PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Determinación de Pb(II), Zn(II) en cervezas artesanales de Quito, mediante Voltametría de Redisolución Anódica

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Químicas con Mención en Química Analítica

Presenta: RICARDO ANDRÉ BORJA VERA

Quito, 2019

CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, con mención en Química Analítica del Sr. Ricardo André Borja Vera ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Ph.D. Patricio Espinoza-Montero
Director de Disertación
Quito, 04 de febrero de 2019

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi familia, en especial a mi madre y mi hermana que me ayudaron a seguir adelante en mi tesis.

También agradezco a Dios que me iluminó el camino para acabar mi tesis.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por haber estado conmigo y paciente durante la elaboración de mi tesis, a mi hermana Maribel por presionarme para seguir adelante en mi tesis, a mi padre y a mi hermano Leonardo por ser un apoyo emocional.

A la Escuela de Ciencias Químicas, perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por proporcionarme los laboratorios con instrumentos necesarios para la realización de mi tesis, en especial al Mtr. Pablo Pozo por ayudarme en mis momentos difíciles para mis experimentos. Al igual, quiero agradecerle al Dr. Patricio Carrera de Hidroecuador por ayudarme a realizar los análisis de mis electrodos con el SEM; al Lcdo. David Romero del CESAQ, por el análisis de Pb(II) y Zn(II) en cervezas por AAS; y a los doctores Alexis Debut y Carlos Arroyo del CENCINAT de la ESPE, por los análisis por el AFM.

A mi director de tesis Dr. Patricio Espinoza por haber estado conmigo en mi tesis desde el inicio hasta el fin en todo mi trabajo. También agradezco a la Mtr. Verónica Carrera, por darme la motivación necesaria para no desistir en mi trabajo de tesis; a la Dra. Lennys Fernández, por ser un apoyo adicional al proporcionarme ayuda extra en mi trabajo de tesis; a la Mgt. Eliza Jara, por exigirme al máximo para no tener vacíos en mis conocimientos para mi futuro profesional; y al Mtr. David Chúquer y a la Mtr. María Fernanda Pilaquinga por darme buenos consejos para acabar bien mi tesis.

Con respecto a mis amistades, le agradezco a mis amigos que me apoyaron y me dieron soporte para seguir adelante, sobre todo quienes trabajaron conmigo en el laboratorio donde trabajaba, y ellos son los siguientes: a Marjorie Montero, Karol Sigcha, Karlita Montenegro, Diego Bolaños y Dayana Cisneros. También a mis amigos de la universidad con quienes he convivido toda mi vida universitaria, sobre todo a David Leiva, Nicolay Torres, Dianita Loaiza, Leonardo Bustamante y Dominique Aldaz, quienes fueron pacientes conmigo y me apoyaron en toda mi vida estudiantil.

TABLA DE CONTENIDOS

PORTADA i
CERTIFICACIÓN ii
DEDICATORIA iii
AGRADECIMIENTOS iv
TABLA DE CONTENIDOS v
LISTA DE TABLAS ix
LISTA DE FIGURAS x
LISTA DE ANEXOS xii
RESUMEN 1
ABSTRACT 3
INTRODUCCIÓN 5
CAPÍTULO I 8
1. MARCO TEÓRICO 8
1.1 CERVEZA 8
1.2. LÚPULO 8
1.3 MALTA 8
1.3 CEREALES AUXILIARES 8
1.4 AGUA 8
1.5 PROCESO DE ELABORACIÓN 9
1.5.1 MOLIENDA 9
1.5.2 MACERACIÓN Y FILTRACIÓN 9
1.5.3 COCCIÓN Y ADICCIÓN AL LÚPULO AL MOSTO 9
1.5.4 FERMENTACIÓN Y GUARDA 9
1.5.5 FILTRACIÓN 10
1.5.6 ESTABILIZACIÓN Y ALMACENAMIENTO 10
1.5.7 PASTEURIZACIÓN Y ENVASADO 10
1.5.8 CALIDAD DE LA CERVEZA 10
1.6 IMPORTANCIA DEL ANÁLISIS DE LA CERVEZA 10
1.7 LA CERVEZA ARTESANAL 11
1.8 LA CERVEZA ARTESANAL EN EL ECUADOR 11
1.9 MINERALES 11

1.9.1 PLOMO, Pb(II)..... ..12
1.9.2 ZINC, Zn(II)..... ..12
1.10 MATERIAL DE LOS ELECTRODOS..... ..12
1.10.1 DIAMANTE DOPADO CON BORO (BDD)..... ..12
1.10.2 CARBONO TETRAHÉDRICO AMORFO DOPADO CON NITRÓGENO (*ta* – C:N)..... ..13
1.11 TRANSFERENCIA DE MASA..... ..14
1.11.1 MIGRACIÓN DE IONES..... ..14
1.11.2 DIFUSIÓN..... ..14
1.11.3 CONVECCIÓN..... ..14
1.12 OBJETIVOS..... ..15
1.12.1 OBJETIVO GENERAL..... ..15
1.12.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... ..15
CAPÍTULO II..... ..16
2. MATERIALES Y MÉTODOS..... ..16
2.1 MUESTREO ALEATORIO SIMPLE..... ..16
2.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA MEDIOS ELECTROLÍTICOS..... ..16
2.2.1 KCl 0,1 mol L^{-1}; pH = 1..... ..16
2.2.2 KCl 0,5 mol L^{-1}; pH = 1..... ..16
2.2.3 $K_3Fe(CN)_6$ 4 mmol L^{-1}..... ..17
2.2.4 SOLUCIÓN BUFFER ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SODIO 0,1 mol L^{-1} ..17
2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS..... ..17
2.3.1 MICROSCOPÍA DE BARRIDO ELECTRÓNICO (SEM)..... ..17
2.3.1.1 INSTRUMENTACIÓN Y ANÁLISIS..... ..18
2.3.2 MICROSCOPÍA POR FUERZA ATÓMICA (AFM)..... ..18
2.3.2.1 INSTRUMENTACIÓN Y ANÁLISIS..... ..19
2.3.3 VOLTAMETRÍA O VOLTAMPEROMETRÍA..... ..19
2.3.4 VOLTAMETRÍA CÍCLICA..... ..20
2.3.4.1 METODO POR VOLTAMETRÍA CÍCLICA..... ..21
2.3.4.1.1 CAPACITANCIA DE DOBLE CAPA..... ..21
2.3.4.1.2 COMPORTAMIENTO DE TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA..... ..22
2.4 DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL Pb(II) Y Zn(II)..... ..23
2.4.1 VOLTAMETRÍA POR PULSOS..... ..23
2.4.1.1 VOLTAMETRÍA POR PULSO DIFERENCIAL..... ..23

2.4.1.1.1 VOLTAMETRÍA DE REDISOLUCIÓN 25
2.4.1.1.2 INSTRUMENTACIÓN..... ..27
2.4.1.1.3 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL ASV 28
2.4.1.1.4 CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS METALES EN CERVEZA ARTESANAL POR DPASV, EN EL BDD Y *ta* – C:N. ..29
2.5 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE CERVEZA ARTESANAL PARA EL ANÁLISIS POR DPASV Y FAAS..... ..30
2.6 VALIDACIÓN DE UN MÉTODO..... ..31
2.6.1 LINEALIDAD..... ..31
2.6.2 RANGO LINEAL O RANGO DE TRABAJO..... ..31
2.6.3 SENSIBILIDAD..... ..31
2.6.3.1 PREPARACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN POR ADICIÓN ESTÁNDAR..... ..32
2.6.4 LÍMITE DE DETECCIÓN..... ..32
2.6.5 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN 33
2.6.5.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN CUANTIFICACIÓN DEL DPASV 33
2.6.6 PRECISIÓN 33
2.6.7 REPETIBILIDAD DEL MÉTODO 34
2.6.8 REPRODUCIBILIDAD..... ..34
2.6.9 EXACTITUD 35
2.6.9.1 PREPARACIÓN DE FORTIFICACIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRECISÍON (REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD) Y EXACTITUD DEL MÉTODO..... ..35
2.6.10 ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (AAS)..... ..36
2.6.10.1 DETERMINACIÓN DE Pb(II) Y Zn(II) EN CERVEZA ARTESANAL POR FAAS..... ..37
2.7 CUANTIFICACIÓN POR ADICIÓN ESTÁNDAR..... ..38
2.8 COMPARACIÓN DE MÉTODOS (DPASV *vs* FAAS)..... ..38
CAPÍTULO III 39
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... ..39
3.1 CARACTERIZACIÓN POR SEM DE LOS ELECTRODOS DE BDD Y *ta* – C:N ..39
3.2 CARACTERIZACIÓN POR AFM DE LOS ELECTRODOS DE *ta* – C:N Y BDD ..40
3.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS POR VOLTAMETRÍA CÍCLICA 40

3.3.1 VENTANA DE POTENCIAL DE TRABAJO 40
3.3.2 CAPACITANCIA DE DOBLE CAPA 41
3.3.3 TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA DEL ELECTRODO 43
3.4 DETERMINACIÓN DE Pb(II) Y Zn(II) 48
3.4.1 OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA DETECCIÓN DEL Pb(II) Y Zn(II) SOBRE EL *ta* – C:N POR DPASV 48
3.4.1.1 POTENCIAL DE PULSO 48
3.4.1.2 POTENCIAL DE DEPOSICIÓN (PRE – CONCENTRACIÓN) 49
3.4.1.3 TIEMPO DE DEPOSICIÓN 49
3.4.1.4 EFECTO DEL ELECTROLITO DE SOPORTE 50
3.4.1.5 EFECTO POR DÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO 51
3.4.2 DETERMINACIÓN DE Pb(II) Y Zn(II) EN BDD 52
3.4.2.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN DEL Pb(II) Y Zn(II) SOBRE BDD 52
3.4.2.2 LINEARIDAD 53
3.4.2.3 LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL Pb(II) Y Zn(II) 53
3.4.2.4 EFECTO MATRIZ 55
3.4.2.5 PRECISIÓN (REPETIBIDAD Y REPRODUCIBILIDAD) Y EXACTITUD ..56
3.4.2.6 RESUMEN DE LOS PARÁMETROS ANALÍTICOS DE VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE Pb(II) y Zn(II) POR DPASV EN BDD 60
3.4.3 DETERMINACIÓN DE Pb(II) Y Zn(II) POR FAAS 61
3.4.3.1 CURVAS DE CALIBRACIÓN DE Pb(II) y Zn(II) POR FAAS 61
3.4.3.2 CONTENIDO DE Pb(II) Y Zn(II) EN CERVEZAS ARTESANALES POR FAAS 62
3.4.7 CONTENIDO DE Pb(II) Y Zn(II) EN CERVEZAS ARTESANALES POR DPASV EN BDD 64
3.5 COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE Pb(II) Y Zn(II), OBTENIDO CON EL MÉTODO DE DPASV, CON RESPECTO AL MÉTODO DE FAAS 67
CAPÍTULO IV 69
4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 69
4.1 CONCLUSIONES 69
4.2 RECOMENDACIONES 69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 71
ANEXOS 77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Estudios realizados para la determinación de Pb(II) y Zn(II) en cerveza 6
Tabla 2. Condiciones experimentales para la determinación de Pb(II) en la cerveza artesanal por DPASV 29
Tabla 3. Condiciones experimentales para la determinación de Zn(II) en la cerveza artesanal por DPASV 30
Tabla 4. Resumen de los datos de la Voltametría Cíclica del $K_3Fe(CN)_6$ en los electrodos de BDD 46
Tabla 5. Resumen de los datos de la Voltametría Cíclica del $K_3Fe(CN)_6$ en los electrodos de *ta* – C:N 46
Tabla 6. Límites de Detección y Cuantificación del Pb(II) y Zn(II) en BDD 53
Tabla 7. Resultados de la determinación de la Repetibilidad y los Porcentajes de Recuperación del Pb(II) en cerveza artesanal con el BDD 56
Tabla 8. RSD de los Porcentajes de Recuperación del Pb(II) para la determinación de la Reproducibilidad en BDD 57
Tabla 9. Resultados de la determinación de la Repetibilidad y los Porcentajes de Recuperación del Zn(II) en cerveza artesanal con el BDD 58
Tabla 10. RSD de los Porcentajes de Recuperación del Zn(II) para la determinación de la Reproducibilidad en BDD 59
Tabla 11. Parámetros Analíticos de Validación para Pb(II) y Zn(II) por DPASV en BDD 60
Tabla 12. Contenido de Pb(II) en diferentes cervezas artesanales por FAAS..... 62
Tabla 13. Contenido de Zn(II) en diferentes cervezas artesanales por FAAS. 63
Tabla 14. Contenido de Pb(II) en diferentes cervezas artesanales por DPASV en BDD 64
Tabla 15. Contenido de Zn(II) en diferentes cervezas artesanales por DPASV en BDD 65
Tabla 16. Comparación del contenido de Pb(II) obtenido en DPASV y FAAS 67
Tabla 17. Comparación del contenido de Zn(II) obtenido en DPASV y FAAS 68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular de la superficie del BDD (Liu *et al.*, 2016) 13
Figura 2. Estructura molecular de la superficie del *ta* – C:N (Crystallography365, 2014) 13
Figura 3. Voltamperograma cíclico del $K_3Fe(CN)_6$ 6 mmol L^{-1} en KNO_3 1 mol L^{-1}, proveniente de su forma de onda de tiempo vs potencial (Kissinger y Heineman, 1983) 20
Figura 4. Diferentes tipos de señal por cada tipo de técnicas voltamperométricas (Skogg *et al.*, 2014) 23
Figura 5. Señales de excitación en la DPV (BioLogic Science Instruments, 2019)..... 24
Figura 6. Señal analítica de la voltametría por pulso diferencial (Skogg *et al*., 2014) 24
Figura 7. Proceso de medición por DPV: (a) Obtención de la señal de DPV (E *vs.* tiempo) y (b) Medición de Fe(II) por DPV (Corriente *vs.* E) 25
Figura 8. Pasos de la Voltametría de Redisolución Anódica: a) preconcentración y b) redisolución 26
Figura 9. Señal de excitación para la obtención de voltamperogramas del Cadmio y Cobre (Skogg *et al.*, 2014) 27
Figura 10. Esquema de circuito eléctrico de una celda de tres electrodos (Skogg *et al., 2014*) 28
Figura 11. Equipo de absorción atómica 36
Figura 12. Imágenes SEM de los electrodos de: a) BDD con tamaño de 8 µm, escala de 22,5 µm y voltaje de 15 kV y b) *ta* – C:N con tamaño de 10 µm, escala de 42,4 µm y resolución de 15 kV 39
Figura 13. Imágenes AFM: a) *ta* – C:N y b) BDD 40
Figura 14. Voltametría cíclica de los electrodos de BDD y *ta* – C:N en KCl 0,1 mol L^{-1}, pH = 1. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1} 41
Figura 15. Voltamperogramas cíclicos en KCl 0,1 mol L^{-1} a pH = 1, en función de la velocidad de barrido de 25, 50, 75, 100 y 125 mV s^{-1}, de: a) BDD y b) *ta* – C:N 42
Figura 16. Curva de la densidad de corriente *vs.* la velocidad de barrido para la determinación de la capacitancias, para el BDD y el *ta* – C:N. 43
Figura 17. Voltamperogramas cíclicos del BDD en $K_3Fe(CN)_6$ 4 mmol L^{-1} en KCl 0,1 mol L^{-1}, pH = 1. Velocidad de barrido = 100 mV s^{-1} 44
Figura 18. Voltamperogramas cíclicos para el $K_3Fe(CN)_6$ 4 mM para las siguientes velocidades de barrido: 10, 25, 50, 75 y 100 mV s^{-1} del: a) BDD y b) *ta* – C:N 44

Figura 19. Estudio comparativo de las curvas de diagnóstico voltamétrico del comportamiento anódico y catódico del sistema Redox del $K_3Fe(CN)_6$, en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido del BDD y *ta* – C:N 45
Figura 20. Voltamperogramas de pulso diferencial, a 120 s de tiempo de deposición y -1 V, del: a) Pb(II) 1 mg L^{-1} y b) Zn(II) 1,25 mg L^{-1} en acetato de pH de 4,5, en función del potencial de pulso y en el electrodo de *ta* – C:N 48
Figura 21. Voltamperogramas de pulso diferencial, a 120 s de tiempo de deposición, en función del potencial de deposición del: a) Zn(II) 1,25 mg L^{-1} y b) Pb(II) 1 mg L^{-1}, en el *ta* – C:N 49
Figura 22. Voltamperograma de pulso diferencial, a 1V, de la señal del: a) Zn(II) 1,25 mg L^{-1} y b) Pb(II) 1 mg L^{-1}, Acetato 0,1 mol L^{-1} a pH de 4,5 en función del tiempo de deposición en *ta* – C:N..... 49
Figura 23. Voltamperogramas de pulso diferencial, a potencial de -1V y tiempo de deposición de 300s, por efecto del KCl 0,5 mol L^{-1}, pH 1 y Acetato pH 4,5 del: a) Zn(II) 1,25 mg L^{-1} y b) Pb(II) 1 mg L^{-1} en *ta* – C:N 50
Figura 24. Voltamperogramas de pulso diferencial de Pb(II) 1 mg L^{-1}, a potencial de -1V y tiempo de deposición de 300s, en función de los días en: a) KCl 0,5 mol L^{-1}, pH = 1 y b) Acetato pH = 4,5 en *ta* – C:N 51
Figura 25. Voltamperogramas pulso diferencial, a distintas concentraciones del: a) Pb(II) y b) Zn(II) en BDD 52
Figura 26. Curvas de calibración, por DPASV, en BDD de Pb(II) y Zn(II) 53
Figura 27. Curvas de Calibración, normal y con efecto matriz, por DPASV en BDD, del: a) Pb(II) y b) Zn(II)..... 55
Figura 28. Curvas de calibración para FAAS en: a) Pb(II) y b) Zn(II) 61

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Parámetros de análisis de una cerveza corriente (Campbell, 2009)..... 77
Anexo 2. Tamaños del lote y de la muestra según la NTE INEN 2340 para las bebidas alcohólicas 78
Anexo 3. Cálculo de los límites de detección y cuantificación del Pb(II) en el método de DPASV 80
Anexo 4. Cálculo de los límites de detección y cuantificación del Zn(II) en el método de DPASV 82
Anexo 5. Cálculos para determinar la concentración de Pb(II) en cerveza a partir de la ecuación de la curva 84
Anexo 6. Cálculos para determinar la concentración de Pb(II) en cerveza a partir de la ecuación de la curva 85
Anexo 7. Pruebas t de Student para: a) Pb(II) y b) Zn(II) 86
Anexo 8. Voltamperogramas del Pb(II) para la determinación de la exactitud y precisión del método, a concentraciones de 0,375 y 0,875 mg L^{-1}, en 3 días 87
Anexo 9. Voltamperogramas del Zn(II) para la determinación de la exactitud y precisión del método, a concentraciones de 0,4 y 0,875 mg L^{-1}, en 3 días 88
Anexo 10. Voltamperogramas de Pb(II), fortificadas con 80 mg L^{-1} de Pb(II), para la determinación de su contenido en 6 muestras de cerveza artesanal 89
Anexo 11. Voltamperogramas de Zn(II), fortificadas con 70 mg L^{-1} de Zn(II), para la determinación de su contenido en 6 muestras de cerveza artesanal 90
Anexo 12. NTE INEN 2262: Bebidas Alcohólicas. Cerveza. Requisitos 91

RESUMEN

En este trabajo de investigación se llevó a cabo un estudio de la cuantificación de Pb(II) y Zn(II) en seis marcas de cervezas artesanales comercializadas (A, B, C, D, E y F) de la ciudad de Quito, mediante Voltametría de Redisolución Anódica con Pulso Diferencial (DPASV, por sus siglas en inglés), empleando electrodos de Diamante Dopado en Boro (BDD, por sus siglas en inglés) y Carbono Tetrahédrico Amorfo Dopado con Nitrógeno (ta – C:N) como electrodos de trabajo.

La caracterización de los electrodos se realizó mediante Microscopía de Barrido Electrónico (SEM), Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) y electroquímicamente mediante Voltametría cíclica. Posteriormente se procedió a validar el método DPASV para la detección de Pb(II) y Zn(II). Se estudió la presencia de Pb(II) y Zn(II) en las 6 marcas de cervezas artesanales propuesta mediante DPASV; las muestras fueron tomada en los sectores en Quito: La Foch, La Y y La Pradera. Los resultados obtenidos fueron validados con respecto a lo obtenido por espectroscopia de absorción atómica (AAS, por sus siglas en inglés), en un equipo certificado. Además, se verificó si las cervezas analizadas cumplen con la norma NTE INEN 2262.

Los resultados indican que el *ta* – C:N es incapaz de detectar Pb(II) y Zn(II) en las condiciones que fue probado, además, posee una corriente capacitiva muy alta y una superficie poco reactiva frente al ferricianuro de potasio, por lo que, se decidió no realizar los estudios con este electrodo. Para el caso del BDD se obtuvo señales muy bien definidas para la detección de Pb(II) y Zn(II), las curvas cumplen con parámetro de linealidad para ambos analitos, para el Pb(II) se logró cumplir mejores medidas con mayor precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y exactitud que para el Zn(II), por lo que, la técnica DPASV es recomendable solo para Pb(II). Con respecto al análisis de estos metales en las muestras de cerveza artesanal, la cerveza A tiene mayor contenido de Pb(II), 0,2740 mg L^{-1}; F tiene mayor contenido de Zn(II), 0,7056 mg L^{-1}, pero solo la cerveza F cumplió con la normativa NTE INEN 2262, un máximo contenido de 0,1 mg L^{-1} de Pb(II) y 1 mg L^{-1} de Zn(II) permitido respectivo. Sin embargo, al comparar con el método de AAS, se pudo determinar que hay más concordancia en las concentraciones obtenidas para Pb(II) que en el Zn(II), ya que no hubo diferencia significativa en el primero cuando se hizo la prueba estadística de t de student. Se puede concluir que el método de DPASV es confiable solo

para la determinación de Pb(II) en cervezas artesanales empleando cuando se emplea un electrodo de trabajo de BDD.

Palabras clave: Cerveza artesanal, Plomo, Zinc, Voltamperometría de Redisolución Anódica, Diamante Dopado en Boro, Carbono Tetrahédrico Amorfo Dopado con Nitrógeno.

ABSTRACT

In this research work was conducted a study of the quantification of Pb(II) and Zn(II) in six brands of commercial craft beers (A, B, C, D, E and F) of the city of Quito, by means of Anodic Stripping Voltammetry with Differential Pulse (DPASV), using electrodes of Diamond Dopped Boron (BDD) and Amorphous Tetrahedral Charcoal Nitrogen (ta - C:N) as working electrodes.

The characterization of the electrodes was performed by scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM) and electrochemically by cyclic voltammetry. Subsequently, the DPASV method was validated for the detection of Pb(II) and Zn(II). We studied the presence of Pb(II) and Zn(II) in the 6 brands of craft beers proposed by DPASV; Samples were taken in the sectors of Quito: La Foch, La Y and La Pradera. The results obtained were validated with respect to those obtained by atomic absorption spectroscopy (AAS), in a certified equipment. In addition, it was verified if the beers analyzed comply with the NTE INEN 2262 standard.

The results indicate that *ta* - C:N is incapable of detecting Pb(II) and Zn(II) in the conditions that were tested, besides, it has a very high capacitive current and a surface that is not reactive against potassium ferricyanide, what, it was decided not to carry out the studies with this electrode. In the case of the BDD very well defined signals were obtained for the detection of Pb(II) and Zn(II), the curves comply with the linearity parameter for both analytes, for the Pb(II) it was possible to make better measurements with greater precision (repeatability and reproducibility) and precision than for Zn(II), therefore, the DPASV technique is recommended only for Pb(II). With respect to the analysis of these metals in samples of craft beer, beer A has a higher content of Pb(II), 0.2740 mg L^{-1}; F has a higher content of Zn(II), 0.7056 mg L^{-1}, but only beer F met the standard NTE INEN 2262, a maximum content of 0.1 mg L^{-1} of Pb(II) and 1 mg L^{-1} of Zn(II) allowed respectively. However, when compared with the AAS method, it could be determined that there is more agreement in the concentrations obtained for Pb(II) than in Zn(II), since there were no significant differences in the first one when the statistical test of t student was carried out. It can be concluded that the DPASV method is reliable only for the determination of Pb(II) in craft beers when a BDD work electrode is used.

Key words: Craft beer, Lead, Zinc, Anodic Stripping Voltammetry, Boron Doped Diamond, Tetrahedral Amorphous Carbon Doped Nitrogen

INTRODUCCIÓN

La cerveza es una bebida alcohólica proveniente de la fermentación de la cebada, que se caracteriza por su sabor amargo, elaborada de manera artesanal o industrial. Actualmente, la cerveza artesanal tiene una gran importancia en el Ecuador debido a que la población consume como bebida de moderación, por lo que, existen varias empresas que se encargan de producir y de venderla a nivel nacional. En el país existen 55 microcervecerías registradas en Quito, Guayaquil, Cuenca, Manta, Loja e Ibarra (Jiménez, 2016).

En los primeros estudios de cuantificación de trazas metálicas en cerveza se realizó en cervezas brasileñas mediante ICP-AES, con la finalidad de conocer cómo éstos influyen en la calidad de la cerveza y estudiar su toxicidad (Matusiewicz y Kopras, 1997). Sin embargo, esta técnica es costosa y se busca técnicas alternativas de bajo costo que permitan la determinación de los metales pesados en cerveza artesanal.

Actualmente no se han desarrollado muchos trabajos investigativos con respecto a la calidad de la cerveza artesanal en el Ecuador, a pesar de ser un tema de interés social, sobre todo con respecto a la elaboración y su contaminación por metales durante el proceso de elaboración. Por tanto, es importante hacer un estudio de la presencia de metales pesados en estas bebidas para ver si cumplen con las normativas establecidas según el INEN, ya que su toxicidad puede ocasionar efectos nefastos en la salud de los consumidores (Gigliarelli, 2014).

