

MEJORES PRÁCTICAS
EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS
DE COMIDA PARA BEBÉ PARA
DETERMINACIÓN DE METALES TRAZA



MILESTONE
H E L P I N G
C H E M I S T S

Declaración de contribución de autoría

Joaquim A. Nóbrega¹ y Diego Carnaroglio²

Conceptualización, Escritura – manuscrito original, revisión y supervisión

Matteo Volpi², Gianpaolo Rota² y Mirco Rossetti²

Metodología y análisis formal

Andrea Fenili², Serena Lorenzi² y Giulio Colnaghi²

Organización y edición

¹*Departamento de Química, Universidad Federal de São Carlos;*

²*Milestone Srl.*

I Agradecimientos

A Milestone Srl le gustaría agradecer a Ken Fredeen por el asesoramiento científico del proyecto y Laurent Naels por su contribución a los estudios de recuperación.

“

This planet is all we have. If we spoil it, our children will have to pay to clean up the mess we make. Our own body is all we have. If we abuse it, or in our ignorance feed it badly, then one day there will be a price to pay. It is no longer good enough to say we can do nothing, that we must leave the wellbeing of our planet to those who claim to be its guardians. Similarly, when it comes to knowing about the minerals that our body needs, we cannot simply leave it to doctors and dieticians to correct things when they go wrong, because our eating habits are faulty.

”

John Emsley, Nature's Building Blocks.

An A-Z Guide to the Elements, Oxford University Press, Oxford, 2001

Mejores Prácticas en la Preparación de Muestras de Comida para Bebé para la Determinación de Metales Traza

| | |
|--|----|
| 1 Seguridad de la comida para bebé: el impacto en la salud de los metales pesados y la importancia de su determinación a nivel traza | 9 |
| 2 Preparación de muestra Parte I: Estrategias limpias | 13 |
| 3 Preparación de muestra Parte II: Preparación de muestra asistida por microondas adaptada para un “plan lo más cercano a cero” | 18 |
| » 3.1 ultraWAVE 3 procedimiento para el plan “más cercano a cero” | 20 |
| » 3.2 ETHOS UP procedimiento para un plan “lo más cercano a cero” | 27 |
| » 3.3 Consideraciones finales sobre las metodologías para la preparación de muestra | 30 |
| 4 Observaciones finales: un flujo de trabajo para la preparación de muestras integrado, robusto y más verde para análisis de metales traza | 32 |
| 5 Referencias | 35 |



1. Seguridad de la comida para bebé: el impacto en la salud de los metales pesados y la importancia de su determinación a nivel traza

La comida es el combustible para la vida y nuestra salud depende de nuestras elecciones considerando qué alimentos comer y cuáles evitar. Mantener un balance saludable en nuestro cuerpo requiere consideraciones cuidadosas de la calidad y cantidad de los alimentos que elegimos. Obviamente, nosotros somos responsables de nuestras elecciones y podemos mejorarlas al tener información química y nutricional disponible. Las elecciones alimentarias son dependientes de la disponibilidad, costos, hábitos culturales, etc. Pero es también importante contar con información acerca del contenido de proteínas, grasas, carbohidratos y minerales. Existen varios elementos químicos que necesitamos en altas cantidades, tales como calcio, fósforo, potasio, azufre, sodio, cloro y magnesio. Existen otros que, a pesar de ser esenciales, los necesitamos en menor cantidad, como el hierro, zinc, cobre, manganeso, yodo y selenio. Adicionalmente, hay elementos que no debemos ingerir, como el arsénico, cadmio, plomo y mercurio. Eliminar estos últimos elementos tanto como sea posible es crítico para la salud de los adultos e incluso más crítico para la salud de los infantes.

33

As

El arsénico es un elemento que está notoriamente relacionado con un veneno mortal [1]. Este elemento actúa bloqueando la acción de algunas enzimas. Los síntomas de envenenamiento por arsénico son vómito, cólicos, diarrea y deshidratación. Dosis altas pueden causar falla cardíaca y la muerte.

48

Cd

El cadmio también interactúa con enzimas, como la metalotioneína, la cual contiene azufre y puede acumularse en los riñones. Si los niveles se vuelven muy altos, el sistema de filtración del cuerpo se daña y puede ocurrir una falla renal. La exposición continua al cadmio también debilita los huesos y articulaciones.

82

Pb

Los efectos tóxicos provocados por el plomo son bien conocidos y existe una larga historia de contaminación causada por este elemento. Por ejemplo, hay descripciones históricas de contaminación por plomo descritas por los griegos y romanos. Atkins presentó una discusión interesante acerca del plomo en la comida, resaltando que los romanos usaban el plomo en aplicaciones variadas, desde tuberías de agua hasta cubiertos y cosméticos [2]. De acuerdo con Whitney y Rolfes, "al igual que otros minerales, el plomo es indestructible... Químicamente es similar a nutrientes minerales como el hierro, calcio y zinc, el plomo los desplaza de algunas posiciones que normalmente ocupan, pero es entonces cuando es incapaz de sustituir sus roles... El plomo daña muchos sistemas del cuerpo, particularmente el sistema nervioso, riñones y médula ósea... Entre más grande es la exposición, mayores son los efectos dañinos." [3].



80
Hg

Finalmente, el mercurio es un elemento tóxico ubicuo con efectos críticos en varios órganos, incluyendo el sistema nervioso central. El envenenamiento por mercurio provoca varios síntomas físicos incluyendo dolor de cabeza, náuseas, vómito, dolor estomacal, diarrea y sabor metálico en la boca. De acuerdo con Emsley, el envenenamiento por cantidades pequeñas por un período de tiempo largo, p. ej. Exposición crónica a mercurio, provoca fatiga, debilidad, pérdida de la memoria e insomnio [4].

Las toxicidades de estos elementos son dependientes de su forma química. Por ejemplo, es bien conocido que las formas inorgánicas de arsénico (As III, As V), son más tóxicas que los compuestos de organoarsénico, como la arsenobetaina y arseno-azúcares. Para el mercurio, todas las formas son tóxicas, pero las formas más tóxicas son los compuestos órgano mercurícos, los cuales provocaron el desastre de la Bahía de Minamata en Japón en los años 1950s. ¿Cómo estamos expuestos a estos elementos críticos? Basados los registros de contaminación antiguos, este problema no es nuevo, pero claro que hoy en día tenemos una mejor educación y un gran flujo de información para ayudarnos a medir la extensión del problema y remediarlo. No es una exageración el decir que estos elementos están en todos lados y que han tenido aplicaciones inesperadas y usos tecnológicos. El uso de arsénico a lo largo de la historia va desde medicinas (solución del Dr. Fowler) hasta papel tapiz verde (verde de Scheele – arsenito de cobre). Este último compuesto fue incluso utilizado para dar color a dulces y hacerlos más atractivos [1]. El arsénico también ha sido ampliamente utilizado en la agricultura. El cadmio es usado en baterías y también es un contaminante de algunas rocas fosfóricas usadas en muchos fertilizantes. Emsley mencionó que la roca fosfórica de Marruecos contiene más de 50 g de Cd por tonelada [4]. El plomo y arsénico también se encuentran en muchos fertilizantes. Desafortunadamente, el plomo y mercurio están esencialmente en todas partes.



El plomo está presente en y puede lixiviarse de tuberías de agua. Usted muy seguramente ha escuchado de la crisis de plomo en el sistema de agua de Flint en el 2014 en los Estados Unidos [2]. Whitney y Rofles afirmaron que “todos los alimentos contienen algo de plomo” y “el envenenamiento por plomo en infantes a menudo proviene de fórmula infantil hecha con agua contaminada” [3]. Ellos recomiendan que “La primera agua que sale de la tubería cada día es la que más alta concentración de plomo tiene, por lo tanto, una persona que vive en una casa con tuberías viejas con soldadura de plomo debe de dejar el agua correr por algunos minutos antes de beberla o preparar fórmula infantil con ella.” [3]. Es también importante recordar las décadas de uso del tetraetilo de plomo en gasolina automotriz y el uso de carbonato de plomo como pigmento base para pinturas, recubrimientos e incluso cosméticos (Figura 1).

El mercurio es también ampliamente utilizado, hoy en día, todavía es usado en la minería de oro. En resumen, cuando consideramos la ocurrencia natural en la corteza terrestre, aplicaciones industriales, usos tecnológicos y más, no sorprende encontrar estos elementos en la cadena alimenticia. Sin embargo; a pesar de no ser sorpresivos, es ciertamente preocupante. Si acostumbramos leer acerca de seguridad alimentaria, sabemos que el arroz puede contener arsénico, el cadmio puede presentarse en cereales y los compuestos de mercurio son comunes en pescados y mariscos. Todos estos elementos son críticos si están presentes en los alimentos, e incluso peor si estos alimentos con usados para alimentar bebés y niños. **“El Acta para la Seguridad de los Alimentos para Bebé del 2021”**, un nuevo proyecto de ley del Congreso de los Estados Unidos

