

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**EVALUACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA DE LOS NIVELES DE Cd
Y Pb EN VINO TINTO PRODUCIDOS EN LA REGIÓN DE AREQUIPA
EN EL PERIODO 2016**

Tesis presentada por la Bachiller:

Bonilla Ccuno, Erika

Para optar el Título Profesional de

Química Farmacéutica

Asesor: Mgter. Medina Pérez, Jeaneth M.

Arequipa – Perú

2018

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 20160000048255

N° Trámite en Fac. 1694-2016

Fecha 09-11-2016

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: **BONILLA CCUNO, Erika**

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

“EVALUACION VOLTAMPEROMETRICA DE LOS NIVELES DE CADMIO Y PLOMO EN VINO TINTO PRODUCIDOS EN LA REGION DE AREQUIPA EN EL PERIODO 2016”

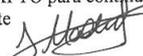
DICTAMINADORES: 1) Dra. Gaby Velasco Lozano 2) Q. F. Mocita De La Fuente Torres

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad
Atentamente

Firmas :   (Devolver antes de 8 días hábiles) Fecha 17/11/16

ASESOR: Mgter. Jeaneth Medina Pérez

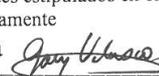
DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por las recurrentes, sugerimos se cambie el título a: **“EVALUACION VOLTAMPEROMETRICA DE LOS NIVELES DE Cd Y Pb EN VINO TINTO PRODUCIDOS EN LA REGION DE AREQUIPA EN EL PERIODO 2016”**, después de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad
Atentamente

Firma  Fecha 11/06/18

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

1) **Dra. Gaby Velasco Lozano** 3) **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**
2) **Q. F. Mocita De La Fuente Torres**

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por los recurrente, y luego de haber verificado el cumplimiento de los objetivos, la redacción del informe, de los resultados, discusión y conclusiones correspondientes, consideramos se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente

Firma   (Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha 26/06/18

JURADOS: Presidente **Dra. Gaby Velasco Lozano**
Vocal **Q. F. Mocita De La Fuente Torres**
Secretario **Mgter. Julitza Paredes Fuentes**

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

Fecha: 05/07/18 Hora: 20.00 Local: C- 402 (SUM)


DECANO 02/07/18

AGRADECIMIENTOS

“A Dios por darme padres maravillosos los cuales supieron guiar mis caminos y apoyarme en cada parte de la vida. ”

“Agradezco a mis padres, Doroteo y Nelly quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación, me han apoyado en cada momento, cada caída y cada reto de mi vida. ”

“Agradezco de manera especial a mi asesora Mgter. Jeaneth M. Medina Pérez por su apoyo incondicional, por la paciencia brindada y el tiempo dedicado para realizar con éxito este proyecto. ”

“Agradezco a mis amigos Mayra, Fabiola, Lourdes, Eulogio, Juan José, Orlando, por su apoyo emocional y paciencia. ”

ÍNDICE

RESUMEN	I
ABSTRACT	III
INTRODUCCIÓN	V
HIPÓTESIS	VII
OBJETIVOS	VIII
 CAPITULO I	
MARCO TEÓRICO	1
1. Uva	1
2. Bebidas Alcohólicas	3
2.1. Fermentadas.....	3
2.2. Destiladas	3
2.3. Licores	4
3. Vino.....	4
3.1. Fabricación	5
3.2. Cultivo de la Vid	5
3.3. Control de Calidad.....	5
3.4. Tratamiento del Vino.....	6
3.5. Conversión de Mosto a Vino.....	6
3.6. Embotellado y Vestido	7
4. Clasificación de Vinos	8
5. Composición del Vino.....	9
5.1. Componentes Básicos.....	12
5.1.1. Agua:.....	12
5.1.2. Alcohol:.....	12
5.1.3. Glicerina:.....	12
5.1.4. Aldehídos y ésteres:	13
6. Control de Calidad.....	13
6.1. Acidez Total	13
6.2. Acidez Volátil.....	13
6.3. Grado Alcohólico	13

6.4. Determinación de Sulfatos	14
6.5. pH	14
7. Metales en Vino	14
8. Pb(II)	15
8.1. Consideraciones Ambientales	16
8.2. Efectos Tóxicos	17
8.3. Pb(II) en los Alimentos	18
9. Cd(II).....	19
9.1. Consideraciones Ambientales	20
9.2. Efectos Tóxicos	21
9.3. Cd(II) en los Alimentos.....	22
10. Voltamperometría.....	23
11. Digestión de Muestras.....	32
CAPITULO II	
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Muestra	35
2. Lugar de Experimentación.....	35
3. Materiales, reactivos y equipos.....	35
3.1. Materiales	35
3.2. Reactivos	35
3.3. Electroodos.....	36
3.4. Soluciones	36
3.5. Equipos.....	36
4. Métodos: Técnicas e Instrumentos.....	36
4.1. Procesamiento de Muestras	36
4.2. Validación del Análisis Voltamperométrico	38
4.2.1. Validación Electrónica.....	38
4.2.2. Validación Química	39
4.2.3. Validación Analítica	39
4.3. Determinación de Cd(II) Y Pb(II).....	42
4.3.1. Técnicas Aplicadas	42
4.3.2. Análisis Estadístico: Estadística de Medidas Repetidas	47

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
1. Técnica de Digestión Aplicada.....	50
2. Validación del análisis voltamperométrico.....	52
2.1. Validación Electrónica	52
2.2. Validación Analítica.....	54
2.2.1. Validación del método para Cd(II)	54
2.2.2. Validación del método para Pb(II).....	59
3. Determinación de Pb (II) y Cd (II) en vinos.....	63
3.1. Muestreo de vino	63
3.2. Presentación de muestras:	64
3.3. Presentación de Niveles detectados de Pb(II)	64
3.4. Presentación de Niveles detectados de Cd(II).....	69
CONCLUSIONES	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
ANEXOS	78
Anexo N° 1 Preparación y Medición de las Muestras.....	79
Anexo N° 2 Resultados	81
Anexo N° 3 Análisis Estadístico de los Resultados.....	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Control de calidad de las uvas.	6
Figura N° 2. Flujo que sigue el proceso de embotellado y vestido.	8
Figura N° 3. Clasificación del vino, tomado de “Introducción al mundo de vino” de la bodega Rioja.....	8
Figura N° 4. Clasificación de los vinos de mesa “Introducción al mundo de vino” de la bodega Rioja.....	9
Figura N° 5. Composición representativa de un vino de mesa tinto seco (% p/p).	9
Figura N° 6. Concentraciones típicas (mg. L ⁻¹) de los principales componentes del vino, excluyendo agua y etanol. Los componentes de trazas (0.1 ng. L ⁻¹ - 0 mg. L ⁻¹) no serían visibles y por lo tanto no están incluidos. ..	10
Figura N° 7. Comparación de los cromatogramas (GC-MS) para a) un zumo de uva y b) un vino producido a partir de dicho zumo de uva. pico en los cromatogramas representa al menos un compuesto volátil único	11
Figura N° 8. Transporte de Pb(II) en el ambiente.	17
Figura N° 9. Señales de excitación de voltaje contra tiempo utilizadas en voltamperometría.....	25
Figura N° 10. Potenciostato manual para voltamperometría: electrodo de referencia (ER), electrodo de trabajo (ET), contra electrodo (EC).	25
Figura N° 11. Dispositivo para mediciones voltamperométricas.	26
Figura N° 12. Diferentes tipos de curvas voltamperométricas. a) Solución agitada o con electrodo que cuenta con rotación; b) solución sin agitar, y c) reducción (u oxidación) por etapas del analito o de una mezcla de dos sustancias electroactivas (solución sin agitar)	27
Figura N° 13. Modelo de un voltamperómetro.	27
Figura N° 14. Voltamperograma.	28
Figura N° 15. Esquema de voltamperometría de pulso diferencial.	29
Figura N° 16. Etapas de la redisolución anódica.	30
Figura N° 17. Tubos después del proceso de digestión UV, variando el tiempo.	38
Figura N° 18. Digestor UV – Methrom 705	43
Figura N° 19. Celda de análisis voltamperométrica.	47
Figura N° 20. Proceso de digestión por fotólisis UV	51

Figura N° 21. Linealidad de la validación electrónica.	52
Figura N° 22. Validación electrónica del pico.....	53
Figura N° 23. Validación química.....	54
Figura N° 24. Linealidad del método voltamperométrico para Cd(II).	55
Figura N° 25. Gráfico de concentración de Cd(II) versus Intensidad.	58
Figura N° 26. Gráfica de concentración de Cd(II) versus desviación estándar.....	58
Figura N° 27. Linealidad del método voltamperométrico de Pb(II).....	60
Figura N° 28. Gráfico de concentración de Pb(II) versus Intensidad.....	62
Figura N° 29. Gráfica de concentración de Pb(II) versus desviación estándar.	62
Figura N° 30. Niveles detectados de Pb(II) para 3 lotes de una muestra de VHA, donde se muestra los valores máximos establecidos por la OIV, D.S. N 005-2013-PRODUCE y CODEX STAN 193-1995.....	65
Figura N° 31. Niveles detectados de Pb(II) para 3 lotes de una muestra de VMT, donde se muestra los valores máximos establecidos por la OIV, D.S. N 005-2013-PRODUCE y CODEX STAN 193-1995.....	66
Figura N° 32. Niveles detectados de Pb(II) para 3 lotes de una muestra de VSN, donde se muestra los valores máximos establecidos por la OIV, D.S. N 005-2013-PRODUCE y CODEX STAN 193-1995.	66
Figura N° 33. Niveles detectados de Pb(II) para 3 lotes de una muestra de VPS, donde se muestra los valores máximos establecidos por la OIV, D.S. N 005-2013-PRODUCE y CODEX STAN 193-1995.....	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1.	Clasificación taxonómica.....	2
Tabla N° 2.	Clasificación primaria, secundaria y terciaria de los aromas del vino.....	11
Tabla N° 3.	Pruebas piloto para determinar la cantidad de muestra a digerir	37
Tabla N° 4.	Digestión de muestras variando el tiempo de digestión.....	38
Tabla N° 5.	Lotes muestreados.....	43
Tabla N° 6.	Condiciones para la determinación voltamperométrica.....	46
Tabla N° 7.	Porcentaje de recuperación de Pb(II) y Cd(II) en muestras digeridas a diferentes tiempos.	52
Tabla N° 8.	Datos de Linealidad para determinación de Cd(II).....	55
Tabla N° 9.	Datos de Precisión para determinación de Cd(II).	56
Tabla N° 10.	Datos de Precisión intermedia para determinación de Cd(II).	56
Tabla N° 11.	Datos de exactitud para determinación de Cd(II).	57
Tabla N° 12.	Datos de Linealidad para determinación de Pb(II).	59
Tabla N° 13.	Datos de Precisión para determinación de Pb(II).....	60
Tabla N° 14.	Datos de Precisión intermedia para determinación de Pb(II).	61
Tabla N° 15.	Datos de exactitud para determinación de Pb(II).....	61
Tabla N° 16.	Muestras adquiridas para análisis.	63
Tabla N° 17.	Muestras de estudio (4 marcas, 3 lotes).	64

RESUMEN

La vitivinicultura es tan antigua como el hombre, la industrialización de esta actividad, permite incluir diferentes agentes capaces de aportar compuestos tóxicos a los vinos, ya sea en el cultivo, o en el procesamiento.

El objetivo de esta investigación es evaluar por voltamperometría los niveles de Cd(II) y Pb(II) en vino tinto producidos en la Región de Arequipa en el periodo 2016 y determinar si superan los niveles máximos establecidos por los organismos reguladores nacionales e internacionales.

La metodología aplicada consistió en validar una técnica voltamperométrica para la identificación y cuantificación de Pb(II) y Cd(II) en vino tinto, para ello se analizaron tres lotes diferentes, correspondientes a cuatro marcas de vino tinto expandidas en los principales centros de abasto de la ciudad de Arequipa, estas fueron procesadas por digestión UV previo a la determinación de los niveles de Cd(II) y Pb(II).

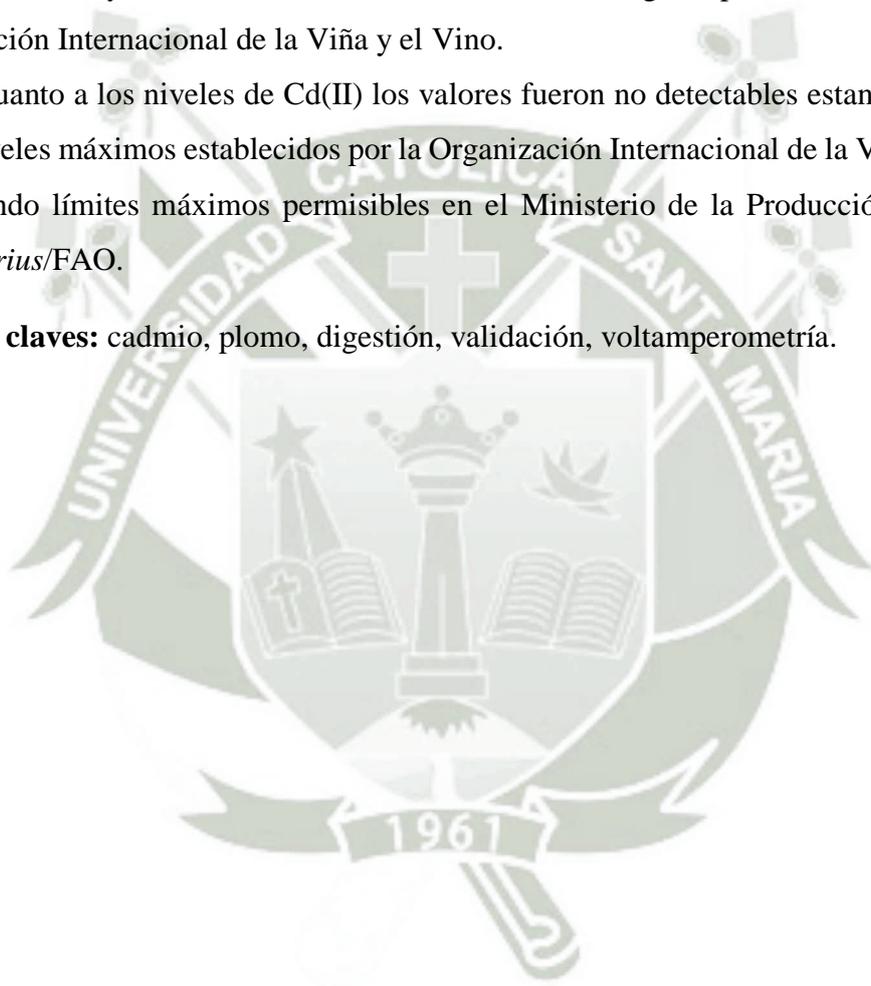
Los resultados de la validación fueron: En cuanto a la linealidad del método para la cuantificación de Pb(II), este mostró un coeficiente de correlación de 0.999; el método tiene los siguientes límites de detección y cuantificación: 0.22 μg de Pb(II). L^{-1} de vino y 0.75 μg de Pb(II). L^{-1} de vino, respectivamente. Para la identificación y cuantificación de Cd(II) en vino tinto se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.9992, los límites de detección y cuantificación son: 0.012 μg de Cd(II). L^{-1} de vino y 0.039 μg de Cd(II). L^{-1} de vino respectivamente, lo que nos indica que el método cumple con las especificaciones dadas por la AOAC, siendo un método preciso y exacto.

Se evaluó los niveles de Pb(II) en las muestras de vino recolectadas, encontrando concentraciones en el rango de $0.774 \pm 0.073 \text{ mg. L}^{-1}$ como valor mínimo y como valor máximo $2.416 \pm 0.168 \text{ mg. L}^{-1}$. Para Cd(II) en muestras de vino tinto, los valores fueron no detectables (menores al límite de detección de $0.012 \mu\text{g. L}^{-1}$).

Se concluye que los niveles de Pb(II) detectados en las muestras son superiores a lo establecido por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), Ministerio de la Producción y *Codex Alimentarius*/FAO, a excepción del lote 3 de una de las marcas estudiadas ($0.217 \pm 0.02 \text{ mg. L}^{-1}$), que no supera los límites establecidos por el Ministerio de la Producción y el *Codex Alimentarius*/FAO; sin embargo, supera lo establecido por la Organización Internacional de la Viña y el Vino.

En cuanto a los niveles de Cd(II) los valores fueron no detectables estando por debajo de los niveles máximos establecidos por la Organización Internacional de la Viña y el Vino, no habiendo límites máximos permisibles en el Ministerio de la Producción y el *Codex Alimentarius*/FAO.

Palabras claves: cadmio, plomo, digestión, validación, voltamperometría.





ABSTRACT



The vitiviniculture is as old as the man, the industrialization of this activity, allows to include different agents able to contribute toxic compounds to the wines, either in the culture, or in the processing.

The objective of this research is to evaluate by voltammetry the levels of Cd (II) and Pb (II) in red wine produced in the Arequipa Region in the 2016 period and to determine if they exceed the maximum levels established by the national and international regulatory bodies.

The applied methodology consisted of validating a voltammetric technique for the identification and quantification of Pb (II) and Cd (II) in red wine, for which three different batches were analyzed, corresponding to four brands of red wine sold in the main supply centers from the city of Arequipa, these were processed by UV digestion prior to the determination of the levels of Cd (II) and Pb (II).

The results of the validation were: Regarding the linearity of the method for the quantification of Pb (II), it showed a correlation coefficient of 0.999; The method has the following limits of detection and quantification: 0.22 μg of Pb (II). L-1 wine and 0.75 μg Pb (II). L-1 of wine, respectively. For the identification and quantification of Cd (II) in red wine a correlation coefficient of 0.9992 was obtained, the limits of detection and quantification are: 0.012 μg of Cd (II). L-1 wine and 0.039 μg Cd (II). L-1 of wine respectively, which indicates that the method meets the specifications given by the AOAC, being a precise and accurate method.

The levels of Pb (II) in the collected wine samples were evaluated, finding concentrations in the range of 0.774 ± 0.073 mg. L-1 as a minimum value and as a maximum

value $2,416 \pm 0.168$ mg. L⁻¹ For Cd (II) in red wine samples, the values were not detectable (lower than the detection limit of $0.012 \mu\text{g L}^{-1}$).

It is concluded that the levels of Pb (II) detected in the samples are higher than that established by the International Organization of Vine and Wine (OIV), Ministry of Production and Codex Alimentarius / FAO, with the exception of lot 3 of a of the brands studied (0.217 ± 0.02 mg L⁻¹), which does not exceed the limits established by the Ministry of Production and the Codex Alimentarius / FAO; However, it exceeds what is established by the International Organization of Vine and Wine.

As for the levels of Cd (II) the values were not detectable, being below the maximum levels established by the International Organization of Vine and Wine, there being no maximum permissible limits in the Ministry of Production and the Codex Alimentarius / FAO.

Keywords: cadmium, lead, digestion, validation, voltammetry.



INTRODUCCIÓN

Ninguna otra actividad agrícola ha generado una mitología tan rica y vasta como la vitivinicultura, el vino formó parte desde muy temprano de los ritos religiosos: Dionisio, Baco, el judaísmo y el cristianismo, adoptaron al vino como símbolo de vida, muerte y resurrección. Por su naturaleza, la vitivinicultura crea cultura, arraiga pobladores, aplica tradiciones y saberes heredados de generaciones anteriores, une pueblos a través del intercambio comercial. Como dice Fernand Braudel, “la viña es sociedad, poder político, campo excepcional de trabajo y civilización”(1).

Los romanos también fueron expertos viticultores y fueron los responsables de propagar la vitivinicultura por todo el Imperio. Con ellos, el consumo del vino se expandió incluso más allá del norte de Alemania. Los emperadores, las familias más pudientes de la antigua Roma y todos aquellos con posibilidades, gustaban de deleitarse con otras recetas más elaboradas como la sapa, pues este preparado se obtenía mediante la cocción del mosto en ollas de plomo porque lo endulzaban, incluso consiguieron elaborar su forma cristalina, el llamado azúcar de plomo, y utilizarlo como edulcorante artificial (1).

El Pb(II) es un metal pesado caracterizado por ocasionar efectos tóxicos sobre el tracto gastrointestinal, sobre el sistema renal y sobre el SNC y periférico, así como interferencias con sistemas enzimáticos implicados en la síntesis del grupo hemo. A pesar de que, en los últimos diez años, los contenidos de Pb(II) de los productos alimenticios se han reducido sensiblemente gracias a los esfuerzos realizados para reducir la emisión de Pb(II) en su origen y por los progresos en la garantía de calidad de los análisis químicos, la dieta sigue siendo una fuente importante de exposición de Pb(II). Es por ello que, el objetivo a largo plazo de las autoridades sanitarias es el de continuar reduciendo los contenidos medios de Pb(II) en los productos alimenticios con el fin de que las ingestas medias dietéticas de plomo de las poblaciones cumplan con la PTWI (Provisional Tolerable Weekly Intake) de 25 $\mu\text{g Pb/Kg/semana}$ establecida por el Comité Mixto FAO/OMS (2).

El Cd(II) es un metal pesado presente de forma natural, está presente en el agua y suelo, y acumulado por los animales y vegetales transmitiéndose al ser humano a través del consumo de pescado y marisco, carne y vegetales con altas concentraciones de Cd(II) (4), la Organización Internacional de la Viña y el Vino indica que el vino puede contener hasta 0.01 mg. L⁻¹ de Cd(II) (41).

A mediados del siglo XVI, algunos españoles salieron de la recién fundada ciudad de Arequipa y comenzaron a explorar la región al sur de la ciudad en busca de nuevas tierras para sembrar las uvas, trigo, caña de azúcar y otros cultivos de su patria. Los colonos tomaron el asunto en sus propias manos, plantaron viñedos cada vez más grandes y establecieron así la agroindustria de vino y pisco (aguardiente de uva, brandy), que dominó, en diversos grados (1).

Por lo tanto, hoy en día la calidad del vino se evalúa no sólo por el aspecto organoléptico, sino también por determinados parámetros fisicoquímicos como, por ejemplo: el grado alcohólico, concentración de sulfitos, concentraciones traza de metales tóxicos.

En cuanto al Pb(II), la Organización Internacional de la Viña y el Vino indica que el vino puede contener hasta 0.15 mg. L⁻¹ de Pb(II) (41)

Existen investigaciones realizadas en nuestra región sobre la presencia de Pb(II) en leche y la presencia de Cd(II) y Pb(II) en el alimento del ganado vacuno (5) Esto nos lleva a pensar que otros productos elaborados en la región Arequipa podrían contener concentraciones elevadas de metales tóxicos como el Pb(II) y Cd(II).

En la actualidad, sin embargo, debido a la aplicación de límites legales cada vez más restrictivos de los contenidos de metales en el vino y al constante control de calidad, existe una demanda cada vez mayor de técnicas analíticas sensibles, potentes y fiables, es por ello que se necesita emplear un método analítico lo suficientemente sensible para poder detectar y cuantificar su presencia. Diversos artículos señalan al método voltamperométrico como uno de los más sensibles y económicos.

HIPÓTESIS

“Dado que el Pb(II) y el Cd(II) son considerados metales tóxicos por los efectos nocivos que producen, la presencia de estos metales puede encontrarse en el agua, suelo, insecticidas o en el aire y que de forma indirecta o directa es probable que puedan entrar en contacto con los cultivos de la vid y así estar presentes en vinos, y que los valores hallados superen los niveles máximos establecidos por la normativa nacional y organismos reguladores internacionales”.



OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar por voltamperometría los niveles de Cd(II) y Pb(II) en vino tinto producidos en la Región de Arequipa en el periodo 2016 y comparar si superan los niveles máximos establecidos por los organismos reguladores nacionales e internacionales.

Objetivos Específicos

- Definir la mejor técnica de digestión de las muestras analizadas.
- Validar una técnica analítica para identificar y cuantificar Pb(II) y Cd(II) en vino tinto por voltamperometría de redisolución anódica.
- Determinar la concentración de Pb(II) y Cd(II) en vino tinto.
- Evaluar si los niveles de Cd(II) y Pb(II) hallados superan los niveles máximos establecidos por la normativa nacional y organismos reguladores internacionales.

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1. Uva

Conocida como la vid o parra, es una planta leñosa trepadora que puede alcanzar con facilidad los treinta metros de altura si se le deja crecer, pero debido a la intervención humana, es podada anualmente alcanzando la altura de un metro. La vid es una planta con flores, una angiosperma de la clase de las dicotiledóneas, de la subclase con flores muy simples (*Choripetalae*) aunque con un cáliz y corola más avanzados (*Dyalypetalae*). Es originaria de la zona mediterránea y de Asia menor, aunque en la actualidad se cultiva en todo el mundo. Prefiere climas templados y no es exigente en cuanto a suelos debido a que se adapta a muchos de estos, aunque su crecimiento se ve favorecido en terrenos pedregosos y bien drenados. Pueden llegar a vivir hasta cien años.(6)(7)

El fruto de la *Vitis vinifera* es la uva y es caracterizada por su forma casi esférica u ovalada y tiene de doce a dieciocho milímetros de diámetro. Se distinguen tres partes: epicarpio, mesocarpio y endocarpio.

- El epicarpio u hollejo: es la parte más externa de la uva que sirve de protección para el fruto. Es de textura membranosa y con epidermis cutinizada en la que aparece una capa protectora cerosa llamada pruina que tiene a su cargo la fijación de las levaduras que fermentan el mosto. El color del hollejo es variable. En la fase herbácea es de color verde y a partir del envero (fase del ciclo de la uva en la que cambia de coloración) toma tonalidades amarillas en variedades blancas, y rosado o violáceo, en variedades tintas. Esto ocurre debido a la acumulación de los polifenoles como las antocianinas (8).
- El mesocarpio o pulpa representa la mayor parte del fruto. Es traslúcida a excepción de las variedades tintoreras (acumulan aquí sus materias colorantes) y muy rica en agua, azúcares, ácidos (málico y tartárico principalmente), aromas, etc. Presenta una

fina red de haces conductores, denominándose pincel a la prolongación de los haces del pedúnculo (6)(8)(7).

- El endocarpio es una fina capa que rodea y protege a las semillas las cuales son ricas en aceites y taninos. Están presentes en número de 0 a 4 semillas por baya. A la baya sin semillas se la denomina baya apirena.

Tabla N° 1. Clasificación taxonómica.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Vitales
Familia:	Vitaceae
Género:	Vitis
Especie:	<i>V. vinifera</i>

FUENTE: Elaboración propia (9)

La vid (*Vitis vinifera*), es una especie originaria de la zona templada del Asia occidental, en donde produce una cosecha al año. La vid se cultiva en los cinco continentes: Europa cuenta con 4900000ha; Asia con 1727000 ha; América con 967000 ha; África con 395000 ha y Oceanía con 192000 ha. En América, Chile cuenta con 191000 ha, Argentina con 219000 ha, Brasil con 78000 ha, Perú y Uruguay con 11000 ha cada uno. (9)

El desarrollo de la vid ocurre como un efecto directo del clima y puede ser descrito a través de los eventos fenológicos, entendiéndose que la fenología de un sistema de cultivo es importante para determinar la capacidad de una zona o región para producir cosechas dentro del esquema de su régimen climático. El tiempo entre estadios fenológicos varía con el cultivar, con el clima y con la localización geográfica. El conocimiento de los estadios fenológicos de cultivares de vid en diferentes zonas puede permitir el establecimiento de su capacidad adaptativa y potencial de producción (9).

