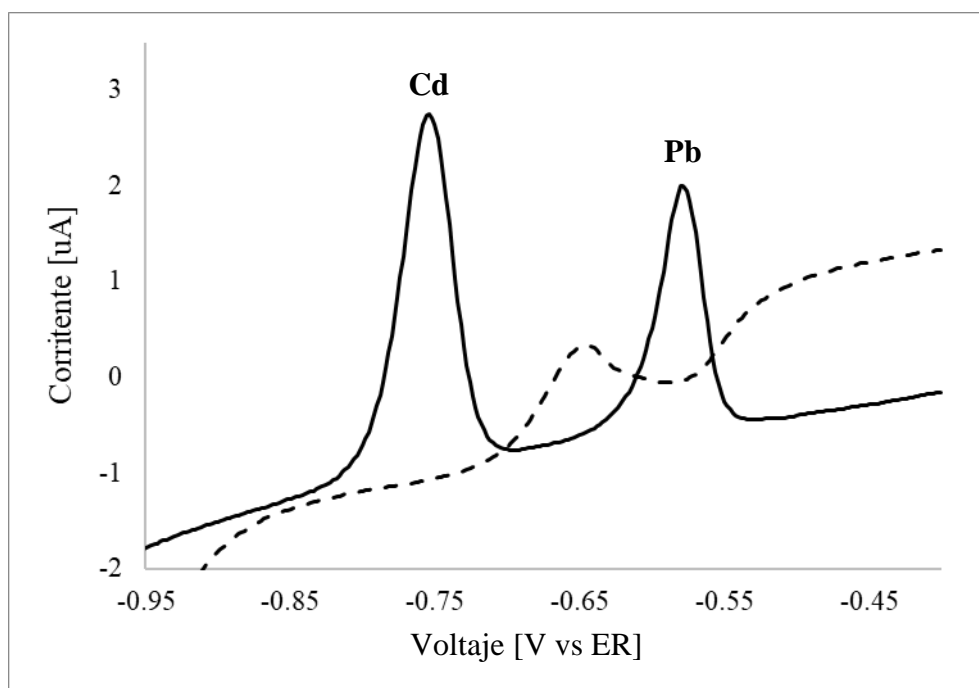


Figura 3. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de estándar combinado de 20 ppb de Cd y Pb en medio iónico de fosfato de sodio 0.3 M pH=6 a una velocidad de barrido de 50 mV/s por 15 minutos con film de mercurio (línea continua) y sin film de mercurio (línea discontinua).

En la Figura 3 se puede apreciar las curvas resultantes de voltametrías de estándares de Pb y Cd con (línea continua) y sin film de mercurio (línea discontinua). Como se puede observar, la voltametría en la que sí se preparó un film de mercurio sobre el electrodo de trabajo GCE, se obtuvieron dos picos independientes en los voltajes correspondientes a Cd y Pb (según el electrodo de referencia), sin superposición. En cambio, en la voltametría realizada sin film de mercurio (línea discontinua), se puede apreciar un solo pico, de menor tamaño, en un voltaje

intermedio entre los valores correspondientes a Pb y Cd, seguido de este pico hubo un aumento de la línea base.

Se esperaba que los picos de plomo y cadmio presenten un mayor tamaño para las voltametrías realizadas con film de mercurio, debido a que la teoría²⁵ indica que, con este, se tiene una mayor preconcentración debido a que los elementos de interés forman una amalgama con el Hg. En la **Error! Reference source not found.** se puede apreciar que no solo aumentó la señal, sino que el film de mercurio permitió que exista una diferenciación entre las señales de plomo y cadmio, siendo imposible de diferenciar en la voltametría realizada sin film.

3.1.2. Medio de Solución

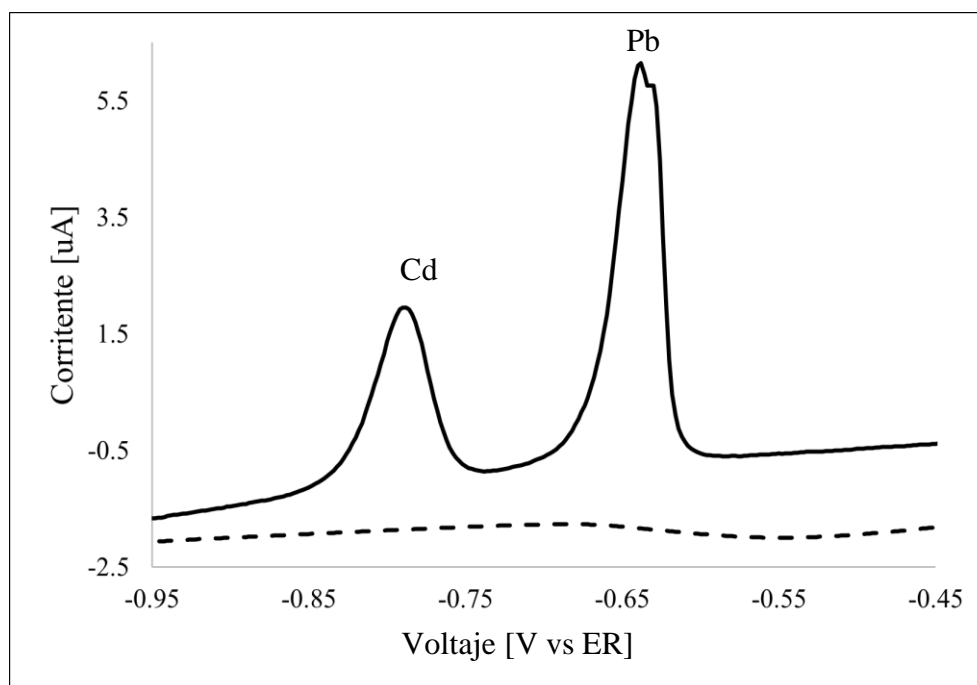


Figura 4. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de estándar combinado de 15 ppb de Cd y Pb a una velocidad de barrido de 50 mV/s por 15 minutos con film de mercurio en medio iónico de fosfato de sodio 0.3 M pH=6 (línea continua) y medio de agua destilada (línea discontinua)

Las voltametrías resultantes del ensayo de medio de solución que se observan en la Figura 4 indican que cuando se utiliza agua destilada como medio de solución (línea discontinua) la señal obtenida no es lo suficientemente fuerte como para ser perceptible por el equipo. Por otro lado, al usar un medio iónico (línea continua) para analizar la misma

concentración, la señal resultante si es perceptible por el equipo y se logran visualizar los picos correspondientes a Cd y Pb.

El que no existan picos distinguibles en la voltimetría realizada en agua destilada se debe a que, en este medio, los únicos iones disponibles son los correspondientes a los estándares, que llegan a ser despreciables en cuanto a la fuerza iónica que aportan, dada su baja concentración. Adicionalmente, Bard²⁵ indica que se requiere un medio iónico que permita el paso estable de corriente entre el electrodo de trabajo y el contraelectrodo para que disminuya la resistencia no compensada entre ellos. Además, la presencia de iones no electroactivos en la solución hace que el transporte de masa no se limite por migración.

3.1.3. Velocidad de Barrido

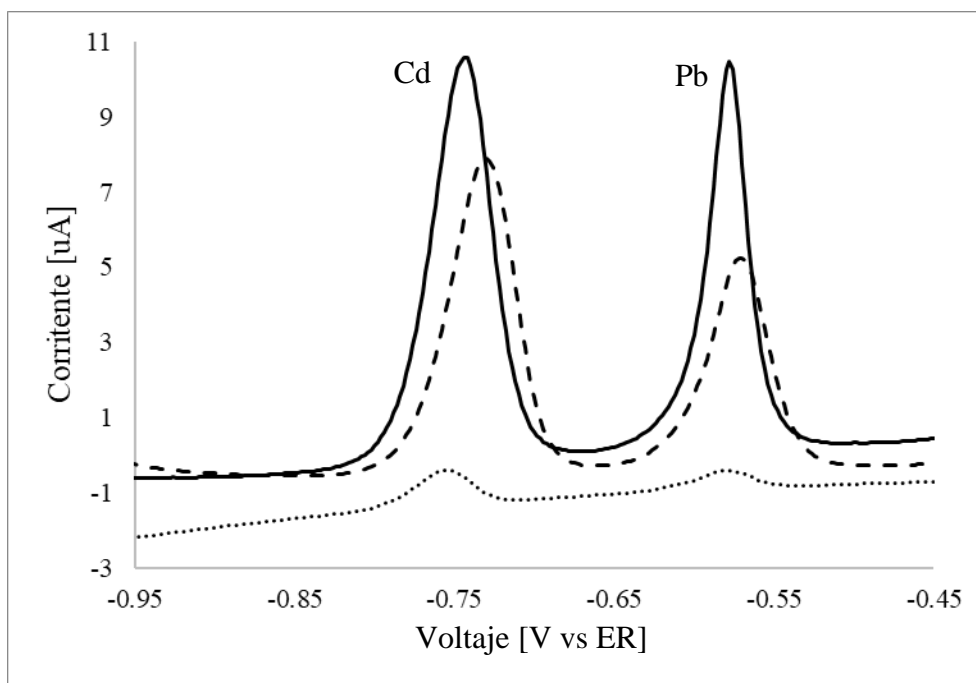


Figura 5. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de estándar combinado de 20 ppb de Cd y Pb en medio iónico de fosfato de sodio 0.3 M pH=6, con film de mercurio, por 20 minutos, a velocidades de barrido de 10 mV/s (línea de punteada), 50 mV/s (línea discontinua) y 80 mV/s (línea continua).

En la Figura 5 se tienen tres voltametrías de estándares de Pb y Cd tomadas a diferentes velocidades de barrido. Se puede observar en cada una de las voltametrías los picos correspondientes a los metales, variando entre ellas la intensidad de la señal de corriente.

Se tomaron las áreas bajo los picos de cada uno de los metales, de ello resultó que las velocidades de 50 y 80 mV/s son mayores a la de 10 mV/s, pero no son estadísticamente diferentes entre ellas (Ver Figura 6. A & B). Adicionalmente, se graficaron los valores de corriente máxima vs. las velocidades (Figura 6. C & D), donde se observa que para el plomo el valor de 80 mV/s sí es mayor al de 50 mV/s, mientras que para el cadmio son estadísticamente iguales.

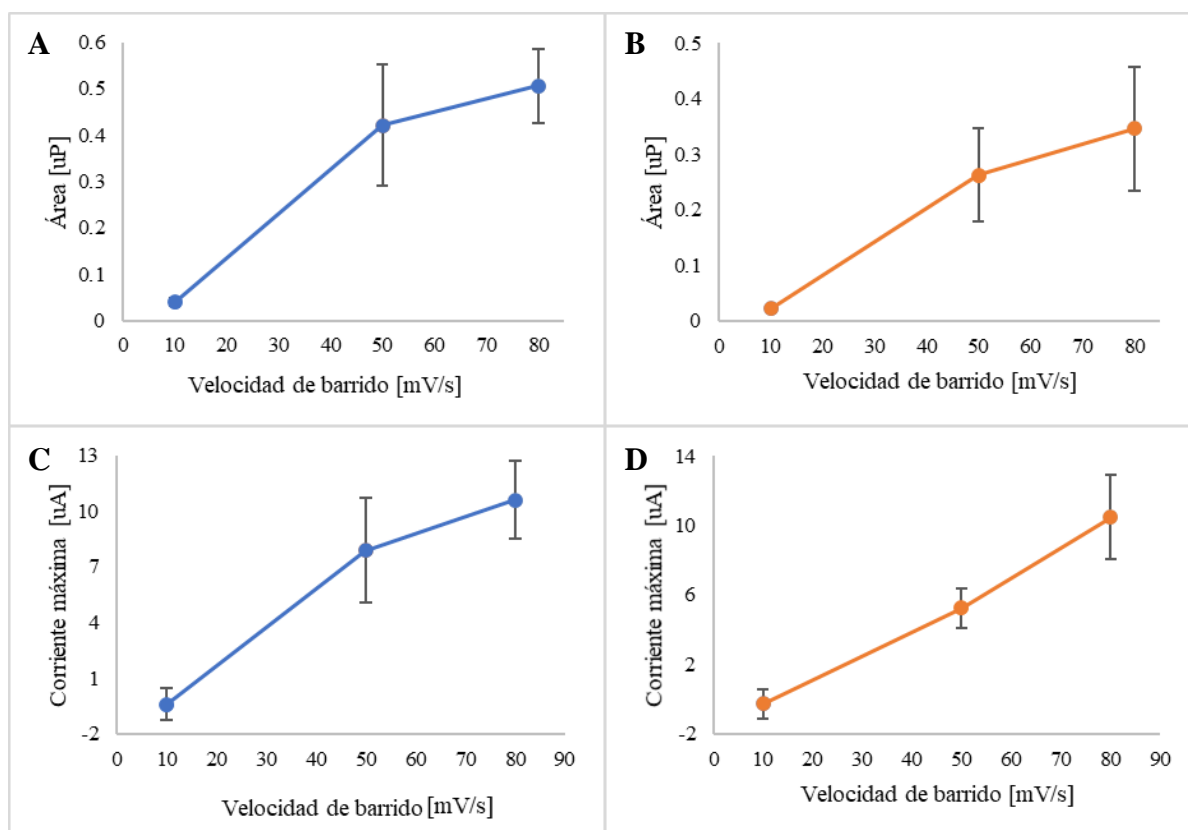


Figura 6. A & B: Áreas bajo las curvas de corriente vs voltaje (cuantificado como unidades de potencia uP) correspondientes a Cd (A) y Pb (B). C & D: Valor de corriente en el pico de la señal vs velocidad de barrido para Cd (C) y Pb (D).

Al igual que en otros espectros, como la cromatografía, picos con una razón altura/ancho mayores son preferidos, al ser considerados como señales de mayor resolución²⁹. Por ello se escogió utilizar la velocidad de 80 mV/s.

