



Determinación de Metales Pesados en un Suplemento Nutricional de Origen Natural con Propiedades Antioxidantes

Bárbara E. Luna SAUCEDO ^{1*}, Ana C. Rodríguez RODRÍGUEZ ¹,
Odalys Quevedo ALVAREZ ² y Leila Cabrera RABÍ ¹

¹ *Laboratorio de Absorción Atómica, Departamento de Aseguramiento de la Calidad, Dirección de Producción, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Avenida 25 y 158, Playa, Apartado Postal 6990, La Habana, Cuba.*

² *Laboratorio de Absorción Atómica, Centro de Investigaciones del Petróleo. Washington 159, esq. Churrucá, Cerro, La Habana, Cuba.*

RESUMEN. El uso de productos naturales como suplementos nutricionales y fármacos requiere conocer con exactitud el contenido de algunos metales tóxicos para el hombre, tales como Cd, Pb, As y Hg. El D-OO3 es un principio activo extraído de la cera de la caña de azúcar, constituido por una mezcla de ácidos alifáticos de alto peso molecular, con propiedades antioxidantes. En este trabajo se determinó la concentración de As, Cd, Pb y Hg en D-OO3 por Espectrometría de Absorción Atómica con llama, empleando en el procedimiento de digestión una mezcla de los ácidos: nítrico, sulfúrico y perclórico. En la determinación de As y Hg se emplearon las técnicas de Generación de Hidruros y Vapor Frío, respectivamente. La exactitud del procedimiento de digestión empleado para cada caso fue evaluada satisfactoriamente por el método de añadido de estándar y determinación de la recuperación, lográndose por cientos de recuperación entre 95 y 105%. Los límites de detección estimados para el As, Cd, Pb y Hg fueron de 0,002, 0,02, 0,30 y 0,01 ppm, respectivamente. Los contenidos de As, Cd, Pb y Hg en el D-OO3 se encontraron por debajo de estos límites, así como del establecido por la USP 27 Ed. para productos similares.

SUMMARY. "Heavy Metals Determination in a Nutritional Supplement from Natural Origin with Antioxidant Properties". The use of natural products as nutritional supplements or drugs requires to know with accuracy the content of some toxic metals as Cd, Pb, As and Hg. The D-003 is a root material extracted from the sugar cane and composed by high molecular weight alifatic acids with antioxidant properties. In this work the concentration of As, Cd, Pb and Hg in D-003 by flame atomic absorption spectrometry was determined, employing a digestion procedure with nitric, sulfuric and perchloric acids. The hydride generation technique was used to determine As and cold vapour method for the determination of Hg. The accuracy of the determination was evaluated by the standard additions method and the recovery was satisfactory between 95 and 105%. The detection limits were 0.002, 0.02, 0.30 and 0.01 ppm for As, Cd, Pb and Hg, respectively. The contents of As, Cd, Pb and Hg were under the limits of detection as well as the established limit of the 27 United States Pharmacopeia for similar products.

INTRODUCCION

El uso y explotación de fuentes naturales de alimentos y medicamentos ha estimulado durante años el estudio de diversos productos naturales ¹. El D-OO3 es un principio activo extraído de la cera de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), constituido por una mezcla de ácidos grasos saturados y lineales desde 24 a 36 átomos de carbono ^{2,3}. Este producto presenta propiedades como hipolipemiante, antiagregante plaquetario y antioxidante, aumentando la respuesta antioxidante del organismo y protegiéndolo del estrés oxidativo promotor del envejeci-

miento y de estados fisiopatológicos asociados a este proceso, protegiendo las partes lipídicas y proteicas de las lipoproteínas, de modo tal que le confiere a las moléculas una mayor resistencia a la oxidación ^{4,6}.

En el ambiente regulatorio actual, los antioxidantes no se consideran medicamentos, sino suplementos nutricionales o productos naturales para la salud, ya que el estrés oxidativo no se considera una categoría terapéutica ⁷.

En aquellos productos cuyo consumo o administración se realiza de forma crónica cobra importancia determinar la posible presencia en

PALABRAS CLAVE: Antioxidantes, espectrometría de absorción atómica, metales pesados.

KEY WORDS: Antioxidants, atomic absorption spectrometry, heavy metals.

* Autor a quien dirigir la correspondencia. E-mail: baby.luna@cnic.edu.cu

su composición de sustancias o elementos de carácter tóxico para el organismo. Dentro de los contaminantes tóxicos prioritarios enumerados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Registro Internacional de Sustancias Tóxicas (IRPTC), se encuentran los metales y su interés se centra en el Arsénico, Cadmio, Plomo y Mercurio a causa de sus posibles efectos carcinogénicos para los seres humanos ⁸.

