

**DESARROLLO DE PRUEBAS ANALÍTICAS RÁPIDAS, CONFIABLES Y
SENSIBLES PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y SU ESPECIACIÓN
ORGÁNICA**

Daniel Esteban León Pérez

**Trabajo de investigación para optar el título de Magíster en Ciencias
Farmacéuticas y Alimentarias**

Asesor

Claudio Jiménez Cartagena.

Químico Farmacéutico, Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas Sub-
Especialidad Bioquímica, Doctor en Ingeniería Ambiental

**Universidad de Antioquia
Facultad de Química Farmacéutica**

Medellín, Junio 2014

Tabla de contenido

Introducción	VII
Objetivos	XI
Objetivo general	XII
Objetivos específicos	XII
Capítulo 1. El mercurio: toxicológica, especiación orgánica y retos analíticos	13
1. El mercurio	14
2. Análisis de mercurio y su especiación	22
3. Limitaciones del análisis en la especiación	39
4. Conclusiones y discusión	42
5. Referencias bibliográficas	43
Capítulo 2. Validación de un método analítico para la determinación de mercurio en camarón y pescado	51
Introducción	52
Materiales y métodos	53
Resultados y discusión	58
Conclusiones	60
Referencias Bibliográficas	61
Capítulo 3. Optimización y comparación de dos métodos analíticos para la cuantificación de metilmercurio en tejido de pescado	64
Introducción	65
Materiales	67
Extracción y determinación	68
Resultados	70
Discusión	80

Conclusiones _____	84
Referencias bibliográficas _____	86
Capítulo 4. Determinación de especies de mercurio en tejido de pescado mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas, validación del método de acuerdo con la Directiva 2002/657/CE de la Comunidad Europea _____	91
Introducción _____	92
Materiales y métodos _____	93
Extracción y Determinación _____	94
Resultados _____	97
Discusión _____	102
Conclusiones _____	103
Agradecimientos _____	104
Referencias bibliográficas _____	104

Lista de tablas

<i>Tabla 1 programa de calentamiento del horno microondas para la descomposición de la muestra</i>	55
<i>Tabla 2 Resultado de la linealidad y el rango</i>	60
<i>Tabla 3 Iones de identificación y confirmación de compuestos de interés</i>	76
<i>Tabla 4 Fragmentación de los compuestos derivatizados</i>	76
<i>Tabla 5 Condiciones optimizadas del método LLE</i>	80
<i>Tabla 6 Plan experimental de validación</i>	96
<i>Tabla 7 linealidad y sensibilidad del método</i>	97
<i>Tabla 8 Análisis de veracidad a través de material de referencia certificado</i>	98
<i>Tabla 9 Análisis de la repetibilidad y reproducibilidad del método</i>	99
<i>Tabla 10 Precisión y exactitud del método desarrollado "dentro-día, entre-días y entre analistas"</i>	100
<i>Tabla 11 Análisis en muestras reales</i>	101

Lista de Figuras

<i>Figura 1</i> Ciclo biogeoquímico del mercurio(Selin, 2009) _____	17
<i>Figura 2</i> Esquema para el análisis de las especies orgánicas de Hg _____	28
<i>Figura 3</i> Cromatogramas obtenidos con los tratamientos derivatizando con NaBEt ₄ : a) SPME y b) LLE, _____	71
<i>Figura 4</i> Cromatogramas obtenidos con los tratamientos derivatizados con NaBPh ₄ : a) SPME y b) LLE. _____	72
<i>Figura 5</i> Espectro de masas del metilfenilmercurio _____	74
<i>Figura 6</i> Espectro de masas del bifenilo producto de la derivatización _____	74
<i>Figura 7</i> Espectro de masas del etilfenilmercurio _____	75
<i>Figura 8</i> Espectro de masas del difenilmercurio _____	75
<i>Figura 9</i> Superficie de respuesta de la optimización del methylmercury _____	77
<i>Figura 10</i> Superficie de respuesta de la optimización del etilmercurio _____	78
<i>Figura 11</i> Superficie de respuesta de la optimización del fenilmercurio _____	79

Lista de anexos

<i>Anexo 1</i> Artículos publicado y sometidos _____	120
<i>Anexo 2</i> Participación de eventos _____	121

Introducción

La literatura científica y documentos gubernamentales abordan el mercurio (Hg) desde sus propiedades fisicoquímicas, sus interacciones ambientales, su ciclo biogeoquímico, su especiación (orgánica e inorgánica) y los métodos para su análisis. Solo el tema asociado a su toxicidad en los 10 últimos años la literatura científica registra alrededor de 5.000 documentos; aunque se ha dado respuesta a muchas preguntas sobre el peligro y el riesgo asociado su exposición, aún hay cuestionamientos que preocupan el interés científico como su dinámica ambiental y las estrategias analíticas para su análisis elemental y de especiación orgánica(Nordberg, Fowler, Nordberg, & Friberg, 2011).

Es conocido que el Hg es un elemento tóxico, a menudo asociado con el cadmio (Cd) y el plomo (Pb) incluido dentro de los metales pesados (Nordberg et al., 2011). A diferencia del Cd y el Pb, el Hg se encuentra en matrices ambientales y alimentarias en forma de diferentes especies químicas, cada una con un potencial toxicológico. De igual forma, mediciones de las concentraciones de Cd y de Pb en el ambiente proporcionan criterios de exposición significativos para su evaluación toxicológica, mientras que para el Hg es necesario distinguir entre el mercurio elemental (Hg^0), forma mercuriosa Hg^{1+} , forma mercúrica Hg^{2+} y los Compuestos orgánicos (principalmente compuestos alquilados) (Ceccatelli, Daré, & Moors, 2010).

La exposición a las diferentes formas de Hg es muy frecuente, se puede encontrar en el suelo, en el aire, en el agua y en los alimentos (Bank, 2012). Es un insumo industrial y aun se emplea para la fabricación de muchos de los productos de consumo masivo, como algunos tipos baterías, combustibles fósiles, empastes dentales y conservante en vacunas, entre otros. Por lo tanto, la incorporación en la cadena trófica es fácil y constituye uno de los mecanismos de entrada a los sistemas biológicos (Dua & Gupta, 2005; Health). Hay diferentes opiniones sobre la toxicología del mercurio a través de los organomercuriales en humanos, debido a que se evidencia una sintomatología tardía, y el período de latencia puede durar

hasta después de la exposición, mientras que los síntomas aumentan con bastante rapidez (Dua & Gupta, 2005). El período de latencia no disminuye por el aumento o disminución de la dosis y aún no se conoce el mecanismo asociado al período de latencia, ni se ha logrado establecer con claridad el mecanismo a través del cual las especies orgánicas de Hg generan neurotoxicidad (Ceccatelli et al., 2010).

El presente trabajo de investigación tiene por objetivo proporcionar una visión general sobre como las especies de mercurio interactúan con algunas biomoléculas y como se presentan algunos aspectos de su toxicología. Se presentarán estrategias de tratamiento y preparación de muestras en diferentes matrices, y las metodologías analíticas disponibles para el análisis de su especiación, como herramienta para la inspección y vigilancia de concentraciones de Hg y de organomercuriales en pescado. Además, se describe el desarrollo y validación de una metodología analítica para la determinación de mercurio total (HgT) en pescado, utilizando digestión con microondas y análisis por espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros, sistema de inyección flujo (AAS-FIAS y materiales de referencia certificados (SRM 2976 y BCR-463) Este método es aplicable para la evaluación de la exposición alimentaria de acuerdo con los parámetros de calidad establecidos en la Resolución 122 de 2012 del Ministerio de Salud y la Protección Social de Colombia.

Se presenta el desarrollo y optimización de un método rápido y sensible para la determinación de metilmercurio (MeHg) en tejido de pescado. En el cual se compararon la Microextracción en fase sólida (SPME) y la Extracción liquido-liquido (LLE) para establecer la técnica más eficiente para la extracción y de mejor recuperación a partir del material de referencia certificado (MRC) NIST 2976. En la SPME se evaluó la extracción en el espacio de cabeza con una fibra recubierta con DVB/CAR/PDMS y en la LLE se utilizó hexano como agente extractante. En ambos procedimientos se comparó la derivatización con tetraetilborato de sodio y con el tetrafenilborato de sodio. La separación, identificación y cuantificación se realizó mediante cromatografía de gases con detector selectivo de masas-masas.

Se optimizaron el pH, el volumen y la concentración del agente derivatizante a través de un diseño factorial de superficie de respuesta basado en un diseño central compuesto circunscrito y la respuesta se fijó como la recuperación en el MRC NIST 2976. El estudio se completó con la optimización del procedimiento de análisis de etilmercurio y fenilmercurio en matriz blanco dopado para seleccionar el estándar interno del método final.

Finalmente, se desarrolló la validación del método para identificar y cuantificar MeHg y etilmercurio (EtHg) por extracción líquido-líquido con hexano y determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas-masas. El método se desarrolló de acuerdo con la Directiva de la Comisión Europea 2002/657/CE, la norma ISO 17025, se emplearon los materiales de referencia certificados, SRM 2976 y NMIJ CRM 7402-a y se aplicó un enfoque de validación de matriz completa “en casa” con un diseño factorial fraccionado.. La validación se hizo con varios analistas, se consideró la significancia intra e inter días.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar pruebas analíticas rápidas, confiables y sensibles para la determinación de mercurio y su especiación orgánica en tejido de pescado.

Objetivos específicos

Evaluar la composición de muestras para el monitoreo de mercurio total en tejido de pescado, utilizando digestión asistida por microondas en recipiente cerrado y detección por espectrometría de absorción atómica con sistema de inyección en flujo con generador de hidruros.

Desarrollar procedimientos analíticos para la determinación de derivados organomercuriales mediante cromatografía de gases con detector selectivo de espectroscopia de masas-masas (GC-MS/MS).

Optimizar condiciones de extracción de metilmercurio por GC-MS/MS en tejido de pescado a través de la metodología de superficie de respuesta basada en un diseño factorial centrado compuesto circunscrito.

Validar el protocolo de análisis para la determinación de derivados organomercuriales mediante cromatografía de gases basado en la Directiva 2002/657/CE de la Comunidad Europea.

Capítulo 1
El mercurio: toxicológica, especiación orgánica y retos analíticos

1. El mercurio

1.1. Importancia del mercurio en el ambiente y en los alimentos

El mercurio (Hg) se deposita en los cuerpos de agua a través de las diferentes precipitaciones y por mecanismos de escorrentía o lixiviación del suelo. Las bacterias sulforeductoras de suelos y sedimentos en condiciones anaerobias son capaces de metilar el Hg y convertirlo en metilmercurio (MeHg) (Bank, 2012); compuesto de gran toxicidad y con gran potencial de incorporación en la cadena trófica hasta alcanzar los tejidos humanos a través de procesos de bioacumulación y de biomagnificación (Ceccatelli et al., 2010).

Las concentraciones de MeHg en peces y en general en animales marinos depende de la presencia y concentración del Hg en el agua, el pH, la cantidad de sólidos disueltos, la materia orgánica presente en el agua, la temperatura del medio y los diferentes microorganismos del ecosistema (Pirrone & Mahaffey, 2005). Cabe destacar que dichas concentraciones en el tejido de pescado también pueden verse afectadas por la presencia de azufre en el agua y de grupos sulfhídricos de proteínas (Farina, Rocha, & Aschner, 2011); por lo que predecir la dinámica de los procesos de bioacumulación es un proceso difícil. Se ha determinado que en un sistema acuático las mayores concentraciones de MeHg se encuentran en animales carnívoros como tiburones, atunes, gaviotas o pelicanos entre otros. Las concentraciones de MeHg en los peces de gran tamaño o aves puede ser un millón de veces más que en el agua de su hábitat (Dua & Gupta, 2005).

La figura 1 muestra la ruta más activa para la liberación y bioacumulación de Hg y de especies organomercuriales a través de la cadena alimentaria. Como se observa en los sedimentos, en las plantas y en el plancton el Hg se consume a través de la absorción pasiva en los alimentos (Dua & Gupta, 2005). Para los organismos autótrofos la exposición crónica al Hg no resulta ser perjudicial, caso

contrario le sucede a los organismos heterótrofos que pueden estar expuestos a concentraciones a través de una segunda ruta (Farina et al., 2011).

La biomagnificación del MeHg a través de la cadena alimentaria, se ve favorecida cuando los depredadores se alimentan de organismos contaminados con Hg, absorbiendo los contaminantes de con alta biodisponibilidad; posterior a la exposición se alcanzaran niveles superiores del compuesto con la adquisición de mayor carga corporal de Hg que los peces que consumen. De igual forma, el impacto de la ingesta de Hg en la población humana depende de la forma de Hg ingerida. El mercurio inorgánico (Hg^0) cuando se ingiere de forma crónica o aguda origina una serie de síntomas perjudiciales (Bank, 2012). Además, la oxidación de Hg^0 en medios lipófilos ocasiona acumulación en tejidos como el cerebral y el hepático (Farina et al., 2011).

Las formas orgánicas más prevalentes del Hg son el MeHg y el etilmercurio (EtHg). Los efectos tóxicos del MeHg se asocian al sistema nervioso central; estudios en Japón y en Irak han reportado muerte por envenenamiento tras el alto consumo de peces contaminados por Hg y retraso mental, parálisis cerebral y mudez en sobrevivientes y en los niños de padres expuestos (Grandjean, Weihe, Debes, Choi, & Budtz-Jørgensen, 2014; Nordberg et al., 2011). Se ha demostrado que el 95% de MeHg ingerido a través del consumo de pescado se absorbe en el tracto gastrointestinal y atraviesa la barrera placentaria, alcanzando niveles en el cerebro del feto entre 5 y 7 veces más que en la sangre de la madre (Grandjean et al., 2014). El MeHg llega al tejido y forma aductos con el azufre de la cisteína, pasando a las células endoteliales de la barrera hematoencefálica (Health).

