

**VARIACIÓN DE LOS NIVELES SANGUÍNEOS DE MACRO Y MICRO MINERALES,
EN BOVINOS PARA CARNE EXPUESTOS A EXCESO DE IÓN FLUORURO EN LA
ALIMENTACIÓN**

Lic. Eduardo Luján Fernández

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al Título de
MAGISTER SCIENTIAE en SALUD ANIMAL

Área de Producción Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA

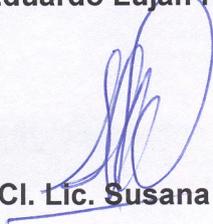
Unidad Integrada Balcarce: Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP – Estación
Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA

Balcarce, Argentina

Agosto de 2019

**VARIACIÓN DE LOS NIVELES SANGUÍNEOS DE MACRO Y MICRO MINERALES,
EN BOVINOS PARA CARNE EXPUESTOS A EXCESO DE IÓN FLUORURO EN LA
ALIMENTACIÓN**

Lic. Eduardo Luján Fernández

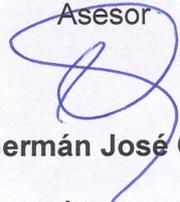


M.SCI. Lic. Susana B. Cseh

Directora de Tesis

Dr. Alfredo Rigalli

Asesor



Dr. Germán José Cantón

Asesor

M. SCI. María Lucía Coria

Asesor

**VARIACIÓN DE LOS NIVELES SANGUÍNEOS DE MACRO Y MICRO MINERALES,
EN BOVINOS PARA CARNE EXPUESTOS A EXCESO DE IÓN FLUORURO EN LA
ALIMENTACIÓN**

LIC. EDUARDO LUJÁN FERNÁNDEZ

Aprobada por:

p/c

Dr. Daniel BENÍTEZ

Dr. Gustavo EYHERABIDE

Dra. Ma. Mercedes LLOBERAS

DEDICATORIA

A mi fiel Rocco.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los que apoyaron este trabajo desde su comienzo.

A la Lic. Susana CSEH por asumir el compromiso de dirigir este trabajo y mi formación de posgrado; y por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente en el área de Bioquímica Clínica Veterinaria.

Al Dr. Alfredo RIGALLI y su equipo de trabajo de la Universidad Nacional de Rosario, por el tiempo dedicado a asesorarme y guiarme en el campo del flúor y la fluorosis. Por abrir las puertas de su laboratorio y de su casa, donde siempre me sentí muy cómodo trabajando o compartiendo alguna cerveza casera, respectivamente.

A la Dra. Brenda FINA por brindarme su tiempo para que aprendiera detalles de la medición de flúor en diferentes matrices y por ponerme en conocimiento de esos “secretos” que hacen que se pueda avanzar más rápidamente en la obtención de resultados.

A la Lic. María CORIA por el enorme esfuerzo para realizar los muestreos en los establecimientos, aún en las peores condiciones climáticas y sin personal que colaborara. Sin su colaboración nada hubiese sido posible.

Al Dr. Germán CANTÓN, por su asesoramiento y revisión crítica de este manuscrito.

A los Sres. Sebastián SALVADOR, Gustavo BARREÑA, Claudio GEREZ y Eduardo SMITH, quienes permitieron el acceso a sus establecimientos y a sus rodeos, para poder obtener las muestras necesarias para la realización de este trabajo. A todos los productores del partido de Guaminí que participaron del relevamiento inicial para determinar la calidad de agua de la región.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica Clínica Veterinaria, por acompañarme en el proceso de formación, por soportar mis días malos. Por los kilómetros recorridos, los mates, las sesiones de “terapia”, las risas, los cursos, las horas compartidas en el laboratorio.

A mis amigos, que fueron el motor cuando el avance era más lento y las ganas disminuían. Gracias por estar sosteniéndome.

A mis padres y hermanos, que me inculcaron la filosofía del trabajo y me enseñaron que con ganas y cariño, **TODO SE PUEDE.**

ÍNDICE

RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUCCIÓN	1
EL FLÚOR	8
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS PARTICULARES	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
1. <u>Establecimientos y muestras</u>	11
1.1) Selección de los establecimientos agropecuarios (EA's).....	11
1.2) Recolección de las muestras.....	13
2. <u>Metodología analítica</u>	14
2.1) Suero.....	14
2.1.1) <i>Determinación de F⁻</i>	14
2.1.2) <i>Determinación de Ca</i>	14
2.1.3) <i>Determinación de P</i>	14
2.1.4) <i>Determinación de Mg</i>	14
2.1.5) <i>Determinación de Cu</i>	14
2.1.6) <i>Determinación de Zn</i>	14
2.1.7) <i>Determinación de ACO</i>	15
2.2) Forrajes y/o alimento balanceado.....	16
2.2.1) <i>Determinación de F⁻</i>	16
2.2.2) <i>Determinación de Ca</i>	17
2.2.3) <i>Determinación de P</i>	17
2.2.4) <i>Determinación de Mg</i>	17
2.2.5) <i>Determinación de Cu</i>	17
2.2.6) <i>Determinación de Zn</i>	17
2.2.7) <i>Determinación de SO₄²⁻</i>	18
2.2.8) <i>Determinación de K</i>	18
2.2.9) <i>Determinación de Mo</i>	18

2.2.10) Determinación de Na.....	18
2.2.11) Determinación de lignina.....	19
2.3) Agua.....	19
2.3.1) Determinación de F ⁻	19
2.3.2) Determinación de Ca.....	19
2.3.3) Determinación de Mg.....	20
2.3.4) Determinación de Cu.....	20
2.3.5) Determinación de Zn.....	20
2.3.6) Determinación de RS.....	20
2.3.7) Determinación de SO ₄ ²⁻	20
2.3.8) Determinación de pH.....	20
3. <u>Análisis estadístico</u>	21
4. <u>Puesta a punto de la metodología para la determinación de F⁻ en agua</u>	22
4.1) Límite de detección (LOD).....	22
4.2) Rango aplicable.....	22
4.3) Bias.....	23
4.4) Precisión.....	23
4.4.1) Repetibilidad.....	23
4.4.2) Precisión intermedia.....	24
4.5) Recuperación.....	24
5. <u>Puesta a punto de la metodología para la determinación de F en suero bovino y material vegetal</u>	25
RESULTADOS	26
1. <u>Puesta a punto de la metodología analítica para la determinación de F⁻ en suero, material vegetal y agua</u>	26
2. <u>Cuantificación de F⁻, Ca, P, Mg, Cu, Zn y ACO en suero bovino</u>	27
2.1) Cuantificación de F ⁻ (ppm).....	27
2.2) Cuantificación de Ca (mg/100 ml).....	28
2.3) Cuantificación de P (mg/100 ml).....	28

2.4) Cuantificación de Mg (mg/100 ml).....	28
2.5) Cuantificación de Cu (ppm).....	29
2.6) Cuantificación de Zn (ppm).....	29
2.7) Cuantificación de ACO.....	29
3. <u>Cuantificación de F⁻, Ca, P, Mg, SO₄²⁻, Na, K, Cu, Zn y Mo en material vegetal.</u>	30
3.1) Establecimiento CONTROL.....	30
3.2) Establecimiento DB.....	31
3.3) Establecimiento DMA.....	31
3.4) Establecimiento DT.....	32
4. <u>Contenido de lignina (%) en material vegetal</u>	32
5. <u>Caracterización fisicoquímica y toxicológica del agua de bebida</u>	33
5.1) Establecimiento CONTROL.....	33
5.2) Establecimiento DB.....	33
5.3) Establecimiento DMA.....	33
5.4) Establecimiento DT.....	34
6. <u>Análisis estadístico de los resultados</u>	35
6.1) Análisis del contenido de F ⁻ en suero.....	35
6.1.1) Análisis de los valores promedio de F ⁻ en suero, en el establecimiento CTRL en función de la estación de muestreo.....	36
6.1.2) Análisis de los valores promedio de F ⁻ en suero, en el establecimiento DB en función de la estación de muestreo.....	37
6.1.3) Análisis de los valores promedio de F ⁻ en suero, en el establecimiento DMA en función de la estación de muestreo.....	38
6.1.4) Análisis de los valores promedio de F ⁻ en suero, en el establecimiento DT en función de la estación de muestreo.....	39
6.2) Análisis del contenido de Ca en suero.....	40
6.3) Análisis del contenido de P en suero.....	40
6.4) Análisis del contenido de Mg en suero.....	41
6.5) Análisis del contenido de Cu en suero.....	42

6.5.1) <i>Análisis de los valores promedio de Cu en suero, en el establecimiento CTRL en función de la estación de muestreo.....</i>	42
6.5.2) <i>Análisis de los valores promedio de Cu en suero, en el establecimiento DB en función de la estación de muestreo.....</i>	43
6.5.3) <i>Análisis de los valores promedio de Cu en suero, en el establecimiento DMA en función de la estación de muestreo.....</i>	44
6.5.4) <i>Análisis de los valores promedio de Cu en suero, en el establecimiento DT en función de la estación de muestreo.....</i>	45
6.6) <i>Análisis del contenido de Zn en suero.....</i>	47
6.7) <i>Análisis de ACO.....</i>	47
DISCUSIÓN.....	49
CONCLUSIONES.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tolerancia al F ⁻ (ppm) en diferentes especies animales.....	5
Tabla 2: Fórmula química y concentración de F ⁻ (ppm) en minerales naturales.....	8
Tabla 3: Parámetros de calidad de la puesta a punto de la metodología analítica para la determinación de F ⁻ en suero bovino.....	26
Tabla 4: Parámetros de calidad de la puesta a punto de la metodología analítica para la determinación de F ⁻ en material vegetal.....	26
Tabla 5: Parámetros de calidad de la puesta a punto de la metodología analítica para la determinación de F ⁻ en agua.....	27
Tabla 6: Valores promedio de F ⁻ (ppm) en suero, por establecimiento y estación.....	27
Tabla 7: Valores promedio de Ca (mg/100 mL) en suero, por establecimiento y estación.....	28
Tabla 8: Valores promedio de P (mg/100 mL) en suero, por establecimiento y estación.....	28
Tabla 9: Valores promedio de Mg (mg/100 mL) en suero, por establecimiento y estación.....	28
Tabla 10: Valores promedio de Cu (ppm) en suero, por establecimiento y estación.....	29
Tabla 11: Valores promedio de Zn (ppm) en suero, por establecimiento y estación.....	29
Tabla 12: Valores promedio de ACO hallados para cada tratamiento.....	29
Tabla 13: Contenido de macro y oligoelementos en pasturas del establecimiento CONTROL por estación.....	30
Tabla 14: Contenido de macro y oligoelementos en pasturas del establecimiento DB por estación.....	31
Tabla 15: Contenido de macro y oligoelementos en pasturas del establecimiento DMA por estación.....	31
Tabla 16: Contenido de macro y oligoelementos en pasturas del establecimiento DT por estación.....	32
Tabla 17: Contenido de lignina (%) en las diferentes pasturas analizadas.....	32
Tabla 18: Caracterización fisicoquímica de las muestras de agua del establecimiento CONTROL.....	33
Tabla 19: Caracterización fisicoquímica de las muestras de agua del establecimiento DB.....	33
Tabla 20: Caracterización fisicoquímica de las muestras de agua del establecimiento DMA.....	33

Tabla 21: Caracterización fisicoquímica de las muestras de agua del establecimiento DT.....	34
Tabla 22: ANOVA del contenido de F ⁻ (ppm) según tratamientos.....	35
Tabla 23: Valores promedio de F ⁻ (ppm) para cada tratamiento.....	35
Tabla 24: ANOVA del contenido de F ⁻ según estación climática en el establecimiento CTRL.....	36
Tabla 25: ANOVA del contenido de F ⁻ (ppm) según estación climática en el establecimiento DB.....	37
Tabla 26: ANOVA del contenido de F ⁻ (ppm) según estación climática en el establecimiento DMA.....	38
Tabla 27: ANOVA del contenido de F ⁻ (ppm) según estación climática en el establecimiento DT.....	39
Tabla 28: ANOVA del contenido de Ca (mg/100 mL) según tratamientos.....	40
Tabla 29: Valores promedio de Ca (mg/100 mL) para cada tratamiento.....	40
Tabla 30: ANOVA del contenido de P (mg/100 mL) según tratamientos.....	40
Tabla 31: Valores promedio de P (mg/100 mL) para cada tratamiento.....	41
Tabla 32: ANOVA del contenido de Mg (mg/100 mL) según tratamientos.....	41
Tabla 33: Valores promedio de Mg (mg/100 mL) para cada tratamiento.....	41
Tabla 34: ANOVA del contenido de Cu (ppm) según tratamientos.....	42
Tabla 35: Valores promedio de Cu (ppm) para cada tratamiento.....	42
Tabla 36: ANOVA del contenido de Cu (ppm) según estación climática en el establecimiento CTRL.....	43
Tabla 37: ANOVA del contenido de Cu (ppm) según estación climática en el establecimiento DB.....	44
Tabla 38: ANOVA del contenido de Cu (ppm) según estación climática en el establecimiento DMA.....	45
Tabla 39: ANOVA del contenido de Cu (ppm) según estación climática en el establecimiento DT.....	46
Tabla 40: ANOVA del contenido de Zn (ppm) según tratamientos.....	47
Tabla 41: Valores promedio de Zn (ppm) para cada tratamiento.....	47
Tabla 42: ANOVA del promedio de ACO en función de los tratamientos.....	47
Tabla 43: Valores promedio de ACO para cada tratamiento.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ubicación geográfica de los establecimientos muestreados.....	12
Figura 2: Equipo de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 700.....	15
Figura 3: Espectrofotómetro UV-Vis PG Instruments T-80.....	15
Figura 4: Soporte de electrodos y puente salino.....	16
Figura 5: Detalle de la unión entre el electrodo y la muestra.....	16
Figura 6: Ciclo de colocación, lectura y extracción de las muestras.....	16
Figura 7: Bloque de digestión Velp DK-20.....	19
Figura 8: Promedios de F ⁻ sérico (ppm) por estación, en el tratamiento CTRL.....	36
Figura 9: Promedios de F ⁻ sérico (ppm) por estación, en el tratamiento DB.....	37
Figura 10: Promedios de F ⁻ sérico (ppm) por estación, en el tratamiento DMA.....	38
Figura 11: Promedios de F ⁻ sérico (ppm) por estación, en el tratamiento DT.....	39
Figura 12: Promedios de Cu sérico (ppm) por estación, en el tratamiento CTRL.....	43
Figura 13: Promedios de Cu sérico (ppm) por estación, en el tratamiento DB.....	44
Figura 14: Promedios de Cu sérico (ppm) por estación, en el tratamiento DMA.....	45
Figura 15: Promedios de Cu sérico (ppm) por estación, en el tratamiento DT.....	46
Figura 16: Promedios de ACO por tratamiento.....	48

RESUMEN

La causa más frecuente de eliminación de una vaca de cría de un rodeo es su desgaste dental, aunque el resto del organismo pueda seguir funcionando sin inconvenientes. Este desgaste puede llevar a una reducción en el 50% de la vida útil potencial de un bovino. Las causas que producen desgaste dental y que establecen la variabilidad de esta característica se pueden clasificar en ambientales y genéticas. Estas últimas no fueron puestas en evaluación en este trabajo.

Dentro de las causas ambientales, la calidad del agua de bebida es un factor muy relevante en la presentación del desgaste dental, principalmente debido a la presencia excesiva de flúor (F). El ion fluoruro (F^-) presente en el agua, es una de las tantas sustancias disueltas en la misma, y es esencial para la salud de los humanos y los animales. Sus efectos dependen directamente de su concentración. Así, concentraciones superiores a 1,5 ppm resultan peligrosas para el normal desarrollo de los dientes y los huesos, tanto en humanos como en animales. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) poner a punto la determinación micropotenciométrica de F^- en muestras de suero bovino, material vegetal y agua de bebida. 2) Relacionar el contenido de F^- en estas muestras con valores de oligoelementos y macroelementos en suero de animales expuestos a diferentes dosis de F^- en el agua de bebida para detectar algún patrón de variación en los valores sanguíneos de macro y/u oligominerales que sirviera de herramienta de detección precoz de la fluorosis bovina. Se realizaron muestreos estacionales de agua de bebida, alimento y suero de 24 animales en 4 establecimientos agropecuarios del partido de Guaminí, Provincia de Buenos Aires. En esta zona el desgaste dental es una problemática planteada por los productores. La técnica potenciométrica resultó adecuada para la cuantificación de F^- en suero, material vegetal y agua. En el agua de bebida se hallaron valores de F^- en un rango desde menos de 0,5 ppm hasta más de 2 ppm. En suero se halló aumento de los niveles de F^- , deficiencia de cobre, disminución de la actividad de ceruloplasmina oxidasa (en el único muestreo en que fue posible este análisis) y no se detectó variación en los niveles séricos de Ca, P, Mg y Zn. En pasturas se encontraron deficiencias anuales de Ca, P y Mg además de deficiencias estacionales de Cu. No se evidenció desgaste dental en los animales involucrados en este trabajo.

Palabras clave: fluoruro, desgaste dental, bovinos, calidad de agua.

ABSTRACT

In cattle, age is estimated by examining the degree of wear of permanent incisor teeth in order to aid culling decisions. Although cows are culled due to excessive dental wear, they are usually still functional. However, productive life is usually reduced to 50% due to several causes, including premature dental wear. Dental wear can be influenced by environmental and genetic factors. Among environmental causes, quality of drinkable water are the main factor associated. Water characteristics is relevant in relation with dental wear, mainly due to fluorine excess. Fluoride availability is essential to livestock wellbeing. Concentrations $> 1.5\text{mg/L}$ can lead to fluorosis which could be detrimental to normal dental and bone growth in humans as well in animals. This work aims: 1) set a potentiometric determination of F^- in bovine serum, drinking water and forage; and 2) evaluate patrons of variations in blood macro and oligo minerals in relation with F metabolism in order to use them as an early detection tool for bovine fluorosis. Seasonal sampling of drinking water, food and serum of 24 animals was carried out in 4 agricultural establishments in Guaminí, Province of Buenos Aires. In this area, dental wear is a problem raised by the producers. In serum, copper deficiencies, decreased activity of ceruloplasmin oxidase (in just one sampling) and increases in F^- were found. In the drinking water, F^- values were found in a range from less than 0.5 ppm to more than 2 ppm. In pastures annual deficiencies of Ca, P and Mg were found in addition to seasonal deficiencies of Cu. There was not observable dental wear in the animals involved.

Keywords: fluoride, teeth wear, cattle, water quality.

INTRODUCCIÓN

Cada especie tiene un ritmo característico para su envejecimiento biológico, aunque la velocidad con que se produce la declinación funcional varía entre individuos, y de órgano a órgano dentro del mismo individuo. Este fenómeno explica el hecho que en los bovinos, las vacas de cría se eliminan del rodeo por su desgaste dental, aunque el resto del organismo pueda seguir funcionando sin inconvenientes. En los rodeos de cría, mediante la práctica denominada “boqueo”, se clasifican los vientres según el grado de desgaste de los dientes incisivos, eliminando del rodeo aquellos animales que presentan los dientes con tal grado de deterioro que les impide alimentarse adecuadamente (Martínez *et al.*, 2011). Generalmente ocurre que los vientres descartados mediante el boqueo todavía se encuentran en buenas condiciones sanitarias y fisiológicas para seguir produciendo. La expectativa de vida de los bovinos es de 18 a 20 años, pero son muy pocos los que llegan a ese rango etario. Esta reducción en el tiempo de “vida útil” puede deberse a varias causas, pero la más natural y común es el desgaste dental prematuro. Este desgaste puede llevar a una reducción en el 50% de la vida útil potencial de un bovino. En todos los dientes permanentes se comienza a percibir desgaste a partir de los 5 años de edad, cuando los animales alcanzan la denominada “tabla dentaria”. Luego el borde de las piezas dentarias pasa de cortante y convexo, a plano y recto (se dice que los dientes han “rasado”). El desgaste continúa hasta que la cara posterior de la corona se hace cóncava y la tabla dentaria aparece de forma cuadrangular, con una mancha central denominada “estrella dentaria”. La corona continúa disminuyendo de altura y cuando desaparece la parte que contacta con los dientes vecinos, produce la apariencia de dientes separados. Con el tiempo, el desgaste puede consumir totalmente la corona, hasta que solamente se observan las estaquillas óseas (raíces), cuya parte superior redondeada sobresale a causa del retraimiento de la encía. Las causas que producen desgaste dental y que establecen la variabilidad de esta característica, se pueden clasificar en ambientales y genéticas. Estas últimas no serán puestas en evaluación en este trabajo.

Dentro de las causas ambientales, se encuentra en primer lugar la abrasión producida por el contacto con los alimentos y otros materiales extraños, y en segundo lugar, la calidad del agua de bebida. Este último es un factor muy relevante en la presentación del desgaste dental, principalmente debido a la presencia excesiva de flúor (F).

El agua químicamente pura es la combinación de dos átomos de hidrógeno con uno de oxígeno. Al estado natural es clara, sin color, ni olor, forma parte de la alimentación de los animales y, después del oxígeno, es el componente más importante e indispensable

para la vida sobre la tierra. Su falta puede producir la muerte rápidamente, más que la de cualquier otro nutriente. El agua que consumen los bovinos debe ser limpia, inodora, incolora e insípida y su pH debe ser cercano a la neutralidad (Cseh, 2003). Entre los parámetros que definen su calidad química y toxicológica se pueden citar pH, residuo seco (RS), carbonatos (CO_3^{2-}), bicarbonatos (HCO_3^{1-}), sulfatos (SO_4^{2-}), sodio (Na), calcio (Ca), magnesio (Mg), cloruros (Cl^-), arsénico (As), flúor (F), nitratos (NO_3^-), nitritos (NO_2^-), cromo (Cr), cobre (Cu), hierro (Fe) y zinc (Zn) (Sager, 2003).

El agua constituye el mayor peso de los animales y de los vegetales. En su forma líquida o sólida, cubre más del 70% del planeta. El 69% del total del agua dulce mundial se usa para agricultura, el 23% para la industria y el 8% para las necesidades domésticas (FAO, 2017). Desde el punto de vista físico, el agua actúa en el animal como un amortiguador entre su propia temperatura y el ambiente. Desde el punto de vista nutricional, se comporta como un solvente universal. Favorece el ablandamiento y fermentación de los alimentos, permitiendo su asimilación y la excreción de orina y heces.

El agua, si posee la salinidad adecuada, puede hacer una buena contribución al consumo de minerales requeridos por el animal, alcanzando valores del orden del 20% para el Ca, 11% para el Mg, 35% para el Na y 28% para el azufre (S) (Vidarrueta, 2017). Es el principal constituyente celular, formando parte de más de la mitad del peso del animal. Así, por ejemplo, un 55 % del peso corporal de una oveja es agua, y una vaca contiene un 60-70% de agua.

Una forma interesante de visualizar este hecho es teniendo en cuenta que al comprar un kilo de carne, en realidad lo que se adquiere es aproximadamente 700 gramos de agua y apenas 300 gramos de materias sólidas. Las fuentes naturales de agua para el ganado son los arroyos, lagos, ríos, charcos, lagunas, manantiales y/o pozos, siendo la de mayor importancia el agua subterránea. La calidad de las distintas fuentes está relacionada con la ubicación geográfica y depende mucho de la geología de la zona

El agua de represas artificiales varía significativamente en su composición química desde el llenado hasta su vaciado, aun cuando este último sea parcial. Esta variación está dada por la concentración y acumulación de desechos orgánicos producidos por los propios animales y de los arrastres en el proceso de llenado (Colacelli, 2012).

El agua proveniente de corrientes superficiales es por lo general dulce, de baja concentración de sales totales, pero la misma puede variar de acuerdo a las regiones que atraviesa y al volumen de agua que acarrea en las diferentes estaciones del año. Existen ríos en la Argentina que tienen un nombre común: Río Salado, de los cuales hay varios, en Salta, Santiago del Estero, Chaco, Santa Fe, Neuquén, Buenos Aires,

Mendoza y San Luis. Aunque las aguas de estos ríos no son salobres, al infiltrarse hacia las napas subterráneas disuelven cloruros y sulfatos que le otorgan alta salinidad al agua de pozo. Esta característica también se observa en proximidad de otros ríos como el Diamante y Tunuyán en Mendoza y en las lagunas encadenadas de la cuenca del Río Salado de Buenos Aires (Bavera, 2006).

