Cuba Salud
IV Convención
Internacional de Salud
17-21 de octubre, 2022

Validación de una metodología para determinar cadmio y plomo en hortalizas frescas por Espectrofotometría de Absorción Atómica

Lyi Wong Trujillo[1]
Carlos García Pino [1]
Ariel Gonzalez Garcia[2]

[1] Instituto Nacional de Higiene, Epidemilogia y Microbiologia, La Habana, Cuba, lyi@infomed.sld.cu
[2] Instituto de Farmacia y Alimentos, La Habana, Cuba,

Introducción.La demanda de hortalizas frescas por la población se ha acrecentado y en la misma medida el riesgo de exposición a metales pesados producto de suelos expuestos a plaguicidas o fertilizantes inorgánicos,aguas de riego no tratadas o residuales,actividades antropogénicas,etc.Una ingesta a largo plazo de concentraciones altas de los mismos repercute negativamente en la salud humana. Por tal motivo, este trabajo tuvo como objetivos la validación de una metodología para determinar cadmio(Cd) y plomo(Pb) en hortalizas frescas por Espectrofotometría de Absorción Atómica por llama,la aplicación en el análisis de muestras y la verificación según las regulaciones.

Materiales y Métodos El proceso de validación se realizó según la NC-TS 368: 2010. Fueron evaluados el límite de detección,límite de cuantificación precisión,linealidad, y exactitud de la metodología analítica.Las muestras empleadas fueron hortalizas frescas provenientes de diversos organopónicos de Ciudad de la Habana.Se procesaron y se mineralizaron por vía seca y realizaron las lecturas en EAA.

Resultados.Los parámetros evaluados al método resultaron satisfactorios demostrando que el método cumple con los requisitos analíticos establecidos,ofreciendo resultados confiables para el análisis Cd y Pb todos los parámetros fueron aceptables a excepción de los límites de detección y cuantificación. Conclusiones: Enlas muestras analizadas no se detectó Pb por el método de cuantificación empleado y los valores de Cd obtenidos se encontraban por debajo de los límites máximos permisibles establecidos por las normas Codex Stand 193: 2015. Las concentraciones encontradas para ambos metales son inferiores a las reportadas por la NC 493:2015 ¨Contaminantes Metálicos en Alimentos¨.Regulaciones Sanitarias.(0.1 mg/kg).

Palabras clave: **hortalizas frescas, validación, cadmio, plomo.**

I. INTRODUCCIÓN

La agricultura urbana (AU) pretende subsanar la creciente demanda de alimentos y convoca a utilizar todos los espacios ociosos para la producción de alimentos. Los organopónicos constituyen una de las fuentes principales de abastecimiento de estos productos para la población. Fundamentalmente, las hortalizas y verduras frescas son la mayor parte de la producción. Estas representan un importante porcentaje de la dieta cubana en el presente siglo, se registran valores de consumo per cápita bastante elevado que superan 576 g por día con respecto a los 300 g/día que necesita el organismo (1), por lo que es necesario conocer la calidad con la que estos productos llegan hasta nuestros hogares. Uno de los riesgos para la salud relacionado con el consumo a las hortalizas y verduras frescas cultivadas en zonas urbanas es el paso de sustancias tóxicas como resultado de la contaminación de agua y suelos, por ejemplo metales pesados, específicamente cadmio y plomo (2,3).De ahí que sea de vital importancia contar con una metodología adecuada y válida para la determinación de los metales pesados en hortalizas frescas que permita reforzar la vigilancia sanitaria para este grupo alimenticio. Por lo que el objetivo de nuestro trabajo fue la validación de la metodología para determinar cadmio y plomo por Espectrometría de Absorción Atómica (EAA) y su aplicación en el análisis de muestras de diferentes organopónicos de Ciudad de la Habana.

