

APLICACIÓN DE MICROONDAS EN LA DIGESTIÓN DE HÍGADO DE BOVINO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE METALES PESADOS

Leticia GARCÍA-RICO y Martín E. JARA-MARINI

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Apartado Postal 1735, Hermosillo 83000, Sonora, México

(Recibido abril 1995, aceptado febrero 1996)

Palabras clave: digestión por microondas, hígado de bovino, metales pesados

RESUMEN

Se modificó la técnica de digestión por vía húmeda utilizando tecnología de microondas, con el fin de reducir el tiempo de preparación de la muestra en la determinación de elementos metálicos como Cd, Pb y Cu, en hígado de bovino por espectroscopía de absorción atómica con flama. La técnica de digestión se estandarizó con 1.25 g de hígado de bovino, adicionando 5 ml de HNO_3 50 % v/v y 3 ml de H_2O_2 al 30 % v/v. El intervalo empleado para el poder del horno fue del 85-100 % a una presión de 90 psi y con un tiempo total de digestión de 55 min. Una vez optimizadas cada una de las variables, se procedió a evaluar la exactitud y la precisión del método por medio de la adición de estándares. Para Cd y Pb la recuperación fue del 100 % y para Cu el valor promedio fue de 100.50 %, con un coeficiente de variación de 3.89 %. Los resultados obtenidos, tanto de precisión como de exactitud, se ubicaron dentro de los rangos aceptados para productos de origen animal. Esto indica que la tecnología de microondas proporciona los resultados adecuados en un tiempo significativamente menor al utilizado por los métodos tradicionales y sin la pérdida de compuestos volátiles.

ABSTRACT

The use of a microwave digestion system was evaluated as a mean of reducing sample preparation time for the later determination of metals such as Cd, Pb, Cu in beef liver by atomic absorption spectrometry. The procedure involved the digestion of 1.25 g of liver with 5 ml of HNO_3 50 % v/v and 3 ml of H_2O_2 30 % v/v at 90 psi, 85-100 % of the power range, with 55 min of digestion time. Standard addition recoveries expressed in percentages were 100 % both for Cd and Pb and 100.5 % for Cu with a variability coefficient of 3.89 %. The results obtained for metals in beef liver were in agreement with the values published by USDA. The digestion method provides accurate and precise results in less time than conventional digestion procedures, without volatile elements loss.

INTRODUCCIÓN

Debido a que los metales pesados se encuentran distribuidos a lo largo de toda la cadena alimentaria, los métodos analíticos utilizados para cuantificarlos deben ser capaces de generar información precisa y exacta.

En estos métodos se requiere, primeramente de la destrucción del material orgánico; este es el paso crítico en el análisis, ya que generalmente es lo que determina los límites bajos de detección e influye en el blanco analítico, además de ser la etapa más lenta en la investigación (Kingston y Jassie 1986).

Actualmente existen muchas modificaciones a los métodos

oficiales, todas encaminadas a optimizar los tratamientos de las muestras con el fin de generar información confiable; un ejemplo es la digestión por microondas.

Teóricamente, la digestión por microondas se basa en la interacción directa de la radiación electromagnética con los disolventes empleados en la muestra en un sistema cerrado. El horno de microondas utiliza una frecuencia de 2450 MHz, lo que permite la penetración de la energía en la muestra y que las moléculas giren y choquen entre sí; se produce el calentamiento del líquido y éste a su vez realiza el ataque al material orgánico en un tiempo menor al requerido por los métodos de digestión tradicionales (Kingston y Walter 1992). La tec-

nología por microondas se ha aplicado a diversos materiales geológicos, metalúrgicos, botánicos y más recientemente a los alimentos (Kingston y Jassie 1988, Kalra *et al.* 1989).

La mayoría de estos estudios se han enfocado a material de referencia certificado y/o a la comparación entre este sistema y los métodos tradicionales de digestión (Ducros *et al.* 1994, Gulmini *et al.* 1994). Sin embargo, la información sobre los productos de origen animal es muy escasa.