3.1.4 Tiempo de Deposición

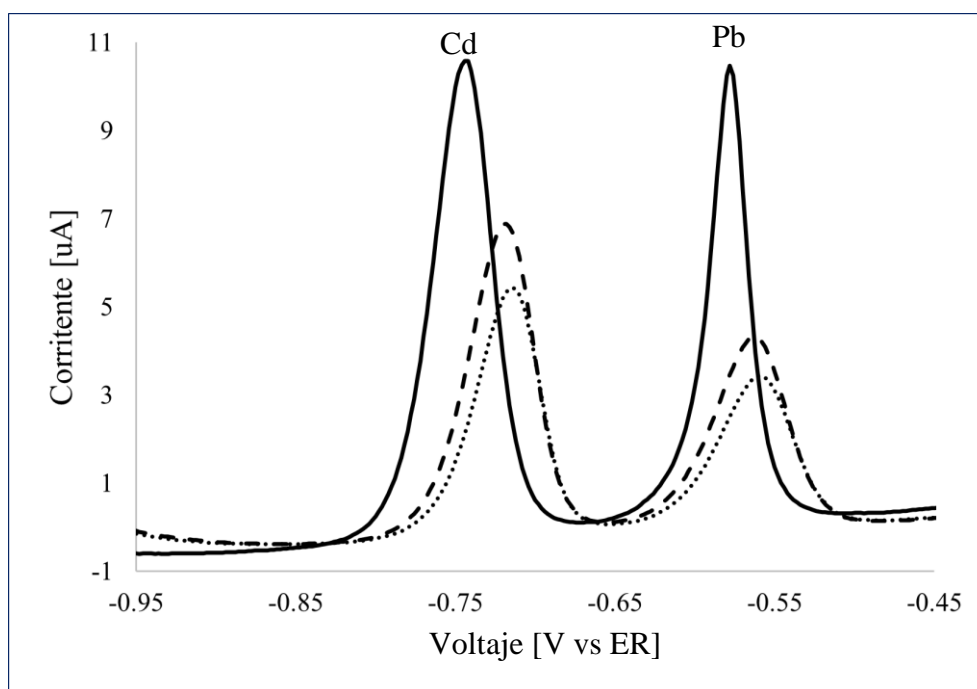


Figura 7. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de estándar combinado de 20 ppb de Cd y Pb en medio iónico de fosfato de sodio 0.3 M pH=6, con film de mercurio, a una velocidad de barrido de 80 mV/s por 10 (línea punteada), 15 (línea discontinua) y 20 (línea continua) minutos.

En la Figura 7 se tienen tres voltametrías del mismo estándar combinado de Pb y Cd con diferentes tiempos de deposición. Se puede observar una tendencia en las voltametrías que a mayor tiempo para depositar los metales se tienen picos más altos.

En la Figura 8. A & B se muestran dos gráficas que representan el área bajo las curvas voltamétricas de la Figura 7 versus los tiempos de deposición que fueron evaluados en el ensayo. Aquí se puede apreciar que, tomando en cuenta el error estadístico, al área obtenida entre los 15 minutos y los 20 minutos de deposición son iguales. No obstante, al comparar la corriente máxima alcanzada se tiene que el pico de la corrida de 20 minutos sí es mayor a las otras corridas para el plomo y estadísticamente iguales para el cadmio como se ve en la Figura 8. C & D.

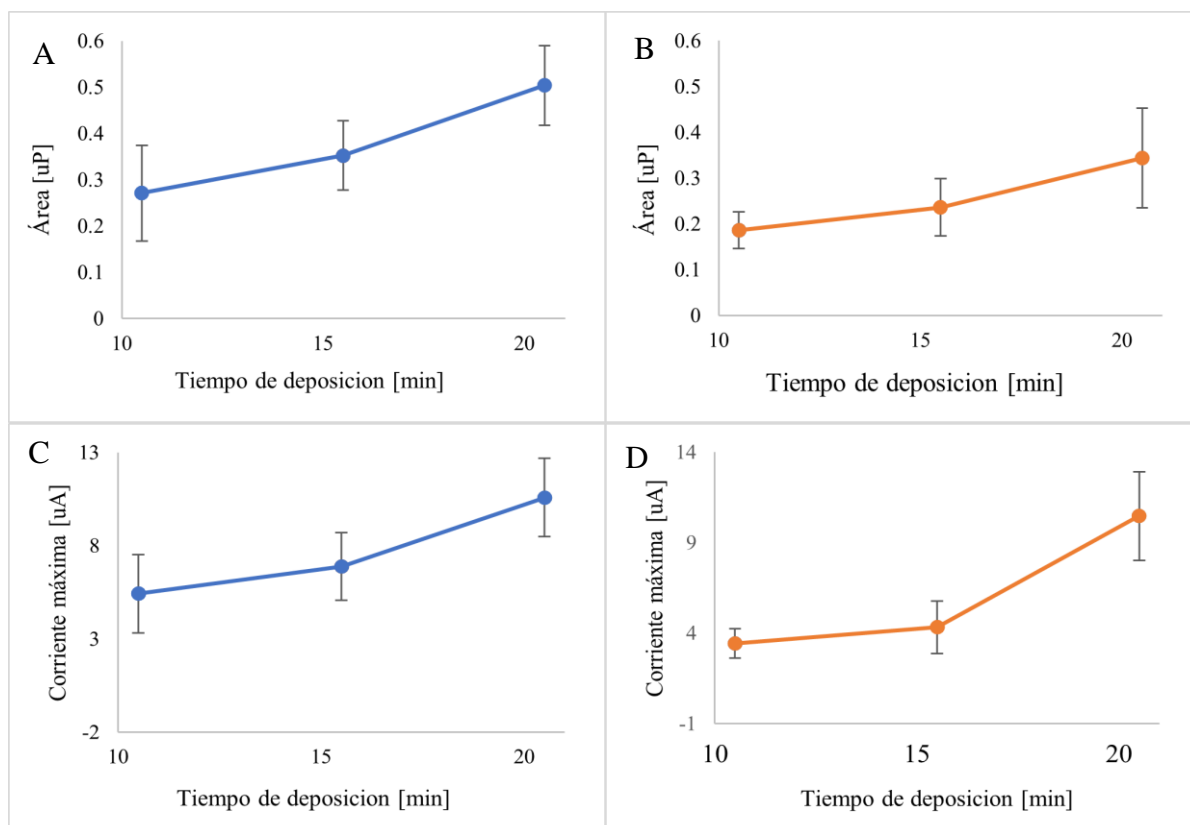


Figura 8. A & B: Valores de área bajo las curvas voltamétricas vs. el tiempo de deposición para Cd (A) y Pb (B). C & D: Valores de corriente máxima versus el tiempo de deposición para Cd (C) y Pb (D)

De forma similar a las velocidades de barrido, no existió una diferencia entre las áreas obtenidas por las voltametrías de 15 y 20 minutos. Sin embargo, sí hay una diferencia significativa entre las alturas conseguidas, por lo que se escogió 20 minutos de deposición al presentar mayor resolución de las señales.

3.2 Límite de Detección

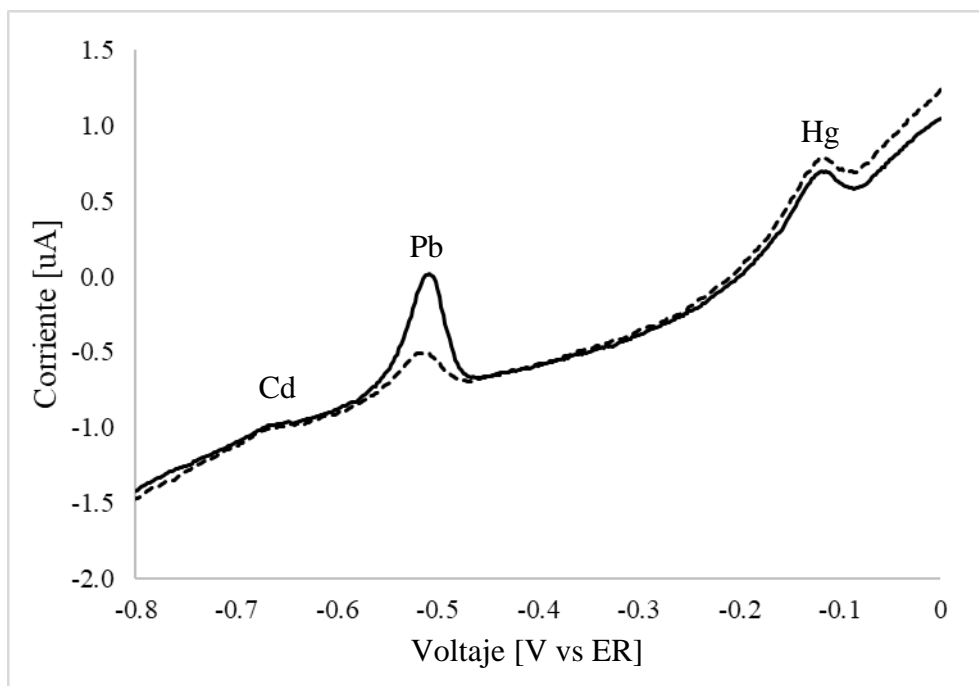


Figura 9. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de estándar de Pb, a una velocidad de barrido de 50 mV/s, por 20 minutos, con film de mercurio, en medio iónico de fosfato de sodio 0.3 M pH=6, con concentraciones de 1 ppb (línea discontinua) y 10 ppb (línea continua)

Resultados anteriores de voltametrías en condiciones no ideales, con velocidad de barrido de 50 mV/s y con pérdida parcial de film (por la señal de Hg), demostraron que concentraciones de 10 ppb y 1 ppb sí resultan en señales detectables, como se puede observar en la Figura 9, en la que se utilizó estándares de plomo.

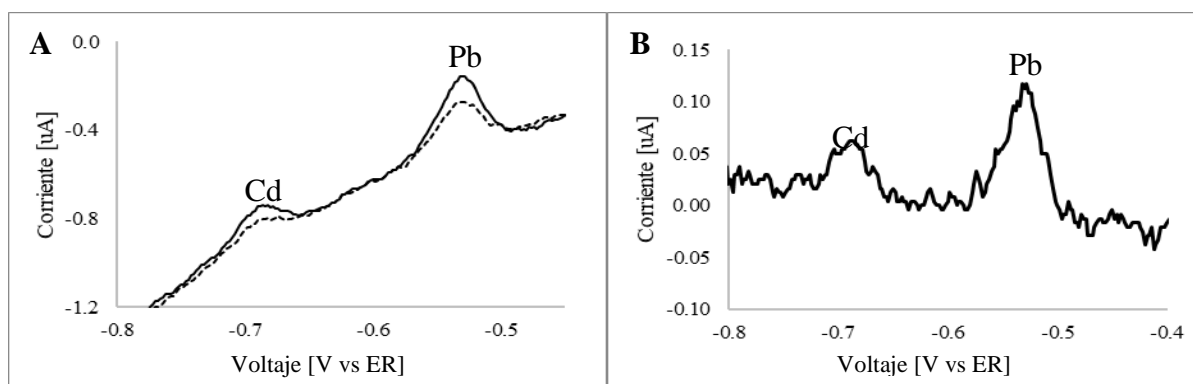


Figura 10. A. Voltametrías Anódicas de estándar combinado de Pb y Cd con concentración de 0.1 ppb (línea continua) y blanco (línea discontinua), a velocidad de barrido de 80 mV/s, por 20 min, con film de mercurio, en medio iónico de fosfato de sodio 0.3 M pH=6. B. Voltametría del estándar de 0.1 ppb con blanco sustraído.

En la Figura 10. A se puede observar que existe diferencia entre las señales dadas por los metales existentes en el blanco (buffer de fosfato) y el estándar de 0.1 ppb. La Figura 10.B

presenta los picos resultantes de la resta de la voltimetría del estándar y el blanco. Al tomar el área correspondiente al pico de plomo de tres estándares de 0.1 ppb en corridas diferentes obtuvo en promedio $5.1 \times 10^{-3} \pm 4.6 \times 10^{-3}$ unidades de potencia (uP).

Es necesario utilizar el área de la señal del estándar sustraída del blanco debido a que existe una señal de plomo y cadmio como contaminante, el orden de la concentración de este contaminante debería estar también en los decimales de ppb. Se esperaba la existencia de una señal en el blanco debido a que el reactivo de fosfato utilizado (Ver sección 2.3.2) mencionaba una presencia de metales pesados de c.a. 0.001%. Adicionalmente, la voltimetría sustraída presenta un mayor ruido en la señal, sin embargo, los picos siguen siendo distinguibles.

3.3. Reproducibilidad de las Curvas

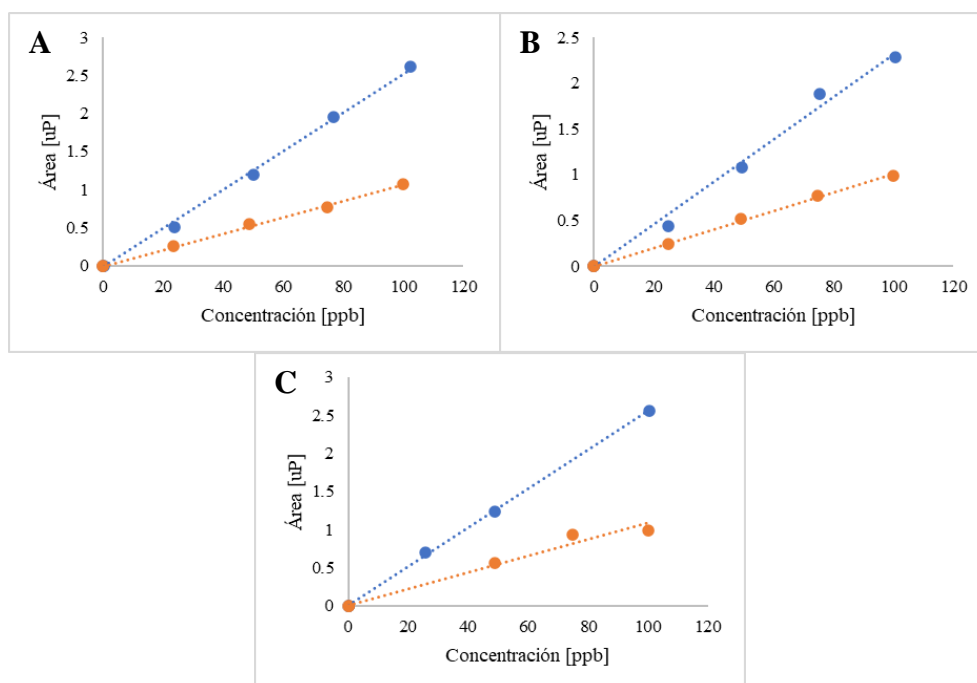


Figura 11: Ejemplos de curvas de calibración de áreas bajo los picos de Cd y Pb vs. concentración.