El EtHg es menos tóxico que el MeHg; sin embargo la sintomatología que producen es similar. Un estudio reporta que el timerosal (conservante en vacunas) se metaboliza a EtHg, modificando la permeabilidad de la membrana celular e induciendo alteraciones en la duplicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y en la apoptosis (Farina et al., 2011).

En alimentos como el arroz, se han encontrado concentraciones considerables de organomercuriales, las cuales están asociadas a la dinámica de los humedales en donde se produce y por procesos bacterianos que facilitan la metilación. Cabe destacar que algunos científicos han indagado si los niveles de Hg o de MeHg establecidos para el consumo seguro en el pescado podrían ser extrapolables para éste alimento. En el jarabe de fructosa, utilizado como edulcorante se han reportado concentraciones de Hg que generan gran preocupación por la alta frecuencia de consumo de este tipo de productos por la población infantil, por las mujeres embarazadas y por lactantes (Bank, 2012; Health; B. Li et al., 2013).

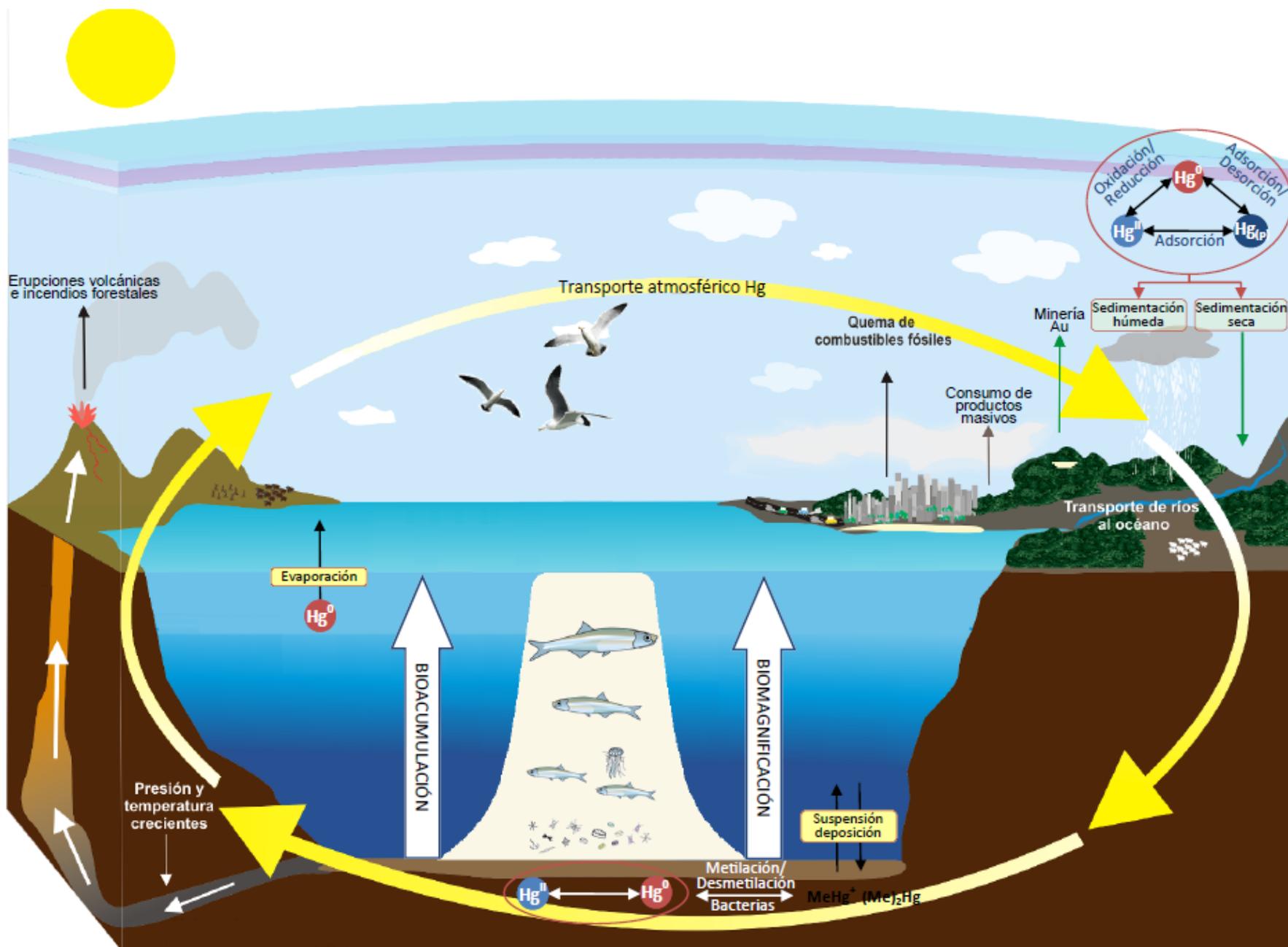


Figura 1 Ciclo biogeoquímico del mercurio - Diseño propio basado en la información de (Selin, 2009)

1.1. Propiedades fisicoquímicas y Fuentes antropogénicas

El Hg elemental es volátil a temperatura ambiente y sus vapores suponen un riesgo para los seres vivos. La exposición puede darse en sitios de trabajo, laboratorios, hospitales, zonas de minería de oro e incluso en los hogares. Instrumentos como los termómetros de Hg al quebrarse son fuente de exposición, en centros de salud, hospitales o en centros veterinarios (Junghans, 1983). Adicionalmente, actividades industriales como la fabricación de interruptores electrónicos, plantas de cloroálcali, fabricación de baterías, industria de amalgamas dentales y lámparas fluorescentes entre otras, constituyen fuentes antropogénicas de gran impacto (Lindqvist & Rodhe, 1985).

El Hg se libera o se re-emite a la atmósfera como Hg^0 , Hg^{II} (particulado o gases) o en forma orgánica (MeHg) (Bank, 2012). Las fuentes naturales como la desgasificación de suelos, las erupciones volcánicas, la evaporación de aguas superficiales contaminadas, los incendios forestales y las fuentes geotérmicas emiten principalmente Hg^0 . La re-emisión se produce por la evaporación de gases de Hg previamente depositados de fuentes antropogénicas y naturales (Lindqvist & Rodhe, 1985).

Los anteriores mecanismos de liberación, hacen que en los últimos años las concentraciones de Hg hayan aumentado en el ambiente, hasta convertirse en una amenaza para los seres vivos. Su naturaleza química hace que no se descomponga ni se degrade, solo cambia su estado de oxidación o especiación química, algunas de estas resultan ser tóxicas por su capacidad de acumulación en los tejidos. El Hg puede ser transportado en el agua y a través del viento en largas distancias, generalizando la problemática en diferentes zonas geográficas (Bank, 2012).

El Hg es el único metal líquido a temperatura ambiente, es de color blanco plateado y de alta densidad; es mal conductor del calor, pero es un buen conductor de la electricidad y forma fácilmente aleaciones o amalgamas con

muchos metales (estaño, oro y plata); esta propiedad lo hace atractivo para su utilización en la extracción de oro (Lindqvist & Rodhe, 1985). Las sales más comunes son el cloruro mercúrico (HgCl_2), el cloruro mercurioso (Hg_2Cl_2) y el sulfuro mercúrico (HgS). Los principales compuestos orgánicos son el dimetilmercurio (DMeHg), metilmercurio (MeHg), etilmercurio (EtHg) y fenilmercurio (PhHg). La especiación orgánica puede darse por acción de algunas bacterias y hongos que metilan o desmetilan el Hg de acuerdo a las características fisicoquímicas del medio donde se encuentren (Lindqvist & Rodhe, 1985). Estos compuestos regularmente se encuentran tanto en sistemas lenticos como loticos, en donde se pueden bioacumular en tejidos blandos grasos de animales y en el tejido nervioso de los humanos (Liu, Cai, & O'Driscoll, 2011)

1.2. Distribución en el ambiente

El Hg es dinámico y cumple un proceso cíclico como se aprecia en la figura 1. Se recicla a través de un ciclo biogeoquímico que se efectúa en seis pasos (Bank, 2012):

1. desgasificación del Hg de suelos, rocas y aguas superficiales, o emisiones de las erupciones volcánicas y de las fuentes antropogénicas.
2. Flujo en su forma elemental a través de la atmósfera.
3. Deposición en aguas terrestres y superficie.
4. Conversión en sulfuros insolubles.
5. Bioconversión o precipitaciones en formas de mayor volatilidad y solubilidad.
6. Bioacumulación en la cadena trófica o reingreso a la atmósfera.

Las actividades naturales y antropogénica liberan vapores de Hg a la atmósfera con una vida media de hasta un año, permitiendo su dispersión a través de grandes zonas. Los vapores del Hg puede sufrir oxidación fotoquímica

produciendo formas de mayor solubilidad que con vapor de agua regresan a la superficie de la tierra a través de la lluvia o de precipitaciones secas (Liu et al., 2011). En el suelo se acumula hasta que se libera de nuevo. En los cuerpos de agua puede convertirse en sulfuro de mercurio (HgS) insoluble, el cual se deposita en los sedimentos y a través de bacterias sulforeductoras puede ser convertido en MeHg. El estudio de esta conversión es importante porque el MeHg es más tóxico que el Hg y más persistente en los tejidos grasos de sistemas biológicos (Selin, 2009).

Los mecanismos de transformación y las rutas ambientales que sigue el Hg son complejas y están determinadas por las condiciones del medio y de la atmosfera (Liu et al., 2011). Para estudiar el impacto y el comportamiento de sus emisiones, se debe considerar las interacciones biogeoquímicas que puede dar lugar a cambios físicos y a la especiación química. La metilación se favorece en sistemas acuáticos a bajos niveles de pH, con altas concentraciones de materia orgánica para que pueda estimular el crecimiento de las microbianas y en bajas condiciones de oxigenación. La temperatura del medio favorece el crecimiento y la productividad; por lo que en las zonas tropicales se favorece la reacción. Cabe destacar que los cambios en el uso del suelo afectan el ciclo biogeoquímico del Hg (Selin, 2009), favoreciendo las tasas de metilación. Un caso particular lo constituyen las presas hidroeléctricas, en las cuales se puede movilizar el Hg almacenado en la vegetación, en el suelo del bosque sumergido y en la materia orgánica hasta el sedimento, en donde en condiciones anaerobias aumentan los niveles metilmercurio y su incorporación en la cadena alimentaria (Mailman, Stepnuk, Cicek, & Bodaly, 2006).

1.3. Toxicocinética y toxicodinamia

La presencia de Hg en el cuerpo humano resulta tóxica a partir de concentraciones críticas que dependen de las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta. Adicionalmente de las variaciones en la exposición, la absorción, el

metabolismo y la excreción (Ceccatelli et al., 2010). La toxicidad del Hg es conocida y en relación a la salud pública y laboral, es necesario tener en cuenta:

- a. Zona de estudio y características geográficas, geológicas, demográficas, climáticas, sociales y económicas.
- b. La especie química (Hg^0 , Hg^{2+} , MeHg , entre otros)

En cuanto a la toxicocinética, cada compuesto del Hg es particular y se debe considerar que:

- la Forma Hg^{2+} es soluble en agua y menos difusible a través de las membranas biológicas con respecto al Hg^0 . Puede inducir a la formación de proteínas del tipo metalotioneína en el riñón.
- El Hg^0 es liposoluble, altamente difusible a través de las membranas biológicas y puede oxidarse intracelularmente a Hg^{2+} .
- Los organomercuriales tipo MeHg^+ , por ser un catión es solubles en los lípidos y en agua, es altamente difusibles a través de las membranas biológicas y se puede transformar en Hg^{2+} .

Por su parte las principales vías de acceso del Hg al organismo humano son la aérea la oral y la tópica.

El MeHg y el EtHg presentan un comportamiento similar, pueden ser absorbidos por inhalación con una eficiencia del 80%. Al tener una presión de vapor elevada se favorece la absorción y su liposolubilidad permite su paso a través de las membranas biológicas (Ceccatelli et al., 2010).

La absorción del Hg elemental en el tracto gastrointestinal es muy baja y no representa toxicidad importante. La absorción se limita por acomplejación intestinal. Al ingerir Hg^0 , el proceso de oxidación en el tracto intestinal es más lento por lo que se elimina en heces. La intoxicación por sales inorgánicas como el cloruro de mercurio II ocasiona irritación por la formación de albuminato que altera la permeabilidad del tracto gastrointestinal, favorece la absorción y aumenta la toxicidad. La vía oral es la más importante para el MeHg , ya que la población se

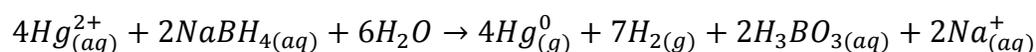
expone básicamente por el consumo de pescado contaminado (Farina et al., 2011). El vapor de Hg^0 posee afinidad por el tejido nervioso y por los eritrocitos en donde se oxida a Hg^{2+} a través de la catalasa, aunque su vida media en sangre es corta, logra atravesar la barrera hematoencefálica (Farina et al., 2011).

2. Análisis de mercurio y su especiación

2.1. Análisis de mercurio total

El contenido de HgT en pescados es generalmente en concentración de trazas, por lo que es necesario desarrollar métodos analíticos sensibles. El método instrumental más utilizado es la espectrometría de absorción atómica con vapor frío (AAS-CV), el cual permite alcanzar límites de detección de 1.0 ppb. Esta metodología se basa en la absorción de las radiaciones electromagnéticas debidas a los átomos a analizar presentes en la muestra, que se forman en la zona ultravioleta-visible. El procedimiento requiere atomizar la muestra en un proceso en el cual los átomos de Hg^{2+} de la muestra líquida se convierten en partículas gaseosas de Hg elemental (Cazes, 2004).