En general, los requerimientos de agua por unidad de peso corporal disminuyen con la edad. Un bovino adulto consume entre un 8-10% de su peso en agua. Una vaca lechera puede consumir entre 38 y 110 litros de agua por día y un vacuno para carne de 26 a 66 litros (Sager, 2003). Las hembras preñadas consumen más agua que las vacías, y las lactantes más que las secas. Las vacas lecheras, son las que más agua consumen de todos los bovinos, en proporción a su tamaño corporal, debido a que tienen grandes requerimientos de agua para poder mantener su producción láctea, ya que entre el 85 y el 87% de la leche, es agua. El ganado lechero tiene una mayor demanda hídrica, la cual aumenta a medida que crece su nivel de producción.

Hay diversos factores que influyen sobre la cantidad de agua requerida por los animales, tales como: raza, edad, estado fisiológico, temperatura y humedad ambiente, velocidad del viento, contenido de proteínas e hidratos de carbono de la dieta, ingestión de sales, etc. Los factores que más modifican el consumo de agua son la temperatura ambiente y las características del alimento. Al mismo tiempo, el tipo de animal (tamaño, raza, edad, sexo) hace que se modifiquen los requerimientos de agua por kilogramo de materia seca consumida. Por ejemplo, si un bovino adulto de raza cebuina consume 2,5 litros, uno de raza británica necesita 3,5 y un ternero hasta 7 litros por el mismo kilo de materia seca ingerida (Stritzler y Rabotnikof, 2008).

El ion fluoruro (F^-) presente en el agua, deriva principalmente de la disolución natural de los minerales que conforman las rocas y los suelos, los cuales interactúan con el agua. Es una de las tantas sustancias disueltas presentes en el agua, y es esencial para la salud de los humanos y los animales. Sus efectos dependen directamente de su concentración. Así, concentraciones superiores a 1,5 ppm resultan peligrosas, tanto en humanos como en animales, conduciendo a fluorosis severa de dientes y huesos, además de afectar al sistema nervioso y el aparato reproductor (Shupe *et al.*, 1992; Browne *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2009; Barbier *et al.*, 2010; Ulemale *et al.*, 2010; Spittle, 2011; Hufschmid *et al.*, 2015).

Los signos clínicos de la fluorosis pueden no aparecer por varias semanas o meses en animales que están ingiriendo cantidades de F^- que se consideran tóxicas, a menos que esas cantidades sean tan grandes que conduzcan a una intoxicación aguda. La

duración del período de latencia varía con la dieta basal. Durante el período de latencia, el animal se protege con dos mecanismos fisiológicos: excreción de F^- en orina y deposición en el hueso. La saturación del hueso se produce cuando la concentración alcanza valores de 15.000 a 20.000 ppm de F^- (1,5 a 2 %), esto es, 30 a 40 veces más de lo que contiene un hueso normal. Después de esto, se produce una “inundación” de F^- a los tejidos blandos, la cual se manifiesta por un desorden metabólico y luego mortandad. Una severa anorexia acompaña a las últimas etapas de la fluorosis y los efectos de la subnutrición se superponen a los tóxicos del flúor. Durante el período de latencia no necesariamente se produce pérdida de apetito o disminución láctea (presentación subclínica) (Shupe, 1980; Suttie, 1980; Aguado Sánchez *et al.*, 1996; Mufarrege, 1999; Luciola *et al.*, 2007; Filappi *et al.*, 2008; Chouhan *et al.*, 2009; Choubisa, 2010^{a,b}; Karademir, 2010; Flueck y Smith-Flueck, 2012; Choubisa, 2014; Comba y Çinar, 2016; Choubisa, 2017). La alteración en las concentraciones de ácidos grasos volátiles y la microbiota ruminal son responsables de la disminución en la ingesta de alimentos y la pobre conversión de los mismos, de aquí la pérdida progresiva de apetito y peso corporal (Ranjan y Ranjan, 2015).

En el caso de los animales jóvenes, la manifestación primaria de fluorosis es el moteado de los dientes (fluorosis dental) y la osteoesclerosis (fluorosis esquelética). También existen signos de fluorosis en tejidos blandos, como disturbios gastrointestinales, desórdenes neurológicos, alteración de otros parámetros sanguíneos (selenio (Se), Zn, Cu, manganeso (Mn), cobalto (Co) y Mg) (Han *et al.*, 2006; Ranjan *et al.*, 2008), disfunciones reproductivas y efectos teratogénicos. La prevalencia y la severidad de estos efectos crónicos de la fluorosis están influenciadas por varios factores como el contenido de F^- en la dieta, la duración a la exposición y la frecuencia de ingesta (Gründer, 1974; Choubisa *et al.*, 2011; Chhabra *et al.*, 2012; Ekambaram *et al.*, 2013; Kaur Gill y Kumar Dumka, 2013; Aydin *et al.*, 2014; Chandan Agalli y Bhavsar Shintre, 2016; Do *et al.*, 2016; Palczewska-Komsa *et al.*, 2016). Recientemente, Pramoda *et al.* (2017) han reportado efectos inhibitorios del F^- sobre algunas enzimas y/o sistemas enzimáticos como peroxidasa, pseudo catalasa, catalasa, ureasa, ATPasas y aquellas involucradas en el sistema antioxidante como la superóxido dismutasa (SOD).

Los rumiantes son más susceptibles a los efectos del F^- que los herbívoros monogástricos. Entre los rumiantes, la prevalencia de lesiones dentales y óseas es mayor en búfalos y bovinos, siendo el búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) la especie más sensible. Como regla se acepta que los bovinos pueden tolerar hasta 1 mg F^- / kg PV durante 5-10 años, observándose solo pequeñas manchas sin desgaste evidente; pero

2 mg F⁻ / kg PV pueden resultar en un desgaste dental acelerado y signos de fluorosis esquelética. Existe evidencia (Ranjan y Ranjan, 2015) que las vaquillonas son las que menos tolerancia tienen al F⁻ en el agua de bebida y las ovejas, las de mayor tolerancia (Tabla 1).

Especie animal	F ⁻ en alimentos (ppm)	F ⁻ en agua (ppm)
Vaquillonas (carne y leche)	30	2,5 – 4
Vaca lechera adulta	30	3 – 6
Vaca para carne adulta	40	4 – 8
Oveja	50	12 – 15
Caballo	60	4 – 8
Cerdos	70 – 100	5 – 8
Aves de corral	100	10 – 13

Tabla 1: Tolerancia al F⁻ (ppm) en diferentes especies animales (Ranjan y Ranjan, 2015).

En Argentina, la mayor parte del agua extraída del subsuelo proviene de sedimentos finos de origen eólico, producto de la orogenia andina, ricos en vidrios volcánicos y responsables de los elevados contenidos de F⁻ (y As) en las aguas superficiales y subterráneas (Lavado *et al.*, 1983; Herrero *et al.*, 2000; Perez Carrera y Fernández Cirelli, 2004; Pérez Carrera *et al.*, 2005; Puche y Rigalli, 2007; Pariani *et al.*, 2014; Osicka *et al.*, 2015; Moudarzi y Sheljani, 2016; Stewart *et al.*, 2016; Xiajin *et al.*, 2017). En muchos casos, los animales destinados a la producción, se encuentran expuestos a altas concentraciones de F⁻ en el agua y en los alimentos, generalmente, pasturas que crecen sobre suelos irrigados por aguas con excesos de F⁻ (Arnesen, 1997).

Los excesos de F⁻ en el agua de bebida son una importante causa del desgaste dental prematuro en terneros en la provincia de Buenos Aires, haciendo que el crecimiento de las vaquillonas se retrase y que se descarten por dientes antes del primer servicio, lo que obliga a una reposición del 20-30%, en lugar de la tasa habitual del 12-15%. (Mufarrege, 1999). Este desgaste se debe a la defectuosa calcificación del esmalte provocada por la fluorosis. En este caso, la hidroxiapatita que da estructura al diente normal es reemplazada por fluoroapatita, de estructura cristalina más desordenada y que da como resultado una pieza dentaria de menor resistencia al desgaste (Bavera, 2006).

En nuestro país, la distribución geográfica del contenido de F⁻ en aguas destinadas al consumo de bovinos no se ha investigado exhaustivamente y, en consecuencia, no se ha podido dimensionar el impacto del exceso de F⁻ en la producción. La bibliografía al respecto es escasa, y con datos relativos a ciertas zonas. Existen datos dispersos que

no abarcan la totalidad de la superficie del país. Si bien está centrado en zonas de mayor densidad de población, se observan elevados niveles de F^- (más de 3 ppm) en la zona pampeana. Esta zona abarca gran parte de las provincias de Buenos Aires, La Pampa, Santa Fe, Córdoba, y San Luis. Existen reportes de zonas de fluorosis crónica en los partidos de Tapalqué, Azul y Tandil en la Provincia de Buenos Aires, con casos clínicos de exostosis, engrosamiento de las articulaciones y desgaste casi total de incisivos y muelas (con exposición de la pulpa dentaria) en vacunos de 3 a 5 años de edad. En otras zonas del sudeste bonaerense se observaron signos clínicos más atenuados, manifestándose principalmente oscurecimiento de los dientes (Bavera, 2006).

En la actualidad, la medición del contenido de F^- en agua se hace principalmente por colorimetría (APHA-AWWA-WPCF, 1992; OMS, 2006). La reacción implica la formación de una laca de alizarina sulfonato de sodio con sales de circonio, la cual es de color rosado y va decolorándose a medida que aumenta la concentración de F^- en el medio, por formación del complejo hexafluorocirconato (Rigalli *et al.*, 1999; Rigalli y Puche, 2007). Esta reacción es de aplicación relativamente sencilla, de bajo costo, pero presenta el inconveniente de requerir un importante volumen de muestra (50 ml), hay varios pasos analíticos a realizar y no es de rápida ejecución. Este método es ampliamente utilizado en un gran número de laboratorios que realizan investigación básica, con excelentes resultados en cuanto a reproducibilidad, repetibilidad, precisión y exactitud. Sin embargo, es una metodología que no resulta completamente adecuada en aquellos laboratorios que realizan diagnóstico veterinario, donde una característica fundamental para determinar la aplicabilidad de un método, es la rapidez con que se puede realizar. En este sentido, la potenciometría aparece como un método rápido y extremadamente sensible, ya que con un electrodo específico, se obtienen lecturas de F^- en agua prácticamente sin interferencias y en un tiempo muy breve, del orden de los segundos. Sin embargo, y al igual que la colorimetría, requiere de grandes volúmenes de muestra para la obtención de resultados confiables (Ayranci y Duman, 2004; Tokalioglu *et al.*, 2004; Rigalli y Puche, 2007).

Una alternativa surgida en las últimas décadas es la microtécnica potenciométrica, que posee las ventajas de la potenciometría tradicional, con la característica adicional de emplear pequeños volúmenes de muestra (50 μ l) (Rigalli y Puche, 2007).

No obstante, el equipamiento necesario para la utilización de esta metodología no se encuentra disponible en forma comercial, motivo por el cual debe crearse a medida de las necesidades de cada laboratorio. En este sentido, el Laboratorio de Biología Ósea, de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario posee un

prototipo de equipamiento (hardware y software) desarrollado para facilitar la aplicación de la microtécnica potenciométrica. Dicho equipamiento fue reproducido para el Laboratorio de Bioquímica Clínica Veterinaria, del Área de Investigación en Producción Animal perteneciente a la Estación Experimental Agropecuaria “Domingo Pasquale” del INTA.

En este contexto, y siendo el agua un recurso imprescindible y de gran impacto en la producción animal, se decidió realizar la puesta a punto de la determinación de F^- en agua, suero bovino y pasto para luego evaluar el contenido del mismo en muestras de estos especímenes destinados al consumo animal, así como su impacto en los valores de algunos macro y micro minerales en sueros de bovinos provenientes de establecimientos agropecuarios del partido de Guaminí, donde el desgaste dental prematuro es una problemática planteada (Coria *et al.*, 2013).

El flúor

Henri Moissan logró aislar a este elemento por primera vez en 1886, por electrólisis de una solución diluida de fluoruro de potasio. Este elemento se combina explosivamente con el hidrógeno, aún en la oscuridad. Oxida el agua, de modo que en cualquier reacción en la que interviene, se libera oxígeno. Es el primer elemento de la familia química conocida como halógenos. Posee el menor radio iónico y la mayor electronegatividad de todos los elementos. Su forma estable iónica es el (F^-), el cual reacciona directamente con casi todos los elementos, excepto el nitrógeno, helio y argón. Químicamente presenta un estado de oxidación 1-, pero en condiciones químicas muy agresivas puede actuar como positivo. Esta notable reactividad del F^- explica el hecho que no exista en forma libre en la naturaleza. Se combina con el hidrógeno (H) para formar fluoruro de hidrógeno (H_nF_n) un gas corrosivo e incoloro, o un líquido cuyo punto de ebullición es de 19,5 °C, y su presión de vapor menor a 1 atmósfera (Ranjan y Ranjan, 2015). A temperatura ambiente es un gas amarillo verdoso, con un olor pungente característico. El F es un elemento ubicuo en la naturaleza. Desde los abundantes depósitos de la litósfera se distribuye ampliamente en la superficie de la Tierra y en la atmósfera, como resultado de procesos naturales (erosión, actividad volcánica, arrastre de cursos hídricos) o por procesos de industrialización y/o minería. Un 0,065 % de la corteza terrestre está integrada por compuestos conteniendo F, ubicándose decimotercero en la escala de abundancia relativa (Panda *et al.*, 2015). En la tabla 2 se pueden ver la fórmula química y la concentración de F^- en los minerales que más lo contienen.

Mineral	Fórmula química	Contenido de F^- (%)
Sellaíta	MgF_2	61
Villiaumita	NaF	55
Flourspar	CaF_2	49
Criolita	Na_3AlF_6	45
Bastnasita	$(Ce,La,Y)(CO_3)F$	9
Fluoroapatita	$Ca_5(PO_4)_3F$	3.5

Tabla 2: Fórmula química y contenido de F^- (ppm) en minerales naturales (Ranjan y Ranjan, 2015).

Las vías de aporte de F al medioambiente son dos: natural y antropogénica. Respecto de la primera, el (H_nF_n)_{gas}, se genera en las emanaciones de las erupciones volcánicas, siendo dispersado a enormes distancias del punto de emanación. Los diferentes fluorocompuestos derivados de la actividad volcánica van cargando el ecosistema y la cadena trófica. Las industrias que aportan mayor cantidad de F^- a la atmósfera son la metalúrgica, cerámica, cementera, fundiciones, fabricación de ladrillos y fertilizantes

fosforados. El empleo de estos últimos, con impurezas que van desde un 0,5% a un 4% (m/m), aporta cantidades importantes de F^- a los suelos. En los fertilizantes de mejor calidad, el contenido de F^- contaminante es de alrededor de un 0,15%. Aplicando 500 kg de este fertilizante por hectárea, se agregan hasta 7,5 kg de F^- en la misma superficie (Jubb *et al.*, 1993; Choubisa, 1999; Agalakova y Petrovich Gusev, 2012; Choubisa y Choubisa, 2016). La toxicidad del F^- está relacionada con la biodisponibilidad y las características del receptor. El impacto del F^- desde el punto de vista ecológico y toxicológico, presenta muchas controversias, generadas por la falta de información científica inobjetable. Las investigaciones son difíciles de realizar, debido a que las planificaciones requieren de parámetros y normas que pueden afectar los resultados, y que demandan costos frecuentemente no disponibles. Por otro lado, el elemento tiene una gran facilidad para formar polímeros. Este efecto de polimerización se observa a lo largo de muchos fluoro-complejos orgánicos e inorgánicos, presentes en minerales naturales y artificiales (Palczewska-Komsa *et al.*, 2016).

Una forma legalmente autorizada de aumento de concentración en el agua potable es el agregado de sales de F^- con fines cariostáticos. Habitualmente se agrega una cantidad determinada de F^- para lograr una concentración de 1 ppm. El inconveniente es que se destina menos del 1% del consumo de agua potable a la higiene bucal. El resto se utiliza para higiene corporal, lavado, riego, servicios higiénicos o simplemente desecho. Una importante proporción será acumulada en la cadena trófica (bio-acumulación), con consecuencias en la flora, fauna y organismos superiores. En el caso del F^- (y de la gran mayoría de los contaminantes) existen bio-marcadores que resultan útiles al momento de estimar la exposición de un individuo o de un ecosistema al elemento. Estos bio-marcadores pueden clasificarse según diferentes criterios. El NRC clasifica los bio-marcadores para el F^- según se utilicen para estimar: (1) efecto, (2) susceptibilidad o (3) exposición. El marcador de efecto puede considerarse como la diferencia entre individuos en la relación dosis-respuesta. El marcador de efecto se explica cómo la consecuencia de una exposición previa (por ejemplo: fluorosis dental y/o fluorosis esquelética). La OMS clasifica estos marcadores según la exposición sea (1) histórica, (2) actual o (3) reciente. Para la estimación de la exposición histórica puede utilizarse el dosaje de F^- en huesos y/o dientes. En el caso de la exposición reciente, el dosaje en pelos y/o uñas. Para la estimación de la exposición actual se utiliza el dosaje de F^- en sangre, plasma, saliva, orina, sudor, y/o leche (Chandan Agali y Bhavsar Shintre, 2016).

Hipótesis

La microtécnica potenciométrica para la determinación de F^- en diversas matrices cumple con los requisitos analíticos necesarios para su aceptación e implementación.

El contenido elevado de F^- en agua de bebida y alimentos para bovinos de cría produce alteraciones en los valores sanguíneos de F^- , calcio (Ca), fósforo (P), magnesio (Mg), cinc (Zn), cobre (Cu) y en la actividad de ceruloplasmina oxidasa (ACO) que pueden utilizarse como indicadores de intoxicación con F^- , permitiendo la detección precoz de la fluorosis.

Objetivo general

Detectar un patrón de variación en los valores sanguíneos de macro y/u oligominerales, relacionado con el consumo excesivo de F^- , y utilizarlo como herramienta de detección precoz de la fluorosis bovina.

Objetivos particulares

Poner a punto una microtécnica potenciométrica para la determinación de F^- en muestras de suero, agua y pasto.

Caracterizar fuentes de agua y alimento, ubicadas en distintos establecimientos, en el área de influencia de la EEA Cesáreo Naredo del INTA, Partido de Guaminí, Provincia de Buenos Aires.

Cuantificar F^- , macrominerales, oligominerales y actividad de ceruloplasmina oxidasa en suero sanguíneo de bovinos expuestos a diferentes niveles de F^- en el agua que beben y en el alimento que consumen.

Relacionar el patrón de variación en los valores sanguíneos de macro y/u oligominerales, el estado dental, la condición corporal y el % de preñez; con la concentración de F^- hallada en las fuentes de agua y alimentos.

MATERIALES Y METODOS

1 Establecimientos y muestras

1.1) Selección de los establecimientos agropecuarios (EA's): Durante los meses de septiembre y octubre del año 2014, se realizó un relevamiento, a través de encuestas (Anexo B), de los EA's en la zona de influencia de la Estación Experimental Agropecuaria "Cesáreo Naredo" del INTA, cuyos propietarios habían manifestado tener presencia de desgaste dental prematuro en los bovinos de sus rodeos (Fig. 1). Para la selección de los establecimientos, se tuvo en cuenta el contenido de F^- en el agua de bebida que consumían los animales. De este modo se escogieron 4 EA's que fueron identificados como a) **ESTABLECIMIENTO CTRL:** Ubicado en el Cuartel IX del partido de Guaminí (S36°53.482' W62°24.321'), con agua de bebida conteniendo menos de 0,5 ppm de F^- . La actividad principal en el establecimiento es la cría bovina, con una superficie dedicada a esta actividad de 53 hectáreas. El plantel estaba compuesto por 36 vacas, 6 vaquillonas, 33 terneros y 1 toro. La base forrajera era pasto llorón y alfalfa. Todas las categorías eran suplementadas en invierno con rollo. El servicio era de tipo natural estacionado (vaquillonas durante el invierno y vacas en primavera), con una edad promedio de las vaquillonas de 18 meses al primer servicio. El porcentaje de preñez se encontraba en valores del 95%, con una edad promedio de descarte de 8 años. El rodeo presentaba buen estado general (condición corporal (CC) 4, en una escala de 1 a 5) al momento del muestreo; b) **ESTABLECIMIENTO DB:** Ubicado en el Cuartel IV del Partido de Guaminí (S36°39'22.8" W62°24'35.4"), con agua de bebida conteniendo una concentración de F^- entre 0,51 y 1 ppm. Tiene una superficie de 548 hectáreas. La actividad principal del establecimiento era la agricultura, pero una parte de la superficie se destinaba a ciclo completo (cría e invernada corta), contando con 150 terneros. Los mismos tenían una alimentación a base de alfalfa y silo de maíz. De ser necesario, se suplementaban con grano de maíz en diferentes momentos del año. El porcentaje de preñez se encontraba en valores del 80% al momento del muestreo, con los animales en CC=4; c) **ESTABLECIMIENTO DMA:** Ubicado en el Cuartel VII del partido de Guaminí (S37°05.026' W61°59.248'); con agua de bebida conteniendo una concentración de F^- entre 1,01 y 2 ppm. Posee una superficie de 200 hectáreas propias y 300 alquiladas, destinadas a la cría bovina. El plantel estaba compuesto por 200 vacas, 80 vaquillonas, 100 terneros y 2 toros. La alimentación se basaba en verdeos de invierno, suplementando a las vacas en invierno con rollo y grano de cebada o avena. El servicio era de tipo natural, estacionado (3 meses durante la primavera) con una edad promedio de las vaquillonas de 22 meses al momento del primer servicio. La preñez era

del 90 %, y la edad promedio de descarte era de 10 años. Todos los animales se encontraban en CC=4; y d) **ESTABLECIMIENTO DT**: Ubicado en el cuartel VI del partido de Guaminí (S37°03.800'W062°33.340'), con agua de bebida conteniendo una concentración de F⁻ mayor a 2 ppm. Posee una superficie de 193,5 hectáreas, de las cuales se destinan 77,5 para la cría bovina. El plantel estaba compuesto por 45 vacas, 30 terneros y 1 toro. La alimentación del rodeo se basaba en campo natural y avena, suplementado con rollo durante el invierno. El servicio era de tipo natural y continuo, con una edad promedio de las vaquillonas de 24 meses al momento del primer servicio. En este establecimiento la preñez alcanzaba valores del 75%, con los animales en CC=3.