Se obtuvieron 6 curvas de calibración funcionales realizadas en diferentes etapas del proyecto, como se pueden observar ejemplos en la Figura 11. En ellas se obtuvieron coeficientes de correlación que tendían a tener de 2 a 3 nueves (Tabla 1). El cadmio siempre presentó un área mayor respecto al plomo para las mismas concentraciones, resultando por consecuencia, que

la pendiente de Cd mantuvo una razón de poco más del doble que la pendiente de Pb para todas las curvas. Las curvas utilizadas en este proyecto se pueden observar en las Figura 19-25 en el anexo B de anexos

Tabla 1. Ecuación y coeficiente de correlación obtenidos de las curvas de calibración de Cd y Pb

| Fecha de Curva | Puntos | Cd | | Pb | |
|----------------|--------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | | Ecuación* | R ² | Ecuación* | R ² |
| 06/08/2021 | 5 | $A = 0.02521 C$ | 0.9989 | $A = 0.01071 C$ | 0.9992 |
| 17/08/2021 | 5 | $A = 0.02317 C$ | 0.9957 | $A = 0.01012 C$ | 0.9992 |
| 20/08/2021 | 4 | $A = 0.02231 C$ | 0.9997 | $A = 0.00795 C$ | 0.9970 |
| 10/09/2021 | 4 | $A = 0.02226 C$ | 0.9991 | $A = 0.01123 C$ | 0.9999 |
| 01/10/2021 | 4 | $A = 0.01913 C$ | 0.9994 | $A = 0.00560 C$ | 0.9931 |
| 21/02/2022 | 4 | $A = 0.02554 C$ | 0.9998 | $A = 0.01096 C$ | 0.9884 |

*A: Área bajo los picos. C: Concentración del elemento

Como fue mencionado en la metodología, en las curvas realizadas del 6 de agosto de 2021 al 1 de noviembre del mismo año se utilizó la misma solución de mercurio para depositar el film en el GCE. Se puede observar (con una excepción) que la pendiente obtenida de las curvas de calibración disminuye, lo que sugiere a su vez una disminución de la señal obtenida para una misma concentración o, dicho en otras palabras, una disminución de sensibilidad.

Se infirió que la disminución podría deberse a una reducción del grosor del film de mercurio. Esto a su vez se debería a que se reduce la concentración de mercurio en la solución de Hg cada vez que se utiliza. Para verificar esto se utilizó una solución nueva de Hg para depositar el film que se utilizaría en la curva de calibración del 21 de febrero de 2022. Como se esperaba, la tendencia volvió a un valor muy similar al de la primera curva. Sin embargo, se requeriría realizar una mayor cantidad de curvas, depositando films con soluciones de Hg recicladas y nuevas, para verificar su relación con la sensibilidad.

3.4 Digestión Ácida de las Muestras

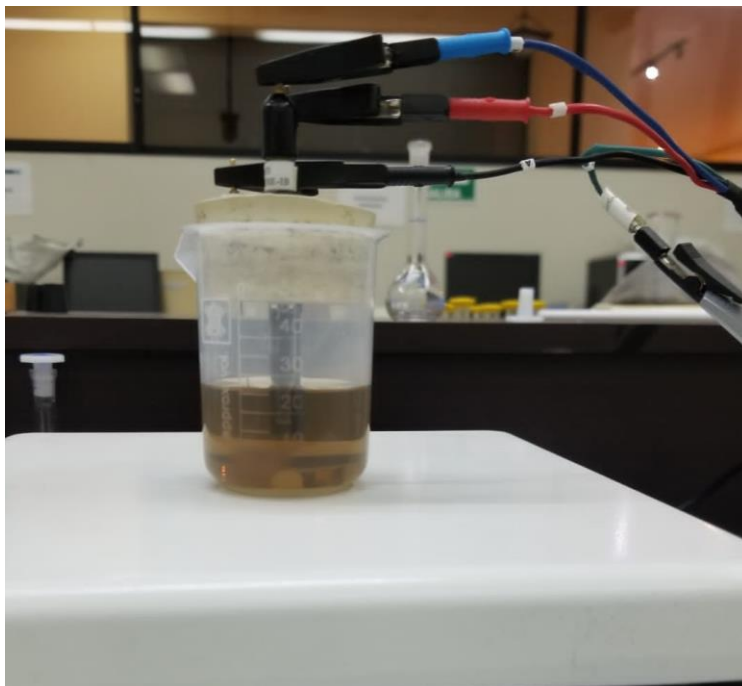


Figura 12. Solución de una muestra de leche tras digestión, filtración y dilución.

Tras el tratamiento de las muestras de leche se obtuvieron soluciones que variaban en color de amarillo a café oscuro, aparentemente sin turbidez apreciable (Ver Figura 12).

De los ensayos de recuperación de la digestión se encontró que se pierde un porcentaje de Cd y que aumenta el porcentaje de Pb en los estándares que fueron sometidos al proceso.

El hecho de que se pierda un poco de Cd en los estándares al pasar por el proceso de digestión y filtrado se puede explicar considerando que se puede quedar en las paredes del balón donde fueron digeridos. Además, también se puede perder una parte al momento de filtrarse, ya que se puede quedar en la ceniza que se forma por las temperaturas altas a las cuales se realiza la digestión. Por otro lado, se sospecha que el aumento en la concentración de Pb se debe a que los reactivos utilizados en el proceso de digestión presentan una ligera cantidad de este elemento (como el ácido nítrico), que aumentó su concentración en los estándares

3.5 Análisis de las Muestras

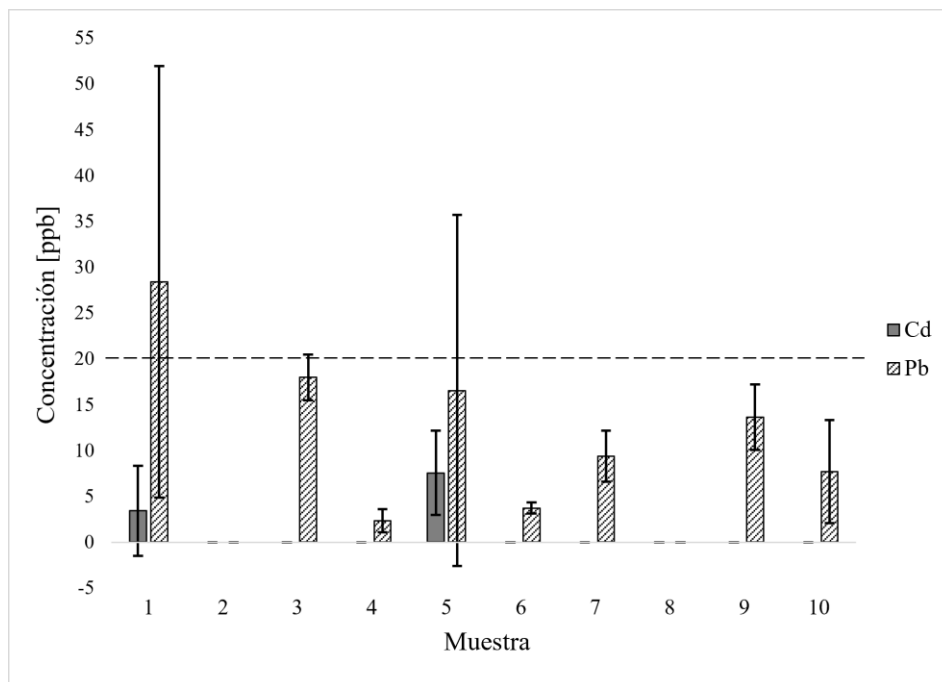


Figura 13. Concentraciones en ppb de Pb y Cd medidas en las muestras mediante el método ASV con sus intervalos de confianza al 95%

En la Figura 13 se pueden apreciar los resultados obtenidos de las muestras de leche analizadas con el método propuesto, utilizando todos los parámetros definidos en las secciones anteriores. Este gráfico indica que, de las 10 muestras analizadas, en 8 se pudo detectar la presencia de Pb, mientras que en 2 se pudo detectar la presencia de Cd.

De las muestras que tienen Pb detectable, no se puede asegurar que 3 de ellas estén por debajo del límite permitido por las normas nacionales e internacionales^{11,14}, el cual es 20 ppb y está representado por la línea discontinua en la Figura 13. Estas son las muestras 1, 2 y 5. La Tabla 2, presenta los valores de concentración de los metales en las leches obtenidos en el análisis ASV. En las Figura 26-35 en el anexo D de anexos se pueden ver todas las voltametrías de las muestras analizadas.

Tabla 2. Concentración de Pb y Cd en las 10 muestras analizadas usando ASV

| Muestra | Concentración (ppb) Cd 95% confianza | Concentración (ppb) Pb 95% confianza |
|----------------|---|---|
| 1 | 3.42 ±4.93 | 28.39 ± 23.57 |
| 2 | ND | ND |
| 3 | ND | 17.98 ± 2.46 |
| 4 | ND | 2.33 ± 1.25 |
| 5 | 7.55 ±4.60 | 16.54 ± 19.15 |
| 6 | ND | 3.72 ± 0.59 |
| 7 | ND | 9.39 ± 2.79 |
| 8 | ND | ND |
| 9 | ND | 13.61 ± 3.57 |
| 10 | ND | 7.71 ± 5.63 |

ND: No detectable

La presencia de Pb en el 80% de las muestras analizadas sugiere que existe una fuente de contaminación de este metal, de baja concentración, en la zona de pastoreo del ganado. Es posible que esta fuente sea permanente o que haya ocurrido algún evento de contaminación importante que aún se puede detectar en la zona. Posibles fuentes de estos contaminantes sería la ceniza esparcida en la tierra debido a la actividad volcánica permanente de volcanes en erupción (Sangay y Reventador) y volcanes activos con actividad reciente (Cotopaxi y Tungurahua en la última década)³⁰; además de las diversas actividades humanas que suelen realizarse en zonas rurales. Investigaciones futuras ayudarían a comprobar el origen de la fuente de contaminación, ya que si se tienen cantidades superiores de los contaminantes en épocas donde hay actividad volcánica se infiere que esta tiene sí tiene un efecto considerable en la contaminación del ganado.

Adicionalmente, el hecho de que exista una leve contaminación en el ganado indica que, si los niveles de exposición en los campos de pastoreo no disminuyen, se podría bioacumular dentro del mismo, alcanzando concentraciones dañinas. Esto se podría comprobar realizando radiografías a los huesos del ganado para verificar si los niveles de plomo y cadmio están afectando de manera crónica. Como se mencionó, debido a los intervalos de confianza, 3

de estas muestras podrían estar contaminadas con Pb por encima del nivel permitido por las normas de salud.

3.6 Comparación de Sensibilidad de ASV con AAS

Tabla 3: Límites de detección (LOD) y límites de cuantificación (LOQ) de los instrumentos AAS y ASV

| Método | Pb | | Cd | |
|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | LOD [ppb] | LOQ [ppb] | LOD [ppb] | LOQ [ppb] |
| AAS | 109.9 | 549.6 | 115.9 | 579.6 |
| ASV | 0.09353 | 0.4677 | 0.07678 | 0.3839 |

Los límites de detección de AAS tanto para plomo como para cadmio fueron mayores a los reportados por el manual del equipo¹⁹, los cuales eran de 80 y 10 ppb respectivamente como se ve en la Tabla 3. Esto se podría atribuir al desgaste de las lámparas del equipo lo cual disminuiría su sensibilidad. Adicionalmente se tuvo que los LOD de ASV fueron ligeramente menores al valor utilizado en las curvas de calibración de 0.1 ppb.

Como se esperaba, la sensibilidad es considerablemente mayor mediante el método de ASV respecto al de AAS. Específicamente 1176 veces más sensible para el plomo y 1510 veces más sensible para el cadmio. Debido a la concentración que se detectó en las muestras y a la relativamente baja concentración permitida para estos metales (20 ppb para Pb y 6 ppb para Cd), el método de AAS no podría ser utilizado para cuantificar Pb y Cd en leches.

4. OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES

El método desarrollado es un método electroquímico que presenta una sensibilidad alta; es por esto que se deben considerar varias situaciones que podrían interferir con las mediciones y/o retrasar los análisis. A continuación, se enumerarán algunas de estas situaciones que surgieron a lo largo del desarrollo de este proyecto junto con sus posibles causas y soluciones.

- Pérdida de film

o Por perturbaciones mecánicas:

El film de Hg formado en la superficie del GCE es delicado, por lo que es susceptible a soltarse parcialmente debido a perturbaciones mecánicas. Golpear el electrodo con las paredes del vaso, tocarlo con la barra de agitación o el simple hecho de enjuagarlo con una corriente delgada de agua destilada, pueden provocar la pérdida parcial del film, lo que causaría una disminución de la sensibilidad.

Para evitar este tipo de inconvenientes se recomienda minimizar el movimiento de los electrodos y enjuagarlos sumergiéndolos en agua destilada. Es importante recordar que, una vez depositado el film de mercurio, los electrodos deben mantenerse conectados permanentemente, caso contrario el film se perdería al ser sumergido en agua destilada.

o Por re-oxidación:

Con plata/cloruro de plata como referencia el voltaje de oxidación del Hg inicia alrededor de los -0.1 V. En la Figura 9 de la sección 3.2 se puede observar un pico que representa el inicio de pérdida de Hg por oxidación. Para asegurarse de no perder el film se recomienda dejar un espacio entre el voltaje en que termina la voltimetría y el de oxidación de Hg. En este proyecto se llegó hasta -0.4 V vs. Ag/AgCl.

- Contaminantes externos diferentes al metal de interés

Pueden existir cationes y/o compuestos orgánicos iónicos cuyo voltaje de oxidación se encuentre cerca de los correspondientes a los metales de interés. Si estos compuestos se encuentran en alguno de los instrumentos (barra de agitación, electrodos) o del material utilizado (balones, vasos), los picos de los metales de interés se encontrarían considerablemente distorsionados (ver Figura 36 en el anexo D de anexos). Se recomienda utilizar una solución al 5% de ácido nítrico que no tenga trazas de los metales para limpiar los materiales.