II. MÉTODO

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Contaminantes Metálicos de la Sección de Química Sanitaria del Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología (INHEM). La parte experimental se dividió en dos etapas: la validación de las metodologías de análisis para la determinación de metales pesados (Cd y Pb) en hortalizas frescas y su aplicación al análisis de muestras recolectadas en diferentes organopónicos de Ciudad de la Habana, a fin de determinar los niveles de contaminación por los metales en estudio.

I.TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

Cada una de las muestras analizadas, tanto para la validación de las metodologías, así como para la determinación de los metales pesados, serán tratadas según una adaptación al método oficial de la AOAC 999,11 (4).

II.PROCEDIMIENTO

Se procedió a cortar y eliminar la parte no comestible de la hortaliza, posteriormente se sometió a un lavado con agua para eliminar cualquier suciedad en la superficie, luego se escurrió para seguido volver a lavar con agua desionizada y escurrir sobre papel absorbente para secar, después se troceo en pequeños pedazos para su homogenización utilizando un miniprocesador de alimentos. Una vez molida la muestra se pesó en un beaker 10 g de la misma, se tapó y se colocó en la estufa a 100 ºC durante toda la noche, al día siguiente se elevó la temperatura lentamente hasta la carbonización total hasta a 270 ºC en un periodo de tres días. Posteriormente se colocó en la mufla comenzando a 280 ºC, se elevó lentamente la temperatura en un periodo de siete horas hasta 450 ºC y se dejó a esta temperatura durante aproximadamente dieciséis horas para la incineración de la muestra. Se enfrió la muestra y se le añadió 1 mL de ácido nítrico concentrado al 65 %, transcurrida una hora aproximadamente y se colocó en la plancha hasta que secó, luego se procedió a colocar de nuevo en mufla a la misma temperatura anterior (450 ºC) entre tres a cuatro horas. Las cenizas obtenidas se disolvieron en 1 mL de ácido clorhídrico concentrado

al 37 % (1:1) en caliente y se trasvasaron a un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a volumen con agua desionizada realizando varios lavados de arrastre cuantitativo.

III.METODOLOGÍA DE VALIDACIÓN

Para la validación se utilizó como analito una muestra de col china para la validación del método obtenida del organopónico UBPC 25 y 246 en playa. Ciudad de la Habana. Para los cálculos y resultados estadísticos se utilizó el programa Microsoft Excel 2006 y el programa estadístico IBM SPSS Statistics 22.0.

Parámetros de validación según NC-TS 368: 2010 (5).

A.Límite de detención y cuantificación

El límite de detección y cuantificación se determinó analizando 10 de muestras de soluciones patrones con una concentración baja y se calculó por la expresión siguiente:

B.Linealidad

$$Ld = 3\,x\,S \qquad Lc = 10\,x\,S$$

S desviación estándar

Ld límite de detención.

Lc límite de cuantificación.|

A fin de evaluar la relación entre la señal analítica y la concentración se procedió a preparar una curva de calibración con diferentes concentraciones en el rango de 0.02 µg/mL hasta 1.4 µg/mL para el Cd y de 0.25 µg/mL hasta 8 µg/mL para el Pb, las soluciones se prepararon a partir de una solución intermedia de 100 ppm preparada a partir del estándar de Cd y Pb (1000 ppm) y se disolvieron en la misma matriz que las muestra.

Cada concentración se preparó por triplicado, finalmente se calculó la pendiente de la curva de calibración y se analizó en el coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2) fin de evaluar la linealidad del método y el mejor rango de trabajo.

C.Exactitud

Se evaluó mediante la técnica añadido – recobrado. Se analizaron 10 muestras fortificadas y no fortificadas con Cd y Pb a tres niveles de concentraciones diferentes 0.02, 0.04 y 0.08 µg/mL para el Cd y 1, 2 y 4 µg/mL para el Pb, todas las fortificaciones se prepararon de una solución intermedia de 100 ppm preparada a partir del estándar de Cd y Pb (1000 ppm). El álculo de recobro se obtuvo para cada concentración de la siguiente manera:

$$\%R = \frac{M_f - M_{nf}}{f} \; x \; 100$$

$\%R$ porciento de recuperación.