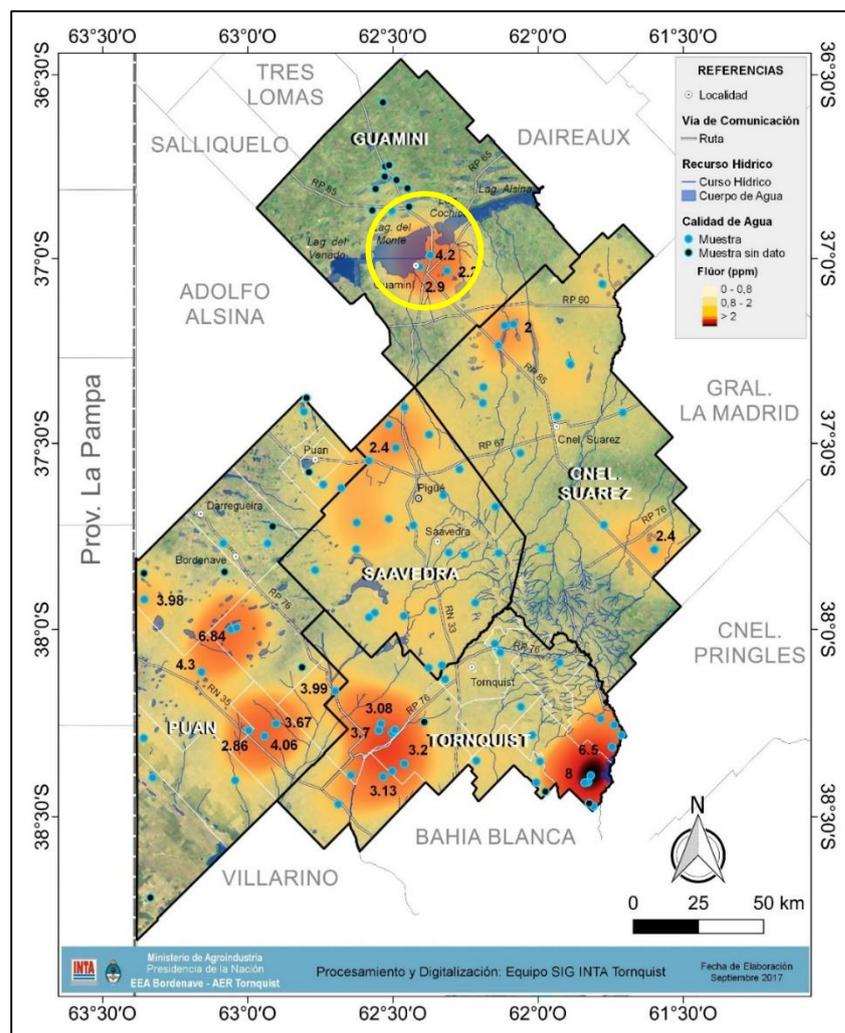


Figura 1: Ubicación geográfica de los establecimientos muestreados. (Equipo SIG INTA Tornquist)

1.2) Recolección de las muestras: En cada establecimiento se recolectaron muestras de agua, alimentos y suero bovino, en las estaciones climáticas de invierno y verano, durante 2 años consecutivos (2015-2016). Las muestras de suero se obtuvieron por punción yugular de 24 vacas de más de 3 años de edad y/o con más de dos pariciones en su vida. En los casos que el número de animales fuera mayor al de 24, la selección se realizó al azar teniendo en cuenta las características mencionadas anteriormente. Posteriormente, las muestras de sangre extraídas se centrifugaron en centrífuga Sigma durante 10 minutos a 1500 rpm para la obtención de suero. Estas muestras se mantuvieron refrigeradas hasta el momento del envío al Laboratorio de Bioquímica Clínica de la EEA INTA Balcarce. Una vez en el laboratorio se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

Las muestras de forrajes se obtuvieron recorriendo los potreros donde los animales pastoreaban y juntando aproximadamente 1 kg de material vegetal. Estas muestras fueron remitidas al laboratorio de Bioquímica Clínica de la EEA INTA Balcarce, donde se dispusieron en estufas de secado Dalvo hasta peso constante, a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego fueron molidas en un molino Arcano hasta obtener un tamaño de partícula menor a 0,2 mm. En estas condiciones se mantuvieron en estufa a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Las muestras de agua se obtuvieron de todas las fuentes de abrevado, molinos, bebederos y/o lagunas. Se recolectó un litro de agua en cada punto de abrevado, en envases plásticos (PET), perfectamente limpios. El envase se enjuagó 4 a 5 veces con el agua a muestrear antes de la recolección definitiva. Las muestras recolectadas se refrigeraron hasta su envío y procesamiento en el Laboratorio de Bioquímica Clínica de la EEA INTA Balcarce. Una alícuota de la muestra fue mantenida refrigerada para la realización de los análisis mientras que otra alícuota fue congelada y almacenada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ con el fin de mantener un banco de muestras de agua.

2. **Metodología analítica**

La metodología analítica aplicada al análisis de las muestras fue variable, en función del tipo de matriz (suero, agua o pasto).

2.1) Suero: Sobre las muestras de suero, recolectadas según el punto 1.2, se realizó la determinación de F^- , Ca, P, Mg, Cu, Zn y actividad de ceruloplasmina oxidasa (ACO), de acuerdo a los protocolos que se detallan a continuación:

2.1.1) Determinación de F^- : La medición de la concentración de F^- en suero se realizó por potenciometría utilizando un electrodo de ion específico Orion 94-09 y un electrodo de referencia de Ag/AgCl conectados a un conversor analógico digital (Figuras 4, 5 y 6). Previo a la determinación potenciométrica, el F^- fue extraído de las muestras por microdifusión isotérmica, tratando la muestra con ácido fosfórico (H_3PO_4) concentrado durante 24 hs a $60^\circ C$ y recuperando el ácido fluorhídrico (HF) desprendido de la muestra sobre 5 μl de NaOH 1,65 N depositado en la tapa de la cámara de destilación. Luego de la destilación isotérmica, la trampa de NaOH se ajustó a pH 5-5,5 con ácido acético (CH_3COOH) glacial diluido 1/60 (v/v) con agua desionizada. Los cálculos se realizaron relacionando el potencial desarrollado por los electrodos y el logaritmo de la concentración de F^- en la muestra y/o los patrones utilizados, a través de un software de hojas de cálculo (Rigalli y Puche, 2007).

2.1.2) Determinación de Ca: La muestra de suero se diluyó con cloruro de lantano ($LaCl_3$), el cual controla las interferencias químicas de la determinación. En sendos tubos de ensayo se diluyeron 0,25 ml de suero en 0,50 ml de $LaCl_3$ al 1% + 9,25 ml de agua desionizada. La longitud de onda utilizada fue de 422,7 nm.

2.1.3) Determinación de P: Se tomaron 0,02 ml de suero y se diluyeron con 4 ml de agua desionizada y 1 ml de reactivo de ácido ascórbico, necesario para el desarrollo de color. Luego de 30 minutos de reacción, se realizó la lectura de absorbancia a 820 nm en espectrofotómetro UV-Vis (Figura 3) y se calculó la concentración de P en la muestra, en función de una curva construida con estándares de concentración conocida (Cseh *et al.*, 1994).

2.1.4) Determinación de Mg: Se tomaron 0,2 ml de suero y se diluyeron en 9,8 ml de agua desionizada. La longitud de onda utilizada fue de 285,2 nm.

2.1.5) Determinación de Cu: Se tomó 1 ml de suero y se diluyó con 4 ml de agua desionizada. La longitud de onda utilizada fue de 324,8 nm.

2.1.6) Determinación de Zn: Se tomó 1 ml de suero y se diluyó con 4 ml de agua desionizada. La longitud de onda utilizada fue de 213,9 nm.

Las determinaciones de Ca, Mg, Cu y Zn se realizaron por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 700 (Figura 2). Este equipo posee un software capaz de realizar los cálculos de concentración en función de las diluciones realizadas. No se requieren cálculos complementarios. Las diluciones y condiciones empleados para cuantificar a estos minerales son las establecidas por el fabricante del equipo. (Perkin Elmer, 2000)

2.1.7) Determinación de ACO: Siguiendo el método propuesto por Bingley *et al* (1978), en tres tubos por cada muestra se colocaron 2 ml de buffer acético-acetato y 0,1 ml de suero. A uno de los tubos se le agregó 1 ml de solución de azida sódica y a todos los tubos 1 ml de substrato *p*-PD, recién preparado. Se agitaron e incubaron en baño maría a 37 °C durante una hora. Se retiraron del baño y se agregó 1ml de azida sódica a los dos tubos restantes de cada muestra. Se realizó la lectura de absorbancia dentro de los 30' a 530 nm en espectrofotómetro T-80 (Figura 3).



Figura 2: Equipo de absorción atómica Perkin Elmer AAnalyst 700.



Figura 3: espectrofotómetro UV-Vis PG Instruments T-80.

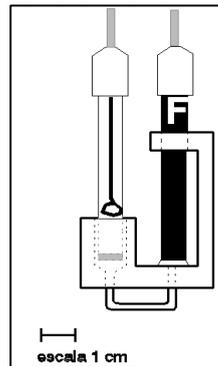


Figura 4: Soporte de electrodos y puente salino.

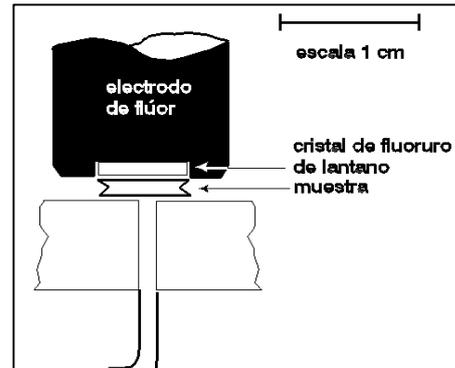


Figura 5: Detalle de la unión entre el electrodo y la muestra.

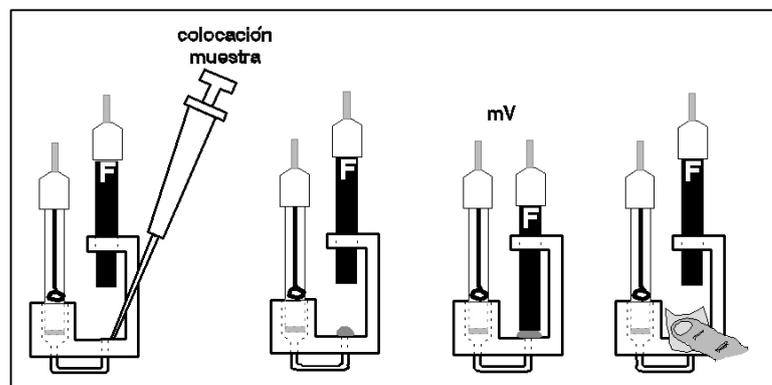


Figura 6: Ciclo de colocación, lectura y extracción de las muestras.

2.2) Forrajes: Sobre las muestras de forraje recolectadas según el punto 1.2, se realizó la determinación de F^- , Ca, P, Mg, SO_4^{2-} , Na, K, Cu, Zn, Mo y lignina de acuerdo a los protocolos que se detallan a continuación:

2.2.1) Determinación de F^- : La medición de la concentración de F^- en material vegetal se realizó por potenciometría utilizando un electrodo de ion específico Orion 94-09 y un electrodo de referencia de Ag/AgCl conectados a un conversor analógico digital. Previo a la determinación potenciométrica, el F^- fue aislado de las muestras por microdifusión isotérmica, tratando la muestra con H_3PO_4 concentrado durante 24 hs a $60\text{ }^\circ\text{C}$ y recuperando el HF desprendido de la muestra sobre $5\text{ }\mu\text{l}$ de NaOH 1,65 N depositado en la tapa de la cámara de destilación. Luego de la destilación isotérmica, la trampa de NaOH se ajustó a pH 5-5,5 con H_3COOH glacial diluido 1/120 (v/v) con agua desionizada. Los cálculos se realizan relacionando el potencial desarrollado por los electrodos y el logaritmo de la concentración de F^- en la muestra y/o los patrones utilizados, a través de un software de hojas de cálculo (Rigalli y Puche, 2007).

2.2.2) Determinación de Ca: Se colocaron 200 mg de pasto seco y molido en tubos de digestión y se les agregó (HClO₄ / HNO₃) (2 ml / 2 ml). Se efectuó una digestión húmeda durante 1 hora a 120 ° C y 1 hora a 150 ° C. Finalizado este proceso, el digesto se filtró a través de papel de filtro cualitativo (11 cm de diámetro y tamaño de poro de 14 micrones) y se retomó con agua desionizada, llevando a un volumen de 100 ml en matraz aforado. De esa solución se colocaron 20 ml en un matraz de 50 ml, se agregaron 5 ml de LaCl₃ 1% y se diluyeron en 50 ml de agua desionizada. La lectura se realizó por EAA. La longitud de onda utilizada fue de 422,7 nm.

2.2.3) Determinación de P: Se pesaron 200 mg de pasto seco y molido en sendos tubos de digestión y se les agregó (HClO₄ / HNO₃) (2 ml / 2 ml). Se colocaron los tubos en el equipo de digestión durante 1 hora a 120 ° C y 1 hora a 150 ° C. El digesto obtenido se recuperó de los tubos de digestión utilizando pequeños volúmenes de agua desionizada y trasvasando a un matraz de 100 ml. Se realizó la lectura de absorbancia a 820 nm, en espectrofotómetro T-80 y se calculó la concentración de P en la muestra, en función de una curva construida con estándares de concentración conocida (Chen *et al.*, 1956).

2.2.4) Determinación de Mg: Se colocaron 200 mg de pasto seco y molido en tubos de digestión y se les agregó (HClO₄ / HNO₃) (2 ml / 2 ml). Se efectuó una digestión húmeda durante 1 hora a 120 ° C y 1 hora a 150 ° C. Finalizado este proceso, el digesto se filtró a través de papel de filtro cualitativo (11 cm de diámetro y tamaño de poro de 14 micrones) y se retomó con agua desionizada, llevando a un volumen de 100 ml en matraz aforado. De esa solución se colocaron 5 ml en un matraz de 50 ml y se diluyeron con agua desionizada. La lectura se realizó por EAA. La longitud de onda utilizada fue de 285,2 nm.

2.2.5) Determinación de Cu: Se colocaron 500 mg de pasto seco y molido en tubos de digestión y se les agregó (H₂SO₄ / HClO₄ / HNO₃) (2 ml / 2 ml / 2 ml). Se efectuó una digestión húmeda durante 1 hora a 150 ° C y 1 hora a 250 ° C. Finalizada la digestión, se dejó enfriar el digesto y se resuspendió con agua desionizada en matraz aforado de 25 ml. De esta dilución se efectuaron las lecturas por EAA. La longitud de onda utilizada fue 324,8 nm.

2.2.6) Determinación de Zn: Se colocaron 500 mg de pasto seco y molido en tubos de digestión y se les agregó (H₂SO₄ / HClO₄ / HNO₃) (2 ml / 2 ml / 2 ml). Se efectuó una digestión húmeda durante 1 hora a 150 ° C y 1 hora a 250 ° C. Finalizada la digestión, se dejó enfriar el digesto y se re suspendió con agua desionizada en matraz aforado de 25 ml. De esta dilución se colocó 1 ml en tubo de ensayo, se agregaron 3 ml de agua

desionizada y se efectuaron las lecturas por EAA. La longitud de onda utilizada fue de 213,9 nm.

2.2.7) Determinación de SO_4^{2-} : Se pesó 1 gramo de pasto seco y molido en un crisol de porcelana con 5 ml de HCl al 20% y se llevó a mufla durante 5 horas a 500 °C. Luego de este proceso, se agregaron 5 ml de HCl al 20% y se retomó el digesto (previa filtración) en matraz aforado de 50 ml con agua desionizada caliente. Se realizó el mismo procedimiento colocando un crisol con 1 ml de agua desionizada (blanco) y 1, 2 y 3 ml de estándar para hacer la curva de calibración. La lectura se realizó en un espectrofotómetro UV-Vis a 668 nm, con el agregado de cloruro de bario ($BaCl_2$), lo que condujo a la formación de sulfato de bario ($BaSO_4$) con los sulfatos provenientes de la muestra, otorgando turbidez al medio. El $BaSO_4$ formado fue mantenido en suspensión por el agregado de 5 ml de KCl 40 % (v/v) (Bingley y Dick, 1967).

2.2.8) Determinación de K: Se pesaron 200 mg de pasto seco y molido en tubo de digestión y se les agregó ($HClO_4 / NHO_3$) (2 ml / 2 ml). Se realizó la digestión húmeda durante 1 hora a 120 °C y 1 hora a 150 °C. Una vez terminada la digestión se dejó enfriar y se retomó el digesto con agua desionizada en matraz de 100 ml. De la solución de 100 ml se tomó 1 ml en tubo de ensayo, se agregaron 0,5 ml de $LaCl_3$ y 9,8 ml de agua desionizada, se agitó y se cuantificó por emisión en espectrofotómetro AAnalyst 700.

2.2.9) Determinación de Mo: Se pesaron 500 mg de pasto seco y molido por triplicado, en sendos tubos de digestión y se les agregó ($H_2SO_4 / HClO_4 / HNO_3$) (2 ml / 2 ml / 2 ml). Se realizó la digestión húmeda por 60 min a 150 °C y 60 min a 250°C. Posteriormente se resuspendieron los digestos en matraces de 25 ml y se llevaron a volumen con agua desionizada. Desde los matraces se tomaron 5 ml en un tubo de ensayo y se les agregó (H_2O / HNO_3) (5 ml / 0,02 ml). La cuantificación se realizó utilizando el horno de grafito del equipo de absorción atómica AAnalyst 700 (HG-EAA).

2.2.10) Determinación de Na: Se pesaron 200 mg de pasto seco y molido en tubo de digestión y se les agregó ($HClO_4 / NHO_3$) (2 ml / 2 ml). Se realizó la digestión húmeda durante 1 hora a 120 °C y 1 hora a 150 °C. Una vez terminada la digestión se dejó enfriar y se retomó el digesto con agua desionizada en matraz de 100 ml. De la solución de 100 ml se tomaron 4 ml y se agregaron 6 ml de KCl al 0,1%. Se realizó la cuantificación por el método de emisión, utilizando el espectrofotómetro AAnalyst 700.

La mineralización del material vegetal se realizó en el equipo de digestión húmeda Velp DK-20 (Figura 7). Este equipo permite la selección y automatización de rampas de tiempo y temperatura, lo que facilita la estandarización del proceso de digestión húmeda con ácidos.



Figura 7: Bloque de digestión Velp DK-20.

2.2.11) Determinación de lignina: esta determinación se realizó en el Laboratorio de Nutrición y Evaluación de Forrajes de la EEA INTA Balcarce, según la metodología propuesta por Goering y Van Soest (1970).

2.3) Agua: Sobre las muestras de agua, recolectadas según el punto 1.2, se realizaron las siguientes determinaciones: F^- , Ca, Mg, Cu, Zn, RS, SO_4^{2-} , y pH.

2.3.1) Determinación de F^- : El contenido de flúor se realizó por potenciometría directa sobre una muestra de 10 μ l de agua, estabilizada con 100 μ l de solución TISAB (por sus siglas en inglés de *total ionic strength adjustment buffer*). La lectura se efectuó con un electrodo de ion específico Orion 94-09 y un electrodo de referencia de Ag/AgCl conectados a un conversor analógico digital. El cálculo de concentración se hizo con una curva de calibración realizada con estándares comerciales de F^- . El equipo de potenciometría posee un software que brinda una curva de potencial en función de la concentración. Utilizando estos datos se calcularon las concentraciones usando un software de hojas de cálculo (Rigalli *et al.*, 1999).

2.3.2) Determinación de Ca: Se realizó una dilución de 2,5 ml de muestra con 5 ml de $LaCl_3$ y se llevó a un volumen final de 50 ml con agua desionizada. La lectura se realizó por EAA, utilizando una longitud de onda de 422,7 nm.

2.3.3) Determinación de Mg: Se realizó una dilución de 1 ml de muestra en 100 ml de agua desionizada. La lectura se efectuó por EAA, utilizando una longitud de onda de 285,2 nm.

2.3.4) Determinación de Cu: La lectura se realizó por EAA, sin diluciones previas de la muestra. La longitud de onda utilizada fue de 324,8 nm.

2.3.5) Determinación de Zn: La lectura se realizó por EAA, sin diluciones previas de la muestra. La longitud de onda utilizada fue de 213,9 nm.

2.3.6) Determinación de RS: Se determinó por gravimetría. Se evaporaron 50 ml de cada muestra en cápsulas de porcelana sobre un baño de María a ebullición. Las cápsulas estaban previamente taradas, y por diferencia de peso, antes y después de la evaporación de la muestra, se obtuvo el valor correspondiente al contenido de residuo seco o sales totales, en mg/l.

2.3.7) Determinación de SO_4^{2-} : Se realizó por turbidimetría. A una dilución de la muestra de agua (1:100 con agua desionizada) se le agregó cloruro de bario ($BaCl_2$), lo que condujo a la formación de sulfato de bario ($BaSO_4$) con los sulfatos provenientes de la muestra, otorgando turbidez al medio. El $BaSO_4$ formado fue mantenido en suspensión por el agregado de 5 ml de KCl 40 % (v/v). La cuantificación se realizó con una curva de calibración hecha con una solución estándar de sulfato de potasio (K_2SO_4) anhidro. Se utilizó un espectrofotómetro T-80 UV-Vis a una longitud de onda de 668 nm (Cseh *et al.*, 1993).

2.3.8) Determinación de pH: Se realizó por potenciometría, utilizando un electrodo combinado Orion. El equipo se ajustó antes de cada uso con soluciones buffer comerciales de pH conocido (pH= 4 y pH=7, respectivamente).

3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos, se propuso un diseño completamente aleatorizado (DCA), el cual respetó los principios del diseño experimental: a) aleatorización (los animales se eligieron al azar), b) repeticiones (se trabajó con 24 animales en cada establecimiento) y c) control local (en cada caso se seleccionaron los establecimientos en función de la concentración de F^- en el agua de bebida). En este trabajo se pusieron a prueba las siguientes hipótesis estadísticas:

H_0 : $\tau_i = 0$ No hubo efecto del F^- sobre la variable respuesta

H_1 : $\tau_i \neq 0$ Hubo efecto del F^- sobre la variable respuesta.

Los datos obtenidos fueron tratados como MEDIAS \pm D.E., y dichas medias fueron analizadas por el test de Tukey de comparaciones múltiples.

El modelo estadístico que se planteó fue el siguiente:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + e_{ij}$$

Donde:

y_{ij} = valor de la variable respuesta para el i -ésimo nivel de F^- y en el j -ésimo animal.

μ = media poblacional de la variable respuesta.

τ_i = efecto del i -ésimo nivel de F^-

e_{ij} = error experimental asociado al i -ésimo nivel de F^- y el j -ésimo animal.

Para la descripción del modelo propuesto se realizó un cuadro ANOVA, utilizando R como programa estadístico (R Core Team, 2017). En los casos donde se encontró variaciones en la variable respuesta, se probó la existencia de interacción entre la dosis de F^- en el agua y la estación climática donde tuvo lugar el muestreo (VERANO o INVIERNO). Las hipótesis estadísticas que se pusieron a prueba en el caso de la interacción fueron:

H_0 : $(\tau\beta)_{ij} = 0$ No hay efectos de la interacción entre los niveles de F^- y la estación climática sobre la respuesta media de la variable respuesta.

H_1 : $(\tau\beta)_{ij} \neq 0$ Hay efectos de la interacción entre los niveles de F^- y la estación climática sobre la respuesta media de la variable respuesta.

Donde:

τ corresponde a cada dosis de F^- en agua de bebida.

β corresponde a cada estación climática.

En todos los casos, la variable respuesta fue el valor promedio de F⁻, Ca, P, Mg, Zn, Cu y ACO, en suero.

4. Puesta a punto de la metodología para la determinación de F⁻ en agua

Para la puesta a punto de la medición potenciométrica de F⁻ en muestras de agua, se procedió según lo propuesto por la AOAC (2016) en su Apéndice F: Guía de Requerimientos de Desempeño para Métodos Estándar. En esta guía, el F⁻ en muestras de agua se clasifica como un elemento traza (<100 g/kg), y la potenciometría directa como un método cuantitativo. Basados en esta clasificación del elemento y la técnica, los parámetros a evaluar fueron:

4.1) Límite de detección (LOD)

La AOAC (2016) lo define como la menor concentración de analito capaz de ser cuantificado, con un 99% de probabilidad que no sea un ruido propio del equipo. En base a este criterio se considera que la cuantificación por debajo del LOD deja de ser confiable debido a que la incertidumbre asociada a la medición sería mayor al valor de la medición propiamente dicho. Este parámetro se puede calcular y expresar numéricamente a través de la siguiente fórmula

$$LOD = Bco + 3 \times Sbco$$

donde:

Bco: Señal promedio de la lectura de 10 blancos de calibración.

Sbco: Desvío estándar asociado a esos 10 datos.

4.2) Rango aplicable

Este criterio puede definirse como el rango de concentraciones de F⁻ que el método fue capaz de medir directamente. Se caracteriza por el intervalo que va desde el LOD hasta el último estándar de la recta de calibración con el que se haya comprobado la linealidad, multiplicado por el factor de dilución de la muestra (Fd), si corresponde.

$$LInf = LOD$$

Donde:

LInf: Límite inferior del rango de aplicable.

$$LSup = [St] \times Fd$$

Donde:

LSup: Límite superior del rango de aplicable.

