



UNIVERSIDAD
DE GUANAJUATO
Campus Guanajuato

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

POSGRADO INSTITUCIONAL EN QUÍMICA

**“USO DE ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ATÓMICA CON
EXCITACIÓN EN PLASMA DE MICROONDAS (MP-AES) PARA LA
DETERMINACIÓN DE METALES TRAZA Y MAYORITARIOS EN
MATERIALES DE RELEVANCIA PARA ALIMENTOS”.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA:

Q.I. TANIA LIZETH ESPINOZA CRUZ

Guanajuato, Gto.

Agosto 2019

Guanajuato, Gto. Agosto del 2019

Por medio de la presente me responsabilizo de la autenticidad y originalidad del presente trabajo titulado “Uso de espectrometría de emisión atómica con excitación en plasma de microondas (MP-AES) para la determinación de metales traza y mayoritarios en materiales de relevancia para alimentos”, realizado por Q.I. Tania Lizeth Espinoza Cruz, para obtener el título de Maestra en Ciencias químicas (M.C.), en el Departamento de Química Sede Pueblito de Rocha de la División de Ciencias Naturales y Exactas del Campus Guanajuato de la Universidad de Guanajuato.

Directora:

Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Co-Director:

Dr. Kazimierz Wrobel Zasada

Miembro del comité:

Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar

Miembros del jurado para el examen que para obtener el grado de Maestra en Ciencias químicas presenta la Q.I. Tania Lizeth Espinoza Cruz.

SINODALES

Dra. Eunice Yañez Barrientos
Presidenta

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa
Secretaria

Dr. Armando Gómez Ojeda
Vocal

M.C. Israel Enciso Donis
Suplente

*A Dios y a las personas que más amo en
todo el mundo: Marcos, Lety, Marquitos.*

Agradecimientos

Índice de contenido	
Índice de figuras	8
Índice de Tablas.....	9
Abreviaciones.....	10
Resumen:.....	13
I. Introducción	13
I.1. Espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (MP-AES): alcances y limitaciones de la técnica.	15
I.2. Elementos minerales en vino de mesa.	17
I.2.1. Fuentes naturales y antropogénicas, y concentraciones reportadas.	17
I.2.2. Normatividad vigente.	18
I.2.3. Impacto de los metales/metaloideos contenidos en vino sobre las propiedades sensoriales y en la salud del consumidor.	19
I.2.4. Metales/metaloideos en estudios de procedencia de vinos.....	20
I.2.5. Esquemas de fraccionamiento y especiación analítica de metales/metaloideos en vinos.	23
I.3. Breve descripción de los métodos de cuantificación a utilizar	25
1.3.1. Calibración externa	25
1.3.2. Método de adición de estándar.....	25
1.3.3. Método de dilución de estándar	26
1.3.4. Método de calibración multi-energía.....	30
I.4. Justificación	¡Error! Marcador no definido.
II. Objetivos	32
II.1. Objetivo general	32
II.2. Objetivos específicos	33
III. Parte experimental	33
III.1. Instrumentación.....	33
III.2. Materiales y reactivos.....	33
III.3. Software.....	34
III.4. Muestras	34
III.5. Protocolos de limpieza.....	36
IV. Resultados y discusión	36
IV.1. Determinación de metales totales en vino por MP-AES	36
IV.1.1. Ajuste de los factores de dilución y de condiciones instrumentales.....	36

IV.1.2. Calibración externa	42
IV.1.3 Análisis de vinos basado en calibración externa	44
IV.1.4 Cuantificación de metales en vinos por el método de adición de estándar	45
IV.1.5 Cuantificación de metales por el método de dilución de estándar.....	53
IV.1.7 Cuantificación de metales por calibración multi energía	63
IV.2. Evaluación comparativa de diferentes métodos de cuantificación	68
IV.3. Factibilidad del uso de metales determinados en estudios de procedencia de vinos mexicanos	71
V. Conclusiones	75
VI. Bibliografía	78

Índice de figuras

Fig. 1 Gráfico típico obtenido para el método SDA, representado por la lectura en tiempo real para 3 longitudes de onda, donde se muestran las regiones del grafico en diferentes puntos del método.	27
Fig. 2 Espectros obtenidos directamente del software MP Expert para estroncio en la muestra de vino con dilución 1:10 a) lectura a 460.733 nm b) lectura a 481.188 nm c) lectura a 407.771 nm.	38
Fig. 3 Espectro obtenido para aluminio con el ajuste de línea base automático y solución estándar 0.01 mg/L de aluminio a) matriz sin etanol b) matriz con 1.25 % de etanol.	389
Fig. 4 Espectros obtenidos para construir la curva de calibración, incluyendo la lectura de la muestra de vino chileno (ajuste automático de la línea base). a) Potasio a 769.897 nm b) Calcio a 396.847 nm c) Manganeso a 407.076 nm d) Estroncio a 407.771 nm.	42
Fig. 5 Espectros obtenidos a partir de la lectura de la muestra de vino tinto chileno para manganeso a 403.076 nm (arriba) y hierro a 373.713 (abajo), comparando entre el ajuste manual (izquierda) y automático (derecha) de línea base.	46
Fig. 6 Espectro de emisión del hierro a 373.713 nm con lectura del blanco y de diferentes adiciones de estándar.	47
Fig. 7 Espectros representativos de cada grado de dilución obtenidos a partir de la lectura de la muestra A, siendo en todos los casos A1 la lectura sin adición, A2 adición al 50%, A3 adición al 100% y A4 adición al 150%.	47
Fig. 8 Gráfico típico obtenido para el método SDA original, mostrando lecturas realizadas en tiempo real para los analitos y el estándar interno en vino chileno (adición de estándares: 5mg/L de cada uno de los analitos y del EI).	55
Fig. 9 Gráfico típico obtenido para el método SDA original, representando lecturas en tiempo real para el aluminio como analito y el ytrio como estándar interno, datos extraídos de la Fig. 8 (vino chileno).	55
Fig. 10 Curva de calibración para aluminio por el método de SDA donde se observa la obtención de una pendiente negativa.	56
Fig. 11 Gráfico típico obtenido para el método SDA original, representando las lecturas en tiempo real para el aluminio como analito y el ytrio como estándar interno, correspondiente a concentraciones 2mgAl/L y 10 mgY/L agregadas al vino chileno.	57
Fig. 12 Curva de calibración para aluminio obtenida por el método de SDA original (vino chileno diluido 10 veces, adición de 2 mg Al/L y 10 mg Y/L).	58
Fig. 13 . Espectros para cada analito y estándar interno (ytrio) obtenidos por el método de SDA modificado en el análisis de vino tinto chileno.	62
Fig. 14 Curva de calibración por el método de multi energía para calcio.	64
Fig. 15 Curva de calibración por el método de multi energía para magnesio.	64
Fig. 16 Resultados de determinación de metales mayoritarios (a) y trazas (b) en doce vinos mexicanos (para cada elemento, se presenta promedio de las concentraciones para todos vinos de una región con respectivos valores de desviación estándar).	70
Fig. 17 Modelo PCA obtenido para elementos determinados en doce vinos mexicanos (G1-G4 – región Guanajuato, A1-A3 – región Aguascalientes, V1-V5 – Valle de Guadalupe. a) Distribución de muestras (gráfica scores) b) Distribución de variables (gráfica X-loadings).	72

Índice de Tablas

Tabla 1 Límites máximos aceptables de ciertos metales en vino de acuerdo con OIV y legislaciones nacionales de algunos países8.	19
Tabla 2 Algunos ejemplos de análisis estadístico de discriminación geográfica de vinos en base a contenido multi elemental.	22
Tabla 3 Descripción de las muestras utilizadas en la cuantificación de metales/metaloides en vinos tintos mexicanos.	34
Tabla 4 Selección de las líneas de emisión para la determinación de elementos en vinos, indicando potenciales interferentes.	37
Tabla 5 Condiciones instrumentales de MP-AES para análisis de elementos mayoritarios	40
Tabla 6 Condiciones instrumentales de MP-AES para el análisis de elementos traza.	41
Tabla 8 Parámetros de calibración de elementos traza en muestra de vino tinto chileno.	43
Tabla 9 Concentraciones de elementos encontradas en vino tinto chileno por curva de calibración (se muestran valores promedio \pm SD, n=3).	44
Tabla 10 Intervalos de concentraciones encontrados en vinos para cada uno de los elementos, mediante calibración externa, la dilución aplicada y tres concentraciones propuestas para el método de adición de estándar.	45
Tabla 11 Método de adición de estándar: ecuaciones de regresión lineal y coeficientes de correlación para elementos mayoritarios.	48
Tabla 12 Método de adición de estándar: ecuaciones de regresión lineal y coeficientes de correlación para elementos traza parte 1.	49
Tabla 13 Método de adición de estándar: ecuaciones de regresión lineal y coeficientes de correlación para elementos traza parte 2.	50
Tabla 14 Concentraciones de elementos mayoritarios encontradas en muestras de vino tinto por el método de adición de estándar; se muestran valores promedio \pm SD, en mg/L n=3).	51
Tabla 15 Concentraciones de elementos traza encontradas en muestras de vino tinto por el método de adición de estándar; se muestran valores promedio \pm SD en mg/L, n=3.	52
Tabla 16 Condiciones instrumentales de MP-AES para análisis piloto de elementos traza por SDA.	54
Tabla 17 Principales diferencias entre SDA reportado y SDA modificado.	58
Tabla 18 Concentración de estándares en el stock para el método de SDA modificado (mg/L).	60
Tabla 19 Concentraciones de elementos traza encontradas en muestras de vino tinto por el método de dilución de estándar modificado en mg/L (se muestran valores promedio \pm SD, n=3).	63
Tabla 21 Relación de datos para curva de magnesio por MEC.	64
Tabla 22 Longitudes de onda seleccionadas para elementos mayoritarios por MEC (nm).	65
Tabla 23 Condiciones instrumentales de MP-AES para análisis de elementos mayoritarios por MEC.	66
Tabla 24 Concentraciones de elementos mayoritarios encontradas en muestras de vino tinto por el método de calibración multi energía en mg/L (se muestran valores promedio \pm SD, n=3).	67
Tabla 25 Evaluación comparativa de los métodos de cuantificación utilizados.	68
Tabla 26 Resultados obtenidos en el análisis del vino chileno para cada uno de los elementos, utilizando diferentes métodos de cuantificación propuestos (promedio \pm SD, mg/L, n=3).	71

Abreviaciones

AES	Espectrometría de emisión atómica
Ags	Aguascalientes
ANN	Redes neuronales artificiales
ANOVA	Análisis de varianza
BC	Baja California
BDM	Método discriminante de Fisher
CA	Análisis de clúster
CART	Análisis por arboles de clasificación y regresión
CCD	Dispositivo de acoplamiento de carga
Coah	Coahuila
CV	Coefficiente de varianza
DA	Análisis discriminante
EGCM	Módulo de control de gas externo
EI	Estándar interno
FA	Análisis de factores
FAAS	Espectrometría de Absorción Atómica por Llama
FDM	Método discriminante de Bayer
FLIC	Corrección rápida de interferencia lineal (Fast Linear Interference Correction)
GFAAS	Espectrometría de Absorción Atómica por Horno de Grafito
Gto	Guanajuato
HCA	Análisis de componentes jerárquicos

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente
IEC	Corrección Inter elemento (Inter-Element Correction)
KNN	Algoritmo de vecinos más próximos
LDA	Análisis de discriminación lineal
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MANOVA	Multivariado análisis de varianza
MDS	Escalamiento multidimensional
MEC	Calibración multi-energía (Multi-Energy Calibration)
MP-AES	Espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas
ND	No detectable
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
PCA	Análisis de componentes principales
PLS	Método de mínimos cuadrados parciales
PLS-DA	Análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales
PVC	Cloruro de polivinilo
RMN	Resonancia magnética nuclear
SD	Desviación estándar
SE	Error típico

SDA	Dilución de estándar (Standard Dilution Analysis)
SDM	Dilución de estándar modificado
S/R	Relación señal/ruido
SIMCA	Modelado suave e independiente por analogías de clase

Resumen:

La determinación de metales/metaloideos en cualquier producto relacionado con la alimentación humana es de importancia, ya sea para control de calidad, valor nutricional, denominación de origen etc. En este sentido, el objetivo del presente trabajo de tesis ha sido poner a punto procedimientos analíticos para cuantificar elementos traza y mayoritarios en vino tinto y explorar la utilidad de las concentraciones de estos elementos en productos mexicanos para estudio de su procedencia.

Como técnica analítica, se decidió utilizar espectrometría de emisión atómica con plasma sostenido por microondas (MP-AES), debido a que su sistema de introducción de muestra tolera relativamente alto contenido de sólidos totales (hasta 3% m/v) sin que se presenten interferencias químicas. Gracias a estas características, el pre tratamiento de la muestra consistió en una simple dilución; además de simplicidad en el procedimiento y rápida adquisición de datos, como una importante ventaja es necesario mencionar un bajo costo de análisis relacionado con el uso de nitrógeno como gas para la generación del plasma. El nitrógeno es obtenido a partir de aire en el laboratorio. Por otro lado, al igual que otras técnicas de emisión atómica, MP-AES sufre interferencias espectrales que tienen que ser controladas y eliminadas mediante un adecuado tratamiento de datos espectrales y el uso de un confiable método de cuantificación. Considerando los límites de detección del MP-AES y la composición de metales reportada en vinos tintos se seleccionaron 4 elementos mayoritarios (K, Ca, Na y Mg) y 7 elementos traza (Fe, Al, Mn, Sr, Rb, Cu y Cr) para elaborar el perfil elemental de las 12 muestras de vino tinto provenientes de 3 regiones de México: Guanajuato, Aguascalientes y Baja California.

En la primera parte del trabajo, se realizó el ajuste de condiciones instrumentales para cada uno de los elementos, utilizando para ello un vino tinto chileno. A esta matriz química, se adicionó una mezcla de estándares de los elementos a determinar y, mediante una serie de experimentos, se seleccionaron las líneas de emisión libres de interferencia y se ajustaron parámetros de adquisición de las señales para lograr la más alta relación señal/ruido posible. Desde las primeras pruebas quedó claro que la matriz química del vino afecta fuertemente la línea base de los espectros y por ello, no era posible llevar a cabo la cuantificación por calibración externa; este método se utilizó solamente para evaluar los límites de detección y de cuantificación instrumentales y para estimar los niveles de concentración de los elementos

en vino. Con base en los datos obtenidos, se formaron cuatro grupos de elementos correspondientes a cuatro factores de dilución de muestra (1:100 para K, 1:50 para Ca, Na, Mg, 1:10 para Sr, Rb, Mn, Fe, Al y 1:4 para Cu y Cr) y se definieron las concentraciones de estándares a agregar a las muestras en aplicación de otros métodos de cuantificación. Dichos métodos de cuantificación fueron: el método de adición de estándar (SA), de dilución de estándar (SDA) y de calibración multi-energía (MEC). En el caso de SDA, se propuso una modificación (SDM) con el fin de aumentar el tiempo de integración de las señales y conocer con exactitud el grado de dilución de muestra en el momento de adquisición de las señales, mejorando de esta manera el desempeño analítico del método reportado anteriormente. Es de notar que en el método SA, el ajuste de línea base fue manual para cada una de las muestras, mientras que los métodos SDM y MEC no requieren dicho ajuste. Utilizando como muestra el mismo vino chileno, se llevó a cabo la evaluación comparativa de tres métodos (SA, SDM y MEC), considerando SA como el método de referencia. Los resultados obtenidos permitieron recomendar el método SDM para la determinación de elementos traza y el método MEC para la determinación de metales mayoritarios, obteniéndose en cada uno de los casos una buena concordancia de los resultados con los proporcionados por el método de SA, pero con un protocolo más simple.

En la segunda parte del trabajo, se llevó a cabo la determinación de los once elementos seleccionados en doce vinos mexicanos, observándose importantes diferencias entre concentraciones de los mismos elementos entre tres regiones vinícolas. El análisis multivariante por el método de componentes principales (PCA), sugirió una potencial utilidad de los niveles de metales determinados en este trabajo en estudio de procedencia de los vinos mexicanos.

I. Introducción

I.1. Espectrometría de emisión atómica con plasma de microondas (MP-AES): alcances y limitaciones de la técnica.

El funcionamiento de espectrometría de emisión atómica (AES) se basa en la emisión espontánea de fotones durante la relajación de átomos excitados térmicamente en estado gaseoso, formando espectros característicos para cada uno de los elementos presentes en la muestra. Mientras que la presencia de ciertas líneas en el espectro permite confirmar cuales de los elementos se encuentran en la muestra, las intensidades de las señales permiten realizar el análisis cuantitativo ¹. Los procesos de atomización y excitación térmica usualmente se llevan a cabo introduciendo la muestra líquida, en forma de aerosol, al plasma. En caso particular de la técnica MP-AES, se usa el plasma de nitrógeno sostenido por energía de microondas. Entre las ventajas de esta técnica relativamente reciente, hay que mencionar la formación de un plasma robusto, en forma de una llama, considerablemente resistente a la presencia de sólidos disueltos totales y de materia orgánica en la muestra, y muy bajo costo de operación debido a que el nitrógeno se obtiene en el laboratorio a partir del aire, utilizando un generador de nitrógeno adecuado ^{1,2}.

La temperatura del plasma es de aproximadamente 5000 K, lo que permite convertir la muestra en el vapor atómico y lograr la excitación¹. Debido precisamente a tan altas temperaturas es que las interferencias químicas prácticamente no se presentan; sin embargo, existen interferencias de tipo espectral. Estas interferencias se deben a la posible cercanía de líneas atómicas de diferentes elementos, a la presencia de bandas de emisión de especies moleculares o a emisión continua, provocada por las partículas sólidas ². Las interferencias espectrales pueden evitarse, cambiando la línea más intensa del analito a una de las menos intensas no afectada por interferencia, o mediante algoritmos de corrección del fondo. En este sentido, el modelo Agilent 4100 MP-AES utilizado en el presente trabajo, está equipado con el software MP Expert que ofrece la corrección del fondo automática o manual y también incluye los algoritmos IEC (Inter-Element Correction) y FLIC (Fast Linear Interference Correction) ^{2,3}.

En lo referente a la selectividad y capacidad de evitar las interferencias, hay que notar que MP-AES 4100 cuenta con un sistema de enfoque preóptico, un monocromador de diseño Czerny-Turner con una rejilla de difracción holográfica con 2 400 líneas mm⁻¹ y con 600 mm

de longitud focal. El detector es un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD - Charge Coupled Device) en estado sólido, sensible a longitudes en la región UV y manejando un amplio intervalo espectral desde 176 – 1100 nm y con una resolución de 532 x 128 pixeles, diseñado especialmente para detección de bajas intensidades de radiación con >90 % de eficiencia cuántica de sensibilidad de pico. El detector es enfriado a 0 °C mediante un dispositivo termoelectrico Peltier para disminuir la corriente negra (corriente eléctrica relativamente pequeña que fluye a través de dispositivos fotosensibles aun cuando no está recibiendo luz) y así reducir el ruido de la línea base. El arreglo del detector CCD almacena el espectro del (los) analito(s) y el fondo espectral vecino, permitiendo una corrección simultánea del fondo para mejorar la estabilidad y precisión ².

Con el diseño instrumental que se acaba de describir, el equipo MP-AES es útil para llevar a cabo análisis cuantitativo multi elemental de elementos mayoritarios y a nivel de trazas en una sola corrida cubriendo el intervalo de concentraciones desde sub-partes por millón hasta aproximadamente 1.5 g/L. Este intervalo de trabajo hace de la técnica MP-AES una herramienta de poder similar que espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) pero obviamente menos potente que espectrometría de masas con ionización en ICP. Respecto a ICP-MS, sin embargo, hay que resaltar una mayor tolerancia del plasma de microondas a solidos totales (3% m/v en MP-AES respecto 0.25% en ICP-MS) y el ya mencionado antes bajo costo de operación. Obviamente, por su capacidad multi elemental, rango dinámico de trabajo y uso de nitrógeno, MP-AES sobrepasa significativamente las posibilidades de espectrometría de absorción atómica con atomización en llama².