2. Bebidas Alcohólicas

Las bebidas alcohólicas tienen su origen en el proceso de fermentación alcohólica. Todo líquido azucarado sufre esta fermentación de manera espontánea debido a la acción de las levaduras que en ausencia de aire destruyen la glucosa y otros azúcares produciendo dióxido de carbono y etanol. La vida de las levaduras en los líquidos es distinta a la de los mohos ya que, mientras estos últimos viven en la superficie, las levaduras crecen en la masa del líquido. En algunas ocasiones suben a la superficie creando una película llamada velo. La levadura del vino, por ejemplo, se encuentra sobre las vides en el período de maduración, pasa al mosto en la fase de estrujamiento y posteriormente inicia la fermentación del mosto para transformarlo en vino.(10)

La palabra alcohol proviene del árabe “Al” que significa “el” y “Kohol” que significa “espíritu”. Por definición, un compuesto orgánico formado básicamente por moléculas de hidrógeno, Oxígeno y Carbono. El alcohol etílico es el único apto para el consumo humano. Se obtiene a partir de un proceso bioquímico en el que los azúcares se transforman en alcohol y bióxido de carbono por acción de las levaduras. Las bebidas alcohólicas son aquellas que contienen etanol, que como ya se vio anteriormente, es el único para el consumo humano. Las bebidas alcohólicas se pueden distinguir entre: (11)

2.1. Fermentadas

Surgen por un cambio bioquímico producido por la acción de la levadura ante la exposición de productos naturales a ciertas condiciones de humedad, temperatura y tiempo, que se denomina fermentación. Normalmente se dejan reposar vegetales y frutas que cargan gran contenido de glucosa donde las más frecuentes son: Cerveza cuyo contenido de alcohol varía entre 4° y 5° y Vino posee un grado alcohólico de entre 11° y 14° (11).

2.2. Destiladas

Se pueden obtener licores destilados a partir de muchos materiales, entre los que se encuentran las masas fermentadas de cereales, los zumos de fruta fermentados, jugo de azúcar de caña, melazas, miel y jugo de cactus. La fermentación para elaborar vino y cerveza data de los años 5000 y 6000 a.C.; sin embargo, la historia de la destilación es mucho más reciente. Aunque no está claro dónde se originó la destilación, se atribuye a

los alquimistas, y su uso comenzó a extenderse en los siglos XIII y XIV. Los primeros usos fueron fundamentalmente farmacéuticos.(12)

2.3. Licores

Se preparan con alcohol, agua, azúcar y sustancias aromáticas (13)

3. Vino

El vino es la bebida resultante de la fermentación alcohólica completa o parcial de la uva fresca o del mosto (*Vitis vinifera*)(14). El vino es un producto de las transformaciones de la materia vegetal viva, por microorganismos vivos (levaduras), mediante procesos de fermentación.

El vino ha sido una parte integral de la civilización humana para miles de años, con los primeros signos de enología a gran escala, tales actividades datan de al menos 5000 a.C. En los siguientes milenios, el apareamiento casual, la crianza tradicional y las estrategias de selección se aplicaron a la naturaleza, dando origen a los precursores de las vides modernas para proporcionarnos una serie de *Vitis vinifera* que se utilizan en el vino producción hoy (15).

Sin embargo, no fue hasta el siglo XIX y siglo XX que los microorganismos que eran responsable de la conversión del mosto de uva en vino comenzaron a clasificarse formalmente. La levadura *Saccharomyces Cerevisiae* fue finalmente identificado como el microorganismo principal responsable de la producción del vino, y se demostró que la bacteria *Oenococcus oeni* era responsable para la fermentación maloláctica, una fermentación secundaria eso ocurre en muchos vinos (6)

Sin microorganismos no hay vino ya que son los responsables de la transformación del mosto de la uva en vino. En concreto son las levaduras las que por medio de un proceso bioquímico denominado fermentación alcohólica (F.A.) transforman los azúcares del mosto de la uva en etanol, CO₂ y otros compuestos químicos y con ello el mosto en vino (16).

Desde principios del siglo XX se sabe que en la elaboración de algunos vinos pueden intervenir, además de las levaduras, otros microorganismos cuya misión es transformar el ácido málico del vino en ácido láctico. Esta transformación, que es denominada fermentación maloláctica (F.M.L.) y que es llevada a cabo por diversas especies de bacterias lácticas, es considerada una fermentación de suavización del vino que conviene a todos los

vinos tintos y a aquellos vinos blancos cuyo contenido en ácido málico sea muy elevado.
(17)

3.1. Fabricación

Son cuatro los procesos principales que intervienen en la elaboración de vinos y en el costeo de la producción:

3.2. Cultivo de la Vid

El cultivo de la vid en el Perú tiene una duración de ocho meses en promedio, iniciándose al finalizar el mes de abril y culminando a principios del mes de diciembre. La cosecha de la uva, es una actividad conocida como la vendimia (18), el manejo del cultivo de esta planta durante estos ocho meses está estrechamente ligado al cumplimiento de las labores culturales tales como (18):

- La arada
- La fertilización
- La construcción del sistema de conducción
- La construcción del parral
- La construcción de la contra espaldera
- La poda

3.3. Control de Calidad

Es importante recalcar que durante el acopio (Figura N° 1) se lleva una muestra de la materia prima al laboratorio para que se realice un control de calidad, el cual mide la cantidad de azúcar (expresada en grados Baume °Bé) y la acidez. El resultado de este control va a determinar la calidad de la cosecha en los fundos propios y/o el precio de la uva de los fundos de terceros.

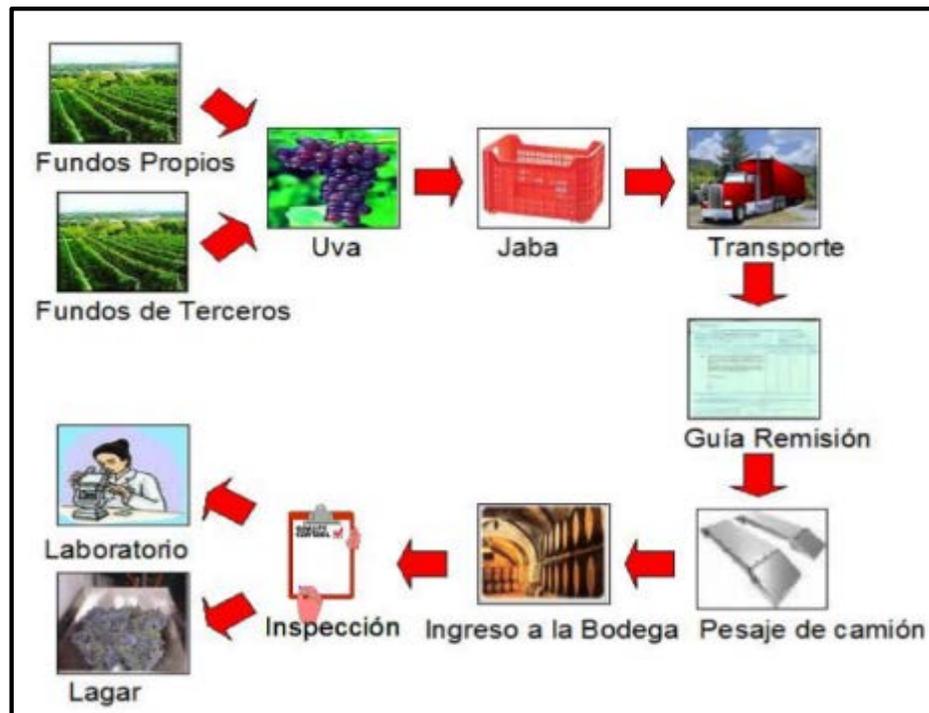


Figura N° 1. Control de calidad de las uvas (19).

3.4. Tratamiento del Vino

Una vez que la uva entra en bodega, ésta recibe un proceso en función del producto que se quiere elaborar. Durante este proceso, al mosto se le agregan insumos enológicos como enzimas y levaduras, los cuales son necesarios para su evolución.

Al completarse la maduración se ha formado sobre los granos de uva una microflora en la que predominan las levaduras.(10)

La vendimia llega a la bodega donde se evalúa su estado y se miden entre otros parámetros su azúcar y acidez. Primero se hace el despalillado, separando el raspón de los granos de uva, que son inmediatamente estrujados (excepto si la vinificación va a ser por maceración carbónica). La pasta obtenida formada por el mosto, la pulpa y los hollejos se somete, si es necesario, a las correcciones de azúcar o acidez, y a un primer sulfitado que asegure una fermentación sin alteraciones químicas o microbianas indeseadas. En este punto la vinificación toma dos rutas distintas según se trate de hacer vinos blancos o tintos. (20)

3.5. Conversión de Mosto a Vino

El proceso de la conversión de mosto de uva en vino es de tipo biológico. Las levaduras que cubren el orujo de los frutos transforman el azúcar en alcohol y anhídrido carbónico,

liberando calor (reacción exotérmica). Además se hace uso de levadura seleccionada durante el proceso de fermentación (18)(20).

Por lo regular se utilizan recipientes cerrados, con objeto de evitar el contacto con el oxígeno atmosférico. Las levaduras que llegan al mosto procedentes de las uvas son las que inician la fermentación. Inmediatamente después de estrujadas las uvas durante el prensado y a medida que se van enriqueciendo con oxígeno las masas de uvas y el mosto comienza la multiplicación de las levaduras. Junto con las levaduras propias del vino se encuentran en las uvas otras especies de levaduras, como la *Kloeckera apiculata* diversas especies de los géneros *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis* y otras. Estas levaduras se multiplican en la fase inicial de la fermentación por lo regular con mayor rapidez que las levaduras vínicas, por lo que al principio de la fermentación propiamente dicha existe en el mosto gran cantidad de estas levaduras.(10)

3.6. Embotellado y Vestido

Durante el reposo del mosto en cubas, el enólogo determina el momento oportuno para embotellar y vestir al vino para luego poder distribuirlo al público final.

El vino se vende habitualmente en botellas de vidrio (de 1000 mL a 750 mL de capacidad). En las plantas de llenado, lo primero es limpiar las botellas y a continuación, llenarlas, cerrarlas y etiquetarlas (Figura N° 2). Los riesgos del embotellado se derivan de la manipulación de objetos de vidrio y varían dependiendo de que las botellas que se van a lavar sean nuevas o recuperadas y de los productos utilizados (agua y detergentes) y las técnicas aplicadas (lavado a mano o mecánico o ambos). Los riesgos vienen determinados por: la forma de las botellas; el modo en que se han de llenar (desde métodos manuales hasta sofisticadas máquinas de llenado capaces de introducir también dióxido de carbono); el proceso de encorchado; el sistema más o menos complejo de apilamiento o la colocación en cajas o en porta botellas tras el etiquetado y otros retoques finales. Se trata de los riesgos habituales del llenado de recipientes con líquidos.(12)

En bodegas con fabricación paralela (producción orgánica y no orgánica), hay un riesgo elevado de contaminación con los pesticidas hasta niveles que no están en conformidad con la idea de vino orgánico que los consumidores tienen: mezcla de uvas o mostos de origen biológico y no biológico, uso de mangueras apenas limpiadas (conteniendo residuos), filtros de placas, prensas, línea de embotellado y manipulación de recipientes

de pequeño volumen. Para ello se recomienda usar equipamiento específico para producción orgánica: mangueras, recipientes, filtros, incluso pintarlos de colores diferentes.(19)

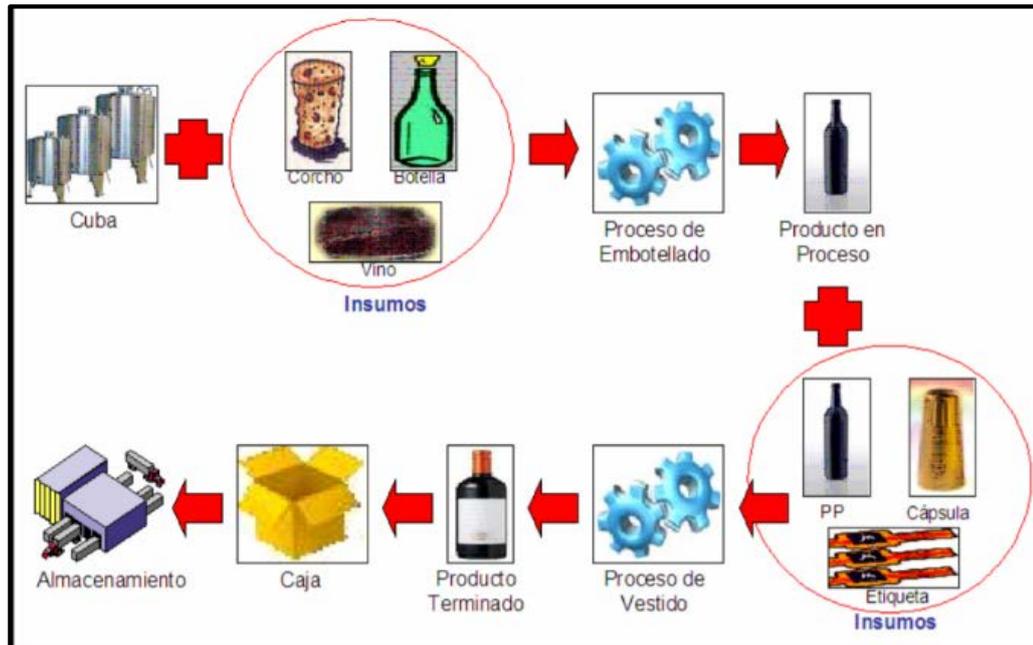


Figura N° 2. Flujo que sigue el proceso de embotellado y vestido (19).

4. Clasificación de Vinos



Figura N° 3. Clasificación del vino, tomado de “Introducción al mundo de vino” de la bodega Rioja (11).



Figura N° 4. Clasificación de los vinos de mesa “Introducción al mundo de vino” de la bodega Rioja (11).

5. Composición del Vino

Es una solución hidroalcohólica ligeramente ácida (pH 3-4). Cuyos componentes principales son el agua y el etanol, que representan aproximadamente el 97 % p/p. Los compuestos restantes, responsables de la mayor parte del sabor y el color del vino, están típicamente presentes a concentraciones $<10 \text{ g. L}^{-1}$ (Figura N° 5), muchos aromas se encuentran a concentraciones de partes por trillón (ng. L^{-1}) (Figura N° 6), los compuestos presentes en el vino también pueden encontrarse en el café, la cerveza, el pan, las especias, las verduras, el queso y otros productos alimenticios.

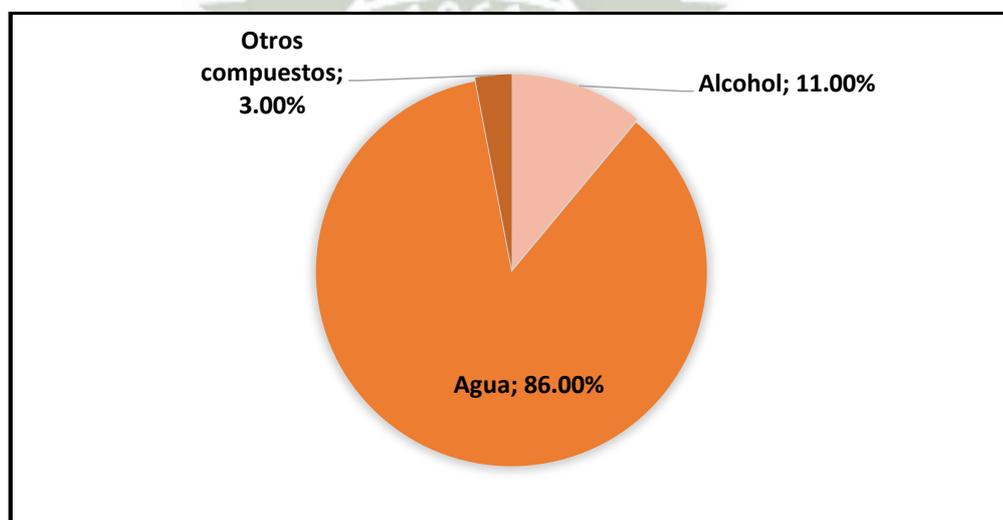


Figura N° 5. Composición representativa de un vino de mesa tinto seco (% p/p) (22).

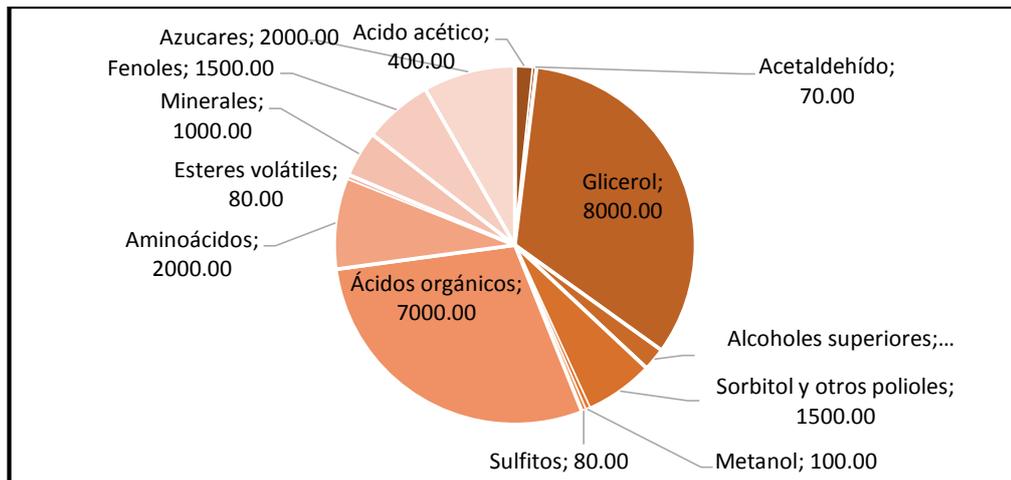


Figura N° 6. Concentraciones típicas (mg L⁻¹) de los principales componentes del vino, excluyendo agua y etanol. Los componentes de trazas (0.1 ng L⁻¹ - 0 mg L⁻¹) no serían visibles y por lo tanto no están incluidos (22).

Lo que distingue diferentes vinos de otros productos, es las diferencias en las concentraciones relativas de los compuestos, en lugar de la presencia de componentes únicos(21).

El vino es producido por la fermentación alcohólica del jugo o mosto de uva, lo que resulta en la transformación total o parcial de los azúcares de uva en etanol y CO₂. Sin embargo, ocurren muchos cambios químicos más allá del simple consumo de azúcares y la formación de alcohol (21).

Esto se ejemplifica fácilmente por la composición volátil de un vino, que es mucho más compleja que la del jugo de uva (Figura N° 7).

Estos componentes volátiles pueden contribuir al aroma del vino y tales aromas se clasifican a menudo sobre la base de cuándo se forman; Es decir, en la uva (primaria), durante la fermentación (secundaria) o durante el almacenamiento (terciario) (Tabla N° 2) (21).

Un estudio de 1969 informó que el vino y otras bebidas alcohólicas contenía cerca de 400 compuestos volátiles, mientras que años más tarde (1983) se informó la presencia de más de 1300 compuestos volátiles (22).

Un análisis más reciente de vinos utilizando un sistema de espectrometría de masas (FT-ICR-MS) fue capaz de detectar decenas de miles de señales químicas únicas (casi 9000 componentes) (23).

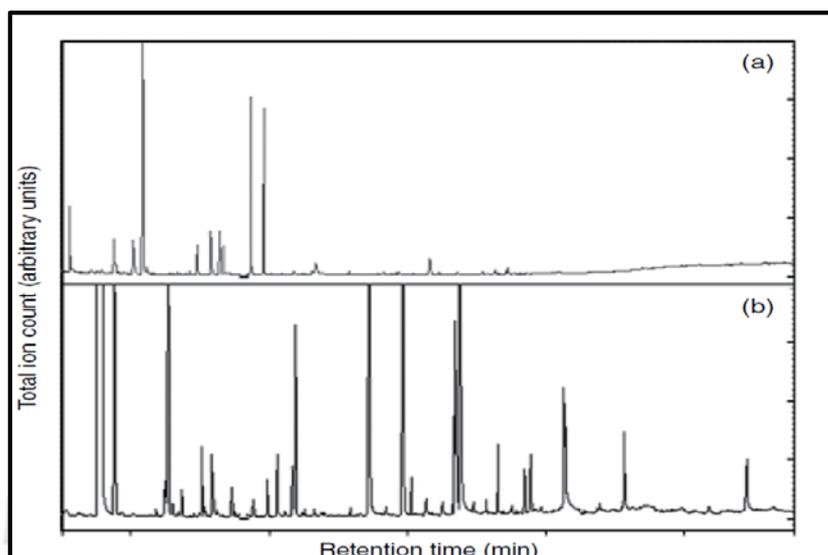


Figura N° 7. Comparación de los cromatogramas (GC-MS) para a) un zumo de uva y b) un vino producido a partir de dicho zumo de uva. pico en los cromatogramas representa al menos un compuesto volátil único (23).

Sin embargo, el número de compuestos químicos en el vino, como la mayoría de los productos naturales, es esencialmente innumerable.

Tabla N° 2. Clasificación primaria, secundaria y terciaria de los aromas del vino. (22)

Clasificación del compuesto	Descripción	Ejemplos
Primario	Compuestos presentes en la uva que permanecen inalterados en el vino.	Metoxipirazinas, rotundona
Secundario	Los compuestos formados como resultado de la fermentación alcohólica y maloláctica debido a: a) i) metabolismo normal de azúcares, aminoácidos, etc. ii) Transformación de precursores de uva específicos.	i) ésteres etílicos, alcoholes combustibles. ii) Tioles varietales.

Terciario	Los compuestos formados durante el almacenamiento del vino, por ejemplo, como resultado de i) Extracción de roble ii) Descomposición microbiana o contaminación química iii) Transformación abiótica de compuestos precursores en el vino	i) lactonas de roble ii) Tricloroanisol iii) TDN
------------------	--	--

FUENTE: Elaboración propia.

5.1. Componentes Básicos

5.1.1. Agua:

Es el principal componente y se encuentra en una proporción del 75-88 %, cuanto más maduro esté el fruto en el momento de la vendimia y mejores sean las condiciones de fermentación, mayor será la cantidad de alcohol y menor la de agua. El vino con una baja graduación alcohólica es difícil de conservar y se avinagra fácilmente. (14)

5.1.2. Alcohol:

12-18 % en volumen, se forma durante la fermentación, algunos fabricantes encabezan el vino para obtener graduaciones alcohólicas hasta de 22 %. La cantidad de otros alcoholes con una sola función OH (metanol, propanol, butanol, isobutanol, pentanol y hexanol). es del orden de 0.05-0.1 %. Alcohol. Es el etanol o alcohol etílico procedente de la destilación del producto resultante de la fermentación alcohólica de mostos adecuados. Sustancias volátiles o congénies. Se consideran sustancias volátiles o congénies de las bebidas alcohólicas destiladas a los compuestos naturales volátiles tales como: acidez volátil, aldehídos, furfural, éteres y alcoholes superiores excluyendo los alcoholes etílico y metílico (14).

5.1.3. Glicerina:

Después del agua y el alcohol, es el componente más abundante del vino. Es un polialcohol que posee 3 funciones OH o propanotriol. Es un alcohol poco volátil, de sabor dulce y cuyo contenido en el vino varía entre 5 a 12 g. L⁻¹ y que le proporciona consistencia, cuerpo y suavidad (14).

5.1.4. Aldehídos y ésteres:

Los aldehídos son el resultado de la oxidación intermedia de los alcoholes y los ésteres de la combinación de los ácidos libres (14).

6. Control de Calidad

Las pruebas básicas que se aplican a cualquier tipo de vino son:

6.1. Acidez Total

La acidez total de un vino se considera como la suma de los ácidos titulables cuando se lleva el vino a $\text{pH} = 7$ por adición de un licor alcalino valorado. El ácido carbónico y el anhídrido sulfuroso libre y combinado no se consideran comprendidos en la acidez total. El gas carbónico se elimina previamente del vino por agitación en frío y con vacío parcial. Los resultados se expresan en g. L^{-1} de ácido tartárico.(24)

6.2. Acidez Volátil

La acidez volátil está constituida por la parte de ácidos grasos pertenecientes a la serie acética que se encuentra en los vinos, ya sea en estado libre o de sal. Se determina mediante la separación de los ácidos volátiles por arrastre con vapor de agua y rectificación de los vapores. Se debe evitar con precaución la presencia de gas carbónico en el destilado. La acidez del anhídrido sulfuroso libre y combinado arrastrados con el destilado no deben comprenderse en la acidez volátil, por lo que hay que restar la equivalencia de su acidez de la del destilado, así como la del ácido sórbico eventualmente presente (24).

Para estas correcciones se sigue la norma Jaulmes (25), en la que se considera como completa la influencia de SO libre y sólo la mitad de la del combinado. Los resultados se expresan en g. L^{-1} de ácido acético.

6.3. Grado Alcohólico

El título alcohométrico es igual al número de litros de etanol contenidos en 100 L de vino, medidos ambos volúmenes a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$, y se expresa en grados alcohólicos volumétricos, con una precisión de $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se determina por destilación simple de líquido alcalinizado y medida de la densidad del destilado por picnometría.

6.4. Determinación de Sulfatos

Precipitación del bario sulfato en el vino, previamente desprovisto de anhídrido sulfuroso por ebullición al abrigo del aire (24).

6.5. pH

Medida potenciométrica a 20 °C, previa eliminación del dióxido de carbono por agitación en frío y con vacío parcial(24).

7. Metales en Vino

Muchos elementos minerales se encuentran en las uvas y el vino. En la mayoría de las situaciones, la concentración de minerales refleja las características de captación del porta injerto, la acumulación por el vástago, y las influencias climáticas en la tasa de la transpiración, por ejemplo, uvas en climas cálidos típicamente tienen mayores contenidos de potasio que aquellos cultivado en regiones climáticas templadas o frías. Sin embargo, altos niveles de azufre elemental pueden surgir de fungicidas aplicado a las vides para el control de la enfermedad; elevado los niveles de calcio pueden ocurrir en los vinos almacenados sin forro tanques de cemento; contenido aumentado de cloro y sodio puede originarse del uso de columnas de intercambio iónico; y niveles anormales de cobre y hierro pueden resultar de contacto con equipos de bodega corroídos. Atípicamente los altos contenidos de aluminio pueden originarse a partir del uso de bentonita. (26)

Los contenidos elevados de Pb(II) en el vino fueron, en el pasado, correlacionado con las vides crecidas cerca de las carreteras(27), o uso de cápsulas de plomo corroídas (27), o por el almacenamiento prolongado en decantadores de cristal de plomo (28). Sin embargo, la fuente más frecuente de Pb(II) la contaminación parece originarse con accesorios de bronce y grifos usados ocasionalmente en bodegas (29). Aunque el tubo de escape de automóviles, los productos químicos agrícolas y contaminación industrial puede aumentar el contenido de Pb(II) de los suelos y las uvas, solo se libera una pequeña porción de Pb(II) en la uva en el jugo (30). Además, la mayoría del Pb(II) que se incorpora se precipitó a lo largo de con las lías durante y después de la fermentación. Finalmente la medición de la proporción de isótopos de Pb(II) en los vinos no apoyan la opinión de que el Pb(II) en las cápsulas de metal se difunde a través del corcho (31). A pesar de esto, los vinos rara vez se cubren con cápsulas de Pb(II) revestidas de estaño, como en el pasado.