- Formación de gases por electrolisis

El método de digestión utilizado requiere de ácido nítrico y agua oxigenada, compuestos que en una celda electrolítica generan hidrógeno y oxígeno respectivamente. En la Figura 18 en el anexo A de anexos se puede observar la formación de gases cuando se aplica una diferencia de voltaje entre el GCE y el CE. De existir un volumen de HNO_3 y H_2O_2 tras la digestión, se dará la formación de burbujas de los gases mencionados al momento de la deposición, lo cual tiende a eliminar parcialmente el film de mercurio. Para evitar esto, se debe realizar un secado completo de la muestra durante la digestión.

Otro motivo por el que se podría producir electrolisis en el sistema es que el de voltaje de referencia varíe. Esto puede ocurrir cuando existe un taponamiento en la superficie porosa de este electrodo, o algún otro tipo de desempeño no adecuado del mismo.

- Análisis de datos

En el anexo E de anexos se puede encontrar el código de Matlab utilizado para traducir las voltametrías en área bajo los picos, con sus instrucciones de uso. Este código permite analizar las curvas teniendo que modificar únicamente los vectores de entrada y especificar manualmente los datos de inicio y fin de cada pico. Se recomienda

utilizar un software especializado o crear un programa que detecte dichos datos de manera automática para ahorrar tiempo.

Adicionalmente, se verificó que analizar la curvas durante las corridas en el laboratorio resulta ventajoso, debido a que permite determinar si alguna de las voltametrías devuelve en un dato atípico por lo que pueda requerirse una corrida adicional para tener una mejor precisión.

5. CONCLUSIONES

La contaminación de metales pesados en el ganado ecuatoriano puede causar problemas importantes en la salud del consumidor. El método propuesto tiene la capacidad para cuantificar la presencia de Pb y Cd en leches. Al ser 1176 veces más sensible que el método de AAS en la cuantificación del Pb y 1510 veces más sensible para Cd; posee la sensibilidad necesaria para verificar si una muestra de leche se encuentra contaminada, según los límites establecidos por las normas. Además, a diferencia del método AAS, la muestra no es consumida al ser analizada, por lo que puede ser utilizada en análisis subsecuentes.

El método de ASV propuesto puede ayudar a las lecheras y ganaderas a certificar que los productos que proveen se encuentran libres de contaminación de Pb y Cd, o a identificar la presencia de estos metales para que tomen las medidas necesarias para su mitigación. Adicionalmente, dada la naturaleza de este tipo de análisis, podría ser utilizado para la cuantificación de estos metales pesados en otros alimentos.

El hecho de que el 80% de las muestras analizadas presenten Pb y el 20% presenten Cd, puede ser un indicativo de que se requieren estudios a futuro de la zona en muestras de suelos, pasto, sangre, huesos y población en general.

REFERENCIAS

- (1) Ministerio del Ambiente, A. y T. E. MAE ejecuta proyecto sobre manejo de ganadería sostenible <https://www.ambiente.gob.ec/mae-ejecuta-proyecto-sobre-manejo-de-ganaderia-sostenible/#:~:text=En Ecuador%2C la ganadería es,después de la producción petrolera.>
- (2) de la Cueva, F.; Naranjo, A.; Torres, B. P.; Aragón, E. Presence of Heavy Metals in Raw Bovine Milk from Machachi, Ecuador. *Granja* **2021**.
<https://doi.org/10.17163/LGR.N33.2021.02>.
- (3) Chirinos-Peinado, D.; Castro-Bedriñana, J.; García-Olarte, E.; Quispe-Ramos, R.; Gordillo-Espinal, S. Transfer of Lead from Soil to Pasture Grass and Milk near a Metallurgical Complex in the Peruvian Andes. *Transl. Anim. Sci.* **2021**.
<https://doi.org/10.1093/tas/txab003>.
- (4) Garrett, R. G. Natural Sources of Metals to the Environment. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2000**. <https://doi.org/10.1080/10807030091124383>.
- (5) Nriagu, J. O. A Global Assessment of Natural Sources of Atmospheric Trace Metals. *Nature* **1989**. <https://doi.org/10.1038/338047a0>.
- (6) Buat-Ménard, P.; Arnold, M. The Heavy Metal Chemistry of Atmospheric Rarticulate Matter Emitted by Mount Etna Volcano. *Geophys. Res. Lett.* **1978**.
<https://doi.org/10.1029/GL005i004p00245>.
- (7) NIOSH. Health Problems Caused by Lead
<https://www.cdc.gov/niosh/topics/lead/health.html> (accessed Mar 23, 2022).
- (8) CDC. Cadmium https://www.cdc.gov/biomonitoring/Cadmium_FactSheet.html
(accessed Mar 23, 2022).
- (9) Wallin, M.; Barregard, L.; Sallsten, G.; Lundh, T.; Karlsson, M. K.; Lorentzon, M.; Ohlsson, C.; Mellström, D. Low-Level Cadmium Exposure Is Associated with

- Decreased Bone Mineral Density and Increased Risk of Incident Fractures in Elderly Men: The MrOS Sweden Study. *J. Bone Miner. Res.* **2016**.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.2743>.
- (10) Engström, A.; Michaëlsson, K.; Suwazono, Y.; Wolk, A.; Vahter, M.; Åkesson, A. Long-Term Cadmium Exposure and the Association with Bone Mineral Density and Fractures in a Population-Based Study among Women. *J. Bone Miner. Res.* **2011**.
<https://doi.org/10.1002/jbmr.224>.
- (11) INEN. *LECHE CRUDA. REQUISITOS. NTE INEN 9*; Ecuador, 2012.
- (12) EFSA. EFSA sets lower tolerable intake level for cadmium in food
<https://www.efsa.europa.eu/en/news/efsa-sets-lower-tolerable-intake-level-cadmium-food#:~:text=The European Food Safety Authority's,an analysis of new data>.
- (13) FDA. Lead in Food, Foodwares, and Dietary Supplements
<https://www.fda.gov/food/metals-and-your-food/lead-food-foodwares-and-dietary-supplements>.
- (14) FAO; WHO. Codex Alimentarius https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B193-1995%252FCXS_193s.pdf.
- (15) Amer, A. A. E. M.; El-Makarem, H. S. A.; El-Maghraby, M. A. E.; Abou-Alella, S. A. E. Lead, Cadmium, and Aluminum in Raw Bovine Milk: Residue Level, Estimated Intake, and Fate during Artisanal Dairy Manufacture. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* **2021**.
<https://doi.org/10.5455/javar.2021.h534>.
- (16) Al-Garory, N. H. S.; Al-Kaabi, W. J. Determination of Some Heavy Metals Concentration in Some Dairy Products from Three Different Regions of Basrah, Iraq. *Basrah J. Agric. Sci.* **2020**. <https://doi.org/10.37077/25200860.2020.33.2.01>.
- (17) INEN. Leche y Productos Lácteos. Determinación Del Contenido de Plomo. Método

- de Espectrometría de Absorción Atómica En Horno de Grafito (ISO/TS 6733:2006, IDT), 2014.
- (18) Ullah, A. K. M. A.; Maksud, M. A.; Khan, S. R.; Lutfu, L. N.; Quraishi, S. B. Development and Validation of a GF-AAS Method and Its Application for the Trace Level Determination of Pb, Cd, and Cr in Fish Feed Samples Commonly Used in the Hatcheries of Bangladesh. *J. Anal. Sci. Technol.* **2017**. <https://doi.org/10.1186/s40543-017-0124-y>.
- (19) Buck-Scientific. *Buck Model 210VGP Atomic Absorption Spectrophotometer. Operator's Manual*, VER 3.74.; Norwalk, 2000.
- (20) Shahbazi, Y.; Ahmadi, F.; Fakhari, F. Voltammetric Determination of Pb, Cd, Zn, Cu and Se in Milk and Dairy Products Collected from Iran: An Emphasis on Permissible Limits and Risk Assessment of Exposure to Heavy Metals. *Food Chem.* **2016**. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.07.123>.
- (21) Palisoc, S.; Gonzales, A. J.; Pardilla, A.; Racines, L.; Natividad, M. Electrochemical Detection of Lead and Cadmium in UHT-Processed Milk Using Bismuth Nanoparticles/Nafion®-Modified Pencil Graphite Electrode. *Sens. Bio-Sensing Res.* **2019**. <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2019.100268>.
- (22) Grabarczyk, M.; Wardak, C. Rapid Determination of Lead in Environmental Water by Anodic Stripping Voltammetry. *Anal. Lett.* **2016**. <https://doi.org/10.1080/00032719.2014.1003426>.
- (23) Sadeghi, N.; Behzad, M.; Razavi, S. H.; Jannat, B.; Oveisi, M. R.; Hajimahmoodi, M. Measurement of Zinc, Copper, Lead, and Cadmium in the Variety of Packaging Milk and Raw Milk in Tehran Markets by Anodic Stripping Voltammetry. *J. Chem. Heal. Risks* **2020**. <https://doi.org/10.22034/jchr.2020.1877927.1048>.
- (24) Yao, Y.; Wu, H.; Ping, J. Simultaneous Determination of Cd(II) and Pb(II) Ions in

- Honey and Milk Samples Using a Single-Walled Carbon Nanohorns Modified Screen-Printed Electrochemical Sensor. *Food Chem.* **2019**.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.110>.
- (25) Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2001; Vol. 2.
- (26) M. Cardoso, L.; B. Mainier, F.; A. P. Itabirano, J. Analysis Voltammetry of Cyanide and Process Electrolytic Removal of Cyanide in Effluents. *Am. J. Environ. Eng.* **2014**.
<https://doi.org/10.5923/j.ajee.20140406.07>.
- (27) Peters, J. B.; Combs, S.; Hoskins, B.; Jarman, J.; Kovar, J.; Watson, M.; Wolf, A.; Wolf, N. *Recommended Methods of Manure Analysis*; Cooperative Extension Publishing Operations: Wisconsin, 2003.
- (28) Robinson, J.; Skelly, E.; Frame, G. *Undergraduate Instrument Analysis*, 6th ed.; Marcel Dekker, 2005.
- (29) Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*, 8th ed.; W. H. Freeman and Company: New York, 2010.
- (30) IGEPN. Red de Observatorios Vulcanológicos <https://www.igepn.edu.ec/red-de-observatorios-vulcanologicos-rovig> (accessed May 10, 2022).

ANEXOS

Anexo A: Instrumentación y Teoría



Figura 14. Electrodo de carbono vidriado con film de mercurio (izq.) y sin film de mercurio (der.)

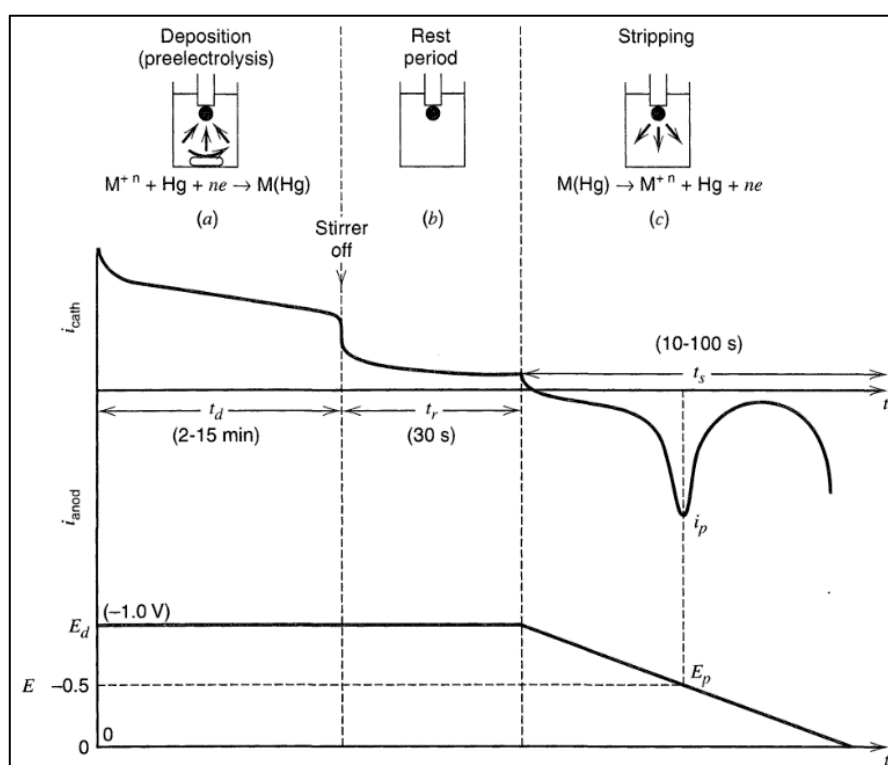


Figura 15. Voltametrías de las etapas de deposición, equilibrio y redisolución (Extracto de Bard)²⁵



Figura 16. Corcho con los electrodos de trabajo colocados en forma de L



Figura 17. Sistema de baño de arena para digestión ácida de leches (izquierda) y filtración de solución tras digestión (derecha).