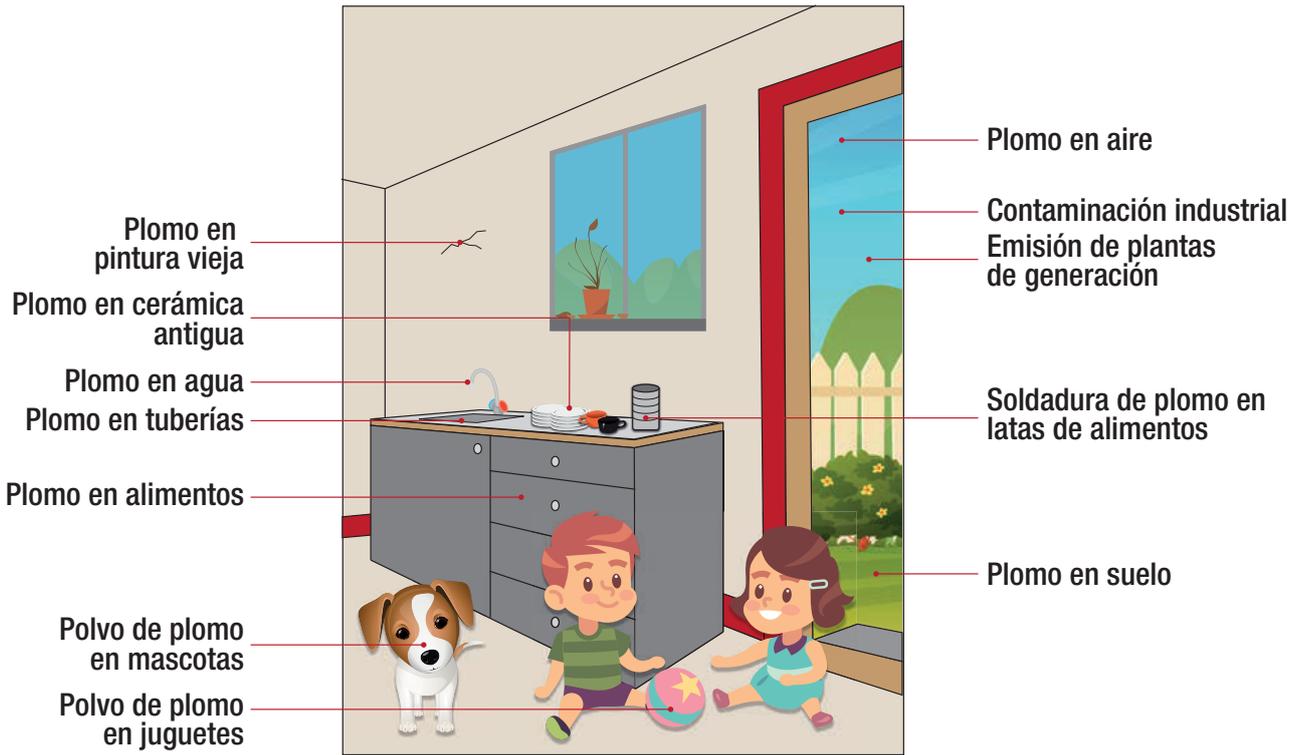


Figura 1. Fuentes potenciales de exposición de plomo

Versión modificada de la figura reportada en la referencia [3]

define “la comida para infante y lactante” como la comida destinada a venderse para consumo de niños de hasta 36 meses de edad, incluyendo la fórmula infantil. Se menciona que: “El arsénico inorgánico, plomo, cadmio y mercurio son metales pesados tóxicos. La Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Organización Mundial de la Salud los han declarado peligrosos para la salud humana, particularmente para niños y bebés, quienes son los más vulnerables a sus efectos neurotóxicos. Inclusive bajos niveles de exposición pueden causar descensos permanentes en IQ, disminución en la productividad económica futura e incremento en el riesgo de comportamientos criminales y antisociales futuros.” De acuerdo con un científico de la FDA, dado que los niños a partir de los 36 meses normalmente comen la misma comida que los adultos, esta Acta de Seguridad podría aplicar para casi cualquier tipo de alimento. Basado en este trasfondo, “El Acta para la Seguridad de los Alimentos para Bebé del 2021” requeriría a los fabricantes y la FDA tomar acción al:

- Establecer niveles máximos de arsénico inorgánico (10 ppb, 15 ppb para cereal), plomo (5 ppb, 10 ppb para cereal), cadmio (5 ppb, 10 ppb para cereal) y mercurio (2 ppb) permitidos en comida para bebé que los fabricantes deberían cumplir en el transcurso de un año.
- Requerir que esos niveles sean disminuidos aún más dentro de dos años a través de una guía de la FDA y de nuevo después de tres años a través de regulación.
- Requerir a los fabricantes probar sus productos finales – no solo los ingredientes – para metales pesados tóxicos (al análisis de ingredientes subestima significativamente los niveles de metales pesados tóxicos).
- Requerir a los fabricantes publicar los resultados de sus análisis de productos en línea dos veces por año.
- Establecer una campaña de concientización pública a través del CDC para resaltar los riesgos de los metales pesados tóxicos en comida para bebé.
- Autorizar \$50 millones de dólares para investigación en métodos de agricultura para reducir los metales pesados tóxicos en cultivos.



En este punto, está claro que tenemos dos importantes aliados para mejorar la seguridad alimentaria: educación y legislación. Los siguientes pasos a seguir serían lógicamente incrementar la información acerca de la composición de los alimentos y, por supuesto, determinar las concentraciones de estos contaminantes elementales. Tal como está establecido por la nueva legislación: “Requerir a los productores llevar a cabo un análisis representativo de los productos finales para metales pesados tóxicos como parte de sus esfuerzos de control preventivo de riesgos” y diseminar información; “Requerir a los productores hacer públicos sus resultados en línea, dos veces por año, en un reporte de resultados resumidos de los análisis de su producto y sus esfuerzos para monitorear y verificar la efectividad de sus controles de prevención de riesgos”. Una cita clásica de Lord Kelvin dice: “Cuando puedes medir de lo que estás hablando, y expresarlo en números, sabes algo acerca de eso...” Medir es conocer. De acuerdo con la nueva legislación debemos de ser capaces de medir concentraciones de As, cd, Hg y Pb en niveles de 2 a 15 µg/kg. También se menciona que estos niveles deben de ir disminuyendo: “Requerir que esos niveles sean disminuidos aún más dentro de dos años a través de una guía de la FDA, y de nuevo después de tres años a través de regulaciones”. La Administración de Alimentos y Medicamentos está trabajando en un plan “lo más cercano a cero”. Pero, ¿Qué “tan cercano a cero” podemos medir realísticamente? ¿Cómo podemos confiar en datos “lo más cercanos a cero”? Hoy en día, podemos seguir construyendo sobre el aforismo de Lord Kelvin: medir precisamente es volverse capaz de actuar y resolver problemas críticos en todas las áreas. Cuando hablamos acerca de la seguridad de la comida para bebé, estamos lidiando con un problema de salud pública absolutamente crítico con complicaciones claras en nuestro futuro como sociedad saludable. Solo como un recordatorio acerca de qué tan lejos nos ha llevado la ciencia, en una nota publicada en 1994 se citó que la especificación establecida por la FDA para plomo en 1958 era de ≤ 10 mg/kg! Y que los nuevos límites serían 0.5 mg/kg para ingredientes de alimentos consumidos en cantidades moderadas y 0.1 mg/kg para ingredientes consumidos en grandes cantidades [5]. Los químicos analíticos han desarrollado estrategias poderosas para cuantificar los elementos traza. Claro está, los métodos instrumentales modernos,

Por ejemplo, espectrometría de masas por plasma inductivamente acoplado, son importantes para cumplir estas demandas analíticas y su uso se incrementa considerablemente, como ejemplo, la legislación reciente relacionada con contaminantes en medicamentos [6]. Sin embargo; a pesar de tener instrumentación apropiada disponible, necesitamos reforzar la cultura del analista sobre trabajar con concentraciones traza y educar a la comunidad acerca de las fuentes de contaminación en procedimientos de análisis típicas. Como hemos difundido anteriormente, y reforzaremos aquí: “Piense en Blanco” y mantenga un control cuidadoso de todas sus etapas analíticas [7]. Consecuentemente, una vez más la preparación de muestra será mostrada como un paso fundamental para obtener resultados exactos y precisos en el análisis traza. Algunos puntos a los que debemos poner mucha atención incluyen:

- Pureza de los reactivos, y cómo pueden ser fácilmente purificados.
- Contaminación y limpieza de los materiales del laboratorio.
- Procedimientos de preparación de muestras que involucran digestión de alta cantidad de muestras usando bajos volúmenes de ácido nítrico purificado.
- Procedimientos analíticos con menor número de etapas sucesivas.

Todos estos puntos serán mencionados en las siguientes secciones y demostraremos cómo los procedimientos optimizados pueden ser desarrollados exitosamente y aplicados para cubrir las demandas de un “plan lo más cercano a cero”.



2.

Preparación de muestra Parte I: Estrategias limpias

Alcanzar el éxito en el análisis elemental traza está estrictamente relacionado a la aplicación de procedimientos aptos de preparación de muestras llevados a cabo a través de un estricto control del blanco analítico. Hoy en día, las mejores condiciones para la preparación de muestras para análisis de elementos traza están establecidas utilizando la digestión ácida asistida por microondas llevada a cabo en vasos cerrados o cámaras de reacción. Claramente, debemos estar conscientes de todos los aspectos involucrados en el procedimiento analítico, por ejemplo, los vasos en los que se lleva a cabo la digestión deben estar hechos con materiales aptos y deben ser limpiados apropiadamente, se deben utilizar reactivos con la pureza apropiada y las fuentes de contaminación deben ser controladas.



Figura 2. duoPUR de Milestone, sistema de destilación por sub-ebullición.

Los procedimientos a la medida deben de involucrar pocos pasos analíticos e idealmente la transferencia de soluciones entre vasos debe ser evitada, reducida o simplificada tanto como sea posible. Además, para determinar elementos presentes en concentraciones cada vez más bajas, un procedimiento analítico ideal debe ser capaz de digerir altas cantidades de muestras usando un mínimo volumen de ácido nítrico. Afortunadamente, varias mejoras se han propuesto en los últimos años permitiéndonos cumplir con estas demandas y algunos aspectos críticos se discuten a continuación. Los ácidos concentrados de alta pureza son costosos, pero también sabemos que estos reactivos pueden ser fácilmente purificados en el laboratorio usando destilación por sub-ebullición [8]. Este es un procedimiento simple y efectivo para producir reactivos de alta pureza sin requerir un involucramiento extensivo de personal especializado (Figura 2). Como se discutió previamente [9], la destilación por sub-ebullición utiliza calentamiento infrarrojo sin contacto para evaporar la superficie del líquido a una temperatura típicamente 20 °C por debajo del punto de ebullición del reactivo. Consecuentemente, una evaporación gentil de la superficie durante la destilación por sub-ebullición previene la formación de aerosoles o gotas como en la destilación tradicional que pudieran contener contaminantes (Figura 3) y por lo tanto produce destilados de alta pureza (Tabla 1). Este procedimiento es fácilmente aplicado a la producción de reactivos de alta pureza comúnmente utilizados. Milestone ha desarrollado un equipo conveniente, llamado duoPUR, que es capaz de recibir HNO₃ y HCl grado reactivo y fácilmente purificarlos en el laboratorio y bajo demanda (una versión dedicada para HF está también disponible, llamada subCLEAN).