En niveles naturales, muchos minerales son cofactores importantes en vitaminas y enzimas. Sin embargo, metales pesados como plomo, mercurio, cadmio, y el selenio son

potencialmente tóxicos. Si está presente en la fruta, los metales pesados suelen precipitar durante fermentación (32). Por lo tanto, su ocurrencia en el vino a las cantidades de trazas anteriores por lo general indica contaminación post-fermentación. En mayor de los niveles normales, minerales como hierro y cobre también puede ser indeseable. Ellos catalizan reacciones oxidativas, modificar las características del sabor o inducir la turbidez (cashe).

Las reacciones oxidativas pueden catalizarse en ausencia de oxígeno molecular por cobre y, a una menor medida, por hierro. Un ejemplo es la oxidación de ácido ascórbico a ácido dihidro ascórbico, y su escisión en ácidos oxálicos y treonico. En presencia de oxígeno, el hierro puede catalizar reacciones oxidativas, además, el hierro favorece la polimerización de compuestos fenólicos con acetaldehído, mientras que los iones manganeso catalizan la síntesis de acetaldehído (33).

Aunque el cobre y el hierro pueden inducir metales / gustos astringentes, esto ocurre solo en concentraciones más altos que los que se encuentran generalmente en el vino (34). Los contenidos altos en sulfito pueden dar un vino sabor ligeramente salado-amargo.

8. Pb(II)

El Pb(II) es un elemento natural que se encuentra en el grupo 14 (IV A) de la tabla periódica, con un peso atómico de 207.2, es de color gris-azulado usualmente combinado con dos o más elementos para formar componentes de Pb(II) (35).

El Pb(II) es un metal gris, blando y maleable que se obtiene por fundición o refinamiento de las minas o secundariamente por el reciclamiento de los materiales de deshecho que contengan Pb(II), como por ejemplo de las baterías de los automóviles. La intoxicación por Pb(II) ocurre luego de la exposición a este metal; este tiene muchos usos y fuentes como pueden ser baterías para autos ya mencionadas, aditivo en la gasolina, revestimiento de cables, producción de tuberías, cisternas, protección de materiales expuestos a la intemperie, fabricación de municiones, pigmentos para pinturas y barnices, fabricación de cristales, esmaltado de cerámica, litargirio, soldadura de latas, antisépticos (agua blanca de Codex) (36).

La principal vía de exposición para la población general es por la ingesta de comida y aire, mientras que la exposición ocupacional a Pb(II) ocurre en los trabajadores de plantas de esmaltado e industrial de refinería, manufactura de baterías, plásticos y pinturas. Los niños son en particular sensibles a los efectos de este metal para los cuales es considerado como un riesgo medio ambiental primario (35).

El tetraetilo y tetrametilo de Pb(II) se utilizan como aditivos y antidetonantes de gasolinas, contribuyendo a la contaminación ambiental, en el Perú según Decreto Supremo N° 019-98-MTC (37), se daba un plazo hasta fines de 2004 para eliminar el contenido de Pb(II) de las gasolinas. Las fundiciones de Pb(II), la fabricación y desarmado de baterías para autos y la industria de la cerámica constituyen la principal fuente de intoxicación laboral en nuestro medio. Antes de 1970 en Estados Unidos las pinturas contenían Pb(II), lo cual representó un problema grave en su momento, ya que los niños ingerían las cascarillas de pintura que se desprendían de las paredes y desarrollaban la intoxicación (38)

En consecuencia, los cultivos agrícolas que se encuentran cerca de carreteras con mucho tráfico pesado, o cerca de fuentes estacionarias de Pb(II), tienen concentraciones significativamente más altas de Pb(II) depositado en ellos; el Pb(II) parece tener una afinidad particular por el tejido superficial de la planta y es parcialmente removido por la lluvia o el lavado. El consumo de frutas o verduras contaminadas, así como la carne de animales de granja que pastaban en la hierba contaminada, puede resultar en una carga corporal considerable de Pb(II) (39).

La intoxicación por Pb(II), a pesar de ser una de las enfermedades laborales más antiguas, a la fecha muchos de los trabajadores expuestos no cuentan con las medidas de protección personales adecuadas y se intoxican no sólo ellos sino sus familias, ya que transportan el Pb(II) al hogar en sus vestimentas, recuérdese aquí que los niños son la población más vulnerable para este tipo de intoxicación. (38).

8.1. Consideraciones Ambientales

El Pb(II) es un metal tóxico que ha sido conocido por la humanidad durante miles de años. Se ha utilizado en cientos de formas, de peltre a tuberías de agua. Recientemente, se ha centrado la atención en el Pb(II) como una fuente importante de salud que afecta a millones de personas. Alrededor de 30 condiciones de salud están relacionadas con el Pb(II), muchas de las cuales afectan a los niños y los no nacidos (28). El Pb(II) se encuentra en la corteza terrestre y está aumentando con el tiempo debido a la desintegración de elementos radiactivos como el uranio que cambia a Pb(II). El Pb(II) está ampliamente distribuido en el medio ambiente (Figura N° 8), se ha encontrado incluso en las capas de hielo del Ártico y está aumentando cada década. Las vías de exposición son la inhalación (30-50 % de la dosis inhalada absorbida en el torrente sanguíneo), la ingestión (8-15 % de la dosis ingerida absorbida en el torrente sanguíneo) y, en una medida limitada por contacto dérmico. El Pb(II) existe en varias formas

inorgánicas y orgánicas, que afectan su destino ambiental, el transporte y la biodisponibilidad, sin embargo, el Pb(II) no se degrada y permanece disponible para la exposición.

La principal vía de exposición al Pb(II) para la población adulta en general es la exposición oral de los alimentos y el agua potable, seguido de la inhalación(40) .

8.2. Efectos Tóxicos

La absorción de Pb(II) ingerido puede constituir un grave riesgo para la salud pública. El objetivo principal de la toxicidad del Pb(II) es el sistema nervioso tanto en adultos como en niños. Los síntomas del envenenamiento agudo de Pb(II) son dolor de cabeza, irritabilidad, dolor abdominal y varios síntomas relacionados con el sistema nervioso. La encefalopatía por Pb(II) se caracteriza por insomnio e inquietud. Los niños pueden verse afectados por trastornos del comportamiento y dificultades de aprendizaje y concentración. En los casos graves de encefalopatía de Pb(II), la persona afectada puede sufrir de psicosis aguda, confusión y conciencia reducida.

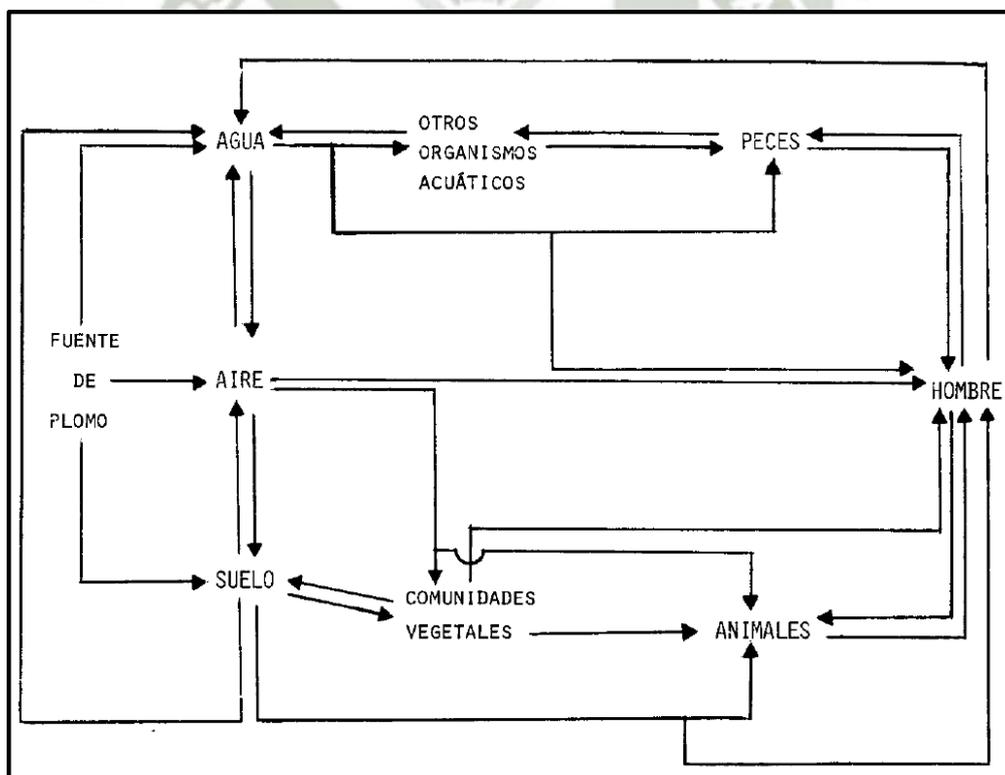


Figura N° 8. Transporte de Pb(II) en el ambiente (31).

Algunos efectos crónicos del envenenamiento por Pb(II) son cólico, estreñimiento y anemia. También puede inducir una mayor presión sanguínea y enfermedades

cardiovasculares en adultos. Los síntomas de toxicidad por Pb(II) pueden aparecer años después de la exposición, o incluso después de la exposición ha cesado, como resultado de la liberación repentina de Pb(II) almacenado debido a la enfermedad, alcoholismo, estrés u otros cambios en el metabolismo.

Además de su amplia distribución en nuestro medio ambiente, la absorción de Pb(II) se ve reforzada por una deficiencia en la dieta de oligoelementos vitales como manganeso, zinc, cobre, cromo, calcio y magnesio. Tales deficiencias son comunes debido a dietas de alimentos refinados y malos hábitos alimenticios.

El Pb(II) es un metal altamente tóxico, afectando casi todos los órganos y sistemas del cuerpo. La exposición crónica al Pb(II) a niveles relativamente bajos puede causar daño a los riñones y al hígado, así como a los sistemas reproductivo, cardiovascular, inmunológico, hematopoyético, nervioso y gastrointestinal. La exposición a corto plazo a altas cantidades de Pb(II) puede causar malestar gastrointestinal, anemia, encefalopatía y muerte. El efecto más crítico de la exposición a bajo nivel de Pb(II) es la reducción del desarrollo cognitivo e intelectual en los niños (31).

El Pb(II) no tiene ninguna función conocida en el cuerpo, puede sustituir al calcio en los huesos (32).

8.3. Pb(II) en los Alimentos

La contaminación por Pb(II) de los alimentos surge de numerosas fuentes, incluyendo el aire y el suelo (33, 34). El Pb(II) producto de la contaminación industrial o la gasolina con Pb(II) puede contaminar los alimentos a través de la deposición en plantas de cultivos agrícolas. El Pb(II) del suelo que se origina de los artefactos que contienen Pb(II) almacenados en antiguas instalaciones, la aplicación inapropiada de plaguicidas, fertilizantes o lodos de alcantarillado puede contaminar las plantas agrícolas mediante absorción o deposición en el suelo. Las plantas y suelos contaminados son a su vez una fuente de contaminación del ganado.

Las aguas superficiales contaminadas son una posible fuente de contaminación de los animales acuáticos de consumo. Para el agua potable y el agua utilizada para la preparación de alimentos, el uso de tuberías de Pb(II) o accesorios que contienen Pb(II) en los sistemas de distribución de agua es una fuente primaria de contaminación.

La contaminación por Pb(II) de los alimentos también puede surgir de la elaboración de alimentos, la manipulación de alimentos y el envasado de alimentos. Las fuentes de

Pb(II) en las áreas de procesamiento de alimentos incluyen pintura con Pb(II) y equipo con Pb(II), tales como tuberías y maquinaria.

En el área de envasado, las latas soldadas con Pb(II) han sido identificadas como una fuente muy importante de contaminación por Pb(II) de los alimentos. Otros artículos de empaque que son fuentes potenciales incluyen bolsas de plástico coloreadas y papeles de envolver, contenedores de cartón coloreados con tintes que contienen Pb(II), cápsulas de Pb(II) en botellas de vino y cerámica vidriada con Pb(II) (27).

Los efectos tóxicos del Pb(II) en los alimentos han sido revisados varias veces por el JECFA (35, 36) y por la FDA (37), SCOOP (38) y EFSA (39).

La Organización Internacional de la Viña y el Vino indica que el vino puede contener hasta 0.15 mg. L⁻¹ de Pb(II) (41).

El *Codex Alimentarius* mediante el CODEX STAN 193-1995, establece un nivel máximo para Pb(II) de 0.2 mg. Kg⁻¹, considerando la densidad de nuestro vino, de 0.991 a 0.993, este es de 0.2 mg. L⁻¹ (42).

En el Perú se establece mediante Decreto supremo N° 005-2013-PRODUCE, en el artículo 42, inciso b, indica que son bebidas alcohólicas no aptas para el consumo humano, las que contienen metales pesados en límites superiores a: cobre (Cu) 2.0 mg. L⁻¹; Pb(II) 0,5 mg. L⁻¹; arsénico (As) 0,5 mg. L⁻¹ y zinc (Zn) 1,5 mg. L⁻¹ (43).

9. Cd(II)

El Cd(II) es un elemento relativamente raro y no se encuentra en estado puro en la naturaleza, pero esta principalmente asociado con minerales como zinc, plomo y cobre en la corteza terrestre a concentraciones entre 0.1 y 1 mg. kg⁻¹ (40).

También es un componente natural del agua del océano, con niveles medios entre <5 y 110 ng. L⁻¹, con niveles más altos reportados cerca de áreas costeras y fosfatos marinos.

Las emisiones naturales de Cd(II) pueden ser consecuencia de emisiones volcánicas, incendios forestales, generación de aerosoles de sal marina, meteorización de rocas u otros fenómenos naturales (41).

Las actividades antropogénicas han contribuido aún más a los niveles de Cd(II) en el suelo, el agua y los organismos vivos. Este metal no es degradable en la naturaleza y, una vez liberado al medio ambiente, permanecer en circulación.

Por ser relativamente soluble, es más móvil en el suelo y más biodisponible tendiendo a bioacumularse.

El hidróxido de Cd(II) es uno de los dos materiales de electrodos de las baterías de Ni-Cd, que tienen aplicaciones extensas en la industria ferroviaria y aeronáutica para el arranque y la energía de emergencia y en aplicaciones de consumo tales como herramientas inalámbricas, teléfonos celulares, computadoras portátiles y juguetes. El sulfuro de Cd(II) y el sulfoseleniuro de Cd(II) se utilizan como pigmentos de color amarillo brillante a rojo profundo en plásticos, cerámica, vidrios, esmaltes y colores de artistas. Debido a que el Cd(II) se utiliza como un pigmento, se encuentra a menudo en los juguetes de plástico y contenedores de alimentos.

Las sales orgánicas de Cd(II) se utilizan como estabilizantes para el cloruro de polivinilo (PVC).

Tanto los procesos naturales como las actividades antropogénicas contribuyen a la contaminación por Cd(II) del medio ambiente y, en consecuencia, de la cadena alimentaria (42, 43), especialmente los cereales y las hortalizas. Así, la dieta es la principal vía de exposición a este metal en la población no fumadora, lo que representa más del 90 % en comparación con otras vías de exposición (inhalación, contacto con la piel) (44). Aunque las cantidades de Cd(II) en los alimentos son relativamente bajas y la absorción en el tracto gastrointestinal se reduce, la exposición diaria durante un largo período y la larga vida media en el cuerpo conduce a la acumulación significativa de este metal tóxico.

El Cd(II) ya se ha eliminado o sustituido en una serie de materiales en contacto con los alimentos, fertilizantes fosfatados y baterías (27).

9.1. Consideraciones Ambientales

El Cd(II) se libera en el medio ambiente a través de la extracción y refinado de metales no ferrosos, la fabricación y aplicación de fosfatos y fertilizantes, la combustión de combustibles fósiles y la incineración y eliminación de desechos.

Considerando que el Cd(II) procedente de los ambientes ocupacionales y el Cd(II) procedente del humo del cigarrillo se transfieren directamente a los seres humanos, el Cd(II) en el aire se deposita generalmente en las aguas o en los suelos y finalmente se traslada a las plantas y los animales hasta que finalmente entra al cuerpo humano a través de la cadena alimentaria (45-47).

Los niveles más altos de este elemento pueden encontrarse en el suelo cerca de áreas industriales o sitios de desechos peligrosos, y los suelos cerca de las carreteras pueden contener altos niveles de Cd(II) por el escape del automóvil.

El uso de fertilizantes y lodos de alcantarillado que contienen Cd(II) es el principal motivo del aumento del contenido de Cd(II) de los suelos durante los últimos 20 o 30 años en Europa (42).

Los principales factores que rigen la movilidad del Cd(II) en los suelos son la especiación, el pH, el contenido de materia orgánica soluble, el contenido de óxido de metal hidratado, la presencia de ligandos orgánicos e inorgánicos y la competencia de otros metales.

Algunos estudios han concluido que el tipo de suelo también afecta la absorción de Cd(II) por las plantas. Por lo tanto, para el suelo con el mismo contenido total, se ha encontrado que el metal es más soluble y más disponible en suelo arenoso que en suelo arcilloso (48).

La absorción de Cd(II) por los organismos se produce principalmente en la fase acuosa, siendo los organismos de alimentación por filtración excepciones. El Cd(II) en el agua puede contaminar los mariscos y crustáceos (27).

9.2. Efectos Tóxicos

El Cd(II) ha sido revisado por el Registro Internacional de Productos Químicos Potencialmente Tóxicos del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Como resultado, se ha descrito como “uno de los oligoelementos más peligrosos de los alimentos y del medio ambiente para el hombre” y se ha incluido en la lista de sustancias y productos químicos considerados potencialmente peligrosos a nivel mundial(44). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado el Cd(II) como un carcinógeno de categoría 1 (45). Este elemento puede constituir un serio peligro para la salud de grandes grupos de la población (46): debido a su absorción relativamente pobre en el cuerpo, la absorción de Cd(II) en el tracto digestivo humano por lo general no excede del 5-10 % de su concentración en los alimentos, pero una vez absorbida se excreta lentamente, con una vida media biológica estimada en 10-30 años(47), y se acumula en el riñón causando daño renal.

La absorción de Cd(II) se incrementaría en sujetos deficientes en hierro, mientras que la presencia en alimentos de cationes divalentes o trivalentes como calcio, zinc o magnesio reduce su absorción (48). La toxicidad del Cd(II) se debe principalmente a su forma libre.

Otros factores, como la edad (54) y el género, también pueden influir en la captación o retención de Cd(II). La exposición al Cd(II) se ha asociado con nefrotoxicidad,

osteoporosis, neurotoxicidad, carcinogenicidad, teratogenicidad y efectos endocrinos y reproductivos (49).

El Cd(II) se almacena en el cuerpo principalmente en formas complejas con metalotioneína. La exposición ambiental al Cd(II) se asocia con disfunción tubular renal (50).

La forma más grave de intoxicación crónica por Cd(II) de origen alimentario es la enfermedad de itai-itai (51), que combina trastornos óseos y efectos renales y se caracteriza por un dolor extremo.

Hoy en día, los niveles de Cd(II) en los alimentos son controlados por las autoridades sanitarias y los niveles permitidos en los productos alimenticios están regulados por la legislación de muchos países.

9.3. Cd(II) en los Alimentos

En 2011, el Grupo de expertos sobre contaminantes de la cadena alimentaria de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (Grupo CONTAM de la EFSA) emitió un dictamen en el que recomendaba que la PTWI se redujera a una ingesta semanal tolerable de TWI. $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal para garantizar un alto nivel de protección a los consumidores, incluidos los subgrupos de la población, como los niños, los vegetarianos o las personas que viven en zonas altamente contaminadas (49).

Los principales contribuyentes al Cd(II) en la dieta son los cereales y las verduras, incluidas las patatas. La carne y especialmente el hígado y el riñón siguen en importancia (38). Los alimentos mencionados cubren más del 80 % de la ingesta para el consumidor normal.

Los moluscos y crustáceos constituyen sólo una pequeña parte de la dieta, por lo que estos productos no contribuyen mucho a la ingesta de Cd(II) para el consumidor medio, aunque ambos productos pueden contener altos niveles de Cd(II).

Ciertas setas silvestres también pueden contener altos niveles; Sin embargo, estos alimentos son contribuyentes menores a la ingesta total de Cd(II), ya que se comen en cantidades relativamente pequeñas.

La Organización Internacional de la Viña y el Vino indica que el vino puede contener hasta $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Cd(II)(41) .

10. Voltamperometría

Entre los métodos con sensibilidad adecuada más utilizados para la determinación de trazas de metales pesados se encuentran la absorción atómica, la espectrometría de emisión atómica y la de masas acoplada a espectrometría de plasma (ICP). Sin embargo, estas técnicas presentan algunas desventajas como la complejidad de las operaciones, el alto costo de los aparatos y su mantenimiento, así como la necesidad de condiciones experimentales muy bien controladas (52). Los métodos electroquímicos constituyen una de las técnicas más favorables para la determinación de iones de metales pesados debido a su bajo costo y elevada sensibilidad. La voltamperometría engloba un conjunto de métodos electroanalíticos que fueron desarrollados a partir de la polarografía. En realidad, la voltamperometría supuso la respuesta a los múltiples problemas que planteaba el uso de las técnicas polarográficas en cuanto a sensibilidad y selectividad (52).

La voltamperometría es un método de análisis electroquímico que informa del tipo y la cantidad de sustancias contenidas en una muestra disuelta basándose para ello en la relación de corriente y tensión. Las ventajas más destacables de la voltamperometría son su alta precisión y sensibilidad, la posibilidad de realizar análisis de especiación y su ventajosa relación precio/rendimiento. Los iones de metales pesados que contaminan alimentos se pueden determinar de forma muy sensible por medio de la voltamperometría, pero para ello es necesario digerir las muestras antes del análisis (53)

La voltamperometría y polarografía comprende un grupo de técnicas electroquímicas que se basan en la respuesta corriente-potencial de un electrodo durante un proceso electroquímico. Un diagrama de la corriente en función del potencial aplicado se llama un voltamograma y es el equivalente electroquímico de un espectro en espectroscopia, proporcionando la información cuantitativa y cualitativa sobre la especie implicada en la reacción de oxidación o de reducción (54).

La voltamperometría incluye todos los métodos en el cual la medición de potencial de la corriente esta hecho en un electrodo fijo y estacionario. Esto incluye el electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), el electrodo de capa fina de mercurio (TMFE), electrodo de glassy carbón (GCE) y electrodos de pasta de carbón (CPE). Los electrodos de trabajo hechos de metales nobles (oro, platino) son usados menos frecuentemente. Varios métodos son atribuidos a los términos de polarografía y voltamperometría; estos difieren en la técnica de medición y el tipo de potencial eléctrico de excitación usado en el proceso de la determinación (55)(56)(57).

El término voltamperometría se refiere a un grupo de métodos electroanalíticos en los cuales se recopila información acerca del analito al medir la corriente en una celda electroquímica en función del potencial aplicado. Esta información se obtiene en condiciones que promueven la polarización de un pequeño indicador o electrodo de trabajo. Cuando se monitorea una corriente proporcional a la concentración del analito a un potencial fijo, la técnica se denomina amperometría, mientras que, en la voltamperometría, la corriente que se desarrolla en una celda electroquímica se mide bajo condiciones de polarización por concentración completa (47) (48).

En contraste, las mediciones potenciométricas se hacen a corrientes que se aproximan a cero, en las cuales la polarización es nula. La voltamperometría difiere de la coulombimetría en que en esta última las mediciones se toman de tal manera que se minimizan o se compensan los efectos de la polarización por concentración. Más aún, en voltamperometría hay un consumo mínimo de analito, mientras que en la coulombimetría todo el analito se convierte a otro estado. Para intensificar la polarización, los electrodos de trabajo en voltamperometría y amperometría tienen superficies de trabajo de unos cuantos milímetros cuadrados cuando mucho y de apenas unos micrómetros cuadrados o menos en algunas aplicaciones (58).

El registro de una medida voltamperométrica se llama voltamperograma. Si hay una especie electroactiva (reducible u oxidable), se registrará una corriente cuando el potencial aplicado se vuelva suficientemente negativo o positivo para que esa especie se electrolice [por convención, una corriente catódica (reducción) es + y una corriente anódica (oxidación) es -]. Si la solución se encuentra diluida, la corriente alcanzará un valor límite porque el analito sólo se puede difundir hacia el electrodo y electrolizarse con una rapidez finita, dependiendo de su concentración. La corriente límite es proporcional a la concentración de la especie (59).

Señales de Excitación en Voltamperometría

En voltamperometría, se imprime una señal de excitación de potencial variable a un electrodo de trabajo de una celda electroquímica. Esta señal de excitación produce una respuesta de corriente característica, la cual es la magnitud que se mide. Las formas de las ondas de las cuatro señales de excitación más utilizadas en voltamperometría se muestran en la Figura N° 9. La señal de excitación voltamperométrica clásica es el barrido lineal mostrado en la Figura N° 9 a, en el cual el voltaje aplicado a la celda aumenta de manera lineal (usualmente en un intervalo de 2 a 3 V) en función del tiempo. La corriente en la celda se registra entonces en función del tiempo y, por lo tanto, en

función del voltaje aplicado (60). En amperometría, la corriente se registra en un voltaje aplicado fijo.

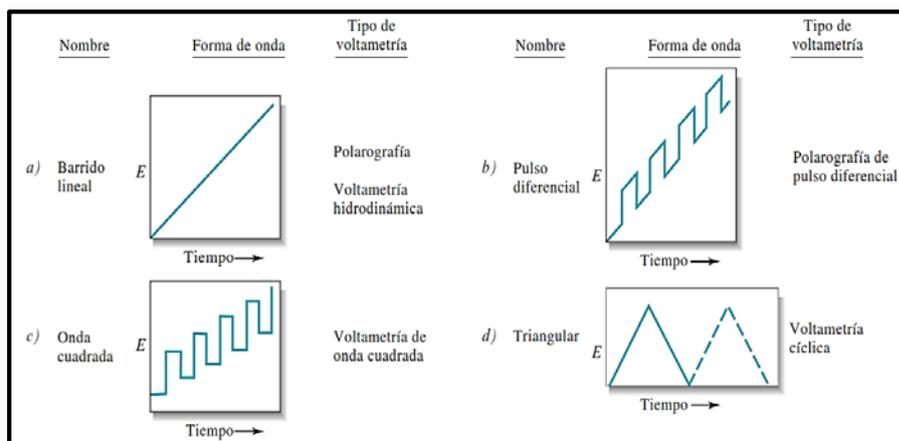


Figura N° 9. Señales de excitación de voltaje contra tiempo utilizadas en voltamperometría (58).

Instrumentación Voltamperométrica

A continuación, se muestra los componentes de un sencillo aparato para llevar a cabo mediciones voltamperométricas de barrido lineal (Figura N° 10).

La celda está constituida por tres electrodos sumergidos en una disolución que contiene al analito y también un exceso de un electrolito no reactivo conocido como electrolito de soporte (60).