Otra ventaja de la digestión por microondas es evitar el uso de mezclas peligrosas de oxidantes, ya que generalmente el ácido nítrico (HNO_3) proporciona buenos resultados (Kalra *et al.* 1989, OSW 1991). Además, la cantidad de ácido que se requiere durante la digestión es pequeña y debido a que ésta se realiza en un sistema cerrado, se reduce significativamente la contaminación tanto en la muestra como en el ambiente (Sheppard *et al.* 1994). Todas estas características del sistema de microondas hacen que disminuya el tiempo requerido para digerir el material orgánico presente en la muestra y, por lo tanto, el tiempo total de la preparación.

Actualmente, los métodos de digestión por microondas tienden a la automatización y permiten establecer parámetros de calidad y de eficiencia en el laboratorio, características esenciales para obtener una buena cuantificación de metales pesados.

Considerando todo lo anterior, el objetivo de este trabajo fue establecer una técnica de digestión por microondas que sirva para el monitoreo de diferentes metales pesados, en hígado de bovino, en un tiempo mucho menor al requerido por los métodos tradicionales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de la muestra

Al tejido hepático se le eliminó la grasa y el tejido conectivo con un cuchillo de acero inoxidable. Se cortó en trozos y se homogeneizó en una picadora eléctrica (Osterizer, México) por 30 seg a velocidad media, teniendo cuidado de no sobrecalentar el tejido. Cada una de las muestras homogeneizadas fueron transferidas a recipientes de plástico debidamente etiquetados.

Preparación del material

Para eliminar la contaminación con metales pesados, todo el material utilizado se lavó previamente con una solución RBS35 al 20% v/v (Pierce, Rockford, ILL, EUA) y se enjuagó con agua (H_2O) desionizada, con HNO_3 al 20% v/v (Mallinckrodt, Scientific Inc., Houston, TX, EUA) y finalmente con H_2O desionizada (Noller y Bloom 1978).

Preparación de estándares

Tanto el estándar múltiple de 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ como las soluciones de cada uno de los analitos se prepararon a partir de estándares inorgánicos de cadmio (Cd), plomo (Pb) y cobre (Cu) de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, adquiridos en Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA). En todos los casos se igualaron las matrices.

Digestión de la muestra

Los parámetros utilizados para la estandarización de la técnica de digestión fueron la concentración de HCl y HNO_3 (Mallinckrodt, Scientific Inc., Houston, TX, EUA), el volumen de HCl, HNO_3 y agua oxigenada (H_2O_2) 30% v/v (Sigma, St. Louis, MO, EUA), el poder del horno de microondas así como el tiempo aplicado en cada etapa de digestión.

Las concentraciones de HCl y HNO_3 probadas fueron de 50% v/v, 70% v/v y concentrado. El volumen de HCl y HNO_3 varió de 5 a 20 ml y de 0.5 a 3 ml para H_2O_2 30 % v/v. El poder del horno fluctuó entre 85 y 100 % y el tiempo de digestión varió de acuerdo con los parámetros anteriores.

Los criterios para establecer el programa de digestión fueron posibilitar la regulación de la presión interna del vaso mediante la válvula de seguridad del horno, cuando ésta se eleva por la generación de gases y asegurar la destrucción del material orgánico.