Fd: factor de dilución de la muestra.

[St]: Concentración del último estándar de la curva de calibración.

4.3) Bias

Refleja el grado de correlación entre una respuesta generada por el equipo y la respuesta teórica esperada en función de la concentración. Puede ser estimado por la diferencia entre el valor promedio medido de un material de referencia y su valor teórico. Dicho material de referencia puede ser analizado varias veces bajo condiciones de repetibilidad o de precisión intermedia. Es un componente del error sistemático (AOAC, 2016). En este trabajo se utilizaron diluciones de una solución estándar certificada de 100 ppm de F⁻ (Thermo Orion) en agua bidestilada. Se analizaron 10 réplicas independientes en tres niveles de fortificación (8; 1,9 y 0,8 ppm) y el Bias se calculó en función de la diferencia entre la concentración agregada y lo medido. El criterio de aceptación (CA) que se estableció corresponde a los informes de conferencias de Shah y colaboradores (Shah *et al.*, 1992; Shah, *et al.* 2000), ampliamente aceptado en análisis bio-analíticos. El cálculo fue:

$$Bias \% = \left[\left(\frac{Co}{Ca} \right) - 1 \right] \times 100$$

Co: Concentración obtenida.

Ca: Concentración agregada.

4.4) Precisión

Representa el grado de dispersión entre los valores obtenidos por medidas repetidas sobre un mismo objeto, bajo condiciones específicas. Este parámetro depende de la matriz de la muestra y de la concentración del analito, por lo que puede diferir ampliamente entre altas y bajas concentraciones. Está asociada sólo con el error aleatorio. El diseño para la validación de técnicas por un solo laboratorio ofrece la posibilidad de caracterizarlo mediante la repetibilidad y la precisión intermedia (AOAC, 2016; Ruggieri *et al.*, 2016):

4.4.1) Repetibilidad

Refleja el grado de concordancia entre resultados de mediciones independientes realizadas con el mismo método, sobre la misma matriz, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, en el mismo día. En este trabajo se analizaron en un mismo día 5

réplicas independientes de 3 muestras con diferentes niveles de concentración de F⁻ (5; 1,9 y 0,5 ppm).

Se caracterizó el coeficiente de variación % (Cvr %) para cada muestra:

$$Cvr \% = \left(\frac{Sm}{Xm} \right) \times 100$$

Sm: desvío estándar de la medida de las réplicas en cada concentración.

Xm: promedio de las medidas de las réplicas en cada concentración.

4.4.2) Precisión intermedia

Este parámetro pone de manifiesto el grado de concordancia entre resultados de análisis independientes obtenidos con el mismo método, sobre la misma muestra, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, en diferentes días, con diferentes curvas de calibración. Se analizaron en diferentes días 5 réplicas independientes de una misma muestra, y se caracterizó el CVpi% total. El CA establecido es el sugerido por la AOAC en su apéndice F (2016) para la precisión por repetibilidad asumiendo que la variación entre días no debe ser significativa.

$$CVpi \% = \left(\frac{SM}{XM} \right) \times 100$$

SM: Desvío estándar de las medidas de las réplicas a través de los días.

XM: Media de las medidas de las réplicas a través de los días.

4.5) Recuperación

Indica el porcentaje del analito que es cuantificado a partir de una muestra fortificada. Para la cuantificación de F⁻ en agua y suero, se analizaron 7 repeticiones en 4 niveles de fortificación (0,5; 1; 2 y 5 ppm).

En todos los casos las fortificaciones se realizaron a partir de diluciones de una solución estándar certificada de 100 ppm de F⁻ (Thermo Orion). El CA establecido es sugerido por la AOAC (2016) en su apéndice F, en función de la concentración de la muestra. Se caracterizó el parámetro realizando el promedio porcentual de recuperación para cada nivel de concentración,

$$Rec \% = \left(\frac{M1 - M0}{Cf} \right) \times 100$$

M1: Concentración leída en la muestra fortificada.

M0: Concentración leída en la muestra sin fortificar.

Cf: Concentración de fortificación.

5. Puesta a punto de la metodología para la determinación de F⁻ en suero bovino y material vegetal

Para la puesta a punto de esta metodología se tuvieron en cuenta los mismos parámetros de performance evaluados en la metodología de medición de F⁻ en agua.

La principal diferencia metodológica en la medición de F⁻ en suero bovino y material vegetal, consistió en la cuantificación potenciométrica de F⁻. Mientras que en las muestras de agua se efectuó una determinación por potenciometría directa, en las muestras de suero y material vegetal se realizó una microdestilación isotérmica. Dicha metodología consistió en colocar en una cámara de destilación una cantidad de muestra conocida (100 µL de suero bovino o 100 mg de material vegetal seco y molido) junto con un volumen conocido de H₃PO₄. Este volumen fue de 100 µL en el caso de las muestras de suero y 300 µL en el caso de muestras de material vegetal.

En la tapa de la cámara de destilación se colocaron 5 µL de NaOH 1,65 N; se procedió a tapar las cámaras y se efectuó la destilación durante 24 hs a 60 °C. En estas condiciones el *flúor ácido lábil* (FAL) es liberado desde la muestra como FH y atrapado en el NaOH, formando fluoruro de sodio (NaF), el cual es cuantificado posteriormente por potenciometría, previo ajuste de pH=5-5,5 con una solución acuosa de ácido acético 1/60 (v/v).

Para la caracterización de los parámetros de calidad de las metodologías para suero y material vegetal se utilizaron las siguientes concentraciones:

BIAS: 18, 8 y 1,9 ppm

REPETIBILIDAD: 5; 1,9 y 0,5 ppm

RECUPERACION (suero): 0,5; 1; 2 y 5 ppm

RECUPERACION (pasto): 1, 2 y 5 ppm.

RESULTADOS

1) **Puesta a punto de la metodología analítica para la determinación de F⁻ en suero, material vegetal y agua:** Para facilitar la lectura se muestran las tablas con los resultados de cada parámetro evaluado junto con el criterio de aceptación (CA). Los resultados desglosados de los análisis se encuentran en el ANEXO C.

MATRIZ	PARÁMETRO DE CALIDAD	RESULTADO	CA	REFERENCIA	
SUERO	LÍMITE DE DETECCIÓN (ppm)	0,28	< 0,50	(Rigalli y Puche, 2007)	
	RANGO APLICABLE (ppm)	0,28 - 8,00	-	-	
	BIAS	18 ppm	-6,27	15%	(Shah et al., 2000)
		8 ppm	4,16		
		1,9 ppm	6,89		
	REPETIBILIDAD (CV%)	5 ppm	7,12	<21%	(AOAC,2016)
		1,9 ppm	3,40		
		0,5 ppm	1,81		
	PRECISIÓN INTERMEDIA (CV%)	8,28	< 21%	(AOAC,2016)	
	RECUPERACIÓN (%)	0,5 ppm	88,57	80-110 %	(AOAC ,2016)
		1 ppm	103,43		
		2 ppm	101,64		
5 ppm		100,29			

Tabla 3: Parámetros de calidad de la puesta a punto de la metodología analítica para la determinación de F⁻ en suero bovino.

MATRIZ	PARÁMETRO DE CALIDAD	RESULTADO	CA	REFERENCIA	
PASTO	LÍMITE DE DETECCIÓN (ppm)	1,01	3,5	(Bunce,1985)	
	RANGO APLICABLE (ppm)	1,01 - 8,00	-	-	
	BIAS	18 ppm	-2,43	15%	(Shah et al., 2000)
		8 ppm	0,04		
		1,9 ppm	5,26		
	REPETIBILIDAD (CV%)	5 ppm	8,18	<21%	(AOAC,2016)
		1,9 ppm	5,08		
		0,5 ppm	8,94		
	PRECISIÓN INTERMEDIA (CV%)	6,86	<21%	(AOAC,2016)	
	RECUPERACIÓN (%)	1 ppm	96,86	80-110 %	(AOAC, 2016)
		2 ppm	94,64		
		5 ppm	94,46		

Tabla 4: Parámetros de calidad de la puesta a punto de la metodología analítica para la determinación de F⁻ en material vegetal.

MATRIZ	PARÁMETRO DE CALIDAD	RESULTADO	CA	REFERENCIA	
AGUA	LÍMITE DE DETECCIÓN (ppm)	0,34	0,50	(Rigalli y Puche, 2007)	
	RANGO APLICABLE (ppm)	0,34 - 8,00	2,00	-	
	BIAS	9 ppm	2,06	15%	(Shah et al., 2000)
		1,9 ppm	0,11		
		0,8 ppm	-3,38		
	REPETIBILIDAD (CV%)	5 ppm	9,90	<21%	(AOAC,2016)
		1,9 ppm	6,48		
		0,5 ppm	8,74		
	PRECISIÓN INTERMEDIA (CV%)	9,68	<21%	(AOAC,2016)	
	RECUPERACIÓN (%)	0,5 ppm	90,57	80-110 %	(AOAC,2016)
		1 ppm	93,71		
		2 ppm	99,29		
		5 ppm	102,26		

Tabla 5: Parámetros de calidad de la puesta a punto de la metodología analítica para la determinación de F⁻ en agua.

2) Cuantificación de F⁻, Ca, P, Mg, Zn, Cu y ACO en suero bovino: Para facilitar la interpretación de los resultados, los muestreos se identificaron como **VERANO 1**, **VERANO 2**, **INVIERNO 1** e **INVIERNO 2**, respectivamente. Se presentan tablas a modo de resumen, con los valores promedios ± DE (desvío estándar) obtenidos para cada analito (n=24) en cada establecimiento y estación climática.

2.1) Cuantificación de F⁻ (ppm): En la siguiente tabla se muestran los promedios ± DE, de F⁻ sérico, hallados en cada establecimiento y estación climática.

	VERANO 1	INVIERNO 1	VERANO 2	INVIERNO 2	V.R.
CONTROL	1,31 ± 0,60	3,46 ± 0,29	0,76 ± 0,28	1,44 ± 0,82	0,20-0,50 (ppm)
DB	1,14 ± 0,67	3,38 ± 0,93	SIN DATOS	2,38 ± 0,70	
DMA	1,48 ± 0,44	5,18 ± 2,96	0,98 ± 0,23	3,06 ± 1,34	
DT	1,39 ± 0,53	5,42 ± 2,23	0,65 ± 0,29	4,05 ± 2,10	

Tabla 6: Valores promedio de F⁻ (ppm) en suero, por establecimiento y estación.

En todas las muestras analizadas se encontraron valores séricos de F⁻ superiores a los valores de referencia, encontrándose valores más elevados en invierno que en verano.

2.2) Cuantificación de Ca (mg/100 mL): En la siguiente tabla se muestran los promedios \pm DE, de Ca sérico hallados en cada establecimiento y estación climática.

	VERANO 1	INVIERNO 1	VERANO 2	INVIERNO 2	V.R.
CONTROL	10,90 \pm 1,20	11,10 \pm 1,10	12,10 \pm 0,60	10,80 \pm 0,80	9,50-12,50 (mg/100 ml)
DB	9,90 \pm 0,60	9,70 \pm 0,70	SIN DATOS	11,00 \pm 0,60	
DMA	12,00 \pm 1,40	10,50 \pm 0,80	11,30 \pm 1,20	10,90 \pm 1,00	
DT	12,00 \pm 0,70	11,30 \pm 1,10	12,10 \pm 0,80	10,30 \pm 0,80	

Tabla 7: Valores promedio de Ca (mg/100 ml) en suero, por establecimiento y estación.

2.3) Cuantificación de P (mg/100 mL): En la siguiente tabla se muestran los promedios \pm DE, de P sérico hallados en cada establecimiento y estación climática.

	VERANO 1	INVIERNO 1	VERANO 2	INVIERNO 2	V.R.
CONTROL	4,40 \pm 1,10	5,40 \pm 0,80	5,50 \pm 0,80	6,70 \pm 1,00	3,50-7,50 (mg/100 ml)
DB	6,90 \pm 0,90	5,60 \pm 1,00	SIN DATOS	4,60 \pm 0,60	
DMA	6,50 \pm 1,30	5,50 \pm 0,90	5,40 \pm 0,80	5,80 \pm 0,90	
DT	5,00 \pm 1,30	4,10 \pm 0,60	6,20 \pm 0,60	5,00 \pm 0,80	

Tabla 8: Valores promedio de P (mg/100 ml) en suero, por establecimiento y estación.

2.4) Cuantificación de Mg (mg/100 mL): En la siguiente tabla se muestran los promedios \pm DE, de Mg sérico, hallados en cada establecimiento y estación climática.

	VERANO 1	INVIERNO 1	VERANO 2	INVIERNO 2	V.R.
CONTROL	1,70 \pm 0,30	1,80 \pm 0,10	1,80 \pm 0,20	1,60 \pm 0,20	1,80-3,20 (mg/100 ml)
DB	2,00 \pm 0,30	1,50 \pm 0,20	SIN DATOS	1,30 \pm 0,20	
DMA	1,60 \pm 0,20	1,60 \pm 0,20	1,70 \pm 0,20	1,90 \pm 0,20	
DT	1,7	1,8	1,5	2	

Tabla 9: Valores promedio de Mg (mg/100 ml) en suero, por establecimiento y estación.

Se detectó hipomagnesemia en el 53,33% de los muestreos, siendo de origen primario en el 87,5% de los casos; y secundaria asociada a exceso de K en las pasturas en los casos restantes.

Como puede observarse el resto de los macroelementos analizados en sangre se encontraban dentro del rango normal.

2.5) Cuantificación de Cu (ppm): En la siguiente tabla se muestran los promedios \pm DE, de Cu sérico hallados en cada establecimiento y estación climática.

	VERANO 1	INVIERNO 1	VERANO 2	INVIERNO 2	V.R.
CONTROL	0,80 \pm 0,10	0,30 \pm 0,10	0,40 \pm 0,10	0,50 \pm 0,10	0,60-1,50 (ppm)
DB	0,40 \pm 0,10	0,30 \pm 0,10	SIN DATOS	0,40 \pm 0,10	
DMA	0,60 \pm 0,10	0,40 \pm 0,10	0,40 \pm 0,10	0,50 \pm 0,10	
DT	0,50 \pm 0,10	0,20 \pm 0,10	0,30 \pm 0,10	0,40 \pm 0,10	

Tabla 10 Valores promedio de Cu (ppm) en suero, por establecimiento y estación.

2.6) Cuantificación de Zn (ppm): En la siguiente tabla se muestran los promedios \pm DE, de Zn sérico hallados en cada establecimiento y estación climática.

	VERANO 1	INVIERNO 1	VERANO 2	INVIERNO 2	V.R.
CONTROL	0,70 \pm 0,10	0,60 \pm 0,10	0,80 \pm 0,10	0,70 \pm 0,10	0,50-1,50 (ppm)
DB	0,70 \pm 0,20	0,40 \pm 0,10	SIN DATOS	0,60 \pm 0,10	
DMA	0,90 \pm 0,10	0,50 \pm 0,10	0,70 \pm 0,10	0,60 \pm 0,10	
DT	0,70 \pm 0,10	0,50 \pm 0,10	0,70 \pm 0,10	0,90 \pm 0,30	

Tabla 11: Valores promedio de Zn (ppm) en suero, por establecimiento y estación.

Se observó hipocupremia en 14 muestreos de los 15 realizados a lo largo del estudio (93,33%). De este porcentaje, el 36% correspondió a hipocupremia de origen primario. El 64% restante correspondió a hipocupremia de origen secundario o condicionado. No se detectaron deficiencias de Zn.

2.7) Determinación de ACO: en la siguiente tabla se muestran los valores de ACO hallados en cada establecimiento durante el INVIERNO 2.

	CONTROL	DB	DMA	DT	V.R.
PROMEDIO	0,345	0,177	0,179	0,167	>0,50

Tabla 12: Valores promedio de ACO hallados para cada tratamiento.

En los cuatro tratamientos se encontraron valores de ACO menores al valor de referencia. Esta determinación solo pudo realizarse en las muestras correspondientes a INVIERNO 2, ya que los demás muestreos se vieron afectados por un corte de electricidad en el laboratorio de Bioquímica Clínica Veterinaria y se descongelaron.

3) Cuantificación de F⁻, Ca, P, Mg, K, SO₄²⁻, Na, Cu, Zn y Mo en material vegetal

Para poder caracterizar las posibles alteraciones en los valores séricos de F⁻, Ca, P, Mg, Zn y Cu, se cuantificaron estos mismos minerales y sus interferentes metabólicos en las muestras de pastura recolectadas en cada establecimiento y estación climática (n=15).

3.1) Establecimiento CONTROL

	Ca (%MS)	P (%MS)	Mg (%MS)	K (%MS)	SO ₄ ²⁻ (%MS)	Na (%MS)
VERANO 1	1	0,40	0,24	3,1	0,44	0,017
INVIERNO 1	0,16	0,05	0,06	0,15	0,04	0,010
VERANO 2	1,15	0,26	0,20	2,47	0,16	0,12
INVIERNO 2	0,48	0,19	0,14	2,31	0,12	0,12
V.R.	0,40	0,24	0,20	3	0,5	0,10

	Cu (ppm)	Zn (ppm)	Mo (ppm)	F ⁻ (ppm)
VERANO 1	13,3	47,6	2,3	n.d.
INVIERNO 1	2,9	17	0,6	n.d.
VERANO 2	6,8	35,7	1,2	n.d.
INVIERNO 2	7,7	29	0,85	n.d.
V.R.	5	>25	<2	<10

Tabla 13: Contenido de macro y oligoelementos en pasturas del establecimiento CONTROL, por estación. *n.d.= no detectado.*

3.2) Establecimiento DB

	Ca (%MS)	P (%MS)	Mg (%MS)	K (%MS)	SO ₄ ²⁻ (%MS)	Na (%MS)
VERANO 1	0,25	0,07	0,23	1,1	0,26	0,08
INVIERNO 1	0,14	0,09	0,06	0,93	0,15	0,09
INVIERNO 2	0,30	0,24	0,12	1,52	0,11	0,10
V.R.	0,40	0,24	0,20	3	0,5	0,10

	Cu (ppm)	Zn (ppm)	Mo (ppm)	F ⁻ (ppm)
VERANO 1	4,4	13,7	1,59	n.d.
INVIERNO 1	3,2	24,3	1,1	n.d.
INVIERNO 2	3,3	31,4	1,7	n.d.
V.R.	5	>25	<2	<10

Tabla 14: Contenido de macro y oligoelementos en pasturas del establecimiento DB, por estación. *Por razones de fuerza mayor, no hubo acceso a este establecimiento durante el segundo verano del ensayo, motivo por el cual no se realizaron muestreos.* n.d.= no detectado.

3.3) Establecimiento DMA

	Ca (%MS)	P (%MS)	Mg (%MS)	K (%MS)	SO ₄ ²⁻ (%MS)	Na (%MS)
VERANO 1	0,15	0,13	0,08	1,11	0,05	0,04
INVIERNO 1	0,84	0,18	0,12	1,29	0,17	0,01
VERANO 2	0,71	0,25	0,15	2,38	0,11	0,10
INVIERNO 2	0,26	0,19	0,11	1,48	0,07	0,10
V.R.	0,40	0,24	0,20	3	0,5	0,10

	Cu (ppm)	Zn (ppm)	Mo (ppm)	F ⁻ (ppm)
VERANO 1	1,7	15	0,4	n.d.
INVIERNO 1	5,2	14	6,85	n.d.
VERANO 2	5,7	32,7	3,6	n.d.
INVIERNO 2	3,65	29,5	2,5	n.d.
V.R.	5	>25	<2	<10

Tabla 15: Contenido de macro y oligoelementos en pasturas del establecimiento DMA, por estación. n.d.= no detectado.

3.4) Establecimiento DT

	Ca (%MS)	P (%MS)	Mg (%MS)	K (%MS)	SO ₄ ²⁻ (%MS)	Na (%MS)
VERANO 1	0,29	0,07	0,1	0,56	0,25	0,02
INVIERNO 1	0,21	0,18	0,07	2,2	0,09	0,09
VERANO 2	0,36	0,18	0,14	1,05	0,33	0,16
INVIERNO 2	0,35	0,43	0,15	3,29	0,21	0,16
V.R.	0,40	0,24	0,20	3	0,5	0,10

	Cu (ppm)	Zn (ppm)	Mo (ppm)	F ⁻ (ppm)
VERANO 1	5,0	15	1,7	n.d.
INVIERNO 1	5,8	15	0,9	n.d.
VERANO 2	5,0	45,5	2,0	n.d.
INVIERNO 2	7,06	41	2,0	n.d.
V.R.	5	>25	<2	<10

Tabla 16: Contenido de macro y oligoelementos en pasturas del establecimiento DT, por estación. *n.d*= no detectado.

4) Contenido de lignina (%) en material vegetal: Con el objetivo de estimar la abrasión sobre los dientes, producida por el alimento, se determinó el contenido de lignina en las muestras de pasturas obtenidas en cada establecimiento y estación climática (n=13). Este parámetro no tiene valores de referencia, pero se asume que a mayor porcentaje de lignina, más abrasivo será el material vegetal.

	VERANO 1	INVIERNO 1	VERANO 2	INVIERNO 2	PROMEDIO
CTRL	Sin dato	8,2 %	6,8 %	9,5 %	8,16 %
DB	8,3 %	9,5 %	Sin dato	10,7 %	9,50 %
DMA	4,2 %	9,9 %	9,9 %	7,7 %	7,90 %
DT	8,6 %	6,3 %	7,6 %	Sin dato	7,50 %

Tabla 17: Contenido de lignina (%) en las diferentes pasturas analizadas.

5) **Caracterización fisicoquímica de agua de bebida:** Las fuentes de agua (n=15) que utilizaron los animales durante el período del ensayo, fueron caracterizadas para conocer su calidad fisicoquímica y toxicológica; y para poder completar la caracterización de las posibles deficiencias minerales detectadas en los rodeos.

5.1) Establecimiento CONTROL

	pH	RS (mg/l)	SO ₄ ²⁻ (mg/l)	Ca (mg/l)	Mg (mg/l)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	F ⁻ (ppm)
VERANO 1	8,4	254	49	14	13	n.d.	n.d.	0,33
INVIERNO 1	8,9	332	46	27,5	14,8	n.d.	n.d.	0,28
VERANO 2	8,08	318	33	52,8	11,8	n.d.	n.d.	0,19
INVIERNO 2	8,9	276	68	17,3	13,2	n.d.	n.d.	0,22
VR	6,8-9,2	<7000	<1500	<200	<500	0,5	0,2	<2

Tabla 18: Caracterización fisicoquímica de la muestra de agua del establecimiento CONTROL. *n.d= no detectado.*

5.2) Establecimiento DB

	pH	RS (mg/l)	SO ₄ ²⁻ (mg/l)	Ca (mg/l)	Mg (mg/l)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	F ⁻ (ppm)
VERANO 1	7,5	366	6	26	14	n.d.	n.d.	0,50
INVIERNO 1	8	359	893	9,5	44,8	n.d.	n.d.	0,86
INVIERNO 2	8,6	442	60	24	13	n.d.	n.d.	0,42
VR	6,8-9,2	<7000	<1500	<200	<500	0,5	0,2	<2

Tabla 19: Caracterización fisicoquímica de la muestra de agua del establecimiento DB. *Por razones de fuerza mayor, no hubo acceso a este establecimiento durante el segundo verano del ensayo, motivo por el cual no se realizaron muestreos. n.d= no detectado*

5.3) Establecimiento DMA

	pH	RS (mg/l)	SO ₄ ²⁻ (mg/l)	Ca (mg/l)	Mg (mg/l)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	F ⁻ (ppm)
VERANO 1	8	894	178	23,8	18,5	n.d.	n.d.	2,66
INVIERNO 1	7,7	982	159	15	15,4	n.d.	n.d.	1,95
VERANO 2	8,15	592	280	27,5	13,8	n.d.	n.d.	1,52
INVIERNO 2	8,21	570	156	15	11,7	n.d.	n.d.	1,48
VR	6,8-9,2	<7000	<1500	<200	<500	0,5	0,2	<2

Tabla 20: Caracterización fisicoquímica de la muestra de agua del establecimiento DMA. *n.d= no detectado*

5.4) Establecimiento DT

	pH	RS (mg/l)	SO ₄ ²⁻ (mg/l)	Ca (mg/l)	Mg (mg/l)	Cu (ppm)	Zn (ppm)	F ⁻ (ppm)
VERANO 1	7,7	908	206	20,9	11,5	n.d.	n.d.	3,67
INVIERNO 1	7,9	908	202	18,3	13,6	n.d.	n.d.	2,97
VERANO 2	8,6	836	243	26,5	11,7	n.d.	n.d.	4,32
INVIERNO 2	8,7	774	237	11,2	9	n.d.	n.d.	3,42
VR	6,8-9,2	<7000	<1500	<200	<500	0,5	0.2	<2

Tabla 21: Caracterización fisicoquímica de las muestras de agua del establecimiento DT. *n.d= no detectado*

Todos los parámetros analizados mostraron valores dentro de los rangos aceptados para consumo de bovinos de producción con excepción del F⁻ en distintos momentos del año. Los diferentes valores de la variable F⁻, fueron los que definieron cada tratamiento (CTRL, DB, DMA, DT).