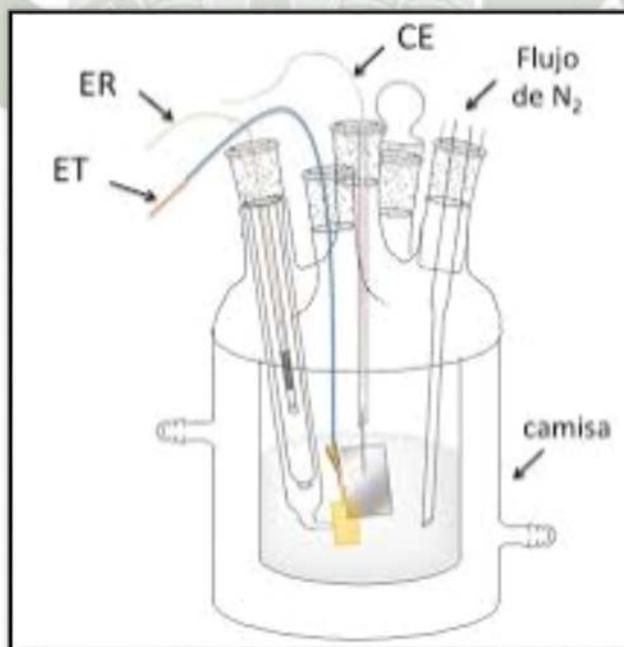


Figura N° 10. Potenciostato manual para voltamperometría: electrodo de referencia (ER), electrodo de trabajo (ET), contra electrodo (EC) (58).

Una celda voltamperométrica (Figura N° 11) consiste en un microelectrodo de trabajo (ET), cuyo potencial frente a un electrodo de referencia es variado linealmente con el tiempo; el electrodo auxiliar o contraelectrodo (CE), el cual generalmente es un alambre de platino enrollado o un depósito de mercurio; y un electrodo de referencia (ER), que por lo regular es un electrodo de Ag/AgCl y tiene un potencial que permanece constante a lo largo del experimento. Se emplea un potenciostato para controlar el potencial (59) (58).

La corriente del electrodo de trabajo se registra en función de su potencial medido contra el electrodo de referencia (60), pero el voltaje se aplica entre los electrodos de trabajo y auxiliar, y la corriente pasa también entre estos dos últimos (Figura N° 10) (Figura N° 11).

De esta manera, la curva de corriente-voltaje no se ve perturbada por una resistencia apreciable por parte de la solución, lo cual crea una caída de iR (caída de voltaje) entre los electrodos de trabajo y auxiliar, como en los disolventes no acuosos. La ley de Ohm establece que el voltaje es igual al producto de la corriente por la resistencia: $E = iR$, donde i es la corriente en amperios y R es la resistencia en ohmios. Cuando la corriente fluye, el potencial registrado se distorsiona (se desplaza) en una cantidad igual a $i \times R$, donde R es la resistencia de la solución. Si es apreciable, esto origina que la curva de corriente-potencial (Figura N° 12) se distorsione y se prolongue sobre un intervalo de potencial más grande. Con un sistema de tres electrodos, el potencial registrado es el que se establece entre el electrodo de trabajo y el de referencia, esencialmente sin flujo de corriente y sin caída de iR distorsionante (59).

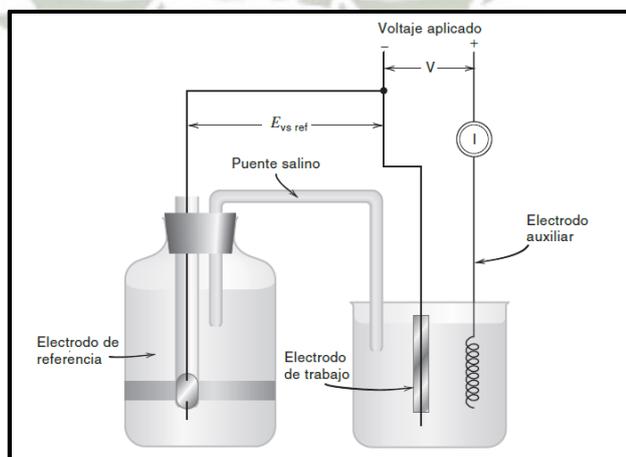


Figura N° 11. Dispositivo para mediciones voltamperométricas (59).

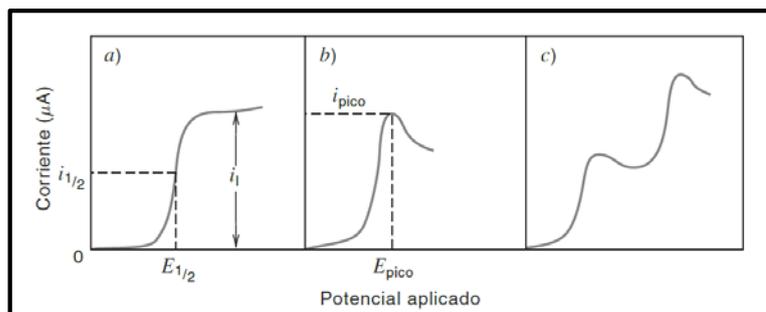


Figura N° 12. Diferentes tipos de curvas voltamperométricas. a) Solución agitada o con electrodo que cuenta con rotación; b) solución sin agitar, y c) reducción (u oxidación) por etapas del analito o de una mezcla de dos sustancias electroactivas (solución sin agitar) (59)

El voltímetro digital tiene una resistencia eléctrica tan alta ($>10^{11} \Omega$) que prácticamente no hay ninguna corriente en el circuito que incluye al medidor y al electrodo de referencia. Por lo tanto, virtualmente toda la corriente de la fuente pasa entre el contraelectrodo y el electrodo de trabajo. La variable independiente en este experimento es el potencial del electrodo de trabajo frente al electrodo de referencia, y no el potencial entre el electrodo de trabajo y el contra electrodo(58).

10.1. Partes de un Voltamperómetro

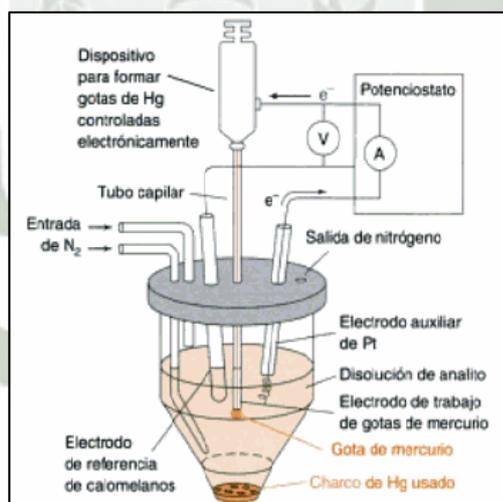


Figura N° 13. Modelo de un voltamperómetro.(58)

Un voltamperómetro trabaja con tres electrodos (Figura N° 13):

1. El electrodo de Trabajo (WE), el más importante del sistema electroquímico, su potencial varía de manera lineal con el tiempo. Existen dos tipos: El MME, (electrodo multimodo) que incluye todos los tipos de electrodos de mercurio (DME, SMDE, HMDE) y el RDE para aplicaciones especiales.

2. El electrodo de Referencia (RE): que ofrece un potencial estable. Los potenciales en el WE se aplican con respecto al potencial de referencia constante. Hoy en día se utiliza principalmente sistemas de Ag/AgCl.
3. El tercer electrodo es el Electrodo Auxiliar (AE): la corriente fluye entre el trabajo y electrodo auxiliar. Existen dos tipos disponibles: platino (Pt) y carbón vítreo (GC).

10.2. Voltamperograma

En voltimetría se han empleado mucho los electrodos de mercurio, por varias razones: una de ellas es por el potencial negativo relativamente grande que se puede lograr con el mercurio, debido al alto sobre voltaje del hidrógeno sobre el mercurio. Éste sobre voltaje permite la determinación de metales que se reducen con potenciales negativos, hasta amalgamas en la superficie de un electrodo de mercurio. Además, se forma rápidamente una superficie metálica fresca con una nueva gota de mercurio.(54)(57)

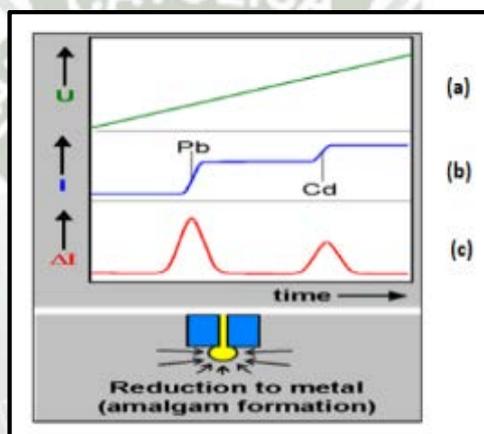


Figura N° 14. Voltamperograma (54).

La voltamperometría se basa en la aplicación de una rampa de voltaje (Figura N° 14) sección a), al alcanzarse el potencial de reducción del metal este se reduce se disuelve en el mercurio del electrodo (Figura N° 14) sección b), esta reacción produce una corriente, que es medida (Figura N° 14) sección c). La corriente fluye cuando la sustancia es oxidada o reducida en el electrodo. Sin reacción electroquímica no existe corriente.(60)

10.3. Métodos Voltamperométricos

a) Voltamperometría de Barrido Lineal (VBL)

El potencial aplicado varía entre (20 – 200 mV/seg) rápidamente y la intensidad de corriente se monitoriza directamente. La sensibilidad no es alta y algunas distorsiones

en el resultado de las ondas pueden ser obstáculos para su cuantificación. Es también conocida como polarografía (61) (58).

b) Voltamperometría Cíclica (CV)

Es principalmente usada para investigar la reversibilidad del proceso del electrodo y para estudio cinéticos, brindando información acerca del número de electrones ganados o perdidos en cada paso redox (61) (58).

c) Voltamperometría de Pulso Diferencial (DP)

La voltamperometría de pulso diferencial, es una de las técnicas electroanalíticas que alcanzó una gran popularidad a partir de 1970. Es el modo de medición universal y más frecuentemente usado, es apropiado para sistemas reversibles e irreversibles y ofrece una alta sensibilidad (61) (58).

Para la voltamperometría de pulso diferencial, DP, la intensidad de la corriente, I , es medida en función del voltaje, U , inmediatamente antes del pulso $t_{(1)}$ y al final del pulso $t_{(2)}$ (Figura N° 15) de las diferencias entre las dos mediciones de intensidad de corriente se obtienen picos en vez de los característicos saltos de la polarografía, los cuales pueden ser evaluados usando una base lineal, polinomial o exponencial para determinar tanto su altura como su área (58) (61).

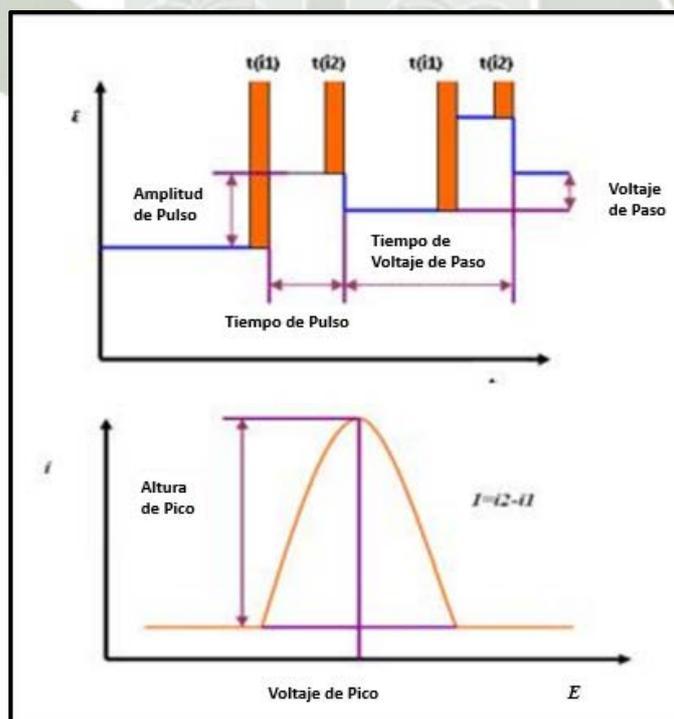


Figura N° 15. Esquema de voltamperometría de pulso diferencial(61).

d) Voltamperometría de Redisolución (stripping)

Es la técnica electroquímica más sensible actualmente disponible, la técnica es aplicable a los analitos que se oxidan o se reducen reversiblemente en un electrodo solido (delgada capa de mercurio) o que forman una especie insoluble con el material del electrodo que posteriormente se puede quitar electroquímicamente. Básicamente, la voltamperometría de redisolución es una operación de dos pasos. durante el primer paso, el ión o iones de interés se depositan en el electrodo por electrolisis con potenciales controlados (pre-concentración), después de un periodo de reposo, se propicia la redisolución del analito por medio de una rampa de voltaje invertida mientras la intensidad de la corriente es monitoreada, el paso de pre-concentración o electrodeposición proporciona los medios para mejorar sustancialmente el límite de detección para el paso de redisolución, a menudo por un factor de hasta un millón (Figura N° 16) (62).

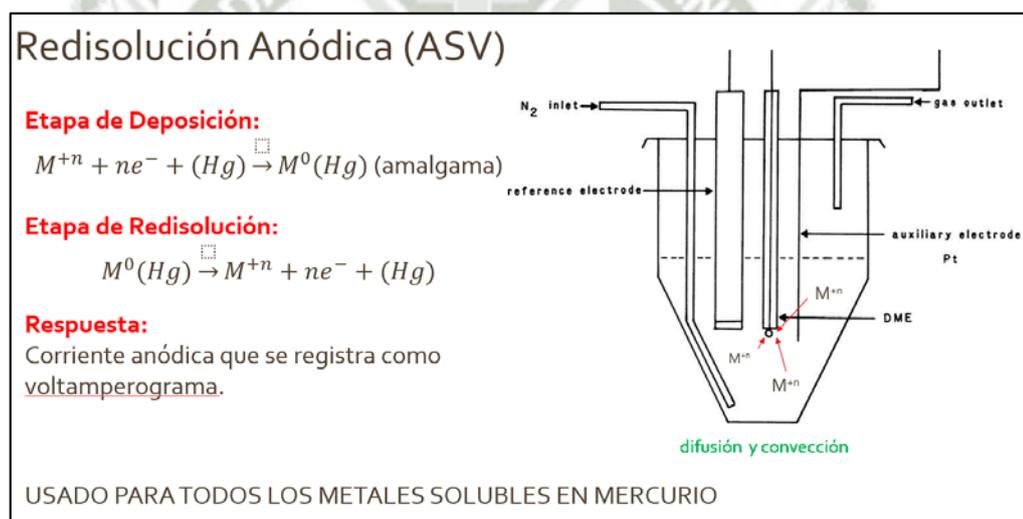


Figura N° 16. Etapas de la redisolución anódica (62).

e) Etapas de la Voltamperometría de Redisolución Anódica

Una de las más importantes técnicas de voltamperometría cuantitativa es la voltamperometría de redisolución ya que proporciona los límites de detección más bajos para los metales (10^{-9} - 10^{-12}). Es decir, detecta iones metálicos con una exactitud razonable, en pocos minutos y en un margen de concentración como el antes expresado (54).

Los métodos de redisolución están basados en el siguiente concepto: la sustancia a determinar se pre-concentra en el electrodo y posteriormente es devuelta a la disolución

por un proceso inverso. Gracias a la voltamperometría de redisolución se ha conseguido pre-concentrar sustancias que antes no era posible al ser consideradas no electroactivas, desarrollar métodos impulsionales, de onda cuadrada, voltamperometría de corriente alterna, las cuales permiten aumentar la sensibilidad de las determinaciones, pudiéndose llegar en algunos casos a determinar concentraciones de orden $\mu\text{g/L}$ e incluso pg/mL (54-56,60).

Se compone de tres técnicas relacionadas: anódica, catódica y voltamperometría de adsorción. Ya que la voltamperometría de redisolución anódica ha encontrado la aplicación más amplia, se ha considerado con mayor detalle.

1. Etapa de Pre-concentración: El objetivo de esta etapa, consiste en traspasar el analito de la disolución hacia la gota de mercurio (electrodo de trabajo).

Diversos aspectos influyen en esta etapa:

- La sustancia, el analito, puede llegar al electrodo de tres maneras distintas: por migración (debido a atracciones electrostáticas), por difusión (debido al gradiente de concentración) y por convección (fuerzas mecánicas de agitación)(54).
- La temperatura, debe estar controlada, ya que, el coeficiente de difusión depende de ella(54).
- El tiempo, a medida que se aumenta el tiempo, la cantidad de analito depositado en el electrodo aumenta. Por otro lado la intensidad de corriente disminuye con el tiempo(54).
- Para que el proceso mantenga su intensidad prácticamente constante se utiliza volúmenes grandes de disolución, superficies pequeñas de electrodo y tiempos de electrodeposición cortos(54).

2. Etapa de Reposo: En el proceso de reposo se detiene la agitación y se mantiene el potencial aplicado. Se necesita que el analito y el electrodo se homogenicen.

3. Etapa de Medida: El objetivo es de obtener desde el punto de vista analítico información acerca del depósito que tenemos.

Existen distintas técnicas y la más común es:

- Barrido lineal de potencial con respecto al tiempo: Consiste en aplicar al electrodo un potencial cuya variación es una función lineal en el tiempo.
- En redisolución anódica el barrido lineal consistiría en que el potencial de electrodo se hace variar linealmente hacia potenciales más positivos, registrando la intensidad de la corriente. A medida que aumenta el potencial se produce un aumento de la intensidad, ya que, aumenta la velocidad de reacción. En redisolución catódica ocurre lo contrario el potencial varía hacia valores más negativos. A partir de un determinado valor de potencial, la intensidad disminuye al igual que la concentración de sustancia electroactiva (54–57).

11. Digestión de Muestras

Los métodos de digestión deben ser seleccionados de acuerdo al tipo de muestra, el metal a ser determinado y finalmente al método analítico, los más comunes son:

- Digestión húmeda en soluciones ácidas,
- Digestión seca.
- Extracción del analito de la muestra sin destrucción total de la matriz.

La calcinación seca es útil para muchas muestras como alimentos o muestras botánicas, debido a la rápida y fácil destrucción de grandes cantidades de materia orgánica húmeda; sin embargo, si el analito (metal) está presente en forma volátil por ejemplo el metilmercurio la calcinación en seco puede causar la pérdida del analito.

Muchas matrices de muestras tanto orgánicas como inorgánicas pueden ser disueltas por calentamiento en una solución oxidante ácida. Otras muestras pueden ser tratadas por extracción de los metales de la matriz. Este método es frecuentemente usado para muestras de aguas, donde un agente quelante puede ser usado para acomplejar el metal de interés, establecido su fácil separación de la matriz acuosa(54).

11.1. Tipos de Técnicas de Digestión

Los métodos de digestión se usan para reducir interferencias debido a la presencia de materia orgánica, y convertir los metales a una forma que, si se pueda analizar, esto es generalmente volviéndolo puro.

Para muestras que contienen gran de materia orgánica, de las cuales se pretende analizar metales no volátiles, la técnica de elección es la calcinación seca, es un método

relativamente simple para la remoción de materia orgánica, las temperaturas típicas de calcinación se encuentran entre 450 y 550 °C durante 6 a 12 horas, y los residuos son disueltos en un ácido apropiado según el metal que se desea analizar (63).

Entre las técnicas más empleadas tenemos la digestión en microondas, este es un método usado especialmente para muestras pequeñas, la aplicabilidad de esta técnica es estrictamente dependiente del tipo de la muestra, los carbohidratos son fácilmente mineralizados con ácido nítrico a 180° C, mientras que las grasas, proteínas y aminoácidos presentan digestiones incompletas debido al relativo bajo potencial de oxidación del ácido nítrico a 200 °C, estos materiales requieren la adición de ácido sulfúrico o perclórico con todos los problemas relacionados a sus altas temperaturas y presiones (63).

Finalmente se tiene la técnica de Digestión UV. Este instrumento ha sido diseñado para la digestión de muestras líquidas que contengan de bajas a moderadas concentraciones de material orgánico. La ventaja de la fotólisis UV es que solo una cantidad pequeña de peróxido de hidrógeno es necesaria y consecuentemente los valores de blanco se mantienen muy bajos. La radiación UV disuelve los componentes de la matriz por la formación de especies oxidantes altamente reactivas (H_2O_2) radicales hidroxilos, radicales halógenos), los cuales aceleran la descomposición de las sustancias interferentes; el peróxido de hidrógeno es usado como iniciador de la reacción y la energía radiante de la lámpara de mercurio es convertida en calor, la cual acelera la digestión (64)

Dado que el vino es una muestra líquida, se deberán optar otras formas de digestión, tal es el caso de la Digestión UV.

11.2. Digestión de UV

El proceso de la oxidación fotoquímica UV representa una mejora prometedora para la descomposición de materia orgánica y, en cierta medida, también la materia inorgánica (polifosfatos, por ejemplo) antes del análisis (54). La digestión es esencial para la fiabilidad del análisis de trazas y ultra trazas en matrices de muestras naturales. Se utiliza para la preparación de la muestra en la espectroscopía, polarografía, la voltamperometría y cromatografía de iones para eliminar la matriz orgánica (54).

El instrumento ha sido diseñado para la digestión de muestras líquidas que contengan de bajas a moderadas concentraciones de material orgánico. La ventaja de la fotólisis UV es que solo una cantidad pequeña de peróxido de hidrógeno es necesaria y consecuentemente los valores de blanco se mantienen muy bajos (54).

La radiación UV disuelve los componentes de la matriz por la formación de especies oxidantes altamente reactivas (H_2O_2 , radicales hidroxilos, radicales halógenos) los cuales aceleran la descomposición de las sustancias interferentes; el peróxido de hidrógeno es usado como iniciador de la reacción y la energía radiante de la lámpara de mercurio es convertida en calor, la cual acelera la digestión (33).

El sistema consta de una unidad de control con temporizador integrado y una parte separada con lámpara UV, equipo de refrigeración y racks de 12 tubos de digestión de la muestra con un volumen de muestra de máximo 12 ml cada uno (39).



CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestra

Muestras de vino tinto obtenidas de centros de abasto masivo, 4 marcas, 3 lotes por marca y 3 muestras por lote.

2. Lugar de Experimentación

Laboratorio de investigación del Proyecto Mercurio, pabellón H - 202, Universidad Católica de Santa María

3. Materiales, reactivos y equipos

3.1. Materiales

- Fiolas de 10, 25, 50, 100, 250, 500 mL.
- Vaso de precipitados
- Micropipetas
- Tips descartables
- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Termómetro
- Pipetas volumétricas
- Pipetas lineales

3.2. Reactivos

- Ácido Nítrico, suprapur.
- Solución de peróxido de hidrógeno, suprapur, w (H₂O₂) = 30 %.
- Ácido acético, suprapur.

- Solución de amoniaco, para análisis de trazas, $w(\text{NH}_3) = 25\%$
- Cloruro de potasio, suprapur.
- Estándar de Pb(II) 1000 mg. L⁻¹ CertiPUR.
- Estándar de Cd(II) 1000 mg. L⁻¹ CertiPUR.
- Nitrógeno uhp.

3.3. Electrodo

- Electrodo multimodo (MME) de mercurio para voltamperometría (Puede funcionar como DME, SMDE o HMDE).
- Capilar de mercurio (silanizado) para MME.
- Electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl (3 mol. L⁻¹).
- Electrodo de platino.

3.4. Soluciones

- Electrolito de soporte: Buffer acetato de sodio pH 4.6.
- Solución de KCl: (KCl) = 3 mol. L⁻¹.

3.5. Equipos

- Balanza analítica.
- pHmetro.
- Voltamperómetro 797 VA Computrace.
- Digestor 705 UV Digester.

4. Métodos: Técnicas e Instrumentos

4.1. Procesamiento de Muestras

- **Elección de la Técnica Analítica**

Para encontrar la técnica analítica que mejor se adecue a las muestras (vino) se realizó una investigación previa, respecto a la naturaleza de la muestra (material líquido), teniendo en cuenta lo siguiente:

- La técnica nos permitirá degradar y solubilizar la matriz para la liberación de los metales para su determinación.
- Se quiere extraer los metales de la matriz en un solvente más apropiado para el método analítico a usar.
- Se busca concentrar los metales presentes en las muestras.

- Se debe separar un analito de un grupo de compuestos de otras especies que puedan estar interfiriendo en el análisis.

Para descartar las técnicas de digestión, se empleó un primer criterio, respecto a la naturaleza de la muestra: sólida o líquida.

Se decidió trabajar con la técnica de Digestión UV, ya que ha sido diseñado para la digestión de muestras líquidas que contengan de bajas a moderadas concentraciones de material orgánico. La ventaja de la fotólisis UV es que solo una cantidad pequeña de peróxido de hidrógeno es necesaria y consecuentemente los valores de blanco se mantienen muy bajos. La radiación UV disuelve los componentes de la matriz por la formación de especies oxidantes altamente reactivas (H_2O_2) radicales hidroxilos, radicales halógenos), los cuales aceleran la descomposición de las sustancias interferentes; el peróxido de hidrógeno es usado como iniciador de la reacción y la energía radiante de la lámpara de mercurio es convertida en calor, la cual acelera la digestión (64)

Determinado el método más adecuado para digerir nuestra muestra de vino se procedió a realizar el procesamiento de la muestra, para ello se realizaron las siguientes pruebas:

- **Cantidad de muestra a digerir**

Se optó por trabajar por duplicado en cada prueba en un digestor por fotólisis UV, en la Tabla N° 3 indica el volumen de muestra de vino, la cual se incrementó de forma exponencial, también nos indica la cantidad de los catalizadores y el tiempo de digestión por fotólisis UV.

Tabla N° 3. Pruebas piloto para determinar la cantidad de muestra a digerir

Tubo (por duplicado)	Muestra (μ L) vino	Tiempo (h)	Catalizadores
1 -2	50	1	20 μ L H_2O_2 100 μ L HNO_3
3-4	100		
5-6	200		
7-8	400		

- **Tiempo de digestión**

Una vez determinada la concentración de muestra de vino, se procedió a evaluar el tiempo de digestión, se realizaron tres pruebas, basadas en la primera experiencia

que fue de una hora. Ahora se decidió disminuir este tiempo, en la Tabla N° 4 se indica la cantidad de muestra, los tiempos de digestión por fotólisis UV a evaluar y la cantidad de catalizadores usados.

Tabla N° 4. Digestión de muestras variando el tiempo de digestión.

Tubo (por duplicado)	Muestra (μL) vino	Tiempo (min)	Catalizadores
1 -2	200	30	20 μL H_2O_2 100 μL HNO_3
		45	
		60	

Transcurrido el período de prueba todos los tubos quedaron transparentes, por lo que se determinó realizar lecturas en el equipo, esta vez usando adición de estándar y evaluando el porcentaje de recuperación. (Figura N° 17)



Figura N° 17. Tubos después del proceso de digestión UV, variando el tiempo.

4.2. Validación del Análisis Voltamperométrico

4.2.1. Validación Electrónica

○ Test de Linealidad

Antes de ejecutar el método de cuantificación, se realizó una validación electrónica del equipo, para verificar su correcta operatividad.

Se unió la celda electroquímica a la estación voltamperométrica 797 VA Computrace con los siguientes pasos:

Se unió el cable del electrodo auxiliar AE con el conector AE, luego se conectó el cable del electrodo de referencia RE con el conector RE y el cable del electrodo de trabajo WE con el conector WE-L y finalmente se abrió y cargó el método (Test

797_L del directorio de métodos) y se inició el método. Esta validación se registró con la formación de una línea diagonal.