Debido al efecto tóxico, aún de pequeñas concentraciones de estos metales, resulta entonces necesario conocer en términos cuantitativos su presencia. Para esto se hace necesario no sólo el empleo de modernas técnicas analíticas con elevada sensibilidad, precisión, confiabilidad y bajos límites de detección, como la Espectrometría de Absorción Atómica con llama, la Generación de Hidruros y la técnica de Vapor Frío acoplada a EAA sin llama ⁹, sino también la selección y optimización de métodos de digestión adecuados ¹⁰.

Los métodos y procedimientos utilizados tienen que ser validados a través del examen y el aporte de evidencias objetivas que demuestren que satisfacen los requisitos particulares para los cuales están destinados. En algunos casos es necesario utilizar métodos que no han sido establecidos como normalizados y estos deben ser validados apropiadamente antes de ser utilizados. La validación del método establece que sus características son adecuadas para el uso pensado, y asegura la calidad y fiabilidad del método ¹⁰. La validación se realiza a través de una serie de experimentos, usando las condiciones específicas del método, el mismo tipo de matriz y empleando muestras dopadas. Esto trae consigo la evaluación de varios parámetros como exactitud, precisión en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, linealidad, límites de detección y cuantificación y recobrado. Las definiciones y los procedimientos para el cálculo de estos parámetros están adecuadamente descritos en muchas publicaciones relacionadas con el análisis biomédico y farmacéutico ¹¹⁻¹³.

En la industria farmacéutica, la validación de la metodología forma parte de las buenas prácti-

cas de laboratorio en el control de calidad, imprescindible para la licencia sanitaria y la comercialización de principios activos en la red nacional y en el extranjero ^{14,15}. El objetivo de este trabajo fue la determinación de Cadmio, Plomo, Arsénico y Mercurio por Espectrometría de Absorción Atómica en el producto natural D-OO₃, necesario para su registro sanitario y comercialización como suplemento nutricional.

MATERIALES Y METODOS

Reactivos

Los ácidos empleados (ácido nítrico, sulfúrico y perclórico) fueron de la firma Merck y de calidad puros para análisis. Las disoluciones patrones que se utilizaron en la preparación de las curvas de calibración se obtuvieron a partir de disoluciones de referencia de 1000 ppm de Cd, As, Hg y Pb, de la firma BDH. En todos los casos se enrasó con agua desionizada (conductividad 18 M/cm). Se utilizaron disoluciones de permanganato de potasio al 5%, borohidruro de sodio 3% m/v, sulfato de hidroxilamina al 25% y cloruro estannoso al 10%, todos de la firma BDH y de calidad puros para análisis. Todo el material de vidrio utilizado fue sometido a un procedimiento de limpieza con ácido nítrico al 10% (v/v) durante 24 h. Posteriormente se lavó cuidadosamente con agua destilada y por último con agua desionizada.

Equipos

La pesada de las muestras se realizó en balanza analítica Mettler con precisión de $\pm 0,0001$ g. Para la determinación de cadmio y plomo la digestión de las muestras se realizó en baños de arena RECISPLAC de la firma Selecta. Para la determinación de mercurio y arsénico se empleó un sistema cerrado con bombas de digestión ácida marca Paar. Se utilizó el espectrómetro de absorción atómica UNICAM Solar 919. En la Tabla 1 se resumen los parámetros instrumentales utilizados.

Muestra

La muestra con la cual se trabajó es un prin-

Parámetros	Cd	As	Hg	Pb
Longitud de onda (nm)	228,8	193,7	253,7	217,0
Intensidad de corriente (mA)	5,0	8,0	6,0	8,0
Ancho de rendija (nm)	0,5	1,0	0,5	0,5
Altura de Observación (mm)	12	8,0	10	10

Tabla 1. Condiciones instrumentales.

cipio activo extraído de la cera de la caña de azúcar, constituido por una mezcla de ácidos alifáticos de alto peso molecular (D-OO3).