6) Análisis estadístico de los resultados: Se compararon los valores promedio de cada parámetro analizado en las muestras de suero bovino (F^- , Ca, P, Mg, Cu, Zn, ACO), para cada tratamiento. Para esto se utilizó el software estadístico R (R Core Team, 2017). Siguiendo el modelo estadístico presentado en la sección *Materiales y Métodos*, se analizaron los valores de cada variable para conocer el efecto sobre las mismas de la concentración de F^- en el agua de bebida. En todos los casos se asumió que el modelo lineal generalizado ($\alpha=0,05$) respondía a la siguiente relación:

$$[\text{mineral en suero}] \sim \text{TRATAMIENTO}$$

Donde *[mineral en suero]* representa el valor de F^- , Ca, P, Mg, Cu, Zn y ACO hallado en las muestras de suero y *TRATAMIENTO* representa cada uno de los valores de concentración de F^- en el agua de bebida (CTRL, DB, DMA, DT).

6.1) Análisis del contenido de F^- en suero

Los resultados del análisis pueden verse a continuación:

	GL	SC	CME	F	Pr (>F)
ESTABLECIMIENTOS	3	58,7215	19,5738	5,0586	0,002
RESIDUALES	277	1071,8272	3,8694		

Tabla 22: ANOVA del contenido de F^- (ppm) según TRATAMIENTOS.

Con un margen de seguridad del 95%, puede decirse que se detectaron diferencias significativas en los valores promedio de F^- sérico, en función del establecimiento donde tuvo lugar el muestreo. Para identificar tales diferencias, se realizó un test de Tukey ($\alpha=0,05$) de comparaciones múltiples de medias.

A continuación se muestra el cuadro con los valores promedio de F^- sérico en cada establecimiento.

Letras diferentes indican diferencias significativas.

Tratamiento	Promedio	Comparación	
CTRL	1,75	A	
DB	2,43	A	B
DMA	2,61		B
DT	2,99		B

Tabla 23: Valores promedio de F^- (ppm) para cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

En las muestras de suero se cuantificaron valores significativamente más altos de F^- en aquellas pertenecientes a los tratamientos DOSIS MEDIA ALTA y DOSIS TOXICA,

respecto de los animales pertenecientes al tratamiento CONTROL. Encontradas las diferencias en los niveles de F- sérico en función del tratamiento, se evaluó la existencia de diferencias debidas a la estación climática, dentro de cada tratamiento. Para esto se realizaron sendos análisis de ANOVA, cuyos resultados se muestran a continuación.

6.1.1) *Análisis de valores promedio de F⁻ en suero, en el establecimiento CTRL en función de la estación de muestreo*

	SC	GL	CM	F	p-valor
ESTACION	75,8209	3	25,2736	87,3106	1,1102 ⁻¹⁶
ERROR	19,1049	66	0,2895		
TOTAL	94,9258	69			

Tabla 24: ANOVA del contenido de F⁻ (ppm) según estación climática en el establecimiento CTRL.

Con un 95% de seguridad ($\alpha=0,05$) puede decirse que hubo diferencias significativas en los niveles séricos de F- en los animales pertenecientes al tratamiento CTRL, en función de la estación climática donde ocurrió el muestreo (VERANO 1, INVIERNO 1, VERANO 2, INVIERNO 2). En estas condiciones, se planteó un test de Tukey de comparación de medias para encontrar las diferencias significativas. Tales diferencias pueden verse en el gráfico de medias correspondiente al tratamiento CTRL, donde letras diferentes entre las barras indican diferencias significativas en los valores séricos de F-.

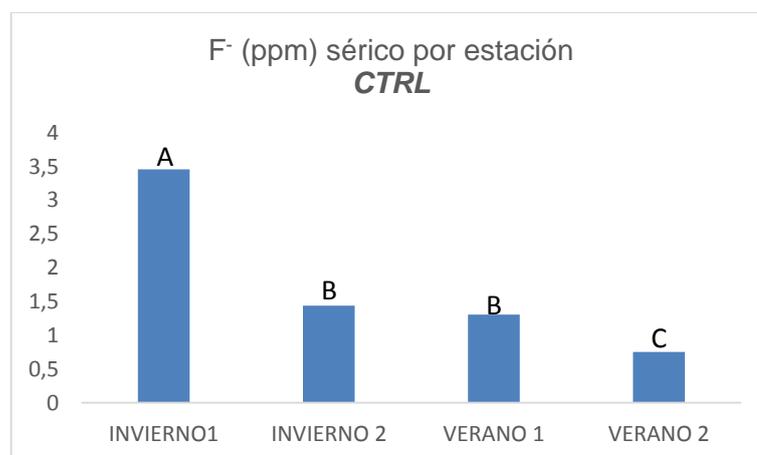


Figura 8: Promedios de F- sérico (ppm) por estación, en el tratamiento CTRL.

Se obtuvieron valores significativamente mayores en la estación INVIERNO 1, respecto del resto de las estaciones.

6.1.2) Análisis de valores promedio de F^- en suero, en el establecimiento DB, en función de la estación de muestreo

	SC	GL	CM	F	p-valor
ESTACION	41,296	2	20,648	32,9855	7,3371 ⁻¹⁰
ERROR	31,2986	50	0,626		
TOTAL	72,5946	52			

Tabla 25: ANOVA del contenido de F^- (ppm) según estación climática en el establecimiento DB.

Con un 95% de seguridad ($\alpha=0,05$) puede decirse que hubo diferencias significativas en los niveles séricos de F^- en los animales pertenecientes al tratamiento DB, en función de la estación climática donde ocurrió el muestreo (VERANO 1, INVIERNO 1, INVIERNO 2). En estas condiciones, se planteó un test de Tukey de comparación de medias para encontrar las diferencias significativas. Tales diferencias pueden verse en el gráfico de medias correspondiente al tratamiento DB, donde letras diferentes entre las barras indican diferencias significativas en los valores séricos de F^- .

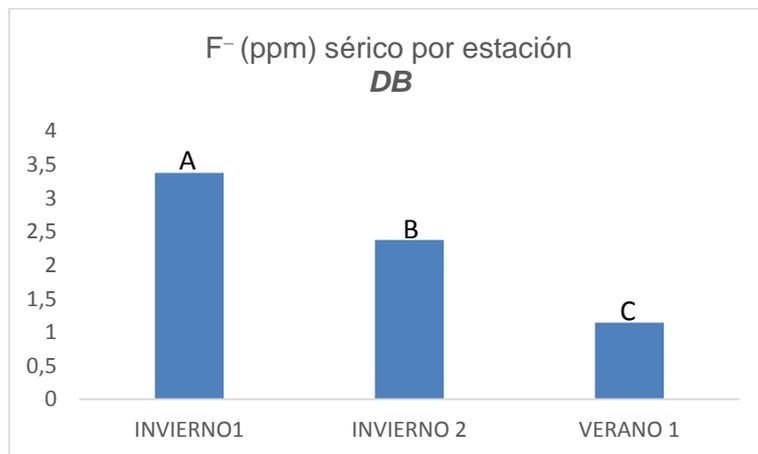


Figura 9: Promedios de F^- sérico (ppm) por estación, en el tratamiento DB.

Se obtuvieron los mayores valores de F^- sérico en los muestreos realizados durante los meses de invierno, respecto del único muestreo que se hizo en época estival. *Durante el VERANO 2 no pudo muestrearse en este establecimiento por razones de salud de su propietario.*

6.1.3) Análisis de valores promedio de F^- en suero, en el establecimiento DMA, en función de la estación de muestreo

	SC	GL	CM	F	p-valor
ESTACION	223,0993	3	74,3664	28,8731	9,4380 ⁻¹³
ERROR	206,0503	80	2,5756		
TOTAL	429,1496	83			

Tabla 26: ANOVA del contenido de F^- (ppm) según estación climática en el establecimiento DMA.

Con un 95% de seguridad ($\alpha=0,05$) puede decirse que hubo diferencias significativas en los niveles séricos de F^- en los animales pertenecientes al tratamiento DMA, en función de la estación climática donde ocurrió el muestreo (VERANO 1, INVIERNO 1, VERANO 2, INVIERNO 2). En estas condiciones, se planteó un test de Tukey de comparación de medias para encontrar las diferencias significativas. Tales diferencias pueden verse en el gráfico de medias correspondiente al tratamiento DMA, donde letras diferentes entre las barras indican diferencias significativas en los valores séricos de F^- .

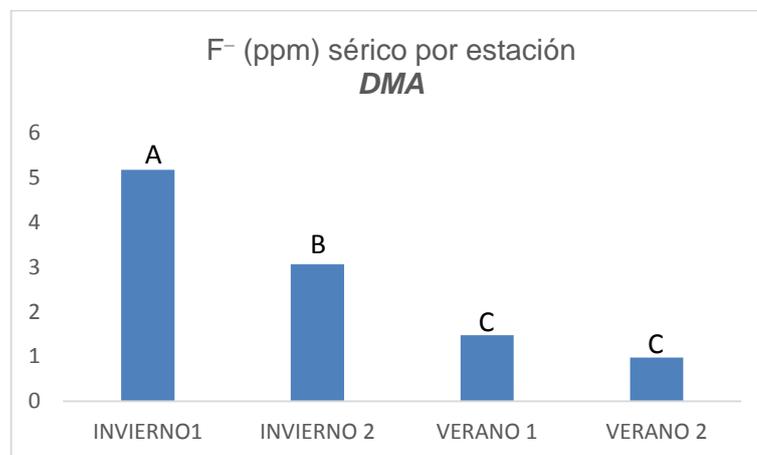


Figura 10: Promedios de F^- sérico (ppm) por estación, en el tratamiento DMA.

Se obtuvieron valores significativamente mayores de F^- sérico en aquellos muestreos realizados en invierno, sin que se hallaran diferencias significativas en los resultados de F^- sérico entre los muestreos realizados en verano.

6.1.4) Análisis de valores promedio de F⁻ en suero, en el establecimiento DT, en función de la estación de muestreo

	SC	GL	CM	F	p-valor
ESTACION	285,6269	3	95,209	35,1639	5,6510 ⁻¹⁴
ERROR	189,5303	70	2,7076		
TOTAL	475,1572	73			

Tabla 27: ANOVA del contenido de F⁻ (ppm) según estación climática en el establecimiento DT.

Con un 95% de seguridad ($\alpha=0,05$) puede decirse que hubo diferencias significativas en los niveles séricos de F⁻ en los animales pertenecientes al tratamiento DT, en función de la estación climática donde ocurrió el muestreo (VERANO 1, INVIERNO 1, VERANO 2, INVIERNO 2). En estas condiciones, se planteó un test de Tukey de comparación de medias para encontrar las diferencias significativas. Tales diferencias pueden verse en el gráfico de medias correspondiente al tratamiento DT, donde letras diferentes entre las barras indican diferencias significativas en los valores séricos de F⁻.

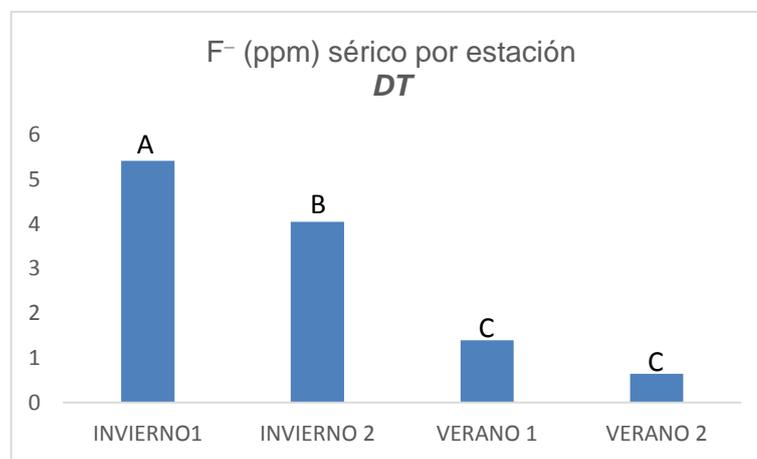


Figura 11: Promedios de F⁻ sérico (ppm) por estación, en el tratamiento DT.

Se obtuvieron valores significativamente mayores de F⁻ sérico en aquellos muestreos realizados en invierno, sin que se hallaran diferencias significativas en los resultados de F⁻ sérico entre los muestreos realizados en verano.

6.2) Análisis del contenido de Ca en suero

Los resultados del análisis pueden verse a continuación:

	GL	SC	CME	F	Pr (>F)
TRATAMIENTOS	3	63,9	21,299	17,69	1,18x10 ⁻¹⁰
RESIDUALES	322	387,7	1,204		

Tabla 28: ANOVA del contenido de Ca (mg/100 mL) según TRATAMIENTOS.

Con un margen de seguridad del 95%, puede decirse que se detectaron diferencias significativas en los valores promedio de Ca sérico, en función del establecimiento donde tuvo lugar el muestreo. Para identificar tales diferencias, se realizó un test de Tukey ($\alpha=0,05$) de comparaciones múltiples de medias. A continuación se muestra el resumen con los valores promedio de Ca sérico en cada establecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas.

TRATAMIENTO	Promedio	Comparación	
CONTROL	11,451	A	
DMA	11,223	A	
DT	11,171	A	
DB	10,187		B

Tabla 29: Valores promedio de Ca (mg/100 mL) para cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Se puede concluir que el tratamiento identificado como DB fue el único que presentó un menor contenido de Ca sérico, deficiencia que fue de origen primario (Tabla 14).

6.3) Análisis del contenido de P en suero

Los resultados del análisis pueden verse a continuación:

	GL	SC	CME	F	Pr (>F)
ESTABLECIMIENTOS	3	27,5	9,178	6,696	0,0002
RESIDUALES	320	438,6	1,371		

Tabla 30: ANOVA del contenido de P (mg/100 mL) según TRATAMIENTOS.

Con un margen de seguridad del 95%, puede decirse que se detectaron diferencias significativas en los valores promedio de P sérico, en función del tratamiento. Para identificar tales diferencias, se realizó un test de Tukey ($\alpha=0,05$) de comparaciones múltiples de medias. A continuación se muestra la tabla con los valores promedio de P sérico en cada establecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Tratamiento	Promedio	Comparación	
DMA	5,830	A	
DB	5,708	A	
CONTROL	5,514	A	B
DT	5,059		B

Tabla 31: Valores promedio de P (mg/100 mL) para cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se puede concluir que no existieron diferencias significativas en los valores séricos de P, en función del contenido de F^- en agua de bebida, cuando se compara el CONTROL con los demás tratamientos.

6.4) Análisis del contenido de Mg en suero

Los resultados del análisis pueden verse a continuación:

	GL	SC	CME	F	Pr (>F)
ESTABLECIMIENTOS	3	0,364	0,12119	1,583	0,193
RESIDUALES	322	24,651	0,07656		

Tabla 32: ANOVA del contenido de Mg (mg/100 mL) según TRATAMIENTOS.

Con un margen de seguridad del 95%, puede decirse que no se detectaron diferencias significativas en los valores promedio de Mg sérico, en función del tratamiento. A continuación se muestra el cuadro con los valores promedio de Mg sérico en cada establecimiento. Letras iguales indican diferencias no significativas ($\alpha = 0,05$).

TRATAMIENTO	Promedio	Comparación
DT	1,723	A
CONTROL	1,705	A
DMA	1,694	A
DB	1,627	A

Tabla 33: Valores promedio de Mg (mg/100 ml) para cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al no existir diferencias estadísticamente significativas en los valores séricos de Ca, P y Mg, en función de la dosis de F^- en agua de bebida, no se analizó la interacción entre las variables TRATAMIENTO y ESTACION.

6.5) Análisis del contenido de Cu en suero

Los resultados del análisis pueden verse a continuación:

	GL	SC	CME	F	Pr (>F)
TRATAMIENTOS	3	1,141	0,3803	15,46	2,02x10 ⁻⁹
RESIDUALES	323	7,947	0,0246		

Tabla 34: ANOVA del contenido de Cu (ppm) según TRATAMIENTOS.

Con un margen de seguridad del 95%, puede decirse que se detectaron diferencias significativas en los valores promedio de Cu sérico, en función del establecimiento donde tuvo lugar el muestreo. Para identificar tales diferencias, se realizó un test de Tukey ($\alpha=0,05$) de comparaciones múltiples de medias. A continuación se muestra el cuadro con los valores promedio de Cu sérico en cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Tratamiento	Promedio	Comparación	
CONTROL	0,505	A	
DMA	0,473	A	
DT	0,378		B
DB	0,368		B

Tabla 35: Valores promedio de Cu (ppm) para cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Encontradas las diferencias en los niveles de Cu sérico en función del tratamiento, se evaluó la existencia de diferencias debidas a la estación climática, dentro de cada tratamiento. Para esto se realizaron sendos análisis de ANOVA, cuyos resultados se muestran a continuación.

6.5.1) Análisis de valores promedio de Cu en suero, en el establecimiento CTRL en función de la estación de muestreo. Se realizó un ANOVA con los resultados de Cu obtenidos en las muestras de suero del tratamiento CTRL, en función de la estación climática. Con una seguridad del 95%, puede concluirse que existieron diferencias significativas entre estaciones.

	SC	GL	CM	F	p-valor
ESTACION	2,8144	3	0,9381	103,8520	$1,1102 \times 10^{-16}$
ERROR	0,8130	90	0,0090		
TOTAL	3,6273	93			

Tabla 36: ANOVA del contenido de Cu (ppm) según estación climática en el establecimiento CTRL

Al encontrarse diferencias en los valores de Cu sérico en función de la estación climática, se efectuó un test de Tukey de comparaciones múltiples de medias.

Se obtuvieron valores significativamente mayores de Cu en las muestras de suero obtenidas en el VERANO 1, seguidas por las obtenidas en el INVIERNO 2. Los valores de Cu en muestras de suero obtenidas durante el VERANO 2 y el INVIERNO 1 fueron significativamente menores, pero sin diferencias entre ellas. En la figura 8 pueden verse los promedios correspondientes a cada estación climática. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

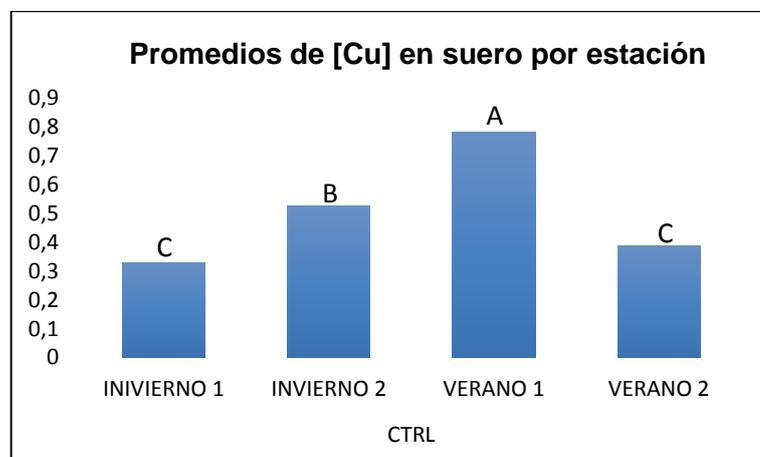


Figura 12: Promedios de Cu sérico (ppm) por estación, en el tratamiento CTRL.

6.5.2) *Análisis de valores promedio de Cu en suero, en el establecimiento DB, en función de la estación de muestreo.* Se realizó un ANOVA con los resultados de Cu obtenidos en las muestras de suero del tratamiento DB, en función de la estación climática. Con una seguridad del 95%, puede concluirse que existieron diferencias significativas entre estaciones.

	SC	GL	CM	F	p-valor
ESTACION	0,1366	2	0,0683	5,0730	0,0092
ERROR	0,8078	60	0,0135		
TOTAL	0,9443	62			

Tabla 37: ANOVA del contenido de Cu (ppm) según estación climática en el establecimiento DB.

Al encontrarse diferencias en los valores de Cu sérico en función de la estación climática, se efectuó un test de Tukey de comparaciones múltiples de medias. Se cuantificaron valores significativamente más altos de Cu sérico en aquellas muestras obtenidas en VERANO 1. EL muestreo que arrojó menores contenidos de Cu fue el realizado en INVIERNO 1. La concentración de Cu sérico cuantificada en las muestras correspondientes a INVIERNO 2 no se diferenció significativamente de los otros muestreos. En la figura 9 pueden verse los promedios correspondientes a cada estación climática. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

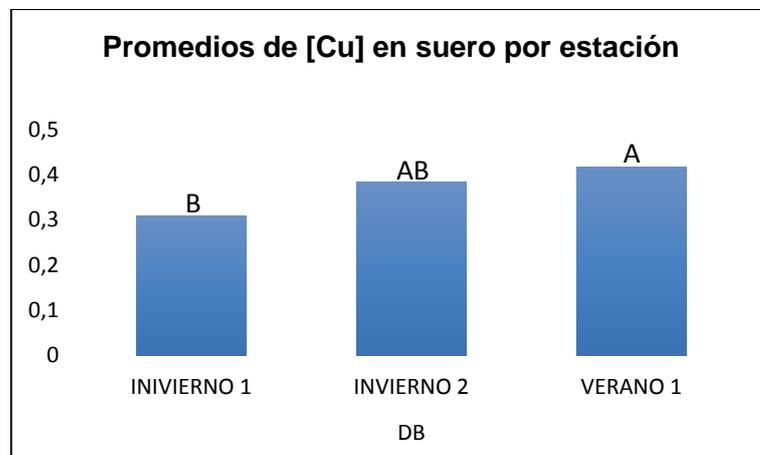


Figura 13: Promedios de Cu sérico (ppm) por estación, en el tratamiento DB.

6.5.3) *Análisis de valores promedio de Cu en suero, en el establecimiento DMA, en función de la estación de muestreo.* Se realizó un ANOVA con los resultados de Cu obtenidos en las muestras de suero del tratamiento DMA, en función de la estación climática. Con una seguridad del 95%, puede concluirse que existieron diferencias significativas entre estaciones.

	SC	GL	CM	F	p-valor
ESTACION	0,8673	3	0,2891	28,8789	$6,9333 \times 10^{-13}$
ERROR	0,8309	83	0,01		
TOTAL	1,6982	86			

Tabla 38: ANOVA del contenido de Cu (ppm) según estación climática en el establecimiento DMA.