La AAS es muy específica para el análisis elemental, dado que las líneas de absorción son muy estrechas porque las energías de transición electrónicas son únicas para cada elemento. Esto obliga a usar como fuente de radiación lámparas que emiten a la misma longitud de onda de cada elemento. El procedimiento utilizado para el análisis de Hg es similar al sistema de hidruro, excepto que el Hg formado no tiene que ser calentado, ya que está en la forma atómica (Ebdon & Evans, 1998). La reducción del Hg se lleva a cabo de manera similar a la de los otros elementos que forman hidruros; éste se puede reducir con borohidruro de sodio o con cloruro de estaño II, mediante la siguiente reacción:



El vapor de Hg es expulsado del sistema en la pieza en T para ser medido. Algunos sistemas cerrados con ventanas de sílice utilizan una bomba de

circulación y permiten que el vapor de Hg alcance el equilibrio con argón. Durante el análisis los tiempos de residencia prolongados en la celda T aumenta la sensibilidad hasta 100 veces en comparación con la AAS de llama (Krishna, Ranjit, Karunasagar, & Arunachalam, 2005). En este sistema la corrección de fondo no es requerida y algunos elementos tales como oro, plata, paladio y platino pueden interferir con la reducción y afectar el análisis. Los límites de detección que se pueden alcanzar son mayor a 1 ng mL^{-1} . (Ebdon & Evans, 1998)

En 1975 se describieron por primera vez los métodos de flujo no segmentados que hoy se conocen como análisis de inyección de flujo (FIA). En esta técnica, el flujo no está segmentado por burbujas de aire y por lo tanto difiere del sistema de flujo segmentado usado en autoanalizadores. La muestra se inyecta en la corriente que fluye en lugar de ser directamente aspirada dentro de la llama. El vapor frío (VP) es un accesorio para la medición de hidruros con mejor sensibilidad que llama o atomización del horno. Los elementos de análisis en la muestra se reducen a hidruros volátiles usando borohidruro de sodio, y se llevan en una corriente de gas portador a una celda de medición (Krishna et al., 2005). El portador que contiene la muestra en solución se bombea de forma continua y se aspira en el nebulizador. Las técnicas de llama normalmente utilizan un volumen de muestra de 0,5 a 2 ml; mientras que este sistema es requiere entre 10 y 200 μl . Cabe destacar que el efecto de los sólidos disueltos y de la viscosidad es tolerado y por dilución de la muestra antes de la aspiración son reducidos al mínimo. (Ebdon & Evans, 1998)

La digestión por microondas (MW) emplea radiación electromagnética de microondas para desorber el compuesto de interés de la matriz, digiriendo la materia orgánica. De todo el espectro electromagnético, solo se considera radiación de microondas aquella cuya longitud de onda está comprendida entre 0.3 mm y 1 m, con frecuencias de 100 GHz a 300 MHz, esto sitúa a éste tipo de radiación entre las ondas de radio y la zona infrarroja. A pesar del amplio rango de frecuencias posibles, los hornos microondas comerciales no son adecuados para tal fin; por su parte los hornos analíticos alcanzan potencia superior, lo que se traduce en operaciones de digestión a temperaturas y presiones más altas (Chen,

Chou, & Hwang, 2004). El principio por el cual se produce calentamiento al emplear microondas puede ser por conducción iónica o por rotación bipolar o por ambos. La conducción iónica es la migración electroforética de los iones al aplicar un campo electromagnético, este flujo de iones provoca fricción debido a la resistencia que ejerce el disolvente y produce calentamiento. La rotación bipolar es el realineamiento de dipolos con el campo aplicado a una frecuencia de 2450 MHz, se produce un alineamiento de los dipolos de $4.9 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$, siendo este movimiento molecular el que produce el calentamiento. La gran diferencia que presente este tipo de calentamiento con los sistemas convencionales es que se produce en el seno de la disolución y no por convección desde una fuente externa, produciendo un calentamiento más homogéneo y eficaz.

La digestión por microondas es un procedimiento estándar para la preparación de muestras en el análisis elemental. La temperatura máxima de trabajo para producir la degradación parcial o total de la muestra normalmente está entre 180 y 220°C. Los reactivos más utilizados para la mineralización en el horno son el ácido nítrico y el peróxido de hidrógeno. La digestión produce una disolución acuosa ácida que posteriormente se analiza mediante técnicas espectroscópicas. La gran ventaja de la digestión con horno microondas frente a la digestión en vaso abierto convencional es la posibilidad de controlar la presión o la temperatura, y la posibilidad de digerir la muestra en tiempos muy reducidos, ya que la velocidad de calentamiento dentro del horno es muy alta (Rahman, Corns, Bryce, & Stockwell, 2000). A continuación se especifica el comportamiento químico del ácido nítrico y el peróxido de hidrógeno como agentes oxidantes en la digestión de muestras de tejido de pescado.



El ácido nítrico disuelve la mayoría de los metales que forman nitratos solubles y a menudo se mezcla con H_2O_2 , HCl y H_2SO_4 . Este ácido está disponible en alta pureza para el análisis de trazas, posee un punto de ebullición de 120°C y posee deficiente fuerza oxidante en concentraciones menores a 2 M y en contraste su

fuerza de oxidación aumenta con la temperatura, la concentración y la presión de reacción.

El peróxido de hidrógeno por su parte es un agente oxidante, de acuerdo a la siguiente reacción:



Típicamente en procesos de digestión se emplea en conjunto con HNO_3 con el fin de reducir los vapores nitrosos y acelerar la digestión de las muestras orgánicas elevando la temperatura, se emplean en una proporción 4:1

Las interferencias en absorción atómica están bien definidas, como también los medios de tratarlas. Para el análisis de Hg se deben considerar las siguientes interferencias (Navarro, López, López, & Sánchez, 1992):

- Interferencias debidas al tratamiento de muestra:
 - los compuestos orgánicos no degradados pueden absorben a las mismas longitudes de onda de del Hg, causando interferencias espectrales. Para evitar esto, se debe asegurar una digestión completa de la muestra.
- Interferencias debidas a la matriz
 - Concentraciones altas de sólidos disueltos en el digerido, debido a la diferencia de viscosidad entre éste y las soluciones patrón. Se debe tratar de asemejar, en lo posible, la matriz del digerido y las soluciones de calibración.
 - Concentraciones altas en sulfuros (>20 mg/Kg) interfieren en la recuperación del mercurio inorgánico. El sulfuro oxida al ion estañoso.
 - Concentraciones altas de cloruro ya que absorben a la misma longitud de onda del Hg.
 - Altas concentraciones de cobalto, cobre, hierro y níquel (> 1000 mg/L) causan precipitados.
- Interferencias debidas al material

- El material sucio o contaminado es una de las mayores fuentes de interferencia, por lo cual se debe tener especial cuidado en el lavado.
- El aporte de Hg por parte de los reactivos debe mantenerse controlado, se debe usar ácidos con baja concentración de Hg.

2.2. Especiación orgánica

El reto del análisis de las especies orgánicas de Hg se enfrenta al desarrollo y validación de la metodología con el propósito de garantizar resultados fiables y acordes a los parámetros de calidad que garanticen su selectividad para determinaciones rutinarias, incluso a bajos niveles de concentración y para matrices complejas como las muestras ambientales y alimentarias (Batley, 1989).

Para resolver la sensibilidad para la especiación en concentración de trazas y ultra-traza de MeHg en muestras pescados se han desarrollado estrategias desde la recolección y el pretatamiento de las muestras, los procedimientos de extracción, concentración y limpieza, hasta la separación, identificación y cuantificación (Berzas Nevado et al., 2011).. Cada una de estas técnicas ofrece ventajas y pueden ser sofisticadas o inviables para análisis de rutina por el costo de operación (Carrasco & Vassileva, 2014; Hakan Emteborg, Hadgu, & Baxter, 1994). El método EPA 1630 (Water, Science, Engineering, & Division, 2001), muestra una metodología de bajo costo, alta sensibilidad y práctica, a través de cromatografía de gases con detector de espectrometría de fluorescencia atómica (GC–AFS) y derivatización con tetraetilborato de sodio (NaBEt₄) para producir (EtHg y dietilmercurio) (Yong Cai & Bayona, 1995). A continuación se presenta un breve estado del arte del análisis de las especies orgánicas de Hg

2.3. Preparación de muestras

En la preparación de muestras para el análisis de la especiación orgánica de Hg es transcendental considerar la naturaleza de la matriz a tratar. En las

muestras líquidas, el recipiente para contener la muestra constituye un factor importante. En cuanto a el material del recipiente se considera conveniente el uso de polietileno, polipropileno y cloruro de polivinilo, siendo los más adecuados los recipientes en teflón y en pirex®. Se recomienda acidificar las muestras para evitar pérdidas por absorción en las paredes del recipiente, controlar la temperatura de almacenamiento y la exposición a la luz para conservar la muestra (Yong Cai & Bayona, 1995).

La extracción se realiza con objeto de separar el analito de interés de la matriz biológica, obteniendo buenos rendimientos de acuerdo con el propósito de la metodología y para garantizar la disminución de interferencias y la selectividad del método (Carrasco & Vassileva, 2014). Entre las técnicas más usadas para la extracción de organomercuriales de muestras acuosas están la extracción líquido-líquido (LLE) con disolventes, la destilación, la extracción en fase sólida (SPE), la microextracción en fase sólida (SPME) (Carrasco, Díez, & Bayona, 2007) y la purga y trampa (Filippelli, Baldi, Brinckman, & Olson, 1992). De igual forma, en el análisis de especiación en muestras biológicas, la conservación de las muestras en congelación y sin conservantes es lo más adecuado para garantizar su integridad. A su vez, evitar los procesos de descongelación y congelación, la exposición a la luz. Liofilizar es una buena técnica para garantizar la estabilidad de las muestras, la interconservación de las especies químicas y prevenir la conversión del Hg a MeHg (Carrasco & Vassileva, 2014).

La preparación de la muestra es considerada la etapa crucial en el desarrollo metodológico y se debe abordar puntualmente para obtener una adecuada recuperación y prevenir pérdidas por proceso y cambio o recambio entre las formas químicas del Hg (Hg orgánico a elemental) (Cazes, 2004). La figura 2, muestra posibles rutas para el desarrollo del método analítico para la determinación de organomercuriales. Se establece que el primer paso es extraer las especies por lixiviación ácida, digestión alcalina o destilación, luego las especies extraídas se pueden someter a análisis directo o a pre-

concentración cuando la concentración de estas especies es demasiado baja para ser analizado directamente (Carrasco & Vassileva, 2014).

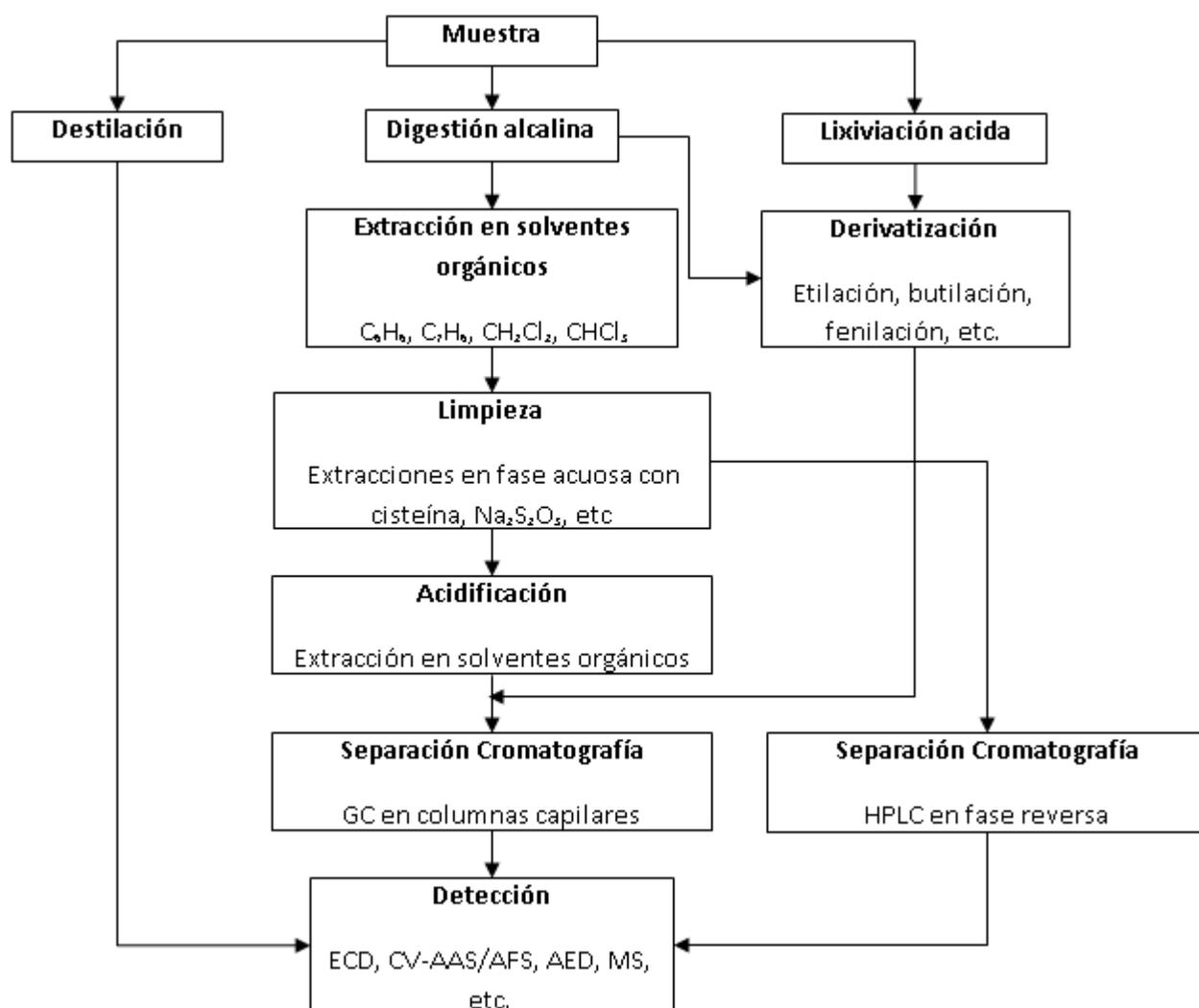


Figura 2 Esquema para el análisis de las especies orgánicas de Hg

2.3.1. Hidrólisis alcalina

La hidrólisis alcalina resulta ser uno de los tratamientos más aplicados para la liberación de las especies mercuriales de las muestras, consiste en el tratamiento con una base seguido del ajuste de pH, normalmente se usa en muestras biológicas y se realiza con bases como el hidróxido de sodio (NaOH),

hidróxido de potasio (KOH) o hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) disueltos en metanol (Navarro et al., 1992). Estas digestiones se desarrollan durante periodos de tiempo entre 2 a 3 horas y se ven fuertemente influenciadas por la temperatura a la que se desarrollen, altas temperaturas las agilizan, pero puede llevar a la pérdida de analito por degradación térmica o volatilidad si no hay un adecuado cierre hermético. Este método se ha comparado con las lixiviaciones ácidas, en la cual han obtenido resultados semejantes, pero específicamente para la lixiviación se requiere un paso extra de limpieza que consiste en la extracción de los organomercuriales en solución de tiosulfato sódico.