○ **Test de desempeño de pico**

Se unió la celda electroquímica a la estación voltamperométrica 797 VA Computrace con los siguientes pasos: se unió el cable del electrodo auxiliar AE con el conector AE, luego se conectó el cable del electrodo de referencia RE con el conector RE y el cable del electrodo de trabajo WE con el conector WE-D y finalmente se abrió y cargó el método (Test 979_D del directorio de métodos) e inició el método. Esta validación se registró con la formación de una curva de Gauss.

4.2.2. Validación Química

En la celda electroquímica se cargó 10 mL de H₂O₂ ultrapura, 500 µL de KCl 3 mol. L⁻¹ y 100 µL de solución estándar de ión Pb(II) (1,000 g. L⁻¹), continuando con la validación, se descargó de la lista métodos el método Test Pb in ion estándar solution.mth y comenzó el modo DME. La solución contenida en la celda fue desgasificada, el Voltamperograma se registró tres veces y seguidamente se visualizó la ventana de adición estándar.

4.2.3. Validación Analítica

Se validó un método voltamperométrico para la determinación de Pb(II) y Cd(II) en muestras de vino tinto de la región de Arequipa, para el método se utilizó estándares de Pb(II) y Cd(II), un equipo voltamperométrico 797 VA Computrace.

En una celda electroquímica se cargó 10 mL de Buffer Acetato 0.1 M pH 4.6 y 100 µL de solución estándar de ión Pb(II) (1 mg. L⁻¹) y Cd(II) (0.5 mg. L⁻¹), el Voltamperograma se registró tres veces y seguidamente se visualizó la ventana de adición estándar, se realizó esta validación según la AOAC la cual presenta parámetros idóneos para el proceso de validación analítica, para la validación se evaluó los siguientes parámetros:

- Linealidad
- LDD y LDQ
- Precisión
- Exactitud

a. Linealidad:

Para evaluar la linealidad se construyó graficas de concentración – respuesta, siendo la concentración dependiente del método. La relación matemática entre ambas variables fue representada por una recta de regresión del tipo (59)(60):

$$y = a + bx$$

Se trabajó con las siguientes concentraciones: 0.005, 0.010, 0.015, 0.019, 0.024 y 0.028 mg. L⁻¹ de Pb (II) y 0.0008, 0.0016, 0.0023, 0.0031, 0.0038, 0.0045 mg. L⁻¹ de Cd (II) por triplicado.

b. Límite de Detección:

La menor cantidad de analito que puede detectarse en una muestra, aunque no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones del experimento indicadas. Así, las pruebas de límite confirman simplemente que la cantidad de analito se encuentra por encima o por debajo de un cierto nivel (59)(60).

El límite de detección del método, se determinó a partir de los gráficos de calibración

El cálculo se realizó sustituyendo los valores en la siguiente fórmula:

$$LDD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

c. Límite de Cuantificación:

La menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones del experimento establecidas (59)(60).

El límite de cuantificación del método desarrollado, se determinó a partir de los gráficos de calibración, estos valores corresponden a la misma gráfica de la cual se obtuvo el límite de detección. El cálculo se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$LDD = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \times \frac{1}{\sqrt{n}}$$

Donde:

Y_{bl} : intercepto de la recta de calibración.

S_{bl} : intercepto de la recta de concentración versus desviación estándar.

b : pendiente de la recta de calibración.

n : número de muestras o repeticiones.

d. Precisión:

La precisión indica la variabilidad que existe entre los diferentes resultados, sin considerar la proximidad al valor real (59)(60).

o Precisión de Repetitividad

La precisión se evaluó a través del intervalo de cuantificación especificado en el método, este consiste en realizar mediciones repetidas a una misma muestra en similares condiciones operativas, en un mismo laboratorio, el mismo día (59)(60).

o Precisión Intermedia

Para la precisión intermedia se evaluaron factores como día de ensayo (I), buffer (II) y analista (III). Se determinaron los coeficientes de variación, a partir de las desviaciones estándar y de los promedios de las lecturas obtenidas en las curvas de calibración para cada elemento; con la finalidad de evaluar la precisión del instrumento, se hicieron lecturas de soluciones estándar de Pb(II) 0.005 mg. L⁻¹ y Cd(II) 0.0008 mg. L⁻¹, se realizaron 03 lecturas de esta solución, con 05 adiciones de estándar. El cálculo se realizó utilizando la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{(SD)}{\bar{X}} \times 100$$

Donde:

CV: Coeficiente de Variación

SD: Desviación estándar

\bar{X} : promedio

Ecuación de Horwitz

Permite establecer el máximo CV (%) aceptable:

$$CV(\%) = 2^{(1-0.5 \times \log C)}$$

C= g analito/mL muestra.

e. Exactitud

Es una medida de la veracidad de los resultados en el método analítico, para evaluarla se determinó el porcentaje de recuperación, la que indica la capacidad del método analítico para obtener resultados lo más próximos posibles al valor verdadero (59)(60).

Para hallar el porcentaje de recuperación se tomaron 3 grupos de 3 tubos cada uno, los cuales contenían:

- **1° grupo:** 200 μL de muestra de vino, 20 μL H_2O_2 y 100 μL HNO_3 .
- **2° grupo:** 10 μL de solución patrón de Pb(II) a 1000 mg. L^{-1} y 5 μL de solución patrón de Cd(II) a 1000 mg. L^{-1} .
- **3° grupo:** 1° grupo y se le agregó 10 μL de solución patrón de Pb(II) a 1000 mg. L^{-1} y 5 μL de solución patrón de Cd(II) a 1000 mg. L^{-1} .

Luego se digirió por fotólisis UV y se realizó la lectura en el voltamperómetro.

El cálculo se hizo a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \left(\frac{(M + St) - M}{St} \right) \times 100$$

Donde:

M: Concentración del analito en la muestra

St: cantidad de estándar adicionado a la muestra

4.3. Determinación de Cd(II) Y Pb(II)

4.3.1. Técnicas Aplicadas

a) Toma de Muestras: Ubicación de los puntos a muestrear

Se planteó trabajar con 4 marcas de vinos, producidos en la Región Arequipa. Para ello se encuestó a los vendedores de las botillerías de la Av. 28 de Julio – Cercado.

- **Adquisición de muestras**

La Tabla N° 5 describe las muestras obtenidas de los principales centros de abasto mostrando el tipo de vino, de uva e indicando la procedencia y sus respectivos lotes.

Tabla N° 5. Lotes muestreados.

Muestras	Lotes	Tipo de vino	Tipo de uva	Cantidades	Procedencia
VHA	VB1305 VB1603 VB1605	Tinto	Borgoña	1 botella por cada lote	Valle de Vitor
VMT	L3 FDE 11-05 L2 FDE 01-16 L3 FDE 04-16	Tinto	Borgoña		Valle de Majes
VPS	38022LI315 110406 102026	Tinto	Borgoña		Valle de Vitor
VSN	V516057BIX V516093BIX V516040BIX	Tinto	Borgoña		Valle de Majes

b) Preparación de muestras para Análisis por Voltamperometría

○ **Preparación del equipo digestor**

El digestor UV utilizado fue el 705 UV Digester – Methrom (Figura N° 18), este equipo consta de 12 tubos de cuarzo, los cuales contenían 200 μ L de muestra vino, 20 μ L de H₂O₂ suprapur, 100 μ L de HNO₃ suprapur y 5 mL de agua, en el caso del blanco se reemplaza H₂O ultrapura en vez de la muestra de vino. Cada muestra de vino se digirió por triplicado por 45 min.



Figura N° 18. Digestor UV – Methrom 705(60)

c) Lectura en el voltamperómetro

Concluida la digestión, el material resultante fue llevado a volumen en fioas de 10 mL con agua ultrapura, se reservó para su lectura. A continuación, el detalle de las soluciones que serán empleadas en la lectura voltamperométrica.

- **Preparación de buffer acetato 0.1 M pH 4.6**

Para la determinación voltamperométrica del Pb(II) fue requerido como electrolito de soporte el buffer acetato (ácido acético / acetato de sodio).

Los cálculos en los que fue necesario el uso de la ecuación de Henderson Hasselbalch son mostrados a continuación:

$$pH = pka + \log \frac{SAL}{\acute{A}CIDO}$$

$$4.6 = 4.76 + \log \frac{SAL}{\acute{A}CIDO}$$

$$\frac{SAL}{\acute{A}CIDO} = 0.69$$

$$0.69x + 1x = 0.1 M$$

$$x = 0.059 M$$

Ácido acético

$$\frac{0.059 \text{ mol}}{L} * \frac{60.05 \text{ g}}{1 \text{ mol}} * \frac{100 \text{ g}}{100 \text{ g}} * \frac{1 \text{ mL}}{1.05 \text{ g}} * 1L = 3.37 \text{ mL}$$

Acetato de sodio

$$\frac{0.049 \text{ mol}}{L} * \frac{82.05 \text{ g}}{1 \text{ mol}} * 1L = 4.02 \text{ g}$$

Hidróxido de sodio

$$82.05 \text{ g acetato} \text{ ----- } 40 \text{ g NaOH}$$

$$4.02 \text{ g acetato} \text{ ----- } 1.96 \text{ g NaOH}$$

Ácido acético

$$82.05 \text{ g acetato} \text{ ----- } 60.05 \text{ g ácido acético}$$

$$4.02 \text{ g acetato} \text{ ----- } 2.94 \text{ mL ácido acético}$$

El buffer se preparó pesando 1.96 g de NaOH, esta cantidad fue colocada a un beaker de 1 L, se agregó agua ultrapura, aproximadamente 800 mL, posterior a ello se

agregaron los 2.94 mL de ácido acético, se determinó el pH con una estación potenciométrica TITRANDO 808 (Metrohm), se ajustó el pH a 4.6., finalmente se llevó a una fiola de 1 L y se enrasó con agua ultrapura. Este buffer fue empleado para todas las determinaciones.

- **Preparación de soluciones estándar de Pb(II) y Cd(II)**

Para ambas soluciones se empleó la ecuación de dilución:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

- C1: Concentración del estándar patrón
- V1: Volumen de solución patrón, que será añadido al volumen que se desea preparar
- C2: Concentración deseada
- V2: Volumen que se quiere preparar

Se trabajó con soluciones estándar patrón, que vienen certificadas a una concentración de 1000 mg. L⁻¹.

Pb(II) 0.5 mg. L⁻¹

$$1000 \text{ mg. L}^{-1} \times V_1 = 0.5 \text{ mg. L}^{-1} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,05 \text{ mL} \sim 50 \mu\text{L}$$

Se tomó 50 μL de solución estándar de Pb(II), y se llevó a una fiola de 100 mL, se enrasó con agua ultrapura.

Cd(II) 0.008 mg. L⁻¹

$$1000 \text{ mg. L}^{-1} \times V_1 = 0.008 \text{ mg. L}^{-1} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,0008 \text{ mL} \sim 0.8 \mu\text{L}$$

Se tomó 0.8 μL de solución estándar de Pb(II), y se llevó a una fiola de 100 mL, se enrasó con agua ultrapura.

Durante la ejecución de las pruebas piloto, se trabajó con adiciones estándar de 1 mg. L⁻¹ para Pb(II) y 0.5 mg. L⁻¹ para Cd(II), pero el equipo registraba errores superiores al 20 %. Esto se debe a que el estándar agregado era superior a la cantidad de Pb(II)

y Cd(II) presente en la muestra, por lo que se tuvo que probar concentraciones más bajas de estándar, hasta obtener un coeficiente de variación menor a 10 % (68). Es por ello que en adelante las soluciones estándar se preparan a 0.5 mg. L^{-1} para el Pb(II) y a 0.008 mg. L^{-1} .

d) Acondicionamiento del Voltamperómetro

El voltamperómetro utilizado fue el 757 VA Computrace de Metrohm, este equipo cuenta con una celda conformada por un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE, se eligió este modo de trabajo ya que la renovación constante de la gota de mercurio, nos permite eliminar interferentes que pudieran permanecer en el electrodo, la gota de mercurio usada, se renueva en cada medición), un electrodo auxiliar de platino y un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl 3M.

El software del equipo fue configurado bajo los siguientes parámetros, tomados del manual del equipo, es decir, fueron configurados por sugerencia del fabricante, y validados por investigaciones que preceden este trabajo(54).

Parámetros 797 VA Computrace (57)

Tabla N° 6. Condiciones para la determinación voltamperométrica.

Electrodo de trabajo	HDME
Velocidad de stirrer	2000 RPM
Modo	DP
Tiempo de purga	300 s
Potencial de deposición	-0.9 V
Tiempo de deposición	90 s
Tiempo de equilibración	10 s
Potencial de inicio	-0.8 V
Potencial final	-0.3 V
Amplitud del pulso	0.05 V
Tiempo de pulso	0.04 s
Paso de voltaje	0.006 V
Tiempo de paso de voltaje	0.1 s
Velocidad de barrido	0.06 V/s
Potencial de pico para Cd(II)	-0.6 V
Potencial de pico para Pb(II)	-0.45 V

Los valores de la Tabla N° 6 muestran los valores óptimos la obtención de la curva de intensidad Vs. Concentración; los valores de potencial pico, corresponden a la máxima intensidad desarrollada, mientras que el potencial de inicio y final, delimitan al método a un rango de máxima sensibilidad.

Los parámetros a configurar en el método de análisis son:

El método voltamperométrico empleado fue el de redisolución anódica, dado que se busca los cationes de Pb(II) y Cd(II), se usó como solución estándar 0.5 mg. L^{-1} de Pb(II) y 0.008 mg. L^{-1} de Cd(II), Una vez ingresado los parámetros, con la muestra digerida y preparada para su análisis, se transfirió a la celda electroquímica (Figura N° 19) y se procedió a colocar 10 mL del buffer acetato 4.6 y 100 μL de muestra para la lectura.

La secuencia de análisis fue la siguiente:

- 1° Blanco: 100 μL de blanco digerido (20 μL H_2O_2 + 100 μL HNO_3 + 5 mL agua ultrapura) + 10 mL de buffer acetato 4.6.
- 2° Estándares: 10 mL de buffer acetato 4.6 + 100 μL de solución estándar de Pb(II) y Cd(II)
- 3° Muestra: 10 mL de buffer acetato 4.6 + 100 μL de muestra (por triplicado).



Figura N° 19. Celda de análisis voltamperométrica.

4.3.2. Análisis Estadístico: Estadística de Medidas Repetidas

Para el análisis estadístico se usaron los siguientes valores:

Promedio: el cual representa a un conjunto de datos, señalando un centro de los valores.

Desviación Estándar (SD): Representa una medida de la dispersión de un conjunto de datos alrededor del promedio.

Coefficiente de Variación (CV): Mide la variación de los datos, conocida como desviación estándar relativa.

$$CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100$$

Donde:

SD: Desviación estándar

\bar{X} : Promedio.

La AOAC establece valores aceptables para cada concentración, siendo 8 % para concentraciones de 1 mg. L⁻¹ y 15 % para una concentración de 10 µg. L⁻¹, estos valores fueron obtenidos utilizando la ecuación de Horwitz.

Ecuación de Horwitz

Permite establecer el máximo CV (%) aceptable:

$$CV(\%) = 2^{(1-0.5 \times \log C)}$$

C= g analito/mL muestra

T de student - Comparación de una media experimental con un valor conocido

Al hacer un contraste de significación se prueba la veracidad de una hipótesis denominada hipótesis nula, El término nulo se emplea para indicar que no hay otra diferencia entre el valor observado y el conocido que la atribuible a la variación aleatoria.

Para decidir si la diferencia entre \bar{x} y μ es significativa, es decir para contrastar H₀: la media de la población = μ , se calcula el estadístico t:

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu) \times \sqrt{n}}{s}$$

Donde:

\bar{x} : media muestral.

μ : Valor conocido

n : número de muestras o repeticiones.

s : desviación estándar

El dato obtenido es comparado con el valor t de Tabla para un G.L.: n-1.

- **Prueba de significación**

Análisis de Varianza

Utilizada para comparar más de dos medias, el análisis ANOVA, es una técnica estadística muy completa, que se utiliza para separar y estimar las causas de variación(60).

Las fórmulas utilizadas son:

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Estadístico F
Entre de grupos	K-1	SCE	$\frac{SCE}{K-1} = CME$	$\frac{CME}{CMD} = F$
Dentro de grupos	N-K	SCD	$\frac{SCD}{N-K} = CMD$	
Total	N-1	SCT		

Donde:

N: Número de datos.

K: Número de grupos experimentales.

El valor F es comparado con el valor F de Tabla de acuerdo a los grados de libertad; si el F calculado es menor que el F de Tabla, se dice entonces que todos los grupos son iguales, en contraste se dirá que no todos los grupos son iguales por lo que existe una diferencia significativa, en tal caso es necesario realizar una prueba de especificidad como la Prueba Least Significant Difference (LSD), que tiene la siguiente expresión (60):

$$LSD = S \sqrt{\frac{2}{n}} \times t_{h(n-1)}$$

Donde:

S: Promedio de los cuadrados dentro de los grupos.

n: Número de datos por grupo.

h: Número de grupos.

t: t de Tabla.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Técnica de Digestión Aplicada

Se optó por usar la Digestión UV, y se inició con las pruebas para determinar la cantidad de muestra óptima para el análisis. Se buscó tubos decolorados como punto determinante para seleccionar la cantidad de muestra óptima para digerir. Se trabajó con los datos de la Tabla N° 3 mostrado en el capítulo II, con un tiempo de digestión por fotólisis UV de 1 hora. En la Figura N° 20 se observa los tubos antes del proceso de digestión por fotólisis UV y el resultado que se obtuvo después del tiempo de digestión, se encontró que todos los tubos decoloran excepto los que contenían 400 μL de muestra de vino, por ser este nuestro punto de inflexión se decidió trabajar con la cantidad de muestra inferior a este punto, siendo el valor de 200 μL el más adecuado.

Nuestro segundo punto de análisis fue el de determinar el tiempo óptimo de digestión, basada en la primera experiencia que fue de una hora, se decidió disminuir este tiempo y optimizar nuestra técnica, se trabajó a 30 min, 45 min y a 60 min. de tiempo de digestión. Se decoloró en todos los tubos, por lo que para evaluar si todos fueron digeridos al 100 % se empleó la técnica de adición de estándar, para calcular el porcentaje de recuperación, a cada tubo se le agregó 10 μL de solución patrón de Pb(II) a 1000 mg. L^{-1} y 5 μL de solución patrón de Cd(II) a 1000 mg. L^{-1} .

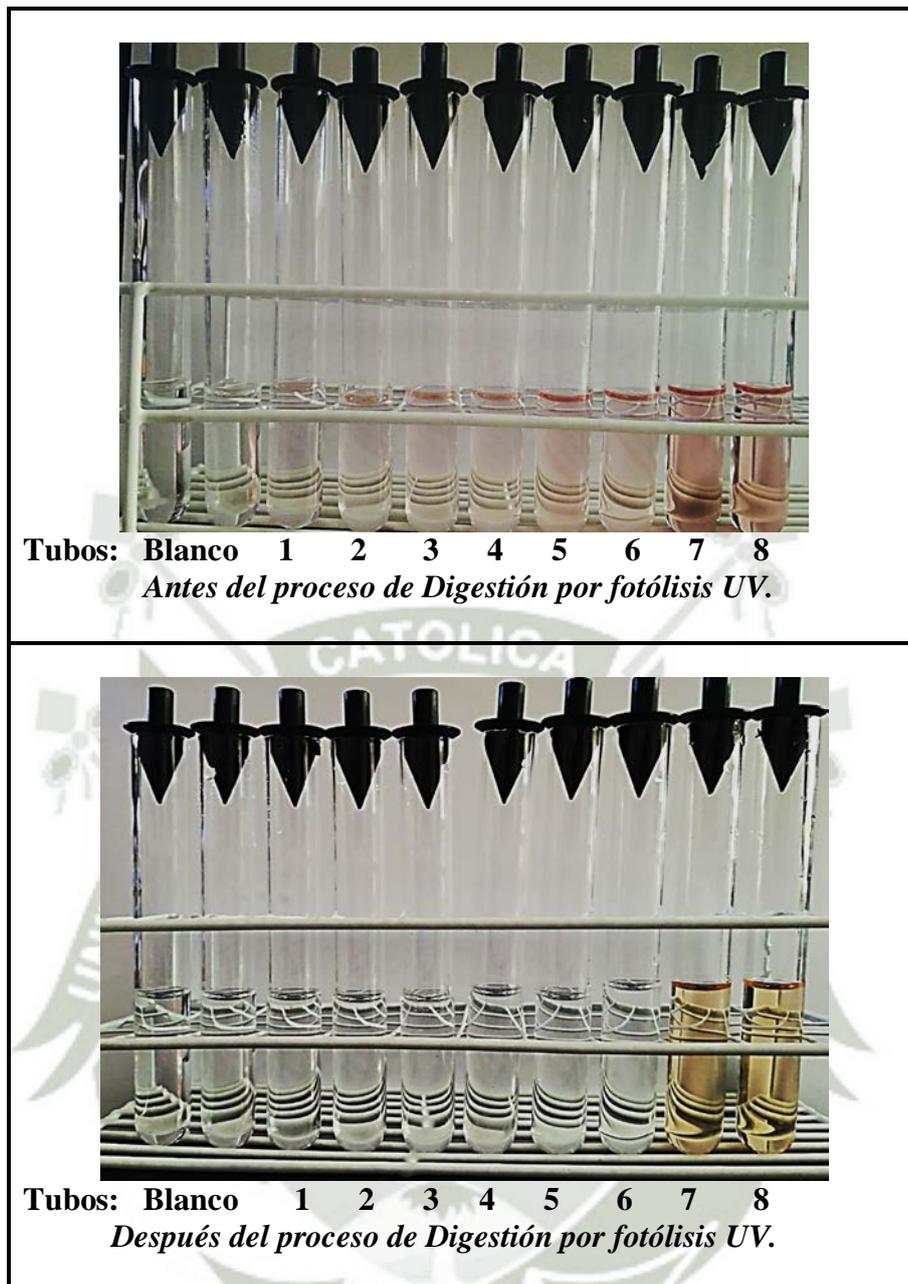


Figura N° 20. Proceso de digestión por fotólisis UV

Como se observa en la Tabla N° 7, los valores de recuperación se encuentran dentro de los lineamientos establecidos por la AOAC para una concentración de 0.1 % (1000 ppm) el porcentaje de recuperación oscila entre 90 – 108 % (68), por lo tanto al estar el tiempo de 45 y 60 minutos dentro de este rango, se considera apropiado trabajar con el menor tiempo que me brinde las condiciones más óptimas de recuperación.

Con las pruebas ejecutadas anteriormente se encontró los parámetros con los que se digirieron las muestras: Digestión UV por 45 minutos usando 200 μ L de muestra.

Tabla N° 7. Porcentaje de recuperación de Pb(II) y Cd(II) en muestras digeridas a diferentes tiempos.

Tiempo de digestión (min)	Cc. Final Pb(II)	Cc. Final Cd(II)	Porcentaje de recuperación Pb(II)	Porcentaje de recuperación Cd(II)
30	764.9	658	76.49 %	65.80 %
45	1034.45	509.95	103,45 %	101,99 %
60	1033	504.8	103,30 %	100.96 %

2. Validación del análisis voltamperométrico

2.1. Validación Electrónica

Para validar el instrumento VA Computrace de Metrohm, se utilizó una celda estándar incorporada en el equipo. La validación se efectuó en dos partes, una validación electrónica y una validación química.

En la validación electrónica se reportó 2 resultados, uno del test de linealidad y otro del test de desempeño del pico, los 2 resultados se dan entre la Intensidad (A) versus el Voltaje (V).

En la Figura N°21 representativa es mostrada a continuación.

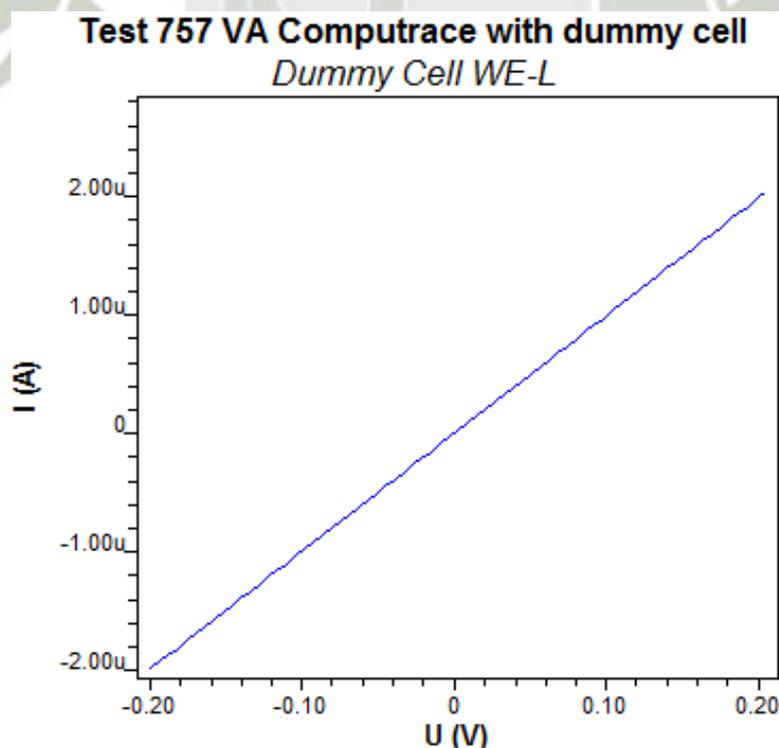


Figura N° 21. Linealidad de la validación electrónica.

En la Figura N°21, se observa una línea recta, la cual es obtenida de la corriente mínima ($-2 \mu\text{A}$) y la corriente máxima ($2 \mu\text{A}$) frente a la rampa de voltaje mínimo (-200 mV) y la rampa de voltaje máximo ($+200 \text{ mV}$), la tolerancia para la corriente mínima es de ($-1.6 \mu\text{A}$ a $-2.4 \mu\text{A}$) y para la corriente máxima es de ($1.6 \mu\text{A}$ a $2.4 \mu\text{A}$), según parámetros descritos por Metrohm, con estas características obtenidas se confirma la linealidad para la validación electrónica, es decir que el desempeño de la rampa de voltaje fue óptima para la utilización del equipo.

En la Figura N° 22, se muestra un pico simétrico, el cual fue obtenido del voltaje máximo (-497 mV) y la corriente máxima ($-1.27 \mu\text{A}$), la tolerancia para el voltaje es de (-450 mV a -550 mV), según parámetros descritos por Metrohm, al producirse un cambio de intensidad por el equipo se evidencia la simetría del pico y la fiabilidad del equipo para la determinación de Pb(II) .