Figura 3. Procesos de evaporación por ebullición y sub-ebullición

Tabla 1. Contaminación por metales traza (ng/l) en ácido nítrico producido por destilación por distribución en columna de cuarzo.

| | Ácido Nítrico – Especificación Grado ACS (ng/l) | Ácido Nítrico – destilación por sub-ebullición (ng/l) |
|-----------|---|---|
| As | < 10000 | < 100 |
| Ba | < 10000 | < 50 |
| Cd | < 10000 | < 5 |
| Cr | < 20000 | < 20 |
| Co | < 10000 | < 5 |
| Cu | < 10000 | < 1000 |
| Hg | < 10000 | <10 |
| Mn | < 10000 | < 100 |
| Mo | < 20000 | < 10 |
| Ni | < 20000 | < 500 |
| Pb | < 10000 | < 20 |
| Sb | < 10000 | < 10 |
| Se | < 10000 | < 500 |
| Sr | < 10000 | < 500 |
| Te | < 10000 | < 50 |
| V | < 10000 | < 10 |
| W | < 10000 | < 10 |

El duoPUR, dependiendo de las condiciones de operación utilizadas, produce entre 30 a 140 ml por hora de HNO₃ y 20 a 130 ml por hora de HCl, como se muestra en la Tabla 2. Consideramos que este equipo es esencial laboratorios de análisis elemental traza que requieren de un suministro estable de ácidos purificados.

Además de su simplicidad, es importante mencionar que hay ahorros en costos significativos cuando se usa duoPUR comparado a comprar reactivos de alta pureza producidos comercialmente [10]. Esto es demostrado en el siguiente ejemplo considerando un laboratorio aplicando el método



US FDA EAM 4.7 y tomando en consideración los ácidos adicionales utilizados para los estándares de calibración, muestras QC, dilución de muestra y enjuagues entre muestras (todos los costos se proveen como estimados para propósitos de ejemplo): Si un laboratorio procesa 200 muestras por mes usando un promedio de 18 ml de ácido nítrico ultrapuro (Merck $\geq 60\%$, €1520 por litro) por muestra analizada, usará 3.6 l de ácido ultrapuro a un costo de aproximadamente €5,472 por mes. Por el contrario, el ácido grado reactivo (Merck, react. ISO, Ph. Eur.) costaría solamente aproximadamente €144 por mes (€40 por litro). Al destilar este ácido de menor grado, se ahorrarían cada mes €5,328.



Perspectiva a futuro – Recientemente, la posibilidad de repurificar ácidos contaminados fue demostrada por Mello et al. [11]. Estos autores han demostrado cómo digestados de ácidos pueden ser reciclados y reutilizados para más digestiones sin comprometer la exactitud de los análisis. Se concluyó que la destilación por sub-ebullición minimiza tanto el uso de ácidos y la generación de desechos, además de ser completamente compatible con los principios de la química verde al reducir-reusar-reciclar ácido sin usar grandes cantidades de energía u horas-hombre.

Con la disponibilidad de ácidos de alta pureza asegurada, los siguientes pasos son seleccionar los vasos de digestión apropiados que sean compatibles con los requisitos del análisis elemental traza, y definir estrategias para limpiar apropiadamente los vasos de digestión entre corridas. Recipientes desechables simples de tipo vial pueden ser utilizados para muchos análisis de rutina que no tienen requisitos astringentes para la determinación de elementos traza. Sin embargo; cuando tratamos con el análisis traza en sus niveles más bajos, los mejores resultados son alcanzados usando recipientes hechos de cuarzo o TFM-PTFE. Como un principio general en el análisis traza, podemos asumir que todos los receptáculos y piezas auxiliares que están en contacto con las muestras deben ser limpiados antes de ser usados, pero es importante también llevar a cabo mediciones de blancos en todos los procesos para checar cualquier nivel de contaminación. Los análisis de múltiples blancos son tan importantes como el análisis de muestras cuando se trabaja en el análisis de elementos traza. Tradicionalmente, los vasos de digestión son limpiados por inmersión por aproximadamente 12 h en un baño ácido. Sin embargo; esta aproximación es a menudo no suficiente cuando los analitos a determinar se encuentran en concentraciones traza más bajas, tal como se espera con el As, Cd, Pb y Hg en alimentos para bebé. La limpieza más efectiva de los vasos de digestión se alcanza al usar vapor de ácido para lixiviar los metales contaminantes de las paredes de los vasos. Milestone ha desarrollado un equipo práctico para llevar a cabo este procedimiento

Tabla 2. Tazas de destilación típicas para duoPUR para HNO_3 y HCl en ml/h basado en ajustes de potencia de infrarrojos variables (expresados en porcentaje, modo de columna doble)

| Destilación por sub-ebullición de 500 ml de HNO_3 | | | | | |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|
| Potencia | 20% | 50% | 55% | 60% | 65% |
| Taza de destilación por sub-ebullición de HNO_3 | 30 mL/h | 100 mL/h | 110 mL/h | 130 mL/h | 140 mL/h |

| Destilación por sub-ebullición de 500 ml de HCl | | | | | | |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Potencia | 15% | 30% | 35% | 45% | 50% | 60% |
| Taza de destilación por sub-ebullición de HCl | 20 mL/h | 60 mL/h | 64 mL/h | 90 mL/h | 110 mL/h | 130 mL/h |

de una manera automatizada llamado traceCLEAN (Figura 4). Una vez que los vasos son cargados en el sistema, el tiempo y la temperatura requeridos para la limpieza son simplemente introducidos en el controlador del traceCLEAN y entonces el vapor ácido destilado recién generado es continuamente recirculado dentro de la unidad sellada para limpiar los vasos. El uso de traceCLEAN también resulta en una reducción significativa del consumo de ácido típicamente utilizado para procedimientos de limpieza. El sistema típicamente consume aproximadamente 500 ml de HNO₃ (grado técnico) para 20 ciclos de limpieza, lo cual colectivamente puede limpiar más de mil viales (cálculo basado en viales de 15 ml para ultraWAVE 3).



Figura 4. traceCLEAN de Milestone - sistema de limpieza con vapor de ácido

Una rutina práctica de laboratorio fue simulada para demostrar la aplicación del traceCLEAN para la limpieza de viales y vasos entre lotes de muestras. En esta prueba, leche en polvo (0.5 g), fue enriquecida a un nivel alto de concentración (1 mg/kg) con As, Cd, Pb y Hg; posteriormente digerida en viales de cuarzo y PTFE para ultraWAVE 3, así como vasos apropiados para ETHOS UP, respectivamente. Después de cada digestión, los viales de cuarzo y PTFE fueron limpiados usando traceCLEAN. Se llevaron a cabo mediciones de blancos en los viales y en los vasos antes

de que fuera utilizados para más digestiones de muestras. Para las pruebas en blanco se añadieron 5.5 ml de HNO₃, 0.5 ml de HCl y 1 ml de H₂O desionizada a los viales y vasos; y posteriormente se llevaron a cabo los ciclos de calentamiento típicos de los sistemas de microondas. Después de esto, una vez fríos, las soluciones fueron aforadas a un volumen final de 50 ml y analizadas usando un ICP-MS de triple cuadrupolo (Tabla 3 y vea Apéndices para detalles del método).

Otro aspecto importante para optimizar los procedimientos para el análisis traza es minimizar las etapas analíticas y limitar, lo más posible, el riesgo de error humano. Por ejemplo, simplemente reduciendo el filtrado, transferencia o más de las etapas de manejo en general es benéfico para el control apropiado del blanco analítico. El procedimiento completo de preparación analítica debe ser evaluado y cada etapa innecesaria debe ser evitada o simplificada si es posible. Para ayudar a los químicos a simplificar sus procedimientos, Milestone ha desarrollado el sistema easyFILL (Figura 5) para la adición automática de ácidos durante la preparación de las mezclas de digestión. easyFILL es capaz de añadir automáticamente cualquier tipo de ácido en los vasos de digestión y viales, limitando tanto como sea posible la manipulación de la mezcla de digestión y reduciendo el riesgo de una posible contaminación.



Figura 5. easyFILL de Milestone - Estación de Dosificación Automática

Tabla 3. Medición de blanco usando ICP-MS de triple cuadrupolo después de un tratamiento en traceCLEAN (la corrida en blanco fue llevada a cabo a 250 °C en ultraWAVE 3 y a 210 °C en ETHOS UP). Los datos reportados en esta tabla son resultados promedio de 5 repeticiones para cada prueba.

| | As ($\mu\text{g/L}$) | Cd ($\mu\text{g/L}$) | Pb ($\mu\text{g/L}$) | Hg ($\mu\text{g/L}$) |
|---|--|--|--|--|
| <i>ultraWAVE 3 – vial de cuarzo</i> | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.005 |
| <i>ultraWAVE 3 – vial de PTFE</i> | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.005 |
| <i>ETHOS UP – vasos de PTFE del MAXI 24 HP</i> | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.005 |



3.

Preparación de muestra Parte II: Preparación de muestra asistida por microondas adaptada para un “plan lo más cercano a cero”

La evolución de la preparación de muestra asistida por microondas ha traído avances significativos en los instrumentos por microondas con mayor potencia aplicada, completo control de las condiciones de digestión y seguridad mejorada para los analistas y el ambiente del laboratorio. Estos objetivos fueron alcanzados a través del desarrollo apropiado de los hornos y los vasos de reacción cerrados con sensores de temperatura y presión que permiten un monitoreo en tiempo real de las condiciones de digestión. Los vasos de reacción cerrados deben tener las siguientes características:

- Los materiales utilizados deben prevenir la contaminación de la muestra y los efectos de memoria.
- Los materiales deben de soportar altas temperaturas (alrededor de 260 °C) y altas presiones (alrededor de 80 – 100 bar) sin deformación mecánica y sin afectar su estabilidad microestructural (p. ej. Las paredes del contenedor no deben de volverse porosas incluso después de varios ciclos de calentamiento-enfriamiento).
- Los materiales deben ser altamente resistentes químicamente a mezclas calientes de ácidos concentrados.
- El diseño de los vasos de reacción debe garantizar la recuperación completa de analitos y operación segura.
- Los materiales deben limpiarse fácilmente.

Estos requisitos han sido alcanzados con vasos cerrados modernos, el desarrollo de los cuales satisface un requerimiento crítico para llevar a cabo el análisis de elementos traza. Podemos considerar un vaso cerrado como un sistema de micro-laboratorio aislado del ambiente y el cual hace posible las condiciones adecuadas para el análisis traza sin comprometer los blancos analíticos.