Procedimiento de digestión de la muestra para la determinación de Cd y Pb¹⁰

Se pesaron 500 mg de muestra y se les añadieron 2 ml de ácido nítrico concentrado, se tapó con un embudo y luego se colocó en el baño de arena entre 100 y 150 °C hasta formación de una sustancia sólida oscura, se repitió la adición de 2 ml de ácido nítrico concentrado hasta desaparición de la sustancia sólida oscura. Luego se adicionaron 2 ml de la mezcla ácida, nítrico, sulfúrico y perclórico, en proporción 10:4:1 y se aumentó la temperatura entre 250 y 300 °C, hasta que la disolución se volvió totalmente transparente y se formaron cristales de sales húmedas sin llevar a sequedad. Para determinar el contenido de Cd y Pb se trasvasó cuantitativamente la disolución, a un matraz aforado de 25 ml y se enrasó con agua desionizada¹⁰. Por cada muestra a digerir se prepararon tres réplicas.

Ensayo en blanco

Se repitió el procedimiento anterior a partir de la adición de los 2 primeros ml de ácido nítrico. Las determinaciones de Cd y Pb se realizaron en las muestras digeridas en sistema abierto, directamente en el Espectrómetro de Absorción Atómica con una llama estequiométrica de aire-acetileno.

Digestión de la muestra para la determinación de Hg y As

Se pesaron 100 mg y se trasvasaron a la tasa de teflón de la bomba de digestión Paar. Se añadieron 3 ml de ácido nítrico concentrado, la tasa de teflón se colocó en la bomba de digestión la cual se selló convenientemente y se colocó en la estufa a 90 °C durante 2 h. Para determinar el contenido de Hg y As se trasvasó cuantitativamente el contenido de la tasa de teflón, a un matraz aforado de 10 ml y se enrasó con agua desionizada. Por cada muestra a digerir se prepararon tres réplicas.

Ensayo en blanco

Se repitió el procedimiento a partir de la adición de 3 ml de ácido nítrico.

Determinación de Mercurio¹⁰

Para la determinación de Hg se tomaron 10 ml de la muestra digerida en la bomba de digestión y se colocaron en el frasco de reacción del

sistema de vapor frío, se añadieron 2 ml de ácido sulfúrico 1N, permanganato de potasio al 5% gota a gota hasta color rosado estable, 2 ml de sulfato de hidroxilamina y 2 ml de cloruro estannoso, se cerró inmediatamente el frasco de reacción y se conectó la bomba de aire. Se tomó la lectura máxima que se observó en el digitalizador.

Determinación de Arsénico¹⁶

En la determinación de As se mezcla la muestra digerida en medio ácido clorhídrico 3 mol/L se mezcla con una disolución de borohidruro de sodio al 3%; el hidruro así producido fue transportado por una corriente de nitrógeno de 10 L/h desde el separador gas-líquido hasta la celda de cuarzo colocada en el espectrómetro, la cual fue calentada mediante una llama estequiométrica de aire-acetileno. Los análisis se realizaron por triplicado.

Validación del método analítico¹⁷⁻²⁰

Estudio de linealidad

Como criterios para una buena linealidad de los sistemas se consideraron la prueba F de linealidad para un 95% de confianza y los coeficientes de variación de los factores de respuesta inferiores a 5 % .

Determinación del límite de detección y cuantificación

El límite de detección ($k = 3$) y el límite de cuantificación ($k = 10$) se determinaron en cada caso según la IUPAC²¹⁻²², con 10 mediciones del blanco de digestión.

Determinación de la exactitud

En este trabajo por no contar con un material de referencia similar a la muestra analizada, fue necesario el empleo del método de añadido de estándar y determinación de la recuperación para validar el procedimiento de digestión ácida utilizado, tanto en el sistema abierto como en el cerrado. Se realizaron adiciones a cuatro niveles de concentración para cada uno de los analitos.

Determinación de la precisión en condiciones de reproducibilidad

La precisión, expresada como reproducibilidad, se obtuvo, en una muestra dopada, a través de la determinación de Cd, Pb, Hg y As a un nivel de 0,5, 2,0, 0,3 y 0,04 µg/mL, respectivamente en 5 días diferentes. El criterio de aceptación para una buena reproducibilidad fue un coeficiente de variación inferior al 5 %¹⁷⁻²⁰.

Determinación de la precisión en condiciones de repetibilidad

La repetibilidad se evaluó por el análisis de 6 réplicas independientes de la muestra dopada con Cd, Pb, Hg y As a un nivel de 0,5, 2,0, 0,3 y 0,04 µg/ml, respectivamente, por el mismo técnico en el mismo día y equipo. El criterio de aceptación para una buena repetibilidad fue un coeficiente de variación inferior al 5% ¹⁷⁻²⁰.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de linealidad

Mediante una prueba F de linealidad al 95 % de confianza se determinaron los intervalos lineales de concentraciones de las disoluciones de referencia para la calibración, los cuales fueron: de 0,01 a 0,07 µg/mL para As, de 0,5 a 4 µg/mL para el Pb, de 0,2 a 0,8 µg/mL para el Cd y de 0,1 a 0,5 µg/mL para el Hg. En la Tabla 2 aparecen los parámetros de las ecuaciones de calibración para los elementos analizados. Se puede apreciar, además que los coeficientes de variación de los factores de respuesta, para los cuatro elementos, son inferiores a 5%, lo cual es un índice de buena linealidad.