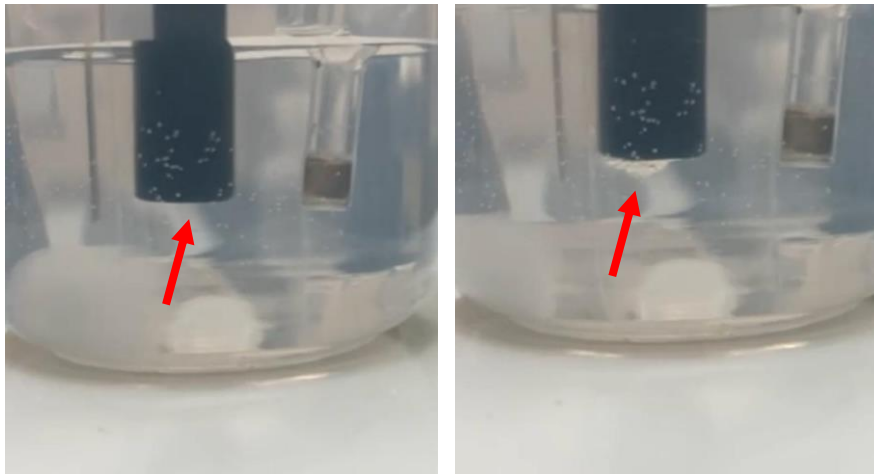


Figura 18. GCE antes y después de aplicar el voltaje de deposición en un medio con ácido nítrico y agua oxigenada

Anexo B: Curvas de Calibración

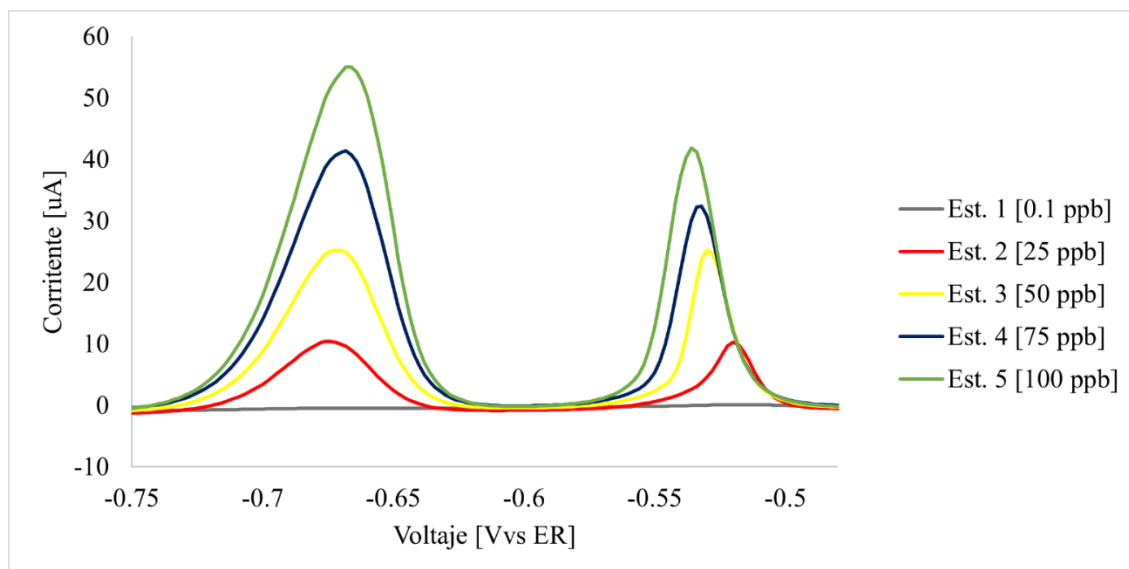


Figura 19. Voltametría anódica de la curva 6-08

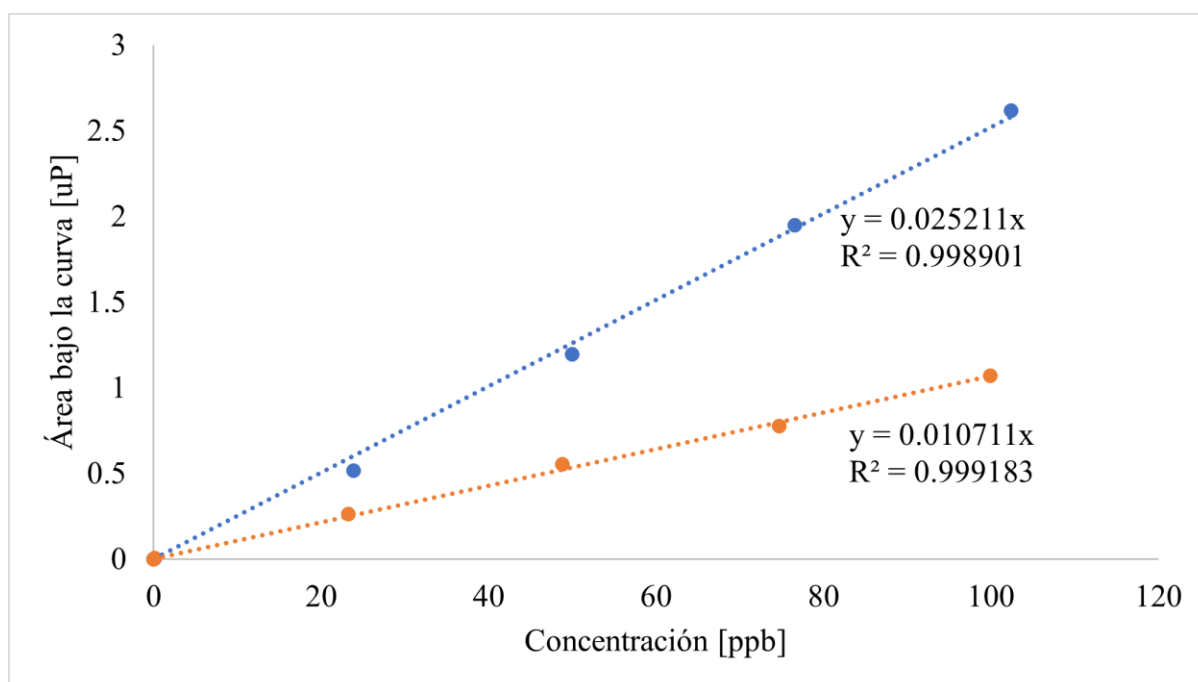


Figura 20. Curva de calibración del 6-08 con Cd (Azul) y Pb (Naranja).

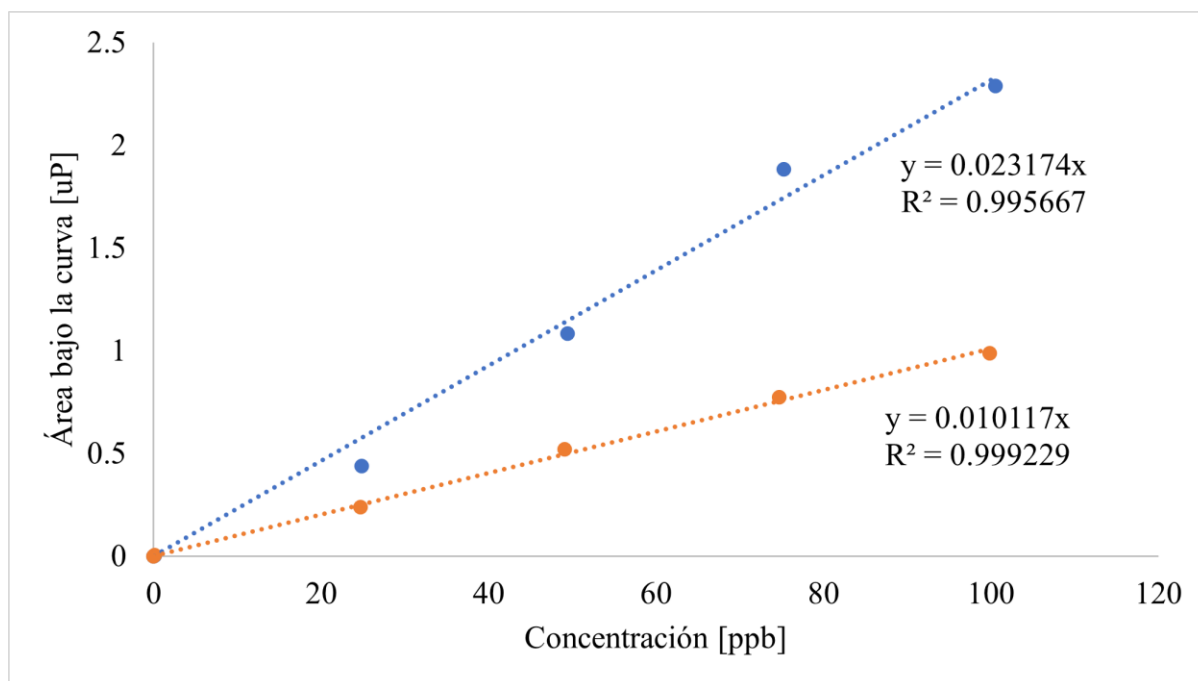


Figura 21. Curva de calibración del 17-08 con Cd (Azul) y Pb (Naranja).

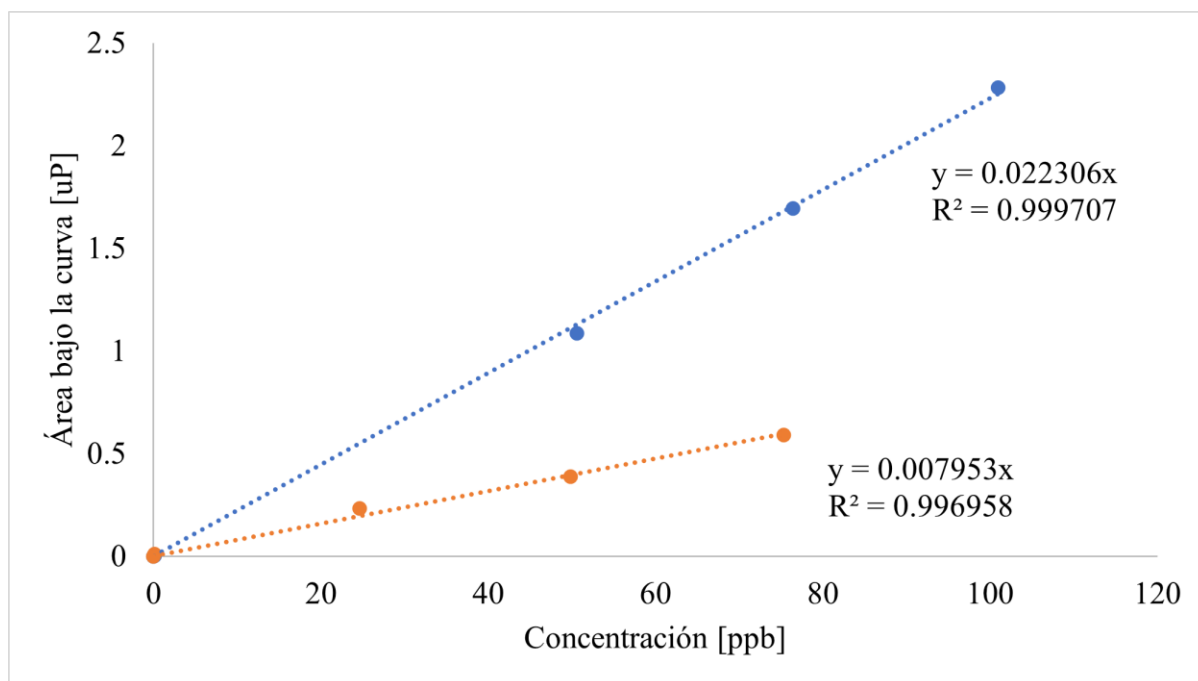


Figura 22. Curva de calibración del 20-08 con Cd (Azul) y Pb (Naranja).

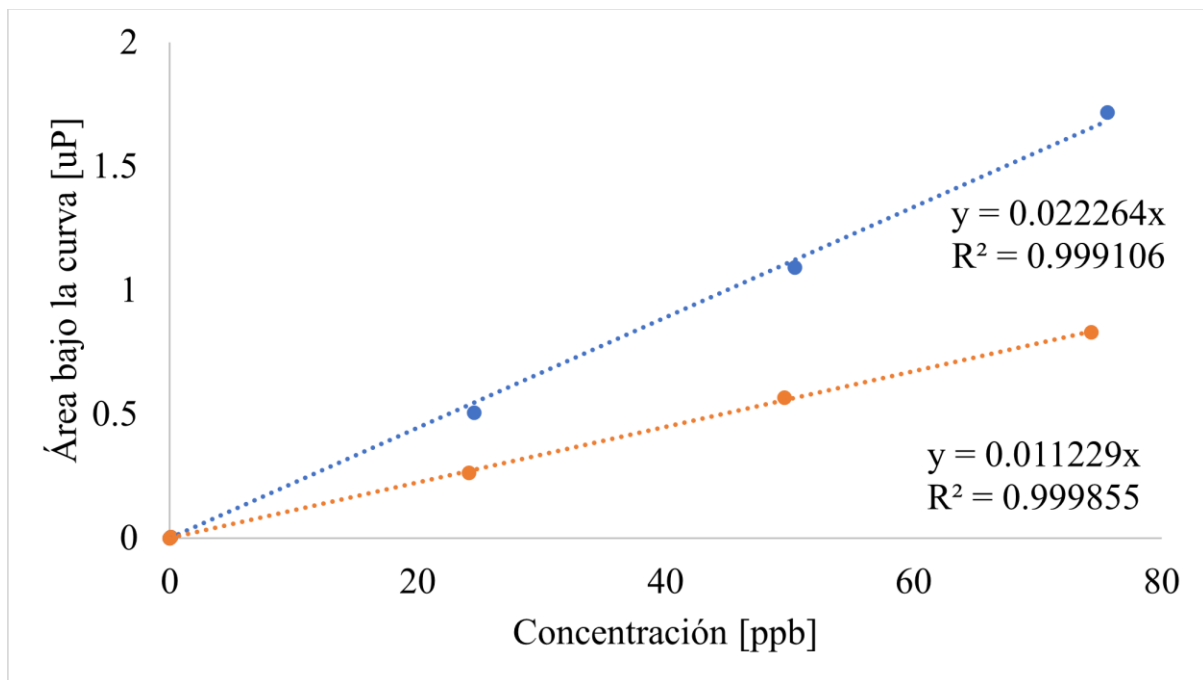


Figura 23. Curva de calibración del 10-09 con Cd (Azul) y Pb (Naranja).

