

Trabajo Original

Toxicología analítica

## **Digestión de productos fitoterapéuticos, asistido por microondas, para el análisis espectrofotométrico de plomo**

**José Rafael Luna<sup>1✉</sup>, María Luisa Di Bernardo<sup>2</sup>, Anmary Valdivieso<sup>3</sup>, Tatiana Quintero<sup>3</sup>, Mager Hamdan<sup>4</sup>, José Ovalles<sup>2</sup>.**

1. Dr. en Bioanálisis. Grupo de Investigación en Toxicología Analítica y Estudios Farmacológicos (GITAEF). Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Urbanización Campo de Oro, Calle Principal, Edificio Carlos Edmundo Sala. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. Apartado postal 5101. mail: [lunajr@ula.ve](mailto:lunajr@ula.ve)
2. Dr. en Química Analítica. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.
3. Licenciada en Bioanálisis. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.
4. Farmacéutico. Universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

## Resumen

Los productos fitoterapéuticos se utilizan ampliamente en todo el mundo, por esta razón, los gobiernos deben garantizar la calidad, seguridad y eficacia de los mismos. Estos productos manufacturados de hierbas pueden constituir una fuente de metales tóxicos, bien por contaminación natural y/o por las mismas actividades humanas, incluyendo la adulteración. La exposición a algunos metales tóxicos tales como plomo y mercurio debe ser controlada debido a los efectos nocivos para la salud. La mayor parte de la preparación de las muestras para determinar elementos metálicos se realiza por digestión húmeda con ácidos oxidantes. No obstante, hoy en día es conocido que los hornos microondas aligeran enormemente la eficiencia de la disolución y digestión. En el presente trabajo se evalúa un método de digestión utilizando un equipo de microondas doméstico y una mezcla ácido/oxidante como método de preparación de la muestra para determinar plomo en un producto fitoterapéutico (*Taraxacum officinale*). La digestión se llevó a cabo en tres etapas secuenciales: tratamiento ácido y oxidante ( $\text{HNO}_3$ ) durante 30 segundos, enfriamiento durante 5 minutos y tratamiento oxidante con  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 30 segundos. El análisis cuantitativo se realizó utilizando la espectrofotometría de absorción atómica con atomización electrotérmica. La muestra analizada no superó la concentración de Pb de  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  para hierbas medicinales sugerida por la OMS, no obstante, el método podría utilizarse en la determinación de Pb en muestras contentivas de niveles superiores o muy cercanos al límite establecido por la OMS con un coeficiente de variación mejor que el 10% (incluyendo el sistema de digestión y el sistema analítico). Igualmente, esta propuesta preliminar representó un ahorro significativo de tiempo y costos en el desarrollo de la técnica.

**Palabras clave:** hierbas medicinales, plantas medicinales, productos fitoterapéuticos, digestión por microondas, plomo.

## Abstract

The phytotherapeutic products are used extensively throughout the world, for this reason governments must ensure quality, safety and efficacy of them. The herbal products may be a source of toxic metals, either by natural contamination or by the same human activities, including adulteration. Toxic metals exposure, such as lead and mercury, causes serious adverse health effects, therefore it must be controlled. Wet digestion with oxidizing acids is the most common sample preparation for metallic elements determination. Nonetheless, today is known that the use of microwave ovens improves greatly the efficiency of both dissolution and digestion. In this paper, we evaluate a microwave-assisted acid digestion by using an acid/oxidant mixture solution and a domestic microwave-equipment as method preparation for determining lead in a phytotherapeutic product (*Taraxacum officinale*). Digestion was carried out in three sequential steps: firstly, acid/oxidant treatment ( $\text{HNO}_3$ ) for 30 seconds by using the microwave-assisted acid digestion method; after, an intermediate cool treatment procedure for 5 minutes; and finally, oxidant treatment with  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 30 seconds. The quantitative analysis was performed using atomic absorption spectrophotometry with electrothermal atomization. The analyzed sample did not exceed the Pb concentration of  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  for herbal products suggested by the WHO. Nevertheless, the method could be applied in the determination of Pb at levels very close to the limit set by WHO, and even above it, with a variation coefficient better than 10% (including the digestion system and analytical system). This preliminary proposal represented a significant time/cost saving in the development of the proposed technique.