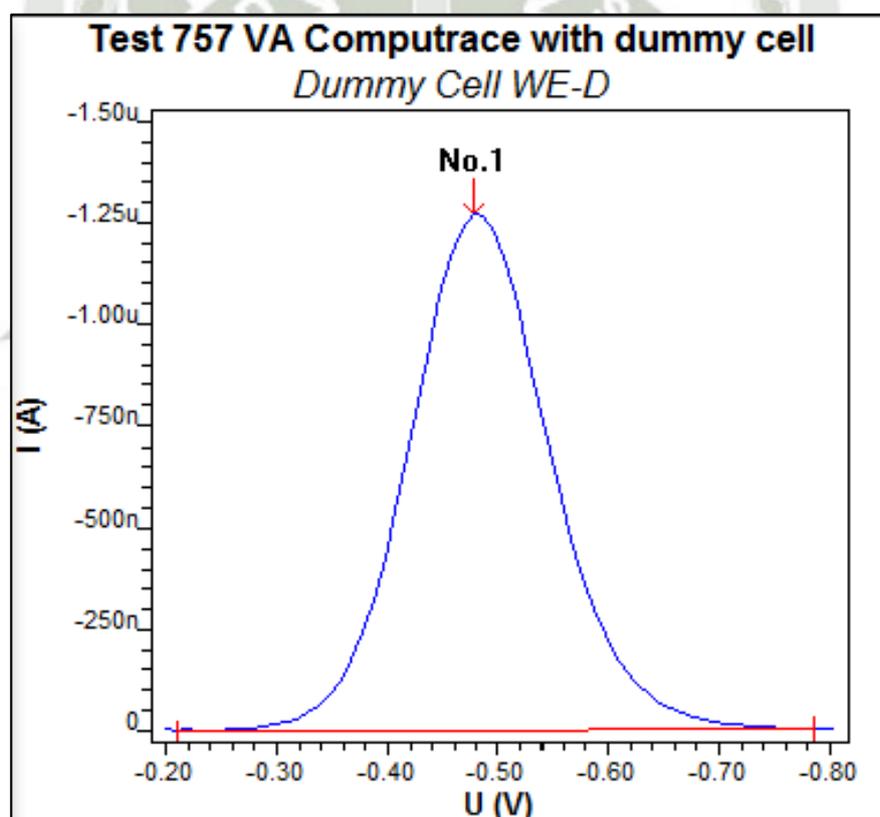


Figura N° 22. Validación electrónica del pico.

Culminada la validación electrónica se procedió con la validación química, la cual se efectuó para ver la precisión y exactitud con la que cuenta el instrumento para reportar los resultados de las muestras. Una gráfica representativa es mostrada a continuación.

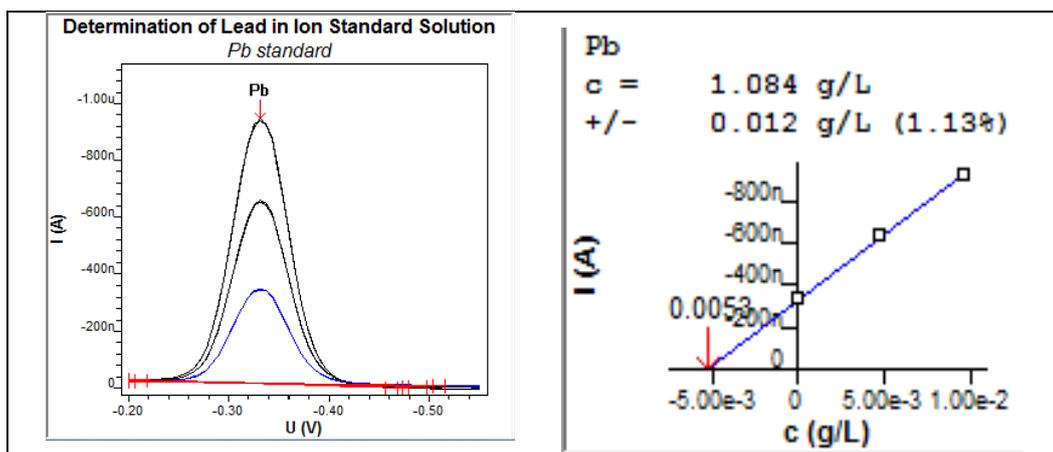


Figura N° 23. Validación química.

En la Figura N° 23, se observa la validación química que se efectuó usando una solución estándar de Pb(II) ($1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) después de 2 adiciones de estándar de $100 \mu\text{L}$ en modo DME, se muestra un aumento en el pico de dicho metal y la concentración final es de $1.084 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de Pb(II), la tolerancia para la concentración final es de (1.072 a $1.096 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), dicha concentración final depende enormemente del cuidado tomado en la preparación de la solución de análisis y en la distribución de las soluciones de adición estándar, al estar la concentración de Pb(II) dentro del rango establecido, se concluye con la validación química dado el cumplimiento de los parámetros descritos por Metrohm.

2.2. Validación Analítica

2.2.1. Validación del método para Cd(II)

a. Linealidad del método para Cd (II)

Se evaluaron 6 niveles de concentración ($0.0008, 0.0016, 0.0023, 0.0031, 0.0038, 0.0045 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), las cuales se analizaron por triplicado, obteniéndose los resultados representados en la Tabla N° 8.

A continuación, con los datos de la Tabla N° 8 se construyó la curva para la linealidad del Cd(II), la Figura N° 24. Donde se muestra un comportamiento lineal, sin embargo, fue necesario evaluar el coeficiente de determinación (r^2) el cual fue igual a 0.9992 , valor muy cercano a la unidad, por lo que se afirma que existe una buena correlación entre las variaciones de la concentración del analito y su respuesta.

Tabla N° 8. Datos de Linealidad para determinación de Cd(II).

Cd(II) mg. L ⁻¹	Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	Promedio	S.D.
0.0008	1.98	2.11	2.12	2.07	0.08
0.0016	3.92	3.92	4.09	3.98	0.10
0.0023	5.84	6.16	5.97	5.99	0.16
0.0031	7.98	8.06	7.83	7.96	0.12
0.0038	9.79	10.1	10.08	9.99	0.17
0.0045	11.39	11.37	11.89	11.55	0.29

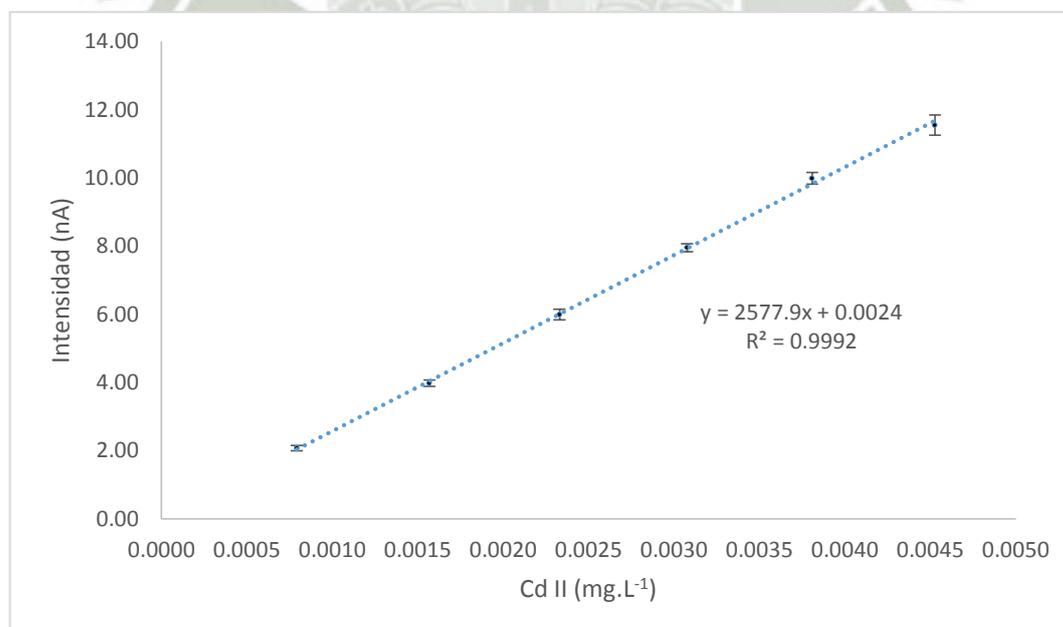
FUENTE: Elaboración propia.

Para una mayor aproximación, el mejor indicador del modelo lineal no es r^2 sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor de t con n- 2 grados de libertad y se compara con el valor t tabulado para el nivel de confianza requerido.

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} = \frac{|0.9996|\sqrt{6-2}}{\sqrt{1-0.9992}} = 70.68_{t_T=2.78}$$

$$t_r > t_T$$

El valor t permite establecer estadísticamente el comportamiento lineal de los datos, ya que es un estimado comparativo a un 95 % de nivel de confianza.



FUENTE: Elaboración propia.

Figura N° 24. Linealidad del método voltamperométrico para Cd(II).

b. Precisión del método para Cd(II)

La precisión indica la variabilidad que existe entre los diferentes resultados, sin considerar la proximidad al valor real, este consiste en realizar mediciones repetidas a una misma muestra en similares condiciones operativas, en un mismo laboratorio, el mismo día, los resultados se muestran en la Tabla N° 9.

Tabla N° 9. Datos de Precisión para determinación de Cd(II).

Cd(II) mg. L ⁻¹	Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	Promedio	S.D.	% CV	INT. CONFIANZA	
0.0008	1.98	2.11	2.12	2.07	0.08	3.77	1.88	2.26
0.0016	3.92	3.92	4.09	3.98	0.10	2.47	3.73	4.22
0.0023	5.84	6.16	5.97	5.99	0.16	2.69	5.59	6.39
0.0031	7.98	8.06	7.83	7.96	0.12	1.47	7.67	8.25
0.0038	9.79	10.1	10.08	9.99	0.17	1.74	9.56	10.42
0.0045	11.39	11.37	11.89	11.55	0.29	2.55	10.82	12.28

Fuente: Elaboración propia.

Según las directrices de la AOAC y la ecuación de Horwitz, a un nivel de concentración próximo a 0.5 mg. L⁻¹ el valor de coeficiente de variación máximo aceptable es 8.9 %, por lo tanto, los resultados mostrados al ser menores de 8.9 % cumplen con las especificaciones.

c. Precisión intermedia del método para Cd(II)

Para la precisión intermedia se evaluaron factores como día de ensayo (Intensidad I), buffer (Intensidad II) y analista (III) representados en la Tabla N° 10.

Tabla N° 10. Datos de Precisión intermedia para determinación de Cd(II).

Cd(II) mg. L ⁻¹	Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	Promedio	S.D.	% CV	INT. CONFIANZA	
0.0008	4.82	4.36	3.98	4.39	0.42	9.59	3.34	5.43
0.0016	6.86	6.36	5.99	6.40	0.44	6.82	5.32	7.49
0.0023	9.25	8.43	7.96	8.55	0.65	7.64	6.92	10.17
0.0031	10.97	10.35	9.99	10.44	0.50	4.75	9.21	11.67
0.0038	13.11	12.48	11.88	12.49	0.62	4.92	10.96	14.02
0.0045	15.47	14.32	13.9	14.56	0.81	5.58	12.54	16.58

Fuente: Elaboración propia.

Para la precisión intermedia se puede aceptar valores inferiores al doble del coeficiente de variación del método, por este motivo los datos mostrados en el cuadro anterior, cumplen con las especificaciones dadas.

d. Exactitud del método para Cd(II)

La exactitud expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

Tabla N° 11. Datos de exactitud para determinación de Cd(II).

	M	M + 0.16 mg. L ⁻¹	M + 0.32 mg. L ⁻¹
	0.077	0.241	0.379
	0.077	0.244	0.418
	0.084	0.235	0.399
Promedio	0.077	0.242	0.398
D.S.	0.004	0.005	0.020
Recuperación %		103.514	100.485

* M: misma muestra

Fuente: Elaboración propia.

Como se observa en la Tabla N° 11, 101.99 % fue el promedio de la recuperación del método, estando dentro de los límites (75-120 %) dados por la AOAC, por lo que la técnica es exacta.

e. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método para Cd(II)

Los LD y LC fueron calculados con los datos obtenidos de los análisis realizados por triplicado en el Cuadro de linealidad.

Límite de detección	0.000012 mg. L ⁻¹ de Cd(II) \approx 0.012 μ g. L ⁻¹ de Cd(II)
Límite de cuantificación	0.000039 mg. L ⁻¹ de Cd(II) \approx 0.039 μ g. L ⁻¹ de Cd(II)

Para determinar los límites de cuantificación y de detección se construyeron con las gráficas de concentración versus área y concentración versus desviación estándar, como se muestran en las Figuras N° 25 y 26

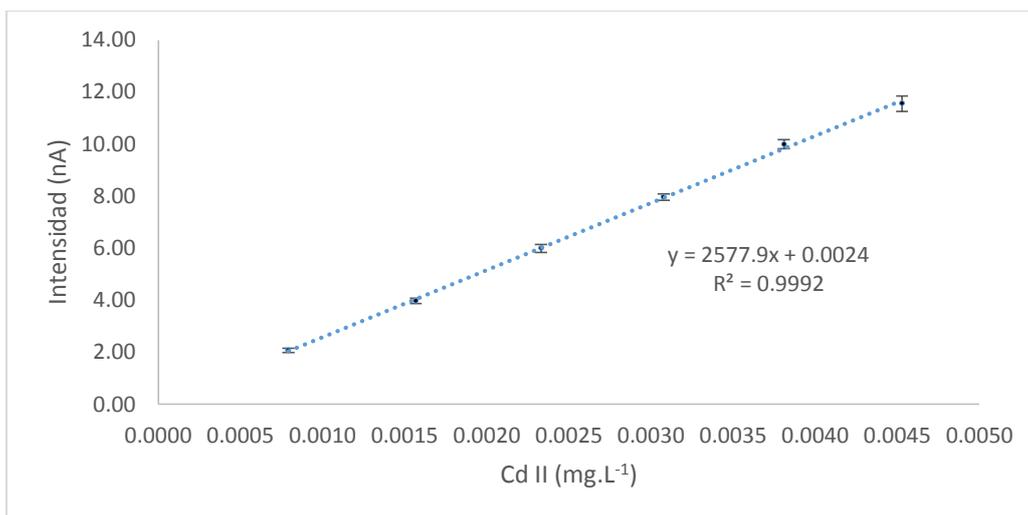


Figura N° 25. Gráfica de concentración de Cd(II) versus Intensidad.

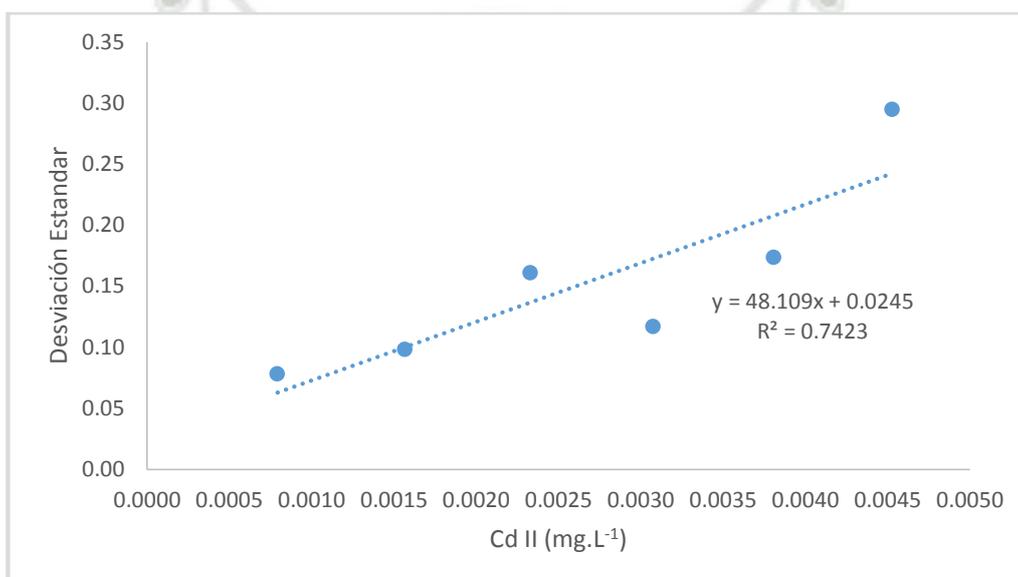


Figura N° 26. Gráfica de concentración de Cd(II) versus desviación estándar.

Por lo tanto, el método es capaz de cuantificar como 0.000039 mg. L⁻¹ de Cd(II) con buena precisión y exactitud.

Los resultados obtenidos muestran que el método voltamperométrico para la cuantificación de Cd(II) propuesto; es lineal, preciso y exacto con un LDD de 0.000012 mg. L⁻¹ y LDQ de 0.000039 mg. L⁻¹.

2.2.2. Validación del método para Pb(II)

a. Linealidad del método para Pb(II)

Se evaluaron 6 niveles de concentración (0.005, 0.010, 0.015, 0.019, 0.024 y 0.028 mg. L⁻¹), las cuales se analizaron por triplicado, obteniéndose los resultados representados en la Tabla N° 12.

Tabla N° 12. Datos de Linealidad para determinación de Pb(II).

Pb(II) mg. L ⁻¹	Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	Promedio	S.D.
0.005	7.74	8.31	8.54	8.20	0.41
0.010	15	14.95	15.8	15.25	0.48
0.015	21.87	23.53	22.69	22.70	0.83
0.019	29.64	30.27	29.35	29.75	0.47
0.024	36.03	37.5	37.5	37.01	0.85
0.028	45.57	45.69	43.86	45.04	1.02

FUENTE: Elaboración propia.

A continuación, se construyó la curva para la linealidad del Pb(II), (Figura N° 27) donde se muestra un comportamiento lineal, sin embargo, fue necesario evaluar el coeficiente de determinación (r^2) el cual fue igual a 0.999, valor muy cercano a la unidad, por lo que se afirma que existe una buena correlación entre las variaciones de la concentración del analito y su respuesta.

Para una mayor aproximación, el mejor indicador del modelo lineal no es r^2 sino un test estadístico, en el cual se calcula un valor de t con n- 2 grados de libertad y se compara con el valor t tabulado para el nivel de confianza requerido.

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} = \frac{|0.999|\sqrt{6-2}}{\sqrt{1-0.999}} = 63.182_{t_T=2.78}$$

$$t_r > t_T$$

El valor t permite establecer estadísticamente el comportamiento lineal de los datos, ya que es un estimado comparativo a un 95 % de nivel de confianza.

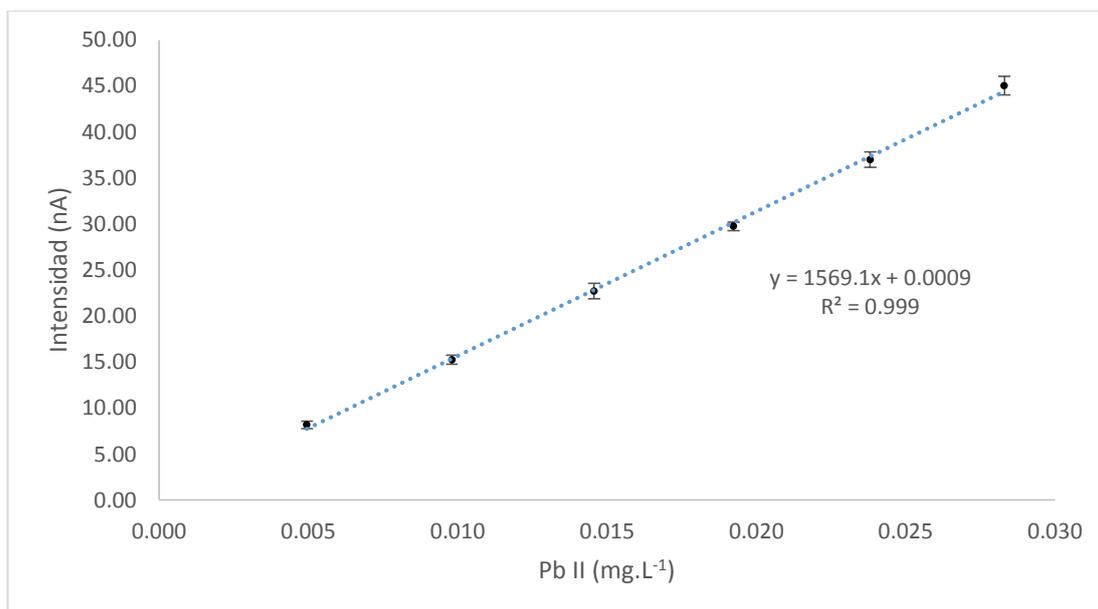


Figura N° 27. Linealidad del método voltamperométrico de Pb(II).

b. Precisión del método para Pb(II)

La precisión indica la variabilidad que existe entre los diferentes resultados, sin considerar la proximidad al valor real, este consiste en realizar mediciones repetidas a una misma muestra en similares condiciones operativas, en un mismo laboratorio, el mismo día, los resultados se muestran en la Tabla N° 13.

Tabla N° 13. Datos de Precisión para determinación de Pb(II).

Pb(II) mg. L ⁻¹	Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	Promedio	S.D.	% CV	INT. CONFIANZA	
0.005	7.74	8.31	8.54	8.20	0.41	5.02	7.17	9.22
0.010	15	14.95	15.8	15.25	0.48	3.13	14.07	16.43
0.015	21.87	23.53	22.69	22.70	0.83	3.66	20.63	24.76
0.019	29.64	30.27	29.35	29.75	0.47	1.58	28.58	30.92
0.024	36.03	37.5	37.5	37.01	0.85	2.29	34.90	39.12
0.028	45.57	45.69	43.86	45.04	1.02	2.27	42.50	47.58

Fuente: Elaboración propia.

Según las directrices de la AOAC y la ecuación de Horwitz, a un nivel de concentración próximo a 3 mg. L⁻¹ el valor de coeficiente de variación máximo aceptable es 6.8 %, por lo tanto, los resultados mostrados al ser menores de 6.8 % cumplen con las especificaciones.

c. Precisión intermedia del método para Pb(II)

Para la precisión intermedia se evaluaron factores como día de ensayo (Intensidad I), buffer (Intensidad II) y analista (Intensidad III) representados en la Tabla N° 14.

Tabla N° 14. Datos de Precisión intermedia para determinación de Pb(II).

Pb(II) mg. L ⁻¹	Intensidad I (nA)	Intensidad II (nA)	Intensidad III (nA)	Promedio	S.D.	% CV	INT. CONFIANZA	
0.005	8.92	8.84	9.52	9.09	0.37	4.09	8.17	10.02
0.010	14.02	14.25	14.74	14.34	0.37	2.57	13.42	15.25
0.015	20.1	20.04	19.66	19.93	0.24	1.20	19.34	20.53
0.019	24.27	25.3	25.24	24.94	0.58	2.32	23.50	26.37
0.024	29.6	31.2	29.8	30.20	0.87	2.89	28.03	32.37
0.028	35.5	35.83	37.91	36.41	1.31	3.59	33.17	39.66

Fuente: Elaboración propia.

Para la precisión intermedia se puede aceptar valores inferiores al doble del coeficiente de variación del método, por este motivo los datos mostrados en el cuadro anterior, cumplen con las especificaciones dadas.

d. Exactitud del método para Pb(II)

La exactitud expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente como valor verdadero o un valor de referencia y el valor experimental encontrado.

Tabla N° 15. Datos de exactitud para determinación de Pb(II).

	M	M + 1 mg. L ⁻¹	M + 2 mg. L ⁻¹
	0.465	1.499	2.341
	0.462	1.543	2.632
	0.522	1.478	2.503
Promedio	0.464	1.521	2.486
D.S.	0.034	0.033	0.146
Recuperación %		105.754	101.147

* M: misma muestra

Fuente: Elaboración propia.

En la Tabla N° 15 se observa que el promedio de la recuperación del método fue de 103.45 %, estando dentro de los límites (80-115 %) dados por la AOAC.

e. Límites de (LD) y cuantificación (LC) del método para Pb(II)

Los LD y LC fueron calculados con los datos obtenidos de los análisis realizados por triplicado en el Cuadro de linealidad.

Límite de detección	0.00022 mg. L ⁻¹ de Pb(II) ≈ 0.22 μg. L ⁻¹ de Pb(II)
Límite de cuantificación	0.00075 mg. L ⁻¹ de Pb(II) ≈ 0.75 μg. L ⁻¹ de Pb(II)

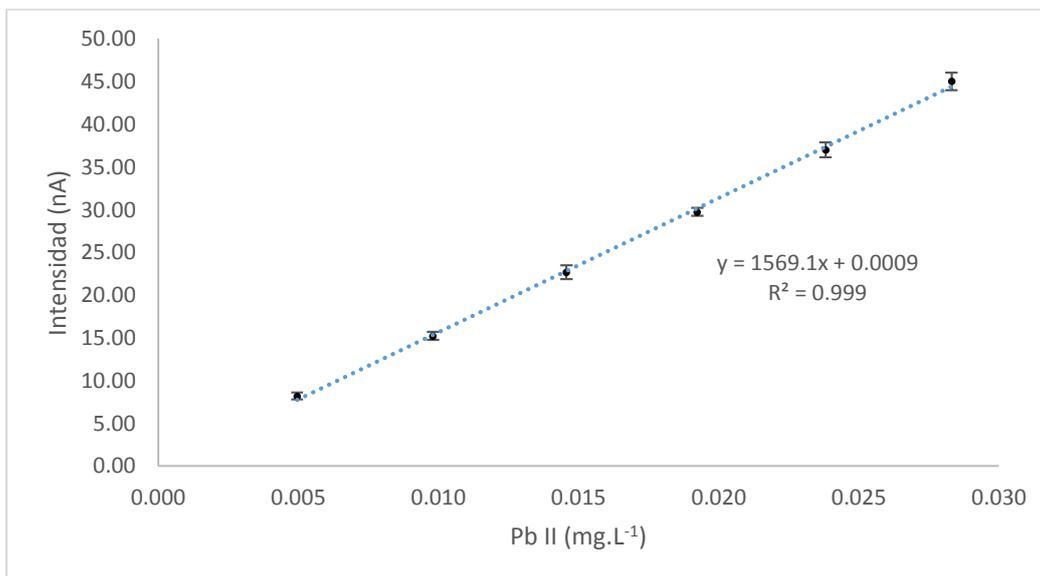


Figura N° 28. Gráfico de concentración de Pb(II) versus Intensidad.

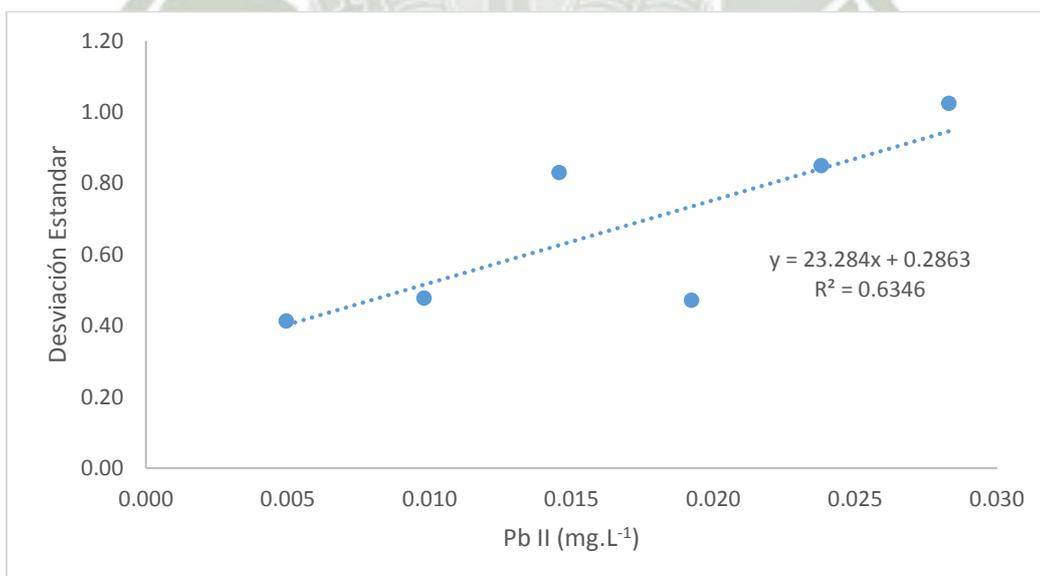


Figura N° 29. Gráfica de concentración de Pb(II) versus desviación estándar.