2.3.2. Lixiviación ácida

Se fundamenta en el tratamiento de la muestra con un ácido seguido de una extracción en solvente orgánico. Este método se ha aplicado en la extracción de MeHg en peces con base en protocolos derivados de la técnica clásica de Westöö (M. Horvat, Byrne, & May, 1990), la cual consiste en la extracción selectiva en benceno conteniendo HCl, con posterior formación de un complejo con cisteína. El método extrae en agua, liberando el MeHg por acidificación y re-extracción en benceno. La metodología se ha modificado sustituyendo el benceno por tolueno y utilizando agentes complejantes como el dietilditiocarbamato. El Hg inorgánico se elimina de la muestra por lavados con acetona para evitar interferencias. Este método se ha aplicado con mayor eficacia realizando la lixiviación en presencia de cobre (II) o bromuro potásico (H. Hintelmann & H. Nguyen, 2005; Tseng, De Diego, Wasserman, Amouroux, & Donard, 1999).

2.3.3. Destilación

Se ha realizado con haluros de potasio y ácido sulfúrico para disgregar el MeHg de las muestras. Se realiza a presión atmosférica y a temperaturas elevadas (140-180 °C). Igual que la digestión alcalina, el proceso es seguido por la extracción en un solvente orgánico y derivatización con una sal sódica de tetraalquilborato. Se reporta con esta técnica recuperaciones más altas y más

reproducibles que con otras técnicas de extracción, aun siendo bastante lenta. El ditiocarbamatopirrolidín amónico (APDC) puede mejorar la recuperación de los compuestos y disminuye el tiempo de extracción, eliminando totalmente la co-distilación de Hg inorgánico (Bloom, Colman, & Barber, 1997; Milena Horvat, Bloom, & Liang, 1993).

2.3.4. Extracción asistida por ultrasonido

La extracción con ultrasonidos es una técnica sencilla y económica, adecuada para el tratamiento de tejidos biológicos y sedimentos. Se usa un baño de ultrasonidos para minimizar desventajas de los procedimientos convencionales de extracción en términos de tiempo, eficiencia de extracción y consumo de solvente (Krishna et al., 2005). Se ha utilizado un baño de ultrasonidos para minimizar el tiempo de extracción del método (Krishna et al., 2005).

2.3.5. Extracción asistida por microondas (MAE)

La extracción asistida por microondas se ha usado para la extracción de especies de Hg de material biológico, suelos y sedimentos, acelerando la extracción tanto con ácidos, bases o con solventes orgánicos. Los parámetros fundamentales para la optimización son el medio de extracción, la energía aplicada y el tiempo de exposición. La MAE es considerablemente más rápida que otras técnicas de extracción y preparación de muestra (2 o 3 min) y se ha utilizado principalmente para sedimentos con ácido nítrico, logrando la extracción en 3 min con una potencia de 60W y en material biológico con TMAH en 2-3 min entre 40-60W. Se han evaluado ácido acético (HAc), ácido clorhídrico, ácido nítrico, TMAH y KOH; con el HAc se obtienen bajas recuperaciones y el HCl y el HNO₃ producen la descomposición del MeHg. El HCl proporciona buenos resultados tanto en sedimentos como en material biológico, mientras que el TMAH sólo con muestras de material biológico. La extracción asistida por microondas produce una recuperación igual o mejor que con métodos convencionales, menor efecto matriz

y disminución del tiempo de 3 horas a 3 min (Mao Tseng, De Diego, Martin, & F. X. Donard, 1997).

2.3.6. Extracción con fluidos supercríticos

El uso de fluidos supercríticos es un buen procedimiento para la preparación de muestra debido al no usar solventes orgánicos. (Lorenzo, Vázquez, Carro, & Cela, 1999) El CO₂ es el fluido supercrítico más adecuado y usado en las extracciones, ya que no es tóxico ni inflamable y presenta un gran poder disolvente. Se ha utilizado para la extracción de especies de mercurio de muestras de sedimentos y de material biológico (Hakan Emteborg et al., 1996).

2.3.7. Extracción con disolventes

La extracción con solventes es un método tradicional que consiste en obtener los compuestos de la muestra por partición en un disolvente inmiscible. Es necesario el uso de solventes no miscibles en agua, como tolueno, hexano, heptano, iso-octano, o benceno (Chen et al., 2004). Para mejorar la incorporación de los compuestos a la fase orgánica es necesaria la formación de un complejo extraíble o compuestos no polares en la disolución antes de la extracción. Los agentes quelantes más utilizados son iones haluro (I⁻), tetra (alquil/aril) boratos (NaBPh₄, NaBPr₄, NaBEt₄), aminas terciarias y ditizona. Este método usa grandes volúmenes de solventes orgánicos y grandes volúmenes de muestra, teniendo que repetirse la extracción varias veces para alcanzar recuperaciones aceptadas. Con algunas muestras, pueden producirse emulsiones lo que complica y prolonga la extracción. El proceso es lento, requiere considerable mano de obra y genera gran volumen de residuo.

2.3.8. Extracción en fase sólida

En este método los compuestos se atrapan en una fase inmobilizada y se eluyen con un volumen mínimo de solvente. Las ventajas sobre la extracción líquido-líquido incluyen un factor de enriquecimiento mayor, menor consumo de solvente, menor riesgo de contaminación y es fácilmente automatizable. Las muestras tienen que estar filtradas previamente. Se han utilizado diferentes fases como resinas con agentes quelatantes inmobilizados (ditiocarbamato, ditiocarbazona, ditizona, 2-mercaptoetanol), con grupos dadores de nitrógeno y azufre (1,2-bis (o-aminofeniltio) etano) y columnas de algodón con grupos funcionales (–SH, SCF).

Las fases más utilizadas son las de ditiocarbamato y las de algodón con grupos sulfhidrilo. La separación de organomercuriales se lleva a cabo con base en la afinidad del Hg por los grupos dadores de azufre. En las resinas con grupos ditiocarbamato la elución se consigue con una solución de tiourea acidificada, y en las de algodón con grupos sulfhidrilo con ácido clorhídrico. Por su parte, las resinas modificadas con grupos dadores de nitrógeno y azufre permiten la elución selectiva del MeHg con etanol y después la elución del Hg con tiourea acidificada. Si se va a usar cromatografía de gases como técnica de separación se debe derivatizar.

2.3.9. Microextracción en fase sólida

En esta tecnología se utiliza una fibra revestida con una fase estacionaria, la cual puede colocarse en el inyector del sistema de cromatografía de gases (GC) para que los compuestos de interés se desorban directamente en el sistema. Los organomercuriales previamente deben haber sido derivatizados para volatilizarlos. Esta técnica combina extracción, pre-concentración, introducción de la muestra y ofrece varias ventajas incluyendo la reducción del tiempo de extracción por muestra, menos manipulación de muestra, eliminación de solventes orgánicos, simplicidad, bajo costo y posibilidad automatización (de la Guardia & Garrigues, 2012).

La elección de la fase absorbente usada en el muestreo de SPME afectará directamente la selectividad del análisis. Hay diferentes fibras comerciales disponibles, clasificadas según su mecanismo de extracción (fibra absorbente y adsorbente). Las fibras absorbentes extraen por partición del analito en un revestimiento líquido, las más comunes son polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA). Las fibras adsorbentes extraen los analitos por interacciones físicas, entre las más recomendadas están polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB), carbowax/divinilbenceno (CW/DVB), carboxen/polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) y divinilbenceno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Dadfarnia & Haji Shabani, 2010).

Este método ha sido muy utilizado y se ha aplicado también al análisis multielemental, se han utilizado otros agentes derivatizantes para evitar interferencias durante la derivatización con NaBEt_4 en muestras de agua salada por su contenido de cloruros (de la Guardia & Garrigues, 2012) (Díez & Bayona, 2008). El efecto matriz durante el análisis es controlable mediante el uso de estándar interno como el EtHg o en su defecto a través de adiciones estándar o dilución isotópica (Delgado, Prieto, Zuloaga, de Diego, & Madariaga, 2007).

2.3.10. Extracción líquido-gas (purga y trampa)

La extracción líquido-gas consiste en burbujear la disolución acuosa con un gas inerte (nitrógeno o helio) para extraer las especies volátiles no polares en la fase gas, las especies necesitan ser convertidas previamente en hidruros o derivados alquilados/arilados volátiles, las especies purgadas son atrapadas en una trampa criogénica o en una trampa de tenax® o carbotrap y liberadas normalmente en la columna cromatográfica (Filippelli et al., 1992).

2.4. Preconcentración y limpieza

La calidad del extracto debe de tener un alto grado de limpieza para poderlo introducir en el sistema cromatográfico, para lo cual es necesario que esté en un solvente no polar libre de partículas en suspensión, que sea volátil y térmicamente estables. En algunos procedimientos se lleva a cabo una reacción de derivatización a especies con mejores características cromatográficas, reacción que también puede realizarse simultáneamente con la extracción (Díez & Bayona, 2008).

La introducción de la muestra en el sistema cromatográfico se puede realizar por inyección directa, por purga y trampa, por espacio de cabeza o mediante SPME. El método más usado de pre-concentración es el de purga y trampa mediante trampas criogénicas o trampas de tenax® o carbotrap® y la elución se realiza térmicamente. El espacio cabeza difiere de la purga y trampa en que los compuestos se transfieren directamente a la columna cromatográfica; en ambos casos, los compuestos son previamente derivatizados (Dadfarnia & Haji Shabani, 2010).

2.5. Derivatización

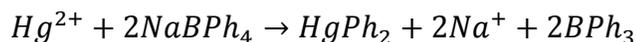
La derivatización se utiliza para obtener especies con mejores características para la separación o para la detección. La mayoría de las especies organometálicas existen en forma iónica con puntos de ebullición relativamente altos y una baja estabilidad térmica. Para mejorar su separación por GC (Demuth & Heumann, 2001; Díez & Bayona, 2008), estas especies deben ser derivatizadas a través de métodos que incluyen: conversión de iones inorgánicos y organometálicos en compuestos covalentes volátiles (hidruros, alquilados) en medio acuoso y conversión de cationes alquilmetálicos con reactivos de Grignard para saturar los grupos no polares (Pontes et al., 2014).

2.5.1. Tetra alquil/aril boratos

Estos compuestos se han utilizado como reactivos de derivatización en numerosas publicaciones relacionadas con el análisis de especiación de compuestos organometálicos debido a que la reacción se lleva a cabo en medio acuoso, como alternativa a la generación de hidruros que es una técnica susceptible a efecto matriz (Demuth & Heumann, 2001). Adicionalmente, se puede extraer en un solvente orgánico. Los principales tetra alquil/aril boratos usados como son el tetraetilborato sódico (NaBEt_4), el tetrafenilborato sódico (NaBPh_4) y el tetrapropilborato sódico (NaBPr_4) (Clevenger, Smith, & Winefordner, 1997). La alquilación de compuestos organometálicos con tetraalquilboratos es fuertemente dependiente del pH. La derivatización con NaBPr_4 puede llevarse a cabo a pH entre 4,5 y 6, con NaBPh_4 entre 2 y 6 y con NaBEt_4 de 5 (Demuth & Heumann, 2001). El NaBEt_4 es el más usado, su disolución es bastante estable pero debe prepararse inmediatamente antes de su uso. Una limitación importante en los estudios de especiación es la dificultad de diferenciar las especies de organomercuriales y además, la etilación del MeHg sufre interferencias por la presencia de iones cloruro. El NaBEt_4 permite la derivatización multielemental y multiespecie de Sn, Hg y Pb:



La fenilación con NaBPh_4 sólo se da con el Hg inorgánico y con los alquilmercuriales, lo que elimina posibles interferencias de otros metales:

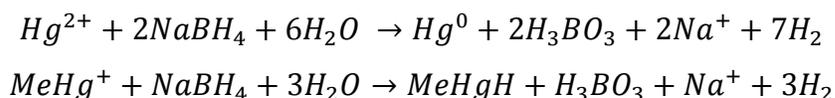


Se ha propuesto el uso de NaBPr_4 para la determinación de especies de Hg ya que permite la derivatización multielemental y multiespecie. Tanto el NaBPh_4 como el NaBPr_4 están disponibles comercialmente y comparten dos ventajas, su fácil

manipulación para la derivatización/extracción in situ y la posibilidad de distinguir entre el EtHg y el Hg inorgánico. Además, son más económicos y sus disoluciones son más estables que la del NaBEt₄. La derivatización con NaBPh₄ se ve afectada por el uso en la digestión de TMAH, ya que el ion tetrametilamonio forma con el tetrafenilborato sódico un precipitado blanco de baja solubilidad

2.5.2. Generación de hidruros

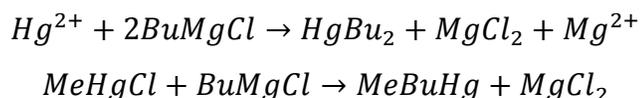
La generación de hidruros se ha empleado para la determinación de un amplio rango de especies elementales. El MeHg y Hg (II) pueden transformarse en hidruros volátiles por tratamiento con NaBH₄ en fase acuosa:



Esta técnica puede presentar interferencias debidas a metales de transición que pueden afectar al rendimiento de la reacción y a la precisión analítica. La presencia de altas concentraciones de sales (NaCl) favorece la reducción de MeHg⁺ a Hg⁰ (Gil, Fragueiro, Lavilla, & Bendicho, 2005; Mao Tseng, De Diego, Martin, Amouroux, & F. X. Donard, 1997).