El método US FDA EAM (Manual del Análisis Elemental) 4.7 describe los procedimientos de preparación de muestra aptos para ambos sistemas, basados en rotores (también conocidos como vasos cerrados)

ETHOS UP de Milestone

El ETHOS UP con el rotor de alto rendimiento MAXI-24 HP está diseñado para procesar volúmenes más grandes de tipos de muestras y pesos dentro de una sola plataforma basada en rotores. El MAXI-24 HP puede procesar hasta 24 muestras de alimentos simultáneamente y completar la digestión en menos de una hora. El proceso de digestión está siempre bajo control a través del sensor easyTEMP incorporado que mide la temperatura en todos los vasos y asegura un control completo de la reacción. El ETHOS UP con MAXI-24 HP es una herramienta óptima para abordar la preparación de muestras de alimentos y permitir al operador enfocarse en lo que importa: incremento del rendimiento, alta calidad de datos y corridas más redituables.



ultraWAVE 3 de Milestone

El ultraWAVE 3 es la tercera generación de sistemas de digestión basados en la tecnología de Cámara de Reacción Individual (SRC) la cual utiliza una cámara de acero inoxidable con un recipiente de PTFE y tapa. Esta aproximación revolucionó la preparación de muestra ofreciendo desempeño superior, mayor productividad y facilidad de uso sin paralelo. La tecnología SRC, permite agilizar el flujo de trabajo en la preparación de muestra, removiendo el manejo tedioso típicamente involucrado en este proceso. Al mismo tiempo, ultraWAVE 3 ofrece un desempeño superior en términos de capacidades de temperatura y presión, lo cual conlleva a la habilidad de digerir tamaños de muestra más grandes con menos ácido, produciendo una digestión y calidad de análisis superiores. El ultraWAVE 3 combina productividad, facilidad de uso y mejor flujo de trabajo en una sola plataforma sin comprometer el desempeño.



y para los sistemas de Cámara de Reacción Individual (SRC). La FDA está actualmente discutiendo cómo mejorar este método, no solo para alcanzar límites de metales pesados tan bajos presentados en el Acta para la Seguridad de los Alimentos para Bebé con mayor confianza, sino para asegurar que incluso límites más bajos que se esperan a futuro puedan ser alcanzados. Claramente, medir esos niveles tan bajos de elementos traza requiere que el analista trabaje en un ambiente limpio con procedimientos rigurosos para controlar los contaminantes y, como se mencionó en la sección previa, nosotros proveemos soluciones para hacer esto más fácil. Otra área en la cual la FDA se está enfocando es en reducir los factores de dilución de las muestras para bajar los LOD/LOQ de los métodos. Como tal, existe particular interés en cómo los últimos desarrollos en preparación de muestras por microondas pueden contribuir para alcanzar estos ambiciosos objetivos de medición. Un comprensivo estudio de recuperación fue llevado a cabo con el objetivo de evaluar la habilidad de los procedimientos de digestión desarrollados con las plataformas ultraWAVE 3 y ETHOS UP para reducir los factores de dilución del método para el análisis de comida para bebé. El éxito en este esfuerzo depende de la habilidad de los sistemas de digestión para procesar tamaños de muestra más grandes usando volúmenes de ácido limitados sin afectar la calidad de la digestión. Una alta calidad de la digestión es definida para este estudio a través de una recuperación completa de los analitos con mínimas interferencias originadas por la matriz de la muestra (p. ej. También podría haber interferencias debido a un alto volumen de ácido o concentraciones de sólidos disueltos, alto contenido de carbono residual). Para este estudio, un lote mixto de muestras de alimentos para bebé/infante, tanto secas como húmedas (límite equivalente de masa seca $\leq 0.5\text{g}$), fueron utilizadas. Como se muestra en la Tabla 4, las muestras consisten de dos materiales de referencia (JRC-ERM y FAPAS), un material de control de calidad (FAPAS) y cuatro muestras comerciales. Las muestras comerciales fueron enriquecidas previo a la digestión con una solución estándar que contenía As, Cd, Hg y Pb. El nivel de la adición fue calculado para obtener una concentración de enriquecimiento para cada elemento de $1\ \mu\text{g/l}$ en la solución analítica final. El análisis de las muestras fue llevado a cabo con un sistema ICP-MS de triple cuadrupolo

Tabla 4. Muestras de alimentos de bebé/infantes, tanto secas como húmedas, utilizadas.

| Tipo de muestra | ID de la muestra | Descripción |
|------------------------------------|------------------|---|
| Material de Referencia Certificado | ERM BD-150 | Leche en polvo descremada (elementos traza) |
| Material de Referencia Certificado | TFV002RM | Metales pesados en leche en polvo |
| Material de QC | T07413QC | Metales pesados en cereales infantiles (basados en arroz) |
| Comercial | BF-MEAT | Comida para bebé – Carne |
| Comercial | BF-VEG | Comida para bebé – Vegetales |
| Comercial | BF-FISH | Comida para bebé – Pescado |
| Comercial | FJ | Jugo de frutas |

usando las condiciones de operación listadas en los Apéndices. Para ambos, ultraWAVE 3 y ETHOS UP, los datos relacionados a los nuevos procedimientos descritos abajo son comparados con los datos para las mismas muestras preparadas usando el método estándar EAM 4.7.

3.1 ultraWAVE 3 procedimiento para el plan “más cercano a cero”

Entre las tecnologías disponibles, la tecnología SRC merece particular atención (Figura 6). En SRC, la cámara de reacción está herméticamente cerrada y presurizada con un gas inerte de tal forma que los recipientes pueden alcanzar temperaturas tan altas como 300 °C y presiones de hasta 199 bar. Como ventaja adicional, SRC usa contenedores de digestión de tipo vial de uso simple y bajo costo, en conjunto con otros tipos de rejillas donde, con el último lanzamiento del ultraWAVE 3, un rendimiento muy alto de muestras puede ser alcanzado. Como se mencionó, el punto clave de la tecnología SRC es la capacidad de soportar temperaturas y presiones extremadamente altas. El beneficio directo que se obtiene de esto es la habilidad de digerir completamente tamaños de muestra más grandes con volúmenes de ácido más bajos, cuando se compara con los sistemas basados en rotores. La Tabla 5 lista los factores de dilución alcanzables con el método estándar EAM 4.7 para digestiones de tipo autoclave con los métodos optimizados en esta publicación. En este estudio, no se utilizó peróxido de hidrógeno para los nuevos métodos propuestos. H₂O₂ es generalmente utilizado para mejorar el poder oxidativo de la mezcla de digestión, además, también ayuda a regenerar HNO₃ a partir del NO en el gas de reacción lo que conlleva a una mayor

disponibilidad de ácido y a bajar la presión en el sistema. ultraWAVE 3, gracias a su capacidad de soportar altas temperaturas y presiones, no requiere H₂O₂ para obtener una digestión completa, disminuyendo por lo tanto el consumo de reactivos y facilitando un mejor control del blanco analítico. Todos los métodos mencionados fueron probados en muestras distintas y las recuperaciones de As, Cd, Pb y Hg son reportadas en las tablas a continuación. Los criterios de aceptación fueron de 80-120%, los mismos reportados por EAM 4.7. En las Tablas 6 y 7 los datos de recuperación trabajando con el método EAM 4.7 (detalles del método en la Tabla 5) son reportados.



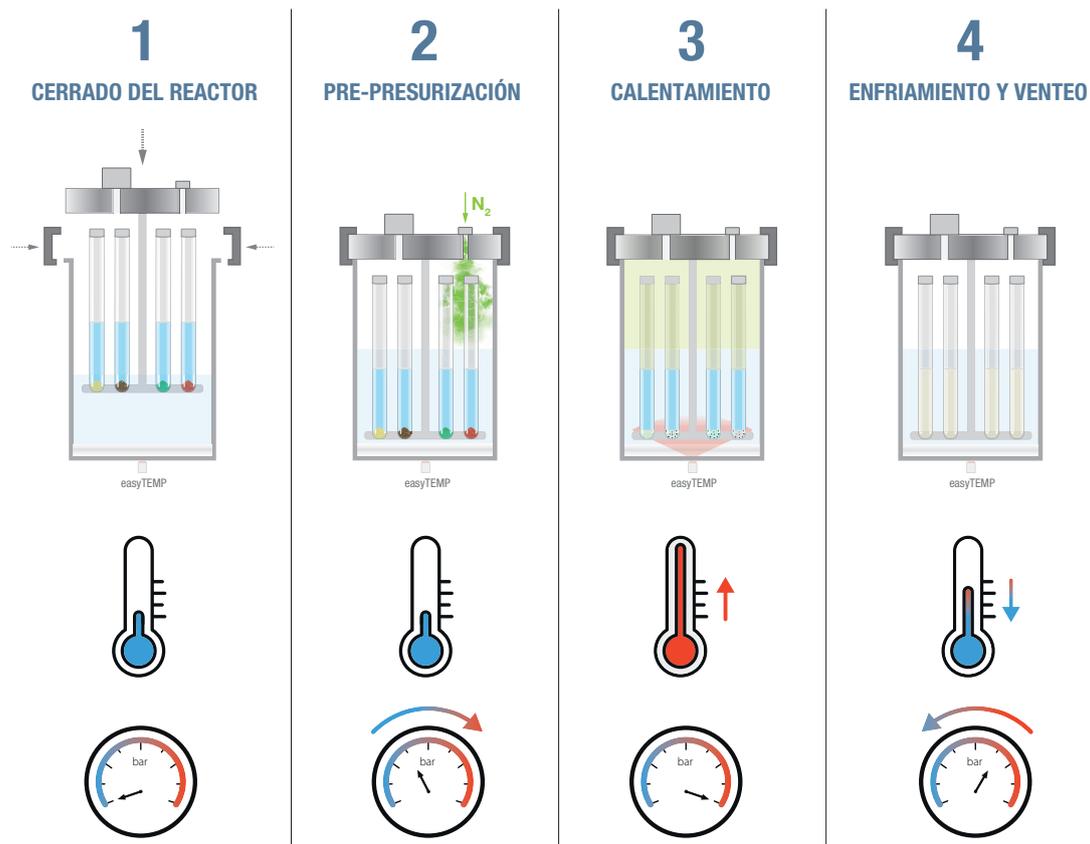


Figura 6. Secuencia de operación SRC

Tabla 5. Métodos del ultraWAVE 3 para digestión de muestras de comida para bebé y sus factores de dilución

| Tipo de muestra | Método | Cantidad de muestra | Mezcla de digestión | Volumen final (ml) | Acidez final* (V/V) | Factor de dilución |
|-----------------|---|------------------------|---|--------------------|-------------------------------|--------------------|
| 1 | EAM 4.7 | 0.5 g (muestras secas) | 5 ml HNO ₃ + 1 ml H ₂ O ₂ (+ 0.25 ml HCl post-digestión) | 50 | 5% HNO ₃ 0.5% HCl | X100 |
| 2 | Menor volumen de ácido | 0.5 g (muestras secas) | 2.5 ml HNO ₃ + 0.25 ml HCl | 25 | 5% HNO ₃ 0.5% HCl | X50 |
| 3 | Tamaño de muestra más grande | 1 g (muestras secas) | 5 ml HNO ₃ + 0.25 ml HCl | 50 | 5% HNO ₃ 0.5% HCl | X50 |
| 4 | Tamaño de muestra más grande/ baja dilución | 1 g (muestras secas) | 5 ml HNO ₃ + 0.25 ml HCl | 25 | 10% HNO ₃ 1% HCl | X25 |
| 5 | EAM 4.7 | 5 g (muestras secas) | 5 ml HNO ₃ + 1 ml H ₂ O ₂ (+ 0.25 ml HCl post-digestión) | 50 | 10% HNO ₃ 0.5% HCl | X10 |
| 6 | Menor volumen de ácido | 5 g (muestras secas) | 2.5 ml HNO ₃ + 0.25 ml HCl | 25 | 5% HNO ₃ 0.5% HCl | X5 |