**Key words:** medicinal herbs, medicinal plants, phytotherapeutic products, herbal products, microwave digestion, lead.

## Introducción

Las plantas con propiedades medicinales fueron las primeras medicinas utilizadas por el hombre, se utilizan como fitofármacos y se definen como todas aquellas que contienen en alguno de sus órganos mezcla de compuestos químicos responsables de la actividad farmacológica y que administrados en dosis suficiente, producen efectos curativos (1-2).

Pocos pacientes o profesionales son conscientes de las interacciones potenciales entre los productos a base de hierbas y las drogas prescritas, así como la presencia de elementos tóxicos tales como los metales pesados, que pueden surgir por contaminación del producto o por que el metal es parte de su formulación (3-4).

El análisis de metales pesados en la mayoría de matrices orgánicas, requiere de una parcial o total disolución de la muestra previo al análisis instrumental (5), en donde la instrumentación está fundamentalmente dedicada al análisis de muestras líquidas previo a su detección (6); tal es el caso en la determinación de mercurio mediante el análisis de su vapor frío por espectrofotometría de absorción atómica (7-8) y la determinación de plomo mediante la espectrofotometría de absorción atómica con Atomización Electrotérmica (9). No obstante, es necesario que la muestra pueda presentarse, además de su forma líquida, con un contenido limitado de sólidos disueltos; por lo tanto, en el caso de tejidos y otras muestras biológicas (matrices orgánicas) se requiere una etapa de mineralización previa, convirtiendo la materia orgánica en dióxido de carbono, óxido de nitrógeno y agua, seguida de una dilución (6). Esta etapa se cumple mediante procesos de digestión que pueden ocurrir en sistemas abiertos y cerrados (10).

Los tratamientos de digestión convencionales, generalmente significan calentamiento en medio ácido por períodos bastante largos; en general este proceso se lleva a cabo con ácidos minerales concentrados, los que actúan más rápidamente a temperaturas y presiones elevadas aunque requieren supervisión constante y puede ocurrir una digestión incompleta (11).

Sin embargo, las muestras de plantas en general requieren un procedimiento de descomposición más completo para estar seguro de la movilización de los metales dentro de la solución debido al alto contenido de silicato, además de las desventajas propias de los métodos <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

de digestión húmeda utilizando plancha de calentamiento (12). Esto ha originado la aparición de métodos alternativos y el uso de las microondas para la digestión húmeda previo al análisis elemental (13-14).

El uso de hornos microondas domésticos modificados, con el objetivo de ser utilizados en métodos para la digestión ácida ha sido bien documentado (15) y es una alternativa muy apreciada en sustitución de los métodos clásicos de digestión que utilizan envases abiertos en planchas de calentamiento, lo que reduce drásticamente el tiempo de calentamiento, la cantidad de ácido utilizado y la contaminación (15-18). Muchos artículos han sido publicados describiendo el uso del horno microondas para la disolución de muestras botánicas entre ellos una revisión de Smith F., 1996 (15) y Lambie K., 1998 (16) en donde se determinan niveles de Cu, Co y Mg en muestras de tomate y cítricos.

En la descomposición de la muestra para la determinación de los elementos totales, la mayoría de los métodos de digestión húmeda necesitan de reactivos que destruyan la materia orgánica; el ácido nítrico es el más utilizado como oxidante primario, además comúnmente es utilizado con peróxido de hidrogeno para una oxidación más eficiente, debido a que el peróxido de hidrogeno refuerza el poder de oxidación y disminuye los residuos sólidos y el contenido de carbón residual (19-21). Por otra parte, el uso del ácido nítrico como oxidante para la digestión de plantas, utilizando microondas, ha sido empleado exitosamente, generando bajos valores del blanco y de la desviación estándar relativa (22-24), y al disminuir el volumen de reactivos utilizados contribuye a minimizar la contaminación y los costos, lo que es una ventaja al compararlos con los métodos de digestión en plancha de calentamiento. De acuerdo a lo anterior, en este trabajo presentamos un método de digestión rápido en horno microondas doméstico utilizando ácido nítrico y peróxido de hidrogeno, con la finalidad de ser utilizado en la digestión de productos fitoterapéuticos.