La digestión se estandarizó como sigue: se pesaron 1.25 ± 0.005 g de hígado de bovino homogeneizado en vasos de digestión DVL (CEM Corporation, Matthews, NC, EUA) y se les agregó 5 ml de HNO_3 al 50% v/v, cuidando cubrir totalmente la muestra. Después los vasos se cerraron herméticamente, se colocaron en el horno de microondas MDS-81D (CEM Corporation, Matthews, NC, EUA) y se programaron las primeras 4 etapas de digestión (Tabla I). Cumplido este primer ciclo, los vasos se llevaron a la campana de extracción donde se pusieron en hielo para aliviar la presión interna. Posteriormente se les adicionó 3 ml de H_2O_2 al 30% v/v, manteniendo la muestra a temperatura ambiente hasta que cesó la producción de burbujas. Los vasos se cerraron de nuevo y se acomodaron en el horno de microondas para aplicar las etapas de digestión restantes (Tabla I). Terminado este segundo ciclo, los vasos se colocaron nuevamente en hielo para aliviar la presión interna.

TABLA I. PROGRAMA DE DIGESTIÓN*

Parámetros	E t a p a						
	1	2	3	4	5	6	7
Poder (%)	95	90	85	0	100	90	0
Tiempo (min)	2	5	15	5	4	20	5
Presión (psi)	90	90	90	-	90	90	-

* Programa estandarizado para 12 vasos de digestión

Las soluciones resultantes se transfirieron a matraces volumétricos (clase A) de 25, 50 y 100 ml aforando con H_2O desionizada y se procedió a su cuantificación por medio de un espectrofotómetro de absorción atómica con flama, Spectr AA-20 (Varian, Mulgrave, Victoria, Australia).

Validación del método de digestión

Una vez estandarizado el programa de digestión, se proce-

dió a su validación por medio de la exactitud y la precisión. A su vez, esta última se determinó con base en los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad (APHA-AWWA-WPCF 1990, Garfield 1993).

Repetibilidad

Se considera la precisión del sistema que es la concordancia obtenida entre determinaciones independientes de una misma preparación de un estándar, realizadas bajo las mismas condiciones experimentales.

Así, se prepararon estándares de 1.4, 3.4 y 1.8 $\mu\text{g/ml}$ para Cd, Pb y Cu, respectivamente, y se procedió a su lectura por sextuplicado, ajustando a cero antes de cada lectura. Este procedimiento se realizó durante tres días diferentes y fue el mismo para los tres analitos.

Reproducibilidad

Se considera la precisión del método analítico y manifiesta la concordancia entre mediciones independientes de una muestra homogénea, bajo las mismas condiciones experimentales e introduciendo factores de variación de días, analistas y/o equipos.

Para esta determinación, se pesó una muestra homogénea por triplicado y se le adicionó 0.5 ml del estándar múltiple de 3 $\mu\text{g/ml}$, a cada una. Se digirieron y se leyeron para cada analito; esto se realizó durante 3 días consecutivos de trabajo.

Exactitud

Es la concordancia entre el valor promedio experimental obtenido y el valor de referencia o teórico. Generalmente es referido como porcentaje de recuperación.

Este parámetro se estimó utilizando tanto un estándar certificado de hígado de bovino SRM 1577b (National Institute of Standards & Technology) como por la adición de un estándar múltiple preparado en este laboratorio. Para el primer caso, se pesó el material de referencia de acuerdo con las indicaciones del proveedor y para el segundo, se pesó una muestra homogénea de hígado de bovino y se le adicionó 0.5 ml del estándar múltiple de 3 $\mu\text{g/ml}$. En ambos casos el análisis se realizó por sextuplicado. El porcentaje de recuperación resultó de dividir la concentración determinada experimentalmente entre la concentración adicionada y de multiplicar este cociente por 100.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tiempo total de digestión para las muestras de hígado de bovino, incluyendo el requerido para aliviar la presión interna de los vasos, fue de aproximadamente 2 h, tiempo significativamente menor al utilizado en otros métodos de digestión tanto por la vía húmeda (>6 h) (Kalra *et al.* 1989) como por la vía seca (>2 días) (Kingston y Jassie 1986). Así, el uso de la tecnología de microondas reduce considerablemente el tiempo de cuantificación de metales pesados, lo que

puede ser de gran utilidad en el monitoreo de productos de origen animal que requieren rapidez de certificación para el comercio internacional.