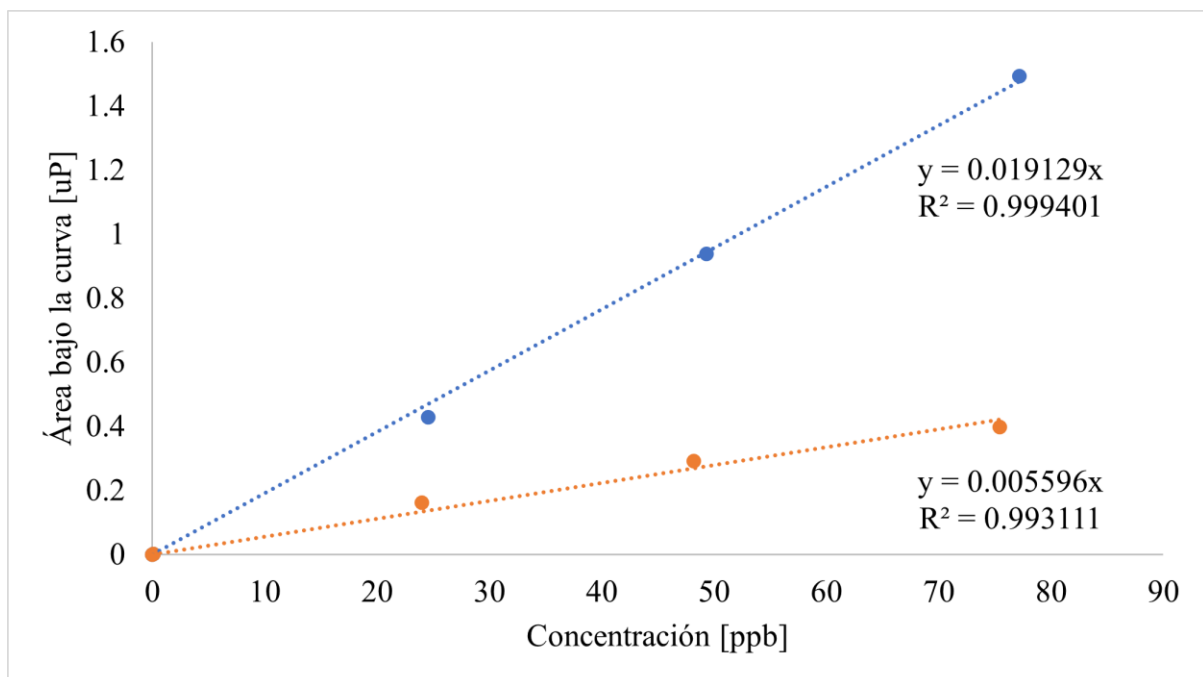


Figura 24. Curva de calibración del 1-10 con Cd (Azul) y Pb (Naranja)

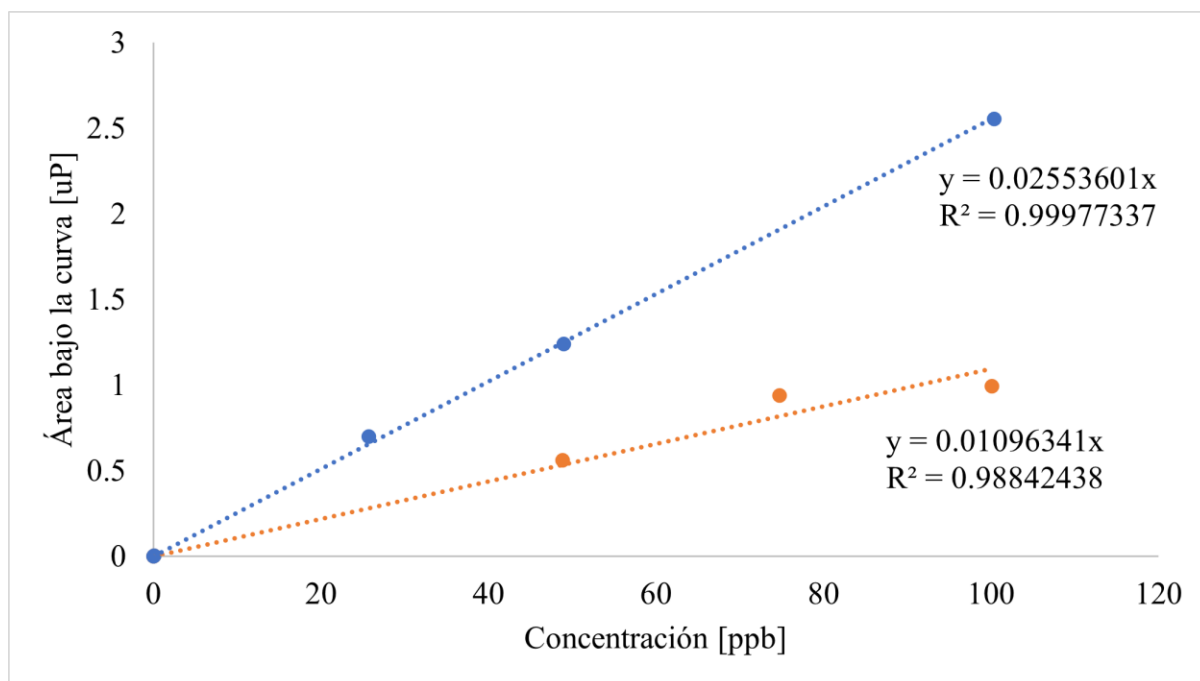


Figura 25. Curva de calibración del 21-02 con Cd (Azul) y Pb (Naranja).

Anexo C: Información de Muestras

Tabla 4. Información estadística de las muestras

| Muestra | Masa de muestra [g] | Numero de mediciones | Cd [ppb] | Intervalo de confianza al 95% | Desviación estándar | Variación porcentual | Factor de recuperación | Pb [ppb] | Intervalo de confianza al 95% | Desviación estándar | Variación porcentual | Factor de recuperación |
|-------------------|---------------------|----------------------|----------|-------------------------------|---------------------|----------------------|------------------------|----------|-------------------------------|---------------------|----------------------|------------------------|
| 1 (RZ 57) | 1.285 | 3.000 | 3.423 | 4.933 | 1.985 | 58.004 | 0.943 | 28.390 | 23.527 | 9.470 | 33.356 | 1.609 |
| 2 (RZ 77) | 1.997 | 3.000 | ND | - | - | - | - | ND | - | - | - | - |
| RZ 82 | 1.306 | 3.000 | ND | - | - | - | 0.547 | 17.982 | 2.485 | 1.000 | 5.563 | 0.984 |
| 4 (RZ 85) | 1.441 | 3.000 | ND | - | - | - | 0.547 | 2.332 | 1.250 | 0.503 | 21.577 | 0.984 |
| 5 (RZ 89) | 1.153 | 2.000 | 7.548 | 4.598 | 0.512 | 6.780 | 0.547 | 16.542 | 19.155 | 2.132 | 12.889 | 0.984 |
| 6 (RZ 105) | 2.986 | 3.000 | ND | - | - | - | 0.774 | 3.724 | 0.590 | 0.237 | 6.377 | 1.349 |
| 7 (RZ 122) | 0.911 | 3.000 | ND | 0.000 | - | - | 0.774 | 9.390 | 2.787 | 1.122 | 11.949 | 1.349 |
| 8 (RZ 123) | 1.060 | 3.000 | ND | - | - | - | 0.774 | ND | 0.000 | - | - | 1.349 |
| 9 (RZ 133) | 1.318 | 3.000 | ND | - | - | - | 0.744 | 13.611 | 3.572 | 1.438 | 10.564 | 1.063 |
| 10 (RZ 85) | 1.686 | 3.000 | ND | - | - | - | 0.744 | 7.709 | 5.628 | 2.266 | 29.389 | 1.063 |

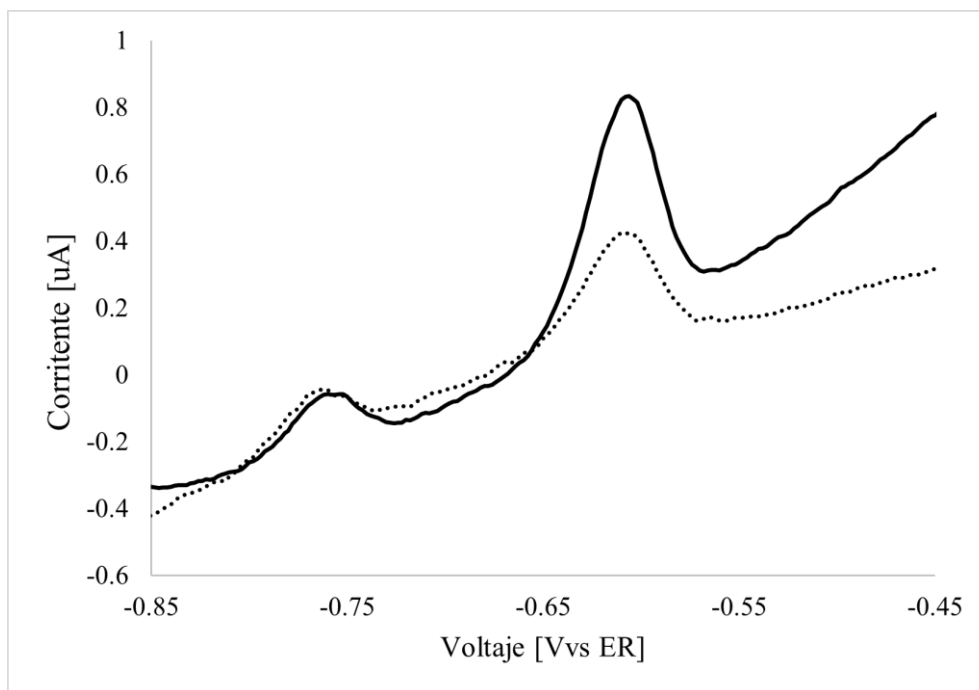
Anexo D: Voltametrías de Muestras Analizadas

Figura 26. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 1 con su blanco (línea punteada).

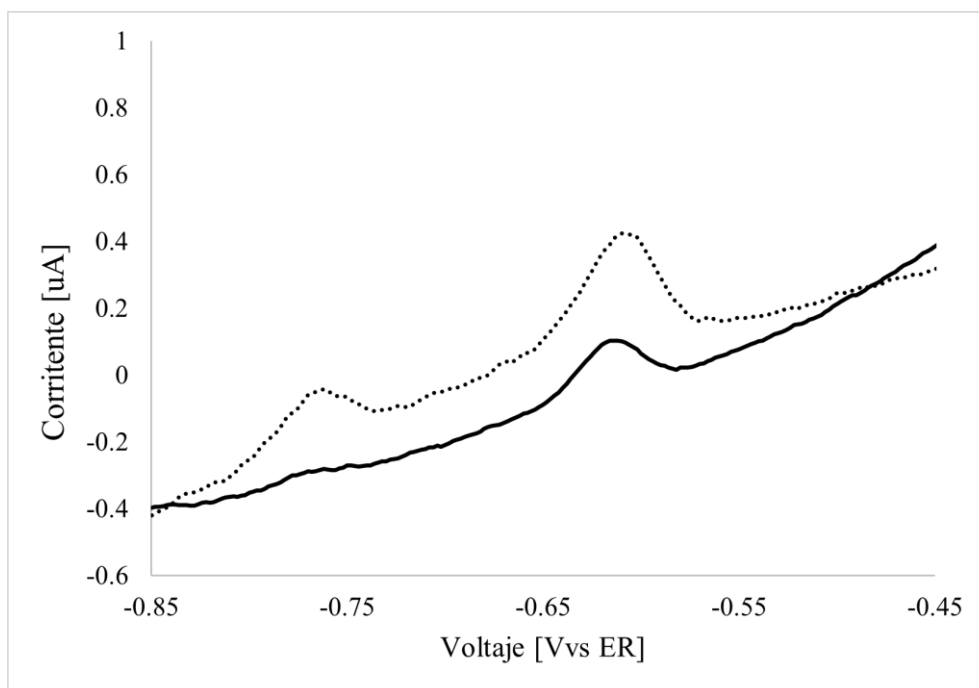


Figura 27. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 2 con su blanco (línea punteada).

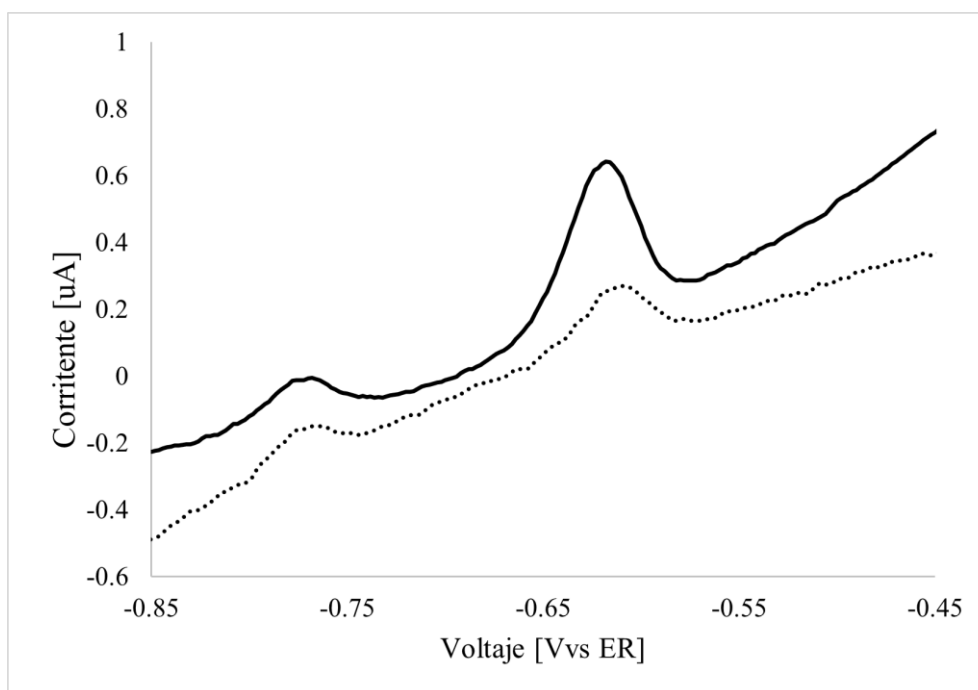


Figura 28. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 3 con su blanco (línea punteada).