M_f muestra fortificada.

M_{nf} muestra no fortificada.

f fortificación.

D.Precisión

Para determinar la precisión del método se procedió a determinar los factores de repetibilidad y reproducibilidad interna. Se trabajó sobre las muestras fortificadas y no fortificadas del punto.

a) Repetibilidad

Medición de 10 muestras para cada nivel de fortificación por un mismo analista y las mismas condiciones de trabajo.

b) Reproducibilidad

Se midieron 5 muestras para cada nivel de fortificación en días diferentes por un analista y las mismas condiciones de trabajo. Para Evaluar la precisión se determinó las desviaciones estándar (DS) y los coeficientes de variación (CV).

IV.DETERMINACIÓN DE CD Y PB EN MUESTRAS RECOLECTADAS EN ORGANOPÓNICOS

A fin de completar el estudio, las metodologías validadas serán aplicadas a muestras recolectadas en diferentes organopónicos de Ciudad de La Habana que poseen una alta producción y comercio de hortalizas frescas de pesca y se consideran un lugar apropiado para evaluar los niveles de contaminación que presentan sus productos. Fueron recolectadas entre 3 y 6 muestras por organopónico (tabla1) las cuales fueron guardadas, clasificadas y etiquetadas en bolsas plásticas selladas de polietileno que después se transportó al laboratorio de Contaminantes Metálicos de la Sección de Química Sanitaria del INHEM donde se guardaron a una temperatura apropiada para su conservación, posteriormente se aplicó el tratamiento de las muestras descrito previamente para se procedió a leer en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica según los parámetros establecidos anteriormente para la determinación de Cd y Pb. Se determinó y verificó si cumplían con los límites establecidos por el Codex (6) para este tipo de producto.

Tabla1.Muestras recolectadas en los organopónicos

Organopónicos	Dirección	Muestras
UBPC "La Vereda"	222 y 39. La Lisa.	Rábano Lechuga Acelga Apio Ajo de montaña Col china *
UBPC "1ro de julio"	Avenida Independencia Km 3 ½, Cerro.	
UBPC "24 de febrero"	Avenida Independencia Km 1 ½, Cerro.	
UBPC "25 y 146"	Avenida 25 / 146 y 144, Playa.	
UBPC "5ta y 44"	5ta avenida / 42 y 44, Playa.	

*muestra utilizada para la metodología de validación.

III. RESULTADOS

A. Resultados de parámetros de la validación

Linealidad

Con los datos se elaboraron dos curvas de calibración, curva para Cd en el rango de 0,02 a 0.8 mg/L (Gráfico 1) y una para Pb en el rango de 0,25 a 8 mg/L (Gráfico 2).

Gráfico 1.

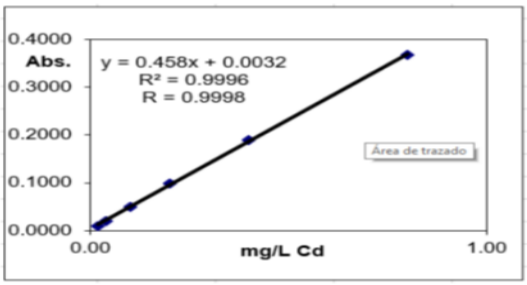
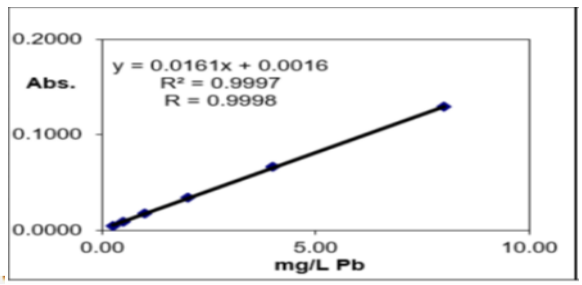


Gráfico 2.