Durante la estandarización de la técnica se probaron diversos oxidantes. A diferencia de otras matrices, las 3 concentraciones de HNO_3 empleadas no fueron capaces de eliminar, por sí solas, la totalidad del material orgánico presente en 1.25 g del tejido hepático; además de que se generó una gran cantidad de vapores, los cuales pueden dañar al equipo. Es así como se preparó una mezcla azeotrópica $\text{HNO}_3\text{-HCl}$, capaz de acelerar la reacción y eliminar tales vapores. Aún cuando la mezcla produjo una buena digestión, ésta mostró interferencias en la cuantificación de otros elementos metálicos, como el arsénico y cuyos resultados no se incluyen en este artículo.

Respecto a la mezcla $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{O}_2$, se obtuvo una excelente digestión ya que la destrucción de la materia orgánica fue completa y el peróxido logró eliminar rápidamente los vapores de HNO_3 . Por ello se decidió utilizar esta mezcla en el estudio.

En cuanto al aforo final de las soluciones, los 3 volúmenes usados revelaron buenos resultados. Sin embargo, debido a que los niveles promedio de los metales en hígado de bovino de la región son de 0.42 $\mu\text{g/g}$ para Cd, 0.65 $\mu\text{g/g}$ para Pb y de 44 $\mu\text{g/g}$ para Cu, además de que este último presenta una variación de concentración muy amplia, se seleccionó el volumen de 50 ml como aforo final. Así se aseguró la lectura de varios analitos en una misma muestra.

Para describir las características de rendimiento del instrumento se empleó la sensibilidad o la concentración característica (CC) y el límite de detección (LD). La primera se determinó leyendo la absorbancia producida por una concentración dada en la región lineal y relacionando la ecuación de proporcionalidad para la concentración que provoca una absorbancia de 0.0044. El LD se consideró como la mínima concentración que indujo una señal distinguible (Bennett y Rothery 1983).

TABLA II. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO*

Elemento	Repetibilidad	Reproducibilidad
Cd	0.595	0.175
Pb	0.342	0.070
Cu	0.417	0.796

*Valores en porcentaje de coeficiente de variación

Los resultados obtenidos de LD y CC fueron de 0.003 y 0.009 $\mu\text{g/ml}$ para Cd y de <0.02 y 0.038 $\mu\text{g/ml}$ para Cu, que concuerdan con los descritos por Cathodeon (1994) de 0.002 y 0.009 $\mu\text{g/ml}$ para Cd y de 0.001 y 0.026 $\mu\text{g/ml}$ para Cu, respectivamente. Mientras que en el caso del Pb, solo se observó diferencia en el LD, cuyo valor fue de 0.09 $\mu\text{g/ml}$

respecto al 0.01 µg/ml descrito en la misma publicación.

En cuanto a la repetibilidad (**Tabla II**), los coeficientes de variación para los 3 analitos se encontraron dentro de los recomendados para los métodos espectrofotométricos ($\leq 1.5\%$) (Garfield 1993), lo que indica que existe muy buena precisión instrumental (USP 1990).

Con respecto a la reproducibilidad, también los coeficientes de variación para los 3 analitos fueron $\leq 1.5\%$ (**Tabla II**). Además, no se evidenciaron diferencias significativas ($p=0.05$) entre distintos días de trabajo en ninguno de los 3 metales, existiendo una relación muy significativa entre la cantidad adicionada y la cantidad medida.