Resumiendo, las características de MP-AES son muy adecuadas para su empleo en la determinación de elementos en matrices relativamente complejas donde las concentraciones de elementos de interés no son más bajos que 0.1 mg/L ³, mientras que la determinación de ultra trazas requiere el uso de técnicas con mayor poder de detección siendo en la actualidad ICP-MS el estándar de oro ⁴.

El enfoque del presente trabajo de tesis radica en el análisis de elementos mayoritarios y elementos traza en materiales de relevancia alimenticia, por lo que queda justificado el uso de MP-AES⁵.

I.2. Elementos minerales en vino de mesa.

I.2.1. Fuentes naturales y antropogénicas, y concentraciones reportadas.

Debido a que el vino se elabora a partir de uvas, la exposición de la planta durante su crecimiento a la composición mineral del suelo provoca que dicha composición tenga un impacto inevitable sobre el perfil de elementos en frutas y en vino. Otros aspectos dignos de mencionar son los requerimientos nutricionales de la planta, que varían dependiendo de la especie de la vid, de las condiciones climáticas de la zona, la cercanía con el mar o con cuerpos acuíferos, etc⁴.

Cabe señalar que no todas las fuentes de minerales en el vino son naturales, existen también las fuentes antropogénicas, tales como el uso de pesticidas, fertilizantes o funguicidas aplicados en los cultivos, o la contaminación medioambiental cuando el cultivo se encuentre cerca de zonas industriales, carreteras transitadas o zonas habitacionales que provoquen emisiones de agua o aire contaminadas. Otras fuentes antropogénicas de metales incluyen aditivos aplicados durante el proceso de elaboración y maduración del vino; por ejemplo, en el proceso de clarificación suelen añadirse cationes de Ca, Na y Al provenientes de agentes floculantes, otra práctica común consiste en agregar sales de calcio (sulfatos, carbonatos) con el fin de disminuir la acidez del vino⁴, algunos metales/metaloides pueden ser lixiviados de los recipientes donde se almacena o donde madura el vino, etc.

En resumen, el contenido de metales en vino depende de muchas variables, tales como componentes naturales del suelo en zonas de cultivo, uso de agentes de protección de plantas o aditivos agregados durante elaboración y maduración del vino, composición de contenedores y condiciones de almacenamiento; lo que nos conduce a concluir que el contenido de metales en vino debe estar directamente relacionado con la región geográfica donde el vino es producido y/o a las prácticas empleadas por el fabricante⁶.

Con base en los datos recolectados en distintas regiones y tipos de vinos, los metales/metaloides contenidos en vinos, se clasifican en tres grupos según su concentración⁵:

- Elementos mayoritarios >10 mg/L: Ca, K, Mg y Na.
- Elementos traza desde 0.1 hasta 1 mg/L: B, Al, Cu, Fe, Mn, Rb, Sr y Zn.
- Elementos ultra traza <0.1 mg/L: Sc, Ti, As, Se, Mo, Ag, Hg, Tl, Sn, Ba, Cd, Co, Cr, Li, Ni, Pb y V.

Acorde con esta clasificación y considerando el límite de detección de la técnica seleccionada, los elementos de interés en el presente trabajo son Ca, Mg, K y Na como elementos mayoritarios⁷ y Al, Cu, Fe, Mn, Sr y Zn como elementos traza.

I.2.2. Normatividad vigente.

En México, el contenido de metales en bebidas alcohólicas (donde se encuentra incluido el vino) está reglamentado por la Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1/SCFI-2014, Bebidas alcohólicas, especificaciones sanitarias, etiquetado sanitario y comercial donde se establece que el límite máximo permisible de plomo y arsénico es de 0.5 mg/L, mientras que en la NOM-199-SCFI-2017, Bebidas alcohólicas, denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba, se establecen límites máximos de 300 ppm de óxido de calcio, 230 mg/L de sodio y 1700 mg/L de potasio.

Por otro lado, es importante mencionar que algunos países cuentan con regulaciones más estrictas en lo referente a esta materia (tabla 1); por ejemplo, Croacia que regula el contenido de elementos como Ag, Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Na, Ni, Sn, Pb y Zn, mientras que en cuanto a referencias no aplicadas por países, destaca una de las regulaciones más extensas referentes al contenido de metales en vino y es la establecida por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV - International Organization of Vine and Wine) que establece niveles permisibles para siete elementos: 0.01 mg/L de cadmio, 0.15 mg/L de plomo, 0.2 mg/L de arsénico, 1.0 mg/L de cobre y bromo, 5 mg/L de zinc, y 80 mg/L de boro⁸.

Tabla 1 Límites máximos aceptables de ciertos metales en vino de acuerdo con OIV y legislaciones nacionales de algunos países⁸.

Organización o nación	Concentración (mg/L)											
	Ag	Al	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Na	Ni	Sn	Pb	Zn
OIV	-	-	0.2	0.01	-	1	-	-	-	-	0.15	5
Brasil	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	0.5	-
Croacia	0.1	10	0.2	0.01	0.1	1	20	20	0.1	10	0.2	5
Hungría	-	-	0.05	0.02	-	1	-	-	-	-	0.25	-
Australia	-	-	0.1	0.05	-	5	-	-	-	-	0.2	5
Alemania	-	8	0.1	0.01	-	5	-	-	-	-	0.3	5
Italia	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	0.3	5
México	-	-	0.5	-	-	-	-	230	-	-	0.5	-

En comparación con otros países e instituciones, México no considera en la normatividad de las bebidas alcohólicas muchos de los elementos de relevancia (ya sea nutricional o toxica); sin embargo, es importante conocer las concentraciones de estos por los motivos que se describen más adelante.

I.2.3. Impacto de los metales/metaloideos contenidos en vino sobre las propiedades sensoriales y en la salud del consumidor.

La composición química del vino se considera una matriz compleja, compuesta por etanol, azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, proteínas, microelementos, etc⁹. Los metales contenidos en vino definen las propiedades organolépticas principalmente durante el proceso de maduración y almacenamiento; por ejemplo, aluminio, zinc, cobre, hierro y níquel al acomplejarse con taninos y antocianinas dan origen a la coloración del vino, otros complejos de importancia son los establecidos entre el cobre, hierro y manganeso con ciertos aminoácidos y polifenoles definiendo aroma y sabor del vino⁶. Por su parte, estas propiedades

sensoriales también se ven afectadas por el deterioro oxidativo, provocado principalmente por alto contenido de Cu (II), que da como resultado el oscurecimiento del vino, pérdida de frescura y aparición de precipitados. Hierro (III) y cobre (II) en concentraciones arriba de 1 y 7 mg/L, respectivamente, pueden ocasionar un sabor astringente desagradable, además de turbidez⁶.

Los elementos minerales contenidos en vinos pueden representar un beneficio a la salud humana al consumirlo moderadamente, ya que el hierro, cobre y zinc son metales esenciales que se ven involucrados en procesos fisiológicos además de aportar beneficios nutricionales; sin embargo, otros metales no esenciales tienen la característica de acomplejarse en vinos con compuestos de tipo polifenólico principalmente (aunque suelen encontrarse generalmente unidos a proteínas, polisacáridos, péptidos y ácidos orgánicos⁹) que al exponerse al bajo pH gástrico, los iones libres del metal se encuentran disponibles para la absorción con la posibilidad de causar efectos tóxicos, principalmente interferencia con otros metales (generalmente esenciales) y la generación de estrés oxidativo⁶.

Existen también los clasificados como metales tóxicos, cuya concentración en vino debe mantenerse lo más baja posible, ejemplos de ellos son arsénico, cadmio, plomo, níquel y/o aluminio. El aluminio se ha relacionado a trastornos neurodegenerativos, mientras que el arsénico es carcinógeno para humanos, asociado principalmente a cánceres de piel, pulmón y vejiga; el plomo incluso en niveles bajos de exposición se correlaciona con hipertensión, enfermedad cardiovascular, disfunción renal, alteración de la producción de espermatozoides y osteoporosis⁶.

Considerando que el contenido de metales en vino puede representar un beneficio nutricional si se consume en las cantidades adecuadas y un daño a la salud si estos se encuentran en cantidades elevadas o si este contiene metales xenobióticos, es importante conocer las concentraciones de metales y metaloides en vinos⁶.

I.2.4. Metales/metaloides en estudios de procedencia de vinos.

La certificación del origen geográfico de un producto alimenticio ha tomado importancia recientemente debido a competencia mercantil con imitaciones, falsificaciones o adulteraciones de dichos productos, surgiendo así la necesidad de identificar los productos

originales con la llamada denominación de origen, que en México está definida en el artículo 156 de la Ley de la Propiedad Industrial como el nombre de una región geográfica del país que sirva para designar un producto originario de la misma, y cuya calidad o característica se deban exclusivamente al medio geográfico, comprendiendo en éste los factores naturales y los humanos.

Hasta ahora, la denominación de origen en México no aplica para vinos, sin embargo, otros países como Chile, España, Estados Unidos y Francia ya han puesto en vigor normatividad que defiende y protege al producto contra las denominaciones de origen falsas o susceptibles de error en cuanto a la procedencia geográfica o a la naturaleza y características del producto, evitando así el uso ilegal del mismo.

Existen diversas técnicas analíticas como, RMN¹⁰, FAAS, GFAAS, ICP-OES e ICP-MS que han sido utilizadas para determinar la procedencia de vinos, ya que estas técnicas proporcionan diferentes tipos de perfiles de la composición química de vinos. Específicamente, las técnicas de espectrometría atómica proveen las concentraciones de metales/metaloideos; como un ejemplo se puede mencionar la discriminación de origen geográfico en vinos provenientes de California, USA y de Mendoza, Argentina, con la técnica de MP-AES, para la cual se utilizaron los siguientes metales: Sr, Rb, Ca, K, Na y Mg⁷.

En el trabajo citado, el tratamiento estadístico de los datos consistió primero en un multivariado análisis de varianza (MANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre las concentraciones de metales en los vinos provenientes de diferentes regiones, posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada elemento, así los elementos que mostraron diferencias significativas fueron considerados como variables en un análisis de componentes principales con el fin de visualizar las diferencias entre muestras; para la clasificación de los vinos según su región geográfica se realizó un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Mediante aplicación del método PLS se construye un modelo de regresión lineal que maximiza las varianzas explicadas en las variables de predicción (es decir, los elementos medidos) a la vez que maximiza la clasificación de las variables pronosticadas⁷. Este procedimiento estadístico se propone aplicar de forma similar para el presente trabajo, ya que es el único hasta el momento

reportado en cuanto a discriminación de procedencia de vinos con la técnica MP-AES; sin embargo, el perfil metálico seleccionado para vinos mexicanos está constituido por Fe, K, Na, Mg, Mn, Ca, Al, Sr, Rb, Cr y Cu.

En la revisión bibliográfica se ha encontrado diferentes algoritmos de análisis multivariante que fueron utilizados en la clasificación/discriminación de vinos en función de su procedencia, con base en el contenido de metales/metaloideos; algunos ejemplos representativos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2 Algunos ejemplos de análisis estadístico de discriminación geográfica de vinos en base a contenido multi elemental.

Elementos	Tipo de vino	Región geográfica	Método de discriminación	Referencia
Li, Na, K, Rb, Ca, Fe, Mn.	Blanco	Galicia, España	CA, PCA, KNN, SIMCA.	15
Li, Na, K, Rb, Zn, Fe, Mn, Ni, Co.	Tinto	Galicia, España	CA, PCA, LDA, KNN, SIMCA.	16
Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Sr, Zn, Cd, Ni, Pb, As.	Espumoso	España - Francia	LDA, SIMCA.	17
Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu.	Dulce	Islas Canarias, España	ANOVA, PCA, CA, LDA.	18
Be, Ca, Co, Cu, K, Li, Mn, Na, Rb, Sr.	Tinto - Cabernet Sauvignon	Brasil	PCA, HCA.	19
K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Sr, Li, Rb.	Tinto	Islas Canarias, España	PCA, LDA, ANN.	20
Na, Mg, K, Ca, Mn, Fe, P, Cu, Zn, Be, Al, V, Cr, Co, Ni, As, Sr, Ag, Cd, Sb, Ba, Tl, Pb, U, Li, Rb, Cs.	Variado	Republica Checa	PCA, FA, CA.	21
Li, Na, K, Rb, Zn, Fe, Mn, Ni, Co.	Tinto	Galicia, España	PCA, DA, KNN.	22
Al, As, Ba, Ca, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Pb, Rb, Sb, Sn, Sr, Th, U, V, Y, Zn.	Tinto	Republica Checa	PCA, DA, ANOVA, MANOVA.	23

B, V, Mn, Zn, Fe, Al, Cu, Sr, Ba, Rb, Na, P, Ca, Mg, K.	No especificado	Alemania	ANN, CA, PCA, BDM, FDM.	24
Li, Rb, Cs, Sr, Ba, La, Ce, U, Th, V, Co, Ni, Cu, Zn, As, Mo, Ag, Cd, Pb, Bi.	Tinto y Blanco	Canadá	MDS	25
Al, Ba, Be, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Gd, Ho, K, La, Li, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Nd, Ni, Pb, Pr, Sc, Se, Sm, Sr, Tb, Ti, Tm, V, Y, Yb, Zn.	Tinto	Valencia, España	HCA, PCA, DA, CART.	26
Ca, K, Mg, Na, Sr, Rb.	Tinto - Malbec	Argentina - Estados Unidos de América	PLS-DA.	7

**PCA - análisis de componentes principales, PLS- método de mínimos cuadrados parciales, DA- análisis discriminante, HCA- análisis de componentes jerárquicos, CART- análisis por árboles de clasificación y regresión, MDS- escalamiento multidimensional, ANN- redes neuronales artificiales, BDM- método discriminante de Fisher, FDM- método discriminante de Bayer, ANOVA- análisis de varianza, MANOVA- análisis multivariante de varianza, KNN- algoritmo de vecinos más próximos, CA- análisis de clúster, FA- análisis de factores, LDA- análisis de discriminación lineal, SIMCA- modelado suave e independiente por analogías de clase.*

I.2.5. Esquemas de fraccionamiento y especiación analítica de metales/metaloides en vinos.

De manera general, el vino presenta propiedades antioxidantes, por lo cual los metales suelen estar presentes en sus más bajos estados de oxidación, existiendo iones libres o acomplexados con gran variedad de ligantes como: ácidos orgánicos, aminoácidos, polisacáridos, péptidos, proteínas y polifenoles, entre los que destacan los taninos y antocianinas, especies que tienen capacidad de formar complejos con cobre, zinc, hierro y manganeso principalmente, debido a sus numerosos sitios de coordinación. Específicamente, se ha encontrado que el zinc y el hierro tienen inversa correlación con los polifenoles, es decir mientras aumenta su concentración en vino, las concentraciones de iones libres de los metales disminuyen⁹; sin embargo, la estabilidad de estos complejos depende en gran medida del pH y del contenido de alcohol⁴.

Existen diversas técnicas reportadas de fraccionamiento en vinos, las cuales básicamente consisten en la separación de dos fracciones: una que contiene iones metálicos acomplejados por ligantes orgánicos y la segunda que corresponde a la solución con iones metálicos libres. En cada una de las fracciones, se lleva a cabo la cuantificación del elemento de interés total. Entre las técnicas de fraccionamiento aplicadas en vinos, destaca un protocolo que separa las formas de hierro, cobre y zinc unidos con polisacáridos, proteínas y polifenoles. En el primer paso, se determina el contenido de metales totales en la muestra previa filtración de esta por una membrana de 0.45 μm ; la primera fracción compuesta por metales unidos a polifenoles se obtiene pasando el filtrado por una resina amberlita XAD-8 y eluyendo las especies retenidas con el ácido nítrico 2M. A partir de la fracción no retenida, se precipitan las proteínas con acetona, recuperando la pastilla y cuantificando en ella metales unidos a proteínas. Finalmente, se obtiene fracción de iones metálicos unidos a polisacáridos, mediante su precipitación con etanol¹².

Se encuentra reportado que en la fracción del vino compuesta principalmente por polifenoles aproximadamente hay entre un 20-30% de hierro, 30% de cobre y 15% de zinc, mientras que menos del 5% de cobre y hierro están unidos a polisacáridos y alrededor del 50% de cobre y 60% de zinc están presentes en vino como especies lábiles con carga positiva^{13, 14}.

En el presente trabajo no se pretende determinar las formas de los metales/metaloideos sino su concentración total. Es importante sin embargo asumir que existe cierta distribución de formas de estos elementos y que éstas se encuentran sumergidas en una matriz químicamente compleja. Aunque las interferencias químicas son escasas en MP-AES, la técnica es susceptible a interferencias espectrales. Estas interferencias pueden ser eliminadas mediante el tratamiento adecuado de la muestra, siendo la digestión ácida una práctica común. Otra opción es una simple dilución de vino, pero en este caso se deben evitar posibles solapamientos espectrales y debe llevarse a cabo una efectiva corrección de línea base. En este sentido, uno de los enfoques del trabajo de tesis es seleccionar la más adecuada línea de emisión para cada uno de los elementos con el fin de evitar interferencias espectrales, así como explorar diferentes métodos de cuantificación que permitan simplificar u obviar la corrección de línea base.

I.3. Breve descripción de los métodos de cuantificación a utilizar

1.3.1. Calibración externa

Es el método de cuantificación más utilizado y relativamente simple. Se prepara una serie de soluciones que contienen concentraciones conocidas y crecientes de los analitos, y se adquieren las respectivas señales analíticas en cada una de ellas. Con base en mínimo tres replicas analíticas para cada una de las concentraciones, mediante el método de regresión lineal se calcula la función de calibración que describe la relación entre la concentración y la señal analítica para cada uno de los elementos. Usualmente, se preparan seis soluciones, una es el blanco y las otras cubren el rango dinámico para cada elemento de manera uniforme. La concentración del estándar más bajo corresponde a la cercanía del límite de cuantificación y la concentración del estándar más alto no debe sobrepasar el límite de la linealidad. Es necesario repetir cada día el proceso de calibración y, para series largas de muestras, es necesario realizar recalibración durante el mismo día de trabajo. La ventaja de este método es su simplicidad y el hecho de que con la misma función de calibración se realizan cuantificaciones en varias muestras. Por otro lado, la principal desventaja de la calibración externa es el diferente ambiente químico de los analitos en las soluciones estándar en comparación con la muestra. De ahí, la susceptibilidad a errores debido a interferencias, en su mayoría espectrales¹³.

1.3.2. Método de adición de estándar

Para solventar las carencias del método de calibración externa, se recomienda utilizar el método de adición de estándar, en el que a una serie de iguales porciones de la misma muestra problema se agregan dos o más cantidades conocidas de estándares de los analitos, cuidando que el grado de dilución de la muestra sea el mismo en todas las soluciones preparadas. En este método es importante asegurar una adecuada distancia entre concentración natural en la muestra y consecutivas adiciones, usualmente se agregan porciones de estándar que corresponden al 50%, 100% y 200% de la estimada concentración del analito en la muestra. De esta manera se logra un mejor ajuste de la regresión lineal, aunque hay que asegurarse de que la concentración total del analito nunca sobrepase el límite de linealidad. Es necesario mencionar las siguientes limitaciones del método de adición de estándar: (i) no se eliminan interferencias espectrales; (ii) para cada muestra es necesario preparar al menos tres

soluciones y adquirir señales en cada una de ellas, lo que hace todo el procedimiento, largo, tedioso y susceptible a errores aleatorios relacionados con el manejo de muestra¹⁴.