La presencia de metales en la cerveza puede originarse por varias fuentes mencionadas a continuación: la materia prima, que depende de su calidad para la elaboración de la cerveza; el uso de aditivos que ya contengan residuos de trazas metálicas al momento de mejorar el proceso de fermentación y maduración de la cerveza; y la contaminación del equipamiento de la elaboración de la cerveza, que contribuyen con la deposición de metales a causa de la corrosión del material donde se elaboró la cerveza (Pohl, 2009).

Algunos estudios de la determinación de metales pesados en cerveza se han realizado anteriormente, mediante varias técnicas detalladas en la tabla descrita a continuación:

Tabla 1. Estudios realizados para la determinación de Pb(II) y Zn(II) en cerveza

Analito	Lugar de estudio	Técnica	LD (mg L^{-1})	LC (mg L^{-1})	Referencia
Pb^{+2}	México	DPP-ASV con electrodo de mercurio	0,026	0,087	Zapata-Flores, *et al*., 2016
	Marruecos	SW-ASV con electrodo de película de bismuto	0,00027	N/A	Ghanjaoui *et al*., 2012
	Brasil	AAS de llama	0,0075	N/A	Alves *et al*., 2011
Pb^{+2}, Zn^{+2}	Brasil	AAS de llama con flujo de termospray	0,0016 (Pb) y 0,0009 (Zn)	0,0052 y 0,0031	Nascentes *et al*., 2005
	Reino Unido	AAS de llama	N/A	N/A	Weiner *et al*., 1965
	Brasil	ICP - OES	0,010 (Pb) y 0,025 (Zn)	N/A	Matsushige y Oliveira, 1993

Por lo indicado anteriormente, en este trabajo de investigación se propone analizar el contenido de Pb(II) y Zn(II) en seis marcas de cervezas artesanales comercializadas en Quito, el estudio será por triplicado, mediante voltametría de redisolución anódica por pulso diferencial (DPASV, por sus siglas en inglés). La DPASV es una técnica analítica más sensible y económica que la espectrofotometría de absorción atómica (AAS) y la espectrofotometría de emisión atómica con plasma inducido (ICP – OES). Las técnicas electroquímicas tienen las ventajas sobre otras técnicas instrumentales debido a que son: rápidas, económicas, portables, tratamiento de las muestras sencillos y límites de detección bajos (del orden de nanomolar) (Ibanez *et al*., 2008).

Esta disertación está desglosada en el marco teórico, que abarca toda la teoría científica que involucra este estudio; la parte experimental, que describe varios protocolos

para el tratamiento de los analitos antes de hacer el análisis por voltametría de redisolución anódica por pulso diferencial; los resultados y discusión, que detalla los datos relevantes en cuanto a la cuantificación de los metales pesados en las cervezas artesanales; y las conclusiones en función de los objetivos a lo que se quiere llegar este trabajo.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

Es importante conocer algunos términos que nos ayudarán a familiarizarnos con el tema a desarrollarse y que se detallan a continuación:

La cerveza es una bebida alcohólica de moderación obtenida a partir de la infusión de la cebada y saboreada con lúpulo, para darle un sabor amargo a la bebida. La elaboración de la cerveza se remonta desde hace más de 6000 años, cuyas prácticas actuales son similares a las empleadas en los primeros tiempos, aplicando principios bioquímicos y microbiológicos para su elaboración (Potter y Hotchkiss, 2007).

El lúpulo es una planta que contiene resinas y aceites esenciales en sus flores que aportan con amargor y un aroma agradable en la cerveza. Esta planta también aporta con la coloración de la cerveza al tener taninos en su composición. Además, aumenta la estabilidad de la espuma de la cerveza.

La malta es el grano de cebada, el ingrediente más importante en la elaboración de la cerveza. La germinación de este grano activa enzimas que transforman los almidones de la cebada malteada y otros granos en azucares, que son hidrolizados fácilmente por la levadura, ya que no se puede utilizar directamente el almidón de los granos de cereales para transformarlo químicamente en etanol y dióxido de carbono.

Cereales Auxiliares. **-** Para aportar con carbohidratos suplementarios a la cerveza, se requieren otros cereales que contengan almidón (maíz, arroz, etc.), para que se conviertan en azúcar listo para la fermentación. Sin estos cereales, se produciría una cerveza de sabor fuerte, debido a que quedarían carbohidratos sin fermentar.

Agua. - El agua actúa como disolvente y es uno de los principales ingredientes de la cerveza, ya que ayuda a la disolución de todos los componentes de esta bebida alcohólica; pero esta debe cumplir con ciertos parámetros para que sea apto para su consumo y no tengan reacciones colaterales con los otros componentes de la cerveza. (Housecroft y Sharpe, 2006).

PROCESO DE ELABORACIÓN DE LA CERVEZA ARTESANAL

Molienda. **-** Ésta etapa consiste en la trituración de los granos crudos de la malta, mediante el uso de molinos de rodillos, para disolver los sacos de almidón de la malta en agua caliente y obtener su harina (Jeantet *et at*., 2007; Aftyka, 2018)

Maceración y filtración. **-** La siguiente etapa consiste en la combinación de la cebada malteada, el agua y los cereales que contengan almidón, para que éstos componentes absorban agua y se conviertan en gel, para extraer las sustancias fácilmente solubles del grano de malta y permitir que las enzimas diásticas realicen la hidrólisis enzimática, obteniendo como productos dextrinas y maltosa de la malta (González, 2017). Este calentamiento permite que las amilasas y proteinasas específicas actúen antes de su desactivación por el calor, permitiendo la separación del mosto del residuo de los granos molidos.

Cocción y adición del lúpulo al mosto. **-** Se añade lúpulo al mosto y se somete estos igredientes a cocción en la caldera de lupulado, para estabilizar la mezcla con la destrucción de la flora microbiana, desarrollar el color y sabor de la misma, y la eliminación de olores azufrados e isomerización de las α-humulonas del lúpulo a iso-humulona, y así potenciar su amargor. Después se lo enfría para que se dé la precipitación de los sólidos.

Fermentación y guarda. - Este paso consiste en la adición de la levadura *Saccharomyces* al mosto frío, que contiene oxígeno, azúcares fermentables y varios nutrientes, para que floculen y se recoja la levadura sedimentada del fondo del fermentador por decantación, obteniendo la cerveza con una concentración del 4,6% en porcentaje volumen/volumen de etanol (Campbell, 2009; García *et al*., 2004). Después se guarda el mosto para la maduración de la cerveza, que favorece la disolución del gas carbónico producido de la fermentación, la decantación de materias en suspensión y del afinado del sabor de la cerveza.

Filtración. - Después de completarse la fermentación y enfriada la cerveza, se filtra la misma, basándose en mecanismos de exclusión estérica y la afinidad química o exclusión

iónica por parte de las sustancias químicas, para retener las levaduras y las bacterias de la bebida.

Estabilización y almacenamiento. **-** Debido a la inestabilidad coloidal de la cerveza, se puede utilizar la adsorción con PVPP (polivinilpolipirrolidona), que es un polímero sintético capaz de formar complejos estables con sustancias polifenólicas de la cerveza, para evitar la turbidez en la cerveza tras la reacción entre sustancias proteicas y polifenoles. Además, se puede añadir a la cerveza dióxido de carbono para aumentar su volumen original, durante la fermentación y purgar la cerveza de oxígeno residual, que afecta negativamente a la vida útil del producto final. Luego se dispone a almacenar en un tanque para su refrigeración.

Pasteurización y envasado. - Luego de que la cerveza es almacenada en los tanques de refrigeranción se la somete al proceso de pulido final por filtración, para retirar las trazas de materiales suspendidos y darle una apariencia clara y cristalina. Y para evitar el crecimiento microbiano, por residuos de la levadura, se la pasteuriza a 60 °C, ya sea antes o después del envasado de la cerveza.

Calidad de la cerveza. - Después de terminar el proceso de la elaboración de la cerveza, se dispone a realizar un análisis químico del producto acabado, permitiendo determinar los parámetros específicos que tiene una cerveza comercial (Anexos 1 y 12).

IMPORTANCIA EN EL ANÁLISIS DE LA CERVEZA

La materia prima que se utiliza para la elaboración de la cerveza muchas veces tienen fuentes endógenas de metales, debido a que en su composición química se encuentran residuos de minerales, que puede variar según el sustrato que se utiliza para su elaboración

Además, los metales se depositan en la cerveza durante su proceso de elaboración, ya que se ve afectada por la contaminación del equipo de procesado o en la ingestión del metal por la acidez de la cerveza (pH = 4), que puede ser dañina para nuestro organismo en altas dosis. Por tanto, se tiene que hacer su respectivo control de calidad en las etapas de

procesamiento, sobre todo en las etapas de fermentación y maduración de la cerveza (Pohl, 2008).

La cerveza artesanal tiene características similares de la cerveza industrial tanto en su sabor como en los ingredientes que se utilizan para su elaboración. Sin embargo, la cerveza industrial utiliza aditivos alimentarios y emplea ciertos procesos para el control de microorganismos, como la pasteurización; mientras que, en la cerveza artesanal, su procesamiento es de tipo manual.

Además, durante la elaboración de la cerveza artesanal, el contenido de trazas de metales pesados depende de los parámetros del malteado, calentado, machacado de la materia prima para su elaboración; por lo que, puede influir en la concentración final de las trazas metálicas que puede contener la cerveza terminada, sobre todo en su proceso de filtración, que es el que ayuda a reducir el contenido de metales pesados peligrosos que puede tener esta bebida (Passaghe *et al*., 2015).

LA CERVEZA ARTESANAL EN EL ECUADOR

El boom de la producción de la cerveza artesanal en el Ecuador inicia en el 2011, cuando se crearon bares temáticos que elaboraban esta bebida para el consumo doméstico (Ramírez, 2015). Sin embargo, esto produjo que los estándares de calidad estén bajo la norma de calidad que piden los entes de control, incumpliendo ciertos parámetros como: una planta de elaboración con maquinaria adecuada, obtención de registros sanitarios, etiquetados etc. (Enríquez, 2014).

MINERALES

También son llamados nutrimentos inorgánicos, que son diversos elementos químicos, diferentes del C, H, O, N (Carbono, Hidrógeno, Oxígeno y Nitrógeno), encontrados en los alimentos y que son necesarios para asegurar el bienestar de las personas (Badui, 2013). Sin embargo, la presencia de alguno de éstos elementos químicos puede ser tóxicos si superan los niveles permitidos, sobre todo los metales pesados, que contaminan la

materia prima, que es resultado del riego de las plantas con agua contaminada en el procesado de los alimentos (Fennema *et al*., 2010).

Plomo (Pb). - Químicamente el plomo pertenece al grupo 14 y el periodo 6 de la tabla periódica, que tiene 4 electrones de valencia en su último nivel de energía, perteneciente al grupo de metales pesados. Además, este elemento químico es una sustancia neurotóxica que puede producir graves e irreversibles daños a la salud humana. Sus signos y síntomas producen problemas de comportamiento, anemia, daño renal que puede ocasionar la muerte (Fennema *et al*. 2010).

Zinc (Zn). - El zinc es un elemento de transición, localizado en el grupo 12 y periodo 4 de la tabla periódica. Este elemento se encarga del crecimiento de las células y la reparación de los tejidos (Pérez, 2014). Este metal se involucra en varias funciones en el cuerpo humano tales como: la producción de prostaglandina, mineralización del hueso, síntesis de ADN etc. (Izah *et al*., 2016). Sin embargo, un exceso de este metal puede ocasionar interferencia en el metabolismo del cobre y el hierro en nuestro organismo (Marín, 1998).

MATERIAL DE LOS ELECTRODOS DE TRABAJO

Electrodo de Diamante Dopado con Boro (BDD, por sus siglas en inglés)**.** - El diamante es una forma halotrópica del carbono que se caracteriza por su dureza, resistencia eléctrica alta, químicamente inerte, alta conductividad térmica y transparencia óptica. Químicamente, el átomo de boro substituye uno de los carbonos en la estructura cristalina del diamante, formando una silla en cada anillo mediante el uso de los orbitales híbridos – sp^3 de los carbonos del diamante (Fig. 1), durante su crecimiento al momento de hacer las películas de este material (*Xu et al*. 1997). Esta modificación del diamante durante su síntesis, hace que el material se vuelva conductor (el diamante puro no es conductor), y se pueda emplear como electrodo de trabajo.

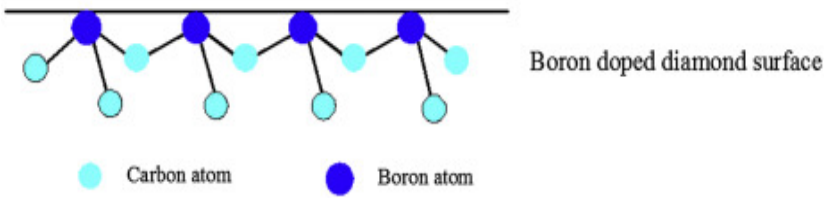


Figura 1. Estructura molecular de la superficie del BDD (Liu *et al.*, 2016)

Electroquímicamente, este material tiene una amplia ventana de potencial de trabajo, que está a un rango de -1,2 a 2,5 V, a comparación de otros materiales como el oro, platino y carbón vítreo, es decir es poco reactivo con el agua (la cinética de oxidación y reducción de agua es muy lenta); lo que lo vuelve un electrodo ideal para llevar a cabo estudios de oxidación o reducción de especies con altos potencial redox. Además, tiene una baja corriente de fondo (corriente capacitiva), lo cual implica una gran sensibilidad en la determinación electroquímica de los analitos a niveles traza y límites de detección muy bajos (Fraunhofer, 2015).

***Electrodo de Carbono Tetrahédrico Amorfo Dopado con Nitrógeno* (*ta* – C:N)**. - El ta – C:N es un material de carbono similar al diamante, que es un alótropo metaestable del carbón, compuesto por una mezcla de carbón hibridizado con enlaces $–sp^2$ y $–sp^3$, que es incorporado a una matriz amorfa y depositada con nitrógeno gaseoso, a presión baja, para incrementar la hibridación $–sp^3$ en su superficie y darle propiedades similares al diamante, tales como: su dureza y su inercia, tanto química como electroquímicamente hacia otros compuestos (Fig. 2) (*Zeng et al*., 2014).

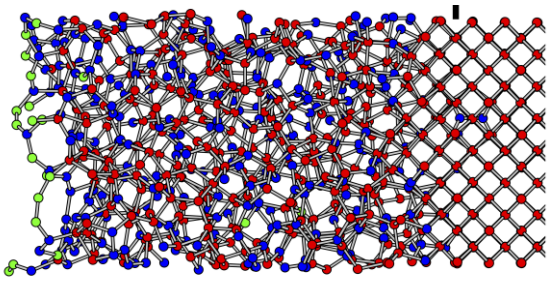


Figura 2. Estructura molecular de la superficie del *ta* – C:N (Crystallography365, 2014)

Electroquímicamente, se reportó una amplia ventana de potencial (-1,6 a 2,3 V) en determinadas soluciones electrolíticas como el $HClO_4$, donde los sobrepotenciales para la formación de hidrógeno y oxígeno son más largo que el BDD y tiene una actividad más

catalítica para la formación de ciertas sustancias como el Cl^-/Cl^2, por lo que este material es más efectivo para un análisis electroquímico que el BDD (Zeng *et al*., 2014).

TRANSFERENCIA DE MASA

Este fenómeno representa el movimiento de la materia en una disolución electrolítica, desde un punto a otro dentro de un sistema electroquímico, esto puede ser por:

Migración de iones. - Este fenómeno consiste en el movimiento de una especie cargada bajo influencia de un campo eléctrico (o de un gradiente de potencial eléctrico), entre el electrodo de trabajo y contraelectrodo.

Difusión. - Este fenómeno permite el movimiento de una especie cargado bajo influencia de un gradiente de concentración o diferencia de potencial químico (de mayor a menor concentración).

Convección. - Este fenómeno consiste en la acción hidrodinámica de una especie química en el medio electrolítico, de forma mecánica (flujo laminar o turbulento por agitación del electrodo de rotación) (Alegret *et al*., 2004).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar el contenido de metales pesados (Pb(II) y Zn(II)) en 6 marcas de cervezas artesanales provenientes de industrias quiteñas, con electrodos de Carbono Amorfo Tetraédrico Dopados con Nitrógeno (*ta* – C:N) y Diamante Dopado en Boro (BDD), mediante voltametría de redisolución anódica, para verificar si estas cumplen con la norma NTE INEN 2263.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Caracterizar los electrodos *ta* – C:N y BDD mediante AFM (por sus siglas en inglés), SEM (por sus siglas en inglés) y electroquímicamente, para conocer la topografía de las superficies de los electrodos, la morfología a nivel microscópico, y comprobar la respuesta electroquímica de estos respectivamente.

2.- Determinar la concentración de metales pesados Pb(II) y Zn(II) en seis marcas de cervezas artesanales, mediante voltametría de redisolución anódica de pulso diferencial, empleando electrodos de *ta* – C:N y BDD, y verificar si las cervezas cumplen con la norma NTE INEN 2262.

3.- Determinar la concentración de Pb(II) y Zn(II) de las seis marcas de cervezas artesanales mediante FAAS y contrastar con los valores obtenidos electroquímicamente

4.- Comparar el método electroquímico desarrollado con respecto al método tradicional de AAS por medio de la prueba estadística t de Student, para determinar si hay variación significativa en los resultados entre los dos métodos desarrollados y (validar el método electroquímico).

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

MUESTREO

Para determinar los lotes a analizar de las cervezas artesanales en estudio, se seleccionó diferentes lugares de comercialización como: supermercados, restaurantes y bares, en 3 zonas diferentes de la ciudad de Quito: La Foch, La Pradera y La Y.

Una vez escogidas las 3 zonas, se seleccionó un lote por cada zona y se llevó a cabo el muestreo de las cervezas artesanales, usando la norma NTE INEN 2340, para determinar la cantidad de muestras que se requirieron para su respectivo análisis electroquímico, como se muestra en el cuadro del Anexo 2.

PREPARACIÓN DE ELECTROLÍTOS

KCl 0,1 mol L^{-1}; pH = 1

Se pesó 0,745 g de KCl, de 99,99% de pureza marca Fisher, en un vaso de precipitación de 100 mL, se lo disolvió en agua destilada, se lo transvasó en un balón aforado de 100 mL, se adicionó 0,81 mL de HCl concentrado marca Fisher, hasta llegar a pH = 1, medido con un pH - metro Mettler Toledo y se lo aforó con agua destilada.

KCl 0,5 mol L^{-1}; pH = 1

Se pesó 37,25 g de KCl, de 99,99% de pureza marca Fisher, en un vaso de precipitación de 250 mL, se lo disolvió en agua destilada, se lo transvasó en un balón aforado de 1000 mL, se adicionó 41 mL de HCl concentrado marca Fisher, hasta llegar a pH = 1, medido con un pH - metro Mettler Toledo y se lo aforó con agua destilada.

$K_3Fe(CN)_6$ 4 mmol L^{-1}

Se pesó 8,45 mg de $K_3Fe(CN)_6$, 99,99% de pureza marca Fisher, en un vaso de precipitación de 50 mL, luego se lo disolvió y se lo aforó con KCl 0,1 mol L^{-1}, pH = 1 ya preparado, a un balón aforado de 10 mL.

SOLUCIÓN BUFFER ÁCIDO ACÉTICO/ACETATO DE SODIO 0,1 mol L^{-1} pH = 4,5

Se midió 7,82 mL de ácido acético glacial Merck, de porcentaje en peso del 100% y de densidad de 1,06 g mL^{-1}, se lo adicionó a un balón de 1 L y se lo aforó con agua destilada. Luego se le añadió acetato de sodio marca Loba Chemie poco a poco hasta obtener un pH de 4,5, que se obtuvo por medio del pH-metro Metter Toledo.

CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS

MICROSCOPÍA DE BARRIDO ELECTRÓNICO

La Microscopía de Barrido Electrónico (SEM, por sus siglas en inglés) es una técnica instrumental que permite obtener micrografías de materiales en el orden de micras o incluso angstroms con equipos muy sofisticados. Además de proporcionar imágenes, esta técnica puede generar datos fisicoquímicos de la muestra en estudio.

El funcionamiento se basa en hacer incidir un barrido de haz de electrones sobre la muestra. La muestra debe ser conductora, caso contrario esta debe ser recubierta con una capa muy fina de oro o carbón, lo que le concede propiedades conductoras. La preparación de las muestras de realiza mediante pulverización catódica, más conocido como “sputtering”.

Una vez que el haz alcanza la superficie de la muestra se generan partículas, principalmente: electrones retrodispersados (e1) y electrones secundarios (e2), incluyendo radiación electromagnética (rayos X) y otras partículas poco significativas. En su interior el

microscopio se encuentra equipado con detectores, que luego de recoger la energía, la transforman en imágenes y datos dependiendo del detector:

1.- Cuando el microscopio posee un detector de electrones secundarios (SEI, Secundary Electron Image) se logran imágenes de alta resolución.

2.- Cuando el microscopio posee un detector de electrones retrodispersados (BEI, Backscattered Electron Image) se logran imágenes con menor resolución, pero mayor contraste para alcanzar la topografía de la superficie.

3.- Cuando el microscopio posee un detector de energía dispersiva (EDS, Energy Dispersive Spectrometer) se logran detectar los rayos X generados, lo cual permite efectuar un análisis espectrográfico de la composición de la muestra (Vásquez y Echeverría, 2000; Egerton, 2016).

CARACTERIZACIÓN DEL *ta* – C:N Y BDD POR SEM

Para la obtención de las morfologías de los electrodos *ta* – C:N y BDD, se realizó una caracterización cualitativa directa, mediante el uso de un SEM de marca Phenom Pure. Para esto, se depositaron los microelectrodos, limpios y secos, en los portamuestras y se los analizó individualmente en el SEM, a un voltaje de 15 kV en el laboratorio de Investigación Hidroecuador en Sangolquí.

MICROSCOPIA POR FUERZA ATÓMICA (AFM)

La Microscopía de Fuerza Atómica (AFM por sus siglas en inglés) es una técnica instrumental que permite obtener imágenes de superficies a escala molecular, en que se basa en la medida de interacciones existentes entre una punta acabada de un átomo y la superficie que se quiere estudiar. Su funcionamiento se basa en el control del equipo mediante un ordenador de la fuerza ejercida por la punta durante el barrido.

En el modo denominado de contacto, la fuerza punta-muestra se mantiene constante mediante un sistema de retroalimentación, basado en los siguientes aspectos descritos a

continuación: la variación de la fuerza punta-muestra se traduce en movimientos verticales y horizontales del fleje, que permite hacer una variación del rayo láser incidente sobre él, que son recogidos por un fotodetector y analizados en un ordenador. La compensación del aumento o disminución de la fuerza punta-muestra permite enviar una señal a la parte piezoeléctrico del equipo, para acercar o alejar la muestra hacia la punta y la variación de la intensidad de la luz, controladas por el ordenador, dentro de un mapa topográfico de la superficie de interés (Ibañez, 2004).

CARACTERIZACIÓN DEL *ta* – C:N Y BDD POR AFM

Para la obtención de las topografías de los electrodos, se realizó una caracterización cualitativa directa de los electrodos secos, colocados en portamuestras, mediante el uso del microscopio de fuerza atómica Park Systems: AFM System, con un tamaño de barrido de 3 x 3 μm^2, en el laboratorio del CENCINAT de la ESPE (Khun *et al*., 2008).

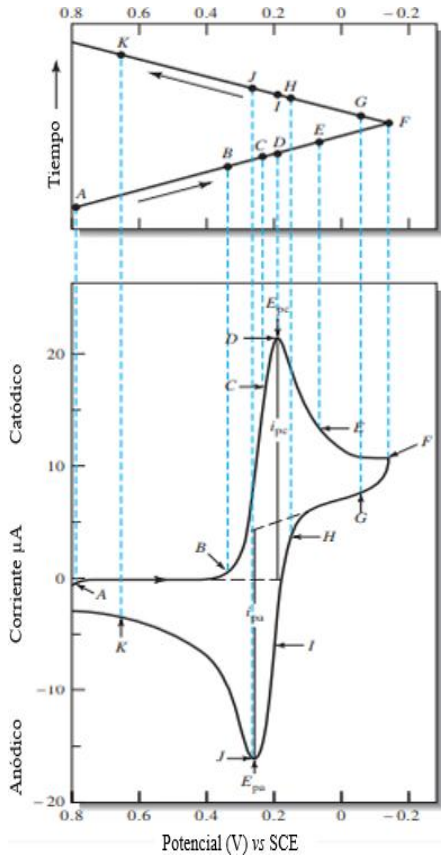
VOLTAMETRÍA O VOLTAMPEROMETRÍA

Consiste en la medición de la intensidad de corriente frente al potencial con la que se aplica al electrodo, el cual varía linealmente con el tiempo (barrido de potencial) entre dos valores límites. Hay varios tipos de métodos electroquímicos: la voltamperometría de barrido lineal, la voltamperometría cíclica, la voltamperometría de pulsos y la voltamperometría de redisolución. Estas técnicas nos ayudan para muchos estudios tales como: el estudio de la formación de una película sobre el electrodo y el estudio de la cinética de intermedios en reacciones químicas acopladas, etc.

Con respecto a los parámetros de este grupo de técnicas, se requiere los potenciales de reacción de inicio y de retorno, para determinar la fuerza impulsadora en la transferencia de electrones y el estado de oxidación de las especies químicas. Además, se necesita la velocidad de barrido para determinar el tiempo del proceso electroquímico, sobre todo en las reacciones homogéneas, ya que determina si hay formación o consumo de los intermedios, y en qué extensión.

VOLTAMETRÍA CÍCLICA

Es una técnica electroquímica cuantitativa y cualitativa, siendo una de las más utilizadas para sondear el comportamiento electroquímico de alguna especie que se requiera estudiar. Se la puede utilizar para medios acuosos y medios no acuosos (orgánicos). Sin embargo, para estudios cuantitativos no es tan utilizada, ya que existen técnicas más sofisticadas donde se puede eliminar la corriente de fondo o corriente capacitiva. Esta técnica consiste en realizar un barrido continuo de potencial desde un punto inicial (A de la Fig. 3), hacia un punto previamente programado (F de la Fig. 3), inmediatamente el barrido prosigue en sentido contrario desde el punto F hacia el punto A, completando un ciclo. En este trayecto, si es que existe una especie electroactiva, aparecerá una señal (un pico) de corriente, debido a la trasferencia de electrones, ya sea por la oxidación u reducción de una especie. En la parte inferior de la Fig. 3, se puede evidencia un proceso redox para el caso del ferricianuro de potasio.



