

## DESARROLLO DE TIRA REACTIVA PARA LA DETECCIÓN *IN SITU* DE METALES PESADOS EN LECHE

Schlapbach Luisina<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Tesinista/becaria del Laboratorio de Sensores y Biosensores (LSB) - Facultad de Bioquímica y Ciencias  
Biológicas (FBCB) - UN

**Área:** Ciencias exactas

**Sub-Área:** Química

**Grupo:** Y

**Palabras clave:** dispositivos microfluídicos, 8-Hydroxiquinolina, Rodizonato.

### INTRODUCCIÓN

Los metales pesados (MPs) son elementos contaminantes, no biodegradables y con densidades superiores a  $5 \text{ g cm}^{-3}$  (Feng y col., 2013). Dentro de este grupo se encuentra el plomo (Pb), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), manganeso (Mn), níquel (Ni) y zinc (Zn), entre otros (Nordberg y col., 2007). La contaminación del ambiente con metales pesados repercute en toda la cadena trófica, siendo el hombre el consumidor final de la misma. Se ha comprobado que la leche de bovinos que pastorean e ingieren agua a las orillas de lagos y ríos contaminados, contienen Pb, Cd y Zn. La concentración de estos metales, ingeridos por estas vacas, aumenta la concentración de dichos elementos en la leche, pudiendo ser excretados en la misma (OMS, 2005). La fluorescencia es un método de detección que ofrece alta sensibilidad para detectar metales pesados a muy bajos niveles. Un fluoróforo muy utilizado es la 8-hidroxiquinolona (8-HQ) que es capaz de reaccionar con varios metales divalentes (Willie y col., 1998). Otro es el Piroxicam (Px), un agente antiinflamatorio utilizado con fines analíticos como ionóforo por tener buena selectividad con el Pb (Sadeghi y col., 2002). Asimismo, los métodos tradicionales para la detección de metales son caros y generalmente no son adecuados para las aplicaciones *in situ*. Como alternativa, una propuesta han sido las tiras reactivas basadas en colorantes (Lan y col., 2010). Los dispositivos microfluídicos basados en papel, usan las propiedades de flujo de los canales del mismo, y no requieren de equipamiento externo o fuentes poderosas, por lo que se la considera una técnica prometedora (Wang y col., 2008). Un colorante utilizado en la detección de Pb es el rodizonato (Rz), ya que tiene la propiedad de intensificar y cambiar de color en presencia del mismo (Rodríguez Medrano, 2004).

### OBJETIVOS

Desarrollar tiras reactivas, con alta sensibilidad y especificidad, para detectar metales pesados en leche obtenida del ordeño vacuno.

### METODOLOGÍA

#### Instrumentación y reactivos

Instrumentos y soportes utilizados fueron: espectrómetro de luminiscencia Perkin-

Proyecto: CAI+D 2011 código 501 201101 00042 Res. 245/13 y Beca de Innovación tecnológica de la Fundación del Nuevo Banco Santa Fe (2016-2017).

Director del proyecto: Silvia Fabiano.

Directora de la tesinista/becaria: Kergaravat, Silvina Vanesa.

Co-Directora de la tesinista/becaria: Hernández, Silvia Raquel.

Elmer LS 55 (Llantrisan, United Kindom), papel Filtro N° 40 (Whatman), Vortex - GENE 2 Models G560 (Scientific Industries, Inc.) y centrífuga (Cavour VT3216). Los reactivos utilizados fueron: 8-HQ (Merck), Px (Merck), Rz (Merck), acetato de cadmio (Cicarelli), sulfato de zinc heptahidratado (Mallinckrodt), nitrato de plomo (Merck) y nitrato de estroncio (Sr) (Cicarelli). Como detergentes y polímeros se evaluaron: Tween-20 (Sigma-Aldrich), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), Poly(diallylmethylammoniumchloride) (Poly) (Aldrich) y Perfluorosulfonic acid-PTFE copolymer (Nafion) (Alfa Aesar) cocoaminopropil betaína (Aldrich), cloruro de benzalconio (Aldrich), dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma-Aldrich), N-lauroylsuccidine (LSS) (Sigma-Aldrich). Como soluciones reguladoras de trabajo se prepararon: Bicarbonato de sodio/carbonato de sodio (pH 10,0) (Cicarelli) y ácido tartárico/tartrato (pH 2,8) (Cicarelli). Los solventes, ácidos e hidróxidos utilizados fueron: ácido clorhídrico (Merck) ácido nítrico (Merck), Hidróxido de Sodio (Cicarelli), Dioxano (Merck), Metanol (Merck) y Etanol (Merck). Las muestras evaluadas fueron: leche bovina cruda de un establecimiento tambero de Esperanza, agua de pozo de San Carlos Centro y agua de pozo de Santo Tomé.