1.3.3. Método de dilución de estándar

Existen diversos reportes donde se propone un nuevo método de cuantificación utilizado en aplicaciones de espectrometría atómica y especialmente útil en muestras cuya composición de la matriz genere interferencias, dicho método es conocido como dilución de estándar (SDA por sus siglas en inglés Standard Dilution Analysis)²⁷. El método SDA consiste en la preparación de dos soluciones de la muestra igualmente diluida; la primera de ellas contiene la muestra y los estándares de los analitos a cuantificar más un estándar interno, mientras que la segunda solución contiene sólo la muestra y blanco²⁸. Para el proceso de cuantificación, se vierte la segunda solución a la primera (volúmenes iguales) y al mismo tiempo se están tomando lecturas de las señales de cada uno de los analitos y del estándar interno en tiempo real. Más específicamente, se utilizan tres recipientes, cuyo contenido se describe a continuación:

Contenedor 1: Blanco

Contenedor 2: Muestra + Adición de una concentración conocida del estándar a cuantificar y estándar interno (1:1)

Contenedor 3: Muestra + Blanco (1:1)

La lectura de las señales de los analitos en tiempo real se lleva a cabo de forma continua, iniciando al ingresar la solución del contenedor 1 en el instrumento de espectrometría atómica, posteriormente se cambia de contenedor y se ingresa el contenedor 2 que contiene muestra, estándares y estándar interno; en ese mismo contenedor se vierte el contenido del contenedor 3 que se compone de la muestra y el blanco; como resultado de este procedimiento, se obtiene un registro de intensidad vs tiempo para cada uno de los elementos monitoreados, tanto los analitos como el estándar interno, agregados todos en concentraciones conocidas. En la primera etapa se obtiene una línea horizontal con intensidad muy baja (cuando solamente el blanco ha sido introducido al sistema), después de hacer el cambio del tubo del blanco por el que contiene la muestra con la mezcla de estándares se observa un incremento en la

intensidad para cada elemento, obteniéndose una curva con una pendiente positiva hasta alcanzar la intensidad máxima e iniciar una zona de estabilidad representada por una línea horizontal, debido a una concentración constante de analitos. En ese punto, se inicia el vertido del tubo 3 al tubo 2 provocando la dilución de los estándares agregados sin cambiar la cantidad de muestra; de ahí, la observada disminución paulatina de las señales corresponde al decremento de concentraciones de los estándares agregados a la muestra, mientras que la contribución de los analitos presentes en la muestra problema se mantiene constante (Fig. 1). Hay que enfatizar que, a partir de que comienza la introducción de la solución 2, en cada momento del registro de espectros en tiempo real, la cantidad de muestra que llega al plasma es la misma. En el registro de las señales, se utilizan las longitudes de onda seleccionadas para cada uno de los analitos y la del estándar interno, generando señales para cada una por separado de manera simultánea.

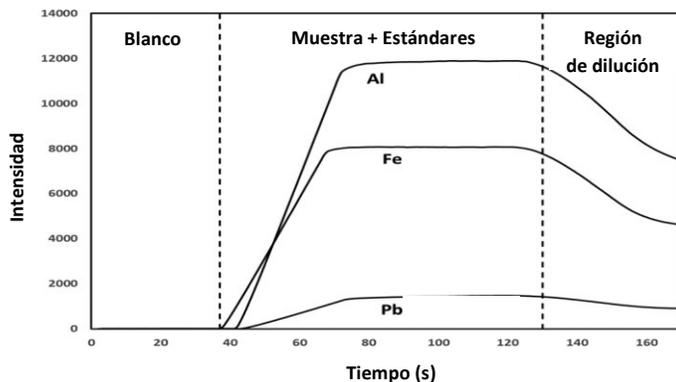


Fig. 1 Gráfico típico obtenido para el método SDA, representado por la lectura en tiempo real para 3 longitudes de onda, donde se muestran las regiones del gráfico en diferentes puntos del método.

En la Fig. 1, se observa una región lineal de decremento de las señales, que corresponde a la dilución de estándares agregados a la muestra – tal como se acaba de describir. En esta figura, la intensidad más alta para el estándar interno (antes de que comience la dilución) corresponde a la concentración presente en el tubo 2 y es conocida; por su parte la señal final del estándar interno corresponde a $\frac{1}{2}$ de la concentración inicial ya que mezclando dos iguales volúmenes de los contenedores 2 y 3, los estándares se diluyen dos veces. Asumiendo la

dilución lineal, se pueden calcular las concentraciones del estándar interno en cada punto de registro. Para cada elemento a determinar en la muestra problema, la intensidad más alta corresponde a su concentración en dicha muestra (diluida) más las concentraciones de estándares agregados (tubo 2), mientras que la intensidad final corresponde a la misma contribución del elemento presente en la muestra más los estándares dos veces diluidos. Los datos obtenidos son suficientes para calcular la concentración de cada uno de los elementos en vino, aprovechando el principio del método de estándar interno²⁸.

Para ello, en primer lugar, se elabora una gráfica, presentando en el eje X los valores $1/[C_{EI}]$ calculados en la región decreciente de registro de las señales, donde C_{EI} es la concentración añadida de estándar interno; en el eje Y, se presentan las respectivas relaciones entre la intensidad del analito y la del estándar interno ($I_{Analito}/I_{Estándar\ Interno}$). Se obtiene una función por el método de regresión lineal, la cual nos conduce a la concentración del analito en la muestra siguiendo el siguiente tratamiento matemático.

Suponiendo una calibración externa para cada analito:

$$Int_{Analito} = m_{Analito} [C_A] \quad Ec. 1$$

De la misma forma puede realizarse una ecuación similar, renombrando para el caso del estándar interno:

$$Int_{EI} = m_{EI} [C_{EI}] \quad Ec. 2$$

Considerando además que la señal producida para el analito en el método SDA en el contenedor 2 (Muestra + Estándar) es una contribución de la concentración de analito contenida *per se* en la muestra $[C_A^M]$ y la concentración añadida de estándares $[C_A^{est}]$, entonces se puede describir la siguiente ecuación:

$$[C_A] = [C_A^M] + [C_A^{est}] \quad Ec. 3$$

El proceso matemático parte de iniciar dividiendo la Ec.1 sobre la Ec. 2

$$\frac{Int_A}{Int_{EI}} = \frac{m_A C_A}{m_{EI} C_{EI}} \quad Ec. 4$$

Posteriormente se sustituye la Ec. 3 en la Ec. 4, obteniéndose la Ec. 5

$$\frac{Int_A}{Int_{EI}} = \frac{m_A(C_A^M + C_A^{est})}{m_{EI}C_{EI}} = \frac{m_A C_A^M}{m_{EI}C_{EI}} + \frac{m_A C_A^{est}}{m_{EI}C_{EI}} \quad \text{Ec. 5}$$

La final Ec. 5 es una función lineal que asocia la concentración de analito con las intensidades obtenidas para el analito y para el estándar interno (ecuación de calibración del tipo $y = m \cdot x + b$) considerando que:

$$y = \frac{Int_A}{Int_{EI}} \quad x = \frac{1}{C_{EI}} \quad \text{pendiente} = \frac{m_A C_A^M}{m_{EI}} \quad \text{intercepto} = \frac{m_A C_A^{est}}{m_{EI}C_{EI}}$$

Resumiendo, al graficar el inverso de C_{EI} vs la relación de señales entre analito y estándar interno (Int_A / Int_{EI}) y realizando el proceso de regresión lineal, se obtienen los valores de pendiente (m) y de intercepto (b), que representan las ecuaciones anteriores.

En el siguiente paso, para conocer la concentración del analito en la muestra problema [C_A^M], se divide la pendiente entre el intercepto, y eliminando los términos iguales se obtiene lo siguiente:

$$\frac{\text{pendiente}}{\text{intercepto}} = \frac{\frac{m_A C_A^M}{m_{EI}}}{\frac{m_A C_A^{est}}{m_{EI}C_{EI}}} = \frac{\cancel{m_A} C_A^M}{\cancel{m_{EI}} \cancel{C_A^{est}}} = \frac{C_{EI} C_A^M}{C_A^{est}} \quad \text{Ec. 6}$$

Despejando la concentración de analito en la muestra [C_A^M] en la Ec. 6 se obtiene la siguiente ecuación:

$$C_A^M = \frac{\text{pendiente}}{\text{intercepto}} \times \frac{C_A^{est}}{C_{EI}} \quad \text{Ec. 7}$$

De manera resumida, para llevar a cabo la determinación del analito A en una muestra M por el método SDA, es necesario extraer a partir del registro de señales en tiempo real (Fig. 1) los puntos que forman parte de la “región de dilución” tanto para el analito como para el estándar interno. Posteriormente se realiza una gráfica representando ($I_{\text{Analito}}/I_{\text{Estándar Interno}}$) en función de $1/[C_{EI}]$ y se aplica el método de regresión lineal. Posteriormente, el re-arreglo

matemático conduce a la Ec. 7, misma que permite despejar la concentración del analito en la muestra $[C_A^M]$ conociendo la concentración de estándar interno en la muestra $[C_{EI}]$, así como de los estándares de cada uno de los analitos añadidos a la muestra $[C_A^{Est}]$.

Es importante resaltar que el método de dilución de estándar representa una alternativa interesante para llevar a cabo una cuantificación confiable de analitos en matrices químicamente complejas, sin necesidad de ajustar la línea base. Su ventaja respecto al método tradicional de adición de estándar es un protocolo más sencillo (se preparan solamente tres soluciones y la adquisición de las señales es en tiempo real); además en este método se integra el estándar interno como estrategia de eliminar/minimizar la fluctuación de las señales y posibles errores aleatorios.

1.3.4. Método de calibración multi-energía

Tradicionalmente los métodos de calibración en espectrometría de emisión atómica requieren de una serie de soluciones estándar y en todas ellas, se adquiere la señal analítica utilizando una sola longitud de onda para cada elemento. En contraste a esta estrategia, recientemente se ha propuesto un método diferente, denominado como calibración multi energía (MEC, por sus siglas en inglés, Multi-Energy Calibration) ²⁹. En este caso, se preparan solamente dos soluciones: una de ellas es la muestra y la otra es la muestra con adición de estándares de los analitos y, para ambas soluciones, se registran espectros utilizando diferentes líneas espectrales para cada analito. Cada una de las líneas representa diferente sensibilidad, pero para cada una de ellas, se mantiene la proporcionalidad entre las intensidades del analito en las dos soluciones. En otras palabras, en el método MEC, se considera la longitud de onda como una variable mientras que la concentración de analitos en cada lectura permanece fija y conocida ²⁹, además de continuar con el beneficio que representa la presencia de la matriz real de las muestras en todas las lecturas.

Bajo el principio de que la respuesta del instrumento (I^j) está directamente relacionada con la concentración del analito (C) y la energía de transición del estado excitado (E_j) que a su vez depende de la longitud de onda (λ_{ij}).

$$I_{\lambda_{ij}}^{ji} = \frac{FCA_{ji}g_j}{Q(T)} e^{-\frac{E_j}{k_B T}} \quad \text{Ec. 8}$$

Ec 8. Donde F = Constante de proporcionalidad instrumental; A_{ij} = Probabilidad de transición; g_j = Degeneración del estado de excitación; Q(T) = Función de partición; k_B = Constante de Boltzman; T = Temperatura

Es así entonces que resulta posible obtener respuestas analíticas manteniendo fija la concentración y tomar lecturas a diferentes longitudes de onda.

Asimismo, el método de calibración multi energía ahorra tiempo de preparación de muestra, tal como se inicia la preparación del método de dilución de estándar antes descrito, se parte de 2 soluciones; solución 1: 50% de vino con la dilución correspondiente y 50% de mezcla de estándares de analitos a concentración conocida, solución 2: 50% de vino con la dilución correspondiente y 50% de blanco, en este caso HNO₃ ultra trazas al 2%.

Para construir la función de calibración, se prepara una gráfica donde en el eje X se presentan las intensidades obtenidas al tomar las lecturas en diferentes longitudes de onda para la solución 1 identificada como M+S (muestra + estándares) y en el eje Y las intensidades obtenidas en las mismas condiciones para la solución 2 identificada como M+B (muestra + blanco). Posteriormente, se construye la función de regresión lineal, para la cual el fundamento se presenta a continuación:

En una curva de calibración externa:

Señal para M+S a diferentes longitudes de onda:

$$I_{\lambda_i}^{(M+S)} = m * (C^M + C^S) \longrightarrow m = \frac{I_{\lambda_i}^{M+S}}{C^M + C^S} \quad \text{Ec 9.}$$

Señal para M+B a diferentes longitudes de onda:

$$I_{\lambda_i}^M = m * C^M \longrightarrow m = \frac{I_{\lambda_i}^M}{C^M} \quad \text{Ec 10.}$$

Las pendientes “m” tienen igual valor en ambas ecuaciones, entonces eliminando esta variable, se llega a la siguiente ecuación:

$$\frac{I_{\lambda_i}^M}{C^M} = \frac{I_{\lambda_i}^{M+S}}{C^M + C^S} \longrightarrow I_{\lambda_i}^M = \left(\frac{C^M}{C^M + C^S}\right) I_{\lambda_i}^{M+S} \quad \text{Ec 11.}$$

Esta nueva ecuación ya tiene la típica forma de función lineal $y = m' x + b$, donde

$$X = I_{\lambda i}^{M+S} \qquad Y = I_{\lambda i}^M \qquad m' = \frac{C^M}{C^M + C^S}$$

Despejando C^M de la pendiente:

$$C^M = \left(\frac{m' * C^S}{1 - m'} \right) \qquad \text{Ec 12.}$$

Con el tratamiento matemático descrito previamente es que se llega finalmente al resultado de concentración del analito en la muestra²⁹.

Es importante mencionar que la principal limitación del método MEC en espectrometría de emisión atómica es la poca cantidad de líneas espectrales en espectro de cada elemento, que proporcionan suficiente sensibilidad. Para realizar la curva de calibración de un elemento, se necesitan al menos tres longitudes de onda para las cuales las intensidades de las señales sean suficientemente altas y que varíen considerablemente entre sí, de lo contrario la linealidad podría verse comprometida.

II. Objetivos

II.1. Objetivo general

Desarrollar procedimientos analíticos basados en el uso de MP-AES para la determinación de elementos mayoritarios y elementos traza en vinos de mesa y explorar la factibilidad de los datos obtenidos en estudio de proveniencia de productos mexicanos.

II.2. Objetivos específicos

Establecer las condiciones instrumentales para la determinación de 11 elementos seleccionados en vinos.

Evaluar comparativamente cuatro diferentes métodos de cuantificación, utilizando una muestra de vino.

Poner a punto las condiciones del procedimiento analítico y realizar el análisis de vinos provenientes de tres regiones vinícolas de México (Guanajuato, Aguascalientes y Valle de Guadalupe)

Evaluar la factibilidad de los datos obtenidos en el estudio de proveniencia de vinos mexicanos.

III. Parte experimental

III.1. Instrumentación

Se ha utilizado el equipo MP-4100 de Agilent Technologies, con el generador de nitrógeno Agilent 4107 y con el módulo de control de gas externo (EGCM). Se utilizó una cámara ciclónica de un solo paso, nebulizador concéntrico de cuarzo, y tubería de PVC para muestras ácidas acuosas en la introducción de muestra (blanco/blanco) y para el desecho (azul/azul). Debido a la presencia de etanol y de compuestos orgánicos en vino, se utilizó el módulo EGCM para introducir un flujo de aire y así facilitar la oxidación de carbón a dióxido de carbono evitando formación de depósitos en la antorcha.

Se utilizó el auto muestreador de Agilent modelo SPS 3 conectado al MP-AES.

III.2 Materiales y reactivos

Para la preparación de todas las soluciones y las muestras, se utilizó agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco) y ácido nítrico para análisis ultra trazas, el cual fue preparado a partir de la dilución del concentrado (69%) trace Select de Fluka Analytical. Los estándares de rubidio, cromo, magnesio, hierro, aluminio, cobre, potasio, calcio fueron adquiridos de Sigma Aldrich, el estándar de sodio fue adquirido de J.T. Baker, mientras que los estándares de estroncio y manganeso fueron preparados a partir de las sales cloruro de estroncio y cloruro de manganeso (Sigma-Aldrich).

La calibración multi elemental del equipo se realizó de manera mensual con una solución a la concentración de 5mg L⁻¹ preparada a partir de una mezcla de estándares de calibración de Agilent Technologies que contiene 50 mg/L de Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr, Zn y 500 mg/L K en HNO₃ al 5 %.

III.3 Software

El equipo MP-4100 de Agilent Technologies incluye un software (MP Expert 1.3.03510) para su manejo, el MP Expert fue utilizado para obtener los ajustes de condiciones instrumentales, tomar las lecturas de las señales analíticas y exportar los datos para poderlos manejar en Microsoft Excel, mismo que fue utilizado para elaborar las curvas de calibración y los cálculos correspondientes, la elaboración de gráficos de espectros superpuestos, etc.

Una vez obtenidos los datos, el programa Unscrambler 7.0 (Camo, Noruega) fue utilizado para hacer el tratamiento estadístico de PCA (análisis de componentes principales).

III.4. Muestras

Las muestras de vino fueron adquiridas en tiendas especializadas en Guanajuato y León, todas fueron de origen nacional, procedentes de diferentes viñedos, ubicados en las regiones de Baja California, Aguascalientes y Guanajuato (tabla 3), procurando variar factores como la composición del vino (tipo de uva utilizada en su producción), tiempo de añejamiento y casas productoras; adicionalmente se analizaron 3 muestras con lugares de procedencia diferentes a los antes mencionados, solo para fines comparativos.

Tabla 3 Descripción de las muestras utilizadas en la cuantificación de metales/metaloideos en vinos tintos mexicanos.

Muestra	Nombre	Año	Descripción	Origen
A	Intermezzo	2015	Ensamble Syrah y Zinfandel	León, Gto
B	Pagliacci	2014	Malbec	León, Gto
C	Tosca	2014	Syrah	León, Gto

D	Vivace	2015	Ensamble Tempranillo y Malbec	León, Gto
E	Cuatro Soles	-	Cabernet Sauvignon	Valle Redondo, Ags
F	Cuatro Soles	-	Blanc de Zinfandel (rosado)	Valle Redondo, Ags
G	Cuatro Soles	-	Vino tinto afrutado	Valle Redondo, Ags
H	L.A. Cetto	2015	Petite Syrah	Valle de Guadalupe, BC.
I	L.A. Cetto	2016	Cabernet Sauvignon	Valle de Guadalupe, BC.
J	L.A. Cetto	2016	Merlot	Valle de Guadalupe, BC.
K	L.A. Cetto	2015	Petite Syrah (frasco pequeño)	Valle de Guadalupe, BC.
L	Marqués del Valle	2016	Cabernet Malbec	Valle de Guadalupe, BC.
M*	Sangre de Cristo	-	Ensamble sin especificar	Cuatro Ciénegas, Coah.
N*	Calvet	2016	Merlot Cabernet Sauvignon	Bordeaux, Francia.
O*	Diamante Original	2013	Ensamble sin especificar	Rioja, España.

* *Muestras incluidas con fines comparativos, no se consideran en el tratamiento estadístico para la discriminación de procedencia.*

Para el desarrollo de procedimientos y para la evaluación de diferentes métodos de calibración, se utilizó un vino tinto chileno.

Antes del análisis, se tomaron dos porciones de aproximadamente 50 mL cada una, la primera porción se almacenó en congelador a una temperatura inferior a los 0°C, y la otra porción de muestra de vino que se conservó líquida fue refrigerada a una temperatura aproximada de 4 °C, fueron colocadas en tubos eppendorf de 2 mL y centrifugados a 10, 000 x g por 10 minutos.

III.5. Protocolos de limpieza

Para prevenir una posible contaminación por metales de interés, todo el material se lavó con ácido nítrico al 5%, se enjuagó con agua destilada y finalmente, con agua desionizada.

El lavado de antorcha se realizó periódicamente, dejándola sumergida en agua regia al 50%, sin que el plástico entrara en contacto con la solución, durante 3 horas y posterior enjuague con agua desionizada y secado con aire comprimido.

Dos veces a la semana, se realizaba la limpieza del lente preóptico; para ello se humedecía un paño desechable (libre de residuos) con solución de isopropanol al 50% y se frotó la superficie del lente hasta desaparecer las manchas.

Cada dos semanas, se limpiaba el nebulizador dejándolo sumergido en HNO_3 al 5% durante 12 horas, para su posterior enjuague con agua desionizada y secado al aire sobre papel absorbente.