*Considerando 10% como el máximo de acidez tolerable por ICP-MS, la acidez final fue estimada considerando 50% de consumo del ácido oxidativo como se reporta en el método EAM 4.7. Note que para los métodos 2, 4 y 6 la acidez final excede el valor real debido a una relación muestra a ácido más baja. En este estudio, una aproximación conservadora fue aplicada para dicho cálculo usando el mismo factor de consumo del 50% reportado en EAM 4.7.

**La adición de 1 ml de agua desionizada es recomendado para minimizar la reacción exotérmica.



Tabla 6. Estudio de recuperación de ultraWAVE 3 para As, Cd, Pb y Hg en muestras de comida secas aplicando el método EAM 4.7. **La adición de 1 ml de agua desionizada es recomendado para minimizar la reacción exotérmica.

| ultraWAVE 3 – método EAM 4.7 – Muestras secas | | | | |
|--|------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | | ERM BD-150 | TFV002RM | T07413QC |
| | Peso de la muestra (g) | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| | Vol. Final (ml) | 50 | 50 | 50 |
| As | Conc. Esp. (µg/kg) | NA | 72.9 | 113 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 3.14 | 67.8 | 115 |
| | Rec% | - | 93 | 102 |
| | RSD% (n=3) | 5.9 | 3.0 | 1.3 |
| Cd | Conc. Esp. (µg/kg) | 11.4 | 21.2 | 32.8 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 10.2 | 21.3 | 33.0 |
| | Rec% | 89 | 101 | 101 |
| | RSD% (n=3) | 0.49 | 3.0 | 1.4 |
| Hg | Conc. Esp. (µg/kg) | 60 | 39.6 | 29.6 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 51.9 | 41.7 | 29.8 |
| | Rec% | 86 | 105 | 101 |
| | RSD% (n=3) | 0.97 | 1.9 | 0.59 |
| Pb | Conc. Esp. (µg/kg) | 19 | 52.9 | 44.9 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 14.3 | 47.1 | 44.9 |
| | Rec% | 81 | 89 | 100 |
| | RSD% (n=3) | 3.3 | 2.7 | 0.65 |

Tabla 7. Estudio de recuperación de ultraWAVE 3 para As, Cd, Pb y Hg en muestras de comida húmedas aplicando el método EAM 4.7.

| ultraWAVE 3 – método EAM 4.7 – Muestras húmedas | | | | | |
|--|------------------------|----------------|---------------|----------------|-----------|
| | | BF-MEAT | BF-VEG | BF-FISH | FJ |
| | Peso de la muestra (g) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | Vol. Final (ml) | 50 | 50 | 50 | 50 |
| As | Conc. Medida (µg/kg) | 1.82 | 2.19 | 20.8 | 1.11 |
| | Rec. Enri. (%) | 107 | 94 | 103 | 97 |
| | RSD% (n=3) | 6.2 | 3.3 | 8.5 | 4.5 |
| Cd | Conc. Medida (µg/kg) | 7.37 | 9.9 | 6.02 | 1.01 |
| | Rec. Enri. (%) | 104 | 80 | 88 | 92 |
| | RSD% (n=3) | 7.3 | 1.8 | 8.0 | 0.15 |
| Hg | Conc. Medida (µg/kg) | 0.48 | < | 0.97 | < |
| | Rec. (%) | 80 | 86 | 87 | 90 |
| | RSD% (n=3) | 8.2 | 8.3 | 3.9 | 3.9 |
| Pb | Conc. Medida (µg/kg) | 2.64 | 12.6 | 2.51 | 0.75 |
| | Rec. (%) | 103 | 95 | 103 | 112 |
| | RSD% (n=3) | 6.6 | 5.5 | 3.0 | 2.9 |



En las Tablas 8 y 9 se reportan los datos obtenidos reduciendo a la mitad el volumen de ácido utilizado en el método EAM 4.7. En los siguientes dos estudios de recuperación relacionados con ultraWAVE 3 un nuevo

procedimiento fue evaluado donde el doble de masa de muestra (detalles del método en la Tabla 5) fue utilizada comparada con el método EAM 4.7.

Tabla 8. Estudio de recuperación de ultraWAVE 3 para As, Cd, Pb y Hg en muestras de alimento seco trabajando con menos volumen de ácido comparado con el método EAM 4.7.

| ultraWAVE 3 – Método con un menor volumen de ácido – Muestras secas | | | | |
|--|------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | | ERM BD-150 | TFV002RM | T07413QC |
| | Peso de la muestra (g) | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| | Vol. Final (ml) | 25 | 25 | 25 |
| As | Conc. Esp. (µg/kg) | NA | 72.9 | 113 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 3.59 | 73.4 | 122 |
| | Rec% | - | 101 | 108 |
| | RSD% (n=3) | 11 | 4.4 | 4.4 |
| Cd | Conc. Esp. (µg/kg) | 11.4 | 21.2 | 32.8 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 10.0 | 21.7 | 34.4 |
| | Rec% | 88 | 102 | 105 |
| | RSD% (n=3) | 2.4 | 0.36 | 4.4 |
| Hg | Conc. Esp. (µg/kg) | 60 | 39.6 | 29.6 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 54.7 | 42.9 | 30.8 |
| | Rec% | 91 | 108 | 104 |
| | RSD% (n=3) | 1.3 | 1.6 | 1.5 |
| Pb | Conc. Esp. (µg/kg) | 19 | 52.9 | 44.9 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 15.8 | 50.6 | 42.8 |
| | Rec% | 83 | 96 | 95 |
| | RSD% (n=3) | 3.6 | 3.4 | 1.1 |



Tabla 9. Tabla 8. Estudio de recuperación de ultraWAVE 3 para As, Cd, Pb y Hg en muestras de alimento húmedo trabajando con menos volumen de ácido comparado con el método EAM 4.7.

| ultraWAVE 3 – Método con menor volumen de ácido – Muestras húmedas | | | | | |
|---|------------------------|----------------|---------------|----------------|-----------|
| | | BF-MEAT | BF-VEG | BF-FISH | FJ |
| | Peso de la muestra (g) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | Vol. Final (ml) | 25 | 25 | 25 | 25 |
| As | Conc. Medida (µg/kg) | 3.36 | 3.27 | 33.8 | 1.26 |
| | Rec. Enri. (%) | 113 | 115 | 114 | 115 |
| | RSD% (n=3) | 4.6 | 1.9 | 4.1 | 6 |
| Cd | Conc. Medida (µg/kg) | 6.15 | 10.0 | 5.44 | 0.98 |
| | Rec. Enri. (%) | 100 | 85 | 95 | 89 |
| | RSD% (n=3) | 4.5 | 4.4 | 5.6 | 4.9 |
| Hg | Conc. Medida (µg/kg) | 0 | 0.33 | 1.85 | 0.71 |
| | Rec. Enri. (%) | 99 | 92 | 87 | 88 |
| | RSD% (n=3) | 6.5 | 4.9 | 3.8 | 4.7 |
| Pb | Conc. Medida (µg/kg) | 3.04 | 12.2 | 2.54 | 0.71 |
| | Rec. Enri. (%) | 97 | 87 | 94 | 95 |
| | RSD% (n=3) | 9.4 | 5.0 | 2.8 | 3.9 |





Gracias a la digestión completa alcanzada con este procedimiento de ultraWAVE 3, se pudo aplicar un factor de dilución menor (Tablas 10 y 11). Los datos de recuperación muestran que los métodos propuestos permiten bajar el factor de dilución de x100 a x25 para las muestras secas y de x10 a x5 para muestras húmedas al incrementar la masa de la muestra seca comparado con lo que es típicamente digerido en el método EAM 4.7 y bajar la dilución final de la muestra para ambos tipos de muestra a la mitad.

Alcanzar un incremento del doble en la masa de muestra seca comparado con el método EAM 4.7 es posible gracias al diseño específico de la cámara de digestión del ultraWAVE 3, donde la digestión se lleva a cabo en un vial pequeño que permite la optimización de la relación masa de muestra a volumen de ácido. Esto, combinado con el alto desempeño y la homogeneidad del calentamiento alcanzado con ultraWAVE 3, permite el desarrollo de estos métodos altamente eficientes.