A = Potencial inicial

B = Potencial de inicio de la reacción de oxidación (energía de activación)

C = Potencial de media onda de oxidación

D = Pico de corriente límite de la oxidación

E = Corriente de oxidación controlado por difusión

F = Potencial máximo del barrido oxidación previamente programado.

G = Potencial de barrido de reducción

H = Inicio del incremento de corriente catódica

I = Potencial de media onda de reducción

J = Pico máximo de reducción catódica

K = Corriente controlada por transferencia de masa.

Figura 3. Voltamperograma cíclico del $K_3Fe(CN)_6$, 6 mmol L^{-1} en KNO_3 1 mol L^{-1}, proveniente de su forma de onda de tiempo *vs* potencial (Kissinger y Heineman, 1983)

Desde el punto B hasta antes del punto D en la parte inferior de la Fig. 3, se observa que el aumento de la corriente es directamente proporcional al aumento del potencial, por lo que el proceso se puede decir que está controlado por la transferencia de carga (tranferencia de electrones). Sin embargo, al llegar el punto D, toda la especie electroactiva se ha consumido, y el proceso empieza a ser controlado por la trasferencia de masa, es decir seguirá habiendo reacción conforme la especie electroactiva vaya llegando a la superficie del electrodo. En este punto es muy importante recalcar, que la intensidad del pico es directamente proporcional a la concentración de la especie electroactiva. (Skoog *et al.*, 2014).

MÉTODO POR VOLTAMETRÍA CÍCLICA

Se utilizó una celda electroquímica de corazón de 3 electrodos: como electrodos de trabajo se emplearon ta – C:N y BDD (que recoge la corriente de la reacción de interés), como electrodo de referencia Ag/AgCl (que permite medir y controlar el potencial del electrodo de trabajo) y un contraelectrodo de grafito (para cerrar el circuito electroquímico).

Todos estos electrodos están conectados hacia el Potenciostato/Galvanostato PGSTAT204, Autolab Metrohm, empleando el software Nova 2.1.2 para procesar los datos analíticos obtenidos en cada determinación voltamperométrica.

Nota: Antes de realizar las determinaciones electroquímicas, se tiene que calibrar el equipo con una celda electroquímica llamada Dummycell, con la finalidad de evaluar el funcionamiento del potenciostato con la proporcionalidad de la corriente, en función del potencial aplicado (Metrohm, 2019).

CAPACITANCIA DE DOBLE CAPA

Para este estudio, se preparó una disolución de KCl 0,1 mol L^{-1}, pH = 1 con una ventana de potencial de -0,1 – 0,5 V, para los electrodos de estudio (ta – C:N y BDD), y a velocidades de barrido de 25, 50, 75, 100, y 125 mV s^{-1}, en donde se obtuvo los voltamerogramas respectivos (Yang, 2013). De las curvas obtenidas, se fija un valor de

potencial para tomar datos y graficar la curva de corriente *vs.* velocidad de barrido, y de esta curva se obtiene la capacitancia de acuerdo con la siguiente ecuación.

$$i_C = AxC_{cl} * v$$

Donde:

$i_C =$ corriente catódica máxima, $A =$ área electroactiva del electrodo, C_{cl} =capacitancia de doble capa del electrodo $y\ v =$ velocidad de barrido.

COMPORTAMIENTO DEL *ta* – C:N Y BDD EN LA TRANSFERENCIA DE CARGA

Para el estudio del comportamiento del *ta* – C:N y BDD frente a un sistema redox conocido, se preparó una disolución de $K_3Fe(CN)_6$ 5 mmol L^{-1} en KCl 0,1 mol L^{-1} con una ventana de potencial de -0,3 – 0,8 V, en BDD y a una ventana de potencial de -1,1 – 1 V en el *ta* – C:N, a velocidades de barrido de 10, 25, 50, 75 y 100 mV s^{-1}, para obtener los voltamperogramas respectivos. Posteriormente se grafica la curva de corriente *vs.* la raíz cuadrada de la velocidad de barrido, de acuerdo a la ecuación de Randles–Sevcik, la misma que nos permite conocer el comportamiento electroquímico de los electrodos.

$$i_p = (2{,}69x10^5)n^{\frac{3}{2}}ACo^*_{ox}D^{\frac{1}{2}}_{ox}v^{\frac{1}{2}}$$

Donde: i_p= Corriente máxima de oxidación/reducción, $(2{,}69x10^5)$ = Constante termodinámica de Nernst, $n^{\frac{3}{2}}$ = Número de electrones que participaron en la transferencia de carga, Co^*_{ox} = Concentración de la especie química en el proceso redox, $D^{\frac{1}{2}}_{ox}$ = Coeficiente de difusión de la especie química en el proceso redox, $v^{\frac{1}{2}}$ = Velocidad de barrido del Sistema electroquímico.

DETERMINACIÓN ANALÍTICA DEL Pb(II) Y Zn(II)

VOLTAMETRÍA DE PULSO

Este método consiste en el uso de formas de onda de potencial en función del tiempo, y es una combinación de barridos de protección y pulsos de potencial. Esta técnica permite mejorar el límite de detección de los analitos en estudio, mediante aumentos significativos de la intensidad de corriente medida. Hay ejemplos de esta técnica tales como: voltametría escalonada (SCV), voltametría de pulso normal (NPV), voltametría de pulso diferencial (DPV) y la voltametría de onda cuadrada (SWV) (Fig. 4).

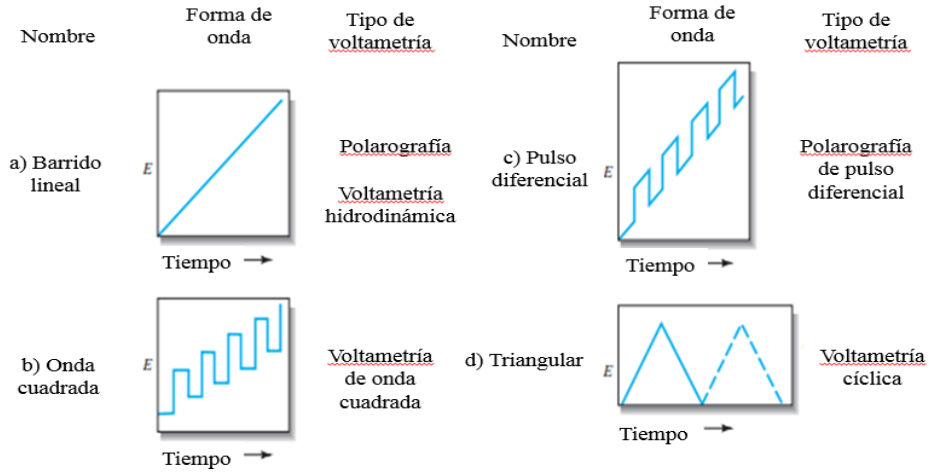


Figura 4. Diferentes tipos de señal por cada tipo de técnicas voltamperométricas. (Skogg et al. 2014)

VOLTAMETRÍA POR PULSO DIFERENCIAL

La voltamperometría diferencias de pulsos (DPV, por sus siglas en inglés) es un método electroanalítico muy útil para la determinación de iones metálicos a niveles traza en medio acuoso. Esta técnica permite discriminar la corriente faradaica de la capacitiva. En esta técnica, la forma de onda aplicada es la suma de un tren de pulsos potenciales con una amplitud en mV, (P_H), por un periodo de tiempo entre cada uno de ellos (P_W), (Fig. 5) (Skoog *et al.*, 2014).

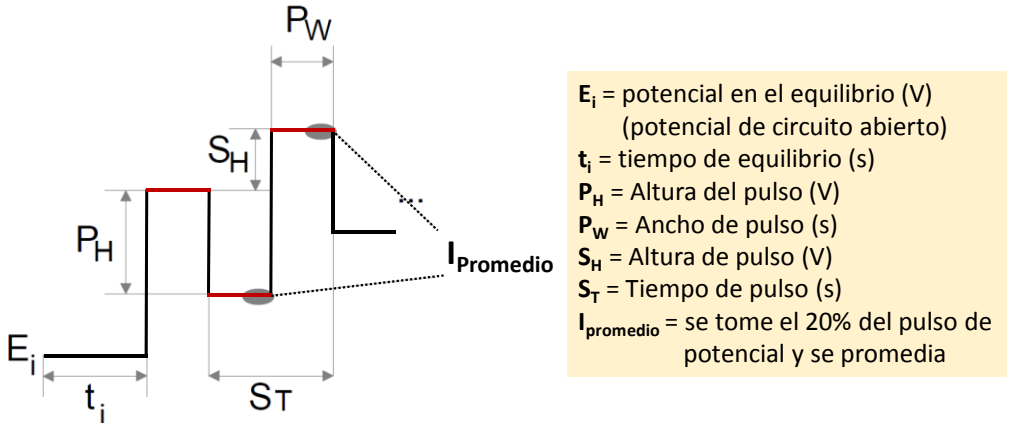


Figura 5. Señales de excitación en la DPV (BioLogic Science Instruments, 2019)

Para cada pulso de potencial en función del tiempo, el equipo registra la corriente como respuesta del proceso y el periodo del pulso suele ser de 40 milisegundos; al final de este periodo el equipo registra el valor de corriente, la misma que se debe al proceso redox en estudio (corriente farádica). Se debe indicar que esta corriente ya no tiene el aporte de la corriente capacitiva en el sistema electroquímico de estudio, obteniendo una señal voltamétrica de tipo cuasi – gaussiana, que es proporcional a la concentración del analito (Fig. 6) (Skoog *et al.*, 2014).

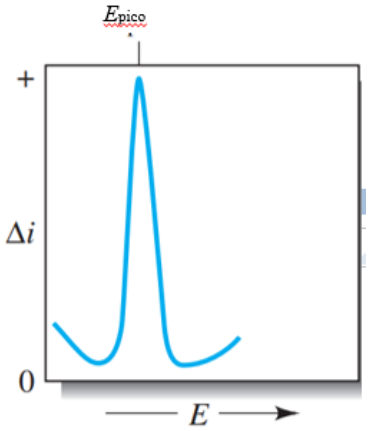


Figura 6. Señal analítica de la voltametría por pulso diferencial (Skoog et al., 2014)

La corriente se muestrea justo antes del pulso y cerca del final del pulso. La corriente resultante es la diferencia entre estas dos corrientes. Tiene una línea de base relativamente plana. La altura del pico actual está directamente relacionada con la concentración de las especies electroactivas en la celda electroquímica.

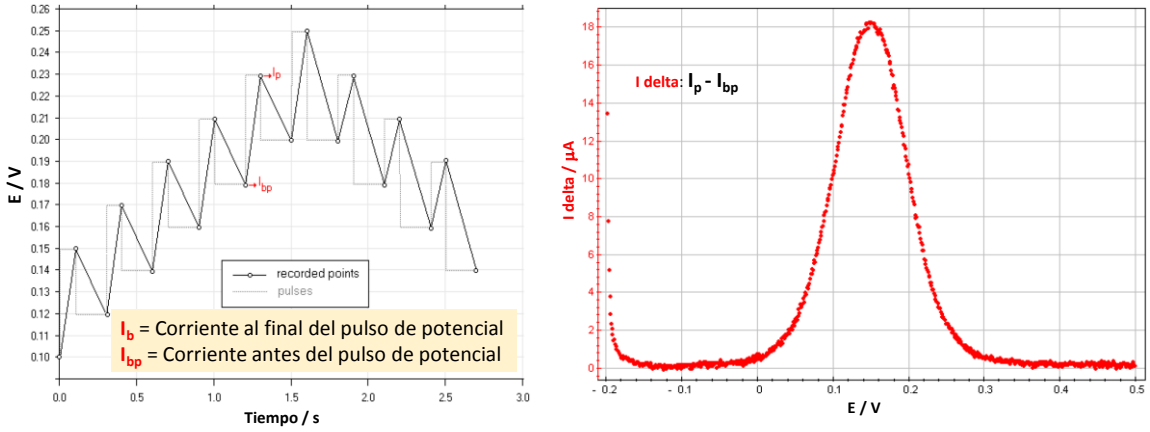


Figura 7. Proceso de medición por DPV: (a) Obtención de la señal de DPV (E *vs.* tiempo) y (b) Medición de Fe(II) por DPV (Corriente *vs.* E)

Con respecto a la señal analítica de esta técnica (Fig. 7), consiste de un pico gaussiano, cuya altura es directamente proporcional a la concentración del analito que se quiere determinar, Fig. 7b. Para una reacción reversible, el pico de potencial es aproximadamente igual al estándar de potencial para la media reacción. Además, esta técnica nos proporciona picos bien definidos a nivel de concentración muy baja, con límite de detección del orden de 10^{-7} a 10^{-8} mol L^{-1}. Esta técnica se aplica para la determinación de trazas de los iones de los metales pesados (Skoog *et al.*, 2014).

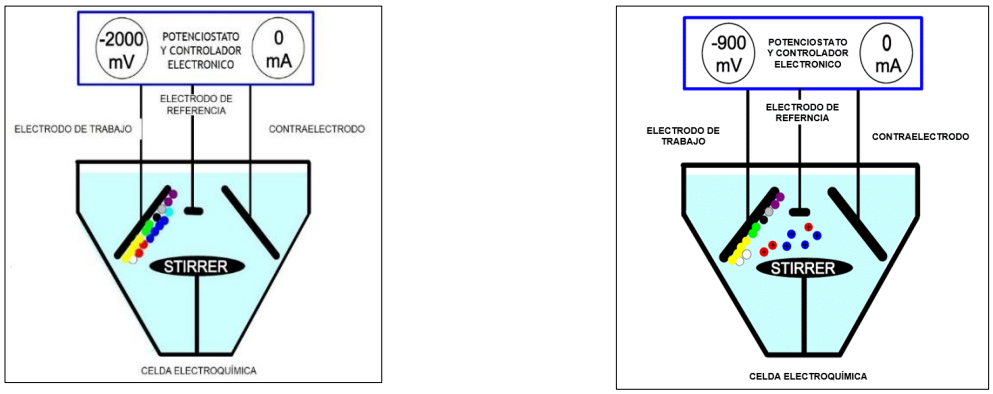
VOLTAMETRÍA DE REDISOLUCIÓN

Este método consiste en lo siguiente:

1) El analito se acumula en el electrodo de trabajo por reducción a un potencial constante, en el caso en que el analito esté oxidado, durante un tiempo determinado (pre-concentración), (Fig. 8a.).

2) Luego se procede a realiza la redisolución, que consiste en realizar un barrido de pulsos de potencial hacia oxidación, como respuesta aparecerá una curva gaussiana (Fig. 8b). El pico de la corriente de la curva es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra. Este método puede ser de 2 tipos: Voltamperometría de Redisolución Anódica (ASV) o Voltamperometría de Redisolución Catódica (CSV).

a) b)



Preconcentración Redisolución

Figura 8. Etapas de la Voltametría de Redisolución Anódica: a) preconcentración y b) redisolución

Para la interpretación del analito que queremos determinar, mediante el uso de un voltamperograma, debemos obtener el potencial del pico (Ep) del analito para su determinación cualitativa (potencial al cual aparece la señal de oxidación del analito); y el pico de corriente de respuesta (I_p) para su determinación cuantitativa, (variable que permite construir las curvas cuantitativas de cualquier analito).

Para la cuantificación del analito, se puede utilizar el área bajo la curva o la altura del pico de la curva gaussiana obtenida, el cual puede cuantificar simultáneamente los analitos a determinar (Alghamdi, 2010), al igual que los métodos de calibrado o de adiciones estándar, que se puede relacionar con la concentración del metal, para cuantificar el analito de nuestro interés. En cuanto al resto de parámetros (potencial y tiempo de preconcentración, condiciones de agitación, temperatura y cantidad de mercurio), estos deben permanecer constantes a lo largo del calibrado e idénticas a las curvas de los estándares de los analitos (Fig. 9) (Faraldos, 2011).

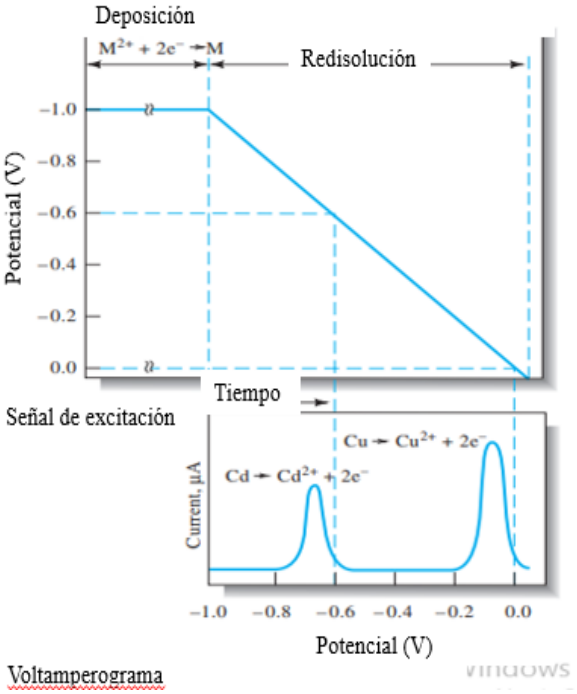


Figura 9. Señal de excitación para la obtención de voltamperogramas del Cadmio y Cobre (Skoog *et al*., 2014)

INSTRUMENTACIÓN

Para las mediciones voltamperométricas, se requiere de una celda electroquímica de 3 electrodos y un electrolito de soporte no reactivo. Los electrodos de esta celda se detallan a continuación: electrodo de trabajo (WE, por sus en inglés), que es el electrodo donde se lleva a cabo la reacción de interés; el electrodo de referencia (RE, por sus siglas en inglés), que se encarga de medir el potencial con el que se realizar la determinación voltamperométrica; y el contraelectrodo (CE, por sus siglas en inglés), que ayuda al paso de la corriente junto al electrodo de trabajo, en decir cierra el circuito eléctrico (Fig. 10).

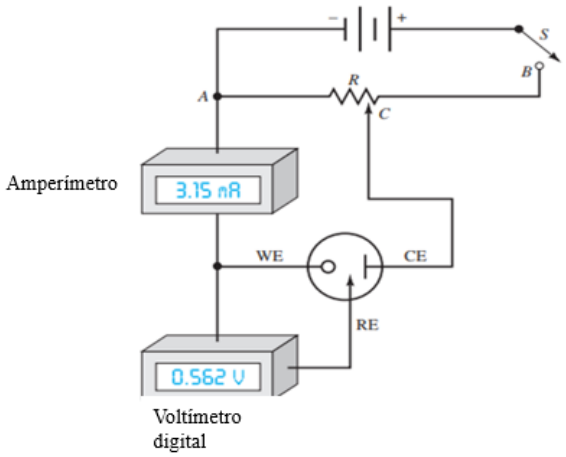


Figura 10. Esquema de circuito eléctrico de una celda de tres electrodos (Skogg *et al., 2014)*

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL ASV

La técnica de ASV es capaz de determinar analitos con bajos límites de detección, a escala de partes por billón (µg L^{-1}) y tiene una sensibilidad aumentada gracias a la aplicación de pasos previos a la preconcentración de la muestra. Además, esta técnica no requiere pasos de extracción y/o separación previa al análisis químico de la especie a determinar, ya que hay posibilidades de pérdida o contaminación de la muestra a analizar (Valdiviezo *et al.*, 2017).

Sin embargo, esta técnica presenta ciertas limitaciones que afectan a los resultados analíticos: la heterogeneidad de los electrodos de trabajo, ya que su estructura macroscópica puede influir en la reproducibilidad de los resultados, por el comportamiento de la electrodeposición del analito que impide la validación de una técnica analítica con respecto a una técnica tradicional; la presencia de especies interferentes, ya que generan interferencia en la reacción electroquímica en el electrodo, ocasionando problemas al analito para obtener señal analítica; y la redisolución incompleta del analito, ya que puede ocurrir durante la experimentación sin darnos cuenta (Hide *et al*., 2003).

CONDICIONES EXPERIMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS METALES EN CERVEZA ARTESANAL POR DPASV, EN EL BDD Y *t*a – C:N

En la determinación de Pb(II) y Zn(II) en cerveza artesanal sobre BDD como electrodo de trabajo, se utilizó el método de voltametría de redisolución anódica de pulso diferencial (DPASV, por sus siglas en inglés), en un equipo potenciostato AUTOLAB Metrohm. Las medidas se realizaron de manera independiente y en todos los casos se purgó 2 minutos con nitrógeno gaseoso antes de correr los experimentos en las condiciones que se detalla en la Tabla 2 y 3, (El Tall *et al.* 2007).

Tabla 2. Condiciones experimentales para la determinación de Pb(II) en cerveza artesanal por DPASV sobre BDD.

Ventana de Potencial (V)	-0,7 – -0,35
Potencial de acondicionamiento (V)	0,5
Tiempo de acondicionamiento (s)	60
Potencial de deposición o reposo (V)	-1
Tiempo de deposición o reposo (s)	300
Potencial de pulso (V)	0,01
Potencial amplitud (V)	0,05
Tiempo de modulación (s)	0,05
Tiempo intervalo (s)	0,5

Tabla 3. Condiciones experimentales para la determinación de Zn(II) en cerveza artesanal por DPASV sobre BDD

Ventana de Potencial (V)	-1,25 – -0,8
Potencial de acondicionamiento (V)	0,5
Tiempo de acondicionamiento (s)	60
Potencial de deposición o reposo (V)	-1,9
Tiempo de deposición o reposo (s)	300
Potencial de pulso (V)	0,01
Potencial amplitud (V)	0,05
Tiempo de modulación (s)	0,05
Tiempo intervalo (s)	0,5

Nota: Para el electrodo del *ta* – C:N, se buscó las condiciones óptimas (Potencial de pulso, potencial de deposición, tiempo de deposición y solución electrolítica) para la detección del Pb(II) y Zn(II), variando una condición a la vez (Potencial de pulso, potencial de deposición y tiempo de deposición), dejando las otras condiciones constantes. Se utilizó las siguientes concentraciones: Pb(II) 1 mg L^{-1} y Zn(II) 1,25 mg L^{-1}. Además, se estudió el efecto electroquímico del electrolito soporte con el Pb(II) y el Zn(II) en Acetato 0,1 mol L^{-1} pH 4,5 y KCl 0,5 mol L^{-1}, y el efecto por día para la determinación de la señal de los analitos de interés.

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA DE CERVEZA ARTESANAL PARA EL ANÁLISIS POR DPASV Y FAAS

Para el tratamiento de la cerveza artesanal, se la desgasificó en el baño ultrasonido Branson 3800 por 20 minutos y se lo purgó con nitrógeno gaseoso (para prevenir interferencias de oxígeno disuelto en la muestra). Posteriormente se realizó una digestión ácida abierta en 5 mL de HNO_3 Fisher grado reactivo al 69,2% para 25 mL de muestra. Luego, se lo calentó en la plancha MTOP MS100 (HP 100) a 100 °C, hasta que el color de la muestra quede amarillo, el contenido final de la digestión se aforó, con solución buffer ácido acético/acetato de sodio 0,1 mol L^{-1} pH = 4,5, hasta un volumen final de 50 mL. Luego,

se realizó una dilución, se tomó 1 mL de la solución madre y se aforó a 50 mL con la misma disolución de buffer.

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO

Este término se lo puede definir como el proceso de demostración experimental y documentada de que un método analítico realice lo que espera el método que se está aplicando, esperando que se cumpla con los parámetros de calidad, para decidir si un método es adecuado o no para para resolver un problema analítico.

LINEALIDAD

La linealidad es la capacidad de un método analítico para dar respuestas relacionadas directamente con la concentración del analito, dentro de un determinado intervalo o rango de concentraciones. Para estimar la bondad con los datos experimentales, se calcula aritméticamente el coeficiente de correlación (R^2), en donde debe tener un valor aproximado de 0,995 para que tenga buen ajuste con la linealidad del método.

RANGO LINEAL O RANGO DE TRABAJO

Corresponde al intervalo de concentraciones útil para un método analítico, cuya pendiente de la recta obtenida debe ser constante, desde la concentración más pequeña del analito hasta la concentración en la que se desvía de la curva de calibración del método a realizar.

SENSIBILIDAD

Se encarga de medir la capacidad de un método para distinguir pequeñas diferencias en la concentración del analito. Los factores que determinan la sensibilidad son la pendiente de la recta de calibrado y de la precisión, en donde hay mayor sensibilidad cuando la pendiente de la recta es mayor, en comparación entre dos métodos analíticos. Se lo representa con la curva de calibración descrita a continuación:

$$y = ax + b$$

Dónde: ***a*** es la pendiente; ***x*** es la variable independiente (eje x); ***y*** es la variable dependiente y ***b*** es la ordenada a origen

PREPARACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA CUANTIFICACIÓN POR ADICIÓN ESTÁNDAR

Para la determinación del rango lineal, se partió de soluciones madre de 1002 mg L^{-1} de Pb(II) y 1000 mg L^{-1} de Zn(II) de la marca Inorganic Ventures, diluidas a concentraciones de 80 y 70 mg L^{-1} en balones de 10 mL, para Pb(II) y Zn(II) respectivamente, se construyó curvas de calibración de Pb(II) y Zn(II) con soluciones patrón, en 5 balones de 25 mL, en un rango de trabajo de 0,25 – 1,25 mg L^{-1} (Pb(II)) y 0,30 – 1,25 mg L^{-1} (Zn(II)) y luego se adicionó 1 mL de la muestra tratada y diluida, a un factor de dilución de 50, y se las aforó con solución buffer ácido acético/acetato de sodio 0,1 mol L^{-1} a pH = 4,5.