## **Materiales y métodos**

### **Reactivos**

Agua grado Milli-Q  $\geq 18$  M $\Omega$ .cm. Ácido nítrico 65%, ultrapuro (*Riedel-de Haën, Seelze, Alemania*). Peróxido de hidrógeno 35%, ultrapuro, (*Riedel-de Haën, Seelze, Alemania*).

### **Equipos**

Espectrofotómetro de absorción atómica con Atomización Electrotérmica. Marca: Perkin Elmer. Corrector de fondo ZEEMAN, modelo 2200, Germany. Horno de microondas doméstico.

### **Muestra**

La materia prima y formulaciones comerciales de *Taraxacum officinale*, fueron donadas por una conocida empresa de la región que comercializa productos fitoterapéuticos.

### **Procedimiento propuesto para la digestión:**

Limpia escrupulosamente con ácido nítrico al 20% los envases y materiales donde se llevará cabo el proceso de digestión, con la finalidad de eliminar los metales adheridos a las paredes de los mismos, pueden dejarse sumergidos al menos 2 horas en la solución de ácido nítrico al 20%. Posteriormente, enjuagar con agua destilada milli Q, al menos tres veces, y dejar secar los materiales en campana a temperatura ambiente.

Las muestras fueron secadas en una estufa durante 24 horas a 60°C y luego fueron trituradas y pulverizadas. En un vaso de precipitados de 10 mL de capacidad se pesó 0,2500 g de la muestra y finalmente se adicionó con precaución los reactivos responsables de la digestión de acuerdo al protocolo de trabajo propuesto en cada caso.

Cada vaso de precipitados fue cubierto con una película de teflón, provista de pequeños agujeros para controlar la presión durante la digestión y se colocan en un receptor que permite contener 12 muestras por vez y proteger la cavidad del horno, frente a fugas accidentales, que sin ser demasiado frecuentes se pueden producir. Sobre la tapa del recipiente se ajustó herméticamente un tubo con conexión final a una trampa de vacío para eliminar los gases generados durante la digestión. Para el desarrollo del método de digestión se utilizó un horno de microondas preparado con una trampa de vacío para permitir el escape de los gases que se producen en el interior del receptor de muestras, (25).

**Protocolo de digestión 1.** Consistió en adicionar a la muestra (n= 10) 3 mL de una solución de HNO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (7:3, v/v) (26), y someter a digestión en el microondas durante 30 segundos.

**Protocolo de digestión 2.** Consistió en adicionar a la muestra (n= 10) 3 mL de una solución de HNO<sub>3</sub> concentrado, someter a digestión en el microondas durante 30 segundos, dejar enfriar, adicionar 1 mL de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y someter nuevamente a digestión en el microondas por 30 segundos adicionales (27).

La eficiencia inicial en la digestión fue evaluada mediante inspección visual, considerando un menor residuo y mayor transparencia, un indicio de una digestión más eficaz.

Después de seleccionar el protocolo adecuado, y efectuar la digestión, el producto fue recolectado con pequeñas porciones de agua Milli-Q y transferidas a un matraz aforado de 25 mL de capacidad, el cual finalmente se enrasó con el mismo disolvente. Esta solución fue sometida al análisis de rigor por espectrometría de absorción atómica para determinar el contenido de plomo en las muestras propuestas. Paralelamente se realizó el análisis de una solución blanco contentiva de sólo los reactivos. Los resultados se expresaron en mg.Kg<sup>-1</sup> en relación al peso en seco.

La precisión del método se determinó mediante el análisis de Pb en 10 muestras (0,2500 g) producto de la digestión realizada simultáneamente. La exactitud del método se determinó mediante fortificación de las muestras con cantidades conocidas de Pb; previo al análisis, las muestras se dejaron en reposo y fueron sometidas a digestión después de transcurridas 24 horas (26).