IV. Resultados y discusión

IV.1 Determinación de metales totales en vino por MP-AES.

IV.1.1 Ajuste de los factores de dilución y de condiciones instrumentales

La primera parte del trabajo se centró en la selección de las condiciones de tratamiento de muestra y de parámetros instrumentales, así como en la selección del método de cuantificación adecuado para realizar el análisis de metales totales en vinos. En cuanto al tratamiento de muestra, se propuso una simple dilución con ácido nítrico al 2%, tratando de agrupar los analitos de acuerdo con sus esperadas concentraciones de tal manera que la dilución aplicada resulte en concentraciones que se encuentren dentro del intervalo de linealidad para cada uno de los elementos.

Los elementos seleccionados para el análisis fueron: K, Mg, Ca, Na, Sr, Rb, Fe, Al, Mn, Cu, Cr, y Zn.

Las longitudes de onda fueron seleccionadas con base en dos factores: la intensidad de la línea de emisión atómica y las interferencias espectrales provocadas por la posible presencia de otros elementos en la muestra, de manera que se realizaron pruebas inicialmente con las longitudes de onda que ya estaban reportadas en vinos⁷ (Sr 407.771 nm, Rb 780.027 nm, Mg

279.553 nm, Ca 396.847 nm, Na 589.592 nm y K 769.897 nm) y además se probaron también las sugeridas por el software MP Expert, con base en las tablas de intensidades relativas, fueron sometidas a pruebas las siguientes longitudes de onda: Mg 285.213 nm, Fe 259.940 nm, 371.993 nm, 385.991 nm, 358.119 nm, 302.064 nm, 374.949 nm, 382.043 nm y 373.713 nm; Al 237.312 nm, 257.509 nm, 394.401 nm, 309.271 nm, 308.215 nm y 396.152 nm; Zn 202.548 nm, 213.857 nm, 206.200 nm, 472.215 nm y 481.053 nm; Cu 327.395 nm y 324.754 nm; Mn 279.482 nm, 403.076 nm y 403.307 nm; Sr 481.188 nm y 460.733 nm; Cr 427.480 nm.

Tabla 4 Selección de las líneas de emisión para la determinación de elementos en vinos, indicando potenciales interferentes.

Elemento	λ (nm)	Línea más intensa	Elementos interferentes	
			Potenciales	Observados en vino
K	769.897	No	-	-
Ca	396.847	No	Sm, Pr	-
Na	589.592	No	-	-
Mg	285.213	Si	Ta, Hf	-
Fe	373.713	No	Er, Sm	-
Al	394.401	No	Dy, Ce, Sm	-
Mn	403.307	No	La, Ga, Tb	-
Rb	780.027	Si	-	-
Sr	407.771	Si	La, Dy	-
Cu	324.754	Si	La	-
Cr	427.480	No	Th, La, Pr	-
Zn	481.053	No	La, Sr, Ta	Sr

En la tabla 4 se presenta la lista de elementos y longitudes de onda finalmente seleccionados, indicando potenciales interferentes.

De los datos presentados en la tabla 4, se observa que prácticamente para todos elementos se pudo encontrar una línea de emisión libre de interferencias por emisión de otros elementos presentes en vinos⁴, excepto para Sr y Zn.

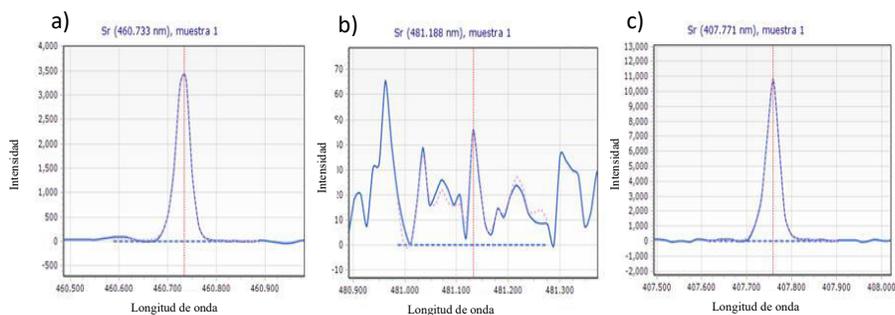


Fig. 2 Espectros obtenidos directamente del software MP Expert para estroncio en la muestra de vino con dilución 1:10 a) lectura a 460.733 nm b) lectura a 481.188 nm c) lectura a 407.771 nm.

A manera de ejemplo, en la Fig. 2, se presentan espectros adquiridos para tres longitudes de onda de Sr; se observa claramente que, bajo el criterio de obtener la relación señal/ruido más alta posible, la línea de emisión a 407.771 nm es la más indicada para el análisis de este elemento en vinos. Igual como para el estroncio, se adquirieron espectros para otros elementos, seleccionando las líneas de emisión más adecuadas (alta relación señal/ruido y sin interferencias)

En el caso de Zn, la línea 481.057 nm presenta interferencia por la línea de emisión de Sr 481.188 nm, esta interferencia no se pudo evitar cambiando a otra línea de emisión de zinc, debido a que las otras líneas probadas presentaban una intensidad mucho muy baja comparada con la de 481.057 nm, por lo que fue necesario aplicar una ecuación para eliminar dicha interferencia.

$$I_{Zn\ 481} = I_{medida\ 481} - \frac{m_{Sr\ 481}}{m_{Sr\ 407}} (I_{Sr\ 407}) \quad \text{Ec. 13}$$

Ec 13. Dónde: $m_{Sr\ 481}/m_{Sr\ 407}$ es la relación de pendientes de la curva de calibración de estroncio a 481.188 nm y 407.771 nm; $I_{medida\ 481}$ es la intensidad adquirida para Zinc a 481.053 nm; $I_{Sr\ 407}$ es la intensidad adquirida para estroncio a 407.771 nm; $I_{Zn\ 481}$ es la intensidad correspondiente solo a la contribución de Zn en la longitud de onda 481.053 nm.

Es importante señalar que, a pesar de establecer las condiciones de adquisición de la señal y la ecuación para eliminar las interferencias, no se logró detectar Zn en ninguna de las muestras, por lo que no se incluye en la discusión de los resultados. Una vez establecidas las condiciones de detección, se procedió con el ajuste de las condiciones instrumentales, tales como: presión del nebulizador, posición del visualizador, flujo de inyección de aire, flujo de la bomba peristáltica, etc. El criterio de selección fue la más alta posible relación señal/ruido. En cuanto a la línea base, en primera instancia se aplicó el ajuste automático. En esta etapa, se utilizaron soluciones de ajuste cuya concentración de estándares fue de 1 mg/L para elementos mayoritarios (K, Mg, Na y Ca) y de 0.01 mg/L para elementos traza (Fe, Al, Sr, Mn, Rb, Cu, Cr y Zn). A estas soluciones se agregó etanol grado HPLC (99.5%) para igualar su concentración a la composición del vino según el factor de dilución utilizado. En el caso de Al, se observó una fuerte fluctuación de la línea base en cercanía a la longitud de onda nominal, el efecto probablemente relacionado con impurezas del etanol (Fig. 3).

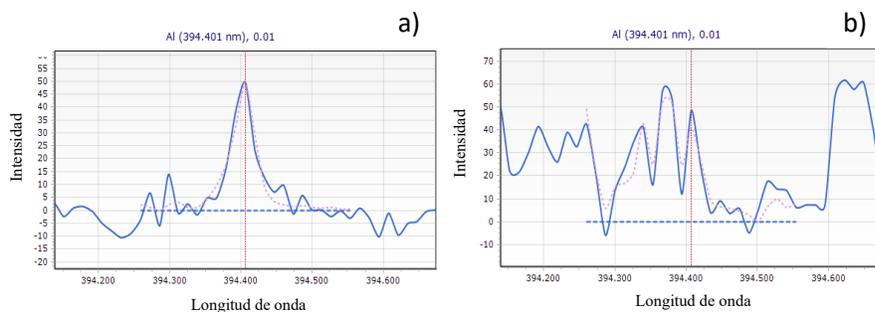


Fig 3. Espectro obtenido para aluminio con el ajuste de línea base automático y solución estándar 0.01 mg/L de aluminio a) matriz sin etanol b) matriz con 1.25 % de etanol.

El etanol se añadió con la intención de simular la matriz de muestra, sin embargo, para algunos elementos la adición de este solvente no aseguraba la misma línea base en solución de estándares y en vinos. Es por ello por lo que se decidió agregar a la solución de ajuste, el vino chileno diluido adecuadamente.

Los parámetros instrumentales seleccionados en estas condiciones para los elementos mayoritarios y para trazas se resumen en las tablas 5 y 6, respectivamente.

Tabla 5 Condiciones instrumentales de MP-AES para análisis de elementos mayoritarios

Parámetro	Elemento			
	Sodio	Potasio	Calcio	Magnesio
Longitud de onda	589.592 nm	769.897 nm	396.847 nm	285.213 nm
Corrección de fondo	Auto	Auto	Auto	Auto
Tiempo de integración	3 s	3 s	3 s	3 s
Posición de visualización	10	10	10	10
Presión del nebulizador	240 kPa	240 kPa	240 kPa	240 kPa
Flujo de inyección de aire	Alto	Alto	Alto	Alto
Velocidad de la bomba	6 rpm	6 rpm	6 rpm	6 rpm
Introducción de muestra	Manual	Manual	Manual	Manual
Tiempo de introducción	3 s	3 s	3 s	3 s
Bomba rápida (40 rpm)	Activada	Activada	Activada	Activada
Tiempo de estabilización	20 s	20 s	20 s	20 s
Número de píxeles	3	3	3	3
Réplicas	3	3	3	3

Tabla 6 Condiciones instrumentales de MP-AES para el análisis de elementos traza.

Parámetro	Elemento						
	Estroncio	Cobre	Hierro	Aluminio	Manganeso	Cromo	Rubidio
Longitud de onda	407.771 nm	324.754 nm	373.713 nm	396.152 nm	403.076 nm	427.480 nm	780.027 nm
Corrección de fondo	Auto						
Tiempo de integración	3 s	3 s	3 s	3 s	3 s	3 s	3 s
Posición de visualización	0	0	-20	-10	-10	-20	10
Presión del nebulizador	220 kPa	180 kPa	240 kPa				
Flujo de inyección de aire	Alto						
Velocidad de la bomba	6 rpm	8 rpm					
Introducción de muestra	Manual						
Tiempo de introducción	3 s	3 s	3 s	3 s	3 s	3 s	3 s
Bomba rápida (40 rpm)	Activada						
Tiempo de estabilización	20 s						
Número de píxeles	3	3	3	3	3	3	3
Réplicas	3	3	3	3	3	3	3

Puesto que la presencia de vino en las soluciones utilizadas para ajuste instrumental fue necesaria para asegurar la misma línea base en la etapa de calibración y el registro de espectros en las muestras, se decidió realizar cuantificación mediante el método de adición de estándar con el ajuste manual de línea base; sin embargo, para proponer las concentraciones de estándares a agregar, era necesario estimar los contenidos de los elementos en todas las muestras de vino. Es por ello, que se llevó a cabo la calibración externa, adoptando las condiciones descritas en esta sección.

IV.1.2. Calibración externa

Para el proceso de calibración, se elaboraron soluciones multi elementales que contenían estándares de los elementos para adquirir sus respectivas señales en cada lectura. Los intervalos de concentración fueron para elementos mayoritarios de 0.1-7 mg/L para Na, Ca y Mg, mientras que para K fue de 0.4-28 mg/L, en elementos traza fue de 0.01-1 mg/L para Mn, Fe, Al, Sr, Cu, Cr, mientras que para Rb fue de 0.01-5 mg/L.

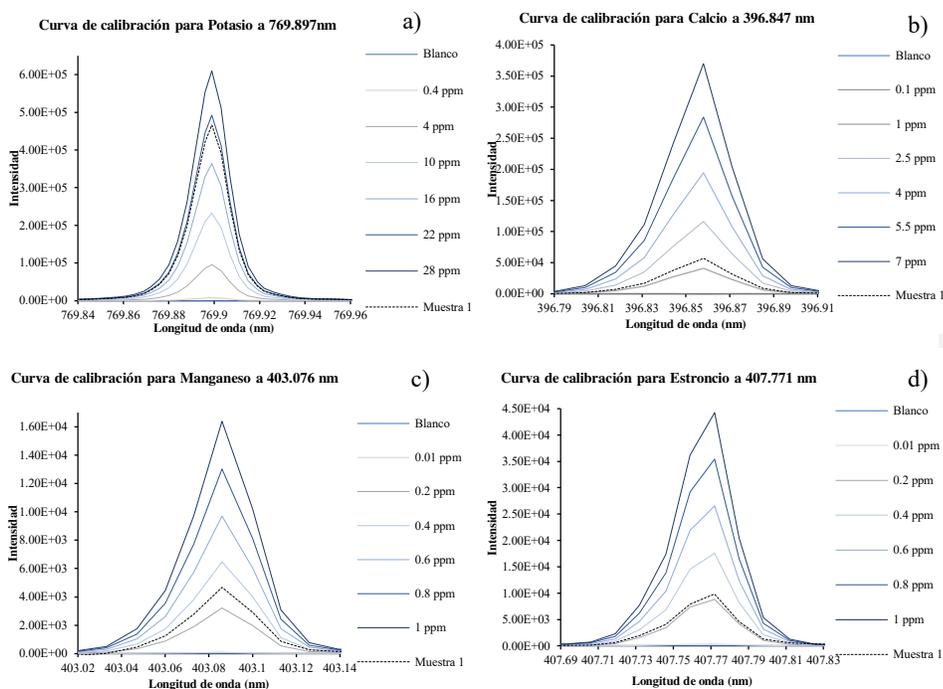


Fig. 3 Espectros obtenidos para construir la curva de calibración, incluyendo la lectura de la muestra de vino chileno (ajuste automático de la línea base). a) Potasio a 769.897 nm b) Calcio a 396.847 nm c) Manganeso a 403.076 nm d) Estroncio a 407.771 nm.

A manera de ejemplo, en la Fig. 4 se presentan espectros de K y Ca, Mn y Sr adquiridos para las soluciones de calibración.

En las tablas 7 y 8 se resumen los parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración; específicamente, era necesario conocer los intervalos de linealidad para seleccionar adecuadamente las concentraciones a utilizar posteriormente en el método de adición de estándar. Cabe también señalar que los valores LOD y LOQ se refieren a límites de detección y de cuantificación instrumentales y fueron evaluados con base en la señal del más bajo estándar para cada uno de los elementos.

Tabla 7 Parámetros de calibración de elementos mayoritarios en muestra de vino tinto chileno.

Elemento	Función de regresión	R ²	SE _m	SE _b	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	CV (%)
Ca	Int Ca = 5.38E+04 [Ca] - 1.26E+04	0.9982	6.75E+03	4.71E+03	4.55	13.8	0.80
Mg	Int Mg = 1.36E+05 [Mg] + 3.43E+02	0.9997	7.42E+03	5.17E+03	0.59	1.77	1.26
K	Int K = 2.19E+04 [K] + 6.27E+03	0.9993	7.04E+03	4.91E+03	10.5	31.8	0.86
Na	Int Na = 1.40E+05 [Na] - 1.43E+04	0.9995	8.94E+03	6.23E+03	1.74	5.28	0.62

Tabla 7 Parámetros de calibración de elementos traza en muestra de vino tinto chileno.

Elemento	Función de regresión	R ²	SE _m	SE _b	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)	CV (%)
Al	Int Al = 1.10 E+04 [Al] + 1.86 E+01	0.9982	4.27E+01	3.11E+01	1.04	3.14	1.02
Cu	Int Cu = 5.76 E+04 [Cu] + 2.29 E+02	0.9982	1.19E+03	8.65E+02	1.59	4.81	0.22
Cr	Int Cr = 1.33 E+04 [Cr] - 1.75 E+00	0.9982	4.29E+01	3.13E+01	1.88	5.71	0.79
Sr	Int Sr = 4.43 E+04 [Sr] - 4.14 E+01	1.0000	8.28E+01	6.04E+01	1.49	4.53	1.40
Fe	Int Fe = 4.38 E+03 [Fe] - 2.05 E+01	1.0000	1.41E+01	1.03E+01	1.13	3.43	0.48
Mn	Int Mn = 1.65 E+04 [Mn] - 1.01 E+02	0.9999	4.84E+01	3.53E+01	2.94	8.92	0.04
Rb	Int Rb = 1.75 E+04 [Rb] - 6.66 E+01	0.9996	1.42E+02	1.03E+02	0.16	0.49	0.30

*En las ecuaciones de calibración, símbolo de elemento entre paréntesis se refiere a su concentración en mg/L; SE_m, error típico de la pendiente; SE_b, error típico del intercepto; LOD, límite de detección calculado como

3.3 σ /m; LOQ, límite de cuantificación calculado como 10 σ /m; CV (%), coeficiente de varianza de 3 réplicas de lecturas de estándares de 1 mg/L (excepto potasio, 4mg/L).

IV.1.3 Análisis de vinos basado en calibración externa

En la tabla 9 se presentan las concentraciones de todos los elementos en el vino tinto chileno, estimados a partir de las curvas de calibración. En dicha tabla se muestra el factor de dilución aplicado para cada grupo de elementos y la concentración promedio en vino con su respectiva desviación estándar (n=3). Es necesario resaltar el carácter aproximado de estos resultados, debido a problemas en el ajuste de la línea base por efectos de matriz mencionados en secciones anteriores. Los resultados obtenidos fueron útiles en el ajuste de las condiciones para el método de adición de estándar.

Tabla 8 Concentraciones de elementos encontradas en vino tinto chileno por curva de calibración (se muestran valores promedio \pm SD, n=3).

Dilución por rango de concentración	Elemento	Concentración total en vino (mg/L)
100 veces	K	1066 \pm 46
	Na	17.0 \pm 0.6
50 veces	Mg	87.6 \pm 1.6
	Ca	65.9 \pm 0.3
	Sr	2.25 \pm 0.08
10 veces	Al	0.58 \pm 0.09
	Fe	1.22 \pm 0.10
	Rb	7.21 \pm 0.65
	Mn	2.91 \pm 0.05
4 veces*	Cr	0.06 \pm 0.02
	Cu	0.21 \pm 0.04

* El elemento zinc estaba incluido originalmente en este factor de dilución sin embargo después del tratamiento (previamente descrito) provocado por la interferencia con estroncio los resultados obtenidos fueron por debajo del límite de detección.

IV.1.4 Cuantificación de metales en vinos por el método de adición de estándar

En tabla 10, se resumen los resultados obtenidos para cada uno de los elementos en todos los vinos, mostrando la dilución aplicada, intervalo de concentraciones encontradas habiendo utilizado para la cuantificación la calibración externa, y las concentraciones seleccionadas para el método de adición de estándar. Para cada uno de los elementos, se aplicaron tres puntos de adición, que correspondían a 50%, 100% y 200% de su estimada concentración en la muestra (además de la lectura del vino sin adición) obteniendo en total 4 puntos para construir una función de regresión lineal.

Tabla 9 Intervalos de concentraciones encontrados en vinos para cada uno de los elementos, mediante calibración externa, la dilución aplicada y tres concentraciones propuestas para el método de adición de estándar.