Tabla 10. Estudio de recuperación de ultraWAVE 3 para As, Cd, Pb y Hg en muestras de alimento seco trabajando con mayor tamaño de muestra y menor factor de dilución comparado con el método EAM 4.7.

| ultraWAVE 3 – Método con mayor tamaño de muestra/menor dilución – Muestras secas | | | | |
|---|------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | | ERM BD-150 | TFV002RM | T07413QC |
| | Peso de la muestra (g) | 1 | 1 | 1 |
| | Vol. Final (ml) | 25 | 25 | 25 |
| As | Conc. Esp. (µg/kg) | NA | 72.9 | 113 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 3.65 | 88.0 | 136 |
| | Rec% | - | 120 | 121 |
| | RSD% (n=3) | 2.9 | 3.7 | 4.0 |
| Cd | Conc. Esp. (µg/kg) | 11.4 | 21.2 | 32.8 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 11.8 | 21.0 | 36.0 |
| | Rec% | 104 | 102 | 109 |
| | RSD% (n=3) | 0.42 | 5.4 | 4.8 |
| Hg | Conc. Esp. (µg/kg) | 60 | 39.6 | 29.6 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 51.9 | 42.0 | 33.0 |
| | Rec% | 86 | 104 | 110 |
| | RSD% (n=3) | 6.1 | 6.0 | 3.0 |
| Pb | Conc. Esp. (µg/kg) | 19 | 52.9 | 44.9 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 18.3 | 46.0 | 43.0 |
| | Rec% | 96 | 87 | 94 |
| | RSD% (n=3) | 5.3 | 4.4 | 2.7 |



Tabla 11. Estudio de recuperación de ultraWAVE 3 para As, Cd, Pb y Hg en muestras de alimento húmedo trabajando con mayor tamaño de muestra y menor factor de dilución comparado con el método EAM 4.7.

| ultraWAVE 3 – Método con mayor tamaño de muestra/menor dilución – Muestras húmedas | | | | | |
|---|------------------------|----------------|---------------|----------------|-----------|
| | | BF-MEAT | BF-VEG | BF-FISH | FJ |
| | Peso de la muestra (g) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | Vol. Final (ml) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| As | Conc. Medida (µg/kg) | 4.07 | 0.18 | 81.4 | 2.88 |
| | Rec. Enri. (%) | 120 | 116 | 119 | 113 |
| | RSD% (n=3) | 4.4 | 2.8 | 1.5 | 2.6 |
| Cd | Conc. Medida (µg/kg) | 0.08 | 8.43 | 6.82 | 0.08 |
| | Rec. Enri. (%) | 96 | 96 | 94 | 92 |
| | RSD% (n=3) | 1.8 | 1.2 | 0.81 | 2.5 |
| Hg | Conc. Medida (µg/kg) | 0.14 | 0.15 | 3.29 | 0.39 |
| | Rec. Enri. (%) | 93 | 91 | 89 | 89 |
| | RSD% (n=3) | 6.5 | 6.3 | 8.7 | 2.3 |
| Pb | Conc. Medida (µg/kg) | 0.4 | 1.15 | 0.91 | 0.5 |
| | Rec. Enri. (%) | 88 | 85 | 84 | 86 |
| | RSD% (n=3) | 0.96 | 2.0 | 0.42 | 1.6 |



3.2 ETHOS UP procedimiento para un plan “lo más cercano a cero”

Un estudio similar fue llevado a cabo para un sistema de microondas basado en rotores. Refiriéndonos al método EAM 4.7 para digestión por microondas en vaso cerrado y el factor de dilución relacionado, el sistema ETHOS UP equipado con un rotor MAXI-24 HP fue probado con nuevas metodologías con el objetivo de reducir los factores de dilución. Las condiciones aplicadas son reportadas en la Tabla 12. Todos los métodos mencionados anteriormente fueron probados en distintas muestras. Las recuperaciones de As, Cd, Pb y Hg son reportadas en las tablas a continuación. En las Tablas 13 y 14 se reportan los datos de recuperación trabajando con el método EAM 4.7

(detalles del método en la Tabla 12). En las Tablas 15 y 16 se reportan los datos obtenidos al disminuir a la mitad el volumen del ácido utilizado en el método EAM 4.7. A pesar de las claras diferencias de especificaciones entre el sistema basado en rotores y la tecnología de ultraWAVE 3, los datos reportados en el estudio de recuperación con ETHOS UP demostraron que el rotor MAXI-24 HP es apto para este campo de aplicación ya que permite bajar el factor de dilución de x200 a x100 para las muestras secas y

Tabla 12. Métodos de ETHOS UP para digestión de comida para bebé y sus factores de dilución.

| Tipo de muestra | Métodos | Cantidad de muestra | Mezcla de digestión | Volumen final (ml) | Acidez final* (V/V) | Factor de dilución |
|-----------------|------------------------|---------------------------|--|--------------------|------------------------------|--------------------|
| 7 | EAM 4.7 | 0.5 g (muestras secas) | 8 ml HNO ₃ + 1 ml H ₂ O ₂ (+ 0.5 ml HCl Post-digestión) | 100 | 8% HNO ₃ 0.5% HCl | X200 |
| 8 | EAM 4.7 | 5 g (muestras secas) | 8 ml HNO ₃ + 1 ml H ₂ O ₂ (+ 0.5 ml HCl Post-digestión) | 100 | 8% HNO ₃ 0.5% HCl | X20 |
| 9 | Menor volumen de ácido | 0.5 g (muestras secas) | 4 ml HNO ₃ + 0.5 ml H ₂ O ₂ (+ 0.25 ml HCl) | 50 | 8% HNO ₃ 0.5% HCl | X100 |
| 10 | Menor volumen de ácido | 5 g (muestras secas) | 4 ml HNO ₃ + 0.5 ml H ₂ O ₂ (+ 0.25 ml HCl) | 50 | 8% HNO ₃ 0.5% HCl | X10 |



Tabla 13. Estudio de recuperación de As, Cd, Pb y Hg con ETHOS UP en muestras de alimentos secos aplicando el método EAM 4.7.

| ETHOS UP, MAXI-24 HP – método EAM 4.7 – Muestras secas | | | | |
|---|------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | | ERM BD-150 | TFV002RM | T07413QC |
| | Peso de la muestra (g) | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| | Vol. Final (ml) | 100 | 100 | 100 |
| As | Conc. Esp. (µg/kg) | NA | 72.9 | 113 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 2.7 | 74.2 | 128 |
| | Rec% | - | 102 | 114 |
| | RSD% (n=3) | 5.1 | 2.6 | 1.4 |
| Cd | Conc. Esp. (µg/kg) | 11.4 | 21.2 | 32.8 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 11.4 | 19.9 | 31.2 |
| | Rec% | 100 | 94 | 95 |
| | RSD% (n=3) | 6.3 | 1.8 | 7.0 |
| Hg | Conc. Esp. (µg/kg) | 60 | 39.6 | 29.6 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 54.5 | 40.8 | 28.8 |
| | Rec% | 91 | 103 | 97 |
| | RSD% (n=3) | 1.7 | 2.6 | 1.5 |
| Pb | Conc. Esp. (µg/kg) | 19 | 52.9 | 44.9 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 16.6 | 51.8 | 44.3 |
| | Rec% | 88 | 98 | 99 |
| | RSD% (n=3) | 1.3 | 4.6 | 1.8 |

Tabla 14. Estudio de recuperación de As, Cd, Pb y Hg con ETHOS UP en muestras húmedas de alimentos aplicando el método EAM 4.7.

| ETHOS UP, MAXI-24 HP– método EAM 4.7 – Muestras húmedas | | | | | |
|--|------------------------|----------------|---------------|----------------|-----------|
| | | BF-MEAT | BF-VEG | BF-FISH | FJ |
| | Peso de la muestra (g) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | Vol. Final (ml) | 100 | 100 | 100 | 100 |
| As | Conc. Medida (µg/kg) | 4.07 | 0.18 | 81.4 | 2.88 |
| | Rec. Enri. (%) | 120 | 116 | 119 | 113 |
| | RSD% (n=3) | 4.4 | 2.8 | 1.5 | 2.6 |
| Cd | Conc. Medida (µg/kg) | 0.08 | 8.43 | 6.82 | 0.08 |
| | Rec. Enri. (%) | 96 | 96 | 94 | 92 |
| | RSD% (n=3) | 1.8 | 1.2 | 0.81 | 2.5 |
| Hg | Conc. Medida (µg/kg) | 0.14 | 0.15 | 3.29 | 0.39 |
| | Rec. Enri. (%) | 93 | 91 | 89 | 89 |
| | RSD% (n=3) | 6.5 | 6.3 | 8.7 | 2.3 |
| Pb | Conc. Medida (µg/kg) | 0.4 | 1.15 | 0.91 | 0.5 |
| | Rec. Enri. (%) | 88 | 85 | 84 | 86 |
| | RSD% (n=3) | 0.96 | 2.0 | 0.42 | 1.6 |



Tabla 15. Estudio de recuperación de As, Cd, Pb y Hg con ETHOS UP en muestras secas de alimentos utilizando un menor volumen de ácido comparado con el método EAM 4.7.

| ETHOS UP, MAXI-24 HP – método con menos volumen de ácido – Muestras secas | | | | |
|--|------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| | | ERM BD-150 | TFV002RM | T07413QC |
| | Peso de la muestra (g) | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| | Vol. Final (ml) | 50 | 50 | 50 |
| As | Conc. Esp. (µg/kg) | NA | 72.9 | 113 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 4.22 | 80.8 | 131 |
| | Rec% | - | 111 | 116 |
| | RSD% (n=3) | 7.2 | 5.6 | 1.1 |
| Cd | Conc. Esp. (µg/kg) | 11.4 | 21.2 | 32.8 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 12.0 | 22.5 | 32.2 |
| | Rec% | 105 | 106 | 98 |
| | RSD% (n=3) | 5.9 | 3.3 | 5.9 |
| Hg | Conc. Esp. (µg/kg) | 60 | 39.6 | 29.6 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 54.4 | 39.9 | 26.7 |
| | Rec% | 91 | 101 | 90 |
| | RSD% (n=3) | 4.7 | 4.9 | 4.1 |
| Pb | Conc. Esp. (µg/kg) | 19 | 52.9 | 44.9 |
| | Conc. Medida (µg/kg) | 18.2 | 51.3 | 42.2 |
| | Rec% | 96 | 97 | 94 |
| | RSD% (n=3) | 8.7 | 0.74 | 1.8 |

Tabla 16. Estudio de recuperación de As, Cd, Pb y Hg con ETHOS UP en muestras húmedas de alimentos utilizando un menor volumen de ácido comparado con el método EAM 4.7.

| ETHOS UP, MAXI-24 HP – método con menos volumen de ácido – Muestras húmedas | | | | | |
|--|------------------------|----------------|---------------|----------------|-----------|
| | | BF-MEAT | BF-VEG | BF-FISH | FJ |
| | Peso de la muestra (g) | 5 | 5 | 5 | 5 |
| | Vol. Final (ml) | 25 | 25 | 25 | 25 |
| As | Conc. Medida (µg/kg) | 4.37 | 0.48 | 81.4 | 3.18 |
| | Rec. Enri. (%) | 115 | 110 | 117 | 117 |
| | RSD% (n=3) | 7.4 | 5.9 | 1.1 | 0.84 |
| Cd | Conc. Medida (µg/kg) | 9.24 | 0.72 | 7.38 | 0.08 |
| | Rec. Enri. (%) | 85 | 81 | 81 | 83 |
| | RSD% (n=3) | 9.7 | 5.5 | 6.8 | 5.6 |
| Hg | Conc. Medida (µg/kg) | 0.08 | 0.06 | 2.72 | 0.06 |
| | Rec. Enri. (%) | 93 | 85 | 85 | 85 |
| | RSD% (n=3) | 4.0 | 2.4 | 3.3 | 5.1 |
| Pb | Conc. Medida (µg/kg) | 3.04 | 12.2 | 2.54 | 0.71 |
| | Rec. Enri. (%) | 80 | 87 | 82 | 89 |
| | RSD% (n=3) | 7.3 | 4.7 | 3.8 | 4.6 |

3.3 Consideraciones finales sobre las metodologías para la preparación de muestra

Los datos reportados demuestran la idoneidad de los sistemas ultraWAVE 3 y ETHOS UP para cumplir con el método EAM 4.7. En particular, muestran cómo el desempeño superior del ultraWAVE 3 lo convierte en un buen complemento para el Acta para la Seguridad de los Alimentos para Bebé del 2021 y sus requerimientos futuros más demandantes.