En las curvas se obtuvo un coeficiente de correlación (R) de 0.9998 para Cd y de 0.9998 para Pb, dichos valores son aceptables y cumplen con lo establecido por el CECMED(7)), donde el valor de R en laboratorios de análisis no debe ser menor que 0.99. El coeficiente de determinación (R2) también resulto satisfactorio en las curvas de calibración de ambos metales, obteniéndose valores para Cd de 0.9996 y para el Pb de 0.9997, en ambos casos tanto para Cd como para Pb los valores de R2 son mayores a 0.98 cumpliendo lo planteado por ISPC(8).Límite de detención y cuantificación

En la tabla 2 se muestran los resultados 10 lecturas de un patrón de Cd de concentración 0.02 mg/L y uno de Pb con 0,5 mg/L. Los resultados muestran que la concentración mínima detectable para la determinación de cadmio es 0,00239 mg/L, para el plomo es de 0.06368 mg/L y el valor mínimo cuantificable para el cadmio es de 0,00797 mg/L y para el plomo 0,21229 mg/L.

Tabla2. Límites de detección y cuantificación

	Concentración (mg/L)	
Muestra	Cd	Pb
1	0.0183	0.4855
2	0.0181	0.5231
3	0.0201	0.4730
4	0.0189	0.4605
5	0.0181	0.4730
6	0.0189	0.4668
7	0.0191	0.5043
8	0.0203	0.5168
9	0.0181	0.4855
10	0.0190	0.4793
Promedio	**0.0188**	**0.4867**
DS	**0.00079**	**0.06368**
Ld	**0.00239**	**0.02122**
Lc	**0.00797**	**0.21229**

Exactitud

Se muestran las curvas de recuperación para Cd (Gráfico 3) y Pb (Gráfico 4) a partir de los promedios de recuperación a distintos niveles de fortificación para Cd y Pb.

Grafico 3.

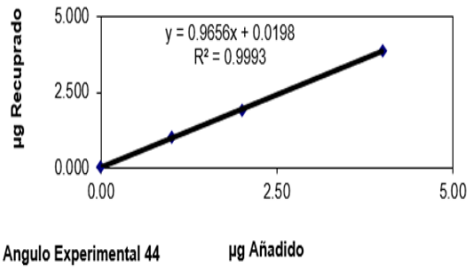
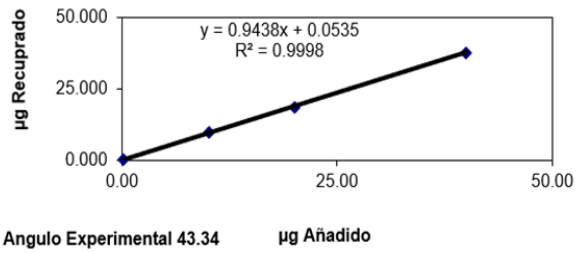


Grafico 4.



Los valores obtenidos en los diferentes niveles de concentración en las muestras fueron: para el nivel 1 de concentración de 104.06 % para el Cd y de 97.71 % para el Pb; el nivel 2 de concentración 95,38 % para el Cd y de 93,08 % para el Pb, el nivel 3 de concentración con 97,25 % para el Cd y de 94,73 % para Pb, aparecen en la tabla 3.

Tabla3. Valores promedio de los % de recuperación

Nivel	µg añadidos	n	µg recuperados	%R
		Cd		
1	1	10	1.0406	104.06
2	2	10	1.9076	95.38
3	4	10	3.8900	97.25
		Pb		
1	10	10	9.7714	97.71
2	20	10	18.6153	93.08
3	40	10	37.8905	94.73

Los resultados reportados en la recuperación tanto para el Cd como para el Pb, muestran un porcentaje aceptable y que cae dentro del rango establecido en estudios de validación, donde define a un % de recuperación aceptable del 80 al120%. El ángulo obtenido en la curva de recuperación es de 44° para el Cd y de 43.34° para el Pb y no se encuentran diferencias significativas al compararlo con el ángulo ideal que es de 45°, lo que nos permite conocer que tan exacto es el método. La pendiente experimental tiene un valor de 0.9656 (Cd) y 0,9434 (Pb) por lo que se encuentra muy próxima a los valores de la pendiente ideal que es 1 con valores de r^2 de 0,9993 (Cd) y 0,9998 (Pb).