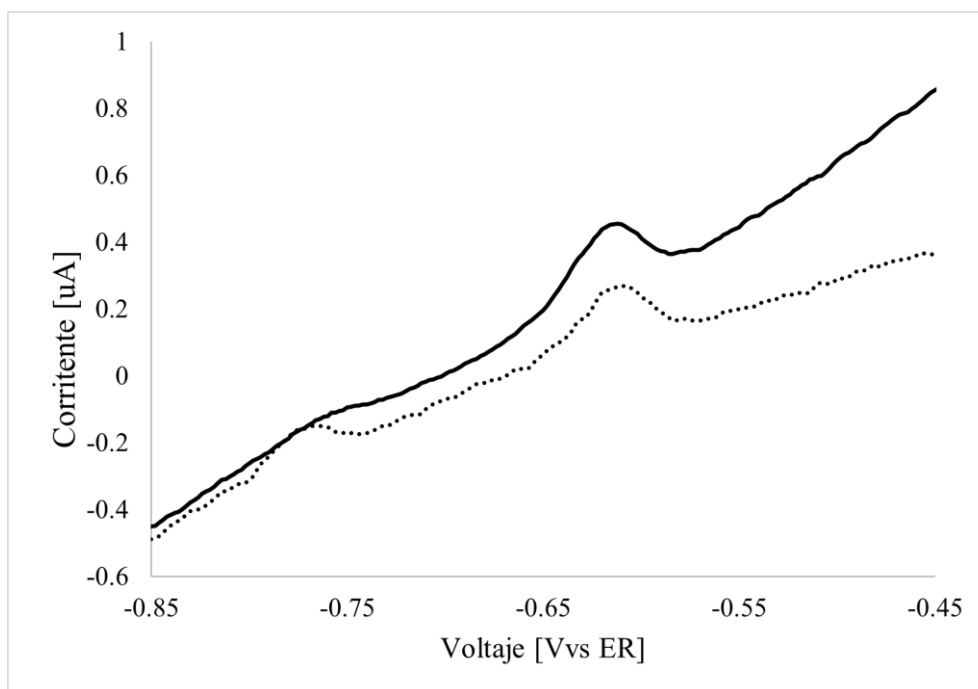


Figura 29. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 4 con su blanco (línea punteada).

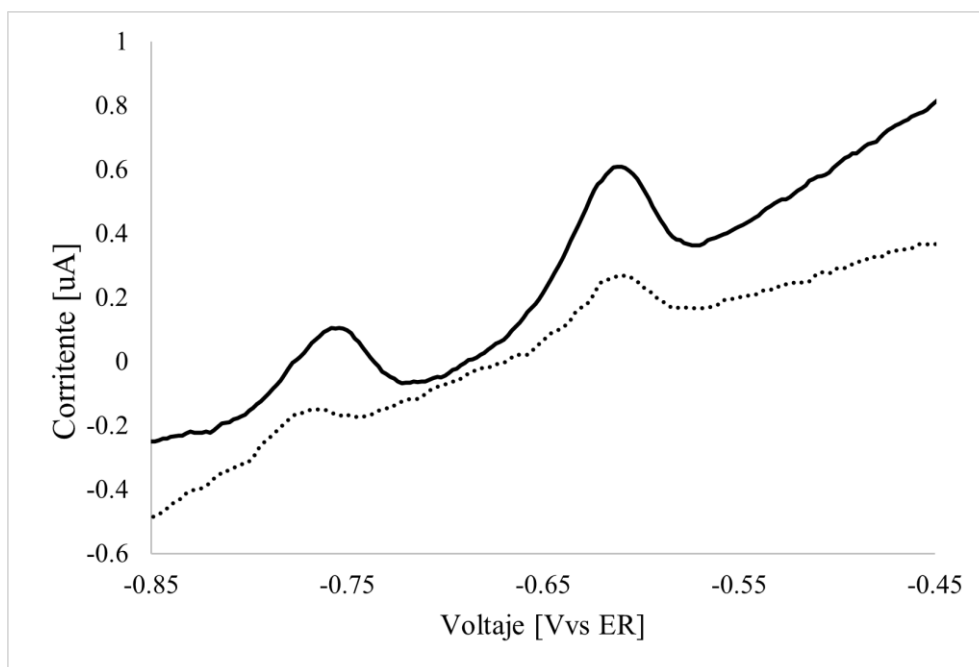


Figura 30. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 5 con su blanco (línea punteada).

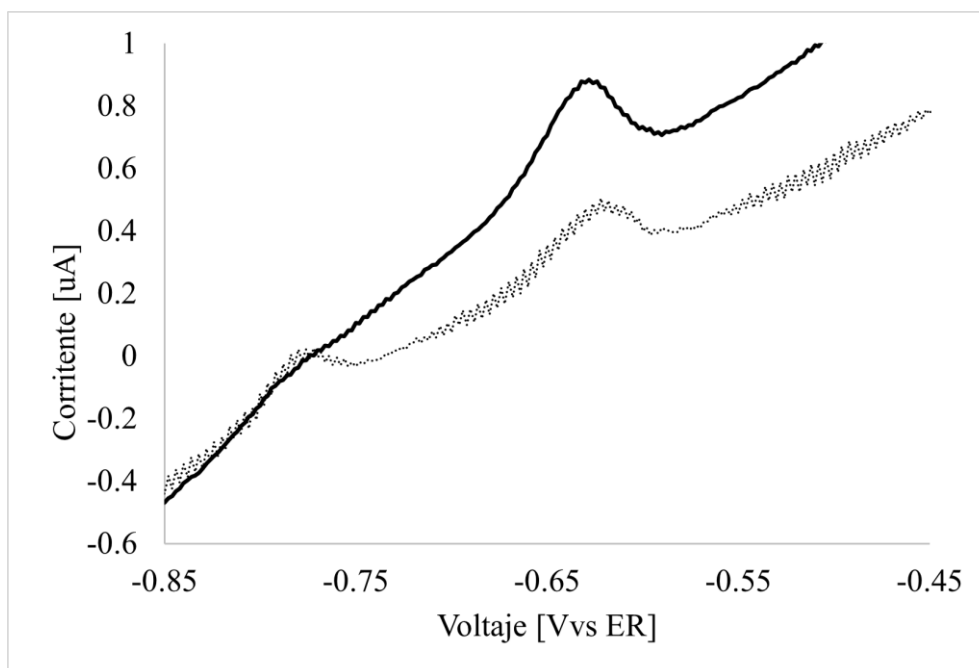


Figura 31. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 6 con su blanco (línea punteada).

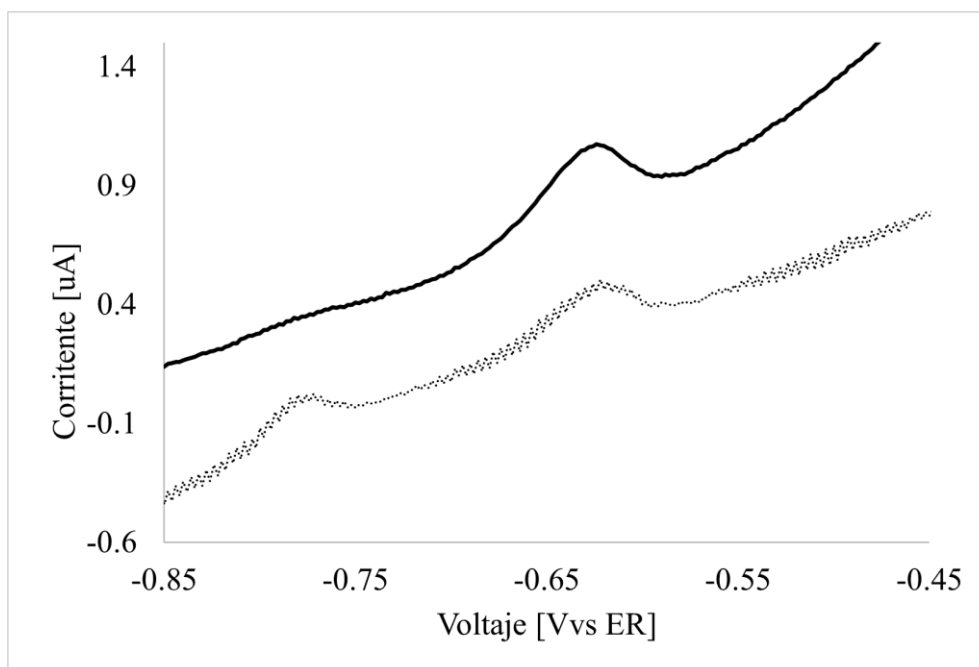


Figura 32. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 7 con su blanco (línea punteada).

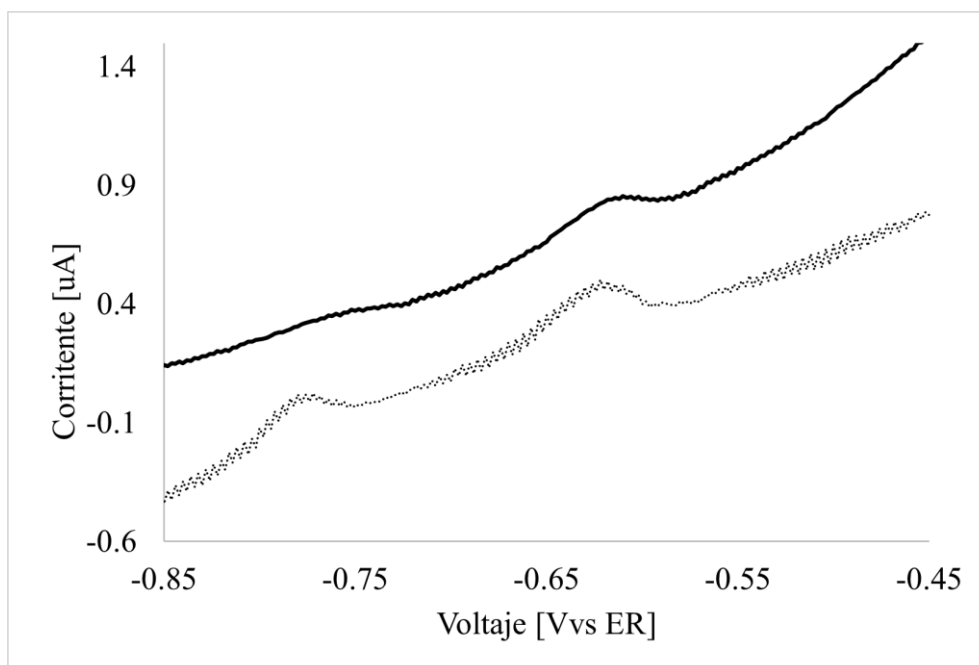


Figura 33. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 8 con su blanco (línea punteada).

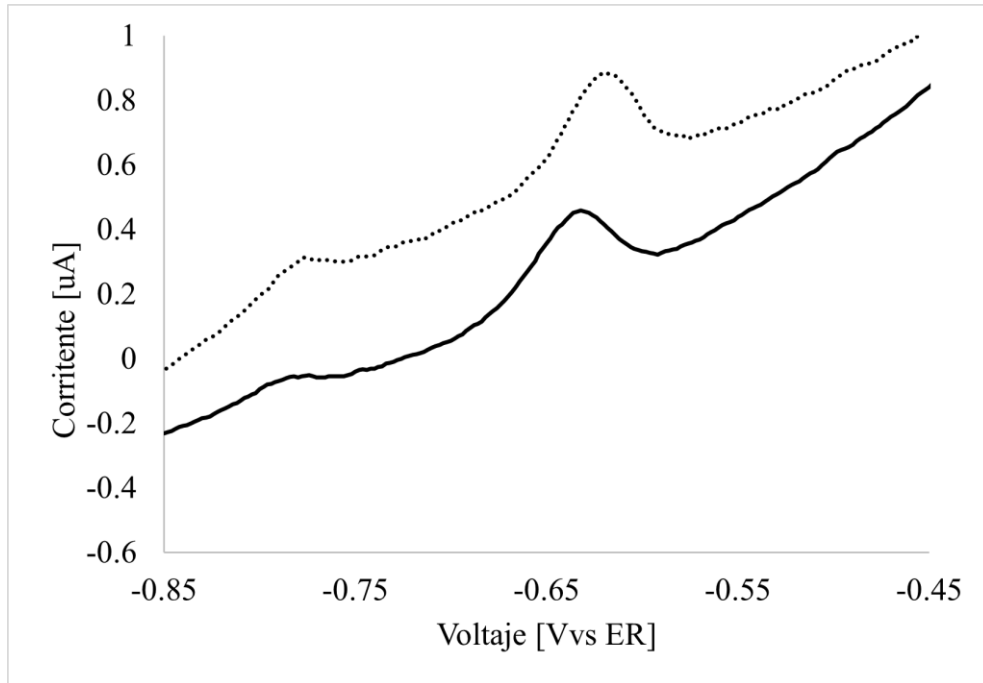


Figura 34. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 9 con su blanco (línea punteada).

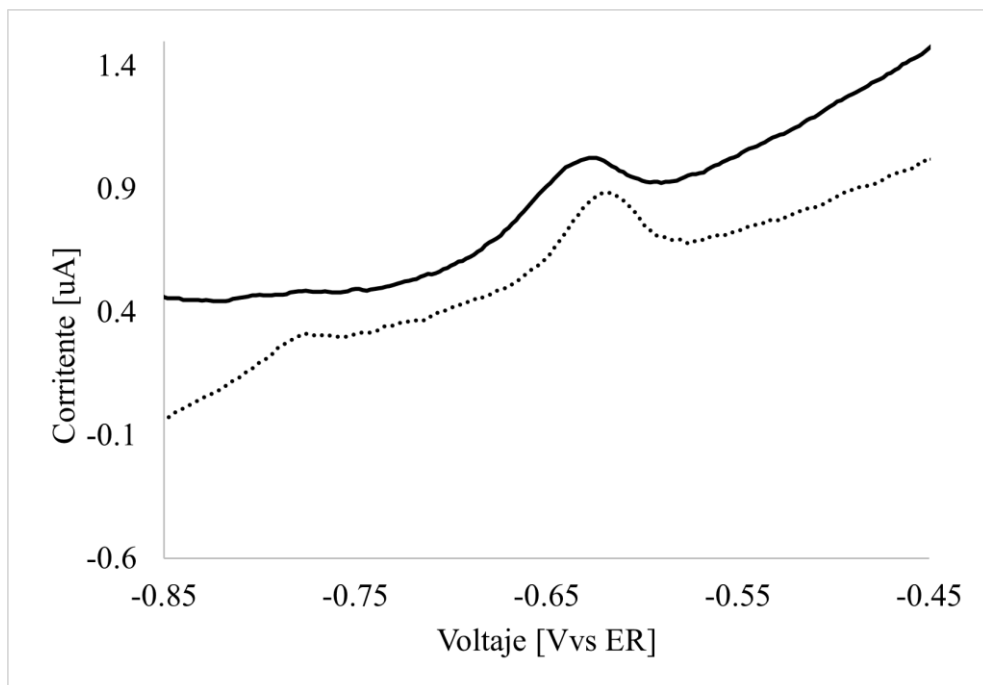


Figura 35. Voltametrías Anódicas (Voltaje de referencia Ag/AgCl) de la muestra 10 con su blanco (línea punteada).