Al encontrarse diferencias en los valores de Cu sérico en función de la estación climática, se efectuó un test de Tukey de comparaciones múltiples de medias. Se pudieron cuantificar valores de Cu séricos significativamente más elevados en las muestras correspondientes al VERANO 1, seguidos por aquellas muestras obtenidas en el INVIERNO 2. Las muestras donde se encontraron los menores valores de Cu sérico fueron las correspondientes a INVIERNO 1 y VERANO 2, sin que se encontraran diferencias significativas entre ellas. En la figura 10 pueden verse los promedios correspondientes a cada estación climática. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

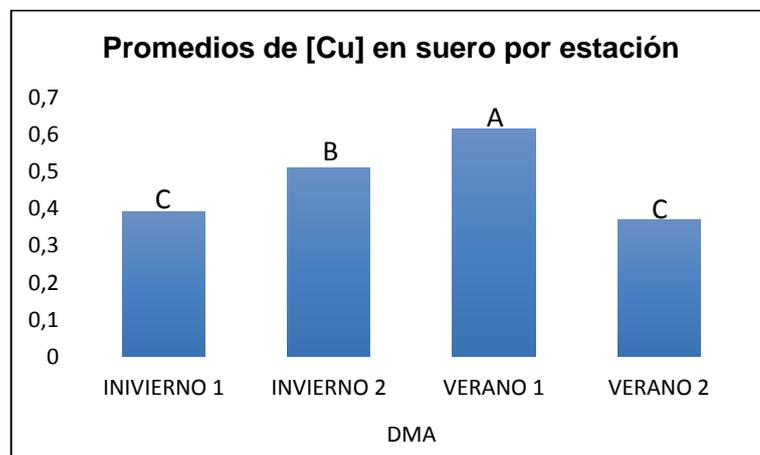


Figura 14: Promedios de Cu sérico (ppm) por estación, en el tratamiento DMA.

6.5.4) *Análisis de valores promedio de Cu en suero, en el establecimiento DT, en función de la estación de muestreo.* Se realizó un ANOVA con los resultados de Cu obtenidos en las muestras de suero del tratamiento DT, en función de la estación climática. Con una seguridad del 95%, puede concluirse que existieron diferencias significativas entre estaciones.

	SC	GL	CM	F	p-valor
ESTACION	0,6290	3	0,2097	17,7232	$7,6556 \times 10^{-9}$
ERROR	0,9110	77	0,0118		
TOTAL	1,54	80			

Tabla 39: ANOVA del contenido de Cu (ppm) según estación climática en el establecimiento DT.

Al encontrarse diferencias en los valores de Cu sérico en función de la estación climática, se efectuó un test de Tukey de comparaciones múltiples de medias. Se hallaron valores más elevados de Cu sérico en las muestras recolectadas en VERANO 1 e INVIERNO 2, comparadas con INVIERNO 1 y VERANO 2. En la figura 15 pueden verse los promedios correspondientes a cada estación climática. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha=0,05$).

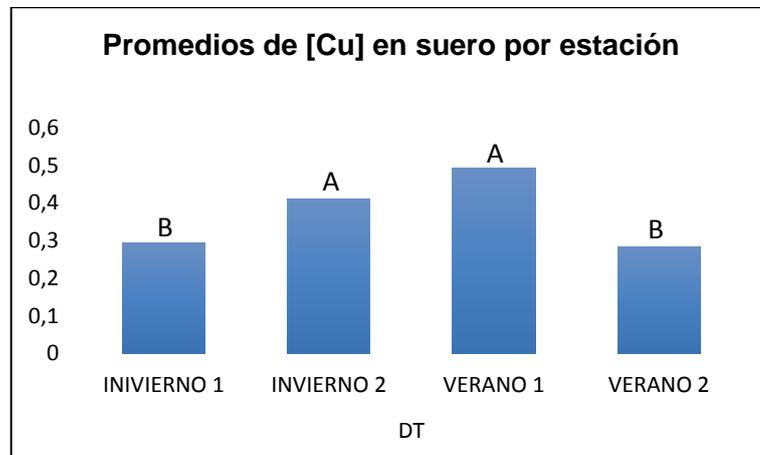


Figura 15: Promedios de Cu (ppm) sérico por estación, en el tratamiento DT.

6.6) Análisis del contenido de Zn en suero

Los resultados del análisis pueden verse a continuación:

	GL	SC	CME	F	Pr (>F)
TRATAMIENTOS	3	0,571	0,19046	5,74	0,000777
RESIDUALES	320	10,618	0,03318		

Tabla 40: ANOVA del contenido de Zn (ppm) según TRATAMIENTOS.

Con un margen de seguridad del 95%, puede decirse que se detectaron diferencias significativas en los valores promedio de Zn sérico, en función del establecimiento donde tuvo lugar el muestreo. Para identificar tales diferencias, se realizó un test de Tukey ($\alpha=0,05$) de comparaciones múltiples de medias. A continuación se muestra el cuadro con los valores promedio de Zn sérico en cada establecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Tratamiento	Promedio	Comparación	
CONTROL	0,721	A	
DT	0,690	A	
DMA	0,683	A	
DB	0,600		B

Tabla 41: Valores promedio de Zn (ppm) para cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

Se aprecia que el único valor promedio de Zn en suero, significativamente menor al control fue el correspondiente a los animales muestreados en el establecimiento DB. Esta disminución en el contenido de Zn en suero respondió a una carencia de dicho elemento en las pasturas (Ver tabla 14), constituyendo una carencia de origen primario. En este contexto no se puede atribuir la deficiencia de Zn al exceso de F^- en el agua de bebida, por lo que se asume que no hay diferencias entre tratamientos. Por este motivo no se analizó la interacción TRATAMIENTO*ESTACION.

6.7) Análisis de ACO

Los resultados del análisis pueden verse a continuación:

	GL	SC	CM	F	Pr (>F)
ESTABLECIMIENTOS	3	0,2191	0,0730	4,1481	0,0127
RESIDUALES	36	0,6338	0,0176		

Tabla 42: ANOVA del promedio de ACO en función de los tratamientos.

Con un margen de seguridad del 95%, puede decirse que se detectaron diferencias significativas en la actividad sérica de la enzima ceruloplasmina oxidasa, en función del

establecimiento donde tuvo lugar el muestreo. Para identificar tales diferencias, se realizó un test de Tukey ($\alpha=0,05$) de comparaciones múltiples de medias. A continuación se muestra el cuadro con los valores promedio de actividad de ceruloplasmina oxidasa sérica en cada establecimiento. Letras diferentes indican diferencias significativas.

Establecimiento	Promedio	Comparación
CONTROL	0,3449	A
DMA	0,1789	B
DB	0,1770	B
DT	0,1670	B

Tabla 43: Valores promedio de ACO para cada tratamiento. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p<0,05$).

El tratamiento CONTROL fue el que presentó mayores valores de ACO. Los demás tratamientos presentaron valores de actividad de ceruloplasmina oxidasa significativamente menores al CONTROL, pero sin significancia estadística entre ellos. Letras diferentes entre barras indican diferencias significativas entre tratamientos

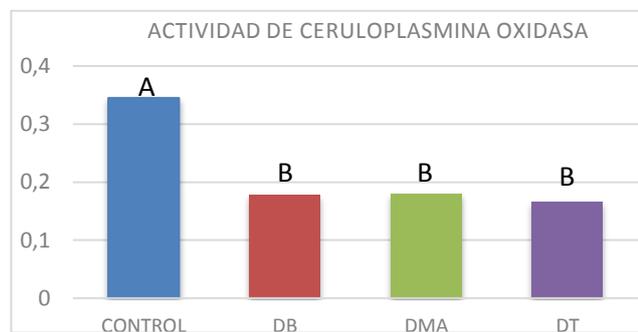


Figura 16: Promedios de ACO por tratamiento.

DISCUSIÓN

La puesta a punto de la técnica potenciométrica arrojó valores de LOD, rango aplicable, Bias, precisión, recuperación y límite de cuantificación dentro de los criterios de aceptación sugeridos por la AOAC (2016). En la bibliografía internacional de las últimas cuatro décadas pueden encontrarse muchos trabajos de puesta a punto y caracterización de metodologías para la cuantificación de F^- en diferentes matrices biológicas, los que involucran principalmente a la determinación potenciométrica de dicho ion (Jacobson y Heller, 1971; Ekstrand, 1977; Eyde, 1982; Schamschula *et al.*, 1985; Fucsko *et al.*, 1987; Venkateswarlu, 1990; NIOSH, 1994; NIOSH, 1996; Itai y Tsunoda, 2001; Whitford, 2005; Rigalli y Puche, 2007; Martinez-Mier *et al.*, 2011). Los porcentajes de recuperación y precisión obtenidos en la puesta a punto de la metodología involucrada en este trabajo se encontraron dentro de los rangos reportados por otros autores. En este sentido Martinez-Mier y colaboradores (2011) reportan recuperaciones del orden del 94-104 %; y una precisión de 11,48 % (CV%), cuando analizaron por potencimetría estándares comerciales de F^- , bebidas carbonatadas, alimentos, saliva, orina y plasma. Itai y Tsunoda (2001) informaron una recuperación del 94,6 al 103,6 %; y una precisión del 4 % (CV%), cuando utilizaron la potencimetría para cuantificar F^- en muestras de suero y orina. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA), establece en su métodos 9214 las condiciones esperables de la potencimetría directa para la cuantificación de F^- en muestras de agua, y ubica la recuperación en un rango del 92 al 96 % y la precisión entre el 2,6 y el 5,3 % (CV%) (EPA, 1996), valores que están en concordancia con los obtenidos en este trabajo. En 1985, Schamschula y colaboradores obtuvieron recuperaciones similares (en el orden del 99,8 al 106 %) cuando analizaron el contenido de F^- en muestras de agua, saliva, uñas y orina, utilizando la potencimetría previa destilación isotérmica. Nuevamente, estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio. En un sentido similar, Ekstrand (1977) analizó la performance analítica de la potencimetría directa, con adición de estándar y obtuvo recuperaciones del 98 al 108 % y precisión entre 1,1 y 4,6 % (CV%) en muestras de plasma y saliva respectivamente, resultados que coinciden con los de este trabajo. La potencimetría también ha sido el método de elección de varios autores al momento de cuantificar F^- en material vegetal. Tal es así que Jacobson y Heller (1971) obtuvieron una recuperación del 98,8 % junto a una precisión del 9,3 % (CV%) y Eyde (1982) en sus investigaciones para determinar la contaminación por F^- en diversos cultivos, obtuvo recuperaciones del orden del 87 al 102% con una precisión entre 4,5 y 14,3 % (CV%).

La performance metodológica de las técnicas analíticas para la cuantificación de F^- descritas en este trabajo resultó notablemente mejor a la obtenida por Venkateswarlu en 1990 y por Kuo y colaboradores en 1999. Estos autores informaron recuperaciones del 30,7 al 56 %; y del 21,7 al 71,3 %, respectivamente. De hecho, Kuo y colaboradores (1999) pudieron demostrar que la potenciometría es tres veces más efectiva para la cuantificación de F^- en material vegetal. La performance de la metodología aquí empleada, cuyos resultados concuerdan con la bibliografía internacional, establece un adecuado desempeño de la misma para la determinación de F^- en distintas matrices. Además proveyó de una capacidad analítica al Laboratorio de Bioquímica Clínica para la cuantificación de F^- en matrices biológicas diferentes al agua.

Los resultados encontrados en este trabajo coinciden con las deficiencias de Ca, P, y Mg en las pasturas informados en dos campos de cría de la localidad de Villegas por Buffarini y colaboradores (2008). Por su parte, Coria y colaboradores (2013) quienes realizaron un seguimiento de dos años en un establecimiento de Guaminí para cuantificar minerales en pasturas, agua de bebida y suero bovino también encontraron deficiencias de estos macro minerales. La deficiencia de estos elementos en las pasturas ha sido ampliamente investigada y demostrada en la última década por Cseh y colaboradores (2008, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015). Los resultados de estos reportes son coincidentes con los hallados en este trabajo de tesis en cuanto a las deficiencias de Ca, P, y Mg. Estas deficiencias también han sido demostradas por otros autores, en diferentes partes del territorio argentino. Así, en el año 2011, Bolla y colaboradores reportaron pasturas deficientes en Ca, P, Mg y Zn en dos áreas de la Provincia de Río Negro. Del mismo modo que sucedió en esta investigación, estos autores encontraron que estas deficiencias de macroelementos fueron de tipo anual. Morlacco y colaboradores (2014) encontraron deficiencias de Mg y Cu en las pasturas analizadas en el Departamento General López, de la provincia de Santa Fe. Benítez y colaboradores (2016) detectaron deficiencias de Ca, P, Mg, Cu y Na en pasturas pertenecientes a un establecimiento de Paso de Los Libres, en la provincia de Corrientes. Al igual que en este trabajo de tesis, las deficiencias en las pasturas fueron de tipo anual.

En este trabajo se detectaron deficiencias de Cu en las pasturas, únicamente en los establecimientos CONTROL, DB y DMA. Además de estas carencias, también se encontraron excesos de algunos elementos interferentes del metabolismo del Cu, principalmente SO_4^{2-} y Mo. La deficiencia de Cu ha sido reportada en bovinos de casi todos los países del mundo. En la Argentina el primer reporte de deficiencia de Cu en

bovinos lo hicieron Bingley & Carrillo (1964) en la provincia de Buenos Aires. Es además una de las principales deficiencias minerales del ganado en pastoreo (Villanueva, 2011; Saravia *et al.*, 2015) y en el área de influencia del INTA EEA Balcarce es sólo superada por la deficiencia de Mg (Spath y Becker, 2012). Los resultados obtenidos en este trabajo también fueron demostrados por numerosos autores. Benítez y colaboradores (2016) reportaron pasturas con deficiencias de Cu, pero en contraposición a lo encontrado en este trabajo, los valores de SO_4^{2-} y Mo estaban dentro del rango normal. Por otro lado, Morlacco y colaboradores (2014) no encontraron valores deficientes de Cu en las pasturas pero, al igual que en este trabajo, detectaron excesos estacionales de SO_4^{2-} y Mo. Este exceso de Mo también ha sido reportado por Cseh y colaboradores (2013) en pasturas provenientes de la provincia de Chubut, por Bolla y colaboradores (2011) en pasturas provenientes de la provincia de Río Negro. El Mo es, entre los antagonistas, el que tiene efectos más drásticos en la absorción de Cu por parte del animal. La presencia de molibdenosis está relacionada con el contenido elevado de Mo en el alimento o con una relación Cu:Mo <2:1 (Rosa y Mattioli, 2002). En especies forrajeras se determinó un promedio de Cu que varía entre 8-11 ppm y el de Mo entre 3-5 ppm no modificándose en promedio esta relación. Se han reportado casos de molibdenosis cuando, manteniéndose dentro de los parámetros normales el Cu, el Mo aumenta entre 6-10 ppm (Balbuena *et al.*, 2003; Hall, 2012). Peters (2011) reportó que cambios en las concentraciones de 1 a 4 ppm de Mo en las plantas puede disminuir la disponibilidad de Cu entre 60-80%. Los resultados de Cu y Mo obtenidos para las pasturas de este trabajo permiten descartar la deficiencia secundaria de Cu por exceso de Mo. A pesar que este último se encontró por encima de los valores de referencia para el elemento, en todos los establecimientos donde se realizaron los muestreos se obtuvieron relaciones Cu:Mo mayores a 2:1. El S también tiene una gran influencia en la absorción de Cu de manera directa formando sulfuros o indirecta, cuando se combina con el Mo formando tiomolibdatos. Para considerar su aporte, no solo hay que tener en cuenta el S inorgánico, sino también el S orgánico aportado por las proteínas, que es transformado en el rumen a sulfuro (S^{2-}). Se han reportado casos en los que concentraciones de 0,3% de S en la dieta afectaba la absorción normal de Cu (Rosa y Mattioli, 2002). Los resultados de SO_4^{2-} en pasturas analizadas en este trabajo se encontraron en su mayoría por debajo de dicho valor, a excepción de las pasturas correspondientes al primer verano del tratamiento CTRL y al segundo veranos del tratamiento DT, con valores de 0,44% y 0,33%, respectivamente. Otra fuente importante de S, que no siempre es tenida en cuenta es el agua. En esta fuente, el animal incorpora

el S en forma de SO_4^{2-} que luego es transformado en el rumen a (S^{2-}). En estudios que se llevaron a cabo en Canadá, se concluyó que valores de SO_4^{2-} mayores a 500 mg/L en el agua generaban deficiencia de Cu en los animales que la consumían (Smart *et al.*, 1986; Rosa y Mattioli, 2002; Beede, 2006). En este trabajo de tesis no se encontraron contenidos de SO_4^{2-} en agua que superen dicho valor, motivo por el cual se estimó que no habría influencia sobre los niveles séricos de Cu. Existen reportes que ponen de manifiesto la condición de hipocupremia en bovinos, ya sea por un escaso contenido de Cu en el alimento o como resultado de algún interferente metabólico en exceso, como Mo y/o SO_4^{2-} . En la gran mayoría de los casos se trata de una deficiencia de Cu secundaria, con concentraciones normales de Cu en las pasturas, pero con altos niveles de Mo en las mismas, y excesos de SO_4^{2-} en el agua de bebida (Bingley *et al.*, 1978; Rosa y Mattioli, 2002; Cseh *et al.*, 2005; Postma *et al.*, 2010; Cseh *et al.*, 2014; Morlacco *et al.*, 2014; Saravia *et al.*, 2015; Micheloud *et al.*, 2017). En este estudio, los valores de elementos que pueden interferir el metabolismo del Cu (Mo, SO_4^{2-} , Fe, Zn) se encontraron en niveles que no podrían causar tal interferencia.

En ninguna de las pasturas analizadas en este trabajo se encontraron niveles detectables de F^- . Este hecho concuerda con los datos reportados por Ranjan y Ranjan (2015), quienes manifiestan que la captación de F^- por las plantas desde el suelo es un fenómeno de difusión pasiva siendo este elemento eliminado del tejido vegetal por transpiración. La mayoría de las plantas no acumulan F^- en concentraciones tóxicas para los bovinos y los niveles, usualmente, se mantienen por debajo de los 10 mg por kilo de MS. Es por esto que la ingesta de F^- a través de las pasturas es prácticamente despreciable en los animales de producción (Loganathan *et al.*, 2001; Baunthiyal y Ranghar, 2015). Por ello el contenido de F^- en el agua cobra importancia para determinar si los animales están expuestos a exceso de F^- y es la razón por la cual se tomó en consideración a este parámetro para categorizar a los establecimientos estudiados en esta tesis y definir los cuatro tratamientos del experimento.

Los resultados indicaron una menor dureza de las pasturas correspondientes al establecimiento con la dosis tóxica de F^- en agua, seguidos (en orden ascendente) por las pasturas de los establecimientos con dosis media alta, control y dosis baja, respectivamente. Un menor contenido de lignina supone un menor desgaste dental debido a la abrasión producida por la pastura. No existe un valor de referencia que pueda establecerse para este parámetro. Su análisis responde a la necesidad de caracterizar el desgaste mecánico producido por la masticación de alimento sólido.

Respecto a las fuentes de agua, todas las muestras analizadas en este trabajo presentaron valores similares en los parámetros analizados, con muy pocas variaciones temporales (Anexo A). La excepción fue el contenido de F^- , que varió notablemente entre establecimientos, siendo este parámetro el que definió los cuatro tratamientos del experimento. Estos resultados también son similares a los reportados por Coria et al (2013) en establecimientos de la misma zona geográfica, solo que en ese trabajo se muestreaba solo un establecimiento, por lo que la información estaba sesgada. Desde el año 2015, el análisis del contenido de F^- en las muestras de agua que ingresan al Laboratorio de Bioquímica Clínica del INTA Balcarce, se realiza de rutina cuando quiere conocerse la aptitud para consumo de bovinos. Está informado que hasta el 50% de las muestras analizadas y clasificadas como aptas para consumo animal, dejan de serlo si se considera el contenido de F^- en las mismas (Fernández *et al.*, 2015).

El exceso de F^- en la ganadería ya ha sido expuesto por otros autores (López *et al.*, 1986; Araya *et al.*, 1993; Robles *et al.*, 2015). Una gran parte de los reportes de desgaste dental están asociados al exceso de cenizas volcánicas depuestas sobre las pasturas luego de las erupciones, y su efecto abrasivo. Pero asociado a la presencia de cenizas volcánicas está el exceso de F^- (en las propias cenizas y/o disueltas en los cursos de agua circundantes), elemento que contribuye a que el desgaste se exacerbe. En estos reportes, la información es dispar y, probablemente, por la época de su publicación aún no se contaba con la metodología adecuada para cuantificar con precisión el F^- en diferentes matrices. A pesar de las discrepancias que existen en estos reportes en los valores absolutos de F^- cuantificados, todos ellos asocian el exceso de dicho elemento en el agua de bebida con un mayor desgaste dental y en algunos casos con una hipocupremia secundaria, dato que ya fue informado por Suttle et al, (2007). Esta información fue la que nos llevó a focalizar este trabajo de tesis en la zona de Guaminí ya que los productores manifestaban desgaste dental prematuro en sus rodeos (Coria, M., com. pers., 2014). Sin embargo, dicha manifestación de la fluorosis no pudo ser comprobada entre los animales involucrados en este trabajo.

Ranjan y colaboradores (2008) reportaron la disminución de los niveles séricos de Zn como una consecuencia del exceso de F^- en el agua de bebida para bovinos de producción. Sin embargo, en este trabajo de tesis se detectaron valores deficientes de Zn en el suero de algunos animales correspondientes al tratamiento DB, siendo esta deficiencia de origen primario. Es decir que, en este caso, el contenido de Zn en el alimento no fue suficiente para cubrir los requerimientos de los animales. Este hecho

coincide con los reportados por varios autores (Pechin, 1999; Pechin *et al.*, 1999; Pechin *et al.*, 2001; Rosa *et al.*, 2008; Bolla *et al.*, 2011; Cseh *et al.*, 2013; Morlaco *et al.*, 2014). Si bien la hipomagnesemia ha sido reportada por Ranjan y colaboradores (2008), no fue posible detectarla en este trabajo de tesis. En este sentido, de los 15 muestreos que se realizaron en el experimento, en 9 se detectó hipomagnesemia, siendo en 8 de ellos deficiencia primaria. En el muestreo restante (Establecimiento CONTROL, Verano 1), la hipomagnesemia fue de tipo secundaria, asociada a excesos de potasio y deficiencia de sodio en las pasturas. Estas características de las pasturas coinciden con las reportadas por Cseh (2012). La hipomagnesemia es un desorden metabólico de los rumiantes, en el cual el consumo o utilización del Mg por parte del animal, está disminuido (Cseh *et al.*, 2011; Cseh *et al.*, 2012; Coria *et al.*, 2013; Morlacco *et al.*, 2014; Fernández y Brambilla, 2018). Un reporte de similares características fue realizado por Cantón (2014), con valores similares a los obtenidos en este trabajo. En el período comprendido entre 1998 y 2013, el Servicio de Diagnóstico Veterinario Especializado del INTA Balcarce registró un total de 173 episodios de hipomagnesemia como diagnóstico definitivo de problemas sanitarios en los rodeos. Un 96,5% de los casos ocurrió en la provincia de Buenos Aires, correspondiendo un 87,3% a los partidos ubicados en la región sur de la provincia y un 9,2% en la región norte. La información que existe en la literatura respecto al efecto que ejerce el F^- sobre el metabolismo del magnesio no es muy abundante. Singh y Swarup (1999) observaron una disminución significativa de los valores séricos de Mg en bovinos suplementados durante tres años con una mezcla mineral rica en F^- . En oposición, Wheeler y Fell (1983) encontraron un aumento en los valores séricos de Mg de ovinos que estaban consumiendo excesivas cantidades de F^- con el agua de bebida.