TABLA III. RESULTADOS DE LA PRUEBA DE EXACTITUD

Elemento	Estándar certificado*		Adición de estándar**
	Referencia	Determinado	
Cd	0.50 ± 0.03	0.49 ± 0.02	100
Pb	0.129 ± 0.004	< LD	100
Cu	160 ± 8	159 ± 1.70	100.5 ± 3.89

* µg/g ± desviación estándar

** Porcentaje de recuperación ± desviación estándar

LD, Limite de detección

Finalmente, en la prueba de exactitud realizada mediante el análisis del estándar certificado, las concentraciones de Cd y Cu determinadas fueron muy acordes con los valores de referencia (**Tabla III**). El Pb no se analizó debido a que el LD del método analítico fue menor al valor reportado. En cuanto a la prueba de exactitud utilizando el estándar múltiple, fue posible recuperar el 100 % del Cd y del Pb adicionados al tejido. Para Cu, el rango de recuperación varió de 94.90 a 106.11% con un coeficiente de variación de 3.87%. Este valor resultó menor al máximo permitido ($\leq 15\%$) por USDA (1991).

CONCLUSIONES

El sistema de digestión por microondas demostró ser un método rápido para eliminar el material orgánico presente en el hígado de bovino que logró reducir la cantidad de ácido utilizado como oxidante, sin necesidad de adicionar ácido perclórico (HClO₄) durante la digestión. Esto proporciona un método más seguro y evita la generación de contaminantes peligrosos al ambiente.

Con respecto a los resultados de precisión y exactitud del método, éstos se encontraron dentro de las normas de validación para los métodos espectrofotométricos, así como dentro de los valores estipulados por USDA (1991), para la determinación de elementos traza en productos de origen animal de

importación; por ello la tecnología de microondas puede generar resultados con buena precisión y exactitud en un tiempo significativamente menor al utilizado por los métodos tradicionales.

REFERENCIAS

- APHA-AWWA-WPCF (1990). *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Ed. Díaz Santos, México, D.F.
- Bennett P.A. y Rothery E. (1983). *Introducing atomic absorption analysis*. Varian, Australia, pp. 73-75.
- Cathodeon Inc. (1994). Hollow cathode lamps, Nueva York.
- Ducros V., Ruffieux D., Belin N. y Favier A. (1994). Comparison of two digestion methods for the determination of selenium in biological samples. *Analyst* 119, 1715-1717.
- Garfield F.M. (1993). *Principios de garantía de calidad para laboratorios analíticos*. AOAC. 1ª Ed. en español, Arlington, pp. 62-73.
- Gulmini M., Ostacoli G. y Zelano V. (1994). Comparison between microwave and conventional heating procedures in tesser's extractions of calcium, cooper, iron and manganese in lagoon sediment. *Analyst* 119, 2075-2080.
- Kalra Y.P., Mayrand D.G. y Radford F.G. (1989). Microwave digestion of tree foliage for multi-elements analysis. *Can. J. For. Res.* 19, 981-985.
- Kingston H.M. y Jassie L.B. (1986). Microwave energy for acid decomposition at elevated temperatures and pressures using biological and botanical samples. *Anal. Chem.* 58, 2534-2541.
- Kingston H.M. y Jassie L.B. (1988). *Introduction to microwave sample preparation: theory and practice*. American Chemical Society, Washington, D.C.
- Kingston H.M. y Walter P.J. (1992). Comparison of microwave versus conventional dissolution for environmental applications. *Spectroscopy* 7, 29-27.
- Noller B.N. y Bloom H. (1978). Methods of analysis for mayor and minor elements in foods. *J. Food Technol. in Australia*, Enero, pp. 11-23.
- OSW (Optical Spectroscopy Workshop) (1991). The EPA and microwave digestion. Seventh Annual Spring. Varian, México, pp. 45-62.
- Sheppard B.S., Heitkemper D.F. y Gaston C.M. (1994). Microwave digestion for the determination of arsenic, cadmium and lead in seafood products by inductively coupled plasma atomic emission and mass spectrometry. *Analyst* 119, 1683-1686.
- USP (1990). The United States Pharmacopeia. Washington, D.C. XXII, pp. 1221-1231.
- USDA (1991). *Chemistry laboratory quality assurance handbook*. Science Field Service Laboratories, Food Safety and Inspection Service. Washington, D.C. Vol. I.