2.5.3. Reactivos de grignard

En este método, las especies organometálicas son alquiladas en especies volátiles apolares (Håkan Emteborg, Snell, Qian, & Frech, 1999):



La principal ventaja es su versatilidad, se dispone de más de 30 reactivos de Grignard. La principal desventaja es la inestabilidad del reactivo en agua y ante el oxígeno, por lo tanto, la extracción debe hacerse en un solvente no polar, aprótico y anhidro. Además, los reactivos de Grignard tienen una baja pureza para la especiación de metales en el orden de trazas; puede haber trans alquilación de los

organomercuriales, alterando sus concentraciones y modificando la recuperación por reacción con haluros de la solución. La derivatización con reactivos de Grignard es aplicable a extractos que contienen complejos de los compuestos organometálicos con ditizona o ditiocarbamatos (Pontes et al., 2014). Los reactivos de Grignard que no han reaccionado tienen que ser eliminados antes de la inyección en la columna cromatográfica, esto se alcanza por agitación con ácido sulfúrico diluido (Håkan Emteborg et al., 1999).

2.5.4. Formación de quelatos

La formación de quelatos permite la detección de las especies de Hg mediante detección UV y mejora la separación de las diferentes especies; los agentes quelatantes más usados son los carbamatos, la cisteína y la ditizona.

2.6. Separación y detección

La metodología más usada para la especiación combina la separación cromatográfica con un sistema de detección altamente específico (Jia, Han, Liu, Duan, & Chen, 2011). Los métodos más comunes para la especiación de Hg son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acopladas con un detector específico para Hg. Los métodos de detección acoplados con técnicas cromatográficas para la especiación de Hg incluyen espectroscopia de absorción atómica (AAS), espectroscopia de fluorescencia atómica (AFS), plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de masas (ICP-MS), plasma de acoplamiento inductivo-espectrometría de emisión atómica (ICP-AES) y plasma inducido por microondas-espectroscopia de emisión atómica (MIP-AES) (Clevenger et al., 1997).

2.6.1. Cromatografía de gases

La cromatografía de gases requiere que las especies de interés se presenten como compuestos no polares, térmicamente estables y en solventes no polares. La preparación de la muestra debe incluir un paso de transferencia de los analitos de la solución acuosa en un disolvente orgánico o un paso de pre-concentración sobre un absorbente cromatográfico por purga y trampa o por SPME. La separación cromatográfica de compuestos con enlace haluomercurio llevan a señales cromatográficas con coleo, debido a su elevada polaridad y a que puede interaccionar con la fase estacionaria de la columna. Para evitar este problema se usa la pasivación de la columna que consiste en su acondicionamiento usando una solución de cloruro de mercurio disuelto en benceno o tolueno; lo cual debe hacerse frecuentemente ya que la eficiencia de la columna se deteriora con el tiempo(Rodríguez, 2005).

La derivatización para obtener especies térmicamente estables puede seguir a la extracción en el disolvente (derivatización de Grignard) o precederlo (derivatización con NaBH_4 o NaBEt_4). Para mejorar los límites de detección, se han abordado aspectos como el uso de columna multicapilar. El aumento en la velocidad en el análisis se debe al diseño especial de la columna multicapilar que ensambla un haz de 900-2000 columnas microcapilares con diámetros internos de 20 a 40 μm . Este diseño permite aplicar flujos más grandes que en las columnas normales. Este mecanismo se ha usado con MIP-AES o ICP-MS (Clevenger et al., 1997).

Entre los detectores más utilizados se encuentran de microcaptura electrónica(ECD), espectroscopia de fluorescencia atómica (AFS), espectroscopia de absorción atómica (AAS) (Ure, 1975), espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de emisión atómica (AES), espectrometría de masas (MS) y plasma acoplado por inducción-espectrometría de masas (ICP-MS). Los métodos de espectroscopia atómica, MS y ICP/MS permiten el análisis multielemental y multiespecie y se han utilizado para la

especiación simultánea de estaño, plomo y mercurio (Popp, Hann, & Koellensperger, 2010).

2.6.2. Cromatografía líquida

Para técnicas basadas en cromatografía líquida se requieren soluciones acuosas de especies estables termodinámicamente, inertes cinéticamente y libres de partículas en suspensión. El HPLC tiene la ventaja sobre GC que no es necesaria la derivatización y se pueden determinar especies menos volátiles como compuestos arilmercuriales (Richard Puk & James H. Weber, 1994). Las especies se han separado principalmente por cromatografía de par iónico en fase reversa. Normalmente, a la fase móvil se le añade 2-mercaptoetanol, aunque también se pueden utilizar otros pares iónicos o agentes complejantes como ditiocarbamatos N,N-di-sustituidos o cisteína (Taylor, Carter, Davies, & Jackson, 2011). En algunos casos se han separado el MeHg y el Hg inorgánico mediante cromatografía líquida micelar usando micelas de bromuro de dodecildimetilamonio (SDS). Con los métodos clásicos de detección en cromatografía líquida como UV o AAS, se alcanzan límites de detección del rango de nanogramos. Esta técnica no es adecuada para el análisis directo de trazas en muestras ambientales (Popp et al., 2010).

3. Limitaciones del análisis en la especiación

La determinación de MeHg es compleja debido a problemas relacionados con la obtención de recuperaciones no cuantitativas y a la posibilidad de formación de artefactos y transformaciones durante la etapa de preparación de la muestra (Richard Puk & James H. Weber, 1994; Quevauviller & Morabito, 2000). La formación de artefactos podría estar relacionada con transformaciones químicas de la matriz durante la extracción y la pre-concentración, causando la liberación de metiladores que pueden reaccionar con el Hg inorgánico presente en la solución de la muestra. En estudios en agua natural, la materia orgánica disuelta (DOC) ha

sido repetidamente identificada como componente responsable de la formación de artefactos de MeHg (Quevauviller & Morabito, 2000). Algunos reactivos usados son metiladores potenciales de Hg, encontrándose en algunos casos que el MeHg no provenía exclusivamente de la matriz (Clémens, Monperrus, Donard, Amouroux, & Guérin, 2012).

La mayoría de los artefactos de MeHg se forman durante la extracción y representan la verdadera metilación abiótica del Hg inorgánico. La cantidad de MeHg producido durante la extracción está relacionada con la cantidad de Hg inorgánico en la muestra y con el método de extracción. Los tejidos de peces parecen no sufrir la formación de artefactos pero las muestras de sedimentos muestran grandes errores. En sedimentos naturales se encuentran cantidades de MeHg muy bajas representando sólo el 0,5-2% del HgT, por lo tanto, incluso si ocurre la metilación en pequeña proporción 0,02-0,03% se puede producir una sobreestimación entre el 30 y el 80% de la concentración del MeHg en el sedimento(Quevauviller & Morabito, 2000).

La Comisión Europea ha financiado un estudio para evaluar los problemas que presentan los valores de MeHg en materiales de referencia certificados; en el cual se evaluaron sistemáticamente las causas y los factores relacionados con la formación del compuesto durante el análisis (Falter, Hintelmann, & Quevauviller, 1999; Quétel et al., 2005). Se estudiaron diferentes técnicas para la extracción en diferentes matrices para evaluar su potencial formación. Los resultados mostraron la posibilidad de transformaciones durante el paso de pre-tratamiento de muestra y, específicamente, usando métodos basados en la destilación. Estas observaciones se basaban en la metilación de Hg inorgánico adicionado, sin tener en cuenta posibles transformaciones del MeHg adicionado (Clémens et al., 2012).

Se ha estudiado la metilación abiótica de Hg inorgánico añadido cuando la matriz se sometía a procedimientos como destilación, lixiviación ácida o extracción alcalina de diferentes muestras ambientales. Dependiendo del procedimiento de pre-tratamiento usado y de la matriz la metilación varía desde 0,005% de la lixiviación ácida de sedimentos con ácido clorhídrico al 4,3% de la extracción

alcalina de muestras de pescado con TMAH. Existe la relación posible entre la formación de MeHg y los niveles de carbono y azufre en el sedimento.

Se han evaluado diferentes métodos de extracción selectiva para la especiación de Hg en sedimentos utilizando HPLC acoplado a ICP-MS y los resultados se comparan con los obtenidos con el método EPA 3200 (Loconto, 2005), entre los métodos evaluados están la sonicación, la extracción asistida por microondas (Mao Tseng, De Diego, Martin, & F. X. Donard, 1997) y la extracción ácida fría. Como ninguno de estos métodos puede corregir ninguna interconversión o transformación de Hg inorgánico a MeHg o viceversa, se usa como herramienta de diagnóstico el método 6800 de la EPA (SIDMS, espectrometría de masas con dilución isotópica elemental y de especies)(Loconto, 2005). Como resultado concluyen que, el método de sonicación con ácido nítrico y extracción asistida por microondas con ácido nítrico presenta menos eficiencia de extracción para hg inorgánico pero bastante alta para MeHg. Por otro lado, la sonicación con ácido clorhídrico y la extracción ácida fría demuestran gran eficiencia en la extracción de Hg inorgánico pero induce a la conversión de MeHg en Hg inorgánico(Taylor et al., 2011).

La reducción del Hg inorgánico en la muestra (lavado con acetona) elimina la posibilidad de su especiación, permitiendo sólo determinar la forma orgánica. La aplicación de la dilución isotópica específica de especies (SSID) en combinación con técnicas que permitan la determinación de isótopos (ICP-MS o MS) (Clémens et al., 2012) permite detectar, cuantificar y corregir éste proceso, preservando la integridad de todas las especies de interés durante el proceso analítico. Con SSID, se añaden y equilibran con la muestra antes del análisis las especies marcadas del compuesto de interés, preparadas desde isótopos estables enriquecidos, y las transformaciones de las especies se reflejarán por la desviación de las relaciones de los isótopos de las especies de su valor natural(Taylor et al., 2011).

4. Conclusiones y discusión

A lo largo de este capítulo se han desarrollado estrategias de preparación de muestra para la determinación de Hg y sus derivados orgánicos en muestras ambientales y alimentarias, se presentó una aproximación de la toxicocinética y la toxicodinamia de estos compuestos, así como su ciclo biogeoquímico como el acceso de estos tóxicos a la cadena alimentaria. A continuación se detallan las principales conclusiones que se pueden extraer del trabajo realizado:

Al evaluar los riesgos de salud pública de Hg el cual debe ser extrapolado a partir de investigaciones sobre las interacciones en los ecosistemas y su acceso a la cadena trófica, se debe hacer con extrema precaución por las siguientes razones:

- La especiación del Hg y de sus especies orgánicas, se debe considerar la transferencia desde el suelo, sedimentos, materia orgánica hacia sistemas tróficos evaluando su bioacumulación y biomagnificación, además, de su disponibilidad en los organismos.
- La concentración de Hg y sus derivados orgánicos en el ambiente depende de variables como temperatura, pH y composición química del agua, tipo de suelo y la geología.
- Hay pocos datos que determinen la disponibilidad de Hg para los organismos. La mayoría de los datos representan la concentración nominal o total de metal en lugar, por lo tanto a menudo se desconoce las fracciones más tóxicas que impactan un organismo.
- Los organismos acuáticos están más expuestos a mezclas de Hg, sin embargo, ya hay evidencias de que estos compuestos se pueden encontrar en otras matrices alimentarias como el arroz o y productos vegetales.
- Es probable que las alteraciones en una comunidad se producen a concentraciones mucho más bajas (exposiciones crónicas) de Hg que los sugeridos en el presente documento (en gran parte basado en los efectos agudos).

En conclusión, la forma en la que se encuentre el Hg en el ambiente varía según las condiciones ambientales, la concentración de materia orgánica, nutrientes, el oxígeno del medio y las interacciones hidrológicas dentro del ecosistema. Así mismo, las formas de Hg y su concentración son en gran medida, una función de las fuentes de emisión y los procesos de transporte.

Los organismos acuáticos en todos los niveles tróficos acumulan Hg en los tejidos. Este se mantiene durante largos períodos de tiempo si está en una forma orgánica (metilado). Entre los factores que aumenta su susceptibilidad están la etapa del ciclo de vida (la etapa larval es más sensible), el desarrollo de la tolerancia, la temperatura del agua y la dureza. Para la especiación orgánica de Hg, hay una amplia posibilidad de métodos que de forma individual o en conjunto se desarrollan para alcanzar las especificaciones de sensibilidad y selectividad que se requieren para el análisis de HgT y su especiación orgánica.

De todas las etapas involucradas en el proceso analítico, el tratamiento de la muestra se constituye como la etapa más crítica en el análisis de los compuestos organomercuriales, por lo que se debe prestar mayor cuidado en su desarrollo evitando las pérdidas de muestra que conllevan a la pérdida de analito y evitando la transformación del compuesto desde su forma inorgánica (Hg^{2+}) a su forma orgánica (MeHg) durante el tratamiento.