#### **Detección fluorescente de metales pesados utilizando Px como fluoróforo**

En tubos de ensayo se prepararon testigos independientes de Zn, Cd y Pb a 0 y 100 ppb, con el fluoróforo Px a  $5 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, en una matriz de agua milli-Q con 1% de dioxano. Estas soluciones se prepararon por quintuplicado. A cada testigo y blanco se le realizó un barrido de emisión, en el espectrofluorímetro, a 320 nm de longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ), 10 nm de slits de excitación y emisión y filtro abierto.

#### **Detección fluorescente de Pb utilizando 8-HQ como fluoróforo**

En tubos de ensayo de 5 ml se prepararon soluciones con 8-HQ a  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>, Tween 20 (Tw) a  $1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, en una matriz de reacción de etanol con SR (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub>) a 0,01 mol L<sup>-1</sup> (8,5:1,5), en las cuales se detectó Pb hasta 25 ppb, realizando lecturas de emisión, en espectrofluorímetro, a 270 nm de longitud de onda de excitación ( $\lambda_{ex}$ ), 10 nm de slits de excitación y emisión y filtro abierto. Con esta metodología se procesaron muestras de agua, realizando una mezcla de reacción de 1 ml de agua de pozo más 4 ml de etanol con SR (8,5:1,5), 8-HQ a  $1 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> y Tw a  $1 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>. A estas soluciones se les realizó lecturas de IF a 270 nm de  $\lambda_{ex}$ , 320 nm de  $\lambda_{em}$ , 10 nm de slits de excitación y emisión y filtro abierto.

#### **Desarrollo de un dispositivo microfluídico para la detección de Pb en leche**

Se confeccionaron dispositivos de papel que consistieron en una tira de papel filtro de 40 mm de largo 5 mm de ancho adherida a un portaobjeto por medio de cinta doblefaz. En un extremo de la tira se colocó una bomba de papel y en el otro se delimitó una zona de siembra de muestra. A 10 mm de esta zona, se sembró una barrera de Nafion (0,25  $\mu$ l del mismo a 0,5 % v/v), una gota de Rz (0,15  $\mu$ l a 0,01 mol L<sup>-1</sup>) y una última gota sobre el Rz de Sr (0,25  $\mu$ l a 0,01 mol L<sup>-1</sup>). Luego de la siembra de cada reactivo se los secó sobre una plancha estufa por 1 minuto y medio.

Para el pretratamiento de la muestra de leche proveniente directamente del ordeño, se colocaron 5 ml de la misma y 5 ml de SR de tartrato/ácido tartárico (pH 2,8), en un tubo de centrífuga. Los mismos se agitaron 90 minutos en un vórtex y se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos. Con pipeta Pasteur se trasvasó la fase líquida a otro tubo y se reconstituyó el volumen faltante (hasta 10 ml) con SR. Del líquido obtenido se tomaron 10  $\mu$ l y se sembraron en el dispositivo de papel para su determinación.

## **RESULTADOS/CONCLUSIONES**

### **Método fluorescente**

En la primera parte, donde se utilizó al Px como fluoróforo, se realizaron barridos de emisión para evaluar el apagamiento de la fluorescencia de dicho fluoróforo por parte de diferentes concentraciones de Cd, Zn y Pb (entre 100 – 1000 ppb), donde se observó un débil apagamiento, lo que evidenció una metodología poco sensible.