Límite de detección y cuantificación

En la Tabla 2 se resumen los valores de los límites de detección y cuantificación estimados, según el criterio de la IUPAC, para cadmio, plomo, arsénico y mercurio. Los límites de detección y cuantificación obtenidos pueden considerarse aceptables teniendo en cuenta el intervalo de valores reportados en la bibliografía consultada.

sobre las diferentes metodologías de determinación de Cd, Pb, Hg y As en productos naturales empleando técnicas espectroscópicas.

Análisis de las muestras

Las determinaciones de Cd y Pb, en las muestras digeridas en sistema abierto, se realizaron directamente en el Espectrómetro de Absorción Atómica con una llama estequiométrica de aire y acetileno, mientras que la determinación de Hg y As, digeridas en sistema cerrado, se realizaron por la técnica de vapor frío, acoplada al Espectrómetro sin llama y por Generación de Hidruros, acoplado al Espectrómetro con llama, respectivamente.

Las concentraciones de Cd, Pb, Hg y As en D-OO3 se encuentran por debajo de los límites de detección estimados. Teniendo en cuenta que la 27ª Edición de la *United States Pharmacopeia* establece que el contenido total de metales pesados, para productos similares, debe ser inferior a 10 µg/mL ²³, se puede asegurar que el producto D-OO3 puede ser empleado como suplemento nutricional, sin riesgos de tipo toxicológico en cuanto al contenido de estos metales.

Determinación de la exactitud

De acuerdo a los resultados del añadido y recobrado para los cuatro metales analizados (Tabla 3) se obtuvieron por cientos de recuperación entre 95 y 105%, lo cual demuestra que existe una buena exactitud en los procedimientos de digestión empleados.

Cd	Pb	Hg	As
Y = 0,075x	Y = 0,0059x	Y = 0,075 + 0,001x	Y = 0,0031x
R ² = 0,9984	R ² = 0,9980	R ² = 0,9996	R ² = 0,9993
CV = 3,1 %	CV = 3,9%	CV = 1,2%	CV = 1,9%
LD = 0,02 µg/mL	LD = 0,30 µg/mL	LD = 0,01µg/mL	LD = 0,00 2µg/mL
LC = 0,07 µg/mL	LC = 0,10 µg/mL	LC = 0,05 µg/mL	LC = 0,005 µg/mL

Tabla 2. Parámetros de la recta de regresión, coeficientes de variación de los factores de respuesta y límites de detección (LD) y cuantificación (LC) para Cd, Pb, Hg y As.

Elemento	% de recuperación (n = 3)			
	Adición 1	Adición 2	Adición 3	Adición 4
Cd	96,7	95,0	98,9	97,0
Pb	99,9	99,3	105,0	102,4
Hg	97,8	98,9	100,0	95,3
As	97,0	96,6	97,5	101,3

Tabla 3. Porcentaje de recuperación de Cd, Pb, Hg y As en muestras de D-OO3 dopadas. Adición 1: Cd 0.3 (g/mL, Pb 1.0 µg/mL, Hg 0.15 µg/mL y As 0.02 µg/mL. Adición 2: Cd 0.4 µg/mL, Pb 1.5 µg/mL, Hg 0.20 µg/mL y As 0.03 µg/mL. Adición 3: Cd 0.5 µg/mL, Pb 2.0 µg/mL, Hg 0.30 µg/mL y As 0.04 µg/mL. Adición 4: Cd 0.7 µg/mL, Pb 3.0 µg/mL, Hg 0.40 µg/mL y As 0.06 µg/mL

Elemento	Reproducibilidad (n = 3)	Repetibilidad (n = 6)
Cd (0,5 µg/mL)	x = 0,500	x = 0,500
	DE = 0,008	DE = 0,007
	CV = 1,60%	CV = 1,40%
Pb (2 µg/mL)	x = 2,000	x = 2,000
	DE = 0,070	DE = 0,063
	CV = 3,50%	CV = 3,15%
As (0,04 µg/mL)	x = 0,039	x = 0,039
	DE = 0,001	DE = 0,0008
	CV = 2,56%	CV = 1,92%
Hg (0,3µg/mL)	x = 0,302	x = 0,301
	DE = 0,008	DE = 0,007
	CV = 2,65%	CV = 2,32%

Tabla 4. Precisión en condiciones de reproducibilidad y repetibilidad en muestras de D-OO₃ dopadas. DE: desviación estándar, CV: coeficiente de variación.