Elemento	Intervalo de concentraciones en vino (mg/L)	Dilución de muestra	Concentración de estándar en la muestra, mg/L		
			50%	100%	200%
K	1061- 1072	100	5	10.0	20.0
Na	16.9 - 17.2		0.5	1.0	2.0
Mg	65.6 - 66.2	50	0.5	1.0	2.0
Ca	65.6 - 66.2		1	2.0	4.0
Al	0.579 - 0.581		0.05	0.1	0.2
Fe	1.20 - 1.24		0.05	0.1	0.2
Rb	6.56 - 7.86	10	0.25	0.5	1
Mn	2.90 - 2.92		0.05	0.1	0.2
Sr	2.22 - 2.28		0.05	0.1	0.2
Cu	0.205 - 0.215	8	0.05	0.1	0.2

Cr	0.058 - 0.062	0.05	0.1	0.2
----	---------------	------	-----	-----

En el primer intento, para el método de adición de estándar, la línea base se ajustó de manera automática y se realizó aspirando la muestra de vino diluido respectivamente. A manera de ejemplo, en la Fig. 5 se presentan espectros de Mn y Fe adquiridos en una muestra de vino con ajuste de la línea base manual y automático, respectivamente. Se observa claramente que, la primera opción asegura la integración de la señal con mayor confiabilidad para en manganeso. El ajuste manual de línea base resultó ser adecuado para K, Ca, Mg, Na, Mn, Sr y Rb. Por otro lado, como se observa en la Fig. 5, para el Fe y su línea de emisión a 373.713 nm, el ajuste manual no mejoró la forma de la señal, por lo que se decidió realizar la lectura del blanco y de la muestra sin ajuste de línea base y tomar como señal analítica la diferencia de intensidades entre la muestra y el blanco (Fig. 6). El mismo procedimiento se utilizó para Al, Cu, Cr y Fe.

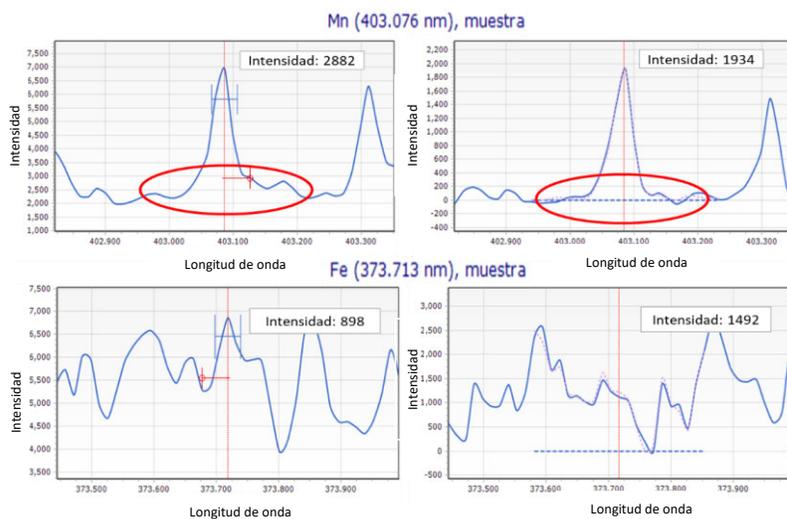


Fig. 4 Espectros obtenidos a partir de la lectura de la muestra de vino tinto chileno para manganeso a 403.076 nm (arriba) y hierro a 373.713 (abajo), comparando entre el ajuste manual (izquierda) y automático (derecha) de línea base.

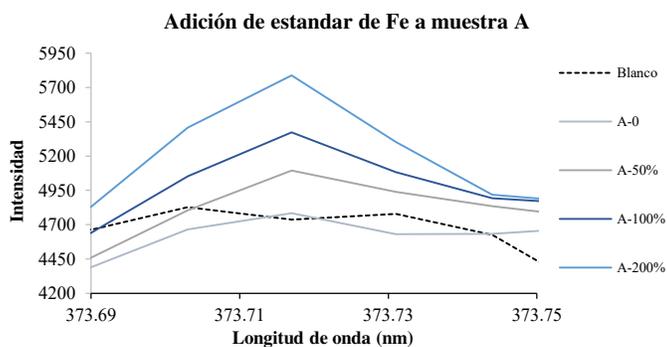


Fig. 5 Espectro de emisión del hierro a 373.713 nm con lectura del blanco y de diferentes adiciones de estándar.

Para la cuantificación de los elementos en 15 muestras de vino tinto, se realizaron cuatro replicas independientes (cada una por triplicado).

En la Fig. 7, se presentan a manera de ejemplo, espectros adquiridos para cuatro elementos que requieren diferente dilución de vino; se observa claramente una buena forma de las señales y su incremento proporcional a la concentración del estándar agregado.

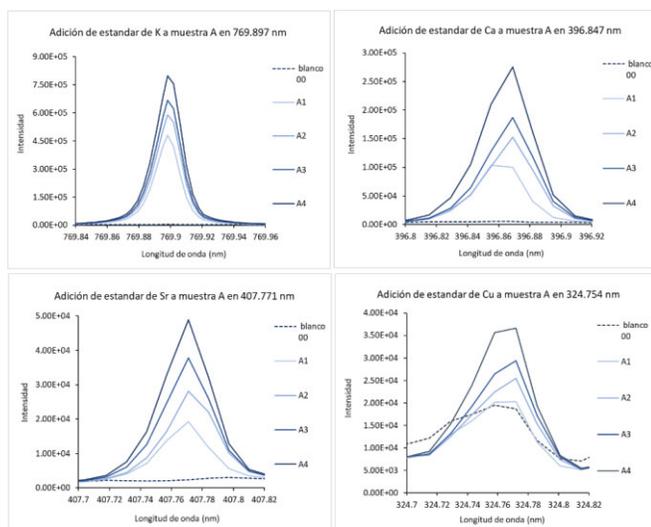


Fig. 6 Espectros representativos de cada grado de dilución obtenidos a partir de la lectura de la muestra A, siendo en todos los casos A1 la lectura sin adición, A2 adición al 50%, A3 adición al 100% y A4 adición al 200%.

Para la cuantificación, se obtuvieron las ecuaciones de regresión lineal mediante el método de mínimos cuadrados y los resultados obtenidos se presentan en las siguientes tablas 11, 12 y 13.

Tabla 10 Método de adición de estándar: ecuaciones de regresión lineal y coeficientes de correlación para elementos mayoritarios.

Muestra	K		Na		Mg		Ca	
	Ecuación	R ²	Ecuación	R ²	Ecuación	R ²	Ecuación	R ²
A	Int = 1.49 E+04 [K] + 4.38 E+05	0.9976	Int = 1.01 E+05 [Na] + 1.95 E+05	0.9996	Int = 6.74 E+04 [Mg] + 1.75 E+05	0.9996	Int = 3.21 E+04 [Ca] + 7.73 E+04	0.9994
B	Int = 1.23 E+04 [K] + 4.38 E+05	0.9860	Int = 1.04 E+05 [Na] + 1.76 E+05	0.9998	Int = 6.96 E+04 [Mg] + 1.56 E+05	0.9901	Int = 3.17 E+04 [Ca] + 7.59 E+04	0.9924
C	Int = 1.17 E+04 [K] + 4.89 E+05	0.9670	Int = 1.06 E+05 [Na] + 1.53 E+05	0.9999	Int = 6.97 E+04 [Mg] + 1.77 E+05	1.0000	Int = 3.26 E+04 [Ca] + 7.65 E+04	0.9996
D	Int = 1.15 E+04 [K] + 5.70 E+05	0.9952	Int = 1.08 E+05 [Na] + 2.21 E+05	0.9981	Int = 7.16 E+04 [Mg] + 1.70 E+05	0.9960	Int = 3.57 E+04 [Ca] + 6.75 E+04	0.9997
E	Int = 1.64 E+04 [K] + 2.19 E+05	0.9951	Int = 9.96 E+04 [Na] + 6.51 E+04	0.9999	Int = 6.88 E+04 [Mg] + 1.44 E+05	0.9991	Int = 2.83 E+04 [Ca] + 4.07 E+04	1.0000
F	Int = 1.69 E+04 [K] + 1.48 E+05	0.9981	Int = 9.18 E+04 [Na] + 2.27 E+05	0.9989	Int = 7.07 E+04 [Mg] + 8.00 E+04	0.9978	Int = 2.66 E+04 [Ca] + 3.81 E+04	0.9993
G	Int = 1.67 E+04 [K] + 1.71 E+05	0.9997	Int = 1.02 E+05 [Na] + 1.74 E+05	0.9994	Int = 7.30 E+04 [Mg] + 9.34 E+04	1.0000	Int = 2.76 E+04 [Ca] + 3.94 E+04	1.0000
H	Int = 1.57 E+04 [K] + 2.69 E+05	0.9997	Int = 1.04 E+05 [Na] + 3.97 E+05	0.9982	Int = 7.03 E+04 [Mg] + 1.71 E+05	0.9986	Int = 2.96 E+04 [Ca] + 4.58 E+04	0.9997
I	Int = 1.54 E+04 [K] + 3.47 E+05	0.9950	Int = 1.05 E+05 [Na] + 1.21 E+05	0.9997	Int = 6.56 E+04 [Mg] + 1.86 E+05	0.9968	Int = 2.91 E+04 [Ca] + 6.09 E+04	0.9992
J	Int = 1.59 E+04 [K] + 2.16 E+05	0.9983	Int = 9.88 E+04 [Na] + 2.03 E+05	0.9995	Int = 6.65 E+04 [Mg] + 1.42 E+05	0.9999	Int = 2.70 E+04 [Ca] + 3.45 E+04	1.0000

K	Int = 1.59 E+04 [K] + 2.58 E+05	0.9928	Int = 8.89 E+04 [Na] + 5.80 E+05	0.9956	Int = 6.31 E+04 [Mg] + 2.08 E+05	0.9996	Int = 2.83 E+04 [Ca] + 4.87 E+04	0.9998
L	Int = 1.68 E+04 [K] + 2.45 E+05	0.9987	Int = 9.96 E+04 [Na] + 2.35 E+05	1.0000	Int = 7.05 E+04 [Mg] + 1.49 E+05	0.9997	Int = 2.89 E+04 [Ca] + 5.09 E+04	1.0000
M	Int = 1.83 E+04 [K] + 1.67 E+05	0.9984	Int = 1.04 E+05 [Na] + 1.02 E+05	0.9995	Int = 7.63 E+04 [Mg] + 1.24 E+05	0.9983	Int = 2.99 E+04 [Ca] + 6.57 E+04	0.9998
N	Int = 1.72 E+04 [K] + 2.04 E+05	0.9991	Int = 1.04 E+05 [Na] + 2.94 E+04	1.0000	Int = 7.66 E+04 [Mg] + 9.54 E+04	1.0000	Int = 2.89 E+04 [Ca] + 3.62 E+04	0.9990
O	Int = 1.69 E+04 [K] + 2.26 E+05	0.9998	Int = 1.05 E+05 [Na] + 3.75 E+04	0.9997	Int = 7.52 E+04 [Mg] + 1.22 E+05	0.9940	Int = 2.94 E+04 [Ca] + 3.08 E+04	0.9925

* En las ecuaciones de calibración, símbolo de elemento entre paréntesis se refiere a su concentración en mg/L.

Tabla 11 Método de adición de estándar: ecuaciones de regresión lineal y coeficientes de correlación para elementos traza parte 1.

Muestra	Sr		Rb		Fe	
	Ecuación	R ²	Ecuación	R ²	Ecuación	R ²
A	y = 1.10 E+05 [Sr] + 1.27 E+04	0.9965	y = 3.02 E+04 [Rb] + 1.90 E+04	0.9971	y = 4.58 E+03 [Fe] + 6.86 E+01	0.9993
B	y = 1.07 E+05 [Sr] + 1.19 E+04	0.9982	y = 2.98 E+04 [Rb] + 1.67 E+04	0.9996	ND	ND
C	y = 1.13 E+05 [Sr] + 1.28 E+04	0.9913	y = 3.12 E+04 [Rb] + 1.90 E+04	0.9996	ND	ND
D	y = 1.22 E+05 [Sr] + 1.09 E+04	0.9936	y = 3.30 E+04 [Rb] + 1.94 E+04	0.9997	ND	ND
E	y = 7.97 E+04 [Sr] + 8.61 E+03	0.9833	y = 2.59 E+04 [Rb] + 2.04 E+03	0.9983	y = 4.51 E+03 [Fe] + 5.53 E+02	0.9891
F	y = 8.54 E+04 [Sr] + 5.13 E+03	0.9985	y = 2.39 E+04 [Rb] + 8.31 E+02	0.9982	y = 4.34 E+03 [Fe] + 6.50 E+02	0.9916
G	y = 9.57 E+04 [Sr] + 7.38 E+03	0.9972	y = 2.45 E+04 [Rb] + 2.03 E+03	0.9992	y = 4.71 E+03 [Fe] + 9.97 E+02	0.9926

H	y = 1.14 E+05 [Sr] + 8.27 E+03	0.9994	y = 2.72 E+04 [Rb] + 1.70 E+03	0.9993	y = 5.40 E+03 [Fe] + 8.19 E+02	0.9751
I	y = 1.22 E+05 [Sr] + 7.79 E+03	1.0000	y = 2.63 E+04 [Rb] + 2.33 E+03	1.0000	y = 4.96 E+03 [Fe] + 8.77 E+02	0.9998
J	y = 9.75 E+04 [Sr] + 5.43 E+03	0.9988	y = 2.37 E+04 [Rb] + 1.26 E+03	0.9991	y = 4.66 E+03 [Fe] + 6.07 E+02	0.9888
K	y = 1.12 E+05 [Sr] + 7.89 E+03	0.9966	y = 2.33 E+04 [Rb] + 1.88 E+03	0.9997	y = 4.91 E+03 [Fe] + 9.48 E+02	0.9814
L	y = 1.05 E+05 [Sr] + 7.48 E+03	0.9986	y = 2.30 E+04 [Rb] + 3.80 E+03	0.9979	y = 4.31 E+03 [Fe] + 7.84 E+02	0.9686
M	y = 9.29 E+04 [Sr] + 1.98 E+04	0.9900	y = 2.10 E+04 [Rb] + 2.54 E+03	0.9982	y = 4.07 E+03 [Fe] + 2.36 E+03	0.9488
N	y = 9.21 E+04 [Sr] + 2.44 E+03	0.9993	y = 2.15 E+04 [Rb] + 3.56 E+03	0.9974	y = 4.27 E+03 [Fe] + 3.45 E+02	0.9991
O	y = 9.87 E+04 [Sr] + 1.05 E+04	0.9985	y = 2.22 E+04 [Rb] + 1.92 E+03	0.9984	y = 4.54 E+03 [Fe] + 2.57 E+02	0.9973

* En las ecuaciones de calibración, símbolo de elemento entre paréntesis se refiere a su concentración en mg/L.

Tabla 12 Método de adición de estándar: ecuaciones de regresión lineal y coeficientes de correlación para elementos traza parte 2.

Muestra	Mn		Al		Cu	
	Ecuación	R ²	Ecuación	R ²	Ecuación	R ²
A	y = 2.44 E+04 [Mn] + 1.87 E+03	0.9974	y = 1.04 E+04 [Al] + 6.90 E+02	0.9922	y = 6.92 E+04 [Cu] + 1.32 E+03	0.9959
B	y = 2.40 E+04 [Mn] + 2.21 E+03	0.9959	y = 1.02 E+04 [Al] + 5.82 E+02	0.9906	y = 7.21 E+04 [Cu] + 8.35 E+02	0.9998
C	y = 2.47 E+04 [Mn] + 2.50 E+03	0.9989	y = 1.08 E+04 [Al] + 5.75 E+02	0.9963	y = 7.49 E+04 [Cu] + 5.80 E+02	0.9998
D	y = 2.62 E+04 [Mn] + 1.80 E+03	0.9985	y = 1.15 E+04 [Al] + 6.72 E+02	0.9949	y = 4.34 E+04 [Cu] + 2.75 E+02	1.0000
E	y = 2.08 E+04 [Mn] + 2.23 E+03	0.9994	y = 8.39 E+03 [Al] + 6.17 E+02	0.9972	y = 4.49 E+04 [Cu] + 7.61 E+02	0.9991
F	y = 1.82 E+04 [Mn] + 1.27 E+03	0.9994	y = 8.04 E+03 [Al] + 5.94 E+02	0.9932	y = 3.83 E+04 [Cu] + 3.38 E+02	0.9880

G	$y = 1.91 \text{ E}+04$ [Mn] + 1.74 E+03	0.9999	$y = 8.44 \text{ E}+03$ [Al] + 4.99 E+02	0.9876	$y = 3.72 \text{ E}+04$ [Cu] + 9.01 E+02	0.9997
H	$y = 2.06 \text{ E}+04$ [Mn] + 2.61 E+03	0.9950	$y = 9.59 \text{ E}+03$ [Al] + 5.22 E+02	0.9926	$y = 3.73 \text{ E}+04$ [Cu] + 1.15 E+03	0.9991
I	$y = 2.13 \text{ E}+04$ [Mn] + 2.42 E+03	0.9982	$y = 9.99 \text{ E}+03$ [Al] + 3.48 E+02	0.9925	$y = 3.64 \text{ E}+04$ [Cu] + 1.16 E+03	0.9981
J	$y = 1.93 \text{ E}+04$ [Mn] + 2.19 E+03	1.0000	$y = 8.73 \text{ E}+03$ [Al] + 2.43 E+02	0.9995	$y = 3.73 \text{ E}+04$ [Cu] + 1.98 E+03	0.9985
K	$y = 2.07 \text{ E}+04$ [Mn] + 3.33 E+03	0.9998	$y = 9.67 \text{ E}+03$ [Al] + 5.46 E+02	0.9968	$y = 5.61 \text{ E}+04$ [Cu] + 6.51 E+02	0.9988
L	$y = 1.97 \text{ E}+04$ [Mn] + 3.05 E+03	0.9999	$y = 9.22 \text{ E}+03$ [Al] + 4.10 E+02	0.9997	$y = 5.48 \text{ E}+04$ [Cu] + 9.59 E+02	0.9994
M	$y = 1.91 \text{ E}+04$ [Mn] + 2.46 E+03	0.9949	$y = 8.31 \text{ E}+03$ [Al] + 6.76 E+02	0.9999	ND	ND
N	$y = 1.87 \text{ E}+04$ [Mn] + 2.26 E+03	0.9992	$y = 8.59 \text{ E}+03$ [Al] + 1.89 E+02	0.9986	ND	ND
O	$y = 1.92 \text{ E}+04$ [Mn] + 2.28 E+03	0.9994	$y = 8.86 \text{ E}+03$ [Al] + 3.62 E+02	0.9985	ND	ND

*En las ecuaciones de calibración, símbolo de elemento entre paréntesis se refiere a su concentración en mg/L.

Como se observa en estas tablas, en cada uno de los casos, la linealidad fue aceptable ($r^2 > 0.99$).

Con base en las ecuaciones obtenidas, se calcularon las concentraciones de los elementos en vinos y los resultados obtenidos se presentan a continuación, en las tablas 14 y 15.

Tabla 13 Concentraciones de elementos mayoritarios encontradas en muestras de vino tinto por el método de adición de estándar; se muestran valores promedio \pm SD, en mg/L n=3).

Muestra	K	Na	Mg	Ca
A	2.9 E+03 \pm 160	96.3 \pm 4.1	130 \pm 6	121 \pm 9
B	3.6 E+03 \pm 202	84.9 \pm 3.6	112 \pm 6	120 \pm 3
C	4.2 E+03 \pm 209	72.5 \pm 3.9	127 \pm 5	117 \pm 7
D	4.9 E+03 \pm 373	102 \pm 6	119 \pm 5	94.6 \pm 4.6
E	1.3 E+03 \pm 45	32.7 \pm 0.4	105 \pm 4	72.1 \pm 0.6

F	8.8 E+02 ± 22	124 ± 2	56.6 ± 0.4	71.5 ± 1.7
G	1.02 E+03 ± 31	85.3 ± 4.6	64.0 ± 4.8	71.3 ± 5.1
H	1.7 E+03 ± 18	191 ± 6	122 ± 4	77.5 ± 3.1
I	2.2 E+03 ± 141	57.5 ± 0.9	142 ± 3	105 ± 3
J	1.4 E+03 ± 50	102 ± 12	107 ± 12	63.9 ± 4.6
K	1.6 E+03 ± 75	326 ± 28	164 ± 10	86.0 ± 2.4
L	1.5 E+03 ± 62	118 ± 4	105 ± 1	88.0 ± 2.2
M	9.1 E+02 ± 24	49.1 ± 3.4	81.5 ± 6.6	110 ± 10
N	1.2 E+03 ± 153	14.2 ± 0.5	62.3 ± 1.1	62.6 ± 1.1
O	1.3 E+03 ± 63	17.9 ± 0.9	81.1 ± 3.4	52.3 ± 3.5

Tabla 14 Concentraciones de elementos traza encontradas en muestras de vino tinto por el método de adición de estándar; se muestran valores promedio ± SD en mg/L, n=3.