LÍMITE DE DETECCIÓN

Es la concentración mínima del analito que proporciona una señal en el instrumento que difiere significativamente de la señal del blanco. Una forma de calcular este parámetro, para un nivel de confianza de 95%, es estimar la mínima señal analítica distinguible (S_D), como la señal media del blanco analítico, más el triple producto de la desviación estándar del blanco (sd_2), siguiendo la siguiente ecuación seguido a continuación:

$$LD = 3(Sa - Sb) \quad \text{ec. 1}$$

Dónde: Sa es la desviación estándar de la medición del analito; Sb es la desviación estándar del blanco y LD es el límite de detección

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Es la concentración mínima del analito que pueden cuantificarse con una precisión y exactitud aceptable. También puede considerarse como el límite inferior del intervalo lineal o de trabajo. Su cálculo se basa a partir de la señal mínima cuantificable, procedente del promedio de un número de medidas del blanco más 10 veces la desviación estándar del blanco (sb), siguiendo la siguiente ecuación seguido a continuación:

$$LC = 10(Sa - Sb) \quad \text{ec. 2}$$

Dónde: Sa es la desviación estándar de la medición del analito; Sb es la desviación estándar del blanco y LC es el límite de detección

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL DPASV

Se prepararon 10 soluciones de 0,15 mg L^{-1} de cada analito (Pb(II) y Zn(II)), provenientes de las soluciones diluidas de 80 y 70 mg L^{-1} de Pb(II) y Zn(II) respectivamente, y se las aforó en balones de 25 mL con buffer de ácido acético/acetato de sodio 0,1 mol L^{-1} a pH = 4,5.

PRECISIÓN

La precisión de un método se lo puede definir como el grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando un método se aplica repetidamente, sobre distintas porciones representativas de una misma muestra, midiendo el error aleatorio de un método. Los estudios de precisión deben hacerse en tres niveles de concentración, que se expresa como la desviación estándar absoluta (sd), desviación estándar relativa (RSD) o coeficiente de desviación (CV) de los resultados obtenidos, expresados en las siguientes ecuaciones:

$$sd = \sqrt{\sum \frac{(x-\bar{X})^2}{n-1}} \text{ Ec. 3}$$

$$RSD = \frac{sd}{\bar{X}} \text{ Ec. 4}$$

$$CV = \frac{sd}{\bar{X}} x\ 100 \qquad \text{ec. 5}$$

Dónde: sd es la desviación estándar, $\sum(x - \bar{X})^2$ es la sumatoria de la diferencia entre el valor medido y la media de total de mediciones, n es el número total de mediciones (ec. 3).

Dónde: RSD es la desviación estándar relativa, sd es la desviación estándar y $\bar{X}$ es la media de todos los valores medidos (ec. 4).

Dónde: CV es el coeficiente de variación, sd es la desviación estándar y $\bar{X}$ es la media de todos los valores medidos (ec. 5).

Esta medida se puede estimar de 2 formas: Repetibilidad y reproducibilidad del método.

REPETIBILIDAD DEL MÉTODO

Consiste en la determinación del grado de concordancia entre los resultados obtenidos después de aplicar el método a una misma muestra varias veces por un mismo analista en tiempo breve. Se aplica la ec. 4 y ec. 5 en esos casos.

REPRODUCIBILIDAD

Consiste en la determinación del grado de concordancia entre los resultados obtenidos cuando el método es aplicado a una misma muestra repetidas veces por analistas distintos en laboratorios diferentes y en distintos días (Sierra *et al*., 2010). Se aplica la ec. 4 y ec. 5 en esos casos

EXACTITUD

Se lo define como el acercamiento de los resultados experimentales obtenidos al valor verdadero. Se lo expresa como el porcentaje de recuperación por el ensayo de cantidades conocidas adicionadas al analito, que representa el valor medio medido respecto al valor teórico (Soledad, 2009). Los estudios de exactitud se expresan en 3 grados, de 80, 100 y 120% de la concentración esperada del analito en la muestra, siguiendo la siguiente expresión matemática:

$$\%R = \frac{\overline{X}}{\mu} x\ 100 \qquad \text{ec. 6}$$

Dónde: %R es el porcentaje de recuperación, X es el promedio de todos los valores medidos, μ es el valor real

Para estimar la exactitud del método, se determina el contenido del analito en la muestra con el método a validar para enriquecer a la muestra con un patrón para su análisis con el método propuesto, luego se resta el contenido de la muestra con el estándar y el contenido de la muestra sin el estándar, para determinar el porcentaje de recuperación del método, que deben estar entre el 80 – 120 % de aceptabilidad.

PREPARACIÓN DE FORTIFICACIONES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PRECISIÓN (REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD) Y EXACTITUD DEL MÉTODO

Se preparó 3 soluciones de cada concentración detallada a continuación: 0,375 y 0,875 mg L^{-1} de Pb(II), y 0,4 y 0,875 mg L^{-1} de Zn(II), partiendo de las soluciones diluidas de 80 y 70 mg L^{-1} de Pb(II) y Zn(II) respectivamente. Luego se le adicionó 1 mL de la muestra diluida y se las aforó en los balones de 25 mL con el buffer de Acetato 0,1 mol L^{-1} a pH = 4.

ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA (AAS)

La espectroscopia de absorción atómica (AA o AAS, por sus siglas en inglés) es un método instrumental de la química analítica que permite medir concentraciones específicas

de más de 70 elementos diferentes en disolución, y es utilizada frecuentemente en investigación.

La AAS se basa en la atomización del analito en matriz líquida, generalmente acuosa, la muestra pasa a un nebulizador (cámara de nebulización) para crear una niebla, luego a un quemador en forma de ranura que da una llama longitudinal larga, para el caso de que la transmisión de energía inicial al analito sea por el método de llama. La niebla atómica queda desolvatada y expuesta a una determinada longitud de onda emitida por la llama, o por una lámpara de cátodo hueco del mismo analito a determinar.



Figura 11. Equipo de absorción atómica

La temperatura de la llama es lo suficientemente alta para mantener atomizada la muestra durante la medición (Rubinson y Rubinson, 2001). Para que se genere un espectro de absorción, una fuente de radiación externa debe infligir en el vapor atómico y absorba radiación cuando el analito se encuentre en estado de excitación, a determinada longitud de onda. El proceso de atomización puede ser de dos tipos: atomización continua, que consiste en la introducción de la muestra en una fuente continua; y la atomización discreta, donde se introduce la muestra por inyección.

Al introducir la muestra, la muestra se nebuliza para la formación de pequeñas gotas y liberar al elemento del solvente en el que se encuentre localizado por desolvatación, y logre volatilizar la muestra, con el atomizador, para absorber la radiación de la luz. Los atomizadores pueden ser de dos tipos: atomizadores de llama, que nebuliza la muestra con llama para la desolvatación de la muestra en la zona primaria de la llama, producida por el combustible y el oxidante; y los atomizadores electrotérmicos, que atomizan la muestra por

medio de pirolisis, combustión sin oxígeno, en la que se seca la muestra a cenizas, para luego aumentar la temperatura y atomizar la muestra.

DETERMINACIÓN DE Pb(II) Y Zn(II) EN CERVEZA ARTESANAL POR FAAS

Para la determinación de metales en cerveza, se utilizó un Espectrofotómetro de absorción atómica de llama Perkinelmer AAnalist 400, con software WinLab32AA y el método de preparación de muestras para el análisis del Pb(II) y Zn(II) fue el mismo método que se utilizó en este estudio para su determinación por DPASV, para que las muestras estén en las mismas condiciones experimentales para su análisis por medio de FAAS; por lo que no se necesitó de un método AOAC.

Con respecto a su rango de trabajo, se analizaron las muestras de cerveza a un rango de 0 – 5 mg L^{-1} por FAAS para el Pb(II), ya que este analito no es muy sensible para esta técnica y se requiere concentraciones altas para su cuantificación; y para el Zn(II), se utilizó el mismo rango de trabajo que se utilizó para su determinación con DPASV, ya que este analito no presenta inconvenientes para su detección en esta técnica. Además, se utilizó las condiciones recomendadas por el equipo, para la cuantificación de cada analito.

Luego de hacer todas las determinaciones con el equipo de FAAS, se lo limpió corriendo con HNO_3 0,1 mol L^{-1} por 5 minutos, seguido de agua desmineralizada por otros 5 minutos. Por último, se apagó la lámpara y la llama del equipo, luego se procedió a cerrar la llave de paso de las tuberías de los gases que alimentan al equipo, finalmente se purgó los gases que se utilizó para formar la llama.

CUANTIFICACIÓN POR ADICIÓN ESTÁNDAR

Se utilizó el método de cuantificación por adición estándar, donde se prepararon soluciones fortificadas con 234 µL de la solución de Pb(II) 80 mg L^{-1} y 268 µL de la solución de Zn(II) 70 mg L^{-1}, de manera independiente para cada analito, se adicionó 1 mL de muestra diluida de cerveza, se aforó cada solución con buffer de ácido acético/acetato de sodio 0,1

mol L^{-1} y se analizó su contenido, con las técnicas de DPASV y FAAS, mediante el uso de la regresión lineal:

$$y = ax + b$$

Dónde: ***a*** es la pendiente; ***x*** es la variable independiente (eje ***x***); ***y*** es la variable dependiente y ***b*** es la ordenada a origen.

COMPARACIÓN DE MÉTODOS (DPASV *vs.* FAAS)

Después de obtener las concentraciones de las cervezas artesanales, tanto para DPASV como FAAS, se utilizó la prueba estadística *t*-student en Excel, para comprobar si hubo diferencia significativa en las concentraciones de Pb(II) y Zn(II) de todas las muestras analizadas por cada técnica analítica utilizada.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN POR SEM DE LOS ELECTRODOS DE BDD Y *ta* – C:N

a) b)

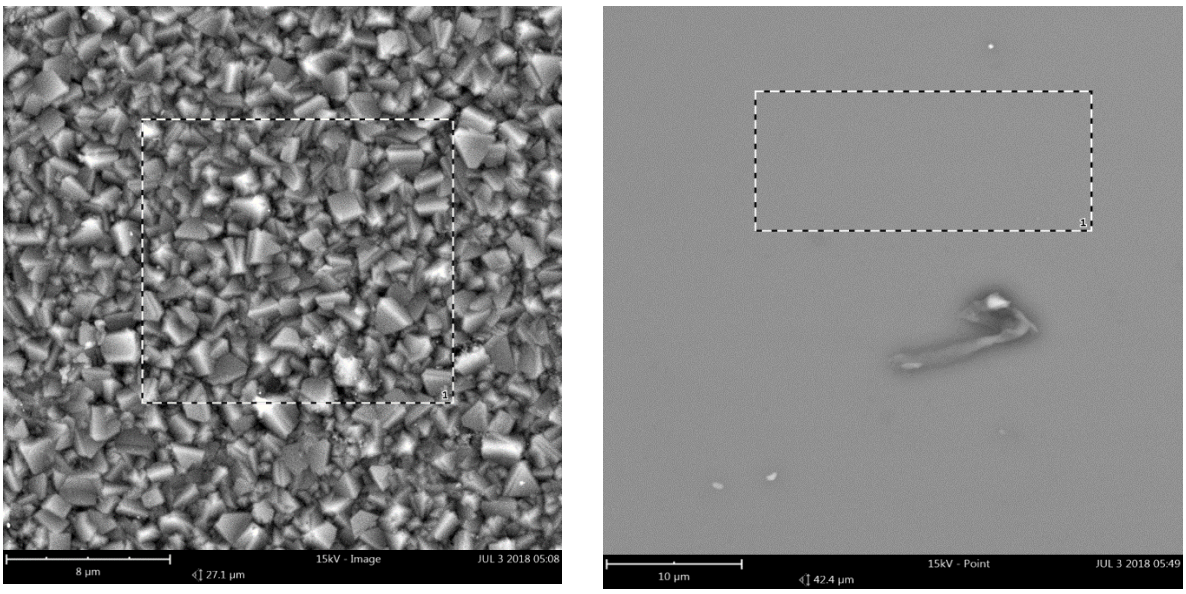


Figura 12. Imágenes SEM de los electrodos: a) BDD con tamaño de 8 µm, escala de 22,5 µm y voltaje de 15 kV y b) *ta* – C:N con tamaño de 10 µm, escala de 42,4 µm y resolución de 15 kV

La Figura 12a, muestra que el electrodo BDD presenta una morfología granular microscópica aleatoria. Para el caso del electrodo *ta* – C:N, Fig. 12b, no puede observarse la estructura nodular global con clústeres grandes de carbono ni la rugosidad de la superficie, se observa una superficie "lisa" y plana en la resolución del SEM empleada a escala micrométrica (Khun *et al*., 2008; Jarošová *et al*., 2016).

CARACTERIZACIÓN POR AFM DE LOS ELECTRODOS DE *ta* – C:N Y BDD

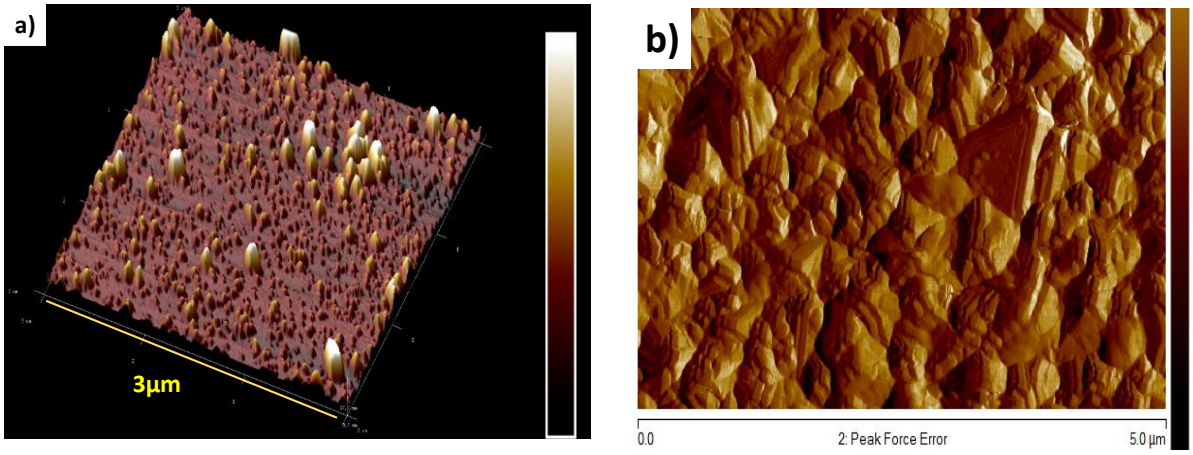


Figura 13. Imágenes AFM: a) *ta* – C:N y b) BDD

En la Figura 13, se muestran las imágenes AFM de los electrodos de *ta* – C:N y BDD; para el caso del *ta* – C:N se observa que la topografía de la superficie no es completamente lisa, a una escala de 3 µm se puede observar pequeñas deformaciones que con la técnica del SEM no fue posible; para el caso del BDD, la topografía es irregular y rugosa, lo cual se puede corroborar con la imagen SEM previamente mostrada en la Figura 10a. Para los dos casos, las superficies se encuentran limpias, por lo que se puede proceder a los estudios analíticos de detección de Pb(II) y Zn(II) en cerveza artesanal.

CARACTERIZACIÓN DE LOS ELECTRODOS POR VOLTAMETRÍA CÍCLICA

VENTANA DE POTENCIAL DE TRABAJO

La ventana de potencial de trabajo es el intervalo de potencial en el cual no ocurren reacciones (oxidación o reducción) ni del electrolito ni del medio, por lo que, en ese intervalo se puede llevar a cabo cualquier tipo de estudio electroquímica, ya sea de oxidación o reducción, o los dos. La Fig. 14 muestra que el electrodo de *ta* – C:N presenta una ventana de potencial más amplia, de -1,65 a 2,1 V *vs.* Ag/AgCl, que el electrodo de BDD de -1,20 a 1,20 V *vs.* Ag/AgCl, cuando se utiliza KCl como electrolito en medio acuoso. Los picos de corrientes anódicas de los electrodos del BDD y *ta* – C:N, en 1,20 y 2,10 V respectivamente,

corresponden a la oxidación del electrolito o el agua, en este caso del cloruro a cloro (Show *et al.*, 2003). En cuanto a sus corrientes catódicas, a -1,20 y -1,65 V respectivamente, corresponden a la reducción del agua a gas hidrógeno (Khun *et al.*, 2008).

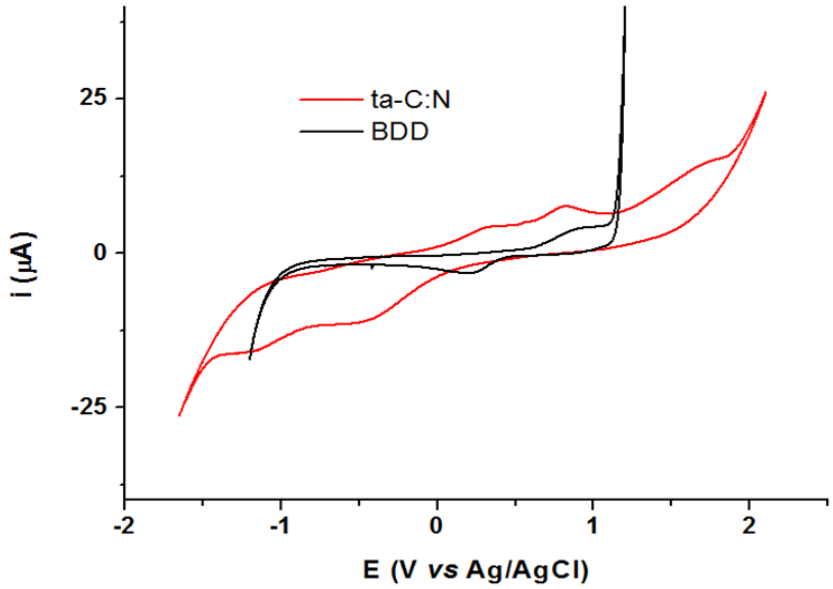


Figura 14. Voltametría cíclica de los electrodos de BDD y *ta* – C:N en KCl 0,1 mol L^{-1}, pH = 1. Velocidad de barrido: 100 mV s^{-1}

Además, se puede presenciar el oxígeno en el voltamperograma del *ta* – C:N en las corrientes anódicas entre 0 a 1 V (Pine research, 2017). La ventana de potencial de trabajo de los electrodos es muy importante para conocer el medio en el que se va a trabajar (disolución), ya que una ventana grande nos indica que ese material de electrodo es ideal para oxidar o reducir especies estables de alto potencial redox.

CAPACITANCIA DE DOBLE CAPA

La capacitancia es una variable que permite conocer cuanta carga almacena un electrodo el momento de ser polarizado, y es una variable muy útil cuando se trata de explorar nuevos materiales con aplicación como electrodos de trabajo en electroanálisis. Un material con baja corriente capacitiva tiene un menor límite de detección y cuantificación, mientras que un material con alta corriente capacitiva generalmente no son muy útiles cuando se los va a utilizar en electroanálisis para detectar concentraciones a niveles traza. Cuando la capacitancia es alta, la corriente capacitiva solapa a la corriente farádica durante

la medición de concentraciones muy bajas, volviéndose indetectable e incuantificable. Para determinar las capacitancias se lo puede hacer con varias técnica electroquímicas, por ej., espectroscopía de impedancia electroquímica, voltamperometría cíclica, etc.

En este proyecto se empleó voltamperometría cíclica, esta consiste en variar la velocidad de barrido en un intervalo de potencial, como se muestra en la Fig. 15 para el *ta* – C:N y el BDD, luego se fija un valor de potencial y se construye una curva de la corriente límite en función de la velocidad de barrido, como se muestra en la Fig. 16 para el *ta* – C:N y del BDD.

Para el caso del BDD, Fig. 15a y Fig. 16, se obtuvo un valor de capacitancia de 0,0002 µF cm^{-2}, que es menor al reportado por Kim *et al*., 15,2 µF cm^{-2}, lo cual se ha asociado a la superficie de contacto y a la resistencia eléctrica del electrodo, es decir a mayor resistencia y menor concentración de C-sp^2, existirá una menor capacitancia en el electrodo (Kim *et al*., 2013).

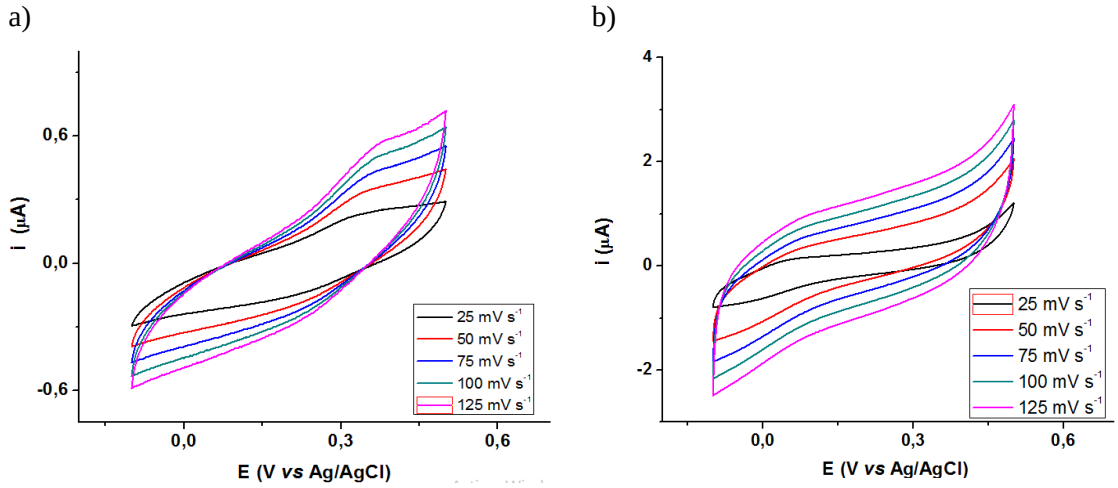


Figura 15. Voltamperogramas cíclicos en KCl 0,1 mol L^{-1} a pH = 1, en función de la velocidad de barrido de 25, 50, 75, 100 y 125 mV s^{-1}, de: a) BDD y b) *ta* – C:N

Para el caso del *ta* – C:N, Fig. 15b y Fig. 16, se obtuvo un valor de capacitancia de 0,033 µF cm^{-2}, este valor es mayor que el BDD y menor que el obtenido por Yang *et al*.; dado que el valor del área geométrica del electrodo influye directamente en la capacitancia del electrodo (Yang *et al*., 2012), ya que la capacitancia es inversamente proporcional al área superficial del electrodo (Sanchez, 2014). Además, de acuerdo a los resultados, la

capacitancia del *ta* – C:N es mayor que la del BDD porque este presenta una mayor concentración de C-sp^2 de acuerdo lo reportado (Aigaje y Espinoza-Montero, 2018).

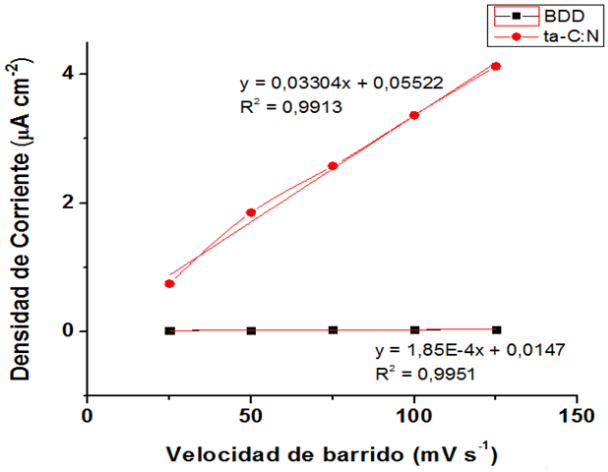


Figura 16. Curva de la densidad de corriente *vs.* la velocidad de barrido para la determinación de la capacitancias, para el BDD y el *ta* – C:N.

TRANSFERENCIA ELECTRÓNICA SOBRE EL ELECTRODO

Un estudio del comportamiento del electrodo frente a un sistema redox conocido como ferri/ferrocianuro de potasio es conveniente para conocer el comportamiento del electrodo. Cuando el ΔE (Ep_{ox} – Ep_{red}) es cercano a 0,059 V se conoce que el proceso redox es rápido cuasi-reversible, cundo el ΔE es muy grande, esto significa que el proceso redox es lentos e irreversible.

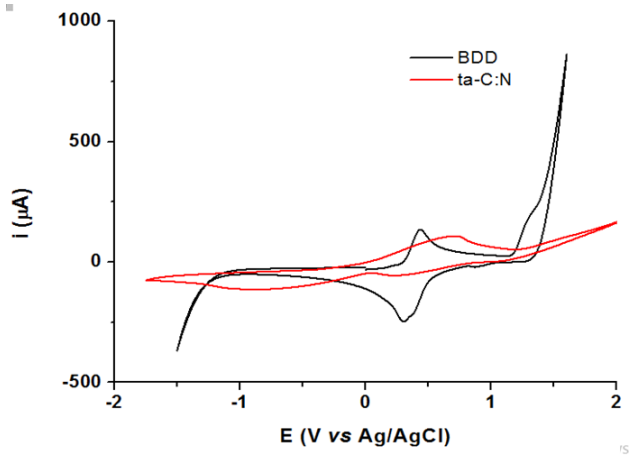


Figura 17. Voltamperogramas cíclicos del BDD y *ta* – C:N en $K_3Fe(CN)_6$ 4 mmol L^{-1} en KCl 0,1 mol L^{-1}, pH = 1, velocidad de barrido = 100 mV s^{-1}.

En la Fig. 17 se puede observar la respuesta redox de los dos electrodos (BDD y *ta* – C:N) frente al $K_3Fe(CN)_6$, las señal de los picos para el BDD son muy definidas y pronunciadas, lo que no ocurre con el *ta* – C:N, en este material se observa que tanto la oxidación como la reducción si ocurren pero de manera lenta, esto se puede corroborar con el ΔE, para el BDD (0,139 V) es muy pequeña comparada con el *ta* – C:N (0,966 V). De acurdo a la literatura esto se debe a la presencia de C-sp^2 en mayor cantidad en la superficie del *ta* – C:N (Kim *et al*., 2013). Además, se conoce que cuando existe menor cantidad de C-sp^2 en la superficie de un electrodo carbonáceo, el comportamiento del ferri/ferrocianuro es reversible y sin complicaciones cinéticas.