En el caso de la 8-HQ como fluoróforo, se llevaron a cabo las siguientes pruebas: A) El estudio espectrofotométrico y espectrofluorimétrico de los complejos metálicos formados por la 8-HQ y los metales Cu, Co, Fe, Pb, Cd, Zn y Ni, donde se eligió al Pb como metal modelo. B) La adición de polímeros o detergentes para mejorar la respuesta fluorescente (se ensayaron Tw, Triton X-100 (Tr), Poly, cloruro de benzalconio, SDS y LSS) donde las mejores respuestas se obtuvieron con Tw y Tr. C) La evaluación de diferentes medios de reacción (agua MilliQ, metanol y etanol) y la adición de hidróxido y SR para alcalinizar el mismo (NaOH a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  y SR pH 10 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ ) a  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ ), donde el complejo Pb-(8-HQ) tuvo una mayor respuesta y menor variabilidad en un medio etanólico con SR  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$  (8,5:1,5). D) La evaluación del rendimiento analítico del método seleccionado [8-HQ a  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , Tw a  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  en medio de reacción de etanol con SR a  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  (8,5:1,5)] para la detección del Pb a 500, 250, 100, 50 y 25 ppb, donde los resultados obtenidos mostraron que, si bien el método fue capaz de detectar Pb hasta 25 ppb, no se observaron diferencias significativas entre dos concentraciones sucesivas de mismo, por lo que no se consideró al método desarrollado semicuantitativo. E) Evaluación de precisión, recuperación y estimación de límites para la validación de dicho método, donde se cumplió con los criterios exigidos por la AOAC (1993). F) La aplicabilidad del método en muestras de aguas de pozo (AP), donde las mismas resultaron negativas para la metodología desarrollada. G) La evaluación del efecto matriz en AP recuperando Pb a 50, 100 y 250 ppb, obteniendo valores de recuperación para todas las concentraciones, inclusive 50 ppb el cual es el valor límite para agua potable establecido por ENRESS. H) La estimación de los límites de decisión ( $\text{CC}\alpha$ ) y la capacidad de detección ( $\text{CC}\beta$ ) del método, donde los resultados obtenidos mostraron que la metodología desarrollada podría detectar Pb a niveles útiles (50 ppb).

### **Método de detección de Pb en papel**

En primer lugar, se intentó transferir el método fluorescente de detección de Pb con 8-HQ a un sistema de detección en papel. Pero los ensayos realizados para tal fin no mostraron resultados favorables ya que no se logró diferenciar a las muestras con Pb respecto de su blanco de reactivo. Como alternativa, se decidió utilizar al Rz como reactivo cromogénico. Las pruebas preliminares fueron llevadas a cabo realizando “ensayos a la gota”. En estos ensayos se seleccionaron: A) Volúmenes de gota a aplicar en el papel, seleccionando 2 y 1  $\mu\text{L}$  (dependiendo del reactivo ya que no todos difunden con igual velocidad y extensión). B) Concentraciones de Rz y Pb de  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  y 20 ppm, respectivamente. C) Adicionar Sr sobre el Rz, con el fin de estabilizar al mismo en el tiempo. D) Adicionar ácido (HCl) para lograr una revelación que permita ver rápidamente diferencias entre las respuestas de los testigos y el blanco. La aplicación de HCl, borró la mancha del blanco y dejó una mancha rosa en el testigo. E) Adicionar un polímero para inmovilizar los reactivos (Rz y Sr) en el papel, por lo que se probó Nafion y Poly por separado, juntos y en diferentes posiciones de la secuencia de siembra. La adición de estos polímeros no permitió ver diferencias entre los testigos y los blancos, aunque se pudo ver que el Nafion repelía al Rz debido a que ambos poseen cargas negativas.