5. Referencias bibliográficas

- Bank, M. S. (2012). *Mercury in the Environment: Pattern and Process*: University of California Press.
- Batley, G. E. (1989). *Trace Element Speciation Analytical Methods and Problems*: Taylor & Francis.
- Berzas Nevado, J. J., Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C., Krupp, E. M., Guzmán Bernardo, F. J., Rodríguez Fariñas, N., Jiménez Moreno, M., . . . Patiño Roper, M. J. (2011). Comparison of gas chromatographic hyphenated

techniques for mercury speciation analysis. *Journal of Chromatography A*, 1218(28), 4545-4551. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.036>

- Bloom, N. S., Colman, J. A., & Barber, L. (1997). Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 358(3), 371-377. doi: 10.1007/s002160050432
- Cai, Y., & Bayona, J. M. (1995). Determination of methylmercury in fish and river water samples using in situ sodium tetraethylborate derivatization following by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 696(1), 113-122. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)01177-G](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(94)01177-G)
- Carrasco, L., Díez, S., & Bayona, J. M. (2007). Methylmercury determination in biota by solid-phase microextraction: Matrix effect evaluation. *Journal of Chromatography A*, 1174(1-2), 2-6. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.09.051>
- Carrasco, L., & Vassileva, E. (2014). Determination of methylmercury in marine biota samples: Method validation. *Talanta*, 122(0), 106-114. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.027>
- Cazes, J. (2004). *Analytical Instrumentation Handbook, Third Edition*: Taylor & Francis.
- Ceccatelli, S., Daré, E., & Moors, M. (2010). Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 188(2), 301-308. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.04.007>
- Clémens, S., Monperrus, M., Donard, O. F. X., Amouroux, D., & Guérin, T. (2012). Mercury speciation in seafood using isotope dilution analysis: A review. *Talanta*, 89(0), 12-20. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.064>
- Clevenger, W. L., Smith, B. W., & Winefordner, J. D. (1997). Trace Determination of Mercury: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 27(1), 1-26. doi: 10.1080/10408349708050578
- Chen, S.-S., Chou, S.-S., & Hwang, D.-F. (2004). Determination of methylmercury in fish using focused microwave digestion following by Cu²⁺

addition, sodium tetrapropylborate derivatization, n-heptane extraction, and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1024(1–2), 209-215. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.015>

- Dadfarnia, S., & Haji Shabani, A. M. (2010). Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals— A review. *Analytica Chimica Acta*, 658(2), 107-119. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.022>
- de la Guardia, M., & Garrigues, S. (2012). *Handbook of Green Analytical Chemistry*. Wiley.
- Delgado, A., Prieto, A., Zuloaga, O., de Diego, A., & Madariaga, J. M. (2007). Production of artifact methylmercury during the analysis of certified reference sediments: Use of ionic exchange in the sample treatment step to minimise the problem. *Analytica Chimica Acta*, 582(1), 109-115. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.08.051>
- Demuth, N., & Heumann, K. G. (2001). Validation of Methylmercury Determinations in Aquatic Systems by Alkyl Derivatization Methods for GC Analysis Using ICP-IDMS. *Analytical Chemistry*, 73(16), 4020-4027. doi: 10.1021/ac010366+
- Díez, S., & Bayona, J. M. (2008). Determination of Hg and organomercury species following SPME: A review. *Talanta*, 77(1), 21-27. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.06.027>
- Dua, A., & Gupta, N. (2005). Mercury Toxicology as Assessed Through Fish Scales. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 74(6), 1105-1110. doi: 10.1007/s00128-005-0695-y
- Ebdon, L., & Evans, E. H. (1998). *An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry*. Wiley.
- Emteborg, H., Bjorklund, E., Odman, F., Karlsson, L., Mathiasson, L., Frech, W., & Baxter, D. C. (1996). Determination of methylmercury in sediments using supercritical fluid extraction and gas chromatography coupled with microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. [10.1039/AN9962100019]. *Analyst*, 121(1), 19-29. doi: 10.1039/an9962100019

- Emteborg, H., Hadgu, N., & Baxter, D. C. (1994). Quality control of a recently developed analytical method for the simultaneous determination of methylmercury and inorganic mercury in environmental and biological samples. [10.1039/JA9940900297]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 9(3), 297-302. doi: 10.1039/ja9940900297
- Emteborg, H., Snell, J., Qian, J., & Frech, W. (1999). Sources of systematic errors in mercury speciation using Grignard reagents and capillary gas chromatography coupled to atomic spectrometry. *Chemosphere*, 39(7), 1137-1152. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00183-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00183-6)
- Falter, R., Hintelmann, H., & Quevauviller, P. (1999). Conclusion of the workshop on “sources of error in methylmercury determination during sample preparation, derivatisation and detection”. *Chemosphere*, 39(7), 1039-1049. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00177-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00177-0)
- Farina, M., Rocha, J. B. T., & Aschner, M. (2011). Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. *Life Sciences*, 89(15–16), 555-563. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.019>
- Filippelli, M., Baldi, F., Brinckman, F. E., & Olson, G. J. (1992). Methylmercury determination as volatile methylmercury hydride by purge and trap gas chromatography in line with Fourier transform infrared spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 26(7), 1457-1460. doi: 10.1021/es00031a025
- Gil, S., Fragueiro, S., Lavilla, I., & Bendicho, C. (2005). Determination of methylmercury by electrothermal atomic absorption spectrometry using headspace single-drop microextraction with in situ hydride generation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60(1), 145-150. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2004.10.008>
- Grandjean, P., Weihe, P., Debes, F., Choi, A. L., & Budtz-Jørgensen, E. (2014). Neurotoxicity from prenatal and postnatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology*, 43(0), 39-44. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2014.03.004>

- Health, A. C. S. *Regulating Mercury Emissions from Power Plants: Will It Protect Our Health*: Am Cncl on Science, Health.
- Hintelmann, H., & Nguyen, H. (2005). Extraction of methylmercury from tissue and plant samples by acid leaching. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(2), 360-365. doi: 10.1007/s00216-004-2878-5
- Horvat, M., Bloom, N. S., & Liang, L. (1993). Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples: Part 1. Sediments. *Analytica Chimica Acta*, 281(1), 135-152. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)85348-N](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(93)85348-N)
- Horvat, M., Byrne, A. R., & May, K. (1990). A modified method for the determination of methylmercury by gas chromatography. *Talanta*, 37(2), 207-212. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0039-9140\(90\)80024-A](http://dx.doi.org/10.1016/0039-9140(90)80024-A)
- Jia, X., Han, Y., Liu, X., Duan, T., & Chen, H. (2011). Speciation of mercury in water samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 66(1), 88-92. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2010.12.003>
- Junghans, R. P. (1983). A review of the toxicity of methylmercury compounds with application to occupational exposures associated with laboratory uses. *Environmental Research*, 31(1), 1-31. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0013-9351\(83\)90059-2](http://dx.doi.org/10.1016/0013-9351(83)90059-2)
- Krishna, M. V. B., Ranjit, M., Karunasagar, D., & Arunachalam, J. (2005). A rapid ultrasound-assisted thiourea extraction method for the determination of inorganic and methyl mercury in biological and environmental samples by CVAAS. *Talanta*, 67(1), 70-80. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.02.007>
- Lindqvist, O., & Rodhe, H. (1985). Atmospheric mercury—a review*. *Tellus B*, 37B(3), 136-159. doi: 10.1111/j.1600-0889.1985.tb00062.x
- Liu, G., Cai, Y., & O'Driscoll, N. (2011). *Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury*: Wiley.

- Loconto, P. R. (2005). *Trace Environmental Quantitative Analysis: Principles, Techniques and Applications, Second Edition*: Taylor & Francis.
- Lorenzo, R. A., Vázquez, M. J., Carro, A. M., & Cela, R. (1999). Methylmercury extraction from aquatic sediments: A comparison between manual, supercritical fluid and microwave-assisted techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18(6), 410-416. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00118-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00118-1)
- Mao Tseng, C., De Diego, A., Martin, F. M., Amouroux, D., & F. X. Donard, O. (1997). Rapid Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury in Biological Reference Materials by Hydride Generation, Cryofocusing, Atomic Absorption Spectrometry After Open Focused Microwave-assisted Alkaline Digestion. [10.1039/A700956I]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12(7), 743-750. doi: 10.1039/a700956i
- Mao Tseng, C., De Diego, A., Martin, F. M., & F. X. Donard, O. (1997). Rapid and Quantitative Microwave-assisted Recovery of Methylmercury From Standard Reference Sediments. [10.1039/A700832E]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12(6), 629-635. doi: 10.1039/a700832e
- Navarro, M., López, M. C., López, H., & Sánchez, M. (1992). Microwave dissolution for the determination of mercury in fish by cold vapour atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 257(1), 155-158. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(92\)80164-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(92)80164-3)
- Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., & Friberg, L. (2011). *Handbook on the Toxicology of Metals*: Elsevier Science.
- Pirrone, N., & Mahaffey, K. R. (2005). *Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales: Atmospheric Processes and Human Exposures Around the World*: Springer.
- Pontes, F. V. M., Carneiro, M. C., Vaitsman, D. S., Monteiro, M. I. C., Neto, A. A., & Tristão, M. L. B. (2014). Investigation of the Grignard reaction and experimental conditions for the determination of inorganic mercury and methylmercury in crude oils by GC–ICP-MS. *Fuel*, 116(0), 421-426. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.025>

- Popp, M., Hann, S., & Koellensperger, G. (2010). Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry—A review. *Analytica Chimica Acta*, 668(2), 114-129. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.036>
- Puk, R., & Weber, J. H. (1994). Critical review of analytical methods for determination of inorganic mercury and methylmercury compounds. *Applied Organometallic Chemistry*, 8(4), 293-302. doi: 10.1002/aoc.590080404
- Quetel, C. R., Snell, J. P., Aregbe, Y., Abranko, L., Jokai, Z., Brunori, C., . . . Bjorn, E. (2005). Methylmercury in tuna: demonstrating measurement capabilities and evaluating comparability of results worldwide from the CCQM P-39 comparison. [10.1039/B505368D]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20(10), 1058-1066. doi: 10.1039/b505368d
- Quevauviller, P., & Morabito, R. (2000). Evaluation of extraction recoveries for organometallic determinations in environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(2–3), 86-96. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00193-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00193-4)
- Rahman, L., Corns, W. T., Bryce, D. W., & Stockwell, P. B. (2000). Determination of mercury, selenium, bismuth, arsenic and antimony in human hair by microwave digestion atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*, 52(5), 833-843. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00436-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00436-7)
- Selin, N. E. (2009). Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A Review. *Annual Review of Environment and Resources*, 34(1), 43-63. doi: doi:10.1146/annurev.environ.051308.084314
- Taylor, V. F., Carter, A., Davies, C., & Jackson, B. P. (2011). Trace-level automated mercury speciation analysis. [10.1039/C0AY00528B]. *Analytical Methods*, 3(5), 1143-1148. doi: 10.1039/c0ay00528b
- Tseng, C. M., De Diego, A., Wasserman, J. C., Amouroux, D., & Donard, O. F. X. (1999). Potential interferences generated during mercury species determination using acid leaching, aqueous ethylation, cryogenic gas

chromatography and atomic spectrometry detection techniques. *Chemosphere*, 39(7), 1119-1136. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00182-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00182-4)

- Ure, A. M. (1975). The determination of mercury by non-flame atomic absorption and fluorescence spectrometry : A review. *Analytica Chimica Acta*, 76(1), 1-26. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)81980-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(01)81980-2)
- Water, U. S. E. P. A. O. o., Science, U. S. E. P. A. O. o., Engineering, T., & Division, A. (2001). *Method 1630: Methyl Mercury in Water by Distillation, Aqueous Ethylation, Purge and Trap, and CVAFS*: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Science and Technology, Engineering and Analysis Division.

Capítulo 2

Validación de un método analítico para la determinación de mercurio en camarón y pescado

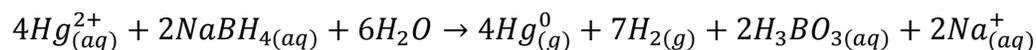
¹ El presente artículo deriva como resultado del proyecto “Validación y estandarización de pruebas analíticas rápidas, confiables y sensibles para la determinación de mercurio y metilmercurio en camarón y pescado” aprobado por Colciencias con código No. 127554431945

² Parte del capítulo fue sometido, evaluado y aceptado para su publicación en la revista Producción + Limpia ISSN: 1909-0455

Introducción

Las emisiones antropogénicas de mercurio (Hg) constituyen el principal medio de contaminación en las matrices ambientales y alimentarias (Martine Leermakers, Willy Baeyens, Philippe Quevauviller, & Milena Horvat, 2005).. La OMS ha establecido una ingesta diaria tolerable para metilmercurio de 0.48 µg/kg de peso corporal y en varios países han establecido límites de Hg total en especies de pescados de 1 mg/kg y en otros productos pesqueros 0.5 mg/kg. En Colombia, el Ministerio de la Protección Social y el de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial establecieron el valor máximo aceptable para el Hg de 0.001 mg/L en el agua para consumo humano (Social, 2012).

El Hg a temperatura ambiente se encuentra como vapor y su atomización se hace más simple (Baklanov & Chmilenko, 2001). Su determinación se fundamenta en la reducción de las formas inorgánicas a Hg elemental utilizando cloruro de estaño (SnCl₂) o borohidruro de sodio (NaBH₄) como se muestra en la reacción (Ri, amp, x, o-Segade, & Bendicho, 1999), para su posterior determinación. Este método es conocido como de vapor frío (CV) es el más aplicado ya que no hay pérdidas por la introducción de la muestra, lo que puede ocurrir al utilizar otros métodos (Hight & Cheng, 2005). Tras la generación del vapor frío la detección tiene lugar por absorción atómica utilizando lámpara de cátodo hueco de Hg y analizando a una longitud de onda de 253.7 nm. El límite de detección que pueden alcanzarse es de <1 ng/mL (Shah, Kazi, Baig, Afridi, & Arain, 2012).