## Resultados

Inicialmente seleccionamos dos protocolos de digestión con el objetivo de observar cual origina una digestión con menor contenido de residuos. Una vez aplicados los dos protocolos de digestión, 10 muestras por cada protocolo, y de acuerdo a una inspección visual se observó menor cantidad de residuos y mayor transparencia en el protocolo N° 2, por lo que se infiere una oxidación más eficiente y por lo tanto menor interferencia espectral, razón por la cual se procede a digestar las muestras de *Taraxacum officinale* de acuerdo a este protocolo, Tabla I, <http://www.sertox.com.ar/retel/default.htm>

con el objetivo de medir las concentraciones de Pb en las muestras y determinar la precisión o repetibilidad del método de digestión así como la exactitud y recuperación del mismo. (Ver Tabla I)

El nivel de plomo estudiado en la muestra (0,2500 g) fue 2,5 mg.Kg<sup>-1</sup>. La repetibilidad del método de digestión (n = 10), bajo las mismas condiciones experimentales, mostró un coeficiente de variación inferior al 10% (5,6%). (Ver Tabla II)

En la Tabla II, se observan los resultados obtenidos cuando se adicionan 0,70 y 0,98 mg de Pb por kilogramo de peso a 0,250 g de muestra de *Taraxacum officinale* cuya concentración basal ha sido previamente determinada; en el primer caso se obtiene una precisión intraensayo de 5,59 % para una recuperación de 109 % y en el segundo caso se obtiene una precisión intraensayo de 1,84 % y un porcentaje de recuperación de 106 %.

## Discusión y conclusiones

En el protocolo de digestión secuencial como ya se menciona, la inspección visual nos permitió observar cual protocolo de digestión permite obtener menor cantidad de residuos y mayor transparencia del digestado, por cuanto, cuando se aplico inicialmente la solución HNO<sub>3</sub> : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3,5:1,5) y se llevó en una sola etapa al microondas, fue evidente la mayor cantidad de sólidos presentes en la muestra, siendo comparable al trabajo de Moreira y col., 2005 (26), en donde utilizando esta misma mezcla, en un horno microondas Prolabo modelo 7195, la muestra no fue completamente disuelta; no obstante, en el método de dos etapas, se produjo un digestado transparente y con muy pocos residuos lo que se explica debido a que se origina una oxidación más completa de la muestra, cuando se adiciona en una segunda etapa el peróxido de hidrogeno y se somete la muestra a un nuevo calentamiento en el microondas; estos resultados son similares a los encontrados por Grijalva y col., 2001 (27), cuando producen la digestión de diferentes alimentos de consumo humano utilizando un digestor microondas MDS 2000. Por otra parte, en este trabajo, el tiempo de mineralización de las muestras utilizando horno microondas domestico fue aproximadamente 10 minutos, lo que



representa un ahorro significativo de tiempo en el desarrollo de la técnica en comparación con los métodos tradicionales (26-27).

Debido a que la naturaleza de la muestra y otros factores pueden ocasionar errores durante las diferentes etapas del análisis, los resultados del analito podrían originar una recuperación incompleta por pérdida del analito de la muestra o una recuperación en exceso por contaminación de la muestra (6). En este trabajo la recuperación del método reporta valores de 106 % y 109 %, que pueden considerarse un valor por exceso quizás debido a errores sistemáticos. Sin embargo, existen trabajos como el de Benavides y Col, 2006 (28) cuyos resultados debido a la digestión de las muestras en planchas de calentamiento originan porcentajes de recuperación por el orden del 97 % indicando pérdida del analito, nosotros consideramos que en este trabajo la recuperación en exceso se debe a contaminación durante las fases del proceso quizás debido a los reactivos utilizados. Por otra parte, Arce S., 2005 (29), utilizando un método de digestión en capsulas de teflón con HNO<sub>3</sub>, HClO<sub>4</sub> y HF lograron una recuperación excelente de Pb en *Valeriana officinalis* en el orden de 99,8 %, esta recuperación quizás sea debido a la combinación de tres agentes oxidantes aunque en sacrificio de costos y tiempo en el análisis.