Para los alimentos para bebé secos, el aplicar un procedimiento con ultraWAVE 3 con tamaño de muestra más grande y menor factor de dilución puede reducir el Límite de Cuantificación (LOQ) del método por un factor de cuatro, lo que en este estudio significaría bajarlo de 0.9 a 0.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para As, Cd y Pb; y de 0.45 a 0.12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para Hg. Para las muestras húmedas de comida para bebé, el LOQ del método puede ser reducido por un factor de dos, lo cual para este estudio lo bajaría de 0.09 a 0.045 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para As, Cd y Pb; y de 0.045 a 0.023 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para Hg. Mientras que los LOQs medidos en este estudio usando el procedimiento del método EAM 4.7 están cómodamente por debajo de los límites de acción

del “Acta para la Seguridad de los Alimentos para Bebé del 2021”, cuando esos límites de acción sean disminuidos en el futuro, tal como es requerido por ley, el nivel de confianza en el análisis será reducido. De acuerdo con un experto en la industria, “Si los límites de acción fueran reducidos por un factor de dos a cinco veces en el futuro, los ICP-MS probablemente tendrían dificultades para cumplir con los LOQs requeridos, a menos que el tamaño de muestra pueda ser incrementado y/o el factor de dilución disminuido.” [12] Tal como la FDA ha propuesto investigar, este estudio demuestra que los métodos de digestión de comida para bebé usando una cantidad de muestra mayor y una menor dilución final son posibles cuando se acoplan con sistemas capaces de digerir completamente las muestras bajo estas condiciones, incluso es posible bajar el LOQ de tal forma que los metales pesados en comida para bebé puedan ser determinados, tanto ahora como en el futuro, con niveles de confianza apropiados.



DMA-80 evo de Milestone

¿Sabía usted acerca del Análisis Directo de Mercurio? Pregunte a los analistas acerca de la técnica de análisis ideal y probablemente le describan mediciones analíticas llevadas a cabo directamente en muestras no tratadas, sin ninguna etapa de preparación de muestra y con una estrategia simple para la calibración analítica. Algo como: coloque las muestras, espere unos minutos y ¡Obtenga resultados! Para muchos analistas, esto puede sonar como un sueño. Pero afortunadamente, la tecnología que se adapta a esta descripción, existe hoy en día.

Milestone ha desarrollado un analizador de mercurio directo, DMA-80 evo, capaz de analizar mercurio directamente en casi cualquier tipo de muestra en alrededor de 5 minutos.



Tabla 17. Resultados del análisis de Hg de muestras de comida para bebé analizadas con el DMA-80 evo.

| | | <i>BD-150</i> | <i>TFV002RM</i> | <i>T07413QC</i> | <i>BF-MEAT</i> | <i>BF-VEG</i> | <i>BF-FISH</i> | <i>FJ</i> |
|-----------|------------------------|---------------|-----------------|-----------------|----------------|---------------|----------------|-----------|
| Hg | Peso de la muestra (g) | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| | Conc. esperada (µg/kg) | 60 | 39.6 | 29.6 | 25 | 25 | 25 | 25 |
| | Masa esperada (ng Hg) | 12 | 7.92 | 5.92 | 5* | 5* | 5* | 5* |
| | Masa medida (ng Hg) | 11.66 | 7.97 | 5.79 | 4.77 | 4.83 | 5.12 | 4.91 |
| | Rec% | 97 | 101 | 98 | 95 | 97 | 102 | 98 |
| | RSD% (n=3) | 0.97 | 1.2 | 0.59 | 0.88 | 1.0 | 1.1 | 1.1 |

*Las muestras comerciales fueron enriquecidas con 100 µl de 50 µg/l de una solución estándar (5 ng Hg) en las navcillas de muestra del DMA-80 evo.

Tabla 18. Cálculo típico del LOQ para el DMA-80 para determinación de Hg.

| <i>DMA-80 evo de Triple Celda</i> | | <i>ASQL Típico (ng)</i> | <i>Tamaño de muestra (g)</i> | <i>Factor de dilución</i> | <i>LOQ (µg/kg)</i> | <i>Límite de acción (µg/kg)</i> |
|-----------------------------------|----|-------------------------|------------------------------|---------------------------|--------------------|---------------------------------|
| Muestras Secas/húmedas | Hg | 0.03 | 0.2 | 1 | 0.15 | 2 |

4.

Observaciones finales: un flujo de trabajo para la preparación de muestras integrado, robusto y más verde para análisis de metales traza

Como usted sabe y como hemos discutido en las secciones previas, el análisis elemental traza depende de instrumentación moderna con sensibilidad extrema, pero la capacidad analítica de estos instrumentos no será efectiva sin procedimientos analíticos optimizados y analistas entrenados. La cultura del analista debe estar adaptada para pensar acerca de la contaminación y cómo controlar el blanco analítico. Es bien

sabidos que resultados confiables no pueden ser obtenidos sin una preparación de muestra adecuada y sin un control apropiado del blanco analítico. Proponemos un flujo de trabajo integrado y completo, específicamente desarrollado para laboratorios de análisis de alimentos, para ser robusto, fácil de aplicar y que tenga el menor impacto en el ambiente (Figura 7).

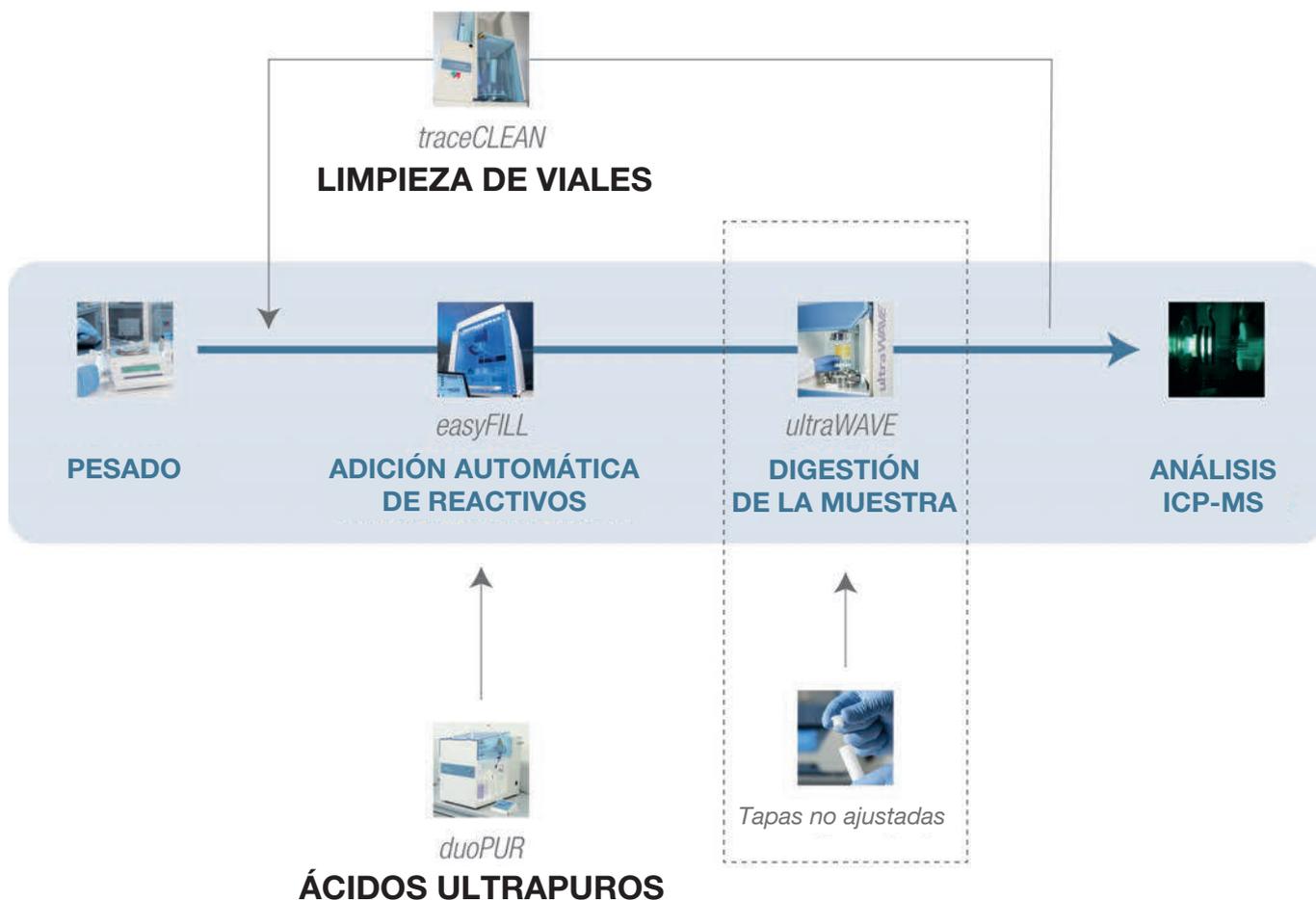


Figura 7. Flujo de trabajo de preparación de muestras para determinación de elementos traza.