Para determinar los límites de cuantificación y de detección se construyeron con las gráficas de concentración versus área y concentración versus desviación estándar, como se muestran en la Figura N° 28 y N° 29.

Por lo tanto, el método es capaz de cuantificar como mínimo 0.00075 mg. L⁻¹ de Pb(II) con buena precisión y exactitud.

Los resultados obtenidos muestran que el método voltamperométrico para la cuantificación de Pb(II) propuesto; es lineal, preciso y exacto con un LDD de 0.00022 mg. L⁻¹ y LDQ de 0.00075 mg. L⁻¹.

3. Determinación de Pb (II) y Cd (II) en vinos

3.1. Muestreo de vino

Una vez validada la técnica para la determinación de Cd(II) y Pb(II) se procedió a la selección de muestras que se basó en una encuesta aplicada a los vendedores de las principales botillerías de la Av. 28 de Julio – Cercado de Arequipa, siendo este lugar uno de los principales centros de abastos de bebidas alcohólicas al por mayor y menor de la ciudad.

Una de las preguntas aplicadas en la encuesta fue: Dentro de las marcas de vino que comercializa ¿Cuáles son las marcas de mayor demanda? Dentro de estas se descartaron todas las marcas que no eran producidas en la región Arequipa, y el segundo criterio excluyente fue contar con número de lote.

Tabla N° 16. Muestras adquiridas para análisis.

MUESTRAS	LOTES	TIPO DE UVA	PROCEDENCIA
VHA	VB1305 VB1603 VB1605	Borgoña	Valle de Vitor
VMT	L3 FDE 11-05 L2 FDE 01-16 L3 FDE 04-16		Valle de Majes
VPS	38022LI315 110406 102026		Valle de Vitor
VSN	V516057BIX V516093BIX V516040BIX		Valle de Majes

Es así que se adquirió cuatro marcas de vinos producidos en la región Arequipa, y por cada marca se adquirió tres lotes. Las muestras fueron codificadas empleando las iniciales de sus nombres de marca como se puede ver en la Tabla N° 16, las que fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para su análisis de Cd(II) y Pb(II).

3.2. Presentación de muestras:

Tabla N° 17. Muestras de estudio (4 marcas, 3 lotes).

COD.	Procedencia	Tipo de vino	Lotes	Código de Lote	Fecha de fabricación
VHA	Valle de Vítor	Vino tinto Borgoña	Lote 1	VB1305	May-13
			Lote 2	VB1603	Mar-16
			Lote 3	VB1605	May-16
VPS	Valle de Vítor	Vino tinto Borgoña	Lote 1	38022LI315	Mar-15
			Lote 2	110406	Oct-16
			Lote 3	102026	Feb-16
VSN	Arequipa	Vino tinto Borgoña	Lote 1	V516057BIX	May-16
			Lote 2	V516093BIX	Set-16
			Lote 3	V516040BIX	Abr-16
VMT	Majes	Vino tinto Borgoña	Lote 1	L3 FDE 11-05	Nov-05
			Lote 2	L2 FDE 01-16	Ene-16
			Lote 3	L3 FDE 04-16	Abr-16

En la tabla N° 17, se muestran las codificaciones de 3 lotes de 4 muestras de vino tinto (Borgoña) provenientes de 3 zonas de la región de Arequipa, se incluye información del código de lote, fecha de fabricación.

3.3. Presentación de Niveles detectados de Pb(II)

La figura N° 30 muestra los niveles de Pb(II) detectados los cuales se encuentran por encima de los niveles máximos establecidos por la Organización Internacional de la Viña y el Vino,

Ministerio de Producción y el *Codex Alimentarius*, la presencia de Pb(II) en la muestra puede deberse a diversos factores como, por ejemplo: el transporte de la uva desde el campo hasta la bodega, condiciones de cultivo de la uva, mala limpieza de los contenedores, insumos contaminados, entre otras.

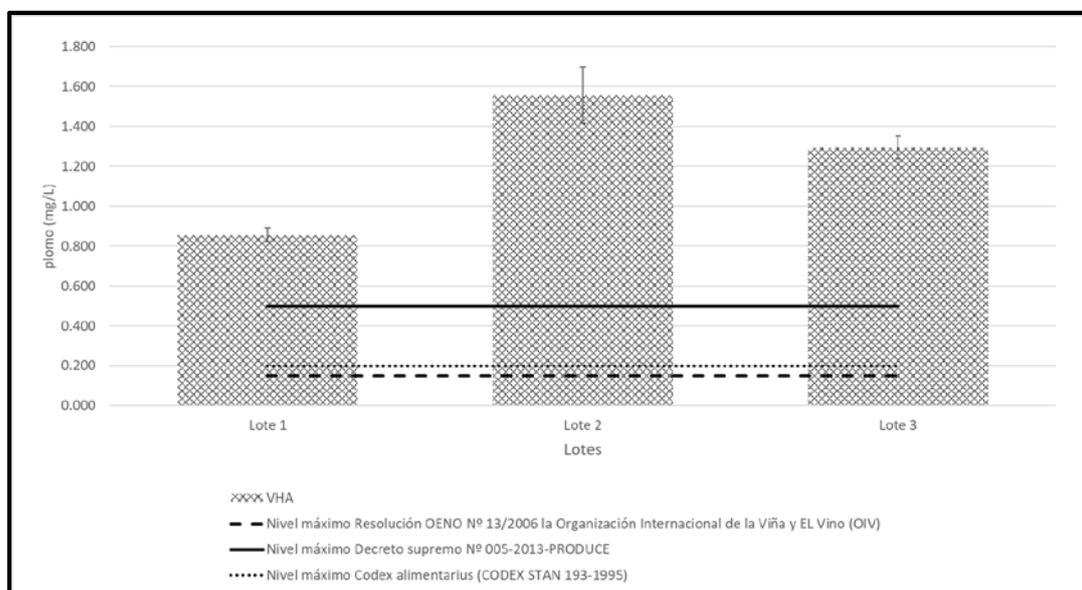


Figura N° 30. Niveles detectados de Pb(II) para 3 lotes de una muestra de VHA, donde se muestra los valores máximos establecidos por la OIV, D.S. N 005-2013-PRODUCE y CODEX STAN 193-1995.

La Figura N° 31 muestra los niveles de Pb(II) detectados los cuales se encuentran por encima de los niveles máximos establecidos por la Organización Internacional de la Viña y el Vino, Ministerio de Producción y el *Codex Alimentarius*, excepto el tercer lote el cual supera los niveles máximos establecidos por la OIV, pero no supera lo establecido por PRODUCE, sin embargo se encuentra en el límite establecido por el *Codex Alimentarius*, la presencia de Pb(II) en la muestra puede deberse a diversos factores desde el transporte de la uva desde el campo hasta la bodega, las condiciones de cultivo de la uva (pesticidas, herbicidas, etc.), mala limpieza de los contenedores, agua de lavado contaminada, insumos contaminados, entre otras.

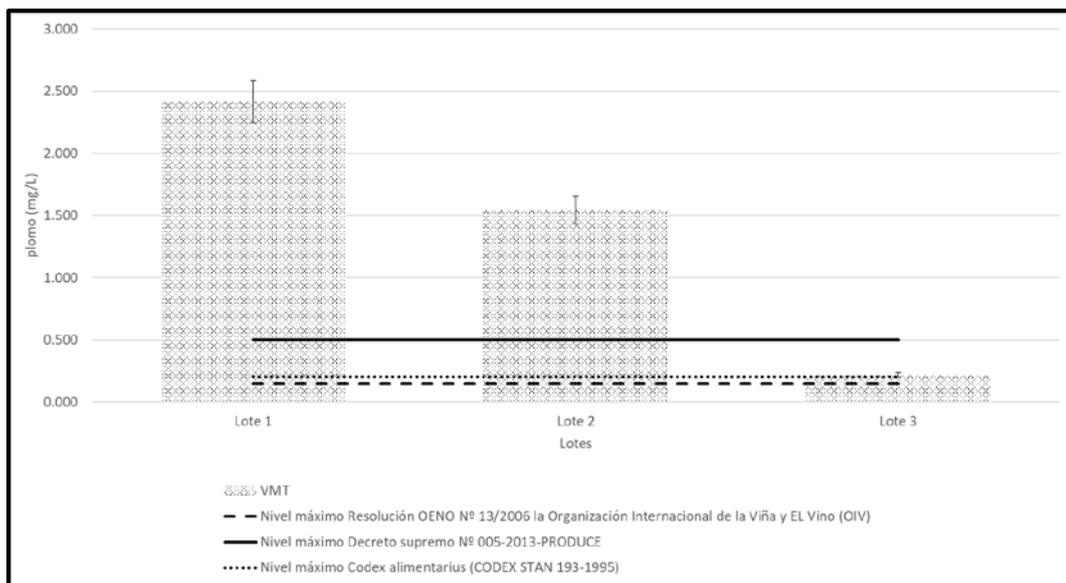


Figura N° 31. Niveles detectados de Pb(II) para 3 lotes de una muestra de VMT, donde se muestra los valores máximos establecidos por la OIV, D.S. N 005-2013-PRODUCE y CODEX STAN 193-1995.

En la Figura N° 32, se muestra los niveles detectados de Pb(II) para 3 lotes de la muestra VSN, donde se muestra los niveles de Pb(II) detectados, los cuales se encuentran por encima de los niveles máximos establecidos por la Organización Internacional de la Viña y el Vino, Ministerio de Producción y el *Codex Alimentarius*. la presencia de Pb(II) en la muestra puede deberse a diversos factores.

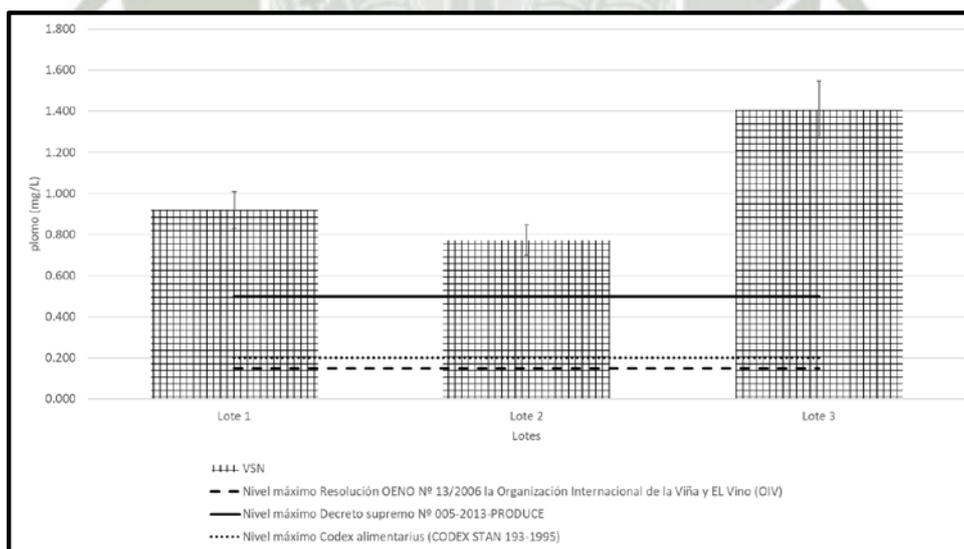


Figura N° 32. Niveles detectados de Pb(II) para 3 lotes de una muestra de VSN, donde se muestra los valores máximos establecidos por la OIV, D.S. N 005-2013-PRODUCE y CODEX STAN 193-1995.

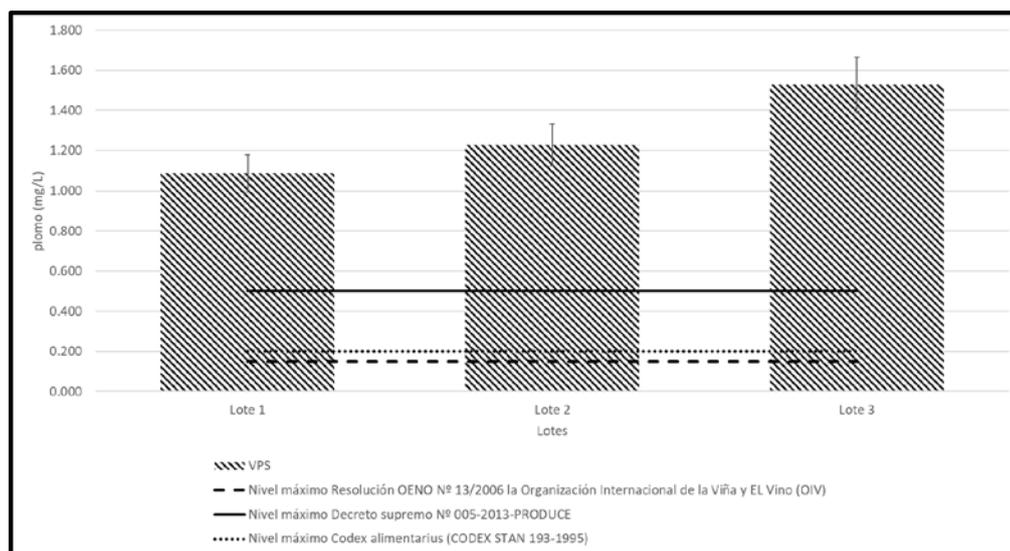


Figura N° 33. Niveles detectados de Pb(II) para 3 lotes de una muestra de VPS, donde se muestra los valores máximos establecidos por la OIV, D.S. N 005-2013-PRODUCE y CODEX STAN 193-1995.

La Figura N° 33, muestra los niveles detectados de Pb(II) para 3 lotes de la muestra VPS, donde se muestra los niveles de Pb(II) detectados los cuales se encuentran por encima de los niveles máximos establecidos por la Organización Internacional de la Viña y el Vino, Ministerio de Producción y el *Codex Alimentarius*, la presencia de Pb(II) en la muestra puede deberse a las posibles fuentes de contaminación por ejemplo: el transporte de la uva desde el campo hasta la bodega, las condiciones de cultivo de la uva (pesticidas, herbicidas, etc.), mala limpieza de los contenedores, agua de lavado contaminada, insumos contaminados, entre otras.

En la Tabla N° 18, se muestran los resultados de la determinación voltamperométrica de Pb(II) (n=3).

Tabla N° 18. Niveles detectados de Pb(II) en 3 lotes de 4 muestras de vino tinto.

COD.	Resultados de Pb (II) en mg. L ⁻¹		
	Lote 1 ^(b)	Lote 2 ^(b)	Lote 3
VHA ^(a)	0.856 ± 0.035	1.556 ± 0.142	1.296 ± 0.057
VMT	2.416 ± 0.168	1.543 ± 0.111	0.217 ± 0.02
VPS ^(a)	1.087 ± 0.094	1.229 ± 0.106	1.529 ± 0.134
VSN	0.919 ± 0.089	0.774 ± 0.073	1.408 ± 0.139

Valores expresados: promedio ± desviación estándar, n=3.

Fuente: Elaboración Propia.

Los valores fueron obtenidos de 3 repeticiones. (ANEXO N° 3) Un análisis de varianza de dos factores con varias muestras por grupo evidencia una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre muestras y entre lotes, sin embargo, al realizar un análisis de la diferencia menos significativa (LSD por sus siglas en inglés), (Tabla Anexo N° 7) se observa que los promedios entre las muestras VHA y VPS no muestran diferencias significativas. Un análisis de una media experimental con un valor conocido muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los resultados y los valores establecidos por La Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) mediante la Resolución OENO N° 13/2006, el D.S. N° 005-2013-PRODUCE y CODEX STAN 193-1995.

Los valores establecidos por la OIV (Resolución OENO N° 13/2006): 0,15 mg. L⁻¹ para Pb(II) y 0,01 mg. L⁻¹ para Cd(II). En el Perú se establece mediante Decreto supremo N° 005-2013-PRODUCE, en el artículo 42, inciso b, indica que son bebidas alcohólicas no aptas para el consumo humano, las que contienen metales pesados en límites superiores a: cobre (Cu) 2.0 mg. L⁻¹; Pb(II) 0,5 mg. L⁻¹; arsénico (As) 0,5 mg. L⁻¹ y zinc (Zn) 1,5 mg. L⁻¹, así mismo el *Codex alimentarius* mediante el CODEX STAN 193 – 1995, establece un nivel máximo para Pb de 0.2 mg. Kg⁻¹, considerando la densidad de nuestro vino de 0.991 a 0.993 este es 0.2 mg. L⁻¹.

Una vez que se ha determinado la confiabilidad estadística de los resultados y conociendo los niveles máximos establecidos, se puede decir que las concentraciones de Pb(II) están por encima de los niveles máximos permitidos a excepción del lote 3 de la muestra VMT.

Dada la presencia del Pb (II) en vino (producto terminado) se analizó las posibles fuentes de contaminación, y es así que, se encontró la investigación de Jagner, D., & Westerlund, S. donde analizaron plomo en vino (por espectrometría de absorción atómica en horno de grafito) en dos bodegas australianas, demostraron que la concentración de plomo aumentó significativamente en los procesos que se realizaron en recipientes con tapa abierta, en contenedores y durante el prensado. El jugo y el vino almacenados en concreto o madera encerada también tenían una concentración significativamente mayor de plomo. Además, la clarificación con bentonita o filtración con tierra de diatomeas contribuyó aún más a la concentración final de plomo, encontrándose concentraciones de 30 µg/L (69).

Si se hace un análisis previo al proceso de fabricación del vino, y se analiza la producción de uva, se puede ver que los agricultores usan varios pesticidas, fungicidas y fertilizantes para optimizar sus cosechas, una investigación realizada en el año 2009 en Mendoza, Argentina, determinó la concentración de plomo en fungicidas cúpricos comercializados,

ninguna de las 44 muestras supera el valor límite establecido para la República Argentina, ($63.06 \text{ mg. kg}^{-1}$) (70), sin embargo es un factor que contribuye a la presencia de dicho metal en el vino. Respecto al Cd(II) reportaron concentraciones de encontraron 1.53 mg. kg^{-1} , no existen niveles límites como en el caso del plomo, pero si reportan su presencia (70).

Otro aspecto que debe ser considerado como un factor que incrementa la presencia del plomo en vino, es la calidad del agua, generalmente se priorizan los análisis de pH, conductividad, y análisis microbiológicos, como análisis de rutina, sin embargo un estudio realizado en la provincia de Salamanca, señala que el agua superan las concentraciones máximas admisibles de cadmio (5 mg. L^{-1}), y un 28 % del total de muestras analizadas supera las concentraciones máximas admisibles de plomo (50 mg. L^{-1})(71), lo mismo ocurre con los niveles de plomo en El Salvador, donde los niveles máximo admisibles con de $0,01 \text{ mg. L}^{-1}$ de Pb (II) y se encontraron $0,02 \text{ mg. L}^{-1}$ de Pb (II)(72). La calidad del agua es un factor determinante en la producción de vino.

3.4. Presentación de Niveles detectados de Cd(II)

En la Tabla N° 19, se muestran los resultados de la determinación voltamperométrica de Cd(II) (n=3), en las muestras de vino recolectadas.

Tabla N° 19. Niveles detectados de Cd(II) (II) en 3 lotes de 4 muestras de vino tinto.

COD.	Resultados de Cd (II) en mg. L^{-1}		
	Lote 1	Lote 2	Lote 3
VHA	N.D.	N.D.	N.D.
VMT	N.D.	N.D.	N.D.
VPS	N.D.	N.D.	N.D.
VSN	N.D.	N.D.	N.D.

N.D.: No detectable

Fuente: Elaboración Propia.

La concentración de Cd (II) en las muestras está en concentraciones no detectables por la técnica utilizada, sin embargo, el valor máximo establecido por la OIV es de $0,01 \text{ mg. L}^{-1}$ y el límite de detección y cuantificación son de $0.012 \mu\text{g. L}^{-1}$ y $0.039 \mu\text{g. L}^{-1}$, respectivamente, se puede decir que no se encontró contaminación detectable de Cd (II) en nuestras muestras.

Una investigación orientada a la búsqueda de aluminio, plomo, cadmio y níquel en rábano (*Raphanus sativus* L.), brócoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) y calabacín (*Cucurbita pepo*

L. var. *italica*), demostraron que, en cuanto al contenido de plomo, cadmio y níquel los vegetales se encuentran en una concentración menor al detectable por el espectrofotómetro de absorción atómica.(73).

En el año 2007, se realizó un trabajo de investigación cuyo objetivo fue el cuantificar la cantidad de cadmio, plomo y cobalto presente en recipientes de alfarería, en México. Determinaron que, el material (arcilla y esmalte) estaba contaminada con Cadmio y que además existían lixiviados de este metal en las salas cuyo pH era ácido, un ejemplo: salsa de tomate. Conforme se reutilizaba el material, mayor era la contaminación del producto (74).

Otro estudio señala que en muestras de pulpas de frutilla y tomate existen concentraciones bajas de plomo, que no ponen en riesgo a sus consumidores según los niveles máximos permitidos del Codex y la UE. En cambio, el cadmio, presenta niveles que sobrepasan a los límites permisibles por el CODEX y la UE, de 0.05 mg. Kg^{-1} y 0.02 mg. Kg^{-1} respetivamente, los valores encontrados en frutilla de $0.0267 \pm 0.0208 \text{ mg. Kg}^{-1}$ y en tomate de $0.0349 \pm 0.0155 \text{ mg. Kg}^{-1}$; sobrepasan los niveles permitidos. Poniendo en riesgo la salud de los consumidores y también de sus productores (75).

Esto nos lleva a deducir, que la fruta puede o no estar contaminada con cadmio de forma natural, pero muchas veces los materiales empleados durante el proceso de fabricación pueden contaminar de forma indirecta el producto final, en nuestra investigación, la concentración de Cd(II) fue menor al límite detectable de nuestro equipo.

CONCLUSIONES

- ✓ El método de digestión empleado fue el de Digestión UV (fotólisis), por ser la más adecuada para muestras líquidas, los parámetros de digestión fotolítica son: 45 minutos usando 200 μL de muestra, 20 μL de H_2O_2 y 100 μL de HNO_3 .
- ✓ Se validó una técnica voltamperométrica para la identificación y cuantificación de Cd(II) en vino tinto cuyo coeficiente de correlación fue de 0.9992, buena precisión y exactitud y con límites de detección y cuantificación de 0.012 μg de Pb(II) x L^{-1} de vino. 0.039 μg de Pb(II) x L^{-1} de vino, respectivamente.
- ✓ Se validó una técnica voltamperométrica para la identificación y cuantificación de Pb(II) en vino tinto cuyo coeficiente de correlación fue de 0.999, mostró buena precisión y exactitud y con límites de detección y cuantificación de 0.22 μg de (II) x L^{-1} de vino y 0.75 μg de Cd(II) x L^{-1} de vino, respectivamente.
- ✓ Se evaluó los niveles de Cd(II) en muestras de vino, se concluye que se encuentra en valores no detectables menores al límite de detección de 0.012 μg . L^{-1} , por debajo de los niveles máximos establecidos por la OIV y PRODUCE.
- ✓ Se evaluó los niveles de Pb(II) en muestras de vino ($0.774 \pm 0.073 \text{ mg. L}^{-1}$ - $2.416 \pm 0.168 \text{ mg. L}^{-1}$) siendo estos superiores a lo establecido por la OIV, PRODUCE y el *Codex Alimentarius*, a excepción del lote 3 de VMT ($0.217 \pm 0.02 \text{ mg. L}^{-1}$) que no supera lo establecido por PRODUCE y el *Codex Alimentarius*, sin embargo, supera lo establecido por la OIV.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Díaz. A. Fermosel L. La Vitivinicultura hace Escuela -La Cultura de la Vid y el Vino. Hist la Vid y el Vino [Internet]. 2015;40. Available from: http://www.fondovitivinicola.com.ar/upload_file/266e319c3a57b00b940e76dfc961f2e2.pdf
2. Rubio C, Gutiérrez a. , Martín Izquierdo R., Revert C, Lozano G, Hardisson a. El Plomo como Contaminante Alimentario. Toxicol. 2004;21:72–80.
3. Elika G. Cadmio. 2014;1–6. Available from: http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento146/25Cadmio_act.pdf
4. Tenorio MD. El Vino y su Análisis. Univ Comtuplense Madrid [Internet]. 2014;15–7. Available from: [http://eprints.ucm.es/29446/7/PIMCD Nº 243. Anexo 1. E-Book-el Vino y su Análisis.pdf](http://eprints.ucm.es/29446/7/PIMCD_Nº_243_Anexo_1_E-Book-el_Vino_y_su_Análisis.pdf)
5. Quispe JMJ. Determinacion de los Niveles de Plomo (II) en Leche de Vacuno por Voltamperometría. Universidad Católica de Santa María; 2011.
6. Barnett JA. The Taxonomy of the Genus Saccharomyces Meyen ex Reess : a Short Review for Non-taxonomists. 1992;8(1 992):1–23.
7. Nacional U, San MDE, Nutrición EAPDE, Hipolipidémico E, Cáscara Dela, Inducida H. Pulverizada de Vitis Vinifera Variedad Pinot Noir (Uva Borgoña) En Ratas. 2015;
8. Vargas Herrera DC, Almanza Merchán PJ, Camacho M. Comportamiento Fenológico de la Vid (vitis vinífera l.) cv Cabernet Sauvignon en Sutamarchán–Boyacá. Cult Científica. 2013;11(11):8–18.
9. Merchán PJA. Determinación del Crecimiento y Desarrollo del Fruto de Vid (Vitis vinifera L .) bajo Condiciones de Clima Frío Tropical [Internet]. Universidad Nacional de Colombia. Universidad Nacional de Colombia; 2011. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/259649640%0ADeterminación>
10. En G, Industria LA, Francisco DEB, Casado C, En G, Industria LA, et al. Parte 1 Procesos de Fabricación de Bebidas Alcohólicas. :1–283.
11. Herrera, Pilotzi H. Introducción al Mundo del Vino. 2007;2011. Available from: <http://vinitodo.com/>
12. Ward LA. AD. Enciclopedia de SALud Y Seguridad en el Trabajo: Industria de las bebidas. Enciclopedia Salud Y Seguridad En El Trabajo. 2001;65.13:65.1-65.16. Available from: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosO>