En cuanto a la precisión, en la Tabla II se muestra una precisión que indica la repetibilidad del método por el orden de 5,4 % indicando que ciertamente existen errores aleatorios inherentes a todo el método desde la el proceso de digestión hasta la medición del elemento, precisión aceptable para la determinación de estas concentraciones de Pb considerando que los valores de referencia en plantas medicinales no deben exceder 10 mg Kg<sup>-1</sup> (30-31) y los valores basales de 2,51 miligramos de Pb por kilogramo de muestra.

Finalmente, se concluye que la digestión de plantas medicinales como la *Taraxacum officinale* puede realizarse utilizando un horno microondas domestico, lo que permite obtener una oxidación más completa de la muestra y una buena precisión y exactitud al momento de cuantificar concentraciones de Pb en las mismas, además, representó un ahorro significativo de tiempo en el desarrollo de la técnica. Por último, este método de digestión fue utilizado para la mineralización de muestras vegetales en trabajos anteriores y en otros que

actualmente se están desarrollando, en nuestro centro de investigación, debido fundamentalmente a su bajo costo y rapidez.

**Tabla I. Protocolo de digestión aplicado a las muestras <sup>(a)</sup>**

Etapa	Condiciones experimentales			
	Reactivo	Volumen	Potencia	Tiempo
Inicial	HNO <sub>3</sub>	3 mL	700 Watts	30 segundos
Enfriamiento	-	-	-	5 minutos
Final	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1 mL	700 Watts	30 segundos

<sup>(a)</sup> *Taraxacum officinale* = 0,2500 g (n= 10).

**Tabla II. Determinación de la exactitud del método por adición de Pb a muestras de *Taraxacum officinale*.**

Concentración Pb (mg Kg <sup>-1</sup> ) n=3 (0,250 mg)			
Pb Basal	Pb Adicionado	Pb Total Recuperado $\bar{x} \pm ds$ (%CV)	% de recuperación
2,51 ± 0,14	0,70	3,49±0,20(5,59)	109
2,51 ± 0,14	0,98	3,70±0,07(1,84)	106

## Referencias Bibliográficas

1. Lucas Morea/Sinexi S.A. Medicina Tradicional. 1997. (citado Julio de 2006) Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos26/medicamentosvegetal/medicamentos-vegetal.shtml>.
2. Monge, A. El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales. Universidad de Navarra. Ciencia e Investigación. 2003; 6 (1):36-9.
3. Tema de Interés. Remedios a base de hierbas y bioquímica clínica. Acta Bioquímica Latinoamericana. 2003; 37(4): 445-60.
4. [Lynch E](#), [Braithwaite R](#). A review of the clinical and toxicological aspects of 'traditional' (herbal) medicines adulterated with heavy metals. Expert Opin Drug Saf. 2005; 4(4):769-78.
5. De Oliveira, Elizabeth. Sample Preparation for Atomic Spectroscopy: Evolution and Future Trends. J. Braz Chem. Soc. 2003; 14(2):174-82.
6. Hoening M. Preparation steps in environmental trace element analysis-facts and traps. Talanta. 2001; 54: 1021-38.
7. Colina de Vargas M, Romero R. Mercury determination by cold vapour atomic absorption spectrometry in several biological indicators from lake Maracaibo, Venezuela. Analyst. 1992; 117: 645-7.
8. Ang HH, Lee KL. Análisis of mercury in Malaysia herbal preparations. Journal of Medicine and Biomedical Research. 2005; 4(1): 31-6.
9. Chow, P.Y.T., Chua, T.H., Tang, K.F. Dilute acid digestion procedure for the determination of lead, Copper and mercury in traditional Chinese medicines by atomic absorption spectrometry. 1995. Analyst 120, 1221-3.
10. Farias S., Disanto N., Garavaglia R., Pucci G., Schwint A., Batistoni D. Digestión de matrices biológicas asistida por microondas para el análisis espectrofotométrico de boro en BNCT. XXVI Reunión anual AATN, Bariloche, 1999.
11. Herrera C., Tello M., Ibanez I., et al. Digestión proteica con microondas y su aplicación en preparación de muestras para análisis de harina de pescado. Bol. Soc. Chil. Quim. 2001; 46(4): 487-94.
12. Polkowska H., Danko B., Dybczynski R., Koster A., Bode P. Effect of acid digestion method in cobalt determination in plant materials. Anal. Chim. Acta. 2000; 408(1): 89-95.
13. Abu-Samra A., Morris J., Koirtyohann S. Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. Anal. Chem. 1975; 47(8): 1475-7.
14. Abu-Samra A., Morris J., Koirtyohann S. Trace Subs, Environ. Health. 1975; 9: 297-301.
15. Smith F., Arsenault E. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. Talanta. 1996; 43: 1207-68.