Muestra	Sr	Rb	Fe	Mn	Al	Cu
A	1.16 ± 0.05	6.31 ± 0.22	0.14 ± 0.05	0.77 ± 0.02	0.67 ± 0.03	0.25 ± 0.01
B	1.12 ± 0.01	5.62 ± 0.15	ND	0.92 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.15 ± 0.01
C	1.13 ± 0.02	6.09 ± 0.28	ND	1.01 ± 0.03	0.53 ± 0.01	0.10 ± 0.01
D	1.90 ± 0.02	5.87 ± 0.19	ND	0.69 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.05 ± 0.01
E	1.08 ± 0.06	0.79 ± 0.02	1.22 ± 0.03	1.07 ± 0.02	0.74 ± 0.01	0.14 ± 0.02
F	0.60 ± 0.02	0.35 ± 0.02	1.50 ± 0.05	0.70 ± 0.01	0.74 ± 0.02	0.07 ± 0.01
G	0.77 ± 0.04	0.83 ± 0.06	2.11 ± 0.19	0.91 ± 0.03	0.59 ± 0.04	0.19 ± 0.03
H	0.73 ± 0.07	0.62 ± 0.01	1.52 ± 0.26	1.26 ± 0.07	0.54 ± 0.03	0.25 ± 0.05
I	0.64 ± 0.03	0.88 ± 0.07	1.77 ± 0.06	1.14 ± 0.04	0.35 ± 0.02	0.26 ± 0.02

J	0.56 ± 0.04	0.53 ± 0.04	1.30 ± 0.09	1.13 ± 0.04	0.28 ± 0.02	0.42 ± 0.05
K	0.70 ± 0.04	0.81 ± 0.04	1.93 ± 0.42	1.61 ± 0.13	0.56 ± 0.05	0.29 ± 0.02
L	0.71 ± 0.02	1.65 ± 0.03	1.82 ± 0.10	1.54 ± 0.06	0.44 ± 0.02	0.24 ± 0.01
M	2.13 ± 0.04	1.21 ± 0.04	5.79 ± 0.55	1.29 ± 0.04	0.81 ± 0.01	ND
N	0.27 ± 0.01	1.62 ± 0.03	0.81 ± 0.05	1.21 ± 0.04	0.22 ± 0.01	ND
O	1.07 ± 0.05	0.87 ± 0.03	0.57 ± 0.02	1.19 ± 0.04	0.41 ± 0.02	ND

Los resultados totales serán sometidos a tratamientos y análisis estadísticos para corroborar la viabilidad de ser utilizados en estudios de procedencia geográfica.

IV.1.5 Cuantificación de metales por el método de dilución de estándar

El principio de este método se presentó en la parte de introducción, se decidió explorar su utilidad en el análisis de metales en vinos debido a que este método integra las ventajas del método de adición de estándar y del estándar interno, reduciendo al mismo tiempo el número de las soluciones a preparar y número de operaciones a realizar. Por otro lado, en experimentos preliminares se observaron algunas limitaciones de la versión del método reportada originalmente³³; principalmente estas fueron; (i) alto ruido debido a corto tiempo de integración aplicado a realizar lectura en tiempo real (1 s), como el menor tiempo posible para llevar a cabo la lectura de entre 3-6 elementos simultáneamente, (ii) necesidad de emplear el mismo ajuste de la posición del visualizador (0), y de la presión del nebulizador (120 kPa) para todos elementos cuyas señales se adquieren simultáneamente. En cuanto al primer punto, en la cuantificación mediante calibración externa o adición de estándar, lo recomendable es integrar las señales al menos durante 3 s y en cuanto al segundo punto, es preferible ajustar las condiciones individualmente asegurando así la más alta posible relación señal/ruido.

En el primer intento, se llevó a cabo el método reportado sin cambios, con las condiciones instrumentales en la tabla 16, para determinar Rb, Fe, Al, Mn y Sr con la dilución de vino

1:10 y utilizando el ytrio como estándar interno; la mezcla de estándares para llevar a cabo la preparación de la solución en el tubo 2 tenía una misma cantidad de analito y de estándar interno; la concentración en la primer prueba fue de 5.0 mg/L de cada elemento. Se utilizaron las longitudes de onda previamente seleccionadas, y para ytrio se utilizó su línea de emisión a 371.029 nm, debido a que es la que presenta una mayor intensidad relativa además de ser la sugerida en los artículos que reportan este método.

El vertido del tubo 3 (muestra + blanco) en el tubo 2 (muestra + estándares), ambos con volumen inicial de 5mL, se realizó de manera manual con una jeringa de 5 mL, con un flujo aproximado de 15 mL/min, bajo las siguientes condiciones instrumentales.

Tabla 15 Condiciones instrumentales de MP-AES para análisis piloto de elementos traza por SDA.

Parámetro	Ajuste
Corrección de fondo	Ninguno
Tiempo de integración	1 s
Flujo de inyección de aire	Alto
Velocidad de la bomba	10 rpm
Introducción de muestra	Manual
Posición del visualizador	0
Presión del nebulizador	120 kPa
Concentración de estándares (stock)	5 mg/L
Modo de lectura	tiempo real

En esta primera prueba se observó que las intensidades obtenidas para el ytrio fueron más bajas en comparación con los otros elementos (Fig. 8).

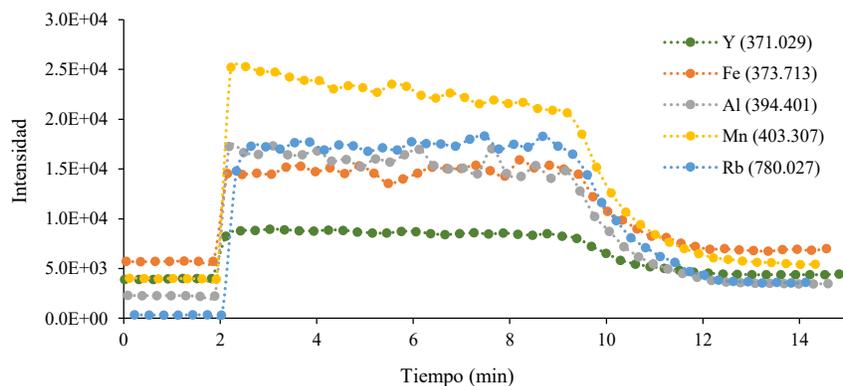


Fig. 7 Gráfico típico obtenido para el método SDA original, mostrando lecturas realizadas a cierta longitud de onda (nm) en tiempo real para los analitos y el estándar interno en vino chileno (adición de estándares: 5mg/L de cada uno de los analitos y del EI)

Esta situación provocó que al realizar la gráfica de calibración del método (I_A/I_{EI} vs $1/[C_{EI}]$), la relación de intensidades fuera de mayor a menor en función del inverso de la concentración de estándar interno, obteniéndose una pendiente negativa. A modo de ejemplo en la Fig. 9 se describe lo ocurrido en el caso del aluminio.

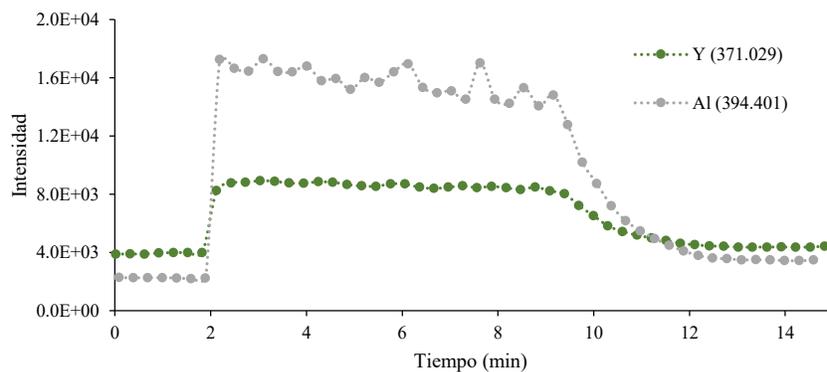


Fig. 8 Gráfico típico obtenido para el método SDA original, representando lecturas en tiempo real realizadas a cierta longitud de onda (nm) para el aluminio como analito y el ytrio como estándar interno, datos extraídos de la Fig. 8 (vino chileno).

En esta gráfica, el punto más alto en intensidad se identificará como Sa_0 para el analito y como S_{i50} para el estándar interno, mientras que el punto donde termina la zona de dilución (el más bajo en intensidad) se identificará como Sa_f y S_{i5f} respectivamente.

A continuación, se muestra la curva de calibración obtenida con los datos extraídos de la gráfica SDA en la Fig. 10, donde se observa que la pendiente es negativa.

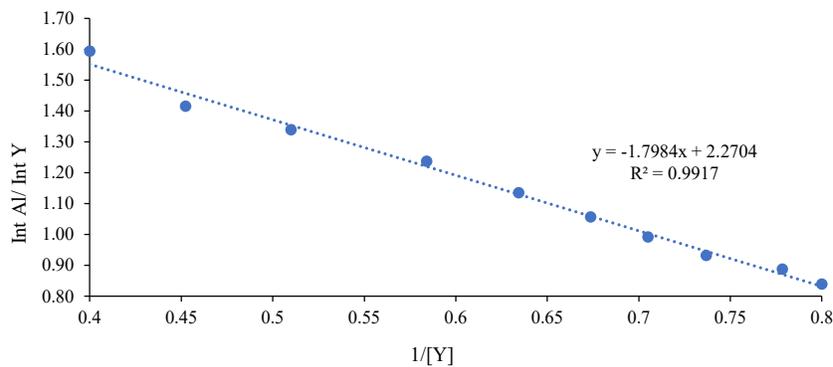


Fig. 9 Curva de calibración para aluminio por el método de SDA donde se observa la obtención de una pendiente negativa.

Debido a que el tratamiento matemático involucra el uso de la pendiente, tal como se describe anteriormente, no es posible calcular la concentración del analito en la muestra con estos resultados puesto que debe cumplirse matemáticamente la condición $\frac{Sa_0}{Sa_f} < \frac{S_{i50}}{S_{i5f}}$ para asegurar la obtención de una pendiente positiva, tal como se explica a continuación.

Visualizando de esta manera, sustituyendo en la ecuación de la recta $(y - y_1) = \left(\frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}\right)(x - x_1) + b$, los valores graficados en la curva de calibración se obtienen que:

$$\left(\frac{Sa}{S_{i5}} - \frac{Sa_0}{Sa_f}\right) = \left(\frac{\frac{Sa_f}{S_{i5f}} \frac{Sa_0}{S_{i50}}}{\frac{1}{c_{i5f}} - \frac{1}{c_{i50}}}\right) \left(\frac{1}{c_{i5}} - \frac{1}{c_{i50}}\right) + b \quad \text{Ec. 14}$$

Donde la pendiente está definida por la sección $\left(\frac{\frac{S_{ISf}}{1} \frac{S_{IS0}}{1}}{C_{ISf} C_{IS0}}\right)$, si aplicamos el enfoque en el numerador, descubriendo que si la relación entre $\frac{S_{a0}}{S_{IS0}} > \frac{S_{af}}{S_{ISf}}$ la pendiente resultará negativa, por lo tanto la condición entre las relaciones de intensidades que deberá cumplirse para que la pendiente sea positiva es que $\frac{S_{a0}}{S_{af}} < \frac{S_{IS0}}{S_{ISf}}$.

Con base en este primer resultado, se decidió disminuir la concentración de los analitos en la solución estándar agregada a la muestra hasta a 2 mg/L y aumentar la concentración de ytrio a 10 mg/L.

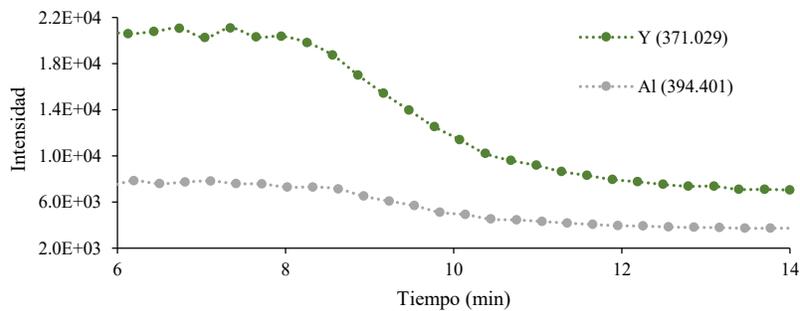


Fig. 10 Gráfico típico obtenido para el método SDA original, representando las lecturas en tiempo real para el aluminio como analito y el ytrio como estándar interno, correspondiente a concentraciones 2mgAl/L y 10 mgY/L agregadas al vino chileno.

En esta segunda prueba la gráfica de lectura en tiempo real (Fig. 11) nos muestra que la intensidad del ytrio es mayor a la del analito, y la curva de calibración nos permite obtener ya una pendiente positiva.

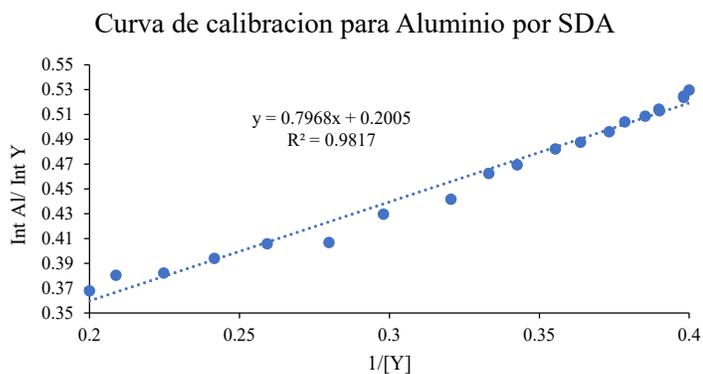


Fig. 11 Curva de calibración para aluminio obtenida por el método de SDA original (vino chileno diluido 10 veces, adición de 2 mg Al/L y 10 mg Y/L)

A pesar de lograr ajustar las concentraciones de estándares de analitos y de estándar interno que se deben agregar a la muestra, las concentraciones obtenidas en muestra de vino chileno fueron en desacuerdo con los del método de adición de estándar; en el caso de aluminio se encontró la concentración de 7.95 ± 0.15 mg/L, mientras que el método de adición de estándar arrojó el valor de 0.35 ± 0.01 mg/L. Con base en estos resultados (Fig. 12) y las limitaciones antes discutidas de este método, se detectaron varios puntos de mejora potencial, por lo que se propusieron algunas modificaciones del método reportado anteriormente, mismas que se resumen brevemente en tabla 17.

Tabla 16 Principales diferencias entre SDA reportado y SDA modificado.

Parámetro	SDA reportado	SDA modificado
Composición de muestra introducida	Cambiante en tiempo	Constante en tiempo
Numero de tubos en auto muestreador	Blanco + 1	Blanco + varios
Presión del nebulizador	120kPa	Ajustado individualmente
Posición del visualizador	0	Ajustado individualmente
Ajuste de línea base	Sin	Sin

Tipo de lectura	Tiempo real	Escaneo de elementos individuales
Tiempo de integración	1 s	5 s
Concentración para cada adquisición de la señal	Debe calcularse	Conocida
Dilución de EI y de los analitos en cada lectura	No exactamente igual	Igual

Cada uno de los puntos del método que se proponen modificar se describen a continuación:

- Modo de lectura: la lectura en tiempo real no permite ajustar algunos parámetros como presión del nebulizador y posición del visualizador de manera individual para cada uno de los elementos, lo que compromete el desempeño analítico.
- Manera de mezclar las soluciones: en el método original, fueron probadas varias formas de verter el contenido del tubo 3 al tubo 2 (vertido rápido manual, con jeringa, con bomba peristáltica); sin embargo, no era posible controlar el mezclado y no se lograba realizar lecturas en las mezclas homogéneas correspondientes a dilución paulatina (lectura en tiempo real).
- Tiempo de integración: el mínimo tiempo de integración en el método original es de 1 segundo, esto es necesario para adquirir suficientes lecturas para cada uno de los elementos en la zona de dilución (Fig. 8) requeridos para calcular la función de regresión lineal. Este corto tiempo de integración no es tiempo suficiente para la estabilización de otros parámetros a cierta longitud de onda y por ello, se observó alto ruido en lectura de las señales.
- Concentración: en el método original la concentración actual en el momento de la medición se calcula de manera aproximada, debido a que se relaciona proporcionalmente la concentración inicial del analito y del estándar interno en el punto del inicio de la zona de dilución, mientras que en el punto final se consideraba llevar esa concentración a la mitad, pero esta condición no podía asegurarse debido a los problemas de mezclado de soluciones mencionados anteriormente.

Para atender los aspectos que se acaban de mencionar, en este trabajo se propuso modificar el método original. Se parte de las mismas soluciones A (50% de vino diluido y 50% de

mezcla de estándares de analitos y estándar interno) y B (50% de vino diluido y 50% de HNO₃ ultra trazas al 2%) y además se preparan cinco 5 tubos etiquetándolas del 5 al 9, lo cual corresponde al volumen final en mL de cada uno de ellos. Los cinco tubos contienen la misma cantidad de solución A (5.0 mL), al tubo 6 se le agrega 1 mL de la solución B, al tubo 7 se le agregan 2.0 mL y así sucesivamente hasta llegar al tubo 9; al conocer el volumen exacto agregado de estándares a cada tubo es posible calcular la concentración de cada analito y de estándar interno con exactitud por lo que se esperaba disminuir considerablemente el error en este cálculo de concentración del método original.

En la modificación realizada, la adquisición de espectros se realiza sucesivamente para cada uno de los tubos del 5 al 9, pudiéndose aplicar mayor tiempo de integración (5 s) y ajustes de posición del visualizador y presión del nebulizador individualmente para cada uno de los elementos. Por otro lado, se conserva la idea original de la dilución de estándar agregado y la integración del método del estándar interno.

El ajuste de condiciones fue llevado a cabo con una solución de vino chileno diluido 100 veces con adición de 1.0 mg/L de estándares de analitos y 25 mg/L de estándar interno. Para la preparación de la solución A, la concentración de estándares del stock utilizado fue de aproximadamente el 50% del promedio de la concentración del analito estimada en vino, por grupos de muestras, tal como se muestra en la tabla 18.

Tabla 17 Concentración de estándares en el stock para el método de SDA modificado (mg/L).

Grupo de muestras	Elementos				
	Sr	Rb	Fe	Mn	Al
A B C D	1.0	2.5	0.1	0.2	0.1
E F G	1.0	2.0	0.2	0.2	0.1
H I J K L	0.6	0.5	0.3	0.4	0.1
M N O	0.8	0.5	0.6	0.3	0.1

La concentración de ytrio se mantuvo fija para el stock utilizado en todas las muestras 50 mgY/L. Puesto que las señales del EI tienen que presentar mayor magnitud respecto a los analitos, el método SDA original y modificado resulta más adecuado para elementos traza respecto a los elementos mayoritarios (se evita altas concentraciones de ytrio).

En este trabajo, el método SDA ha sido utilizado para la determinación de Sr, Rb, Fe, Mn y Al. En la Fig. 13, se presentan espectros adquiridos para estos cinco elementos y para el Y como EI en seis tubos correspondientes a diferente grado de dilución de estándares y de EI (más un blanco).

Uno de los beneficios de modificar el método de SDA es que, al conocer las concentraciones del estándar en cada tubo y agregar la lectura de un tubo 0, cuyo contenido sea únicamente la solución 3 (50% vino diluido y 50% HNO₃ ultra trazas al 2%) es posible realizar una gráfica de concentración del analito añadida vs intensidad, y realizar el tratamiento matemático tal como para el método de adición de estándar. De esta manera, en la misma corrida de muestra, se pueden aplicar dos algoritmos matemáticos, comparando los resultados obtenidos mediante adición de estándar y dilución de estándar.