Determinación de la precisión en condiciones de reproducibilidad y repetibilidad

En la Tabla 4 se consignan los resultados de la determinación de la precisión, en muestras dopadas, tanto en condiciones de reproducibilidad como de repetibilidad, para el Cd, Pb, As y Hg, donde todos los coeficientes de variación fueron inferiores al 5%, que pueden considerarse aceptables teniendo en cuenta lo reportado en la bibliografía consultada¹⁷⁻²⁰.

CONCLUSIONES

Se comprobó que los procedimientos de digestión ácida empleados en la preparación de la muestra para la determinación de Cadmio, Plomo, Arsénico y Mercurio en D-OO₃, son válidos, en los rangos de concentraciones estudiadas, lo cual corresponde con lo reportado en la literatura para matrices semejantes. Como las concentraciones de Cadmio, Arsénico, Plomo y Mercurio en la muestra analizada son inferiores al contenido total de metales pesados establecido por *The United States Pharmacopeia* (USP 29) para productos similares, el D-OO₃ está avalado para su registro sanitario y comercialización, sin riesgos de tipo toxicológico en cuanto al contenido de estos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Marcucucci, M. (1995) *Quím. Ind. Farm.* **1**: 26
- González, L., D. Marrero & A. Laguna (2002) Laboratorios Dalmer SA. Patente CU 22,723; USA 6, 486, 205
- Méndez, E., Y. Jardines, D. Marrero & V. González (2004) *Rev. CENIC. Cienc. Quím.* **31**:
- Castaño, G., R. Mas, L. Fernández, E. López, J.A. Gutiérrez, J. Illnait, J.C. Fernández, R. Gámez & E. Álvarez (2002) *Drug Res. Develop.* **3**: 337-48.
- Arruzazabala, M. L., D. Carvajal & R. Mas (2003) *Clin. Drug Inv.* **23**: 107-18.
- Castaño, G., R. Menéndez & R. Mas (2003) *Clin. Drug Inv.* **23**: 193-203.
- Martínez, G., R. Delgado, G. Garrido, M. Guevara, D. Garcías, E. Páez (A.J. Núñez (2003) "Mitos y realidades de la terapia antioxidante". *Vimang. Nuevo producto natural antioxidante*, Ciudad De La Habana, Cuba. págs. 5-12.
- Hernández, M.T. & M. Garcías (1999) *Rev. Cub. Hig. Epidemiol.* **37**: 132-5.
- Price, J. (1978) "Analytical Atomic Absorption Spectrometry". Ed. Heyenan Son Ltd., págs. 85-93.
- Rodríguez, A., B. Luna, L. Martín & J. Mosquera (2005) *Rev. CNIC. Cienc. Quím.* **36**: 9-14.
- Byrialsen, K., J. Kristiasen & J. M. Christensen (1998) *Analyst.* **123**: 7-12
- Mehta, C.A. (1997) *Analyst.* **122**: 83R-8R.
- Green, J.M. (1996) *Anal. Chem.* **68**: 305A-9A.
- Berridge, J. C. (1995) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **14**: 7-12.
- Clarke, G.S. (1994) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **12**: 643-52.
- Quevedo, O., B. Luna & A. Rodríguez (1998) *Rev. CNIC. Ciencias Químicas* **29**: 37
- Castro, M., S. Gascón, M. Pujol, J.M. Sans & L.Vicente (1989) "Validación de métodos analíticos". A.E.F.I., Sec. Catalana, Comisión de Normas de Buena Fabricación y Control de Calidad, España, págs. 17-51.
- Valcárcel y Ríos, M. (1992) "La calidad en los laboratorios analíticos". Cap.VI. Edit. Reverté, S.A, págs. 72, 185, 245
- Garcés, J., A. Mariné & R. Codony (1988) *Cienc. Ind. Farm.* **7**: 182-9.
- USP XXII (1990) The United States Pharmacopeial convention, 1225. *Validation of compendial methods.* págs. 1710-2
- IUPAC (1977) *Appl. Spectrosc.* **31**: 348.
- Long, G.L. & J. D. Winefordner (1983) *Analytical Chemistry* **55**: 712A-24A.
- USP 29-NF 24 (2006) The United States Pharmacopeia Convention.