16. Lambie K., Hill S. Microwave digestion procedures for environmental. *Analyst*. 1998; 123: 103R-33R.
17. Margui E., Queralt I., Carvalho M., Hidalgo M. Comparison of EDXRF and ICP-OES after microwave digestion for element determination in plant specimen from an abandoned mining area. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 549: 197-204.
18. Soylak M., Tuzen M., Santos A., Andrade M., Costa S. Optimization of microwave assisted digestion procedure for the determination of zinc, copper and nickel in tea samples employing flame atomic absorption spectrometry. *Journal of Hazardous materials*. 2007; 149(2):264-8.
19. Carbonell V., Morales A., Salvador A., de la Guardia M., Burguera J, Burguera M. J. *Anal. At. Spectrom.* 1992; 7: 1085.
20. Carlosena A., Gallego M., Valcárcel M. Evaluation of various simple preparation procedures for the determination of chromium, cobalt and nickel in vegetables. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 1997; 12: 479-86.
21. Araujo G., Gonzalez M., Ferreira A., Nogueira A., Nobrega J. Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. *Spectrochim. Acta. Part B*. 2002; 57(12): 2121-32.
22. Zhou C., Wong M., Koh L., Wee C. Microwave-assisted diluted acid extraction of trace of metal from biological samples for atomic absorption spectrometric determination. *J. Anal. At. Spectrom.* 1996; 11: 585-590.
23. Chow P., Chua T., Ow B. Diluted-acid digestion procedure for the determination of lead, copper and mercury in traditional Chinese medicines by atomic absorption. *Analyst*. 1995; 120: 1221-3.
24. Dugenest S., Olle M., Ribes A., Grenier M. Chemical characterization of municipal solid waste incineration residue. Dissolution of elements with microwave-diluted acid digestion technique compared to conventional methods. *Analyst*. 1998; 26: 256-60.
25. Burguera M, Burguera, J. Microwave-assisted sample decomposition in flow analysis. *Anal. Chim. Acta*. 1998; 366(1-3): 63-80
26. Moreira F., Borges R., Oliveira R. Comparison of two digestion procedures for the determination of lead in lichens by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*. 2005; 60: 755-8.
27. Grijalva M., Ballesteros M., Cabrera R. Contenido de cromo en alimentos y estimación de su ingestión dietaria en el noroeste de México. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 2001; 51(1): 105-10.
28. Benavides A., Magdaleno B., Alarcón M. Determinación espectrofotométrica de plomo en plantas. *Boletín de Mineralogía*. 2006; 17: 91-3.

29. Arce S., Cerutti S., Olsina R., Gomez M., Martinez L. Determination of metal content in Valerian root phytopharmaceutical derivatives by atomic spectrometry. Journal of AOAC International. 2005; 88(1): 221-5.
30. Khan IA, Allgood J, Walter LA, Abourashed EA, Schlenk D, Benson WH. Determination of heavy metals and pesticides in ginseng products. Journal of AOAC International. 2001; 84: 936-9.
31. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials. Working document QAS/05.131/Rev.1 September 2005.

**Recibido: 14/08/10**

**Aceptado: 24/08/10**