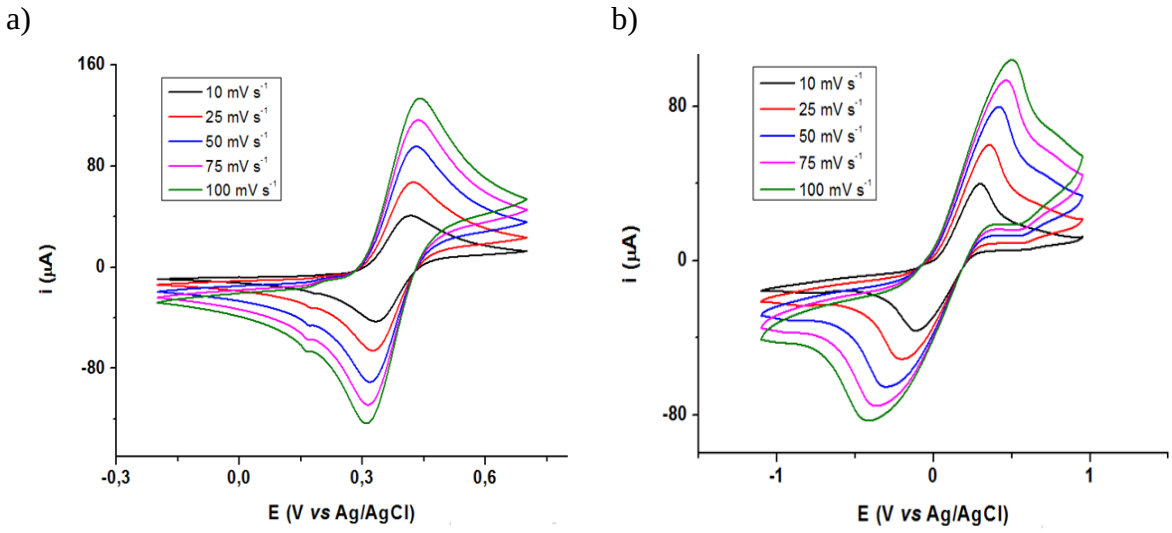


Figura 18. Voltamperogramas cíclicos para el $K_3Fe(CN)_6$ 4 mM para las siguientes velocidades de barrido: 10, 25, 50, 75 y 100 mV s^{-1} del: a) BDD y b) *ta* – C:N

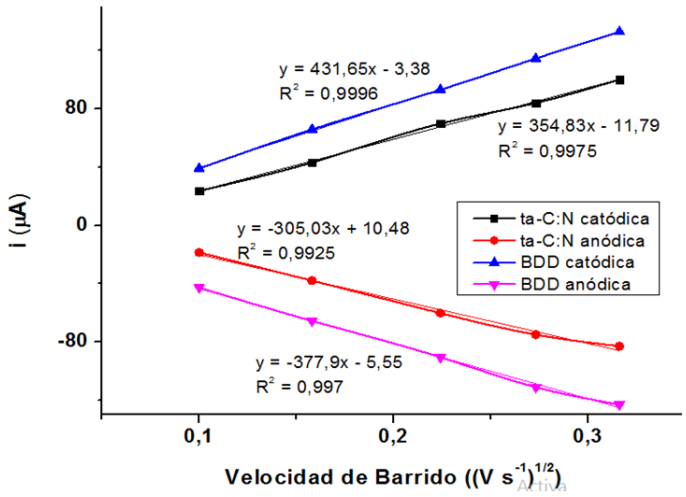


Figura 19. Estudio comparativo de las curvas de diagnóstico voltamétrico del comportamiento anódico y catódico del sistema Redox del $K_3Fe(CN)_6$, en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido del BDD y *ta* – C:N

La Figura 18a muestra la proporcionalidad de las la corrientes catódica y anódica del $K_3Fe(CN)_6$ en BDD a distintas velocidades de barrido, lo que indica que el proceso electroquímico de esta especie sobre este electrodo es por control difusional. (García – Jareño *et al.*, 1998). Complementando con la misma Figura y el resumen del comportamiento del $K_3Fe(CN)_6$, la Tabla No.4, la diferencia de potencial de pico en el BDD, a cada velocidad de barrido, ΔEp aumenta ligeramente, esto se debe a que no existe una adecuado control de la caída óhmica (resistencia del electrolito) y algunas complicaciones cinéticas que podrías ser por reacciones químicas asociadas, o modificaciones en la superficie del electrodo a niveles microscópicos.

En cuanto al electrodo del *ta* – C:N, Fig. 18b, debido a la resistencia de este material y a la presencia mayoritaria de C-sp^2 en la superficie (especies oxigenadas), los ΔE_p son muy grandes y varía con la velocidad de barrido, lo cual indica claramente complicaciones cinéticas en el proceso. Por lo que, los dos electrodos difieren en su comportamiento Redox por tener una superficie de electrodo diferente en su composición. Además, esto se puede corroborar con dos trabajos previamente reportados para los electrodos del *ta* – C:N y BDD respectivamente (Yang *et al.*, 2013) (Show *et al.* 2003).

Tabla 4. Resumen de los datos de la Voltametría Cíclica Del $K_3Fe(CN)_6$ en el electrodo de BDD

v ($V\ s^{-1}$) en BDD	$Ep_{½}$ (mV)	ΔEp (mV)	Ep_{ox} (mV)	Ip_{ox}/Ip_{red}
10	362,5	107	416	0,92
25	376	102	425	0,99
50	373,5	115	427	0,97
75	372,5	123	436	1,03
100	375	139	395	1,08

En la Tabla 4, El $Ep_{½}$ es casi independiente del sistema electroquímico, ya que no cambia con respecto a la velocidad de barrido para el BDD y los picos anódicos y catódicos no se desplazan mucho (Snow *et al*., 2003).

Tabla 5. Resumen de los datos de la Voltametría Cíclica Del $K_3Fe(CN)_6$ en el electrodo de *ta* – C:N

v ($V\ s^{-1}$) en *ta* – C:N	$Ep_{½}$ (mV)	ΔEp (mV)	Ep^{ox} (mV)	Ip^{ox}/Ip^{red}
10	87,5	417	296	1,1
25	68	574	355	1,18
50	51	736	419	1,21
75	46	834	463	1,24
100	43	966	535	1,23

En cuanto al *ta* – C:N, Tabla 5, su ΔEp aumenta con respecto a la velocidad de barrido, y es diferente con los valores reportados por Yang *et al*., influyendo en el incremento en la separación del pico de potencial de la reacción Redox del Fe^{+2} y Fe^{+3} (Behan *et al*., 2017). Además, su $Ep_{1/2}$ no es independiente a medida que aumenta la velocidad de barrido,

por lo que la transferencia de electrones es de tipo cuasi-reversible al separarse los picos, en función de la raíz cuadrada de la velocidad de barrido (Brownson y Banks, 2014).

Adicionalmente, en la Fig. 19 se presenta las pendientes de las curvas de corrientes de oxidación y reducción (Ipox e Ipred) en función de v1/2, con un factor de correlación de 0,9981 y 0,9925 respectivamente, cumpliendo con la ecuación de Randles-Sevcik, lo que indica que las reacciones sobre la superficie del electrodo están limitadas por una difusión semi-infinita, por lo que se tiene una densidad de carga sobre un amplio rango de potencial, que favorece la transferencia rápida de electrones (Snow *et al.*, 2003). Lo mismo pasa con el electrodo del *ta* – C:N, solo que difiere con los factores de correlación de oxidación y reducción (Ipox e Ipred) de 0,9997 y 0,9977 respectivamente, pero difieren con el valor de sus pendientes al ser mayores con respecto al comportamiento difusivo del electrodo del BDD.

Con respecto a los electrodos de BDD y *ta* – C:N, ambos tienen comportamiento difusivo en la transferencia de electrones por la linealidad según la ecuación de Randles – Sevcik y el comportamiento cuasi-reversible porque tiene la relación Ip_{ox}/Ip_{red} distinto de 1. Sin embargo, el comportamiento de $K_3Fe(CN)_6$ en el *ta* – C:N es lenta debido a que ΔEp aumenta con la velocidad de barrido por cada pico anódico y catódico del sistema electroquímico.

DETERMINACIÓN DEL Pb(II) Y Zn(II)

OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS PARA LA DETECCIÓN DEL Pb(II) Y Zn(II) SOBRE EL *ta* – C:N POR DPASV

POTENCIAL DE PULSO

a) b)

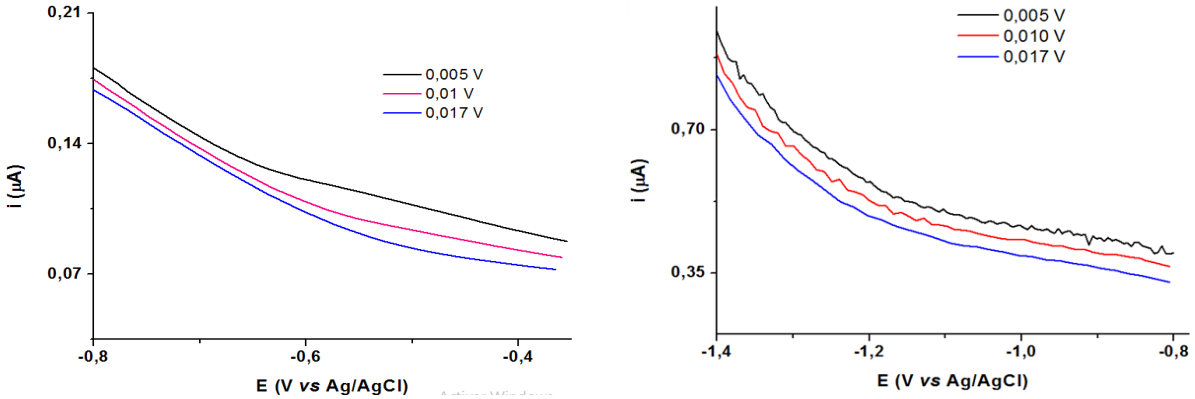


Figura 20. Voltamperogramas de pulso diferencial, a 120 s de tiempo de deposición y -1 V, del: a) Pb(II) 1 mg L^{-1} y b) Zn(II) 1,25 mg L^{-1} en acetato de pH de 4,5, en función del potencial de pulso y en el electrodo de *ta* – C:N

En las Fig. 20 a y b, se puede observar que disminuye el ruido instrumental del potenciostato al momento de aumentar el valor de potencial impuesto, obteniendo un voltamperograma con menor ruido a 0,017 V, siendo el potencial de pulso apto para la determinación de los analitos de interés.

POTENCIAL DE DEPOSICIÓN (PRE-CONCENTRACIÓN)

a) b)

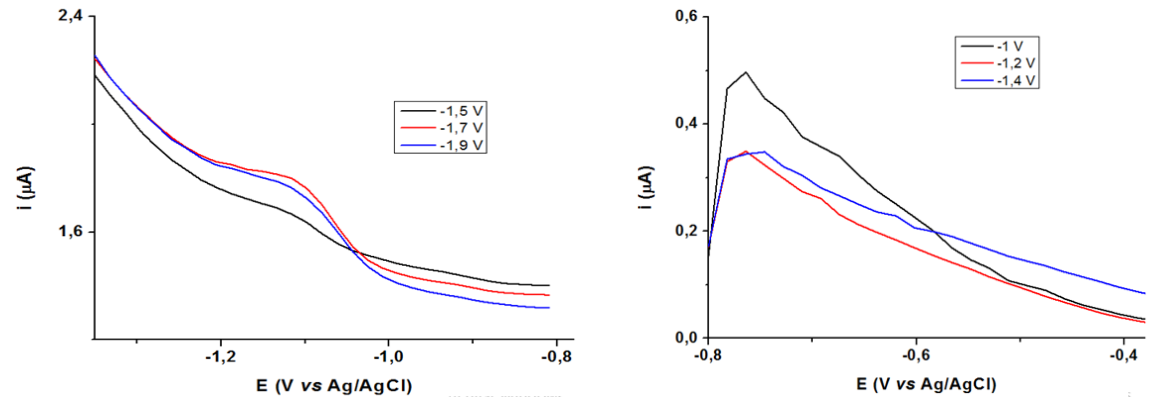


Figura 21. Voltamperogramas de pulso diferencial, a 120 s de tiempo de deposición, en función del potencial de deposición del: a) Zn(II) 1,25 mg L^{-1} y b) Pb(II) 1 mg L^{-1}, en el *ta* – C:N

De acuerdo a la Fig. 21a, la mayor señal de Zn(II) se alcanza cuando se emplea un potencial de pre-concentración de -1,7 V, siendo este el potencial más adecuado para llevar a cabo los experimentos. Para el caso de la pre-concentración de Pb(II) de la Fig. 21b, se alcanza la mejor señal cuando se impone un potencial de -1 V, Fig. 19b., apropiado para su detección en el *ta* – C:N.

TIEMPO DE DEPOSICIÓN

a) b)

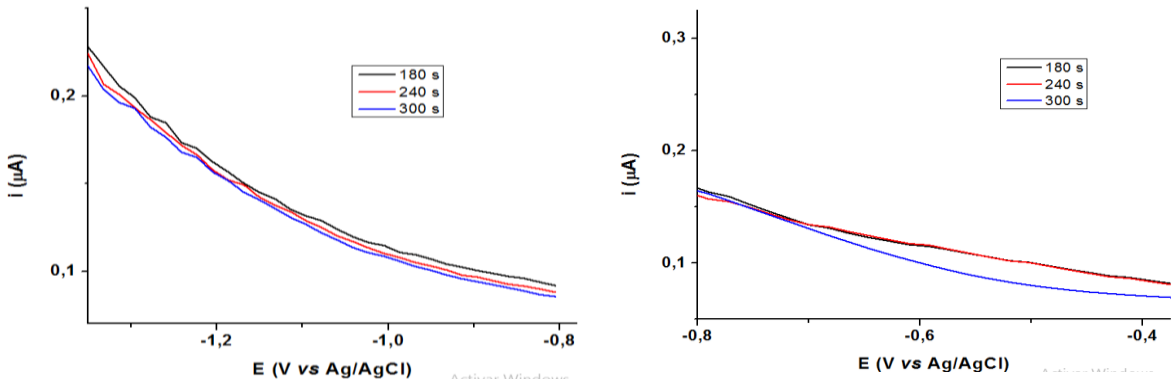


Figura 22. Voltamperograma de pulso diferencial, a 1 V, de la señal del: a) Zn(II) 1,25 mg L^{-1} y b) Pb(II) 1 mg L^{-1}, Acetato 0,1 mol L^{-1} a pH de 4,5 en función del tiempo de deposición en *ta* – C:N

En las Fig. 22 a y b, se puede observar que no hay señal de Zn(II) y Pb(II) detectada en el electrodo de *ta* – C:N, a pesar del aumento del tiempo de deposición para la detección de ambos analitos, no se pudieron depositar correctamente en el electrodo, por la resistencia eléctrica que tenía el electrodo en su ventana de potencial descrita anteriormente.

EFECTO DEL ELECTROLITO DE SOPORTE

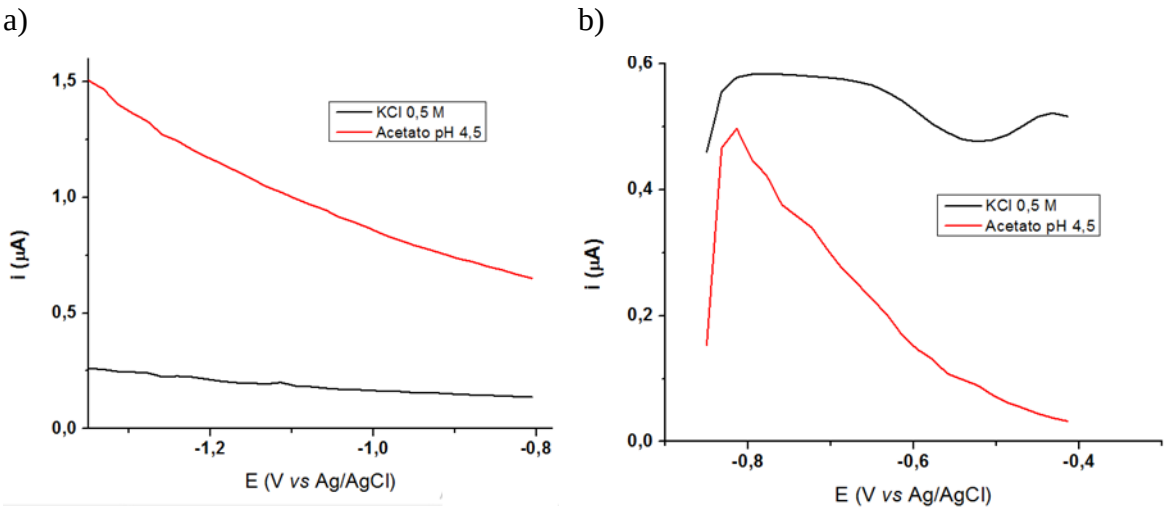


Figura 23. Voltamperogramas de pulso diferencial, a potencial de -1 V y tiempo de deposición de 300 s, por efecto del KCl 0,5 mol L^{-1}, pH 1 y Acetato pH 4,5 del: a) Zn(II) 1,25 mg L^{-1} y b) Pb(II) 1 mg L^{-1} en *ta* – C:N

En la Fig. 23a, se puede ver que el buffer de acetato y el KCl tienen un distinto comportamiento electroquímico, ya que el voltamperograma del Zn(II), en KCl, se aproxima a la línea base a corrientes bajas que el buffer de acetato, en la detección del Zn(II), en la que se podría determinar trazas metálicas que el voltamperograma del acetato; pero tampoco se aprecia la señal de Zn(II) por la falta de deposición en la superficie del electrodo para su redisolución. Además, en la Fig. 23b, se aprecia la señal de plomo asimétrico un poco más definido en el acetato que en el KCl, ya que este presentó un pico amorfo y no se aprecia casi nada del analito.

EFECTO POR DÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE PLOMO

a) b)

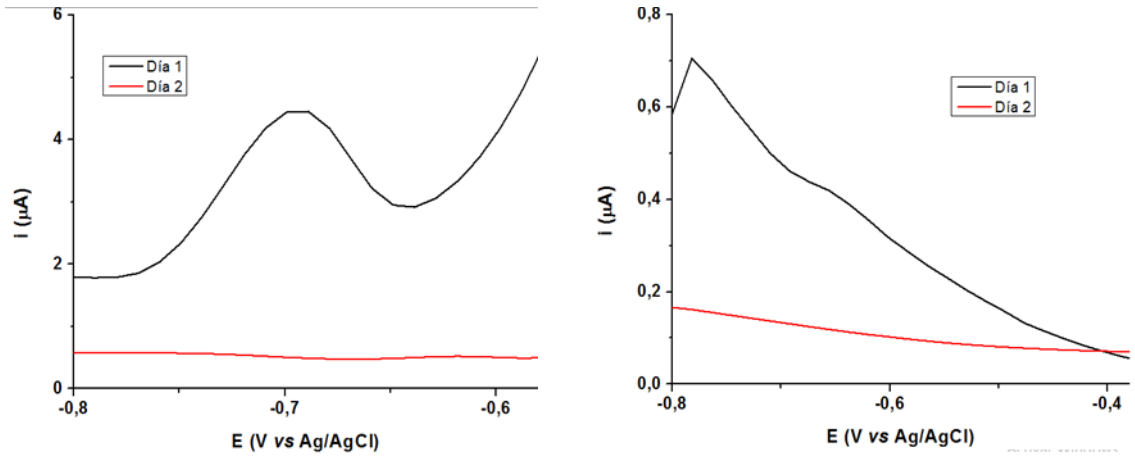


Figura 24. Voltamperogramas de pulso diferencial de Pb(II) 1 mg L^{-1}, a potencial de -1V y tiempo de deposición de 300s, en función de los días en: a) KCl 0,5 mol L^{-1}, pH = 1 y b) Acetato pH = 4,5 en *ta* – C:N

Como se puede observar en las Fig. 24 a y b, en el primer día hay señal del Pb(II) depositado en el electrodo, tanto en el electrolito de KCl 0,5 mol L^{-1} como en el buffer de Acetato 0,1 mg L^{-1}, pH = 4,5; pero en el siguiente día, ya no se muestra la señal de Pb(II) depositado para ambos electrolitos, por lo que hay constancia de que el electrodo no fue lo suficientemente apropiado para la correcta determinación de Pb(II); ya que su pico no se encuentra en el potencial donde debería estar localizada según Khun *et al*. en la determinación de trazas metálicas en el *ta* – C:N, por lo que, no conviene hacer una curva de calibración para el plomo en ese electrodo.

No pudimos determinar los parámetros exactos para la detección de la señal de Zn(II) y Pb(II) en el *ta* – C:N, ya que esto se debe a que el electrodo no estaba lo suficientemente dopado con Nitrógeno, para que el gas tenga un enlace con el carbono del electrodo del *ta* – C:N y la ausencia de los enlaces sp^2 –C=N en el electrodo, comparando con los trabajos de Yang *et al*. en el comportamiento electroquímico del *ta* – C:N y Khun *et al*. en el comportamiento de ese electrodo por voltametría cíclica (Yang *et al*. 2012, Khun *et al*., 2008).

Con respecto a las condiciones experimentales para la determinación analítica de Pb(II) y Zn(II) en el electrodo de BDD, se utilizó los parámetros reportados por El Tall *et*

al., 2007, para la determinación de los mismos en el electrodo ya mencionado, ya que tiene casi todas las condiciones experimentales para su respectiva determinación analítica en la matriz de las cervezas artesanales (El Tall *et al.*, 2007).

DETERMINACIÓN DE Pb(II) y Zn(II) EN BDD

CURVAS DE CALIBRACIÓN DEL Pb(II) Y Zn(II) SOBRE BDD

a) b)

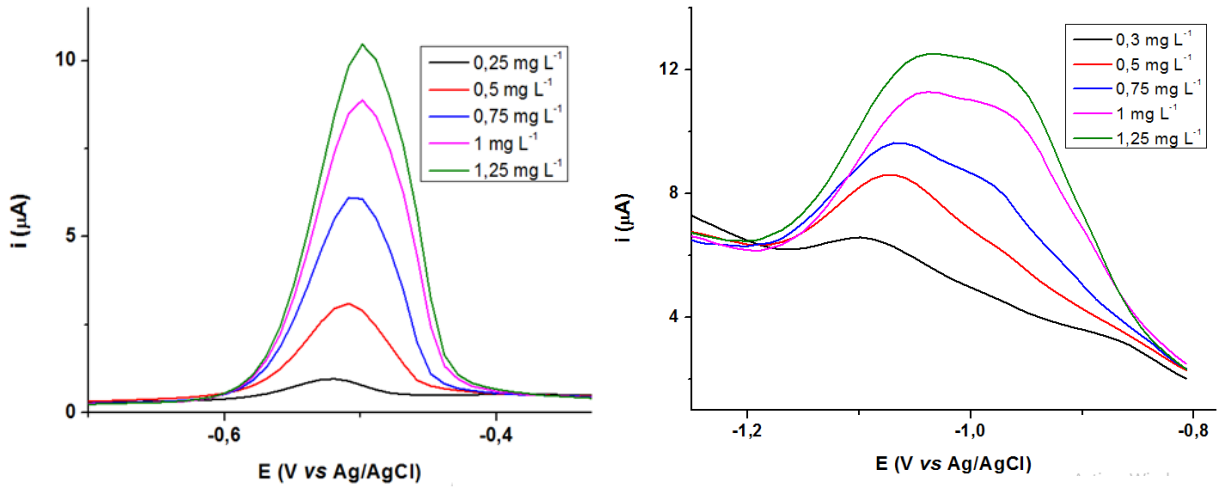


Figura 25. Voltamperogramas de pulso diferencial, a distintas concentraciones del: a) Pb(II) y b) Zn(II) en BDD

En la Fig. 25a se muestra que los picos voltamperométricos están bien definidos para el caso del Pb(II), además las curvas para cada concentración son directamente proporcionales a la señal eléctrica. En cuanto a la Fig. 25b, podemos ver que el Zn(II) muestra curvas voltamperométricas no muy bien definidos, pero son proporcionales a la concentración, esto se debe a que el BDD no es el material de electrodo adecuado para su detección, esto ya fue reportado previamente por McCaw y Swain en un estudio comparativo del BDD y carbón vítreo cubiertos con mercurio (McCaw y Swain, 2006). Además, otros reportes muestran que, a potenciales muy negativos de pre-concentración, se presenta la tendencia de formación de hidrógeno, afectando la eficiencia coulumbimetrica en la electrodeposición del Zn(II) (Show *et al.*, 2002).

LINEALIDAD

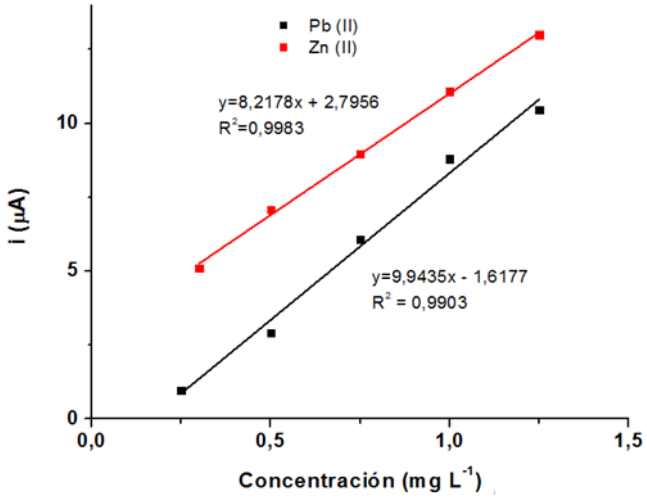


Figura 26. Curvas de calibración, por DPASV, en BDD de Pb(II) y Zn(II)

En la Fig. 26 podemos ver que el Pb(II) es más sensible con respecto al Zn(II), cuyos valores de pendiente fueron de 9,9435 y 8,2178 µA L mg^{-1} respectivamente, ya que el Zn(II) se ve afectado por la evolución de hidrógeno, por lo que disminuye su sensibilidad, cumpliendo lo que estableció El Tall *et al.* en su investigación de los metales con BDD (El Tall *et al.*, 2007). Además, el Pb(II) y el Zn(II) están cumpliendo con el parámetro del rango lineal, cuyos factores de correlación son mayores de $R^2 > 0,99$, por lo que se puede cuantificar ambos analitos con esta metodología. Además, ambos analitos están cumpliendo con la ley de Faraday, en donde se reoxidan los metales después de su deposición en la superficie del electrodo (Wang, 2006).

LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL Pb(II) Y Zn(II)

Tabla 6. Límites de Detección y Cuantificación del Pb(II) y Zn(II) En BDD

Medición	DPASV (BDD)	
	Pb(II) (mg L^{-1})	Zn(II) (mg L^{-1})
1	0,2149	0,1443
2	0,2152	0,1331
3	0,2189	0,1126

4	0,2206	0,1559
5	0,2226	0,1427
6	0,2240	0,1077
7	0,2251	0,1410
8	0,2291	0,1302
9	0,2369	0,1338
10	0,2206	0,1230
Promedio	**0,22277**	**0,13343**
Desviación estándar	**0,00657**	**0,01481**
Límite de detección (LD)	**0,01970**	**0,04443**
Límite de cuantificación (LC)	**0,06568**	**0,14812**

Como se puede observar en la Tabla 6, los LD del Zn(II) y Pb(II) sobre BDD son de 0,01970 y 0,04443 mg L^{-1} respectivamente, indicando la capacidad mínima que se puede detectar los analitos, diferentes al ruido, en el método propuesto de DPASV con BDD. Además, los LC del Pb(II) y Zn(II) son 0,06568 (Anexo 3) y 0,14812 mg L^{-1} respectivamente (Anexo 4), indicando que el Pb(II) puede detectarse a una menor concentración que el Zn(II) para el caso del BDD. Sin embargo, los LC del Pb(II) y Zn(II) son mayores con respecto a lo reportado por Show *et al.*, en la caracterización electroquímica del BDD, con valores de 0,00207 y 0,00654 mg L^{-1} respectivamente (Snow *et al.*, 2003).

Los valores de LD y LC para Pb(II) y Zn(II), mediante DPASV, son mayores con respecto a la técnica de AAS reportado por Nascentes *et al.* en la determinación de cervezas por Espectrofotometría de Absorción Atómica con Horno de Termospray, cuyos valores de LD de referencia fueron de 0,046 y 0,011 mg L^{-1}, para Pb(II) y Zn(II) respectivamente, Para el LC, aunque no se encuentra reportado en ese artículo y aplicando la fórmula para su cálculo (Anexo 3), sus valores fueron de 0,153 y 0,036 mg L^{-1} respectivamente para los analitos ya mencionados anteriormente, debido a los problemas de deposición generados por la hetereogenidad del electrodo de BDD (El Tall *et al.*, 2007).

EFECTO MATRIZ

a) b)

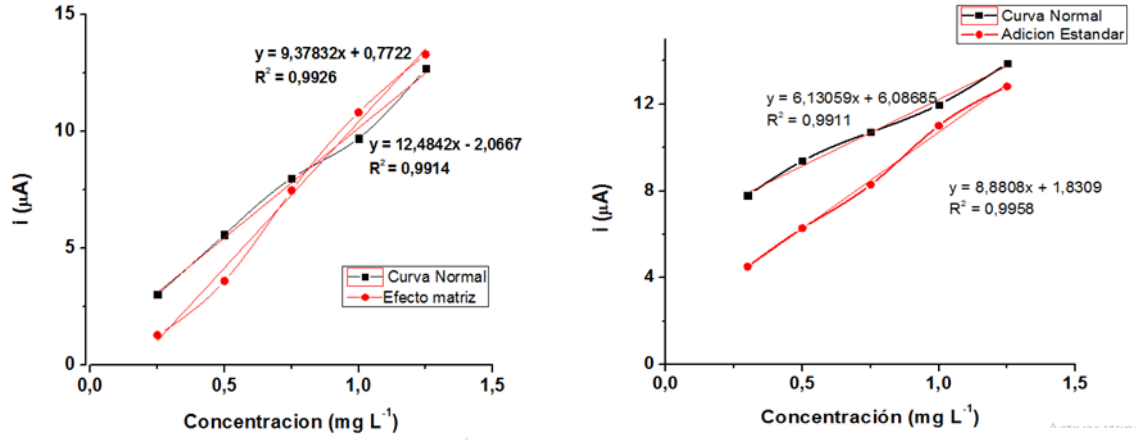


Figura 27. Curvas de Calibración, normal y con efecto matriz, por DPASV en BDD, del: a) Pb(II) y b) Zn(II)

En las Fig. 27a y 27b, la adición de la muestra a cada estándar tiene poca influencia en la obtención de la señal en los dos casos de estudio, ya que hay un ligero aumento en la sensibilidad en ambos casos, con respecto a las curvas de calibración normales (empleando estándares). Por lo que, no existe una interferencia que afecte las medidas de las muestras en las curvas de calibración preparadas tanto para el Pb(II) como para el Zn(II) (Booksh y Kovalski, 1994).

PRECISIÓN (REPETIBILIDAD Y REPRODUCIBILIDAD) Y EXACTITUD

Tabla 7. Resultados de la determinación de la Repetibilidad y los porcentajes de Recuperación Del Pb(II) en Cerveza Artesanal con el BDD

Fortificación	Medición	Concentración obtenida (mg L^{-1})	% Recuperación
0,375 mg L^{-1}	1	0,4501	120,04
	2	0,4041	107,75
	3	0,3647	97,24
	Promedio	0,4063	108,34
	Desviación estándar	0,0176	
	%RSD	10,53	
0,875 mg L^{-1}	1	1,0360	118,40
	2	1,1154	127,47
	3	1,0280	117,49
	Promedio	1,0598	121,21
	Desviación estándar	0,048	
	%RSD	4,56	

De acuerdo a la Tabla 7, la fortificación de 0,375 mg L^{-1} no es repetible al tener el %RSD de 10,53%, excediendo del valor esperado del 10% según Magnusson y Oenemark para la validación del método (Magnusson y Oenemark, 2014), pero su porcentaje de recuperación de 108,34% es exacto por estar dentro de lo establecido para su validación. En cuanto a la fortificación de 0,875 mg L^{-1}, es repetible por tener un %RSD de 4,56, que está por debajo del 10%, que es porcentaje de RSD permitido, pero como su porcentaje de recuperación fue de 121,21%, por lo que no se encuentra dentro del rango que debe cumplir para el método de estudio que es de 80 – 120%; por lo tanto, no cumple con el parámetro de exactitud a esa concentración, comparados con los voltamperogramas del Pb(II) para cada fortificación (Anexo 8).

Tabla 8. RSD de los Porcentajes de Recuperación de las Fortificaciones Del Pb(II) en Cerveza Artesanal para la determinación de la Reproducibilidad en BDD

Día	Fortificación (mg L^{-1})	% Recuperación media	% Recuperación media total	SD	%RSD
1	**0,375**	108,34	114,73	9,04	7,88
	0,875	121,12			
2	**0,375**	98,11	100,49	3,36	3,34
	0,875	102,86			
3	**0,375**	106,97	95,87	15,69	16,37
	0,875	84,78			
Media			103,70	9,36	9,19

Al determinar la reproducibilidad y veracidad del método, en la Tabla 8, existe una buena reproducibilidad con un valor de %RSD menor a 10% como promedio de los 3 días, para ambas fortificaciones, y con buena veracidad al tener un promedio de 103,70% de recuperación, por lo que cumple con estos parámetros para la validación del método de DPASV (Anexo 8).

Tabla 9. Resultados De La Determinación De La Repetibilidad y los Porcentajes de Recuperación Del Zn(II) en Cerveza Artesanal con el BDD

Fortificación	Medición	Concentración obtenida (mg L^{-1})	% Recuperación
0,4 mg L^{-1}	1	0,4388	109,71
	2	0,6210	155,24
	3	0,6591	164,78
	Promedio	0,5729	143,24
	Desviación estándar	0,1177	
	%RSD	20,54	
0,875 mg L^{-1}	1	0,9209	105,24
	2	0,8437	96,42
	3	0,9172	104,82
	Promedio	0,8939	102,16
	Desviación estándar	0,0453	
	%RSD	4,86	

Como se puede ver en la Tabla 9, la fortificación de 0,875 mg L^{-1} cumple con el parámetro de repetibilidad y exactitud del método de estudio, porque las mediciones de concentración de Zn(II) no varían mucho, obteniendo un valor de %RSD de 4,86, que es menor a 10% establecido; y en cuanto al porcentaje de recuperación de 102,16%, está dentro de rango establecido que es 80 – 120%. Sin embargo, no pasa lo mismo con la fortificación de 0,4 mg L^{-1} porque su valor de RSD de 20,54% excede del 10% permitido y que su porcentaje de recuperación fue de 143,24%, excediendo del rango establecido de 80 – 120% para la validez del método de estudio para la determinación de Zn(II) a concentraciones bajas. Por esa razón, no es aceptable para concentraciones bajas (Magnusson y Oenemark, 2014), (Anexo 9).

Tabla 10. RSD de los Porcentajes de Recuperación del Zn(II) en cerveza artesanal para la determinación de la Reproducibilidad En BDD

Días	Fortificación (mg L^{-1})	% Recuperación media	% Recuperación media Total	SD	%RSD
1	**0,4**	143,24	122,7	29,05	23,67
	0,875	102,16			
2	**0,4**	148,88	140,27	12,18	8,68
	0,875	131,66			
3	**0,4**	127,89	123,78	5,82	4,70
	0,875	119,66			
Media			128,92	15,68	12,35

Para el caso del Zn(II), Tabla 10, no cumple con el parámetro de reproducibilidad al tener un %RSD superior a lo establecido, para validar el método con este analito, con un valor de 12,35%. Además, no es un método veraz porque su porcentaje de recuperación está fuera del intervalo establecido de 80 – 120%, con un valor promedio de 128,92%, por lo que no se garantiza tener datos confiables al ser una técnica poco sensible para sus detecciones y la tendencia de reducción de hidrógeno al aplicar potenciales negativos para depositar el Zn(II) (Show *et al.*, 2003) (Anexo 9).

RESUMEN DE LOS PARÁMETROS ANALITICOS DE VALIDACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE Pb(II) Y Zn(II) POR DPASV EN BDD

Tabla 11. Parámetros Analíticos de validación para Pb(II) y Zn(II) por DPASV en BDD

Parámetro	Pb(II)	Zn(II)
Rango lineal (mg L^{-1})	0,25 – 1,25	0,30 – 1,25
Coeficiente de correlación (R^2)	0,9903	0,9983
Límite de Detección (mg L^{-1})	0,01970	0,04443
Límite de Cuantificación (mg L^{-1})	0,06568	0,14812
Repetibilidad concentraciones bajas (%RSD)	10,53	20,54
Repetibilidad concentraciones altas (%RSD)	4,56	4,86
Reproducibilidad (%RSD)	9,19	12,35
Exactitud (%R)	103,70	128,92

Tal como se detalla en la Tabla 11, el método de detección del Pb(II) por DPASV en BDD cumple con todos los parámetros analíticos ya detallados anteriormente, a pesar de que su %RSD sobrepasa el límite de 10% en la repetibilidad a concentraciones bajas. Aunque para la detección del Zn(II) se cumple con el parámetro de linealidad por su coeficiente de correlación de 0,9983 y la repetibilidad a concentraciones altas, con 4,86%, no se cumple con el resto de parámetros al excederse del 10% en repetibilidad a concentraciones bajas y reprodubilidad, y al salirse del rango de 80 – 120% de recuperación según Magnusson y Oenemark para la validación de métodos. Además, en el Pb(II) es capaz de ser detectado a concentraciones bajas porque su límite de detección es más bajo que el Zn(II)

DETERMINACÍON DE Pb(II) Y Zn(II) POR FAAS

CURVAS DE CALIBRACIÓN DE Pb(II) Y Zn(II) POR FAAS

a) b)

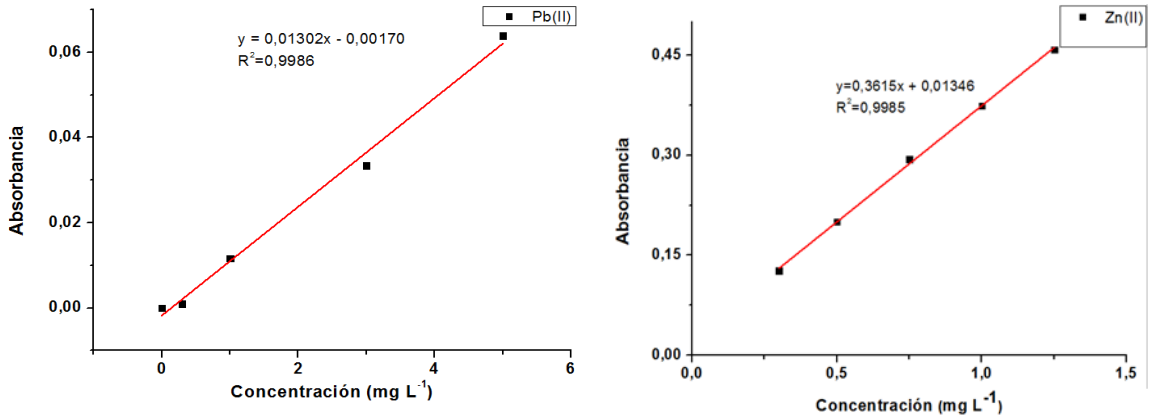


Figura 28. Curvas de calibración para FAAS en: a) Pb(II) y b) Zn(II)

En las Figs. 26a y 26b, ambos analitos mostraron linealidad, cuyos coeficientes de correlación para Pb(II) y Zn(II) fueron de 0,9986 y 0,9985 respectivamente. A pesar de que en el Pb(II) se trabajó con un rango linear diferente con respecto a la técnica de análisis de DPASV, con 0 – 5 mg L^{-1}, fue recomendable este rango porque este analito tiene baja sensibilidad para esta técnica por ser un metal volátil a temperaturas altas (Aragon-Briceño *et al.*, 2011). El Zn(II) es muy sensible para la técnica de FAAS al tener una pendiente muy alta con respecto al Pb(II), a pesar de que su rango de trabajo fuera menor al del Pb(II), con la pendiente de 0,3615 L mg^{-1}, comparado al 0,01302 L mg^{-1} del primero.

Aunque la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (GF-AAS) es una técnica muy sensible para detectar trazas metálicas, a escala de ppb (µg L^{-1}), toma un largo tiempo atomizar la muestra en un horno por pirolisis, sobre el tubo de grafito donde se introduce la muestra, y porque la lámpara de descarga sin electrodo tarda mucho en estabilizarse antes de determinar los analitos de interés, sobre todo para la determinación de Pb(II) en este trabajo (Kurfurst, 1998).

A pesar de que no se hizo ensayos de LD y LC, efecto matriz, precisión y exactitud en FAAS, se la consideró como una técnica de referencia para comparar los resultados medidos del Pb(II) y Zn(II), por DPASV, con el fin de reducir los errores de análisis y asegurar la precisión y exactitud de las mediciones de las muestras de la técnica electroquímica ya mencionada (Vanclay *et al.* 2004).

CONTENIDO DE Pb(II) Y Zn(II) EN CERVEZAS ARTESANALES POR FAAS

Tabla 12. Contenido de Pb(II) en diferentes cervezas artesanales por FAAS

Marca	Medición	Concentración obtenida de la muestra fortificada (mg L^{-1})	Concentración real calculada (mg L^{-1})	Media (mg L^{-1})	%RSD	Cumple con la norma INEN 2262
A	1	0,817	0,0682	0,0672	5,36	Sí
	2	0,812	0,0632			
	3	0,819	0,0702			
B	1	0,830	0,0812	0,0785	3,89	Sí
	2	0,824	0,0752			
	3	0,828	0,0792			
C	1	0,816	0,0672	0,0635	5,06	Sí
	2	0,810	0,0612			
	3	0,811	0,0622			
D	1	0,804	0,0552	0,0552	5,43	Sí
	2	0,807	0,0582			
	3	0,801	0,0522			
E	1	0,816	0,0672	0,0642	4,67	Sí
	2	0,813	0,0642			
	3	0,810	0,0612			
F	1	0,809	0,0602	0,0565	5,69	Sí
	2	0,803	0,0542			
	3	0,804	0,0552			

Según las concentraciones obtenidas en la Tabla 12, todas las muestras de cerveza cumplen con el límite máximo permitido de Pb(II) de 0,1 mg L^{-1} según la normativa NTE INEN 2262 y no hay dispersión en los resultados de cada cerveza porque su %RSD no excede del 10%, con un rango promedio de 0,0552 – 0,0785 mg L^{-1}, donde la cerveza B es la que tiene mayor contenido de ese analito. Sin embargo, su rango es muy diferente con

respecto al trabajo de 0,0141 – 0,0346 mg L^{-1} reportado por Nascentes *et al.* ya que depende de la forma en la que se elaboraron las cervezas para su análisis (Nascentes *et al.* 2005).

Tabla 13. Contenido de Zn(II) en diferentes cervezas artesanales por FAAS

Marca	Medición	Concentración obtenida de la muestra fortificada (mg L^{-1})	Concentración real calculada (mg L^{-1})	Media (mg L^{-1})	%RSD	Cumple con la norma INEN 2262
A	1	0,775	0,0246	0,0226	8,85	Sí
	2	0,771	0,0206			
	3	0,773	0,0226			
B	1	0,799	0,0486	0,0443	9,13	Sí
	2	0,794	0,0436			
	3	0,791	0,0406			
C	1	0,795	0,0446	0,0436	6,07	Sí
	2	0,796	0,0456			
	3	0,791	0,0406			
D	1	0,797	0,0466	0,0433	8,11	Sí
	2	0,794	0,0436			
	3	0,790	0,0396			
E	1	0,779	0,0286	0,0269	7,18	Sí
	2	0,776	0,0256			
	3	0,777	0,0266			
F	1	0,765	0,0146	0,0086	61,53	Sí
	2	0,757	0,0066			
	3	0,755	0,0046			

Según las concentraciones obtenidas en la Tabla 14, todas las muestras de cerveza cumplen con el límite máximo permitido de Zn(II) de 1 mg L^{-1} según la normativa NTE INEN 2262 y no hay dispersión en los resultados de cada cerveza, salvo la cerveza F, porque su %RSD no excede del 10%, con un rango promedio de 0,0086 – 0,0443 mg L^{-1}, donde la cerveza B es la que tiene mayor contenido de ese analito. La cerveza F tiene datos dispersos porque no se succionó bien la muestra al momento de analizarla.

Además, su rango de concentración es diferente y corta con respecto a lo reportado por Nascentes *et al.*, con valores que van entre 0,0553 – 0,1680 mg L^{-1}, ya que la técnica de digestión aplicada a este trabajo es diferente y depende del proceso de elaboración con la que se hicieron las cervezas, para cada análisis realizado en este trabajo (Nascentes *et al.*, 2005).

CONTENIDO DE Pb(II) Y Zn(II) EN CERVEZAS ARTESANALES POR DPASV EN BDD

Tabla 14. Contenido de Pb(II) en diferentes cervezas artesanales por DPASV en BDD

Marca	Medición	Concentración obtenida de la muestra fortificada (mg L^{-1})	Concentración real calculada (mg L^{-1})	Media (mg L^{-1})	%RSD	Cumple con la norma INEN 2262
A	1	0,433	0,3161	0,2740	14,13	No
	2	0,509	0,2400			
	3	0,483	0,2658			
B	1	0,664	0,0848	0,0663	26,69	Sí
	2	0,684	0,0647			
	3	0,699	0,0495			
C	1	0,561	0,1877	0,0843	111,78	Sí
	2	0,687	0,0617			
	3	0,745	0,0034			
D	1	0,604	0,1445	0,0959	44,06	Sí
	2	0,673	0,0748			
	3	0,681	0,0683			
E	1	0,683	0,0657	0,0448	40,26	Sí
	2	0,715	0,0335			
	3	0,784	0,0353			
F	1	0,583	0,1655	0,1615	26,39	No
	2	0,546	0,2019			

	3	0,632	0,1170			

Según los resultados obtenidos de la Tabla 14, el contenido de Pb(II) en las cervezas artesanales analizadas están en el rango de 0,0448 – 0,2740 mg L^{-1}, siendo las cervezas B, C, D y E, las que cumplen con el límite máximo según la normativa NTE INEN 2262, y que su contenido no rebasa del límite máximo permitido del establecido en la normativa (NTE INEN, 2003). Sin embargo, las cervezas A y F, con valores de 0,2740 y 0,1615 mg L^{-1} respectivamente exceden del límite máximo permitido del metal en estudio, que es de 0,1 mg L^{-1} (Anexo 5).

Sin embargo, al hacer el análisis triplicado de cada cerveza según la Tabla 14, los datos están dispersos entre sí, cuyo %RSD es mayor al 10% establecido para la validación de métodos (Anexo 10), ya que esto se debe a que al comportamiento de deposición de los metales por la hetereogenidad en la superficie del electrodo (El Tall, 2007).

El rango del contenido de Pb(II) en cerveza, obtenidos en este trabajo, es muy distinta a los valores reportados por Ghanjaoui *et al.*, 2011, ya que su rango es de 0,092 – 0,280 mg L^{-1}, cuyo valor máximo excede del valor máximo permitido según las normativas NTE INEN 2262 de Ecuador y de la normativa mundial del Office International de la Vigne et du Vin (OIV) (Ghanjaoui *et al.* 2011).

Tabla 15. Contenido de Zn(II) en diferentes cervezas artesanales por DPASV en BDD

Marca	**Medición**	**Concentración obtenida de la muestra fortificada (mg L^{-1})**	**Concentración real calculada (mg L^{-1})**	**Media (mg L^{-1})**	**%RSD**	**Cumple con la norma INEN 2262**
A	1	1,124	0,3732	0,3732	33,63	Sí
	2	1,215	0,4642			
	3	1,459	0,7108			
B	1	1,132	0,3815	0,3814	36,08	Sí
	2	0,994	0,2437			
	3	1,269	0,5190			

C	1	1,129	0,3787	0,3912	13,19	Sí
	2	1,097	0,3468			
	3	1,198	0,4481			
D	1	1,043	0,2929	0,3823	29,96	Sí
	2	1,262	0,5121			
	3	1,092	0,0344			
E	1	1,174	0,4237	0,4317	7,18	Sí
	2	1,216	0,4660			
	3	1,155	0,4054			
F	1	1,402	0,6516	0,7056	6,72	Sí
	2	1,491	0,7413			
	3	1,474	0,7238			

Según los datos obtenidos de la Tabla 15, todas las cervezas analizadas cumplen con la normativa NTE INEN 2262, ya que su contenido de Zn(II) está en un rango de 0,3732 – 0,7056 mg L^{-1}, que no excede del 1 mg L^{-1} del límite máximo permitido. Diferenciando que la cerveza A tiene menor contenido de Zn(II) y la cerveza F con mayor contenido del mismo (Anexo 6).

Sin embargo, las medidas para las cervezas A, B, C y D son muy dispersas entre sí, ya que exceden del %RSD permitido del 10%, debido a los problemas de deposición del metal por la hetereogenidad en la superficie del electrodo y la formación de hidrógeno al hacer la deposición a potenciales muy negativos (El Tall, 2007) (Anexo 11).

A pesar de que no hay datos reportados para los análisis de Zn(II) en cerveza mediante DPASV, su rango es de 0,0547 – 0,226 mg L^{-1} según Nascentes *et al.*, 2005 en la determinación de Zn(II) por espectrofotometría de absorción atómica con horno de llama de termospray, siendo un rango más bajo al obtenido en esta experimentación (Nascentes *et al.*, 2005).

COMPARACIÓN DEL CONTENIDO DE Pb(II) Y Zn(II), OBTENIDO CON EL MÉTODO DE DPASV, CON RESPECTO AL MÉTODO DE FAAS

Tabla 16. Comparación del contenido de Pb(II) obtenido en DPASV y FAAS

Marca	DPASV (mg L^{-1})	FAAS (mg L^{-1})
A	0,2740	0,0672
B	0,0663	0,0785
C	0,0842	0,0635
D	0,0959	0,0552
E	0,0448	0,0642
F	0,1615	0,0565

Con respecto al rango de concentración en las muestras, como se muestra en la Tabla 16, ambas técnicas difieren entre sí, ya que, por medio de la técnica por DPASV, el rango de concentración de Pb(II) fue de 0,0663 – 0,2740 mg L^{-1}; en cuanto a la técnica por FAAS, su rango fue de 0,0552 – 0,0785 mg L^{-1}, siendo este un rango más corto de concentraciones en cervezas artesanales que por medio de DPASV.

Además, se puede ver que hay variación en la técnica de DPASV con respecto a la técnica de FAAS, esto se debe a los problemas de deposición que hubo en el electrodo de BDD para la obtención correcta de la señal del metal redisuelto, debido a las diferentes propiedades ópticas y la hetereogenidad de la superficie que tenía el electrodo, señalando las limitaciones de la técnica para la correcta determinación del contenido de Pb(II) en las cervezas A y F (Hyde *et al.*, 2003).

Sin embargo, esta diferencia de concentraciones de las muestras, para ambas técnicas, no fue significativa gracias a la prueba estadística de t de Student, ya que su valor de t estadístico no excede del valor t crítico para 2 colas (Anexo 7). Por ende, la técnica de DPASV es apropiada para hacer determinaciones de Pb(II) en cervezas artesanales.

Tabla 17. Comparación del contenido de Zn(II) obtenido en DPASV y FAAS

Marca	DPASV (mg L^{-1})	FAAS (mg L^{-1})
A	0,5152	0,0226
B	0,3814	0,0443
C	0,3912	0,0436
D	0,3823	0,0433
E	0,4317	0,0269
F	0,7056	0,0086

Según la Tabla 17, el rango de concentración de las muestras de ambas técnicas, difieren entre sí, ya que por medio de la técnica por DPASV, el rango de concentración de Zn(II) es de 0,3814 – 0,7056 mg L^{-1}; y de la técnica por FAAS es de 0,0086 – 0,0443 mg L^{-1}, siendo este último un rango más corto y de más baja concentración en cervezas artesanales que el método de estudio.