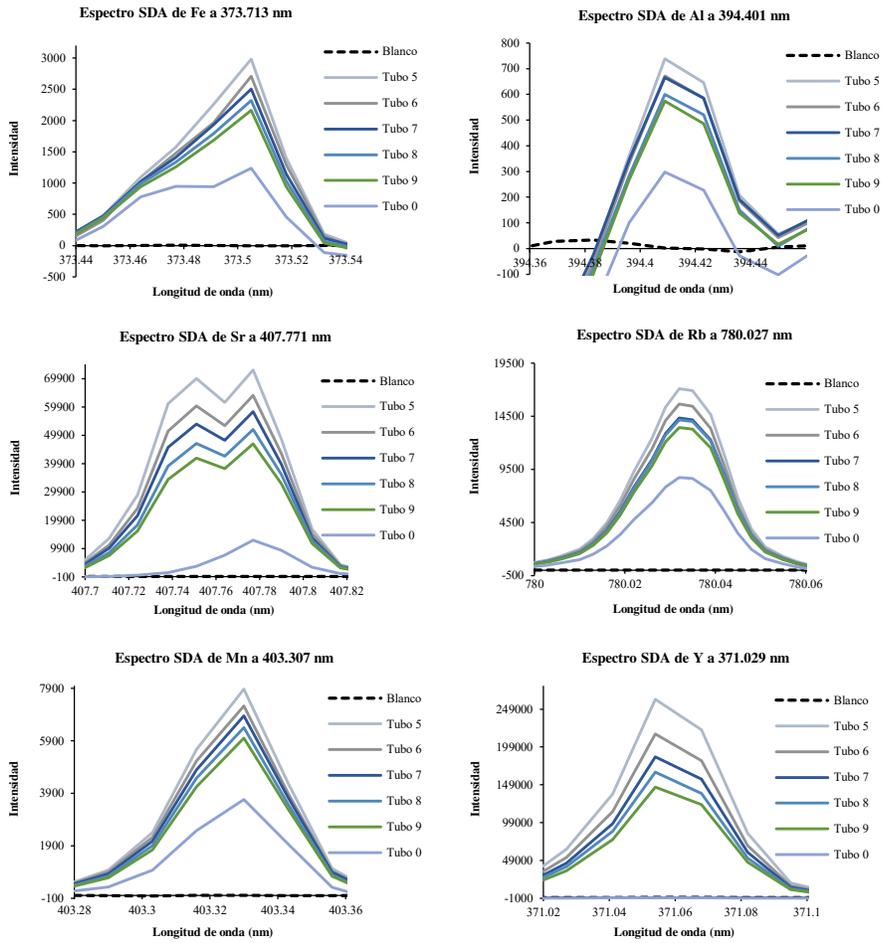


Fig. 12 . Espectros para cada analito y estándar interno (ytrio) obtenidos por el método de SDA modificado en el análisis de vino tinto chileno.

Los resultados de determinación de los cinco elementos seleccionados en 12 vinos mexicanos, obtenidos por el método SDA modificado se presentan en la tabla 19.

Tabla 189 Concentraciones de elementos traza encontradas en muestras de vino tinto por el método de dilución de estándar modificado en mg/L (se muestran valores promedio \pm SD, n=3).

Muestra	Sr	Rb	Mn	Fe	Al
A	0.83 \pm 0.17	6.62 \pm 0.08	0.63 \pm 0.11	ND	0.49 \pm 0.12
B	0.78 \pm 0.15	7.87 \pm 1.42	0.98 \pm 0.11	ND	0.65 \pm 0.11
C	0.72 \pm 0.02	6.97 \pm 0.10	0.87 \pm 0.08	ND	0.48 \pm 0.01
D	0.58 \pm 0.07	7.28 \pm 0.79	0.52 \pm 0.03	ND	0.51 \pm 0.03
E	0.86 \pm 0.14	0.94 \pm 0.28	1.04 \pm 0.10	0.78 \pm 0.11	0.66 \pm 0.07
F	0.56 \pm 0.16	0.71 \pm 0.16	0.62 \pm 0.06	1.34 \pm 0.15	0.63 \pm 0.02
G	0.74 \pm 0.11	0.80 \pm 0.01	0.89 \pm 0.17	2.27 \pm 0.63	0.67 \pm 0.22
H	0.63 \pm 0.06	0.72 \pm 0.04	1.27 \pm 0.10	0.39 \pm 0.04	0.55 \pm 0.06
I	0.36 \pm 0.13	0.71 \pm 0.30	0.98 \pm 0.07	0.52 \pm 0.12	0.23 \pm 0.08
J	0.46 \pm 0.11	0.62 \pm 0.25	1.23 \pm 0.13	0.60 \pm 0.11	0.27 \pm 0.11
K	0.80 \pm 0.16	0.97 \pm 0.24	1.83 \pm 0.17	0.63 \pm 0.11	0.90 \pm 0.20
L	0.55 \pm 0.11	1.71 \pm 0.05	1.33 \pm 0.10	1.52 \pm 0.20	0.56 \pm 0.14

IV.1.7 Cuantificación de metales por calibración multi energía

Para demostrar la factibilidad del método MEC, descrito en la parte de Introducción, se realizó la determinación de elementos mayoritarios (K, Na, Ca y Mg) en el vino chileno, mismo que se utilizó para todos métodos de cuantificación. A manera de ejemplo, en la tabla 20 se muestran las longitudes de onda correspondientes a diferentes líneas espectrales de calcio junto con las intensidades obtenidas para dos soluciones: vino 50 veces diluido (M+B) y la misma muestra con adición de 0.75 mg/L de Ca (M+S).

Tabla 20 Relación de datos para curva de calcio por MEC.

λ (nm)	Int (m+s)	Int (m+b)
643.907	1544	1109
445.478	1729	1290
616.217	3243	2355
430.253	1792	1305
396.847	105416	76712

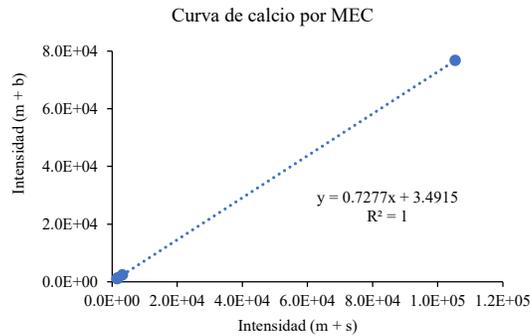


Fig. 13 Curva de calibración por el método de multi energía para calcio

La curva de calibración obtenida a partir de estos resultados se presenta en la Fig. 14 se puede observar que, a pesar de seleccionar 5 longitudes de onda, cuatro presentaban sensibilidad similar y solamente una de ellas aseguro la sensibilidad diferente y mucho más alta; como consecuencia, la función de regresión lineal prácticamente se obtuvo para dos puntos. En la tabla 21 y Fig. 15, se presentan datos obtenidos por el método MEC para magnesio. Como se puede observar, para este elemento las cuatro líneas espectrales presentaban suficientes diferencias en las intensidades, por lo que el ajuste por regresión lineal era de mayor confiabilidad.

Tabla 191 Relación de datos para curva de magnesio por MEC.

λ (nm)	Int (m+s)	Int (m+b)
279.553	168689	116634
280.271	81463	56155
285.213	424484	303310
383.829	13879	9847

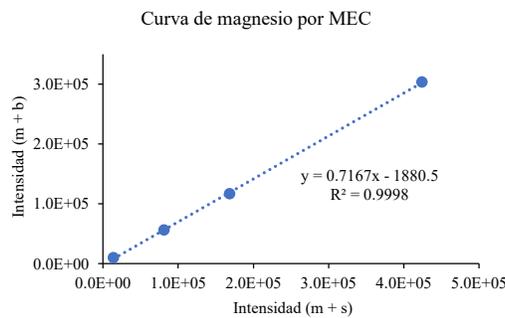


Fig. 14 Curva de calibración por el método de multi energía para magnesio.

Igual como se hizo para Ca y Mg, se revisaron las líneas de emisión y se construyeron las curvas de calibración para 10 elementos incluidos en el estudio, llegándose a la conclusión que el método MEC es adecuado solamente para cuantificar los elementos mayoritarios (algunas de las líneas fueron de baja intensidad). En la siguiente tabla 22, se resumen las líneas de emisión utilizadas para K, Mg, Na y Ca.

Tabla 202 Longitudes de onda seleccionadas para elementos mayoritarios por MEC (nm).

Potasio	Magnesio	Sodio	Calcio
693.877	279.553	568.263	643.907
404.721	280.271	568.82	445.478
344.738	517.268	615.423	616.217
404.414	285.213	330.237	430.253
766.491	383.829	588.995	393.366
769.897	518.36	589.592	396.847

Cabe señalar que el factor de dilución de vino fue 1:100 para potasio y 1:50 para los otros tres elementos.

Las condiciones instrumentales que permanecieron fijas en cada análisis se muestran a continuación en la tabla 23, mientras que la presión del nebulizador y posición del visualizador se ajustaban en cada caso con una solución de ajuste que contenía la muestra en el mismo rango de dilución de vino a analizar.

Tabla 213 Condiciones instrumentales de MP-AES para análisis de elementos mayoritarios por MEC.

Parámetro	Ajuste
Corrección de fondo	Ninguno
Tiempo de integración	5 s
Flujo de inyección de aire	Alto
Velocidad de la bomba	15 rpm
Introducción de muestra	Manual
Tiempo de introducción	3 s
Bomba rápida (40 rpm)	Activada
Tiempo de estabilización	20 s
Número de píxeles	3
Réplicas	3

Para la preparación de todas las muestras de vino analizadas, el stock utilizado para elementos mayoritarios fue el mismo: siendo para potasio de 20 mg/L, calcio 2.5 mg/L, magnesio 1.6 mg/L, y para sodio 1.0 mg/L. Debe notarse que, en las soluciones introducidas al plasma, la concentración final del estándar agregado de cada elemento queda reducida a la mitad puesto que a la solución 1 está constituida por 50% de vino con la dilución correspondiente y 50% de mezcla de estándares de analitos a concentración conocida. De manera similar como se hizo en el método de adición de estándar y de dilución de estándar, se aplicaron las adiciones de estándares considerando la cantidad estimada de los analitos en el vino diluido (resultado de calibración externa).

Tabla 224 Concentraciones de elementos mayoritarios encontradas en muestras de vino tinto por el método de calibración multi energía en mg/L (se muestran valores promedio \pm SD, n=3).

Muestra	K	Na	Mg	Ca
A	2.74 E+03 \pm 124	98.7 \pm 8.0	144 \pm 4	123 \pm 26
B	2.69 E+03 \pm 36	86.9 \pm 2	111 \pm 4	112 \pm 3
C	2.77 E+03 \pm 88	78.2 \pm 8.6	130 \pm 4	105 \pm 6
D	3.60 E+03 \pm 16	109 \pm 7	121 \pm 0	70.4 \pm 7.6
E	1.13 E+03 \pm 23	36.3 \pm 2.2	113 \pm 1	77.5 \pm 1.0
F	8.96 E+02 \pm 19	123 \pm 14	65.7 \pm 2.3	68.6 \pm 3.5
G	1.07 E+03 \pm 30	94.5 \pm 6.9	78.8 \pm 0.9	74.1 \pm 3.8
H	1.57 E+03 \pm 24	182 \pm 2	129 \pm 10	74.1 \pm 1.6
I	2.25 E+03 \pm 50	61.1 \pm 4.5	140 \pm 3	111 \pm 4
J	1.33 E+03 \pm 61	95.4 \pm 6.5	112 \pm 5	58.5 \pm 5.2
K	1.38 E+03 \pm 45	281 \pm 22	144 \pm 2	79.4 \pm 1.6
L	1.67 E+03 \pm 32	114 \pm 7.0	123 \pm 3	95.6 \pm 2.7
M	1.11 E+03 \pm 26	56.3 \pm 4.2	119 \pm 13	68.3 \pm 6.6
N	1.18 E+03 \pm 36	15.7 \pm 0.2	81.9 \pm 1.9	79.8 \pm 8.4
O	1.34 E+03 \pm 27	19.6 \pm 0.2	103 \pm 2	66.6 \pm 3.0

Como resultado del método MEC, las concentraciones de elementos encontrados en cada uno de los vinos se muestran en la tabla 24. Cabe resaltar una buena concordancia de estos resultados con los obtenidos por el método de adición de estándar (tabla 14).

IV.2. Evaluación comparativa de diferentes métodos de cuantificación

La cuantificación es un componente crucial del análisis químico, en el cual la confiabilidad de los resultados siempre es un reto. En particular, dependiendo de la composición de muestra y de la técnica analítica utilizada, es necesario asegurar las condiciones experimentales e instrumentales que aseguren buena exactitud y precisión de los resultados. En el caso de determinación de metales en vinos por MP-AES, los parámetros que se examinaron para evitar interferencias espectrales y para asegurar la más alta posible relación S/N fueron los siguientes: (i) factor de dilución de muestra y (ii) condiciones instrumentales con importancia especial del ajuste de la línea base. Se buscó también la simplicidad en el procedimiento y un corto tiempo de análisis. Para ello, se examinaron cuatro diferentes métodos de cuantificación, mismos que se han descrito en la parte de Introducción. En el caso del método de dilución de estándar (SDA) se propuso una modificación del método original (SDM). La puesta a punto de cada uno de estos métodos se llevó a cabo utilizando un vino tinto chileno, observándose en cada caso ciertas ventajas y desventajas. En la tabla 25, se presenta una evaluación comparativa de los cinco métodos de cuantificación.

Tabla 235 Evaluación comparativa de los métodos de cuantificación utilizados.

	Calibración externa (CE)	Adición de estándar (SA)	Dilución de estándar original (SDA)	Dilución de estándar modificada (SDM)	Calibración multi-energía (MEC)
Ambiente químico del calibrador	Diferente que en la muestra	Igual que en la muestra	Igual que en la muestra	Igual que en la muestra	Igual que en la muestra
Ajuste de línea base	Automática o manual - no confiable	Manual para cada muestra - confiable	Sin ajuste de línea base - confiable	Sin ajuste de línea base - confiable	Sin ajuste de línea base - confiable

Protocolo experimental	Blanco, 5-6 soluciones estándar muestras	Blanco, al menos 3 soluciones de muestra con diferentes adiciones de estándares	Blanco, 2 soluciones de muestra: sin y con adición de estándares	2 soluciones de muestra: sin y con adición de estándares 5 mezclas de dos anteriores	2 soluciones de muestra: sin y con adición de estándares
Tiempo de análisis *	1	4	2	3	5
Estándar interno	No (pero posible)	No	Si	Si	No
Tiempo de integración	Sin limitación	Sin limitación	Limitado (adquisición en tiempo real)	Sin limitación	Sin limitación
Cálculo**	1	3	5	4	2
Utilidad	Limitada (estimación de concentraciones)	Muy buena (método recomendado para todos los elementos)	Limitada (S/N bajo, aplicable para elementos traza)	Buena para elementos traza	Buena para elementos mayoritarios
Cantidad de muestra y HNO₃***	5	3	2	4	1
Limitantes	Interferencias de matriz	Método recomendado, pero procedimiento complejo	Altas concentraciones de EI, mezclado no uniforme	Altas concentraciones de EI, procedimiento complejo	Escasez de líneas de emisión de diferente intensidad

*En escala del 1-5; 1- el más corto tiempo por una muestra y 5 – el más largo tiempo.

**En escala del 1-5; 1 - el más fácil, y 5 – el más complejo.

***En escala del 1-5; 1 - el que requiere menos cantidad y 5 – el que requiere más.

En cuanto a la calidad de los resultados obtenidos en el análisis de vinos, debido a diferente composición química de la muestra y de las soluciones de calibración en el método CE, el

ajuste de la línea base fue problemático y los resultados fueron muy poco confiables. En otros métodos, los estándares de los analitos se adicionaban directamente a la muestra; gracias a ello, en SA se realizaba el ajuste de línea base de manera manual para cada muestra y para SDA, SDM y MEC no era necesario el ajuste de línea base, mejorando de manera importante la confiabilidad.

En el caso del método SDA, su principal ventaja es la simplicidad en el procedimiento (solamente dos soluciones y lectura en tiempo real) y el uso del estándar interno; sin embargo, era necesario utilizar altas concentraciones del EI y las señales eran muy ruidosas (corto tiempo de integración). Aunque la modificación propuesta en este trabajo redujo dichas limitaciones, el método SDM pudo ser aplicado solamente para la determinación de metales traza, obteniéndose una buena concordancia con el método de adición de estándar (SA) considerado como el más confiable.

En el caso de MEC, la limitación principal fue la escasez de líneas de emisión que cubrirían de manera uniforme un amplio intervalo de intensidades para cada uno de los elementos. Debido a que mayoría de las líneas útiles en este sentido presentaban baja intensidad (respecto a la línea más intensa del espectro atómico), el método MEC resultó adecuado para la determinación de elementos mayoritarios, proporcionando resultados congruentes con los del SA.

Con base en la evaluación comparativa que se acaba de presentar, se concluye que los métodos de calibración externa (CE) y de dilución de estándar original (SDA) no son adecuados para el análisis de vinos utilizando como preparación de muestra una simple dilución. Para los métodos de adición de estándar (SA), dilución de estándar modificada (SDM) y calibración multi-energía (MEC), en la tabla 26 se presentan los resultados obtenidos en el análisis de vino chileno. Se observa una buena concordancia entre los valores obtenidos por el método de adición de estándar, considerado como el más confiable, con SDM para elementos traza y con MEC para elementos mayoritarios. Puesto que los dos métodos alternativos (SDM y MEC) no requieren del ajuste de línea base y son en cuanto a

procedimiento más simples respecto al tradicional SA (tabla 25), se puede recomendar su uso en la determinación de elementos traza (SDM) y mayoritarios (MEC) por MP-AES.

Tabla 246 Resultados obtenidos en el análisis del vino chileno para cada uno de los elementos, utilizando diferentes métodos de cuantificación propuestos (promedio \pm SD, mg/L, n=3).

Elemento	Dilución de la muestra	Calibración externa	Adición de estándar	Dilución de estándar	Calibración multi energía
K	100x	1066 \pm 46	1120 \pm 92	-	1138 \pm 44
Na	50x	17.0 \pm 0.6	19.5 \pm 0.8	-	19.1 \pm 0.6
Mg		87.6 \pm 1.6	110 \pm 1	-	111 \pm 1
Ca	10x	65.9 \pm 0.3	95.6 \pm 1.0	-	94.8 \pm 1.4
Sr		2.25 \pm 0.08	0.72 \pm 0.07	0.86 \pm 0.22	-
Al		0.58 \pm 0.09	0.35 \pm 0.01	0.35 \pm 0.09	-
Fe		1.22 \pm 0.10	1.62 \pm 0.13	1.52 \pm 0.33	-
Rb		7.21 \pm 0.65	4.66 \pm 0.25	4.59 \pm 0.49	-
Mn		2.91 \pm 0.05	1.72 \pm 0.09	1.69 \pm 0.16	-
Cr	4x	0.06 \pm 0.02	0.16 \pm 0.04	nd	nd
Cu		0.21 \pm 0.04	0.39 \pm 0.06	nd	nd

*nd- no detectable

IV.3. Factibilidad del uso de metales determinados en estudios de procedencia de vinos mexicanos

En las secciones anteriores se demostró la utilidad de SA, SDM y MEC para la cuantificación de metales seleccionados en este trabajo por MP-AES. La concordancia de los resultados proporcionados por SA con los obtenidos por SDM (Sr, Al, Fe, Rb, Mn, Cr, Cu) y por MEC (K, Na, Mg, Ca) tanto para vino chileno (tabla 26) como para doce vinos mexicanos confirma un buen desempeño analítico de estos tres métodos y una buena exactitud de los resultados. Para fines prácticos, en esta sección se consideran datos obtenidos por el método de adición

de estándar, mismos que se presentan en las tablas 14 y 15 y también, de manera resumida en la Fig. 7.