Precisión

En la tabla 4 se muestran los resultados de repetibilidad para el Cd y el Pb, en las tablas 5 y 6 se muestran los resultados de reproducibilidad en ambos metales en días diferentes y en las tablas 7 y 8 se ven los resultados de la prueba tstudent para muestras independientes.

Tabla 4. Resultados de repetibilidad en Cd y Pb

Metal	n	mg/L	DS	CV
Cd	10	0.0118	0.0005	4.0239
Pb	10	0.9772	0.0302	3.0976

Tabla 5. Reproducibilidad en Cd.

Nivel	Día	n	Promedio (mg/L)	S	CV (%)
1	1	5	0.1146	0.0036	3,2065
	2	5	0.1176	0.0031	2,7044
2	1	5	0.2046	0.0105	5,1498
	2	5	0.2009	0.0058	2,9058
3	1	5	0.4010	0.0088	2,1985
	2	5	0.4010	0.0051	1,2841

Tabla 6. Reproducibilidad en Pb.

Nivel	Día	n	Promedio (mg/L)	S	CV (%)
1	1	5	0,9707	0,0389	4,0108
	2	5	0,9838	0,0209	2,1291
2	1	5	1,8259	0,0531	2,9118
	2	5	1,8772	0,0458	2,4419
3	1	5	3,7414	0,0462	1,2351
	2	5	3,8364	0,0842	2,1953

* En la muestra sin fortificar (nivel 0) de Pb no se obtuvo señal.

Tabla 7. Prueba t.student para muestras independientes Cd

Tabla 8. Prueba t.student para muestras independientes Pb

Nivel	Días	Sig. prueba de normalidad	Sig. prueba t
1	1	0.589	0.213
	2	0.075	
2	1	0.893	0.505
	2	0.471	
3	1	0.314	0.993
	2	0.507	

Nivel	Días	Sig. prueba de normalidad	Sig. prueba t
1	1	0.670	0.526
	2	0.496	
2	1	0.226	0.058
	2	0.917	
3	1	0.489	0.141
	2	0.156	

En análisis de la t de student los datos analizados siguieron distribución normal y la prueba arrojo valores de significación (Sig) en todos los casos para cada metal superiores a 0.05, no mostrando diferencias significativas entre los valores de concentración obtenidos en los diferentes días que se realizó la prueba.

Determinación de Cd y Pb en muestras recolectadas en organopónicos

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos de la determinación de Cd y Pb en hortalizas de los diferentes organopónicos de Ciudad de la Habana.

Tabla 9 .Resultados de Cd y Pb en vegetales por organopónico

Muestras	**Organopónicos**									
	5ta y 44		**25 y 146**		**1ro de Julio**		**24 de febrero**		**La Vereda**	
	Cd	**Pb**	**Cd**	**Pb**	**Cd**	**Pb**	**Cd**	**Pb**	**Cd**	**Pb**
Apio	**0.095**	NSD	**0.028**	NSD	**0.028**	NSD	**0.039**	NSD	NCos	NSD
Acelga	**0.020**	NSD	NSD	NSD	**0.077**	NSD	NCos	NSD	**0.077**	NSD
Lechuga	**0.030**	NSD	NSD	NSD	**0.018**	NSD	NCos	NSD	**0.047**	NSD
Rábano	NSD	NSD	NSD	NSD	**0.033**	NSD	**0.046**	NSD	**0.210**	NSD
Ajo Montaña	**0,045**	NSD	**0.053**	NSD	**0.063**	NSD	**0.073**	NSD	**0.020**	NSD

* Los valores estan expresados en mg/Kg

NSD: No se detectó.