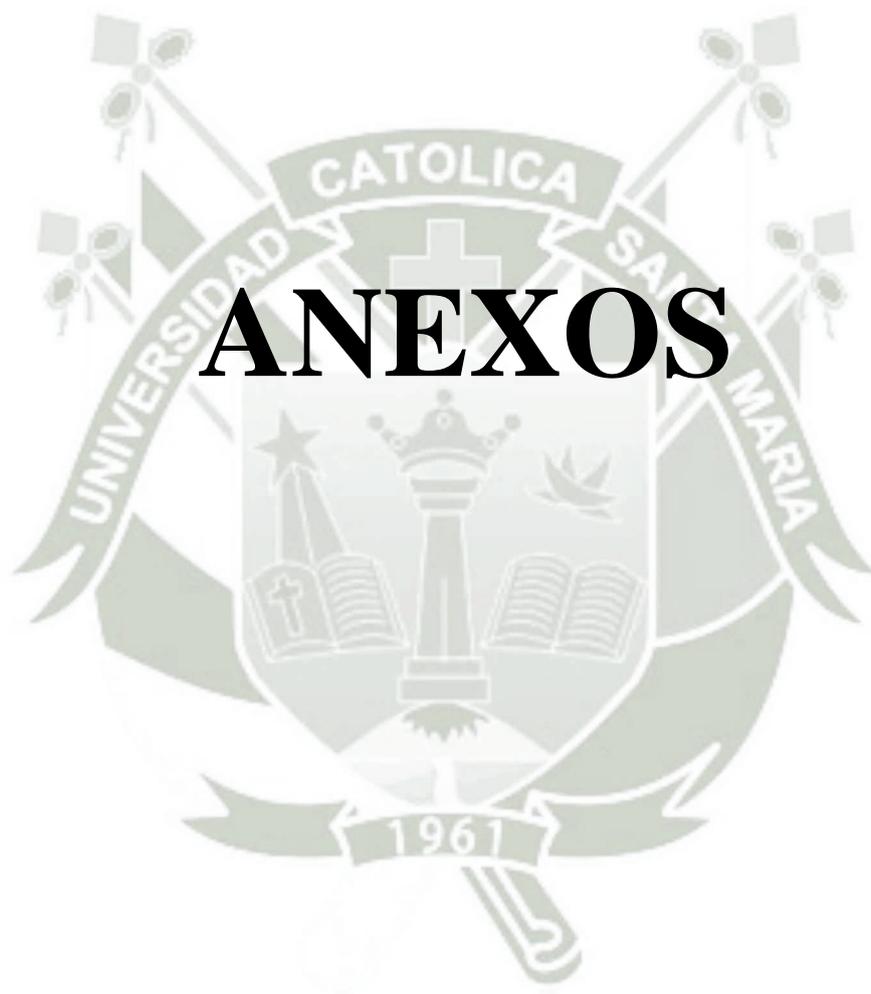
- online/EnciclopediaOIT/tomo3/65.pdf
13. Sánchez M. Análisis de la Estructura de Preferencias y de las Actitudes Hacia los Vinos Tintos con “ Denominación de Origen.” Esic-Editorial; 1997;
 14. Aquino MA de la C, A. R, Martínez-Peniche;, Chávaro-Ortiz AEB-RM del S. Caracterización Física y Química de Vinos Tintos Producidos en Querétaro Physical. Rev Fitotec Mex. 2012;35(Especial 5):61–7.
 15. This P, Lacombe T, Thomas MR. Historical Origins and Genetic Diversity of Wine Grapes. Vol. 22, Trends in Genetics. 2006. p. 511–9.
 16. Mesas JM, Alegre MT. El Papel de los Microorganismos en la Elaboración del Vino. Cienc Tecnol Aliment [Internet]. 1999;2:174–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/11358129909487599>
 17. Bravo F. Del Vino y otros Temas. Ed Eypasa, Madrid. 1995;
 18. Sánchez ZLY. Sistema de Información para el Costeo por Procesos de las Industrias Vitivinícolas. Pontificia Universidad Católica del Perú Facultad de Ciencias e Ingeniería. Pontificia Universidad Católica del Perú; 2008.
 19. Wyss GS, Fuchs FJ. Producción de uva y Fabricación de vino Control de la Calidad y Seguridad en las Cadenas de Producción Orgánica. Org HACCP. :2–5.
 20. Delmas G-V. Elaboración en clase: Procedimiento y Valor Didáctico de una Experiencia Singular [Internet]. I.E.S. Esteban M. de Villegas. Nájera (La Rioja); 2010.
Available from: http://www.enciga.org/files/boletins/61/elaborar_vino_en_clase.pdf
 21. Waterhouse A, Sacks G JD. Understanding Wine Chemistry: John Wiley & Sons. 2016;
 22. Nykänen L SH. Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages. Springer Sci Bus Media. 1983;
 23. Roullier-Gall C, Witting M, Gougeon RD S-KP. High Precision mass Measurements for Wine Metabolomics. Front Chem. 2014;2:102.
 24. Panreac. Productos Derivados de la Uva, Aguardientes y Sidras. 1995;196.
 25. Joslyn MA, Braverman JBS. The Chemistry and Technology of the Pretreatment and Preservation of Fruit and Vegetable Products with Sulfur Dioxide and Sulfites. In: Advances in Food Research. Elsevier; 1954. p. 97–160.
 26. Mckinnon AJ, Cattrall RW, Scollary GR. Aluminum in Wine-its Measurement and Identification of Major Sources. Am J Enol Vitic. Am Soc Enol Viticulture; 1992;43(2):166–70.

27. Médina B, Guimberteau G, Sudraud P. Dosage du Plomb dans les Vins, une Cause d'enrichissement: les Capsules de Surbouchage. *OENO One*. 1977;11(2):183–93.
28. Falcone F. Migration of Lead into Alcoholic Beverages During Storage in Lead Crystal Decanters. *J Food Prot. International Association for Food Protection*; 1991;54(5):378–80.
29. Kaufmann A. Lead in Wine. *Food Addit Contam. Taylor & Francis*; 1998;15(4):437–45.
30. Stockley CS, Smith LH, Guerin P, Brückbauer H, Johnstone RS, Tiller KG, et al. The Relationship Between Vineyard Soil Lead Concentration and the Concentration of Lead in Grape Berries. *Aust J Grape Wine Res. Wiley Online Library*; 1997;3(3):1–8.
31. Gulson BL, Lee TH, Mizon KJ, Korsch MJ, Eschnauer HR. The Application of Lead Isotope Ratios to the Determine the Contribution of the Tin-Lead to the Lead Content of Wine. *Am J Enol Vitic. Am Soc Enol Viticulture*; 1992;43(2):180–90.
32. Hellmuth KH, Fischer E, Rapp A. Uber das Verhalten von Spurenelementen und Radionukliden in Traubenmost bei der Garung und Beim Weinausbau. *Dtsch Leb*. 1985;
33. Cacho J, Castells JE, Esteban A, Laguna B, Sagristá N. Iron, Copper, and Manganese Influence on Wine Oxidation. *Am J Enol Vitic. Am Soc Enol Viticulture*; 1995;46(3):380–4.
34. Amerine MA, Roessler EB. *Wines. Their Sensory Evaluation*. Freeman San Francisco; 1976.
35. Nava-Ruíz C, Méndez-Armenta M. Efectos Neurotóxicos de Metales Pesados (Cadmio, Plomo, Arsénico y Talio). *Arch Neurocién*. 2011;16(3):140–7.
36. Ferrer A. Intoxicación por metales. In: *Anales del Sistema Sanitario de Navarra. SciELO Espana*; 2003. p. 141–53.
37. 019-98-MTC. DSN. Dispone Eliminar del Mercado la Oferta de Gasolina 95 RON con Plomo y Eeducir el Límite Máximo de Contenido de Plomo en la Gasolina 84 RON. (14/07/98). 2013;1. Available from: <http://sumo.dlr.de/>
38. Infantas MMV. Intoxicación por Plomo. *Soc Peru Med Interna [Internet]*. 2005;18(1):27. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rspm/v18n1/a05v18n1>
39. Sánchez Isc. “Determinación de los Niveles de Plomo en Miel de Abeja por Voltamperometría y su Aplicación como Bioindicador de Contaminación Ambiental, Arequipa-2012.” Universidad Católica de Santa María; 2014.

40. Services H. Toxicological Profile for Lead. Agency Toxic Subst Dis Regist. 2007;(August).
41. International Organisation of Vine and Wine. Compendium of International Methods of Wine and must Analysis. International Organisation of Vine and Wine, 2011. 2011. 488 p.
42. CODEX. Norma General Del Codex Stan 193-1995, Para Los Contaminantes Y Las Toxinas Presentes En Los Alimentos Y Piensos. Codex Stan 193_1995. 1999;1-48.
43. Perú C. Decreto Supremo que Aprueba Modificaciones al Reglamento de la Ley N ° 29632 - Ley para Erradicar la Elaboración y Comercialización de Bebidas Alcohólicas Informales , Adulteradas o No Aptas para el Consumo Humano , aprobado por el Decreto Supremo N ° 005. 2015;554450-1.
44. GC B. International Register of Potentially Toxic Chemicals (IRPTC): Part A. United Nations Environment Programme. Environ Conserv. 1982;1987;10:81.
45. Beryllium. Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans;
46. Marzec* Z S-ZM. Exposure to Cadmium, Lead and Mercury in the Adult Population from Eastern Poland. Food Addit Contam. 2004;21:963-970.
47. Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L et al. Environmental Exposure to Cadmium and Risk of Cancer: a Prospective Population-Based Study. Lancet Oncol. 2006;7:119-126.
48. UDo H. Services H. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Asbestos Update. Agency Toxic Subst Dis Regist. 1999;
49. EFS A. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the European Commission on cadmium in food. EFSA J. 2009;980:1-139.
50. Toxicological profile for cadmium, [Internet]. Available from: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp.asp?id=48&tid=15>.
51. Kobayashi E, Suwazono Y, Dochi M, Honda R KT. Influence of Consumption of Cadmium-Polluted rice or Jinzu River water on Occurrence of Renal Tubular Dysfunction and/or Itai-itai disease. Biol Trace Elem Res. 2009;127:257-268.
52. Estévez Hernández OL. Furoiltiureas: Naturaleza de sus complejos con CdCl₂ Y HgCl₂ y su Utilización en Sensores Electroquímicos [Internet]. Universidad de Cádiz; 2007. Available from: <http://minerva.uca.es/publicaciones/asp/docs/tesis/estevez.pdf>
53. Lakshmi VM. Control de calidad del vino y de bebidas a base de vino.

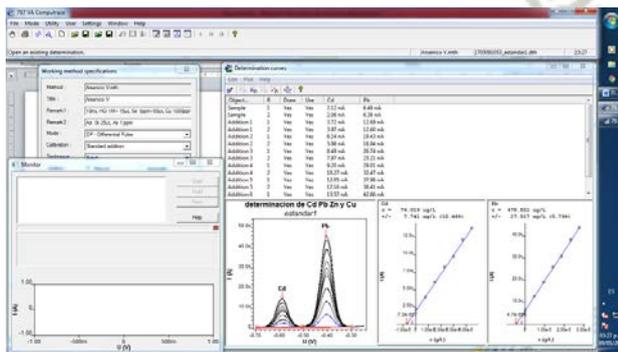
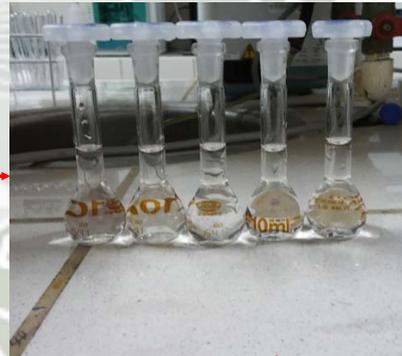
54. Choquenaira Quispe C, Gonzales Condori ER. “Determinación del Efecto de Allium Sativum l. Ajo sobre los Niveles de Plomo en Sangre y [Órganos de Animales con Toxicidad Aguda Experimental. Arequipa 2012.” Methrom [Internet]. 2013;160. Available from: <http://tesis.ucsm.edu.pe/repositorio/bitstream/handle/UCSM/3845/65.1461.FB.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
55. Henze G. Introduction to Polarography and Voltammetry. Metrohm Limited; 2004. Pág. 508-520.
56. Harvey D. Modern Analytical Chemistry. Vol. 381. McGraw-Hill New York; 2000.
57. Ortíz R, Martínez Y. Prácticas de Electroanalítica. Univ los Andes Mérida. 2003;
58. Skoog DA, West DM HF. Fundamentos de Química Analítica. In: 9 na. ed. 2015.
59. GD C. Química Analítica: McGraw-Hill Interamericana de España S.L. 2009;
60. Metrohm. Voltammetry, An Introduction in Theory. Switzerland; Available from: <http://www.metrohm.com.cn/UploadFiles/SupportFile/VA Theory normal.pdf>
61. D. H. Modern Analytical Chemistry. McGraw-Hill New York. 2000;
62. JA. D. Analytical Chemistry Handbook. In: McGraw-Hill. 1995.
63. das Graças Andrade Korn M, da Boa Morte ES, dos Santos DCMB, Castro JT, Barbosa JTP, Teixeira AP, et al. Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods—A Review. Appl Spectrosc Rev. 2008;43(2):67–92.
64. 705 UV Digester (220 V, 60 Hz) [Internet]. [cited 2018 May 1]. Available from: <https://www.metrohm.com/en/products/27050016>
65. Metrohm. Accessories for 2.705.0016. 2018;4–7. Available from: <https://www.metrohm.com/en/products/27050016?print=true>
66. Carvajal MAV. Validación de un Método Voltamperométrico Para la Determinación de Plomo en Muestras de Orina [Internet]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua; 2002. Available from: <http://riul.unanleon.edu.ni:8080/jspui/bitstream/123456789/2679/1/197743.pdf>
67. Moreno AV. Validación de Métodos Analíticos [Internet]. Instituto Politecnico Nacional; 2008. Available from: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/14634/aydedvazquezmoreno.pdf?sequence=1>
68. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized Guidelines for single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). Pure Appl Chem. De Gruyter; 2002;74(5):835–55.
69. Jagner D, Westerlund S. Determination of Lead, Copper, and Cadmium in Wine and

- Beer by Potentiometric Stripping Analysis. *Anal Chim Acta*. Elsevier; 1980;117:159–64.
70. Martí L, Filippini MF, Bermejillo A, Troilo S, Salcedo C, Valdés A. Monitoreo de cadmio y plomo en los principales Fungicidas Cúpricos Comercializados en Mendoza, Argentina. *Rev la Fac Ciencias Agrar*. 2009;41(2):109–16.
71. Luis A, Hernández B, Gutiérrez DA, Blas OJ De, Santiago M, Manzano BDM. Estudio de los Niveles de Plomo, Cadmio, Zinc y Arsénico, en Aguas de la Provincia de Salamanca *. *Rev Esp Salud Publica*. 1998;72:53–65.
72. Chevez Cia. Cuantificación de Plomo, Mercurio y Cadmio en agua de Consumo Humano de cinco Comunidades de El Salvador por Espectrofotometría de Absorción Atómica. Universidad de El Salvador; 2010.
73. Núñez A, Martínez S, Moreno S, Cárdenas ML, García G, Hernández JL, et al. Determinación de Metales Pesados en Rábano (*Raphanus sativus* L.), Brócoli (*Brassica Oleracea* L. var. *Italica*) y Calabacín (*Cucurbita Pepo* L. var. *Italica*). *Lab Química Analítica*. 2008;
74. Quintanar S. Transferencia de Cadmio, Plomo y Cobalto en Alimentos Almacenados en Vasijas de Barro Elaboradas en Cuatro Municipios del Estado de Hidalgo. *Univ Hidalgo-Pachuca-Mexico*. 2010;6–7.
75. Borja SSE. Determinación de la Presencia de Plomo y Cadmio en Frutilla (*Fragaria ananassa*) y Tomate (*Solanum lycopersicum*) en el Quinche [Internet]. Universidad Central del Ecuador; 2016. Available from: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/10068/1/T-UCE-0004-81.pdf>

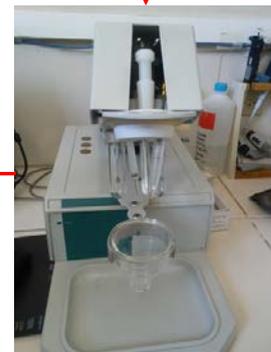


ANEXOS

Anexo N° 1 Preparación y Medición de las Muestras

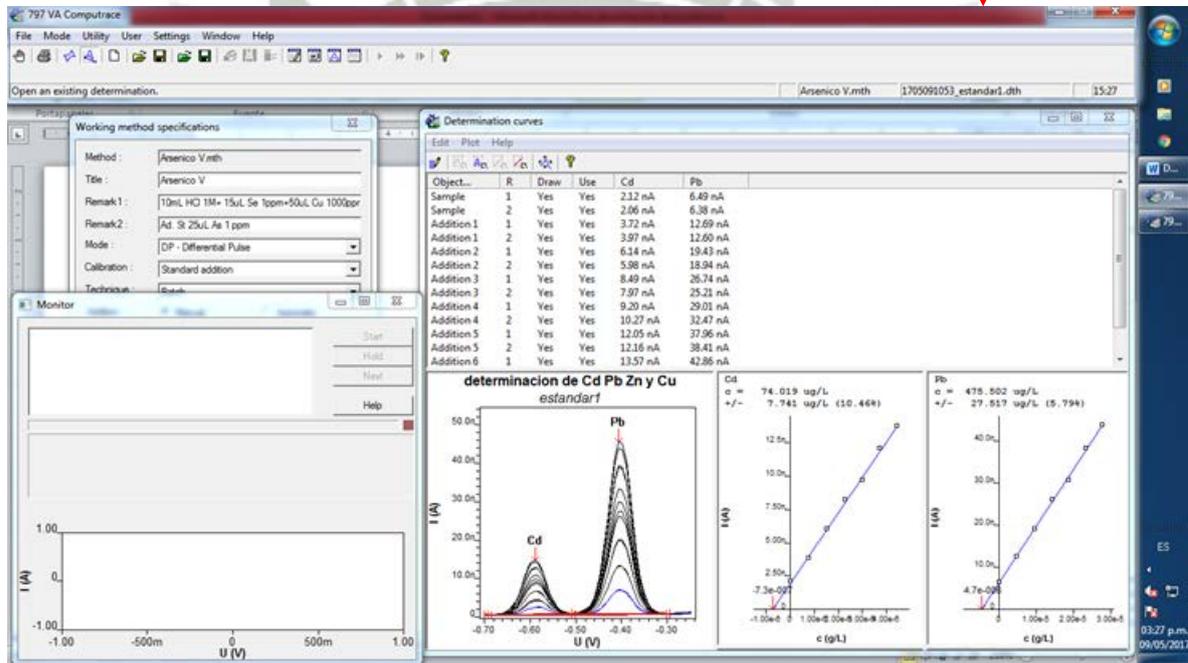


VOLTAMPEROGRAMA



MEDICION
VOLTAMPEROMETRICA

Preparación del estándar.



VOLTAMPEROGRAMA

Anexo N° 1
Resultados

Tabla Anexo N° 1: Resultados de Pb(II) por lotes:

Pb(II) µg. L⁻¹			Lote 1			
Marcas	Repetición 1	D.S.	Repetición 2	D.S.	Repetición 3	D.S.
VHA	106.51	4.5	106.341	2.856	110.552	2.365
VMT	140.742	5.678	136.381	6.846	139.861	4.596
VPS	106.609	10.166	101.828	7.473	100.985	12.609
VSN	91.959	2.085	92.709	5.751	86.504	2.933

Pb(II) µg. L⁻¹			Lote 2			
Marcas	Repetición 1	D.S.	Repetición 2	D.S.	Repetición 3	D.S.
VHA	116.734	3.052	123.371	5.923	125.308	5.506
VMT	121.611	6.59	118.177	4.087	124.821	8.652
VPS	109.647	3.081	105.363	5.204	102.922	4.14
VSN	86.865	4.514	91.301	9.394	84.28	9.427

Pb(II) µg. L⁻¹			Lote 3			
Marcas	Repetición 1	D.S.	Repetición 2	D.S.	Repetición 3	D.S.
VHA	115.775	3.062	114.578	2.062	119.407	4.126
VMT	93.326	7.714	93.881	3.292	97.843	4.546
VPS	114.983	3.862	111.886	5.956	109.085	6.777
VSN	101.49	7.242	101.448	3.984	97.573	5.374

Pb(II) µg. L⁻¹			Blanco			
Marcas	Repetición 1	D.S.	Repetición 2	D.S.	Repetición 3	D.S.
VHA	88.575	2.578	89.568	5.849	93.881	7.714
VMT	88.575	2.578	89.568	5.849	93.881	7.714
VPS	86.95	6.819	78.497	2.286	78.746	2.007
VSN	72.488	7.169	76.385	5.487	67.136	1.791

Anexo N° 3 Análisis Estadístico de los Resultados

Determinación de la Precisión:

Para evaluar la dispersión de los resultados de medidas repetidas se hizo uso del estadístico de desviación estándar relativa o coeficiente de variación.

$$CV = \frac{S}{\bar{x}} 100$$

Tabla Anexo N° 2

Pb (mg. L ⁻¹) Marcas	Lote 1			Lote 2			Lote 3		
	\bar{x}	s	CV (%)	\bar{x}	s	CV (%)	\bar{x}	s	CV (%)
VHA	0,856	0,035	4,1	1,556	0,142	9,1	1,296	0,057	4,4
VMT	2,416	0,168	6,9	1,543	0,111	7,2	0,217	0,020	9,1
VPS	1,087	0,094	8,7	1,229	0,106	8,6	1,529	0,134	8,8
VSN	0,919	0,089	9,7	0,774	0,073	9,5	1,408	0,139	9,9

FUENTE: Elaboración propia. (n = 3)

Se establece que un CV (%) hasta 10 % se considera una precisión buena, de 11 % a 20 % se considera una precisión aceptable y un CV (%) mayor al 20 % se considera una precisión No confiable. Las medidas obtenidas de un n=3, se encuentran en el rango de precisión aceptable.

Comparación de una media experimental con un valor conocido

Es necesario determinar que las medias obtenidas difieren significativamente de los valores de Nivel máximo para Pb (II) establecido como valor conocido.

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu) \times \sqrt{n}}{s}$$

El dato obtenido es comparado con el valor t de Tabla N°s para un G.L.: n-1.

Para el valor máximo de Pb (II) permitido por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV): 0,15 mg. L⁻¹, los resultados de la comparación son:

Tabla Anexo N° 3

Marcas	Valores t calculados			Valor t de Tabla N°s
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	
VHA	34,85	17,19	34,66	4.303
VMT	23,38	21,79	5,88	
VPS	17,22	17,68	17,79	
VSN	14,91	14,73	15,67	

FUENTE: Elaboración propia.

Los valores calculados de t al ser comparados con el valor t de Tablas, muestra una diferencia significativa (95 % de confianza), entre las medias y el valor conocido.

De igual forma se realizó la evaluación para el valor máximo de Pb (II) permitido mediante Decreto supremo N° 005-2013-PRODUCE (Perú): 0,5 mg. L⁻¹, los resultados de la comparación son:

Tabla Anexo N° 4

Marcas	Valores t calculados			Valor t de Tabla N°s
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	
VHA	17,58	12,92	24,07	4.303
VMT	19,77	16,32	-24,79	
VPS	10,79	11,95	13,27	
VSN	8,13	6,47	11,31	

FUENTE: Elaboración propia.

Los valores calculados de t al ser comparados con el valor t de Tablas, muestra una diferencia significativa (95 % de confianza), entre las medias y el valor conocido.

Análisis ANOVA de dos factores con varias muestras por grupo

Es necesario establecer si existe diferencias estadísticamente significativas entre marcas, lotes y la interacción Marca - Lote; para lograr ello se hizo uso del paquete estadístico STATGRAPHICS CENTURION XVI, los resultados se muestran a continuación:

Pruebas de Múltiple Rangos para Pb por MUESTRAS

Tabla Anexo N° 5: Análisis de Varianza para Pb - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:MUESTRAS	0,605697	3	0,201899	17,78	0,0000
B:LOTES	0,285653	2	0,142827	12,58	0,0002
INTERACCIONES					
AB	8,7896	6	1,46493	129,02	0,0000
RESIDUOS	0,272494	24	0,0113539		
TOTAL (CORREGIDO)	9,95345	35			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

El StatAdvisor

La Tabla Anexo N° 5 ANOVA descompone la variabilidad de Pb en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 3 valores-P son menores que 0,05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre Pb con un 95 % de nivel de confianza.

Tabla Anexo N°6: de Medias por Mínimos Cuadrados para Pb con intervalos de confianza del 95 %

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Error Est.</i>	<i>Límite Inferior</i>	<i>Límite Superior</i>
MEDIA GLOBAL	36	1,23598			
MUESTRAS					
1 VHA	9	1,23613	0,0355183	1,16283	1,30944
2 VMT	9	1,39206	0,0355183	1,31875	1,46537
3 VPS	9	1,28183	0,0355183	1,20852	1,35513
4 VSN	9	1,0339	0,0355183	0,960594	1,10721
LOTES					
LOTE 1	12	1,31971	0,0307597	1,25623	1,3832
LOTE 2	12	1,27563	0,0307597	1,21214	1,33911
LOTE 3	12	1,1126	0,0307597	1,04912	1,17609
MUESTRAS por LOTES					
1 VHA,LOTE 1	3	0,856317	0,0615194	0,729347	0,983287
1 VHA,LOTE 2	3	1,55648	0,0615194	1,42951	1,68345
1 VHA,LOTE 3	3	1,2956	0,0615194	1,16863	1,42257
2 VMT,LOTE 1	3	2,416	0,0615194	2,28903	2,54297
2 VMT,LOTE 2	3	1,54308	0,0615194	1,41611	1,67005
2 VMT,LOTE 3	3	0,2171	0,0615194	0,0901299	0,34407
3 VPS,LOTE 1	3	1,08715	0,0615194	0,96018	1,21412
3 VPS,LOTE 2	3	1,22898	0,0615194	1,10201	1,35595
3 VPS,LOTE 3	3	1,52935	0,0615194	1,40238	1,65632
4 VSN,LOTE 1	3	0,919383	0,0615194	0,792413	1,04635
4 VSN,LOTE 2	3	0,77395	0,0615194	0,64698	0,90092
4 VSN,LOTE 3	3	1,40837	0,0615194	1,2814	1,53534

El StatAdvisor

Esta Tabla Anexo N° 6 muestra la media de Pb para cada uno de los niveles de los factores. También muestra los errores estándar de cada media, los cuales son una medida de la variabilidad en su muestreo. Las dos columnas de la extrema derecha muestran intervalos de confianza del 95 % para cada una de las medias. Pueden desplegarse estas medias e intervalos seleccionado Gráfica de Medias de la lista de Opciones Gráficas.

Pruebas de Múltiple Rangos para Pb por MUESTRAS

Tabla Anexo N° 7: Método: 95,0 porcentaje LSD

MUESTRAS	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
4 VSN	9	1,0339	0,0355183	X
1 VHA	9	1,23613	0,0355183	X
3 VPS	9	1,28183	0,0355183	X
2 VMT	9	1,39206	0,0355183	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 VHA - 2 VMT	*	-0,155928	0,103671
1 VHA - 3 VPS		-0,0456944	0,103671
1 VHA - 4 VSN	*	0,202233	0,103671
2 VMT - 3 VPS	*	0,110233	0,103671
2 VMT - 4 VSN	*	0,358161	0,103671
3 VPS - 4 VSN	*	0,247928	0,103671

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta Tabla Anexo N° 7 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 5 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95 % de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 3 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5 % al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Pruebas de Múltiple Rangos para Pb por LOTES

Tabla Anexo N° 8: Método: 95,0 porcentaje LSD

<i>LOTES</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
LOTE 3	12	1,1126	0,0307597	X
LOTE 2	12	1,27563	0,0307597	X
LOTE 1	12	1,31971	0,0307597	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
LOTE 1 - LOTE 2		0,0440875	0,0897814
LOTE 1 - LOTE 3	*	0,207108	0,0897814
LOTE 2 - LOTE 3	*	0,163021	0,0897814

* indica una diferencia significativa.

El StatAdvisor

Esta Tabla Anexo N° 8 aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95 % de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5 % al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.