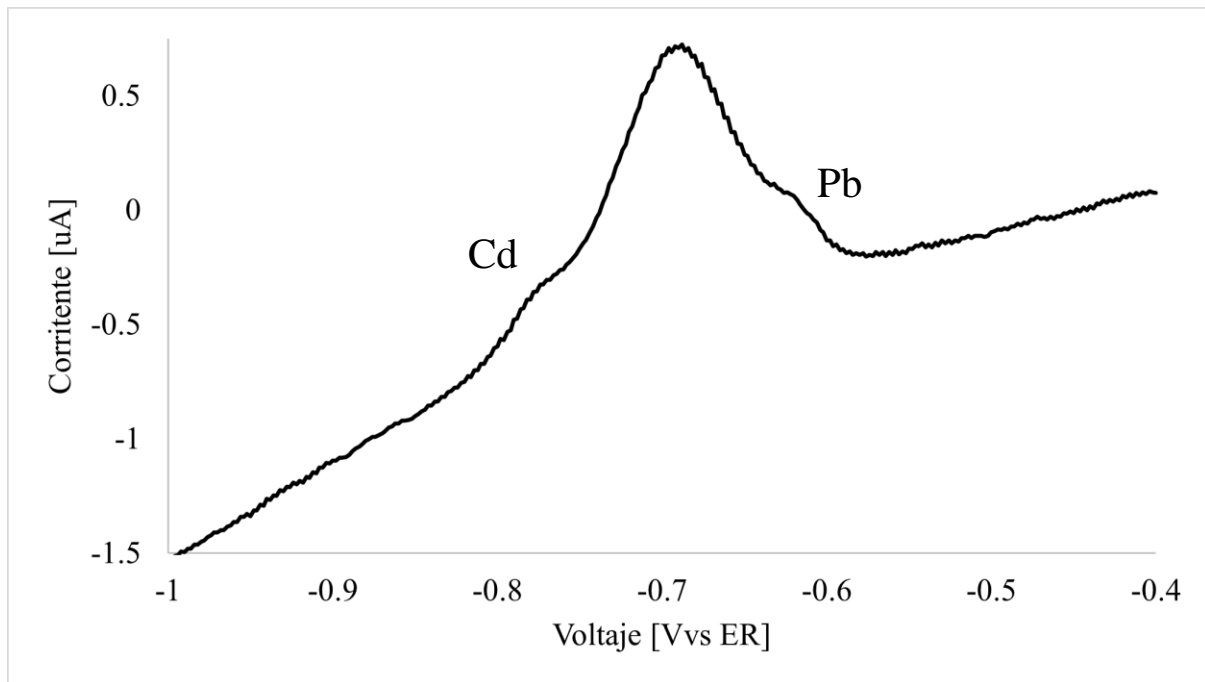


Figura 36. Voltametría donde se visualiza un contaminante desconocido entre los picos de Cd y Pb

Anexo E: Matlab

Código de Matlab ®:

```

clc;
close all;
clear all;

format longG

%Vector de voltaje / añadir
volt_f=[];
volt=transpose(volt_f);
%Solo se requiere un vector de voltaje para todo el script

%vector de corriente de muestra / añadir
iestNf=[];
iestN=transpose(iestNf);
%Cada vector de corriente corresponderá a una voltametría, cambiar N por
%el número de voltametría respectivo

%tabla de voltaje
Nf=[1:length(volt)];
N=transpose(Nf);
table(N,volt)
%La tabla mostrará qué voltaje corresponde a qué # de dato, siendo el
%primer voltaje de la corrida el dato 1

%Análisis de cada voltametría, cambiar N en cada variable por el # de la
%voltametría

%Muestra N

    %pico Cd

    % #s de datos en los que inicia y termina el pico de Cd / añadir
    numEN_Cd_1= 1 ;
    numEN_Cd_2= 2 ;

    %Rango de datos del pico de Cd
    pic_cd_estN_v=[volt(numEN_Cd_1:numEN_Cd_2)];
    pic_cd_estN_i=[iestN(numEN_Cd_1:numEN_Cd_2)];

    %Pendiente e intersección de línea base para pico de Cd
    baseNcd=zeros(length(pic_cd_estN_v),1);
    mNcd=((pic_cd_estN_i(length(pic_cd_estN_v)))-
(pic_cd_estN_i(1)))/((pic_cd_estN_v(length(pic_cd_estN_v)))-(pic_cd_estN_v(1)));
    bNcd=(-(mNcd* (pic_cd_estN_v(1)) ) + (pic_cd_estN_i(1)));

    %Línea base para pico de Cd
    for i=1:length(pic_cd_estN_v)
    baseNcd(i)=(mNcd*(pic_cd_estN_v(i)))+bNcd;
    end

    %Obtención de área entre pico y línea base de Cd
    intA_cd_estN=trapz(pic_cd_estN_v,pic_cd_estN_i);
    intA_cd_baseN=trapz(pic_cd_estN_v,baseNcd);

```

```

A_cd_estN=intA_cd_estN-intA_cd_baseN

%pico Pb

% #s de datos en los que inicia y termina el pico de Pb / añadir
numEN_Pb_1= 1 ;
numEN_Pb_2= 2 ;

%Rango de datos del pico de Pb
pic_pb_estN_v=[volt(numEN_Pb_1:numEN_Pb_2)];
pic_pb_estN_i=[iestN(numEN_Pb_1:numEN_Pb_2)];

%Pendiente e intersección de línea base para pico de Pb
baseNpb=zeros(length(pic_pb_estN_v),1);
mNpb=((pic_pb_estN_i(length(pic_pb_estN_v)))-
(pic_pb_estN_i(1)))/((pic_pb_estN_v(length(pic_pb_estN_v)))-(pic_pb_estN_v(1)));
bNpb=(-(mNpb*(pic_pb_estN_v(1))) + (pic_pb_estN_i(1)));

%Línea base para pico de Pb
for i=1:length(pic_pb_estN_v)
baseNpb(i)=(mNpb*(pic_pb_estN_v(i))+bNpb;
end

%Obtención de área entre pico y línea base de Pb
intA_pb_estN=trapz(pic_pb_estN_v,pic_pb_estN_i);
intA_pb_baseN=trapz(pic_pb_estN_v,baseNpb);
A_pb_estN=intA_pb_estN-intA_pb_baseN

%Graficas para areas

plot(volt,iestN);
hold on;
plot(pic_cd_estN_v,baseNcd);
hold on;
plot(pic_pb_estN_v,baseNpb)

```

Funcionamiento:

El Código adjunto permite tanto graficar las voltametrías como obtener el área bajo los picos correspondientes a las señales de Cd y Pb.

Las líneas que se deben editar para el análisis de cada voltametría tienen en el final del comentario de título “añadir” y corresponden a: vector de voltaje, vector de corriente, y números de datos de inicio y fin de los picos de Cd y Pb.

Los vectores son los obtenidos de las voltametrías, y requieren ser añadidos como vectores fila, es decir, separados únicamente por espacios o comas.

Los números de datos deben ser obtenidos del gráfico generado. La opción señalada en la figura x, permite obtener los valores de X y Y de un plot al hacer click sobre el dato,

como se puede observar en la Figura 37 (se recomienda aumentar el zoom hasta poder seleccionar el inicio y fin de cada pico con precisión). En este caso, el voltaje que corresponde al inicio del pico de Pb es de -0.718 V (el dato de corriente no es relevante).

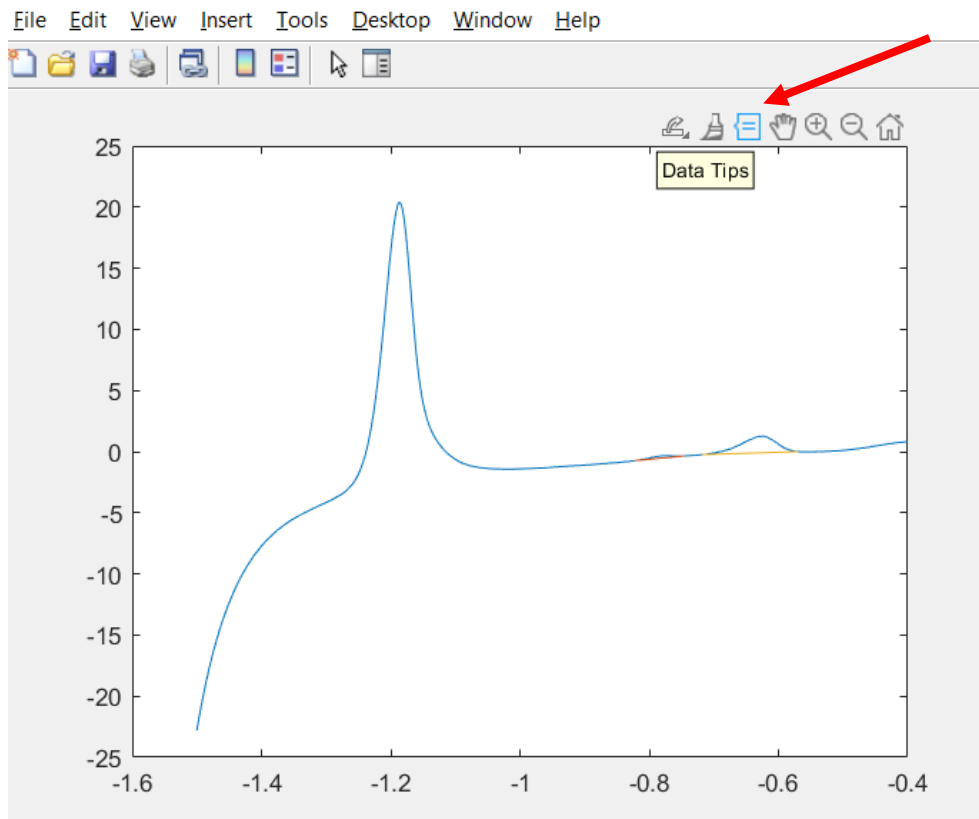


Figura 37. Gráfico generado por MATLAB® de una voltametría

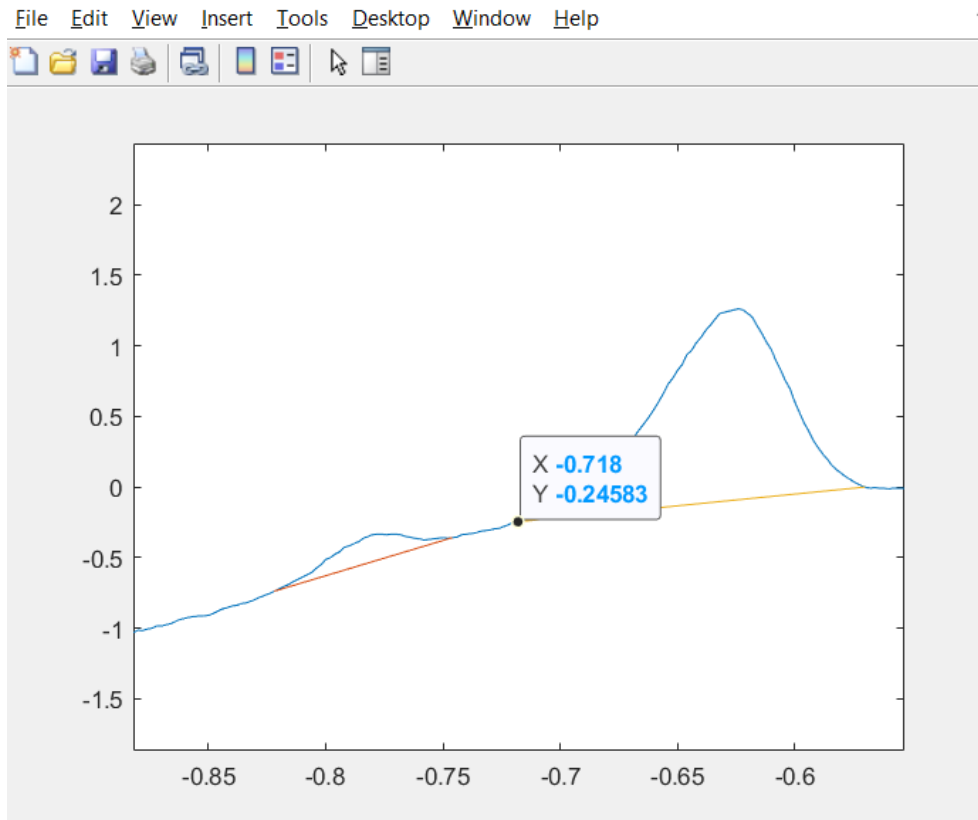


Figura 38. Acercamiento a los picos de Cd y Pb en la voltametría del gráfico generado por MATLAB®

Una vez se conoce el voltaje (valor X) que corresponde al dato de interés, se puede buscar a qué número de dato corresponde gracias a la tabla generada en el *Command Window*. En la Figura 38 pueden observar que el voltaje -0.718 corresponde al dato 392

| | |
|-----|--------|
| 389 | -0.724 |
| 390 | -0.722 |
| 391 | -0.72 |
| 392 | -0.718 |
| 393 | -0.716 |
| 394 | -0.714 |
| 395 | -0.712 |
| 396 | -0.71 |

Así, el número que habría que colocar en la variable *numEN_Pb_1* es 392. Al colocar el dato del final del pico de Pb en *numEN_Pb_2*, el código nos devolverá el valor del área bajo dicho pico en la variable *A_pb_estN*, que a su vez será desplegado en el *Command Window*. El proceso es el mismo para el caso del cadmio, con la única diferencia de que se utiliza el pico de la izquierda.