Luego se optimizó el dispositivo microfluídico final en “tira de papel”. Para esto se llevaron a cabo pruebas donde se seleccionó: A) La distancia de siembra de los reactivos de la zona de siembra de muestra, la cual fue 10 mm ya que se pudo ver una mejor reacción del Pb. B) El volumen de corrida del testigo o blanco, siendo el

mismo de 10  $\mu\text{L}$  porque al sembrar un volumen continuo la mancha de la zona de reactivos se borraban rápidamente. C) La adición de polímeros para inmovilizar los reactivos (Rz y Sr) y proporcionar un tiempo suficiente para que ocurran las reacciones esperadas. El polímero seleccionado fue el Nafion, ubicado después de los reactivos y actuando como barrera repeliendo al Rz y retrasando la corrida del testigo (o blanco). A partir de las condiciones seleccionadas se evaluó el límite de detección del método, probando testigos con distintas concentraciones de Pb, el límite obtenido fue 1 ppm. Luego se probó la aplicabilidad de dicho método en muestras de leche (dando todas negativas) a las cuales se les hizo un pretratamiento previo donde se seleccionó la SR de ácido tartárico/tartrato a pH 2,8 entre otros ácidos como parte del procedimiento. Por último se evaluó el efecto matriz de la leche pretratada, así como también, el límite de detección del método y su repetividad en dicha matriz. El método microfluídico fue capaz de detectar con eficiencia 2 ppm de Pb en la leche cruda.

### **Conclusión**

Por un lado, se logró desarrollar un método fluorescente que pudo detectar semicuantitativamente hasta 25 ppb de Pb (concentración menor al límite establecidos por el ENRESS para agua potable) y su aplicabilidad fue ensayada en muestras de agua de pozo, con buenos niveles de recuperación. Por otro lado, se logró diseñar un dispositivo microfluídico basado en tira de papel que fue capaz de detectar hasta 1 ppm de Pb. Su aplicabilidad fue estudiada en muestras de leche bovina cruda, a las cuales se les pudo realizar un pretratamiento sencillo. Al estudiar el efecto matriz de la leche pudo detectarse Pb hasta 2 ppm, que si bien, los límites exceden lo establecido según el CAA para leches de consumo humano (20 ppb), se encuentran en niveles similares a las tiras reactivas existentes en el mercado internacional por lo que el método desarrollado resulta ventajoso debido a su simpleza, economía de reactivos y elaborado a nivel nacional con insumos locales.

### **BIBLIOGRAFÍA BÁSICA**

- AOAC**, 1993. Peer Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington, VA.
- CAA (Código Alimentario Argentino)**, 2014. Capítulo VII – Productos Lácteos. Artículo 556 tris - (Resolución Conjunta SPReI N°252/2014 y SAGyP N° 218/2014).
- ENRESS**. Anexo I.2.2. Normas de Calidad de Agua Potable y Efluentes Industriales. Ministerio de Obras, Servicios Públicos y Viviendas CEARINSA. Provincia de Santa Fe.
- Feng, L., Li, H., Niu, L., Guan, Y., Duan, C., Guan, Y., Tung, C., Yang, Q.**, 2013. A fluorometric paper-based sensor array for the discrimination of heavy-metal ions. *Talanta*, 108:103-108.
- Lan, T., Furuya, K., Lu, Y.**, 2010. *Chem. Commun.* 46: 3896-3898.
- Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., Friberg, L.**, 2007. *Handbook on the Toxicology of Metals*. 3 ed. Burlington, USA. Academic Press. 1024 p.
- OMS (Organización Mundial de la Salud)**, 2005. Reglamento Sanitario Internacional (RSI). Ginebra: Disponible en: <http://www.who.int/csr/ihr/es/index.html>. Acceso el 5 Julio 2016.
- Rodríguez Medrano A.**, 2004. Desarrollo, validación de un método analítico para la determinación de residuos metálicos de disparo de arma de fuego mediante icp-oes y su aplicación en la química forense. Universidad Autónoma de Nuevo León, 100p.
- Sadeghi, S., Dashti, G. R., Shamsipur, M.**, 2002. Lead-selective poly(vinil chloirider) membrane electrode based on piroxicam as a neutral carrier. *Sensors and actuators*, 81: 223 – 228.
- Wang, Z., Palacios, M. A., Anzenbacher. P.**, 2008. Fluorescence sensor array for metal ion detection based on various coordination chemistries: General performance and potential application. *Anal. Chem.* 80: 7451-7459.
- Willie, S. N., Iida, Y., McLaren, J. W.**, 1998. Determination of Cu, Ni, Zn, Mn, Co, Pb, Cd, and V in Seawater Using Flow Injection ICP-M. *At. Spectrosc.* 3: 67-72.