Un resultado interesante de este trabajo de tesis fue la asociación entre el exceso de F^- en agua y los bajos valores de Cu sérico. Este hecho ha sido informado por otros autores, quienes proponen varios mecanismos de interferencia del F^- en el metabolismo del Cu. Entre ellos, Ranjan *et al.* (2008) propusieron la interacción de estos iones para formar fluoruro cuproso (CuF), insoluble. Otros adjudican la hipocupremia a la inhibición de la actividad de la ceruloplasmina (Sharma, 1983) y el aumento del estrés oxidativo con aumento de la síntesis de superóxido dismutasa (Ranjan *et al.*, 2011; Samal *et al.*, 2016). La hipocupremia asociada a excesos de F^- en la alimentación ha sido demostrada en varias especies animales, principalmente vacas, búfalos y asnos; y en varias partes del mundo como India, China y Turquía (Sharma, 1983; Ranjan *et al.*, 2008; Ranjan *et al.*, 2011; Chhabra *et al.*, 2012; Aydin *et al.*, 2014; Samal *et al.*, 2016)

En este trabajo se pudo demostrar una disminución de la ACO en los sueros correspondientes a los animales de los tratamientos DOSIS BAJA, DOSIS MEDIA-ALTA Y DOSIS TÓXICA, respecto de aquellos pertenecientes al grupo CONTROL. Aunque este análisis se pudo realizar en un solo muestreo, debido a desperfectos eléctricos durante el almacenamiento de las muestras, esta relación negativa entre los niveles ingeridos de F^- y la ACO también ha sido reportada por otros autores (Dawson *et al.*, 1978; Sharma, 1983). A pesar de hallarse una disminución en ACO en aquellos animales que recibían mayores dosis de F en el agua de bebida, no pudo establecerse una relación dosis dependiente. Sharma (1983) reportó un comportamiento similar en la actividad de la ceruloplasmina oxidasa cuando se administraron a los animales cantidades crecientes de fluoruro de sodio. En este sentido, Pramoda *et al.*, (2017) también reportan la inhibición de varios sistemas enzimáticos, asociada a exceso de F^- . Tal es el caso de la SOD, ureasa, catalasa, pseudo catalasa y ATP asasa.

También se destaca el patrón de concentraciones de F^- en suero, con mayores valores en aquellos muestreos que correspondieron al invierno, respecto de los realizados en verano. Este hecho ha sido reportado también por Grace y colaboradores (2007) quienes pudieron hallar un aumento en los valores de F^- sérico en invierno y/o primavera, debido fundamentalmente a la disminución de la cobertura vegetal del suelo, hecho que acarrea una mayor ingesta de tierra por parte de los animales (se estima que un bovino puede llegar a levantar hasta 2 kg de suelo por día en el invierno, lo que se corresponde con una ingesta diaria de F^- tan alta como 900 mg/día). Esta situación no se da en los muestreos de verano, debido a que la oferta forrajera es más abundante y, como se pudo comprobar en este trabajo, el contenido de F^- en las pasturas es despreciable. El desgaste dental no pudo detectarse en ninguno de los tratamientos, a pesar que este fenómeno está reportado en la bibliografía, con una prevalencia de hasta el 87% en el caso de vaquillonas (Choubisa, 2014). En cuanto al % de preñez y la CC, los resultados se corresponden con los hallados por un gran número de autores (Samal *et al.*, 2016; Aydin *et al.*, 2014; Choubisa, 2014; Chhabra *et al.*, 2012; Ranjan *et al.*, 2011; Ranjan *et al.*, 2008; Sharma, 1983) quienes reportaron una disminución en los valores de ambos parámetros.

CONCLUSIONES

- La performance analítica de la técnica potenciométrica directa (en el caso de muestras de agua) o acoplada a la microdestilación isotérmica (en muestras de material vegetal y/o suero bovino) estuvo dentro de los criterios aceptables para este tipo de metodología.
- No se detectó variación en los niveles séricos de Ca, P, Mg y Zn cuando se comparó el tratamiento CTRL con los demás.
- Se detectó aumento en los niveles séricos de F^- para todos los tratamientos, en los muestreos correspondientes al invierno.
- Se detectó hipocupremia condicionada por el exceso de F^- .
- La disminución en la ACO encontrada debe ser profundizada con más investigaciones para determinar el efecto del ion sobre la actividad de la enzima.
- No se pudo observar desgaste dental en los animales evaluados.
- Los animales del establecimiento DT presentaron menores valores de CC y % de preñez que los demás.

BIBLIOGRAFÍA

- AGALAKOVA, N.I.; PETROVICH GUSEV, G. 2012. Molecular mechanisms of cytotoxicity and apoptosis induced by inorganic fluoride. *ISNR Cell Biology*. (2012):1-16. doi:10.5402/2012/403835
- AGUADO SÁNCHEZ, M.D.; ROMERO-PAREDES RUBIO, J.I.; CUARÓN IBARGÜENGOYTIA, J.A. 1996. Efecto sobre la estructura y composición ósea del conejo, con diferentes niveles de flúor en la dieta. *Téc. Pecu. Méx.* (34):46-59.
- AOAC International. 2016 Appendix F: Guidelines for Standard method performance requirements. *AOAC Official Methods Of Analysis*. pp.1-18.
- APHA; AWWA; WPCF. 1992. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales (17° edición). Ediciones Diez de Santos. Madrid. 1830 p.
- ARAYA, O.; WITTWER, F.; VILLA, A. 1993. Evolution of fluoride concentrations in cattle and grass following a volcanic eruption. *Vet. Human. Toxicol* 35(5):437-440.
- ARNESEN, A.K.M. 1997. Availability of fluoride to plants grown in contaminated soils. *Plant Soil* 191(1): 13-25.
- AYDIN, N.; DEDE, S.; TANRITANIR, P. 2014. The distribution of minerals in some tissues of sheep with fluorosis. *Fluoride* 47(1): 43-48.
- AYRANCI, E.; DUMAN, O. 2004. Binding of fluoride, bromide and iodide to bovine serum albumin, studied with ion-selective electrodes. *Food chem.* 84(4) 539-543.
- BALBUENA, O.; MCDOWELL, L. R.; LUCIANI, C. A.; CONRAD, J. H.; WILKINSON, N.; MARTIN, F. G. 2003. Estudios de la Nutrición Mineral de los Bovinos para carne del este de las provincias de Chaco y Formosa (Argentina). Cobre , Molibdeno y Azufre. INTA, EEA Colonia Benítez [en línea] Sitio Argentino de Producción Animal <<http://www.produccion-animal.com.ar>>
- BARBIER, O; ARREOLA-MENDOZA, L.; DEL RAZO, L.M. 2010. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-Biol. Interact.* 188: 319-333.
- BAUNTHIYAL, M.; RANGHAR, S. 2015. Accumulation of Fluoride by plants: potential for phytoremediation. *Clean-Sil, Air, Water* 43(1) 127-132.
- BAVERA, G. 2006. Flúor y dentición. En su : Suplementación mineral y con NNP del bovino a pastoreo [en línea] Sitio Argentino de Producción Animal <<http://www.produccion-animal.com.ar>>
- BEEDE, K. D. 2006. Evaluation of Water Quality and Nutrition for Dairy Cattle. In *High Plains Dairy Conference*. Michigan State. pp.26.
- BENITEZ, D.; MACIAS, D.; SOSA, G.; FERNÁNDEZ, E.; CORIA, M.; CSEH, S. 2016. Diagnóstico de deficiencias minerales en un campo del departamento Paso de los Libres en la provincia de Corrientes. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 36(1):54.
- BINGLEY, B. J.; CARRILLO, J. B. 1964. Deficiencia de cobre I. Observaciones preliminares en ciertas áreas de la provincia de Buenos Aires. INTA, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Argentina. *Boletín Técnico* N° 15.

- BINGLEY, J. B.; DICK, A.T. 1967. Semimicro determination of Inorganic Sulfate in Plant Material. *J. Agric. Food. Chem.* 15(3):539-542.
- BINGLEY, J. B.; RUKSAN, B. E.; CARRILLO, B. J. 1978. Estudios sobre hipocuprosis en la región de La Pampa Húmeda en la provincia de Buenos Aires. *Rev. Med. Vet.* 59(2) 3-8.
- BOLLA, D.; GARCILAZO, M.; CSEH, S.B. 2011. Perfil mineral en dos áreas de la Provincia de Río Negro. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 31(1):22.
- BROWNE, D.; WHELTON, H.; O'MULLANE, D. 2005. Fluoride metabolism and fluorosis. *J. Dent.* 33: 177-186.
- BUFFARINI, M. A.; MINATEL, L.; CSEH, S. 2008. Variación estacional de minerales en sangre de dos rodeos de cría en el partido de General Villegas. Memoria Técnica 2007-2008. EEA General Villegas, Argentina. pp.1-5.
- BUNCE, H. W. F. 1985. Fluoride in air, grass, and cattle. *J. Dairy Sci.* 68(7):1706-1711.
- CANTÓN, G.J. 2014. Análisis de casos de hipomagnesemia en bovinos de producción de carne diagnosticados en INTA EEA Balcarce (1998-2013). [en línea] <<https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/analisis-casos-hipomagnesemia-bovinos-t41187.htm>> [Consulta: 26/07/18]
- CHANDAN AGALI, R.; BHAVSAR SHINTRE, S. 2016. Biological markers of fluoride exposure: a review article. *IJSS Case Reports & Reviews.* 2(10) 49-52
- CHEN, P.S.; TORIBARA, T.Y.; WARNER, H. 1956. Microdetermination of Phosphorus. *Anal. Chem.* 28 (11): 1756-1758.
- CHHABRA, S.; SIDDIQUE, N.; RANDHAWA, S.N.S. 2012. Comparative studies on plasma mineral status of cattle in fluoride toxic brackish water zone of Punjab, India. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 2(1): 257-259.
- CHOUBISA, S.L. 1999. Some observations on endemic fluorosis in domestic animals in southern Rajasthan (India). *Vet. Res. Commun.* 23: 457-465.
- CHOUBISA, S.L. 2010. a Fluorosis in dromedary camels in Rajasthan, India. *Fluoride.* 43:194-199.
- CHOUBISA, S.L. 2010.b Osteo-dental fluorosis in domestic horses and donkeys in Rajasthan, India. *Fluoride.* 43:5-12.
- CHOUBISA, S.L. 2014. Bovine calves as ideal bio-indicators for fluoridated drinking water and endemic osteo-dental fluorosis. *Environ. Monit. Assess.* 186: 4493-4498.
- CHOUBISA, S.L. 2017. A brief and critical review on hydrofluorosis in diverse species of domestical animals in India. *Environ. Geochem. Health.* 40: 99-114.
- CHOUBISA, S.L.; CHOUBISA, D. 2016. Status of industrial fluoride pollution and its diverse adverse health effects in man and domestic animals in India. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (23):7244-7254.

- CHOUBISA, S.L.; MISHRA, G.V.; SHEIKH, Z.; BHARDWAJ, B.; JAROLI, V.J. 2011. Food, fluoride, and fluorosis in domestic ruminants in the Dungarpur district of Rajasthan, India. *Fluoride*. 44:70-76.
- CHOUHAN, S.; LOMASH, V.; FLORA, S.J.S. 2009. Fluoride-induced changes in haem biosynthesis pathway, neurological variables and tissue histopathology of rats. *J. App. Toxicol.* 30:63-73.
- COLACELLI, N.A. Calidad de agua para bebida animal. [en línea] <http://www.produccion.com.ar/1997/97abr_11.htm> [consulta: 06 de enero 2012].
- COMBA, B.; ÇINAR, A. 2016. Investigation of effects of fluorosis on some minerals and hormones in sheep. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 63:223-227.
- CORIA, M.L.; CSEH, S.B.; FERNÁNDEZ, E.L. 2013. Diagnóstico de deficiencias minerales en un campo del Partido de Guaminí, Buenos Aires. *Rev. Arg. Prod. Anim.* (33:1):25.
- CSEH, S.B. 2003. El agua y su importancia para los bóvidos. [en línea] Sitio Argentino de Producción animal. <http://www.produccion-animal.com.ar> [Consulta 10/08/15]
- CSEH, S.B. 2012. Hipomagnesemia. *Ganadería y Compromiso*. IPCVA. 42: 12-13.
- CSEH, S. 2015. Deficiencias minerales en bovinos para carne. Diagnóstico, caracterización y control. Resúmenes del 1er Congreso Internacional de Producción Animal Especializada en Bovinos. Universidad de Cuenca, Ecuador. 143-148.
- CSEH, S.B.; RIDAO, M.; YARRAR, M. 1993. Determinación de sulfatos en agua de bebida. 9º Reunión anual de la AAVLD. La Plata, Argentina. 47p.
- CSEH, S.B.; FAY, P.; SUELDO, R.; DRAKE, M.L. 1994. Una microtécnica simple para el dosaje de fósforo inorgánico en suero bovino. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 14(1):137.
- CSEH, S.; DRAKE, M.; YARRAR, M. 2005. Casuística de hipocupremia en la provincia de Buenos Aires, Argentina. 12º Simposio Internacional de la Asociación Mundial de Laboratorios Veterinarios de Diagnóstico. Montevideo, Uruguay. En CD.
- CSEH, S.; ODEÓN, A.; GAMIETEA, I. MUGARZA, S. 2008. Deformaciones articulares en terneros causadas por deficiencia de fósforo. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 28(1): 31-37.
- CSEH, S. B.; PECHIN, G. H.; GIMÉNEZ, L.; KENNY, O. 2011. Hipomagnesemia en vacas de cría en un campo de la zona del cardenal pampeano. *Rev. Arg. Prod. Anim* 31(1):21.
- CSEH, S. B.; RAMIRO, F. A.; FUMAGALLI, A. E.; GIMÉNEZ, L.; ÁVILA, A. M.; REINERI, P. S. 2011. Relevamiento de deficiencias minerales en cuatro sitios de Santiago del Estero.1.Macroelementos. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 31(1):18.
- CSEH, S. B.; FUMAGALLI, A. E.; FERNÁNDEZ, E. L.; REINERI, P. S. 2012. Deficiencia de calcio y magnesio en rodeos bovinos para carne en el NOA. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 32(1):90.
- CSEH, S.; RASO, M.; MARTÍNEZ STANZIOLA, J. P.; BRAMBILLA, E.; APOSTOLO, R. 2013. Relevamiento mineral en un rodeo bovino en un establecimiento de Chubut. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 33(1):20.

- CSEH, S.; FERNÁNDEZ, E.; ODRIOZOLA, E.; ARMENDANO, E.; LAGLEYZE, B.; BRAMBILLA, E.; DRAKE, M.; POO, J. 2014. Hipocupremia en bovinos asociada a exceso de molibdeno y deficiencia de cobre en pasturas. 20^o Reunión Científico Técnica de la AAVLD. Tucumán, Argentina. En CD.
- DAWSON, J.H.; DOOLEY, D.V.; GRAY, H.B. 1978. Coordination environment and fluoride binding of type 2 copper in the blue copper oxidase ceruloplasmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75(9):4078-4081.
- DO, L.G.; HA, D.H.; SPENCER, A.J. 2016. Natural history and long-term impact of dental fluorosis: a prospective cohort study. *Med. J. Aust.* 204: 25.e1-25.e7.
- EPA. 1996. Method 9214. Potentiometric determination of fluoride in aqueous samples with ion-selective electrode. pp.1-8.
- EKAMBARAM, P.; VANAJA, P.; VIMAL, G.; LAKSHMIKANTHAN, P. 2013. A brief review on experimental fluorosis. *Toxicol. Lett.* 223:236-251.
- EKSTRAND, J. 1977. A micromethod for the determination of fluoride in blood, plasma and saliva. *Calcif. Tiss. Res.* 23:225-228.
- EYDE, B. 1982. Determination of fluoride in plant material with an Ione-Selective Electrode. *Fresenius Z Anal Chem* 311:19-22.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Sistema AQUASTAT. [en línea] http://www.fao.org/nr/water/aquastat/water_use/indexesp.stm
Consulta: 03/11/17
- FERNÁNDEZ, E.L.; CSEH, S.B.; CORIA, M.L.; BRAMBILLA, E.C.; POO, J.I.; DRAKE, M.L. 2015. Variación en el criterio de aptitud de agua para consumo animal en función de los parámetros analizados. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 35(1):69
- FERNÁNDEZ, E.L.; BRAMBILLA, E.C. 2018. Hipomagnesemia en bovinos de cría. *Visión Rural.* 25 (122):28-29.
- FILAPPI, A.R.; PRESTES, D.S.; ANTES, F.G.; FLORES, E.L.M.; DRESSLER, V.L.; FLORES, E.M.M.; CECIM, M. 2008. Metabolismo e distribuição do flúor em ovinos jovens tratados crónicamente com fluoreto de sódio. *Pesqui. Vet. Bras.* 28:124-128.
- FLUECK, W.T.; SMITH-FLUECK, J.A.M. 2012. Severe dental fluorosis in juvenile deer linked to a recent volcanic eruption in Patagonia. *J. Wild. Dis.* 49:355-366.
- FUCSKO, J.; TOTH, K.; PUNGOR, E. 1987. Application of ion-selective electrodes in environmental analysis. Determination of acid and fluoride concentration in rain-water with a flow-injection system. *Anal. Chim. Acta* 194: 163-170.
- GOERING, H. K.; VAN SOEST, P. J. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures and some applications). USDA-AARS Agricultural Handbook 379. US Government Printing Office, Washington D. C. pp.1-20.
- GRACE, N.D.; LOGANATHAN, P.; HEDLEY, M.J. 2007. The effect of a temporal change in ingestion rates of fluorine (F) in soil on the concentration of F in serum and bone of young sheep. *N. Z. Vet. J.* 55(2):77-80.
- GRÜNDER, H.D. 1974. Differential diagnosis of fluoride poisoning in cattle. *Fluoride* 7: 135-142.

- HALL, J. A. 2012. Molybdenum. In: Gupta, R. (ed.), *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. (2nd ed.). New York: Academic Press. 544-549.
- HAN, B.; YOON, S.; WU, P.; HAN, H.; LIANG, L. 2006. Role of selenium in alteration of erythrocyte parameters in bovine fluorosis. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 19:865-871.
- HERRERO, M.A.; MALDONADO MAY, V.; SARDI, G.; FLORES, M.; ORLANDO, A.; CARBÓ, L. 2000. Distribución de la calidad del agua subterránea en sistemas de producción agropecuarios bonaerenses.1. Calidad físico-química y utilización del agua. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 20:229-236.
- HUFSCHEMID, J.; BEVERIDGE, I.; COULSON, G.; WALKER, G.; SHEN, P.; REYNOLDS, E.; CHARLES, J. 2015. Skeletal pathology of Eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*) exposed to high environmental fluoride levels in south-eastern Australia. *J. Comp. Pathol.* 153(2-3): 167-184.
- ITAI, K.; TSUNODA, H. 2001. Highly sensitive and rapid method for determination of fluoride ion concentrations in serum and urine using flow injection analysis with a fluoride ion-selective electrode. *Clin. Chim. Acta* (308): 163-171.
- JACOBSON, J.S.; HELLER, L.I. 1971. A simple, rapid potentiometric method for the estimation of fluoride in vegetation. *Environ. Lett.* 1(1): 43-47.
- JUBB, T.F.; ANNAND, T.E.; MAIN, D.C.; MURPHY, G.M. 1993. Phosphorus supplements and fluorosis in cattle - a northern Australian experience. *Aust. Vet. J.* 70(10): 379-383.
- KARADEMIR, B. 2010. Effects of fluoride ingestion on serum levels of the trace minerals Co, Mo, Cr, Mn and Li in adult male mice. *Fluoride.* 43:174-178.
- KAUR GILL, K.; KUMAR DUMKA, V. 2013. Biochemical alterations induced by oral subchronic exposure to finopril, fluoride and their combination in buffalo calves. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36:1113-1119.
- KUO, H.W.; CHANG, W.G.; HUANG, Y.S.; LAI, J.S. 1999. Comparison of gas chromatography and ion selective electrode methods for measuring fluoride in urine. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62:677-684.
- LAVADO, R.S.; REINAUDI, N.B.; VAQUERO, J.A. 1983. Flúor en aguas, suelo y vegetación del oeste bonaerense. *Ciencia del Suelo* 1:9-14.
- LOGANATHAN, P.; HEDLEY, M.J.; WALLACE, G.C.; ROBERTS, A.H.C. 2001. Fluoride accumulation in pasture forages and soils following long-term applications of phosphorus fertilisers. *Environ. Pollut.* 115:275-282.
- LONG, H.; JIN, Y.; LIN, M.; SUN, Y.; ZHANG, L.; CLINCH, C. 2009. Fluoride toxicity in the male reproductive system. *Fluoride.* 42:260-276.
- LÓPEZ, T. A.; ODRIOZOLA, E. R.; ALLASIA, A. A.; SANTONJA, H.; ELVERDÍN, J. H. 1986. Exceso de fluoruros en aguas de consumo animal: factor causante del desgaste dental prematuro en el ganado? *Vet. Arg.* 3 (24):401-402.
- LUCIOLI, J.; FURLAN, F.H.; MEZARоба, S.; RAYMUNDO, D.L.; BECHTOLD, S.L.; TRAVERSO, S.D.; GAVA, A. 2007. Intoxicação aguda por fluorossilicato de sódio em bovinos no Estado de Santa Catarina. *Pesqui. Vet. Bras.* 27:49-52.

- MARTÍNEZ, R.D.; FERNÁNDEZ, E.N.; ABBIATI, N.N. 2011. Factores que influyen en el desgaste dental de los bovinos. *Vet. Arg.* 28:277-280.
- MARTINEZ-MIER, E.A.; CURY, J.A.; HEILMAN, J.R.; KATZ, B.P.; LEVY, S.M.; LI, Y.; MAGUIRE,...; ZOHOURI, V. 2011. Development of gold standard ion-selective electrode-based methods for fluoride analysis. *Caries Res.* 45: 3-12.
- MICHELOUD, J. F.; SUÁREZ, V. H.; MARTÍNEZ, G. M.; ROSA, D. E.; VENTURA, M. B.; MATTIOLI, G. A. 2017. Niveles séricos de minerales en hembras de cría bovina en un establecimiento de la región de selva y pastizal pedemontano del norte de Salta. *Revista FAVE* 16:97-100.
- MORLACCO, M. B.; CSEH, S.; CORREA LUNA, M.; BRAMBILLA, E.; FERNANDEZ, E. 2014. Identificación y caracterización de deficiencias minerales en el Departamento General López, Provincia de Santa Fe. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 34 (1):71.
- MOUDARZI, F.; SHELJANI, K. 2016. Fluoride and environment. *W. N. Nat. Sci.* 3: 1-11.
- MUFARREGE, D.J. 1999. Los minerales en la alimentación de vacunos para carne en la Argentina. [en línea] Sitio Argentino de Producción Animal<<http://www.produccion-animal.com.ar>> Consulta: 04/05/2015
- NIOSH. 1994. Fluoride in urine. *NIOSH Manual of Analytical Methods* 2:3-4.
- NIOSH. 1996. Potentiometric determination of fluoride in aqueous samples with ion-selective electrodes. *Method 9214-1. Rev 0.*
- ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD. 2006. Guía para la Calidad del agua potable. OMS, Washington DC. pp. 300-315.
- OSICKA, R.M.; AGULLÓ, N.S.; HERRERA AHUAD, C.E.; GIMÉNEZ, M.C. 2015 Evaluación de las concentraciones de fluoruro y arsénico en las aguas subterráneas del Domo Central de la Provincia del Chaco. [en línea]<<http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2002/08-Exactas/E-049.pdf>> Consulta: 04/05/2015.
- PALCZEWSKA-KOMSA, M.; WILK, A.; STOGIERA, A.; CHLUBEK, D.; BUCZKOWSKA-RADLINSKA, J.; WISZNIEWSKA, B. 2016. Animals in biomonitoring studies of environmental fluoride pollution. *Fluoride* 49: 279-292.
- PANDA, L.; KAR, B.B.; PATRA, B.B. 2015. Fluoride and its health impacts-A critical review. *IOSR J. Elec. Comm. Eng.* 10(4) 79-91.
- PARIANI, A.O.; PEREA MUÑOZ, J.M.; CASTALDO, A.O.; GARCIA MARTINEZ, A.R.; GIORGIS, A.O.; ANGÓN, E.; LAMELA ARTEAGA, P.; HECKER, F. 2014. Concentración de flúor y arsénico en el agua de red de General Pico (Argentina) durante el periodo 2007-2013. *Rev. Cien. Vet.* 16 (1) 101-112.
- PECHIN, G.H. 1999. El zinc en la nutrición de los rumiantes. *Cien. Vet.* 1(1):50-78.
- PECHIN, G. H.; CSEH, S. B.; CORBELLINI, C. N.; IDIARD, J. L.; MORALEJO, R. H.; VISCONTI, M.; DRAKE, M. L.; YARRAR, M. 1999. Estudio de las deficiencias minerales en bovinos de carne en el departamento de Maracó, provincia de La Pampa, Argentina. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 15(2):492-494.