En este flujo de trabajo, la manipulación manual de la muestra está limitada tanto como sea posible:

- duoPUR: iniciando desde ácido grado reactivo, produce ácido ultra-puro fresco y bajo demanda.
- easyFILL: agrega automáticamente todos los ácidos requeridos a los viales de digestión.
- ultraWAVE 3: permite la digestión de hasta 20 muestras por corrida trabajando con alta cantidad de muestra y bajo volumen de ácido para alcanzar LOQs superiores.
- traceCLEAN: limpieza robusta y automatizada garantizada al generar continuamente vapores de ácido frescos.

El flujo de trabajo propuesto permite alcanzar resultados exactos de elementos traza y es crucial para alcanzar los estrictos requerimientos para determinar As, Cd, Pb y Hg en alimentos para bebé. Sin embargo; a pesar de ser esencial, no es suficiente con pensar solamente en controlar el blanco y la precisión del análisis. Hoy en día, los procedimientos analíticos también tienen que ser amigables con el ambiente. Para desarrollar un flujo de trabajo para preparación de muestra más verde, debemos también considerar las siguientes áreas relacionadas con el análisis que tienen un impacto en el ambiente y que pueden fomentar una aproximación de “química verde” [9]:

1. Producción de reactivos: materia prima, energía, tiempo, pureza, subproductos, rendimiento y desechos generados.
2. Propiedades físicas y químicas de los reactivos: punto de ebullición, inflamabilidad, corrosividad, estabilidad, vida de anaquel, facilidad de recuperación y facilidad de manejo.
3. Tiempo de vida de los equipos, recipientes y sensores.
4. Cantidad de muestra necesaria.
5. Masa, volumen y concentración de los reactivos.
6. Necesidad de gases o reactivos especiales.
7. Energía necesaria para elevar la temperatura y mantener el sistema de reacción caliente.
8. Condiciones de reacción: temperatura, presión y tiempo.
9. Generación de productos excesivamente reactivos o peligrosos.

1. Volumen y toxicidad de los gases generados.
2. Riesgo al analista y al ambiente.
3. Volumen de desechos generados.
4. Reciclaje de reactivos.

Los procedimientos de preparación de muestra asistida por microondas propuestos para el análisis traza de comida para bebé fueron desarrollados considerando estos principios. Consecuentemente, una alta cantidad de muestra de comida para bebé puede ser eficientemente digerida usando menos ácido nítrico y todas las etapas, desde el pesado hasta la medición, pueden ser llevadas a cabo con manipulación reducida por parte del analista, evitando pérdidas y contaminación. El uso de volúmenes limitados de soluciones de ácido nítrico, preparadas desde ácidos grado reactivo purificados por destilación por sub-ebullición, conlleva a mejores blancos, menor costo de reactivos y menos generación de desechos. El ácido limpio puede ser producido bajo demanda y solamente en las cantidades requeridas, de tal manera que no hay riesgo de necesitar desechar el exceso de reactivos ultrapuros que se pueden contaminar con el tiempo. Además, podemos evitar el uso de peróxido de hidrógeno o cualquier otro reactivo concentrado, obteniendo de esta forma mejores blancos. El uso de traceCLEAN asegura una descontaminación apropiada de los vasos de digestión al usar y reusar una cantidad limitada de ácido. Los procedimientos desarrollados combinan estrategias para un control apropiado del blanco analítico que cumplen con las necesidades del análisis elemental traza de comida para bebé, con estrategias más verdes para disminuir los impactos en los analistas, personal del laboratorio y el ambiente. En la Tabla 17 son reportados los datos de mediciones de Hg llevadas a cabo con el DMA-80 evo en los mismos materiales CRM utilizados en este estudio. Además de excelentes recuperaciones, la Tabla 18 demuestra cómo el método del DMA-80 evo alcanzó un LOQ apto para cumplir con el límite de acción del Acta para la Seguridad de los Alimentos para Bebé e incluso tiene un margen de desempeño para cuando el límite de acción sea más bajo en el futuro. Dados los múltiples retos para determinar Hg en ICP-MS, más y más laboratorios están implementando el Análisis Directo de Mercurio por sus determinaciones de mercurio de bajo nivel, tales como las descritas en este estudio para el análisis de muestras de comida para bebé.



I 5. Referencias

1. J.C. Whorton, *The arsenic century. How Victorian Britain was Poisoned at Home, Work, & Play.* Oxford University Press, Oxford, 2010.
2. P. Atkins, Our daily doses of poison: a look at lead in the food supply. *Spectroscopy*, 32(10):12-17,2017.
3. E.N. Whitney, S.R. Rolfes, *Understanding Nutrition.* 7th ed. West Publishing Co., St Paul, 1996.
4. J. Emsley, *Nature's Building Blocks. An A-Z Guide to the Elements,* Oxford University Press, Oxford, 2001.
5. FDA seeks lower lead levels in food additives and GRAS ingredients. *Journal of the American Dietetic Association*, 94(5):495,1994.
6. J.A. Nóbrega, C. Pirola, *Getting Ready for USP 232, 233 and 2232. Microwave-Assisted Sample Preparation and Determination of Elemental Impurities in Pharmaceutical Products.* Milestone Srl, Sorisole, 2017.
7. R.C. Richter, J.A. Nóbrega, C. Pirola, *Think Blank. Clean chemistry tools for atomic spectroscopy.* Milestone Srl, Sorisole, 2016.
8. E.C. Kuehner, R. Alvarez, P.J. Paulsen, T.J. Murphy, Production and analysis of special high-purity acids purified by sub-boiling distillation. *Analytical Chemistry*, 44(12):2050-2056,1972.
9. J.A. Nóbrega, C. Pirola, *Think Green. Modern Approaches to Microwave-Assisted Digestion.* Milestone Srl, Sorisole, 2018.
10. R.C. Richter, D. Link, H.M. (Skip) Kingston, On-Demand Production of High-Purity Acids in the Analytical Laboratory. *Spectroscopy*, 15(1):38-40,2000.
11. M.L. Mello, L.L. Fialho, C. Pirola, J.A. Nóbrega, Evaluation of recycle and reuse of nitric acid from sample digests by sub-boiling distillation. *Microchemical Journal*,157:105080,2020.
12. R. Thomas, Trace Element Analysis in the Real World: Practical Considerations Driving ICP-MS Detection Performance, *Spectroscopy Virtual Symposium*, 2021.



Apéndice

PROCEDIMIENTOS

Purificación de ácido – duoPUR

| |
|---|
| HNO ₃ : 45% de potencia aprox. 60 ml/h (ciclo de 4h) |
| HCl: 35% de potencia aprox. 50 ml/h (ciclo de 4h) |

Limpieza del reactor – traceCLEAN

| | |
|------------------|----------|
| Tiempo total | 01:30:00 |
| Temperatura | 240 °C |
| Volumen de ácido | 500 ml |

Procedimiento de digestión en ultraWAVE 3

- Pre-carga de presión (N₂): 40 bar
- Temperatura de enfriamiento (líquido en el recirculador): 8 °C
- Enfriamiento del vaso activad por debajo de los 40 °C
- Liberación de presión por debajo de 80 °C
- Taza de liberación de presión: 8 bar/min

Programa de microondas:

| | <i>Tiempo</i> | <i>Temp (T1)</i> | <i>Temp (T2)</i> | <i>P</i> | <i>Potencia</i> |
|----------|---------------|------------------|------------------|----------|-----------------|
| 1 | 00:20:00 | 250 °C | 60 °C | 130 bar | 1500 W |
| 2 | 00:15:00 | 250 °C | 60 °C | 130 bar | 1500 W |

Procedimiento de digestión para el ETHOS UP, MAXI-24 HP

Programa de microondas:

| | <i>Tiempo</i> | <i>Temperatura</i> | <i>Potencia</i> | <i>Ventilación</i> |
|----------|---------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| 1 | 00:20:00 | 210 °C | 1800 W | *** |
| 2 | 00:15:00 | 210 °C | 1800 W | *** |
| 3 | 00:20:00 | Enfriamiento | | *** |



Cuantificación

Instrumentación analítica: ICP-MS de triple cuadrupolo

Parámetros instrumentales:

| Parámetros | Settings |
|----------------------------------|-------------------------------------|
| Potencia del plasma RF | 1.55 kW |
| Conos | Conos de Pt |
| Flujo de gas nebulizador | 1.05 l/min |
| Flujo de gas auxiliar | 0.8 l/min |
| Flujo de enfriamiento | 14 l/min |
| Inserto | Alta matriz |
| Profundidad de muestreo | 8 mm |
| Velocidad de la bomba | 15 rpm |
| Ciclo de autodilución de muestra | 2 mL |
| Flujo CRC | SQ-KED: 4.85 ml/min |
| | TQ-02: 0.34 ml/min |
| Tiempo de integración | As y Hg 200 ms; Cd 100 ms; Pb 50 ms |
| Replicas | 3 |
| Estándares internos | 45 Sc 100 ppb |
| | 73 Ge 100 ppb |
| | 103 Rh 10 ppb |
| | 193 Ir 10 ppb |
| Cálculo del estándar interno | Interpolación |



MILESTONE
H E L P I N G
C H E M I S T S



WWW.MILESTONESRL.COM

MILESTONE Srl - Via Fatebenefratelli, 1/5 - 24010 Sorisole (BG) - Italy
Tel: +39 035 573857 - Fax: +39 035 575498
www.milestonesrl.com - email: analytical@milestonesrl.com

MILESTONE INC. - 25 Controls Drive - Shelton, CT 06484 - USA
Tel: (203) 925-4240 - Toll-free: (866) 995-5100 - Fax: (203) 925-4241
www.milestonesci.com - email: mwave@milestonesci.com

MILESTONE GENERAL K.K. - KSP, 3-2-1, Sakado - Takatsu-Ku,
Kawasaki 213-0012 - Japan - Tel: +81 (0)44 850 3811 - Fax: +81 (0)44 819 3036
www.milestone-general.com - email: info@milestone-general.com

MLS GmbH - Auenweg 37 D-88299 Leutkirch im Allgau - Germany
Tel: +49 (0)7561 9818-0 - Fax: +49 (0)7561 9818-12
www.mLs-mikrowellen.de - email: mws@mLs-mikrowellen.de