El tratamiento de la muestra ha incorporado digestión por microondas (MW), los cuales emplean radiación electromagnética para desorber el analito y digieren la materia orgánica. La diferencia entre este tipo de calentamiento y los sistemas convencionales, es que la digestión se produce en el seno de la disolución y no por convección desde una fuente externa, produciendo un calentamiento homogéneo y eficaz (L. Reyes, Mizanur Rahman, Fahrenholz, & Skip Kingston,

2008). La ventaja de la digestión con horno microondas frente a la digestión en vaso abierto convencional es la posibilidad de controlar los parámetros de presión y temperatura, o la posibilidad de digerir la muestra en tiempos muy reducidos, ya que la velocidad de calentamiento es muy alta. El análisis de Hg permite obtener información de concentración, biodisponibilidad y toxicidad en muestras de productos y derivados de pesqueros y muestras ambientales entre otras.

Este capítulo presenta una metodología sencilla para la determinación de Hg en pescado y camarón utilizando espectroscopia de absorción atómica con generación de hidruros y sistema de inyección flujo, combinado con una digestión con microondas. Se alcanzó una a disminución significativa del volumen del agente oxidante empleado con respecto al método tradicional. Se garantizó una validación fácil, rápida y eficaz, que aseguró los parámetros de calidad y la eliminación de interferencias; además, la veracidad como componente de la exactitud del método se estableció a través de dos materiales de referencia certificados el SRM 2976 del: National Institute of Standards and Technology-NIST y el BCR-463 del Institute for Reference Materials and Measurements – IRMM.

Materiales y métodos

Instrumentación

Se empleó un Espectrofotómetro de Absorción Atómica AAnalyst™ 200 con un Sistema de Inyección en Flujo FIAS 100 de Perkin Elmer, se optimizó el tiempo de permanencia del vapor de Hg en la celda, la duración de la línea de base, las temperaturas de operación, las pulsaciones, la velocidad de bombeo y el flujo del gas portador (PerkinElmer, 2008). Además, se empleó un purificador de reactivos para la eliminación de trazas de Hg, y para el tratamiento de las muestras se utilizó un digestor de Microondas ETHOS ONE, bajo condiciones preestablecidas por el fabricante (Milestone, 2009). Tanto el sistema de destilación como el

digestor fueron provistos por MILESTONE, Italia. Un procesador de alimentos de Black And Decker.

Reactivos

Se empleó Ácido nítrico (HNO_3) Suprapur® para la preparación de la curva de calibración y calidad Emsure® para la digestión de las muestras. Ácido clorhídrico (HCl) al 37% EMSURE® y borohidruro (NaBH_4), hidróxido de sodio (NaOH) EMSURE®, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% Suprapur®, solución patrón de Hg trazable a SRM de NIST en HNO_3 , calidad Certipur®; todos los reactivos utilizados fueron suministrados por Merck Colombia. Los materiales de referencia certificados SRM 2976 - Mussel Tissue (Trace Elements & Methylmercury) Freeze-dried National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, EE.UU) y BCR-463 TUNA FISH Institute for Reference Materials and Measurements European Commission (IRMM, Geel, Belgium).

Obtención de muestras

Se emplearon muestras de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) y camarón tigre (*Penaeus monodon*) obtenidos en supermercados de la ciudad de Medellín-Colombia, se empacaron en bolsas ziploc y se almacenaron a $-30\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su procesamiento. En el tratamiento previo de las muestras, se les retiró las partes no comestibles conservando únicamente el tejido y la piel, estas partes se les redujo su tamaño de partícula en un procesador de alimentos hasta obtener una pasta uniforme, se homogeneizó y se almacenó en tubos de cónicos de polipropileno de 50 ml a $-4\text{ }^\circ\text{C}$ hasta el análisis.

Tratamiento de muestras

La digestión de las muestras se llevó a cabo en digestor de microondas ETHOS ONE, provisto de un rotor con viales de teflón con cierre hermético; la potencia de operación fue de 1500 W y se aplicó para todos los procedimientos. El procedimiento de digestión se siguió de acuerdo con las notas de aplicación SK 16 HPR-FO-17 para pescado liofilizado (usado para el material de referencia) y HPR-

FO-07 para pescado fresco sugeridas por el fabricante (Milestone, 2009). Se tomó entre 0,1 y 0,4 g (pescado y camarón fresco, muestras de pescado y camarón fortificadas al 30 y 70% de los valores de la curva de calibración y para los materiales de referencia), se adiciono 2 ml de H₂O₂ al 30% con 8 ml de HNO₃ al 65%. El programa de microondas se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1 programa de calentamiento del horno microondas para la descomposición de la muestra

Paso	Tiempo	T1	T2	P	Power
1	00:15:00	200°C	110°C	45 bar	1500W
2	00:15:00	200°C	110°C	45 bar	1500W

Después de la digestión y enfriamiento, el producto se transfirió a balones volumétricos de 25 mL y se aforó con agua desionizada.

Soluciones para el análisis

Las soluciones estándar para la curva de calibración se prepararon a partir de una solución estándar de 1000 mg/L de Hg, siguiendo las recomendaciones del método 3111 del Standard Methods Committee (American Public Health Association, 2005), a concentraciones de 1.0, 5.0, 10.0, 15.0y 20.0 µg/L. Todas las soluciones se estabilizaron en HNO₃ libre de Hg 5M.

Las soluciones reductoras se prepararon para cada análisis con una solución fresca de NaBH₄ al 1% preparada en solución de NaOH 0,5% (para estabilizar la solución) y una solución de HCL 0,5 M.

Validación del método

Se utilizó la metodología de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI, 2001) (Ortega, Garcia, & Fontanety, 2001), el método 3111 del Standard Methods Committee (American Public Health Association, 2005), los parámetros establecidos en la Norma ISO –NTC 17025 (ICONTEC., 2003) versión

2003 y los lineamientos de la Association Of Analytical Communities AOAC (Horwitz & Chemists, 2000). Se determinó el rango de trabajo y la linealidad, la precisión y la exactitud, la repetibilidad del instrumento y del método, el efecto matriz, el límite de detección y de cuantificación.

- ***Rango de trabajo y linealidad***

Se evaluaron tres curvas de calibración (1.0 a 20.0 µg/L) en diferentes días. Para verificar la linealidad en dicho rango se analizaron 2 puntos por encima y 2 por debajo del intervalo. A partir de los resultados de las curvas, se definió el rango de trabajo para el proceso de validación, con los mismos experimentos se evaluó la linealidad del método definiendo como parámetro de calidad y de aceptación un coeficiente de correlación de $r^2=0.995$ y se calcularon los residuales en cada punto, estableciendo como parámetro máximo un residual del 20%.

- ***Repetibilidad del instrumento***

Se realizaron 10 mediciones a una misma muestra elegida al azar para calcular la desviación estándar de este análisis y comparar con el valor de la AOAC.

- ***Repetibilidad del método***

Se estableció 3 concentraciones (1.0, 10.0 y 20.0 µg/L) y se analizaron 5 veces cada uno en diferentes días, se comparó con los valores establecidos por la AOAC. Además, en otro experimento se fortificó una muestra placebo (evaluada previamente para establecer que su contenido de Hg este por debajo del límite de detección del método) con concentraciones definidas. Los placebos se doparon previo del tratamiento de muestra y se procede a su análisis. Con los valores de repetibilidad del instrumento y del método, se evaluó la precisión; además, con los mismos valores obtenidos en la repetibilidad del método se pudo calcular la exactitud del método.

- **Efecto matriz**

Se partió de una muestra, la cual se divide en tres partes, dos de ellas se doparon, la primera al 30% (7.0 µg/ L), la segunda al 70% (15.0 µg/L). Este ensayo se realizó 10 veces para cada uno de las muestras, se procedió con el análisis y los resultados se compararon en cada nivel evaluando la desviación estándar en cada uno de ellos.

Veracidad

Se utilizaron los dos materiales de referencia, se analizaron 7 muestras idénticas de cada uno de los CRM siguiendo las instrucciones de ensayo del método, se determinó la concentración del analito en cada una de las muestras, se calculó la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación (%) para estas concentraciones y se calculó la veracidad

Límite de detección y cuantificación

Se calculó por medio de la relación señal/ruido, se doparon 10 muestras con el nivel bajo de la curva y se procedió con diluciones consecutivas a concentraciones conocidas hasta donde se pudo obtener una respuesta del instrumento. Adicionalmente, se analizaron 10 muestras blanco y se midieron las señales. El Límite de detección calculado fue la concentración mínima a la cual el analito fue detectado con una relación/señal ruido de 3:1. El límite de cuantificación se calculó en el punto donde la relación señal/ruido fue menos a 10% y la desviación estándar relativa calculada dio menos de 10%, también se pudo utilizando un factor entre $2 < f < 10$, esta concentración obtenida es un resultado teórico, por lo que se evaluó realizando 5 ensayos a la concentración teórica obtenida, con el fin de demostrar que este resultado fue la cantidad mínima cuantificable, precisa y exacta que constituye el método.

Resultados y discusión

El procedimiento de tratamiento de muestra se aplicó con éxito, tanto para el material de referencia certificado y muestras de camarón y pescado fresco. Cualquier interferencia debida a la matriz orgánica residual se verificó durante el proceso demostrando la no afectación por el efecto matriz.

El análisis de una muestra de material de referencia certificado se llevó a cabo para verificar la fiabilidad del método propuesto, demostrado su veracidad. La digestión de esta muestra se llevó a cabo utilizando el mismo proceso utilizado para las muestras pescado y de camarón. Para el material de referencia certificado SRM 2976, el valor medio en la concentración de las muestras (n=7 cada una) se obtuvo un contenido de Hg de 58.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acuerdo con el valor nominal de $61.0 \pm 3.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ y el para BCR – 463 se obtuvo un contenido de Hg de 2.71 $\mu\text{g}/\text{g}$ de acuerdo con el valor nominal de $2.85 \pm 0.16 \mu\text{g}/\text{g}$; la veracidad calculada y reproducibilidad fueron del 95.40 % y 95,09%, además de RSD = 13.8 y 11 respectivamente. Los resultados obtenidos con el material de referencia verifican la calidad del método y la corrección de errores, en comparación Mao Tseng et al 1997(Mao Tseng, De Diego, Martin, Amouroux, et al., 1997) desarrollo un método por digestión en microondas, pero empleo una solución de hidróxido de potasio metanólico, obteniendo recuperaciones del 102%, para nuestro método no se considera esta solución ya que para el análisis de Hg se requiere que este compuesto este en solución para formar las sales nítricas para su estabilización y realizar una digestión básica requiere de procedimientos extras que pueden introducir errores en la medición.

La tabla 2. Recopila los resultados de la validación del método, en ella se puede establecer que las curvas de calibración mostraron buena linealidad ($> 0,99$), alta sensibilidad y selectividad, siendo estas las principales ventajas de la técnica presentada en este estudio. Se alcanzó buena reproducibilidad siendo confirmada por las bajas desviaciones estándar ($<11\%$) comparables a otros métodos de análisis elemental. Este análisis también certificó que no había pérdidas de Hg

durante la digestión de la muestra por el sistema de microondas en las condiciones adoptadas. La prueba de hipótesis para la regresión del método demostró que existe una relación entre las variables en los intervalos de confianza para la pendiente se concluyó que el método responde adecuadamente a cambios de concentración; además, para los intervalos de confianza para el intercepto, el método exhibe proporcionalidad aceptable en el intervalo ensayado. Los criterios de aceptación para la repetibilidad del método, cumplieron en el %RSD de las determinaciones para los niveles 1, 3 y 5, son menores al porcentaje teórico, cumpliendo con la repetibilidad del método para cada nivel. El método cumple con los criterios de aceptación para la exactitud, de acuerdo con el promedio de porcentajes de recuperación en los tres niveles. La pruebas de hipótesis del método demuestra que es exacto en el rango de concentración ensayado; además, se logra recuperaciones dentro de los límites especificados a cada nivel, el cual presento por un alfa de 0.05, un t calculado de -0.11 y una t tabulado de 2.16. El LD y el LC estimados fueron de 0.331 y 0.992 $\mu\text{g/L}$ respectivamente, cumpliendo un %RSD=8.15. Leal et al 2006 (Leal, Elsholz, Forteza, & Cerdà, 2006) reportaron un límite de detección de 5 ng/L, una concentración muy inferior al reportada por nuestro método, que aunque analíticamente se considera esta análisis a nivel ultratrazo como una buena metodología para el análisis elemental, el nivel de sensibilidad del nuestro método se considera un adecuado porque cumple con requisitos instrumentales para el análisis de Hg en muestras de pescados y camarones, alcanzado a determinar concentraciones por debajo de los límites propuestos por la legislación

Tabla 2 Resultado de la linealidad y el rango

Parámetros	Resultados			
linealidad y el rango (Curva de Calibrado)	r ²	0.9998	Intervalo confianza Inferior	Intervalo confianza Superior
	Pendiente	0.0560	0.080	0.032
	Intercepto	0.0209	0.331	-0.289
Precisión (Repetibilidad del Sistema Instrumental)	Valor promedio		% RSD experimental	
	0.675 µg/L		22,74	
Precisión (Repetibilidad del método)	Valor promedio (µg/L)		% RSD experimental	%RSD (AOAC)
	Bajo	0.774	8.15	16.40
	Medio	10.214	0.84	11.30
	Alto	20.338	4.01	7.70
Exactitud	% Recuperación		Límite inferior	Límite superior
	Bajo	77.40	75.30	111.20
	Medio	102.14	80.00	110.00
	Alto	101.69	82.00	105.00
Efecto matriz (Tejido de pescado)	Matriz adicionada	% Recuperación	Límite inferior	Límite superior
	6.948	90.05	80.00	110.00
	15.924	101.45	90.05	101.45
Efecto matriz (Tejido de camarón)	Matriz adicionada	% Recuperación	Límite inferior	Límite superior
	7.155	91.33	80.00	110.00
	16.034	101.80	91.33	101.80

Conclusiones

La metodología propuesta para la determinación de Hg en pescado y camarones por digestión de microondas tiene muchas ventajas. La utilización de

ácido nítrico en mezcla con peróxido de hidrógeno es más favorable que la utilización de la digestión tradicional con la mezcla de ácido nítrico, sulfúrico y solución de permanganato de potasio. En cuanto a la cantidad de muestra de análisis, a pesar del proceso de digestión implica una cantidad de muestra reducida, la reducción de pérdidas de muestra, el bajo consumo de ácidos (que pueden adicionar analito a la muestra), un volumen de aforo pequeño y la optimización de variables para el análisis permite alcanzar las condiciones de robustez planteadas en el objetivo del estudio.