- PECHIN, G. H.; CORBELLINI, C. N.; CSEH, S. B.; MEGLIA, G. E.; VERGARA, L. A.; MORALEJO, R.H. 2001. Efecto de la suplementación con óxido de zinc en bovinos para carne alimentados con forrajes marginalmente deficientes en zinc. *Rev. Med. Vet* 82(6):308-311.
- PEREZ CARRERA, A.; FERNANDEZ CIRELLI, A. 2004. Niveles de arsénico y flúor en agua de bebida animal en establecimientos de producción lechera (Pcia. de Córdoba, Argentina). *Invest. Vet.* 6:51-59.
- PEREZ CARRERA, A.; MOSCUZZA, C.; FERNANDEZ CIRELLI, A. 2005. Contenido de macrominerales en el agua de bebida de tambos de la provincia de Córdoba (Argentina) y su relación con los requerimientos de bovinos de leche. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 25: 115-121.
- PERKIN ELMER. 2000. *Analytical Methods for Absorption Spectrometry*. Estados Unidos. pp. 1-300.
- PETERS, A. 2011. Copper deficiency in beef cattle: Pasture applied copper study. Oregon. pp.1-5.
- POSTMA, G.C.; MINATEL, L.; CARFAGNINI, J.C. 2010. Deficiencia de cobre en bovinos en pastoreo de la Argentina. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 30(2):189-198.
- PRAMODA, J.; PRIYA PARTHASARADHI, S. 2017. Fluoride and its interaction with human life- A review. *W. J. Pharm. Res.* 6 (6):292-315.
- PUCHE, R.C.; RIGALLI, A. 2007. El flúor alrededor nuestro. *Actualizaciones en Osteología* (3):6-9.
- R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. en línea <<https://www.R-project.org/>>
- RANJAN, R.; SWARUP, D.; BHARDWAJ, B.; PATRA, R.C. 2008. Level of certain macro minerals in blood of cattle from fluoride polluted localities of Udaipur, India. *B. Environ. Contam. Tox.* 81:503-507.
- RANJAN, R.; SWARUP, D.; PATRA, R.C. 2011. Changes in levels of zinc, copper, cobalt and manganese in soft tissues of fluoride-exposed rabbits. *Fluoride* 44(2): 83-88.
- RANJAN, R.; RANJAN, A. 2015. *Fluoride toxicity in Animals*. Springer International Publishing. 105 p.
- RIGALLI, A.; ALLOATTI, R.; PUCHE, R. 1999. Measurement of total and difusible serum fluoride. *J. Clin. Lab. Anal.* 13: 151-157.
- RIGALLI, A.; PUCHE, R.C. 2007. Determinación de la concentración de flúor en muestras biológicas. *Actualizaciones en Osteología.* 3:27-34.
- ROBLES, C.; CABRERA, R.; MARTÍNEZ, A. 2015. Desgaste dentario en ovinos Merino de la Patagonia Argentina, tras la erupción en Chile del volcán Puyehue. *Rev. Med. Vet.* 96(2):10-14.
- ROSA, D.E.; MATTIOLI, G.A. 2002. Metabolismo y deficiencia de cobre en bovinos. *Analecta Veterinaria.* 22(1):7-16.

- ROSA, D.E.; FAZZIO, L.E.; PICCO, S.J.; FURNUS, C.C.; MATTIOLI, G.A. 2008. Metabolismo y deficiencia de zinc en bovinos. *Anal. Vet.* 28(2):34-44.
- RUGGIERI, F.; ALIMONTI, A.; BOCCA, B. 2016. Full validation and accreditation of a method to support human biomonitoring studies for trace and ultratrace elements. *Trend. Anal. Chem.* 80: 471–485.
- SAGER, R.L. 2003. Calidad de agua y desbalances minerales. *Cría Vacuna. Cuaderno de Actualización Técnica* 66: 62-67.
- SAMAL, P.; PATRA, R.C.; GUPTA, A.R.; MISHRA, S.K.; JENA, D.; SATAPATHY, D. 2016. Effect of Tamarindus indica leaf powder on plasma concentrations of copper, zinc and iron in fluorotic cows. *Vet. World* 9(10): 1121-1124.
- SARAVIA, F. C.; MARTÍNEZ, M. V.; ÁVILA, G. N. 2015. Relevamiento de la cupremia en rodeos de cría bovina del chaco semiárido salteño (Argentina). *Rev. Vet.* 26(1):59-62.
- SCHAMSCHULA, R.G; SUGAR, E.; UN, P.S.H.; TOTH, K.; BARNES, D.E.; ADKINS, B.L. 1985. Physiological indicators of fluoride exposure and utilization: an epidemiological study. *Comm. Dent. Epidemiol.* 13:104-107.
- SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I. J.; SKELLY, J. P.; YACOBI, A.; PITTMAN, K. A. 1992. Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *J. Pharm. Sci.* 81(3): 309-312.
- SHAH, V. P.; MIDHA, K. K.; FINDLAY, J. W.; HILL, H. M.; HULSE, J. D.; MCGILVERAY, I. J.; TONELLI, A. 2000. Bioanalytical method validation-a revisit with a decade of progress. *Pharm. Res.* 17(12): 1551-1557.
- SHARMA, Y.D. 1983. Serum sialic acid and ceruloplasmin levels in experimental fluorosis. *Toxicol. Lett.* 15: 1-5.
- SHUPE, J.L. 1980. Clinicopathologic features of fluoride toxicosis in cattle. *J. Anim. Sci.* 51:746-758.
- SHUPE, J.L; BRUNER, R.H.; SEYMOUR, J. L.; ALDEN, C.L. 1992. The pathology of chronic bovine fluorosis: a review. *Toxicol. pathol.* 20(2) 274-288.
- SINGH, J. L.; SWARUP, D. 1999. Biochemical changes in serum and urine in bovine fluorosis. *Indian J. Anim. Sci* 69:776-778.
- SMART, M. E.; COHEN, R.; CHRISTENSEN, D. A.; WILLIAMS, C. M. 1986. The effects of sulfate removal from the drinking water on the plasma and liver copper and zinc concentrations of beef cows and their calves. *C. J. Anim. Sci.* 66(3), 669–680.
- SPATH, E. J. A.; BECKER, B. E. 2012. Analisis epidemiologico de 8 años de diagnóstico de enfermedades de los bovinos. Balcarce 1997-2004. Grupo Sanidad Animal. Ediciones INTA, Buenos Aires. Boletin Tecnico N° 160 pp. 1-35.
- SPITTLE, B. 2011. Neurotoxic effects of fluoride. *Fluoride.* 44:117-124.
- STEWART, C.; CRAIG, H.M.; GAW, S.; WILSON, T.; VILLAROSA, G.; OUTES, V.; CRONIN, S.; OZE, C. 2016. Fate and agricultural consequences of leachable added to the environment from the 2011 Cordón Caulle tephra fall. *J. Volcanol. Geotherm. Res.* 327:554-570.

- STRITZLER, N.P.; RABOTNIKOF, C.M. 2008. El agua en los animales domésticos de producción. En: Golberg, A.D.; Kin, A.G. (eds.) El agua. De la molécula a la biósfera. Ediciones INTA. Argentina. pp. 166-187.
- SUTTIE, J.W. 1980. Nutritional aspects of fluoride toxicosis. J. Anim. Sci. 51:759-766.
- SUTTLE, N.; JONES, D. 2007. Micronutrient imbalance. En: Aiken, I. D. (ed). Sheep diseases Blakwell Publishing. UK. pp. 377-394.
- TOKALIOGLU, S.; KARTAL, S.; SAHIN, U. 2004. Determination of fluoride in various samples and some infusions using a fluoride selective electrode. T. J. Chem. 28: 203-211.
- ULEMALE, A.H.; KULKAMI, M.D.; YADAV, G.B.; SAMANT, S.R.; KOMATWAR, S.J.; KHANVILKAR, A.V. 2010. Fluorosis in cattle. Vet. World 3 (11): 526-527.
- VENKATESWARLU, P. 1990. Evaluation of analytical methods for fluorine in biological and related materials. J. Dent. Res. 69: 514-521.
- VIDARRUETA, I. 2017. Calidad y disponibilidad de agua para los bovinos en producción. [en línea] <<http://www.vetifarma.com.ar/novedades/22.pdf>>
- VILLANUEVA, G. J. 2011. Nutrición del ganado: cobre. *Sitio Argentino de Producción Animal*, [en línea] <<http://www.produccion-animal.com.ar>>
- WHEELER, S. M.; FELL, L. R. 1983. Fluorides in cattle nutrition: a review. Nutr. Abstr. Rev. B. 53:741-769.
- WHITFORD, G.M. 2005. Monitoring fluoride exposure with fingernail clippings. Schweiz Monatsschr Zahnmed. 115(8):685-689.
- XIAJIN, W.; FINBIN, X.; AOSHAN, Y. 2017. Processes occurring in the soil and fluorine. W. N. Nat. Sci.8:37-42.

ANEXO A

Resultados de los parámetros analizados en las muestras de agua de 39 establecimientos muestreados en el relevamiento inicial.

N° de muestra	pH	R.S. (mg/l)	SO ₄ ²⁻ (mg/l)	Ca ²⁺ (mg/l)	Mg ²⁺ (mg/l)	Cu ²⁺ (ppm)	Zn ²⁺ (ppm)	F ⁻ (ppm)
1	8,5	808	125	15,9	36	0,014	0,01	0,58
2	8,4	1140	227	27,5	19	0,016	0,01	3,65
3	8,4	216	8	19,7	15	n.d. ¹	0,01	0,34
4	7,9	1042	202	12,8	13	0,066	0,08	3,54
5	8,5	2736	1100	18,1	43	0,027	0,02	4,19
6	7,7	530	52	81,1	38	n.d.	0,01	0,46
7	8,6	1924	470	9,7	78	0,015	0,01	1,20
8	8,9	1630	560	20	52	n.d.	0,01	0,85
9	7,7	578	44	43,5	20	0,18	0,11	1,22
10	8,3	696	8	33,8	11,7	n.d.	0,02	0,01
11	7,8	1720	449	43,7	33,8	0,025	0,09	2,22
12	7,8	1910	494	29,3	21,6	0,036	0,02	2,61
13	7,3	4856	1960	86,3	100	0,019	0,06	1,76
14	8,4	1454	331	21,5	20,8	0,003	n.d.	2,84
15	7,9	2084	569	37,9	24,6	0,024	0,01	2,28
16	7,8	392	37	35,5	16,7	0,008	n.d.	0,61
17	7,7	2910	478	126	93,7	0,017	n.d.	0,95
18	8,1	984	184	35,8	30	0,007	n.d.	0,73
19	9,9	1374	471	11	13,1	0,003	n.d.	2,17
20	7,5	2148	414	187	87,4	0,004	n.d.	0,35
21	8,3	2964	897	39,9	37,6	0,004	n.d.	2,33

¹ n.d.: no detectado

22	8,2	978	159	38,3	21,1	n.d.	n.d.	1,82
23	8,2	938	170	45,4	26,3	0,053	0,07	1,60
24	8,1	990	S.D. ²	19,8	6,65	0,002	n.d.	1,20
25	8,4	254	49	14	13	n.d.	n.d.	0,33
26	7,6	908	206	20,9	11,5	n.d.	n.d.	3,31
27	8,0	894	178	23,8	18,5	n.d.	n.d.	2,66
28	8,9	332	46	27,5	14,8	n.d.	n.d.	0,28
29	8,8	3590	893	9,5	44,8	n.d.	n.d.	1,65
30	7,7	982	159	15	15,4	n.d.	n.d.	1,95
31	7,5	268	35	26	12	n.d.	n.d.	0,50
32	7,9	908	202	18,3	13,6	n.d.	n.d.	4,18
33	8,10	318	33	52,8	11,8	0,032	0,01	0,19
34	8,15	592	280	27,5	13,8	0,033	0,01	1,52
35	8,60	836	243	26,5	11,7	0,038	0,02	2,90
36	8,9	276	68	17,3	13,2	0,035	0,01	0,22
37	8,56	442	60	24	13	0,035	0,01	0,42
38	8,21	570	156	15	11,7	0,037	0,01	1,48
39	8,7	774	237	11,2	9	0,042	0,01	3,42
V.R.	6,8-9,2	<7000	<1500	<200	<500	0,5	0,2	<2

² S.D.: sin datos

ANEXO C

RESULTADOS DE LOS ANALISIS DE PUESTA A PUNTO.

1) Matriz SUERO

1.1) Límite de Detección (LOD) expresado como ppm de F⁻.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	
Lectura blanco 1	0,161	0,152	0,036	0,045	
Lectura blanco 2	0,125	0,123	0,125	0,123	
Lectura blanco 3	0,199	0,126	0,176	0,184	
Lectura blanco 4	0,152	0,215	0,069	0,102	
Lectura blanco 5	0,081	0,162	0,134	0,132	
Lectura blanco 6	0,058	0,152	0,201	0,091	
Lectura blanco 7	0,126	0,138	0,061	0,136	
Lectura blanco 8	0,028	0,146	0,213	0,168	
Lectura blanco 9	0,081	0,062	0,056	0,203	
Lectura blanco 10	0,184	0,136	0,127	0,098	
Desvío Señal	0,05622425	0,03801696	0,0631133	0,04749222	
Promedio Señal	0,1195	0,1412	0,1198	0,1282	
LOD	0,28817276	0,25525087	0,30913991	0,27067666	0,28 ppm

1.2) Rango aplicable.

LInf = LOD = 0,28 ppm

LSup = 8 ppm

1.3) Bias.

Ca	Co	BIAS	BIAS PROMEDIO
18	16,7	-7,22	-6,27
18	18,5	2,78	
18	18,32	1,78	
18	17,69	-1,72	
18	16	-11,11	
18	18	0,00	
18	19,1	6,11	
18	18,3	1,67	
18	18,5	2,78	
18	7,6	-57,78	
8	8,5	6,25	4,16
8	9	12,50	
8	9,2	15,00	
8	7,9	-1,25	

8	7,53	-5,88	6,89
8	8,2	2,50	
8	8,4	5,00	
8	7,9	-1,25	
8	8	0,00	
8	8,7	8,75	
1,9	2,3	21,05	
1,9	2	5,26	
1,9	1,92	1,05	
1,9	2,26	18,95	
1,9	1,87	-1,58	
1,9	2	5,26	
1,9	1,85	-2,63	
1,9	1,81	-4,74	
1,9	2,1	10,53	
1,9	2,2	15,79	

1.4) Precisión.

1.4.1) *Repetibilidad*

	5 ppm	1,9 ppm	0,5 ppm
1	4,8	1,86	0,5
2	5,02	2	0,5
3	4,72	1,98	0,48
4	4,97	1,9	0,49
5	5,63	2,01	0,5
Promedio	5,028	1,95	0,494
Desv est.	0,35800838	0,0663325	0,00894427
n	5	5	5
CV %	7,12029395	3,40166645	1,81058136

1.4.2) *Precisión intermedia*

Réplica	F-(ppm)	F-(ppm)	F-(ppm)	F-(ppm)		
1	4,96	4,23	4,28	5,2	n días	4
2	4,76	5,21	5,33	5,24	Promedio	5,04
3	5,62	4,63	5,62	4,96	n	20
4	5,03	5,69	5,41	4,89	Desv. Est.	0,41718953
5	4,69	5,16	4,58	5,22	CV%	8,28

1.5) Recuperación.

Adición F- (ppm)	Conc mtra	Conc mtra+st	Recup.	Recup. promedio
0,5	1	1,57	114	88,57 %
0,5	1	1,42	84	
0,5	1	1,4	80	
0,5	1	1,56	112	
0,5	1	1,37	74	
0,5	1	1,26	52	
0,5	1	1,52	104	
1	1	2,09	109	103,43 %
1	1	2,1	110	
1	1	2,03	103	
1	1	2,03	103	
1	1	1,96	96	
1	1	1,94	94	
1	1	2,09	109	
2	1	3,08	104	101,64 %
2	1	3,1	105	
2	1	3,02	101	
2	1	3,05	102,5	
2	1	3	100	
2	1	2,98	99	
2	1	3	100	
5	1	6	100	100,29 %
5	1	6,1	102	
5	1	6	100	
5	1	5,98	99,6	
5	1	6	100	
5	1	6,02	100,4	
5	1	6	100	

2) Matriz PASTO

2.1) Límite de Detección (LOD) expresado como ppm de F⁻.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	
Lectura blanco 1	0,50	0,56	0,62	0,65	
Lectura blanco 2	0,62	0,63	0,57	0,71	
Lectura blanco 3	0,48	0,80	0,81	0,62	
Lectura blanco 4	0,52	0,74	0,67	0,91	
Lectura blanco 5	0,66	0,66	0,59	0,76	
Lectura blanco 6	0,60	0,59	0,80	0,84	
Lectura blanco 7	0,90	0,66	0,76	0,63	
Lectura blanco 8	0,66	0,81	0,69	0,59	
Lectura blanco 9	0,78	0,80	0,74	0,61	
Lectura blanco 10	0,69	0,69	0,86	0,56	
Desvío Señal	0,12999573	0,09020963	0,0989332	0,11525816	
Promedio Señal	0,641	0,694	0,711	0,688	
LOD	1,03098718	0,9646289	1,0077996	1,03377449	1,01 ppm

2.2) Rango aplicable.

$$L_{inf} = LOD = 1,01 \text{ ppm}$$

$$L_{Sup} = 8 \text{ ppm}$$

2.3) Bias.

Ca	Co	Bias	BIAS PROMEDIO
18	17,6	-2,22	-2,43
18	18,3	1,67	
18	18,32	1,78	
18	17	-5,56	
18	18,4	2,22	
18	18,8	4,44	
18	19,1	6,11	
18	17,6	-2,22	
18	18,5	2,78	
18	12	-33,33	
8	7,6	-5,00	
8	7,4	-7,50	
8	8,5	6,25	
8	8,9	11,25	
8	7,53	-5,88	

8	7,7	-3,75	5,26
8	8	0,00	
8	8,9	11,25	
8	8	0,00	
8	7,5	-6,25	
1,9	2	5,26	
1,9	2,1	10,53	
1,9	1,97	3,68	
1,9	2,1	10,53	
1,9	1,87	-1,58	
1,9	2	5,26	
1,9	1,85	-2,63	
1,9	1,81	-4,74	
1,9	2,1	10,53	
1,9	2,2	15,79	

2.4) Precisión.

2.4.1) Repetibilidad

	5 ppm	1,9 ppm	0,5 ppm
1	5,2	1,92	0,5
2	4,9	1,8	0,5
3	5,13	1,69	0,6
4	4,3	1,9	0,57
5	4,5	1,87	0,5
Promedio	4,806	1,836	0,534
Desv est.	0,39329378	0,09343447	0,04774935
n	5	5	5
CV %	8,18339125	5,08902337	8,94182501

2.4.2) Precisión intermedia

Réplica	F-(ppm)	F-(ppm)	F-(ppm)	F-(ppm)		
1	2,30	2,09	2,30	2,05	n días	4
2	1,85	1,88	2,01	1,98	Promedio	1,99
3	1,92	1,78	1,99	1,87	n	20
4	2,10	1,96	1,92	1,90	Desvió Estándar	0,13628144
5	1,93	2,04	2,00	1,85	CV%	6,86

2.5) Recuperación.

Conc agregada (ppm)	Conc mtra	Conc mtra+st	Recup.	Recup. promedio
1	0,7	1,6	90	96,86 %
1	0,7	1,67	97	
1	0,7	1,69	99	
1	0,7	1,72	102	
1	0,7	1,54	84	
1	0,7	1,64	94	
1	0,7	1,82	112	
2	0,7	2,75	102,5	94,64 %
2	0,7	2,5	90	
2	0,7	2,69	99,5	
2	0,7	2,32	81	
2	0,7	2,56	93	
2	0,7	2,74	102	
2	0,7	2,59	94,5	
5	0,7	5,64	98,8	94,46 %
5	0,7	5,9	104	
5	0,7	5,2	90	
5	0,7	5,32	92,4	
5	0,7	5,4	94	
5	0,7	5,12	88,4	
5	0,7	5,38	93,6	

3) Matriz AGUA

3.1) Límite de detección (LOD) expresado como ppm de F⁻.

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	
Lectura blanco 1	0,1	0,09	0,08	0	
Lectura blanco 2	0,2	0	0,1	0,15	
Lectura blanco 3	0,1	0,2	0,2	0,12	
Lectura blanco 4	0,1	0,15	0,14	0,2	
Lectura blanco 5	0	0,12	0,2	0,19	
Lectura blanco 6	0,1	0,1	0,2	0,08	
Lectura blanco 7	0,2	0	0,12	0,1	
Lectura blanco 8	0,2	0	0,2	0,1	
Lectura blanco 9	0,2	0,19	0	0	
Lectura blanco 10	0	0,2	0,13	0,1	
Desvío Señal	0,07888106	0,08222598	0,06634087	0,06769211	
Promedio Señal	0,12	0,105	0,137	0,104	
LOD	0,35664319	0,35167793	0,33602261	0,30707634	0,34 ppm

3.2) Rango aplicable.

L_{inf} = LOD = 0,34 ppm

L_{sup} = 8 ppm

3.3) Bias.

Ca	Co	BIAS	BIAS PROMEDIO
8	8,51	6,38	2,06
8	8,01	0,12	
8	8,46	5,75	
8	7,7	-3,75	
8	8,94	11,75	
8	7,56	-5,50	
8	8,34	4,25	
8	8,36	4,50	
8	8,52	6,50	
8	7,25	-9,38	
1,9	1,7	-10,53	0,11
1,9	2,05	7,89	
1,9	2,04	7,37	
1,9	1,94	2,11	
1,9	1,68	-11,58	
1,9	1,8	-5,26	
1,9	1,5	-21,05	
1,9	1,93	1,58	
1,9	2,24	17,89	
1,9	2,14	12,63	
0,8	0,8	0,00	-3,38
0,8	0,79	-1,25	
0,8	0,7	-12,50	
0,8	0,77	-3,75	
0,8	0,86	7,50	
0,8	0,65	-18,75	
0,8	0,76	-5,00	
0,8	0,77	-3,75	
0,8	0,83	3,75	
0,8	0,8	0,00	

3.4) Precisión

3.4.1) Repetibilidad

	5 ppm	1,9 ppm	0,5 ppm
1	4,3	1,85	0,56
2	4,9	1,69	0,48
3	5	1,84	0,5
4	5,6	1,96	0,5
5	4,62	2	0,44
Promedio	4,884	1,868	0,496
Desv est.	0,48402479	0,12111978	0,04335897
n	5	5	5
CV %	9,91041754	6,48392802	8,74172717

3.4.2) Precisión intermedia

Réplica	F-(ppm)	F-(ppm)	F-(ppm)	F-(ppm)		
1	3,15	2,4	3,1	3,05	n días	4
2	3	2,6	2,65	2,96	Promedio	2,94
3	2,98	2,8	3,16	3,1	n	20
4	3,5	3,2	2,4	2,98	Desv. Est.	0,28422147
5	2,6	2,9	3,2	3	CV%	9,68

3.4) Recuperación

Adición (ppm)	F-	Conc mtra	Conc mtra+st	Recup.	Recup. promedio
0,5	2	2,41	2,41	82	90,57 %
0,5	2	2,33	2,33	66	
0,5	2	2,39	2,39	78	
0,5	2	2,6	2,6	120	
0,5	2	2,52	2,52	104	
0,5	2	2,43	2,43	86	
0,5	2	2,49	2,49	98	
1	2	2,79	2,79	79	
1	2	2,84	2,84	84	
1	2	3,05	3,05	105	
1	2	3	3	100	

1	2	2,96	96		
1	2	2,9	90		
1	2	3,02	102		
2	2	4	100	99,29 %	
2	2	4	100		
2	2	4	100		
2	2	3,95	97,5		
2	2	3,98	99		
2	2	3,97	98,5		
2	2	4	100		
5	2	6,99	99,8		102,26 %
5	2	7	100		
5	2	7,02	100,4		
5	2	7	100		
5	2	6,98	99,6		
5	2	7,3	106		
5	2	7,5	110		