Además, como se muestra en la Tabla 17 los resultados del Zn(II) en DPASV, con respecto a FAAS, varían mucho, esto se debe a los problemas de deposición del metal, a causa de la reducción del hidrógeno al aplicar potenciales negativos para la detección correcta del metal redisuelto, al igual que la superficie y las propiedades ópticas del electrodo donde se hizo esta determinación electroanalítica (El Tall *et al.*, 2007). Esta diferencia de concentraciones se comprobó que era significativa, mediante la prueba de t de student, ya que su valor de t obtenido excedió del valor de t crítico (Anexo 7). Por tanto, la técnica por DPASV no es apropiada para la correcta determinación de Zn(II) en cerveza artesanal.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

En la caracterización del electrodo *ta* – C:N, este muestra poca rugosidad, una alta corriente capacitiva y poca electroactividad a los metales, por lo que, no resultó adecuado para la cuantificación de Pb(II) y Zn(II) en cerveza artesanal.

Las concentraciones obtenidas por DPASV estuvieron dentro el rango de 0,0448 – 0,2740 mg L^{-1} para Pb(II) y de 0,3732 – 0,7056 mg L^{-1} para Zn(II), estos valores son diferentes a los obtenidos por FAAS.

Las concentraciones obtenidas por FAAS estuvieron dentro del rango de 0,0552 – 0,0785 mg L^{-1} para Pb(II) y de 0,0086 – 0,0443 mg L^{-1} para Zn(II), lo cual indica que todas las marcas de cervezas cumplen con la normativa vigente según el NTE INEN 2262 para cervezas, límites establecidos Pb(II) 0,1 mg L^{-1} y Zn(II), 1 mg L^{-1}.

Fue posible verificar los datos obtenidos mediante DPASV con los resultados obtenidos por FAAS, a través de la prueba *t-student*. Para el Pb(II) no hubo diferencia significativa, y para el Zn(II) si hubo diferencia significativa.

RECOMENDACIONES

Se recomienda hacer detección de nitrógeno mediante espectroscopía Raman para asegurar que el electrodo de *ta* – C:N presente nitrógeno para realizar correctamente las determinaciones voltamperométricas.

Como el método de DPASV es de tipo manual, hay que controlar cuidadosamente todas las condiciones experimentales para la obtención de datos repetibles y reproducibles en los futuros análisis con esta técnica.

La técnica del SEM solo es recomendable para BDD por la formación de electrones en su superficie cristalina para la obtención de su imagen, pero no es recomendable para la superficie del *ta* – C:N por la falta de generación de electrones en su superficie, por lo que se sugiere el uso de la técnica de microscopía de barrido electrónico por emisión de campo (FE-SEM), a parte del AFM.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aftyka, R, (2018) *Pasión por la cerveza*. Grijalbo. Recuperado el 29 de marzo del 2019 de: https://books.google.com.ec/books?id=cgdxDwAAQBAJ&pg=PT59&dq=molienda+cerveza&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj0rez696fhAhUBSa0KHWuyCmQQ6AEIJzAA#v=onepage&q=molienda%20cerveza&f=false

Alghamdi, A. (2010) *Applications of stripping voltammetric techniques in food analysis.* Arabian Journal of Chemistry. Vol 3, 1–7. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2009.12.001

Alegret, S.; del Valle, M.; y Merkoci, A. (2004) *Sensores electroquímicos. Introducción a los quimiosensores y biosensores. Curso Teórico-Práctico.* 1ra Edición. Servei de Publicaciones. España.

Alves, V. N., Borges, S. S. O., Neto, W. B., y Coelho, N. M. M. (2011). Determination of Low Levels of Lead in Beer Using Solid-Phase Extraction and Detection by Flame Atomic Absorption Spectrometry. Journal of Automated Methods and Management in Chemistry, 2011, 1–6. doi:10.1155/2011/464102

Aragon-Briceño, C., Ponce-Caballero, C., Coronado Perza, V., y Giácoman-Vallejos, G. (2011) Evaluación de un método analítico para la determinación de níquel y plomo en sedimento de mar por espectroscopía de absorción atómica. *Ingeniería* 15(1), 1 – 8.

Badui, S. (2013). *Química de los alimentos.* 5ta Edición. Pearson Educación. México.

Behan, J. A., Stamatin, S. N., Hoque, M. K., Ciapetti, G., Zen, F., Esteban-Tejeda, L., y Colavita, P. E. (2017). Combined Optoelectronic and Electrochemical Study of Nitrogenated Carbon Electrodes. *The Journal of Physical Chemistry C, 121(12), 6596–6604.*doi: 10.1021/acs.jpcc.6b10145

BioLogic Science Instruments (2019). *EC – LAB Electrochemistry*. Recuperado el 25 de Abril del 2019, de: https://www.bio-logic.net/instruments/?filter[division]=ec-lab

Booksh, K. S., y Kowalski, B. R. (1994). Theory of analytical chemistry. Analytical Chemistry, 66(15), 782A–791A. doi:10.1021/ac00087a001

Brownson, D., y Banks, C. (2014) *The Handbook of Graphene Electrochemistry.* Springer. Reino Unido.

Campbell, G. (2009). *Ciencia y tecnología de los alimentos.* Editorial ACRIBIA, S.A. España.

Crystallography365 (2014). *Tetrahedral amorphous carbon: rough in the diamond.* Recuperado el 9 de Marzo del 2019, de: https://crystallography365.wordpress.com/2014/09/22/tetrahedral-amorphous-carbon-rough-in-the-diamond/

Egerton, R. (2016). *Physical Principles of Electron Microscopy. An Introduction to TEM, SEM and AEM.* 2da Edición. Springer. Canadá.

El Tall, O., Jaffrezic-Renault, N., Sigaud, M., y Vittori, O. (2007). Anodic Stripping Voltammetry of Heavy Metals at Nanocrystalline Boron-Doped Diamond Electrode. Electroanalysis, 19(11), 1152–1159. doi:10.1002/elan.200603834

Enriquez, C. (2014) *Las Cervezas Artesanales se multiplican.* El Comercio. Recuperado el 31 de marzo del 2018, de: http://www.elcomercio.com/actualidad/cervezas-artesanales-multiplican-quito.html

Faraldos, M. (2011) *Técnicas de análisis y caracterización de materiales.* 2da Edición. Editorial CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas). España

Fenemma, O., Damodaran, S., y Parkin, K. (2010). *Química de los Alimentos.* 3ra Edición. Editorial ACRIBIA, S.A. España

Fraunhoffer USA (2015). *Boron Doped Diamond.* Recuperado el 21 de febrero del 2019, de: https://www.egr.msu.edu/fraunhofer-ccd/sites/default/files/content/BDD_Corp.pdf

García, M., Quintero, R., López-Mungía, A. (2004) *Biotecnología alimentaria.* Grupo Noriega editores. México.

Garcia-Jareno, J. J., Benito, D., Navarro-Laboulais, J. y Vicente, F. (1998). Electrochemical Behavior of Electrodeposited Prussian Blue Films on ITO Electrode: An Attractive Laboratory Experience. *Journal of Chemical Education*, *75*(7), 881. https://doi.org/10.1021/ed075p881

Ghanjaoui, M., Srji, M., Hor, M. Serdaoui, F. y El Rhazi, M. (2012). Fast procedure of lead determination in alcoholic beverages. *J. Mater Enriron. Sci.* 3 (1), 85–90.

Gigliarelli, P. (2014). REVISTA MASH-Ciencia Cervecera. Recuperado el 11 de abril de 2018, a partir de http://www.revistamash.com/2017/detalle.php?id=406

Gonzalez, M. (2017) *Principios de elaboración de las cervezas artesanales.* 1ra Edición. Lulú Enterprices. Estados Unidos.

Housecroft, C. y Sharpe, A. (2006). *Química Inorgánica.* 2da Edición. Pearson Educación. España

Hyde, M.; Banks, C. y Compton, R. (2003) Anodic Stripping Voltammetry: An AFM Study of Some Problems and Limitations. *Electroanalysis*. 16 (5), 345–354. https://doi.org/10.1002/elan.200302863

Ibañez, C. (2004) *Los sistemas terrestres y sus implicaciones medioambientales.* Ministerio de Educación y Ciencia. España

Ibanez, J.; Carreon, A.; Barcena, M.; y Casillas, N. (2008) Metal in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation and analysis. Journal of Food Composition. 21, 672–683. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.06.005

Izah, S.; Inyang, I.; Angaye, T. y Okowa, T. (2016) *A Review of Heavy Metal Concentration and Potential Health Implications of Beverages Consumed in Nigeria.* Toxics. 5, 1.

Jarošová, R., De Sousa Bezerra, P. M., Munson, C. y Swain, G. M. (2016). Assessment of heterogeneous electron-transfer rate constants for soluble redox analytes at tetrahedral amorphous carbon, boron-doped diamond, and glassy carbon electrodes. *Physica Status Solidi (A) Applications and Materials Science*. https://doi.org/10.1002/pssa.201600339

Jeantet, R.; Croguennec, T.; Schuck, P. y Brulé, G. (2007) *Ciencia de los alimentos.* Vol. 2. Editorial ACRIBIA, S.A. España.

Jiménez, M. (2016) En Ecuador existe 70 cervecerías artesanales. El Telégrafo. Recuperado el 19 de marzo del 2017, de: https://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/8/en-ecuador-existen-70-cervecerias-artesanales

Kim, D. Y., Yang, J. C., Kim, H. W., y Swain, G. M. (2013). Heterogeneous electron-transfer rate constants for ferrocene and ferrocene carboxylic acid at boron-doped diamond electrodes in a room temperature ionic liquid. *Electrochimica Acta*, *94*, 49–56. https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.01.140

Kissinger, P. T., y Heineman, W. R. (1983). Cyclic voltammetry. *Journal of Chemical Education, 60(9), 702*.doi:10.1021/ed060p702

Khun, N. y Liu, E. (2009) Linear sweep anodic stripping voltammetry of heavy metals from nitrogen doped tetrahedral amorphus carbón thin films. *Electrochimica Acta 54.* 2890 – 2898.

Khun, N.; Liu, E. y Guo, H. (2008) Cyclic Voltammetric Behavior of Nitrogen-Doped Tetrahedral Amorphous Carbon films deposited by Filtred Cathodic Vacuum Arc. *Electroanalysis 20.* No. 17, 1851 – 1856.

Kurfurst, U. (1998) *Solid Sample Analysis: Edition anglaise*. Springer. Alemania.

Lauzurica, J. (2015) *Impuestos especiales II: Figuras impositivas.* 1ra Edición. ISBN. España.

Liu, D., Gou, L., Xu, J., Gao, K., y Kang, X. (2016). Investigations on etching resistance of undoped and boron doped polycrystalline diamond films by oxygen plasma etching. *Vacuum, 128, 80–84.*doi:10.1016/j.vacuum.2016.03.012

Magnusson, B. y Oenemark, U. (Eds.) (2014) *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics* (2da Edición).

Marín, R. (1999) *Elementos de Nutrición Humana.* 1ra Edición. Editorial UNED. España.

Matusiewicz, H., & Kopras, M. (1997). Methods for Improving the Sensitivity in Atom Trapping Flame Atomic Absorption Spectrometry: Analytical Scheme for the Direct Determination of Trace Elements in Beer. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12(11), 1287–1291.doi:10.1039/a704407k

McGaw, E. A., y Swain, G. M. (2006). A comparison of boron-doped diamond thin-film and Hg-coated glassy carbon electrodes for anodic stripping voltammetric determination of heavy metal ions in aqueous media. *Analytica Chimica Acta*, *575*(2), 180–189. https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.05.094

Meinserberg, G.; y Simmons, W. (2018). *Principios de bioquímica médica.* 4ta Edición. ELSEVIER. España.

Metrohm (2019). *Autolab dummy cell.* Recuperado el 20 de Febrero de 2019, de: https://www.metrohm.com/en-gb/products-overview/AUTDUMCELL

Montilla, F., Morallón, E., y Gamero-Quijano, A. (2014). Synthetic Boron-Doped Diamond Electrodes for Electrochemical Water Treatment Electrodos de Diamante Dopado con Boro para el tratamiento electroquímico de aguas. *Bol. Grupo Español Carbón*, *31*, 8–12.

Nascentes, C., Kamogawa, M., Fernandes, K., Arruda, M., Nogueira, A. y Nobrega, J. Direct determination of Cu, Mn, Pb and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta part B.* 60, 749 – 753.

NTE INEN 2262:2003, Bebidas alcohólicas, Cerveza, Requisitos.

NTE INEN 2340:2003, Bebidas alcohólicas, Cerveza, Muestreo.

Pérez, S. (2014). *Introducción a la Química y al ambiente.* 1ra Edición. Grupo Editorial Patria. México.

Pine Research (2017). *Conducting Electrochemical Experiments in an Inert Atmosphere.* Recuperado el 25 de Enero del 2019 de: https://www.pineresearch.com/shop/wp-content/uploads/sites/2/2018/01/DRA10072-Conducting-Electrochemical-Experiments-in-an-Inert-Atmosphere-REV001.pdf

Pohl, P. (2008) *Determination and fractionation of metals in beer: A review.* Food Additives and Contaminants. 25 (6), 693–703. https://doi.org/10.1080/02652030701772323

Pohl, P. (2009). Metals in Beer. *Beer in Health and Disease Prevention*, 349–358. doi:10.1016/b978-0-12-373891-2.00033-x

Potter, N. y Hotchkiss, J. (2007). *Ciencia de los alimentos.* 5ta Edición. Editorial Acribia, S.A. Reimpreso en España.

Ramírez, S. (2015) *La cerveza artesanal vive un 'boom' en Ecuador.* Revista Líderes. Recuperado el 31 de marzo de 2018, de: http://www.revistalideres.ec/lideres/cerveza-artesanal-vive-ecuador-negocios.html

Sanchez, A. (2014) *Estudio de distintos transductores grafénicos en electrodos serigrafiados.* Tesis de Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo.

Sierra, I., Gómez, S., Pérez, D. y Morante, S. (2010) *Análisis Instrumental: algunas herramientas de enseñanza – aprendizaje adaptadas al Espacio Europeo de Educación Superior.* 1ra Edición. Netbiblio S.I. España.

Soledad, B. (2009) *La validación en la Industria.* 1ra Edición. Impreso en español.

Show, Y., Witek, M. A., Sonthalia, P., y Swain, G. M. (2003). Characterization and electrochemical responsiveness of boron-doped nanocrystalline diamond thin-film electrodes. *Chemistry of Materials*, *15*(4), 879–888. https://doi.org/10.1021/cm020927t

Valdivieso, J.; Muñoz, G.; Carchi, T.; Fernández, L.; Carrera, P. y Lapo, B. (2017) Validación de un método electroanalítico para determinación in-situ de cadmio y plomo en agua potable. *Revista CUMBRES.* 3(1), 47–53.

Vanclay, E., Projahn, H.-D., Steeg, U., y Sanders, J. (2004). Application of the reference-element technique for fast sequential flame atomic-absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(4), 1083–1087. doi:10.1007/s00216-003-2200-y

Wang, J. (2006) *Analytical Electrochemistry.* Third Edition. Wiley-VCH. Canadá.

Weiner, J. P., y Taylor, L. (1969). Determination of Metals in Beer and Wine by Atomic Absorption Spectrophotometry. *Journal of the Institute of Brewing*, 75(2), 195–199. doi:10.1002/j.2050-0416.1969.tb03201.x

Xu, J., Granger, M. C., Chen, Q., Strojek, J. W., Lister, T. E., y Swain, G. M. (1997). Peer Reviewed: Boron-Doped Diamond Thin-Film Electrodes. *Analytical Chemistry*, 69(19), 591A–597A. doi:10.1021/ac971791z

Yang, X. (2013) *Electrical and Electrochemical Properties of Nitrogen-Containing Tetrahedral Amorphous Carbon (Ta - C) Thin Films.* Tesis de Doctorado en Filosofía de la Universidad Estatal de Michigan.

Yang, X., Haubold, L., DeVivo, G., y Swain, G. M. (2012). Electroanalytical Performance of Nitrogen-Containing Tetrahedral Amorphous Carbon Thin-Film Electrodes. *Analytical Chemistry*, 84(14), 6240–6248. doi:10.1021/ac301124r

Zapata, E.; Gazcón, N. y Flores, L. (2016) A direct method for the determination of lead in beers by differential pulse polarography-anodic stripping voltammetry. *J. Mater. Environ. Sci.* 7 (12), 4467–4470

Zeng, A., Neto, V. F., Gracio, J. J., y Fan, Q. H. (2014). Diamond-like carbon (DLC) films as electrochemical electrodes. *Diamond and Related Materials*, 43, 12–22.doi:10.1016/j.diamond.2014.01.003

ANEXOS

Anexo 1. Parámetros de análisis de una cerveza corriente (Campbell, 2009)

Tabla 19.5 Análisis de una cerveza corriente

Peso específico	1,0121
Peso específico según la escala Balling, %	3,093
Análisis sacarimétrico, %	3,10
Alcohol en peso, %	3,63
Alcohol en volumen, %	4,60
Extracto real, %	4,73
Extracto del mosto original (2A+E), %[1]	11,99
Extracto según la escala Balling original, %	11,80
Azúcares reductores, %	1,160
Grado de azúcar del mosto, %	71,30
Grado de atenuación, % (grado real de fermentación)	60,00
pH	4,35
Color, °L	2,94
Aire, cm^3	1,20
Nitrógeno, cm^3	1,01
Oxígeno, cm^3	0,19
Oxígeno/aire, %	15,80
CO_2, % en peso	0,460
Acidez, %	0,135
Eritrodextrinas (reacción con iodo)	0
Amilodextrinas (reacción con iodo)	0
Dextrinas, %	2,73
Hierro, ppm	0,175
Prueba indicadora del tiempo, seg	290,0
Tensión superficial, dinas	46,00
Actividad superficial	0,367
$CaSO_4$, ppm	256,00
NaCl, ppm	153,00
Espuma («sigma»)	109,00
Densidad de espuma	20,40
Taninos, ppm	55,40
Viscosidad, cP	1,057
SO_2, ppm	13,20
Cenizas, %	0,148
Diacetilo, ppm	0,210
Cobre, ppm	0,245
Carbohidratos fraccionados, %	
glucosa	0,001
fructosa	Trazas
sacarosa	Trazas
maltosa	0,10
maltotriosa	0,20
maltotetraosa	0,45
sacáridos superiores	3,04
sacáridos totales	3,83
Proteínas fraccionadas, %	
proteínas totales	0,299
proteínas de elevado peso molecular	0,0710
proteínas de peso molecular medio	0,100
proteínas de bajo peso molecular	0,0951
N no proteico	0,0290
proteínas de elevado peso molecular/total	23,30
proteínas de peso molecular medio/total	33,20
proteínas de bajo peso molecular/total	31,60
N no proteico/total	9,6
Kilocalorías (kcal/400 ml)	168,30

FUENTE: Ohlmeyer and Matz (1970).
[1]N. del T.: E es el extracto seco (extracto real). A es la tasa de alcohol en peso.

Anexo 2. Tamaños del lote y de la muestra según la NTE INEN 2340 para las bebidas alcohólicas

INEN

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA NTE INEN 2 340:2002

BEBIDAS ALCOHÓLICAS. CERVEZA. MUESTREO.

Primera Edición

ALCOHOLIC BEVERAGES. BEER. SAMPLING.

First Edition

DESCRIPTORES: Bebidas alcohólicas, fermentación, cervaza, muestreo
AL 06.02-202
CDU: 663.413.008
CIIU: 3131
ICS: 67.160.10

7. PREPARACION DE LA MUESTRA PARA ANALISIS FISICO Y QUIMICO

7.1 Se atempera la cerveza en un intervalo de temperatura de 15°C a 20°C. La muestra se desgasifica transfiriéndola a un erlenmeyer grande y agitando, suavemente al comienzo y luego fuertemente, hasta que no haya escape de gases de la cerveza.

7.2 Si es necesario, se remueve el material en suspensión filtrando la cerveza a través de un papel de filtro seco. El embudo de filtración se cubre con un vidrio de reloj para reducir la evaporación.

7.3 Después de desgasificada, la cerveza debe tener una temperatura aproximada de 20°C.

8. TAMAÑO DE LA MUESTRA

8.1 El tamaño de la muestra debe ser representativo del lote y debe realizarse como se indica a continuación:

8.1.1 De cada lote se tomará, al azar, de acuerdo con lo indicado en la NTE INEN 255 para un plan de muestreo por atributos simple normal correspondiente al nivel de inspección especial S-3, como se indica en la tabla 1.

TABLA 1. Tamaños del lote y de la muestra

TAMAÑO DEL LOTE	TAMAÑO DE LA MUESTRA
2 a 15	2
16 a 50	3
51 a 150	5
151 a 500	8
501 a 3200	13
3201 a 35000	20
35001 a 500000	32
500001 o más	50

Anexo 3. Cálculo de los límites de detección y cuantificación del Pb(II) en el método de DPASV

y = 0,5197

a = 9,9435

b = -1,6177

$$y = 9{,}9435x - 1{,}6177$$

$$x = \frac{y - b}{a}$$

$$x = \frac{0{,}5197 + 1{,}6177}{9{,}9435}$$

$$x = 0{,}2149\ mg\ L^{-1}$$

$$\boldsymbol{X} = \frac{1}{n}\sum_{\boldsymbol{i=1}}^{\boldsymbol{q}} \boldsymbol{xi}$$

$$\boldsymbol{X} = \frac{\begin{array}{c}0{,}2149 + 0{,}2152 + 0{,}2189 + 0{,}2206 + 0{,}2206 + 0{,}2226 + 0{,}2240 \\ +0{,}2250 + 0{,}2291 + 0{,}2369\end{array}}{10}$$

$$\boldsymbol{X} = 0{,}22277\ mg\ L^{-1}$$

$$\boldsymbol{s} = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(xi - X)^2}$$

$$\boldsymbol{s} = \sqrt{\begin{array}{c}\frac{1}{9}\left((0{,}2149 - 0{,}22277)^2 + (0{,}2152 - 0{,}22277)^2 + (0{,}2189 - 0{,}22277)^2\right. \\ +(0{,}2206 - 0{,}22277)^2 + (0{,}2206 - 0{,}22277)^2 + (0{,}2226 - 0{,}22277)^2 \\ +(0{,}2240 - 0{,}22277)^2 + (0{,}2250 - 0{,}22277)^2 + (0{,}2291 - 0{,}22277)^2 \\ \left.+(0{,}2369 - 0{,}22277)^2\right)\end{array}}$$

$$s = 0{,}00657\ mg\ L^{-1}$$

$$LD = 3s$$

$$LD = 3(0{,}00657)$$

$$LD = 0{,}01971\ mg\ L^{-1}$$

$$LC = 10s$$

$$LC = 10(0{,}00657)$$

$$LC = 0{,}0657\ mg\ L^{-1}$$

Anexo 4. Cálculo de los límites de detección y cuantificación del Zn(II) en el método de DPASV

y = 3,8812

a = 8,2176

b = 2,7956

$$y = 8{,}2176x + 2{,}7956$$

$$x = \frac{y - b}{a}$$

$$x = \frac{3{,}8812 - 2{,}7956}{8{,}2176}$$

$$x = 0{,}1321\ mg\ L^{-1}$$

$$\boldsymbol{X} = \frac{1}{n}\sum_{\boldsymbol{i=1}}^{\boldsymbol{q}} \boldsymbol{xi}$$

$$\boldsymbol{X} = \frac{\begin{array}{c}0{,}1423 + 0{,}1331 + 0{,}1126 + 0{,}1559 + 0{,}1427 + 0{,}1077 + 0{,}1410 \\ +0{,}1302 + 0{,}1338 + 0{,}1230\end{array}}{10}$$

$$\boldsymbol{X} = 0{,}13242\ mg\ L^{-1}$$

$$\boldsymbol{s} = \sqrt{\frac{1}{n-1}\sum_{i=1}^{n}(xi - X)^2}$$

$$\boldsymbol{s} = \sqrt{\begin{array}{c}\frac{1}{9}\left((0{,}1423 - 0{,}13242)^2 + (0{,}1{,}331 - 0{,}13242)^2 + (0{,}1126 - 0{,}13242)^2\right. \\ +(0{,}1559 - 0{,}13242)^2 + (0{,}1427 - 0{,}13242)^2 + (0{,}1077 - 0{,}13242)^2 \\ +(0{,}1410 - 0{,}13242)^2 + (0{,}1302 - 0{,}13242)^2 + (0{,}1338 - 0{,}13242)^2 \\ \left.+(0{,}1230 - 0{,}13242)^2\right)\end{array}}$$

$$s = 0{,}01481\ mg\ L^{-1}$$

$$LD = 3s$$

$$LD = 3(0{,}01481)$$

$$LD = 0{,}04443\ mg\ L^{-1}$$

$$LC = 10s$$

$$LC = 10(0{,}01481)$$

$$LC = 0{,}1481\ mg\ L^{-1}$$

Anexo 5. Cálculos para determinar la concentración de Pb(II) en cerveza a partir de la ecuación de la curva

y = 7,2385

a = 12,484

b = -2,0667

$$\mathrm{y} = 12{,}484\mathrm{x} - 2{,}0667$$

$$x = \frac{7{,}2385 + 2{,}0667}{12{,}484}$$

$$x = 0{,}7454\ mg\ L^{-1}$$

$$Cf = \frac{x + 0{,}01872}{0{,}025}\left(\frac{mg}{L}\right)$$

$$x = \ 0{,}025x - 0{,}01872$$

$$x = \ 0{,}025(0{,}7454) - 0{,}01872$$

$$x = \ -8{,}5x10^{-5}mg$$

Como no existen concentraciones negativas, se lo toma como absoluto

$$Concentración\ muestra = \frac{x}{0{,}025}$$

$$Concentración\ muestra = \frac{8{,}5x10^{-5}mg}{0{,}025\ L}$$

$$Concentración\ muestra = 3{,}4x10^{-3}mg\ L^{-1}$$

Diluciones

$$Concentración\ muestra\ real = \frac{3{,}4x10^{-3}mg\ L^{-1} * \frac{0{,}001L}{0{,}025L} * FD * 0{,}025}{0{,}05}$$

$$Concentración\ muestra\ real = \frac{3{,}4x10^{-3}mg\ L^{-1} * \frac{0{,}001L}{0{,}025L} * 50 * 0{,}025}{0{,}05}$$

$$Concentración\ muestra\ real = 0{,}0034\ mg\ L^{-1}Pb(II)$$

Anexo 6. Cálculos para determinar la concentración de Zn(II) en cerveza a partir de la ecuación de la curva

y = 11,8094

a = 8,8808

b = 1,8309

$$y = 8{,}8808x + 1{,}8309$$

$$x = \frac{11{,}8094 - 1{,}8309}{8{,}8808}$$

$$x = 1{,}1236\ mg\ L^{-1}$$

$$Cf = \frac{x + 0{,}01872}{0{,}025}\ \left(\frac{mg}{L}\right)$$

$$x = \ 0{,}025x - 0{,}01876$$

$$x = \ 0{,}025(1{,}1236) - 0{,}01876$$

$$x = \ 9{,}33x10^{-3}mg$$

$$Concentración\ muestra = \frac{x}{0{,}025}$$

$$Concentración\ muestra = \frac{9{,}33x10^{-5}mg}{0{,}025\ L}$$

$$Concentración\ muestra = 0{,}3732\ mg\ L^{-1}$$

Diluciones

$$Concentración\ muestra\ real = \frac{0{,}3732\ mg\ L^{-1} * \frac{0{,}001L}{0{,}025L} * FD * 0{,}025}{0{,}05}$$

$$Concentración\ muestra\ real = \frac{0{,}3732mg\ L^{-1} * \frac{0{,}001L}{0{,}025L} * 50 * 0{,}025}{0{,}05}$$

$$Concentración\ muestra\ real = 0{,}3732\ mg\ L^{-1}Zn(II)$$

Anexo 7. Pruebas t de Student para: a) Pb(II) y b) Zn(II)

a) Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales, en el contenido de Pb(II) en cerveza artesanal