De acuerdo con los estudios anteriores ^{6,7,30} el más abundante elemento en vinos fue potasio con un intervalo de concentraciones 876 - 3258 mg/L, seguido por sodio (32.7 - 326 mg/L), magnesio (56.6 - 164 mg/L) y calcio (63.9 - 121 mg/L).

Por su parte, se obtuvieron datos interesantes para rubidio; el intervalo de concentraciones en doce vinos fue 0.35 - 6.31 mg/L, pero como se puede observar en la Fig. 16, los vinos guanajuatenses contenían mucho más altas concentraciones respecto a las otras dos regiones vinícolas. El rubidio es un elemento relativamente abundante en la corteza terrestre (decimosexto metal más abundante), pero su distribución no es uniforme.

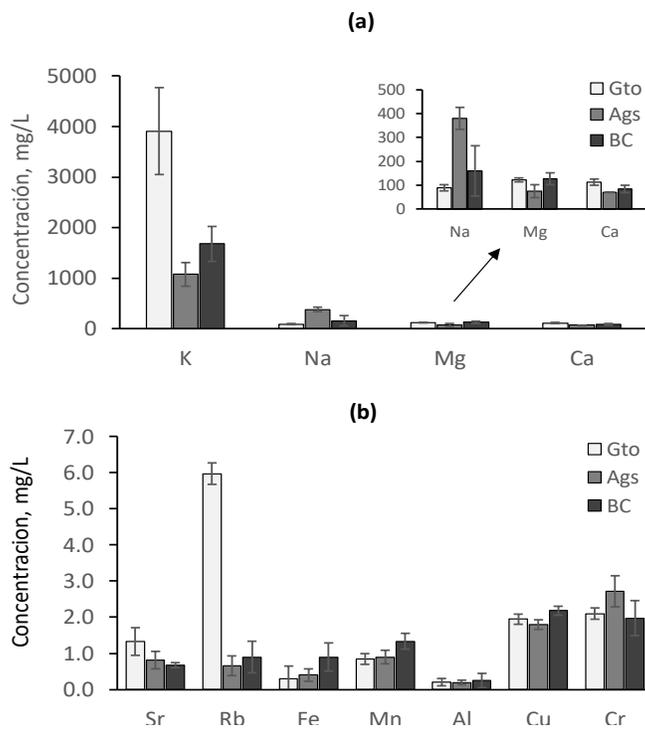


Fig.16 Resultados de determinación de metales mayoritarios (a) y trazas (b) en doce vinos mexicanos (para cada elemento, se presenta promedio de las concentraciones para todos los vinos de una región con respectivos valores de desviación estándar).

Como ejemplo, en suelos europeos como algunas partes de Italia, Portugal y Francia, se reportan altas concentraciones de rubidio (>50 mg/kg)^{31,32}, mientras que en el sur de España, en Polonia, parte de Alemania y norte de Escandinavia, los niveles son mucho más bajos (<3 mg/kg). Aunque no se encontraron datos sobre la distribución de Rb en suelos de México ni en vinos mexicanos, los datos reportados en otros países apuntan que Rb podría ser importante indicador de procedencia de vinos. En particular, los niveles de Rb en vinos elaborados en Polonia fueron < 3 µg/L, de acuerdo con sus bajos contenidos en suelo^{31,32}; se reportaron también importantes diferencias para Rb entre vinos de California (0.57 - 7.83 mg/L) en comparación con los argentinos (0.55 - 2.19 mg/L)⁶.

En cuanto a otros elementos, los niveles de cromo correspondieron al intervalo 1.65 – 2.14 mg/L, mientras que para el estroncio y manganeso las concentraciones fueron más bajas y los intervalos más amplios (0.56 - 1.90 mg/L y 0.69 - 1.60 mg/L, respectivamente); estos valores fueron consistentes con los reportados en otros estudios realizados en diferentes regiones del mundo^{4, 6, 7, 12}. Para los elementos catalogados en vinos como traza^{4, 6, 30, 31}, hierro, aluminio y cobre presentaron intervalos de concentración 0.02 - 1.45 mg/L, 0.09 - 0.58 mg/L y 0.05 - 0.42 mg/L y respectivamente.

En la Fig. 16 se observan claramente diferencias entre contenidos de algunos elementos en tres regiones vinícolas. Los vinos de Guanajuato contenían relativamente altas concentraciones de Rb, K, Sr, Ca y bajos niveles de Na, Fe; en el caso de vinos del Valle de Guadalupe hubo una clara tendencia hacia más elevadas concentraciones de Fe, Cu y a bajas concentraciones de Sr y Cr. Por su parte, los vinos de Aguascalientes presentaban relativamente altas concentraciones de Na, Cr y bajos niveles de K, Mg, Ca y Cu. Las diferencias observadas sugieren que la determinación de metales mayoritarios y traza podría proporcionar datos útiles para la evaluación de procedencia de vinos producidos en México. Para obtener una evidencia más directa de dicha utilidad, se llevó a cabo el análisis multivariante por el método de componentes principales (PCA). Este método permite disminuir la dimensionalidad de los datos mediante los llamados componentes principales que son nuevas coordenadas en el espacio. El algoritmo localiza las muestras (vinos) en nuevas coordenadas y las asocia con parámetros (elementos) que describan de manera eficiente la variabilidad del sistema o, en otras palabras, diferencias entre las muestras. Para

construir el modelo PCA, se utilizaron las concentraciones de cada uno de los elementos encontradas en doce muestras de vino provenientes de tres regiones vinícolas y el modelo obtenido se presenta en la Fig. 17.

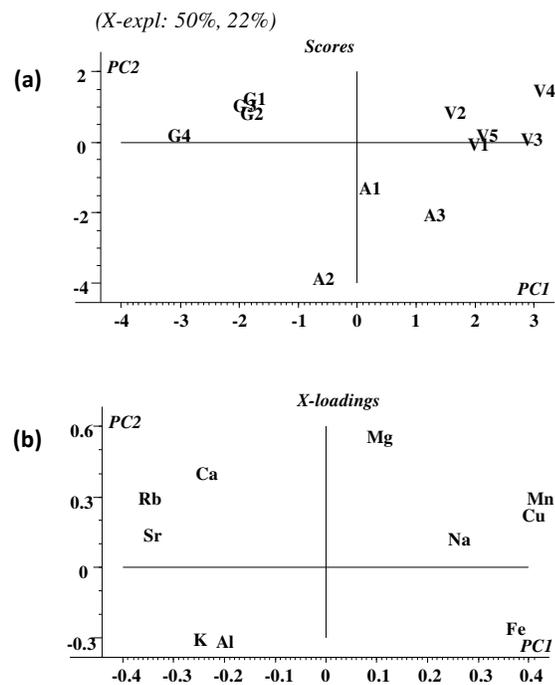


Fig.17 Modelo PCA obtenido para elementos determinados en doce vinos mexicanos (G1-G4 – región Guanajuato, A1-A3 – región Aguascalientes, V1-V5 – Valle de Guadalupe. a) Distribución de muestras (gráfica scores) b) Distribución de variables (gráfica X-loadings)

En la Fig. 17-a se presenta la distribución de muestras en las coordenadas de dos primeros componentes principales (PC1 y PC2), mismos que describen en total 72% de la variabilidad del sistema (50% corresponde a PC1 y 22% a PC2). En la gráfica de “scores” (Fig. 17-a) se observa agrupaciones de vinos provenientes de la misma región vinícola; dichas agrupaciones son más evidentes para Guanajuato y Valle de Guadalupe mientras que las muestras de Aguascalientes son más dispersas. La Fig. 17-b muestra la gráfica de distribución de variables en las mismas coordenadas PC1 y PC2. Al comparar las dos gráficas, queda

claro que Rb, Ca y Sr son las variables que se asocian con vinos guanajuatenses y permiten distinguirlos de las otras dos regiones vinícolas; tanto las muestras como los elementos se localizan en el cuadrante determinado por valores negativos de PC1 y valores positivos de PC2. Por otro lado, los productos de Valle de Guadalupe se asocian con altos niveles de Mg, Mn, Cu y Na (cuadrante correspondiente a valores positivos de PC1 y PC2). En cuanto a los tres elementos restantes, estos parecen ser importantes en vinos de Aguascalientes si se considera el valor de PC2; sin embargo, para K y Al los valores negativos de PC1 apuntan a su contribución en agrupación de vinos guanajuatenses, mientras valor positivo de PC1 para Fe, indica importancia de este elemento en vinos de Valle de Guadalupe.

Cabe señalar que el número de muestras analizadas no es suficiente para realizar el análisis de discriminación requerido para asignar la procedencia a un vino desconocido, pero el modelo PCA indica una potencial utilidad de los niveles de metales determinados en este trabajo para tal fin.

V. Conclusiones

El trabajo de tesis ha sido centrado en la aplicación de la técnica MP-AES en el análisis de vinos mexicanos. Debido a los alcances de esta técnica en términos de capacidad multi elemental, pocas interferencias químicas y relativamente buena tolerancia del sistema de introducción de muestra a sólidos totales, se pudieron determinar hasta cinco elementos en una sola corrida después de una simple dilución de muestra. Por otro lado, el poder de detección del MP-AES limitó la cantidad de los elementos de potencial interés a aquellos mayoritarios y algunos traza. Con el fin de asegurar la concentración de cada analito dentro del intervalo de linealidad y al mismo tiempo introducir al plasma la mínima cantidad posible de matriz de la muestra, se establecieron cuatro grupos de elementos correspondientes a los siguientes factores de dilución: 1:100 (K), 1:50 (Mg, Na, Ca), 1:10 (Rb, Sr, Mn, Al, Fe) y 1:4 (Cu, Cr). Utilizando un vino tinto chileno, se realizó el ajuste de las condiciones experimentales e instrumentales que aseguraron la adquisición de las señales libres de interferencias. Sin embargo, desde los primeros experimentos quedó claro que la calibración externa no es un método de cuantificación adecuado debido a la composición química de vinos compleja y cambiante entre muestras, lo que provocó variaciones en línea base e

impidió una buena integración de las señales. Es por ello, que se examinaron otros métodos de cuantificación: el ampliamente utilizado método de adición de estándar (SA) y dos más recientes; el de dilución de estándar (SDA) y de calibración multi-energía (MEC). En el caso de SDA, se propuso una modificación del método original logrando mejorar su desempeño analítico (SDM). Utilizando la misma muestra de vino chileno, se establecieron los protocolos para preparación de muestra, se definieron las concentraciones para adición de estándares, así como las condiciones de adquisición de señales; tanto los protocolos como los resultados obtenidos para el vino chileno fueron evaluados comparativamente. Se llegó a la conclusión que, como alternativa al método SA considerado como el más confiable, pueden recomendarse los métodos de SDM para elementos traza y MEC para elementos mayoritarios. Las importantes ventajas de los métodos propuestos son: (i) no requerimiento del ajuste de línea base y (ii) protocolos más simples con menos soluciones preparadas por cada muestra respecto a SA. En el caso de SDM, hay que señalar la ventaja adicional relacionada con el uso del estándar interno (ytrio).

Comentado [K1]:

Una vez seleccionados los tres métodos de cuantificación y establecidos los protocolos, se llevó a cabo el análisis de doce vinos procedentes de tres regiones vinícolas de México: Guanajuato, Aguascalientes y Valle de Guadalupe. La concordancia de los resultados entre SA y SDM para elementos traza y entre SA y MEC para elementos mayoritarios fue indicativa de la buena exactitud de estos resultados.

Se observaron importantes diferencias entre concentraciones de algunos elementos en vinos de tres regiones. El análisis multivariante PCA confirmó la factibilidad del uso de metales mayoritarios y traza como indicadores de procedencia de vinos mexicanos. En particular, altas concentraciones de Rb, Ca y Sr fueron asociados con vinos guanajuatenses, la región de Valle de Guadalupe aparentemente se caracteriza por elevadas concentraciones de Mg, Mn, Cu y Na, mientras que Al y Fe parecían ser asociados con los vinos de Aguascalientes. Debido a relativamente pocas muestras analizadas, no era posible realizar la discriminación o clasificación de vinos en función de su procedencia, pero los resultados obtenidos son alentadores para un posible trabajo futuro.

La presencia de altos niveles de Rb en vinos guanajuatenses es muy intrigante y abre un nuevo tema de investigación enfocado a la distribución de este elemento en suelos de la región, su posible biodisponibilidad e impacto en las plantas.

Finalmente, es necesario enfatizar que la técnica MP-AES es muy atractiva en el análisis de largas series de muestras debido a simples procedimientos, rapidez de adquisición de los datos y el costo de análisis mucho más bajo en comparación con cualquier otra técnica de espectrometría atómica. MP-AES es una herramienta relativamente reciente con escaso desarrollo metodológico documentado; en este trabajo de tesis, se demostró que MP-AES en aplicación al análisis de vinos proporciona datos útiles para evaluar la procedencia de vinos.

VI. Bibliografía

- [1] B. Vyset, D. Vummiti, P. Royce, C. Taylord, C. Kamalaa, M. Satyanarayanan, P. Karb, K. Subramanyama, A. Rajub, K. Abburi, Analysis of Geochemical Samples by Microwave Plasma-AES, Atomic Spectroscopy, 35 (2014) 65-78
- [2] Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy (MP-AES) application eHandbook Agilent Technologies.
- [3] S. Karlsson, V. Sjöberg, A. Ogar, Comparison of MPAES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of sunflower (*Helianthus annuus*), Talanta 135 (2015) 124–132.
- [4] P. Phol, What do metals tell about wine? Trends in Analytical Chemistry, 26 (2007) 941-949.
- [5] G. Grindlaya, J. Mora, L. Grasa, M. Vollebregtb, Atomic spectrometry methods for wine analysis: A critical evaluation and discussion of recent applications, Analytica Chimica Acta 691 (2011) 18-32.
- [6] B. Tariba, Metals in wine- impact on wine quality and health outcomes, Biol Trace Elem Res 144 (2011) 143–156.
- [7] J. Nelson, H. Hopfer, G. Gilleland, D. Cuthbertson, R. Boulton, S.E. Ebeler, Elemental profiling of Malbec wines made under controlled conditions by Microwave Plasma Atomic Emission Spectroscopy, Am J Enol Viticult, DOI: 10.5344/ajev.2015.14120 (2015).
- [8] International Code of Oenological Practices of the International Organization of Vine and Wine www.oiv.int/public/medias/3741/e-code-annex-maximum-acceptable-limits.pdf.
- [9] I. Esparza, I. Salinas, I. Caballero, C. Santamaría, I. Calvo, J.M. Garcia-Minac, J.M. Fernandez, Evolution of metal and polyphenol content over a 1-year period of vinification: sample fractionation and correlation between metals and anthocyanins, Analytica Chimica Acta 524 (2004) 215–224.
- [10] M. A. Brescia, V. Caldarola, A. De Giglio, D. Benedetti, F. P. Fanizzi, A. Saccod, Characterization of the geographical origin of Italian red wines based on traditional and nuclear magnetic resonance spectrometric determinations, Analytica Chimica Acta 458 (2002) 177-186.

- [11-3] Nuevo Plasma de Emisión por Microondas MPAES 4100, Ventajas de la técnica y ejemplos de aplicaciones, Agilent Technologies.
https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/Public/2_Nuevo%20Plasma%20de%20Emision%20MPAES%204100_Val.pdf
- [12] K. Pyrzynska, Chemical speciation and fractionation of metals in wine, *Chemical Speciation & Bioavailability* 26 (2014) 1-9.
- [13] I. Karadjova, B. Izgi, S. Gucer, Fractionation and speciation of Cu, Zn and Fe in wine samples by atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B* 57 (2002) 581–590.
- [14] T. Stafilov, I. Karadjova, Methods for determination and speciation of trace elements in wine, *International Journal of Pure and Applied Chemistry* 1(2) (2006) 273-305.
- [15] M.J. Latorre, C. Garcia-Jares, B. Medina, C. Herrero, Pattern Recognition Analysis Applied to Classification of Wines from Galicia (Northwestern Spain) with Certified Brand of Origin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42 (1994) 1451-1455.
- [16] S. Rebolo, R.M. Pena, M.J. Latorre, S. Garcia, A.M. Botana, C. Herrero, Characterisation of Galician (NW Spain) Ribeira Sacra wines using pattern recognition analysis, *Analytica Chimica Acta* 417 (2000) 211-220.
- [17] A. Jos, I. Moreno, A.G. Gonzalez, G. Repetto, A.M. Camean, Differentiation of sparkling wines (cava and champagne) according to their mineral content, *Talanta* 63 (2004) 377-382.
- [18] S. Frias, J.P. Perez Trujillo, E.M. Pena, J.E. Conde, Classification and differentiation of bottled sweet wines of Canary Islands (Spain) by their metallic content, *European Food Research and Technology*, 213 (2001) 145-149.
- [19] W. Boschetti, R.T. Rampazzo, M.B. Dessuy, M.G.R. Vale, A. de Oliveira Rios, P. Hertz, V. Manfroi, P.G. Celso, M.F. Ferrão, Detection of the origin of Brazilian wines based on the determination of only four elements using high-resolution continuum source flame AAS, *Talanta* 111 (2013) 147-155.
- [20] C. Diaz, J.E. Conde, D. Estevez, S.J. Perez Olivero, J.P. Perez Trujillo, Application of Multivariate Analysis and Artificial Neural Networks for the Differentiation of Red Wines from the Canary Islands According to the Island of Origin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (2003) 4303-4307.

- [21] P. Kment, M. Mihaljevic, V. Ettler, O. Sebek, L. Strnad, L. Rohlova, Differentiation of Czech wines using multielement composition – A comparison with vineyard soil, *Food Chemistry* 91 (2005) 157–165.
- [22] R.M. Pena, M.J. Latorre, S. Garcia, A.M. Botana, C. Herrero, Pattern recognition analysis applied to classification of Galician (NW Spain) wines with Certified Brand of Origin Ribeira Sacra, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79 (1999) 2052-2056.
- [23] J. Sperkova, M. Suchanek, Multivariate classification of wines from different Bohemian regions (Czech Republic), *Food Chemistry* 93 (2005) 659–663.
- [24] L.-X. Sun, K. Danzer, G. Thiel, Classification of wine samples by means of artificial neural networks and discrimination analytical methods, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 359 (1997) 143-149.
- [25] J.D. Greenough, L.M. Mallory-Greenough¹, B.J. Fryer, *Geology and Wine 9: Regional Trace Element Fingerprinting of Canadian Wines*, *Geoscience Canada*, 32 (2005) 129-137.
- [26] A. González, A. Llorens, M.L. Cervera, S. Armenta, M. de la Guardia, Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia, *Food Chemistry* 112 (2009) 26–34.
- [27] W.B. Jones, G.L. Donati, C.P. Calloway, B.T. Jones, Standard Dilution Analysis, *Analytical Chemistry* 87 (2015) 2321–2327.
- [28] D.A. Goncalves, T. McSweeney, M.C. Santos, B.T. Jones, George L. Donati, Standard dilution analysis of beverages by microwave-induced plasma optical emission spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 909 (2016) 24-29.
- [29] A. Virgilio, D. A. Gonçalves, T. McSweeney, J. A. G. Neto, J. A. N´obrega and G. L. Donati, Multi-energy calibration applied to atomic spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, (2017) 82, 1–6.
- [30] Ziola-Frankowska A, Frankowski M, Determination of metals and metalloids in wine using inductively coupled plasma optical emission spectrometry and mini-torch *Anal. Food Anal Methods* (2017) 10, 180-190
- [31] Nergel P, Ladenberger A, Reimann C, Birke M, Sadeghi M, Distribution of Rb, Ga and Cs in agricultural land soils at European continental scale (GEMS), Implications for weathering conditions and provenance. *Chem Geol* (2018), 479:188-203.

[32] Karasinski J, Torres Elguera JC, Gonzalez Ibarra AA, Wrobel K, Bulska E, Wrobel K, Comparative Evaluation of Red Wine from Various European Regions Using Mass Spectrometry Tools, *Anal. Anal Lett* (2018) 51 (16):2645-2659.