Ncos: No se cosecho.

En los resultados no fue detectable la presencia de Pb por la metodología validada en ningún organopónicos para ninguna de las hortalizas analizadas, pero se puede afirmar que los valores de concentración se encuentran por debajo de los límites máximos permisibles por el Codex (6) para las hortalizas de hoja específicamente (apio, acelga, lechuga, ajo de montaña), para el caso del rábano el método empleado no es capaz de verificar que cumple con lo establecido por la norma, puesto que el límite de cuantificación del método (0.21 mg/Kg) es superior al límite máximo permisible para esta hortaliza (0.1 mg/Kg). Por consecuente es necesario el uso de un método cuantitativo más sensible que amplíe el rango de detección y cuantificación de Pb. Para el Cd se obtuvieron valores oscilaron entre 0,018 y 0,095 mg/Kg cumpliendo con lo establecido por el Codex (6)para las hortalizas de hoja (apio, acelga, lechuga,

ajo de montaña) con valores inferiores a 0.2 mg/Kg y a lo establecido en la norma cubana (9)y para el rabano valores inferiores a 0.1 mg/Kg. No se detectó señal en el rábano en los organopónicos de "5ta y 44" y "25 y 146", y de acelga y lechuga en "25 y 146", puesto que los valores se encuentran por debajo del límite de cuantificación establecido para el rango de trabajo (0.007) para Cd, encontrándose por debajo de los valores establecidos por el Codex(6) para cada uno de estos productos.

IV. CONCLUSIONES

Se validaron parcialmente las metodologías para la determinación de Cd en hortalizas frescas y de Pb en hortalizas frescas de hoja mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica con llama. En el proceso de validación del método se evaluaron los parámetros de linealidad, límite de detección, limite cuantificación, exactitud y precisión, y los resultados obtenidos para cada parámetro en el análisis de cada metal fueron aceptables, evidenciando la confiabilidad del método.

En la determinación de Cd y Pb en hortalizas frescas que se comercializan en los organopónicos analizados de La Habana, no se detectaron valores para Pb, los valores de Cd obtenidos se encuentran por debajo de los límites máximos permitidos por el Codex Stand 193: 2015.

En los casos que no se detectó señal los valores cumplen con lo normado para el caso específico de las hortalizas de hoja, y en el caso del rábano se consideró un resultado no concluyente puesto que es necesario una técnica más precisa para su cuantificación y posterior verificación contra la norma.

REFERENCIAS

(1) Pérez, N. Breve panorama del consumo de hortalizas en Cuba. Agricultura Orgánica; 2008 p28-29.
(2) Hernández, L. La agricultura urbana y caracterización de sus sistemas productivos y sociales, como vía para la seguridad alimentaria. Cultivos Tropicales. 2006 27(2), 13-25
(3) Olivares, S., García, D., Lima, L., Saborit, I., Llizo, A., Pérez P. Niveles de cadmio, plomo, cobre y zinc en hortalizas cultivadas en una zona altamente urbanizada de la ciudad de la Habana, Cuba. Revista Internacional de contaminación ambiental. 2013; 29(4), 285-294.
(4) AOAC.Official Method 999.11:Determination of Lead, Cadmium, Copper, Iron, and Zinc in Foods. 2015
(5) Oficina Nacional de Normalización. Guía para la validación de Métodos de Ensayos Químicos para Alimentos NC-TS 368, La Habana, Cuba. 2010
(6) Codex Stand 193. Norma general del Codex para los contaminantes y las toxinas presentes en los alimentos. 2015
(7) CECMED. De las buenas prácticas para laboratorios de control de medicamentos. Validación de métodos analíticos.2014
(8) Instituto de Salud Pública de Chile (ISPC). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos.2010

(9) Oficina Nacional de Normalización. Contaminantes metálicos en los alimentos. Requisitos Sanitarios NC 493, La Habana, Cuba. 2015.