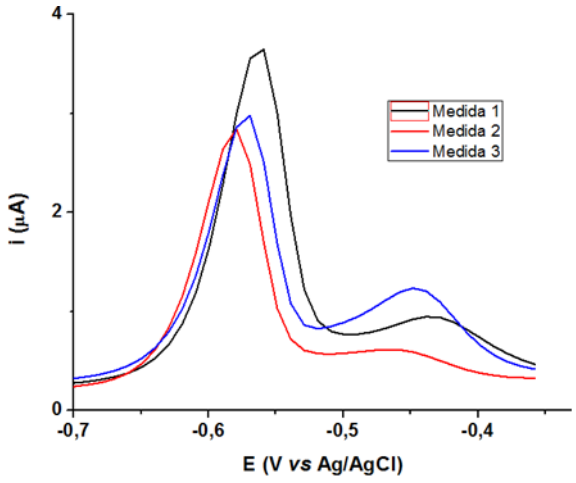
	ASV	*FAAS*
Media	0,12111667	0,06418333
Varianza	0,00716639	7,0854E-05
Observaciones	6	6
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	1,63928947	
P(T<=t) una cola	0,08103901	
Valor crítico de t (una cola)	2,01504837	
P(T<=t) dos colas	0,16207802	
Valor crítico de t (dos colas)	2,57058184	

b) Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas desiguales, en el contenido de Zn(II) en cerveza artesanal

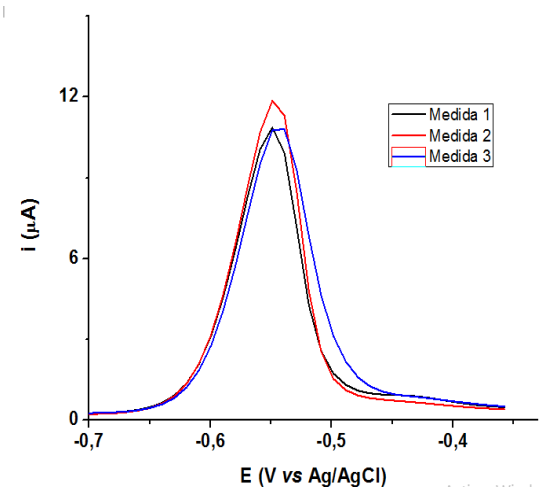
	ASV	*FAAS*
Media	0,12111667	0,06418333
Varianza	0,00716639	7,0854E-05
Observaciones	6	6
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	5	
Estadístico t	1,63928947	
P(T<=t) una cola	0,08103901	
Valor crítico de t (una cola)	2,01504837	
P(T<=t) dos colas	0,16207802	
Valor crítico de t (dos colas)	2,57058184	

Anexo 8. Voltamperogramas del Pb (II) para la determinación de la exactitud y precisión del método, a concentraciones de 0,375 (a, b y c) y 0,875 mg L^{-1} (d, e, f), en 3 días

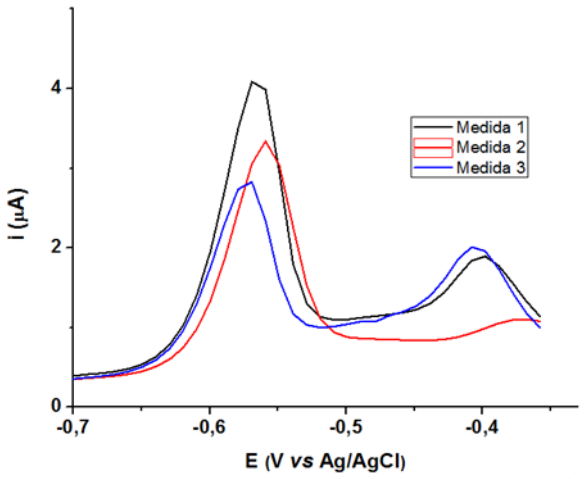
a)



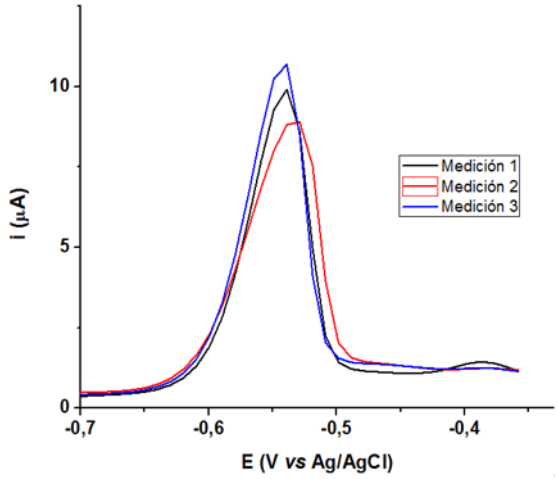
d)



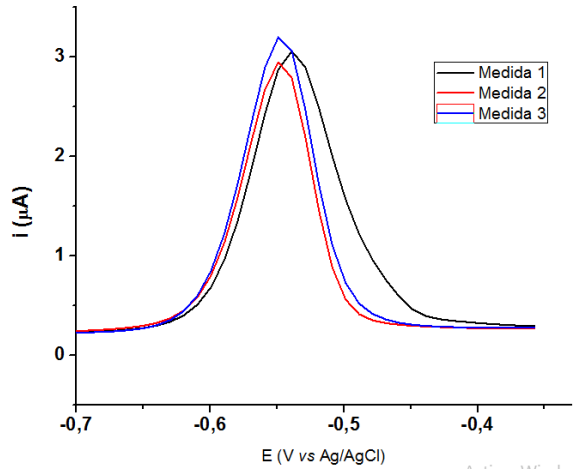
b)



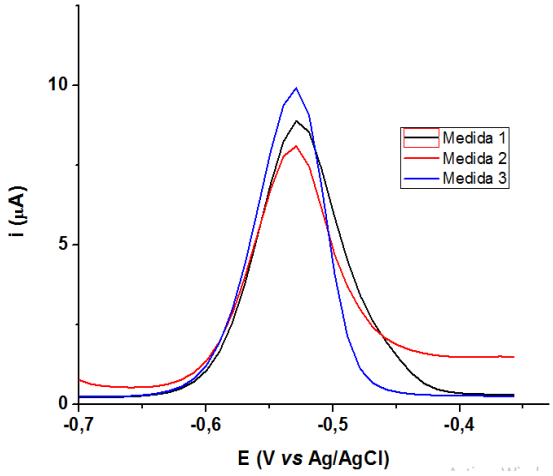
e)



c)

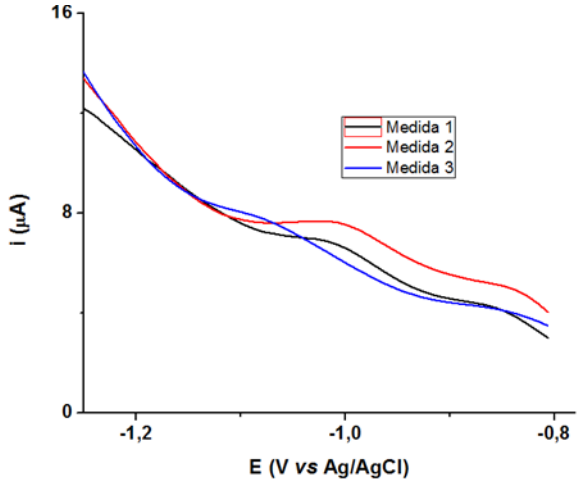


f)

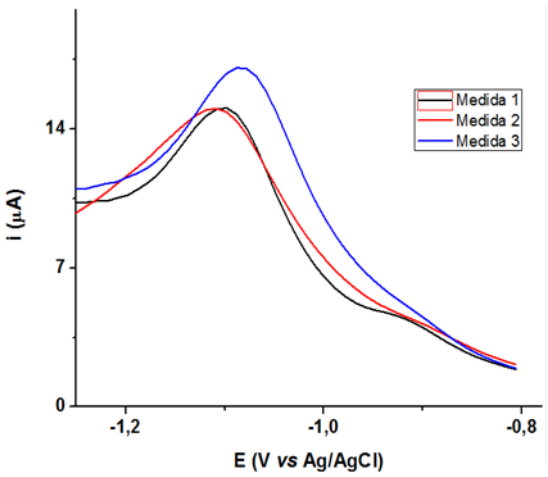


Anexo 9. Voltamperogramas del Zn (II) para la determinación de la exactitud y precisión del método, a concentraciones de 0,4 (a, b, c) y 0,875 mg L^{-1} (d, e, f), en 3 días

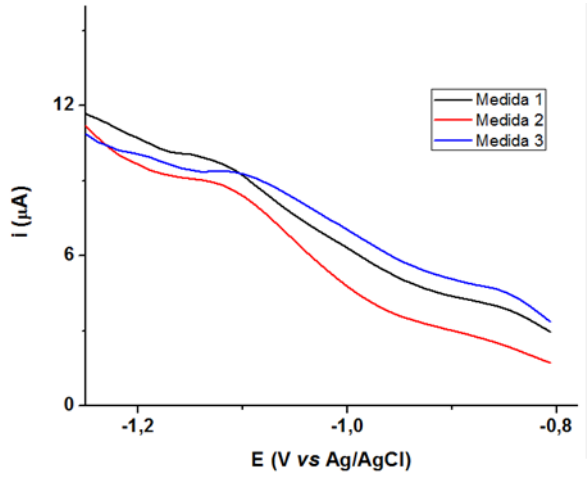
a)



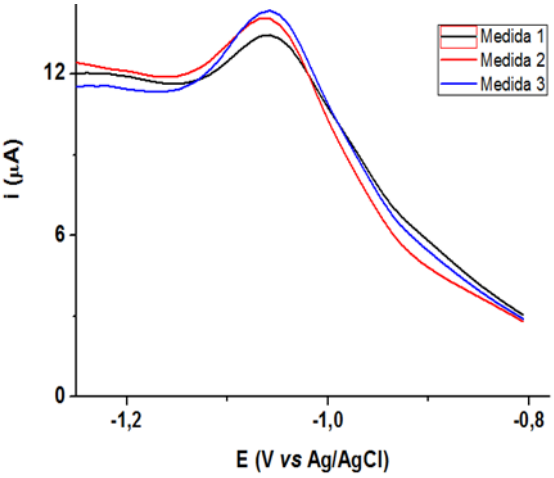
d)



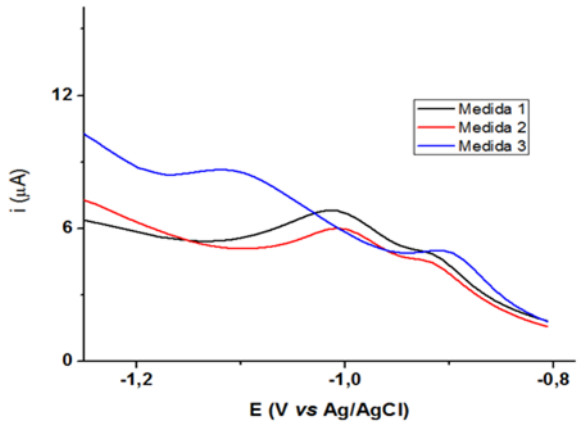
b)



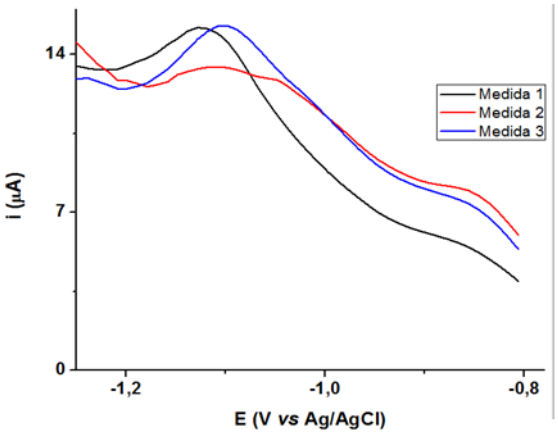
e)



c)

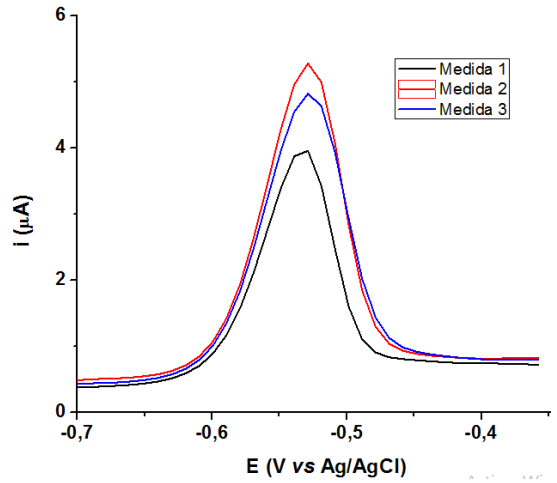


f)

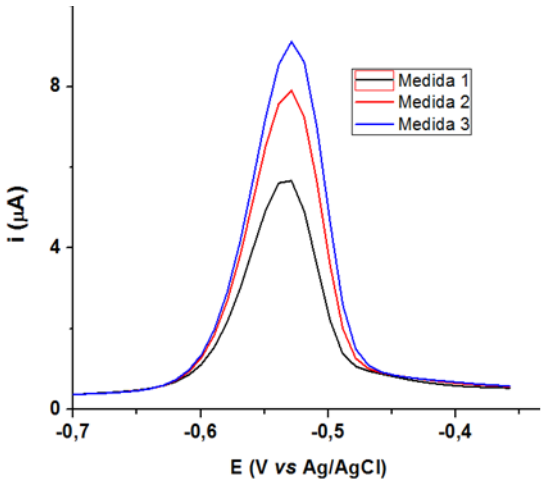


Anexo 10. Voltamperogramas de las muestras de cervezas artesanales, diluidas en 1:50 y fortificadas con 80 mg L^{-1} de Pb (II) en: a) 593, b) Latitud Cero, c) Santa Rosa, d) Camino al Sol, e) Monkeys Brew, f) Páramo

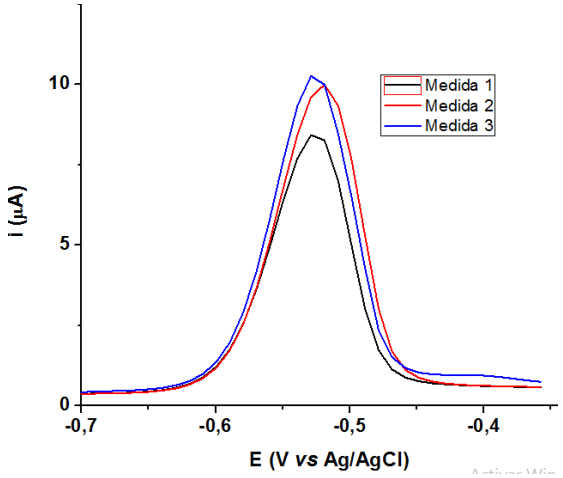
a)



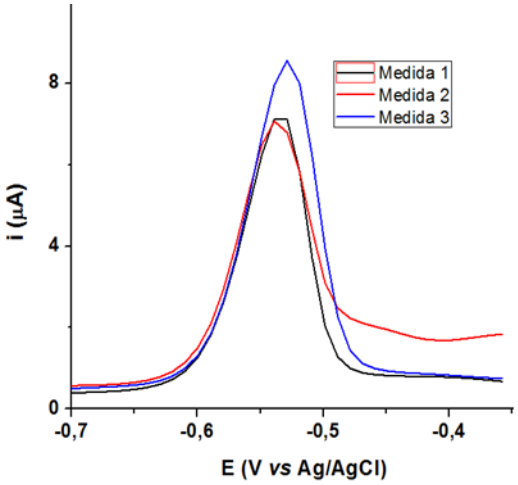
b)



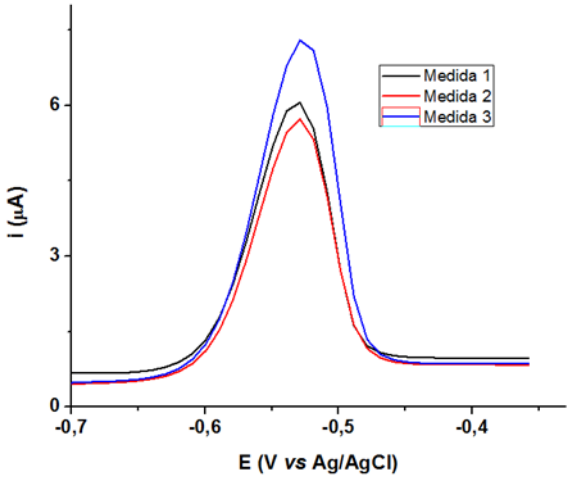
c)



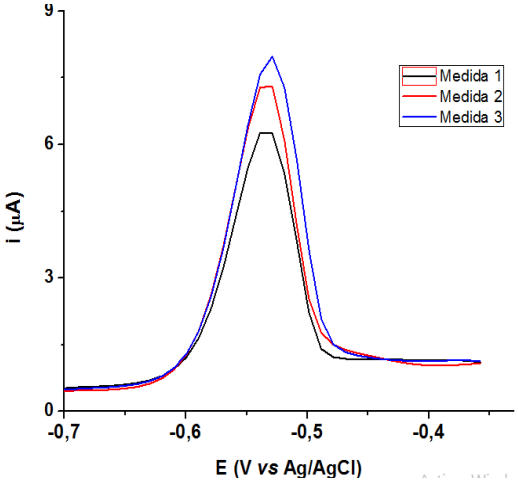
d)



e)

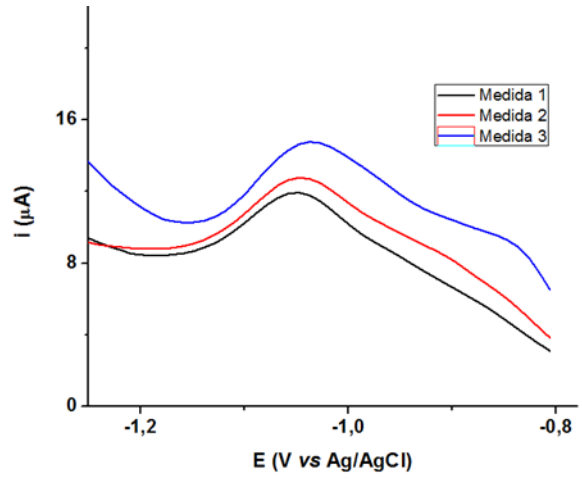


f)

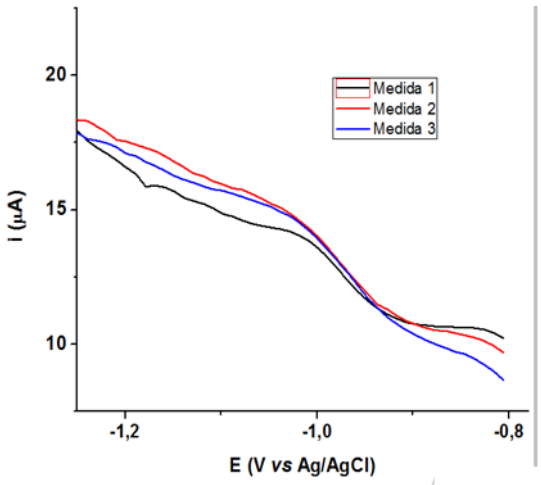


Anexo 11. Voltamperogramas de las muestras de cervezas artesanales, diluidas en 1:50 y fortificadas con 70 mg L^{-1} de Zn (II) en: a) 593, b) Monkeys Brew, c) Latitud Cero, d) Santa Rosa, e) Camino al Sol, f) Páramo

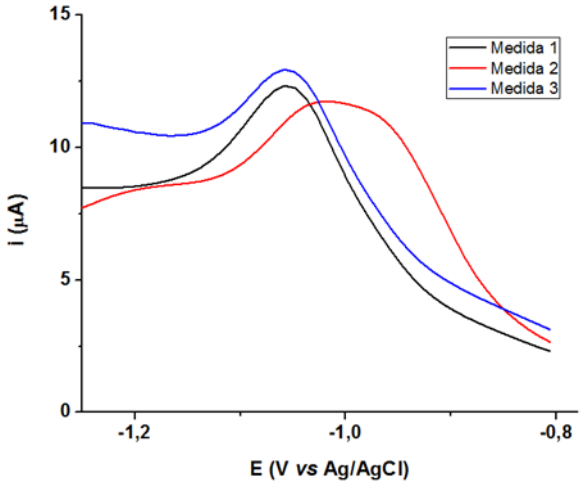
a)



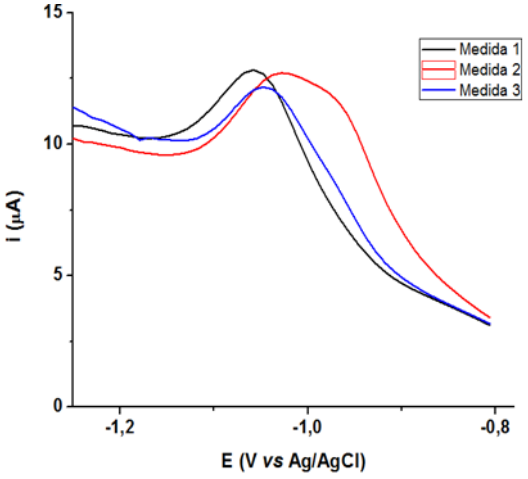
b)



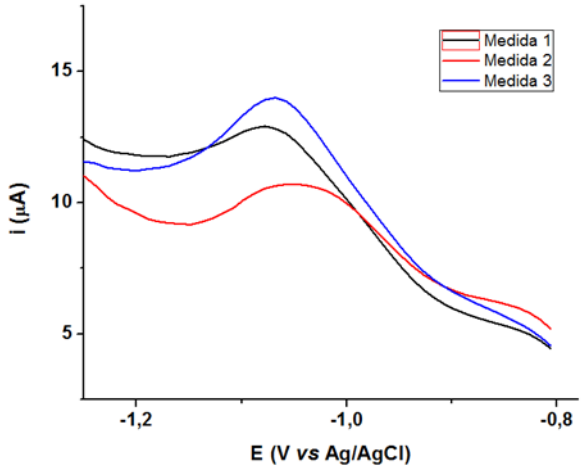
c)



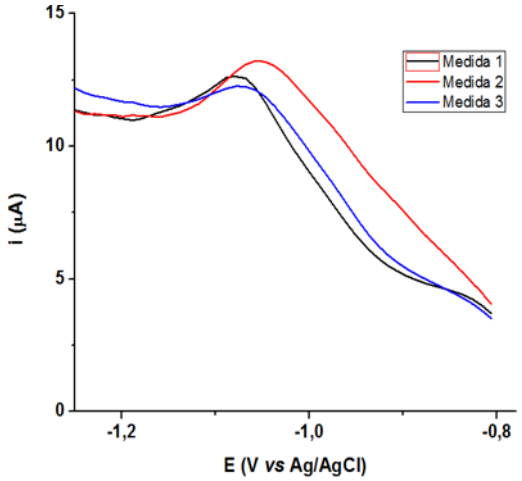
d)



e)



f)



Anexo 12: NTE INEN 2262: Bebidas Alcohólicas. Cerveza. Requisitos

INEN

INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN

Quito - Ecuador

NORMA TÉCNICA ECUATORIANA **NTE INEN 2 262:2003**

BEBIDAS ALCOHÓLICAS. CERVEZA. REQUISITOS.

Primera Edición

ALCOHOLIC BEVERAGES. BEER. SPECIFICATIONS.

First Edition

4. REQUISITOS

4.1 Requisitos específicos

4.1.1 La cerveza debe cumplir con los requisitos establecidos en las tablas 1 y 2.

TABLA 1. Requisitos fisicoquímicos

REQUISITOS	UNIDAD	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉTODO DE ENSAYO
Contenido alcohólico a 20°C	% (v/v)	2,0	5,0	NTE INEN 2 322
Acidez total, expresado como ácido láctico	% (m/m)	-	0,3	NTE INEN 2 323
Carbonatación	Volúmenes de CO_2	2,2	3,5	NTE INEN 2 324
pH	-	3,5	5,0	NTE INEN 2 325
Contenido de hierro	mg/dm^3	-	0,2	NTE INEN 2 326
Contenido de cobre	mg/dm^3	-	1,0	NTE INEN 2 327
Contenido de zinc	mg/dm^3	-	1,0	NTE INEN 2 328
Contenido de arsénico	mg/dm^3	-	0,1	NTE INEN 2 329
Contenido de plomo	mg/dm^3	-	0,1	NTE INEN 2 330