El método propuesto para la determinación de Hg demostró ser simple, eficiente y fácil de realizar en las matrices analizadas y su proceso validación se desarrolló de forma optimizada, se recurrió al uso de análisis multifactores para evaluar diversos parámetros en el tiempo; el cual, denostó un nulo efecto en el resultado analítico por la modificación de factores internos en el protocolo de análisis, asegurando la calidad del protocolo de análisis y el procedimiento de validación establecido dentro del sistema de calidad planteado en el laboratorio.

Agradecimientos

Se agradece al Departamento de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS, por la financiación de proyecto y especialmente al Servicio Nacional de Aprendizaje SENA – La Salada, al facilitar la planta de laboratorio para el desarrollo y obtención de los resultados del proyecto

Referencias Bibliográficas

American Public Health Association, A. W. W. A., Water Pollution Control Federation. (2005). Metal by Flame Atomic Absorption. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater *Method 3111*. New York: American Public Health Association, American Water Works Association.

- Baklanov, A. N., & Chmilenko, F. A. (2001). Use of Ultrasound in Sample Preparation for the Determination of Mercury Species by Cold-Vapor Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 56(7), 641-646. doi: 10.1023/a:1016792205748
- Hight, S. C., & Cheng, J. (2005). Determination of total mercury in seafood by cold vapor-atomic absorption spectroscopy (CVAAS) after microwave decomposition. *Food Chemistry*, 91(3), 557-570. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.004>
- Horwitz, W., & Chemists, A. o. O. A. (2000). *Official methods of analysis of the AOAC: Association of Official Analytical Chemists*.
- ICONTEC. (2003). *Norma tecnica colombiana NTC-ISO-IEC 17025 : requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibracion: Icontec*.
- Leal, L. O., Elsholz, O., Forteza, R., & Cerdà, V. (2006). Determination of mercury by multisyringe flow injection system with cold-vapor atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 573–574(0), 399-405. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.078>
- Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P., & Horvat, M. (2005). Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(5), 383-393. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2004.01.001>
- Mao Tseng, C., De Diego, A., Martin, F. M., Amouroux, D., & F. X. Donard, O. (1997). Rapid Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury in Biological Reference Materials by Hydride Generation, Cryofocusing, Atomic Absorption Spectrometry After Open Focused Microwave-assisted Alkaline Digestion. [10.1039/A700956I]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12(7), 743-750. doi: 10.1039/a700956i
- Milestone. (2009). *MILESTONE SK-10 and SK-12 ROTORS USER MANUAL*. Sorisole, Italy: Milestone.
- Ortega, L. A., Garcia, J. G., & Fontanety, M. I. (2001). *VALIDACION DE METODOS ANALITICOS*. Barcelona, España.
- PerkinElmer. (2008). *Atomic Absorption Spectrometry Methods Manual* (5 ed.).

- Reyes, L., Mizanur Rahman, G. M., Fahrenholz, T., & Skip Kingston, H. M. (2008). Comparison of methods with respect to efficiencies, recoveries, and quantitation of mercury species interconversions in food demonstrated using tuna fish. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(8), 2123-2132. doi: 10.1007/s00216-008-1966-3
- Ri, amp, x, o-Segade, S., & Bendicho, C. (1999). Selective Reduction Method for Separate Determination of Inorganic and Total Mercury in Mussel Tissue by Flow-Injection Cold Vapor Technique. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42(3), 245-252. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/eesa.1998.1753>
- Shah, A. Q., Kazi, T. G., Baig, J. A., Afridi, H. I., & Arain, M. B. (2012). Simultaneously determination of methyl and inorganic mercury in fish species by cold vapour generation atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 134(4), 2345-2349. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.109>
- Por la cual se modifica parcialmente la Resolución número 776 de 2008, RESOLUCIÓN 122 del enero 26 DE 2012 C.F.R. (2012).

Capítulo 3
Optimización y comparación de dos
métodos analíticos para la
cuantificación de metilmercurio en
de pescado

Introducción

El Mercurio (Hg), es uno de los metales de mayor prevalencia en el ambiente, su toxicidad está relacionada con su concentración, bioacumulación, biomagnificación y con su especiación química, siendo el Hg^{2+} y el catión metilmercurio las principales especies encontradas en muestras ambientales y biológicas (Jiang, Hu, Chen, & Zu, 2008). Se estima que los organomercuriales son más complejos que las sales inorgánicas debido a su absorción intestinal y a su fácil difusión a través de la barrera hematoencefálica y de la placenta (Hempel et al., 1995; M. Leermakers, W. Baeyens, P. Quevauviller, & M. Horvat, 2005). La concentración de mercurio total (HgT) no es indicador de su toxicidad, ni de su biodisponibilidad y biotransformación. Por lo tanto, la determinación rápida y selectiva de compuestos organomercuriales, es importante para comprender su dinámica ambiental y su riesgo toxicológico. (Mondal, Das, & Das, 2001).

La determinación analítica de organomercuriales es difícil y su estudio implica cuidados en el muestreo, tratamiento, conservación y almacenamiento de las muestras; posteriormente, la extracción y limpieza, constituyen un riesgo de pérdidas en el proceso de los compuestos de interés. La extracción se considera la etapa más crítica, debido a la naturaleza iónica, la baja volatilidad y sensibilidad térmica de éstos compuestos (R. Rodil, Carro, Lorenzo, Abuín, & Cela, 2002). Por lo anterior, se han propuesto metodologías como la extracción líquido-líquido (LLE) (Gaona & Valiente, 2003) y la microextracción en fase sólida (SPME) (Sánchez, Martín, Morante, Marín, & Munuera, 2000), para su extracción y concentración a partir de muestras de biológicas y ambientales.

Tanto la SPME como la LLE se han usado para la extracción, limpieza y concentración antes de su análisis (Díez & Bayona, 2008; Pena-Pereira, Lavilla, & Bendicho, 2009), éstas técnicas se apoyan en el uso de agentes derivatizantes para la formación de compuestos que de fácil análisis por cromatográfico. La alquilación con tetraalquil/amilboratos como el tetraetilborato sódico (NaBEt_4) (Kuballa, Leonhardt, Schoeberl, & Lachenmeier, 2009; Logar, Horvat, Akagi, &

Pihlar, 2002; Välimäki & Perämäki, 2001), el tetrafenilborato sódico (NaBPh_4) (Y. Cai, Monsalud, & Furton, 2000a; Mao, Liu, Meichel, Cai, & Jiang, 2008) y el tetrapropilborato sódico (NaBPr_4) (Chen et al., 2004), constituyen la estrategia de derivatización más común y eficiente para el tratamiento de organomercuriales. Cabe destacar que la derivatización de estos compuestos se ve afectada por factores como pH, interferencias químicas, volumen y concentración del agente derivatizante, tiempo de extracción y por la limpieza de la matriz entre otros (Yong Cai & Bayona, 1995; Centineo, González, García Alonso, & Sanz-Medel, 2006; Menéndez García, Fernández Sánchez, Sánchez Uría, & Sanz Medel, 1996).

Entre las metodologías utilizadas para el análisis de especies de Hg en matrices biológicas y alimentarias, la mayoría se fundamentan en el acople de una tecnología de separación, como la cromatografía de gases (GC) o cromatografía líquida (LC) con un detector selectivo de masas (MS) (Hippler, Hoppe, Mosel, Rettenmeier, & Hirner, 2009) como: espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) (Ong, Lim, Ghanthimathi, Ibrahim, & Nasir, 2014), espectrometría de emisión atómica con plasma inducido por microondas (MIP-AES) (Costa-Fernandez, Lunzer, Pereiro-Garcia, Sanz-Medel, & Bordel-Garcia, 1995), espectrometría de emisión atómica con acople inductivo de plasma (ICP-AES) (Krull, Bushee, Schleicher, & Smith, 1986), espectrometría de absorción atómica (AAS) (R. Puk & J. H. Weber, 1994) y espectrometría de fluorescencia atómica (AFS) (Yan, Yin, Jiang, & He, 2003) entre otras.

El objetivo de este capítulo es desarrollar una metodología rápida y sensible para la determinación de metilmercurio (MeHg), etilmercurio (EtHg) y fenilmercurio (PhHg) en muestras de tejido de pescado, mediante SPME y LLE, y derivatizando con NaBEt_4 y NaBPh_4 . El desarrollo inicial incluyó la digestión con hidróxido de potasio en metanol, con modificación de los trabajos desarrollados por (Yong Cai & Bayona, 1995) y (Menéndez García et al., 1996). En la SPME se eligió la fibra DVB/CAR/PDMS a partir del trabajo realizado por Centineo et al 2004 y Risticervis et al 2011 (Centineo, Blanco González, & Sanz-Medel, 2004; Risticervis, Vuckovic,

& Pawliszyn, 2011). La optimización se realizó con base en la metodología de superficie de respuesta (RSM) basado en un diseño factorial central compuesto circunscrito (CCC). Tanto para la elección del método como en su optimización se eligió como variable respuesta la recuperación a partir del material de referencia certificado NIST 2976 y muestra blanco dopada. El método seleccionado y optimizado se aplicó con éxito para el análisis de MeHg, EtHg y PhHg en muestras de pescado con recuperaciones mayores al 90%.

Materiales

Reactivos. Se usaron Ácido nítrico 65% suprapure[®] y grado reactivo, hidróxido de potasio (KOH), metanol (MeOH) grado residuo, acetato de cobre (II) monohidratado (Cu^{2+}), todos de Merck. Hexano grado residuo (Hx), y ácido acético glacial (AA) de J.T. Baker. Acetato de sodio trihidratado (ACNa) de Carlo Erba. Tetraetilborato de sodio (NaBEt_4) y Tetrafenilborato de sodio (NaBPh_4) de Sigma-aldrich. Cloruro de metilmercurio 96.0%, cloruro de etilmercurio 95.5% y cloruro de fenilmercurio 93.8% de Dr. Ehrenstorfer.

Muestras. Se empleó trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) como muestra blanco obtenidas de criadero de alta montaña; previamente se descongelaron, se eliminaron las partes no comestibles, se procesaron hasta obtener una pasta homogénea y se almacenó en tubos falcon[®] de 50 ml a -4°C hasta el análisis. Se utilizó el material de referencia certificado SRM 2976-Mussel tissue (trace elements & methylmercury) freeze-dried del National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, EE.UU).

Soluciones. Se prepararon soluciones de los agentes derivatizante (NaBEt_4 y NaBPh_4) a 0.8, 1.0, 1.5 y 2.0% en agua destilada: La solución de Cu^{2+} 40 mM y las soluciones de buffer acetato 200 mM a pH 3.8, 4.0 y 4.5 en agua destilada. La solución de KOH al 25% se preparó en metanol. Se prepararon soluciones de trabajo de 1 mg L^{-1} de MeHg, EtHg y PhHg en MeOH a partir de la solución patrón

de 500.0 mg L⁻¹ de cada uno de los compuestos. A partir de las soluciones de trabajo se construyó en matriz la curva de calibración a 20.0, 50.0, 80.0, 150.0, 500.0 y 900.0 µg L⁻¹. Adicionalmente, se evaluó la recuperación dopando muestras blanco con cada uno de los compuestos de estudio a 20.0, 30.0 y 40.0 µg L⁻¹.

Extracción y determinación

Digestión de muestras. Se tomaron 0.5 g de homogenizado en tubo falcon® de 15 mL, se dopo con 2 ml de las soluciones de 40.0, 60.0 y 80.0 µg L⁻¹ para alcanzar las concentraciones de los límites de funcionamiento para el análisis de recuperación, se adicionó 3.0 ml de solución de KOH/MeOH 25%, se agitó por 3min y se llevó a ultrasonido a 30°C durante 2 horas a 6 ciclos de 15 min cada uno, con reposo de 3min entre los ciclos. Se efectuó el mismo procedimiento para el CMR.

Método de extracción 1 (LLE): el producto de la digestión se ajustó a pH entre 3.8 y 4.3 con AA y se adiciono 3.0 ml de buffer ACNa, luego se adicionó 1.0 ml de solución de Cu⁺² y finalmente se adiciono 0.8 ml de agente derivatizante, inmediatamente se tapó el tubo y se agitó durante 3 min a temperatura ambiente. La extracción se realizó con 2.0 ml Hx, se agitó durante 2 min, se centrifugó durante 5 min a una fuerza centrífuga relativa (RCF) de 1575 y se llevó a -20°C para freezing out. Finalmente, se tomó una alícuota de 1.5 ml del sobrenadante y se llevó al cromatógrafo para el análisis.

Método de extracción 2 (SPME): se desarrolló por Headspace con un soporte manual de fibra de SPME y recubierta de 100 µm de espesor de DVB/CAR/PDMS(Centineo et al., 2006). La extracción se desarrolló con agitación magnética y calentamiento a 30°C en vial de vidrio de 25ml con 17 ml de agua desionizada, 3 ml de solución de buffer AA, 1 mL de solución de Cu⁺², 100 µl del producto de la digestión y 200 µl de agente derivatizante, se tapó el vial y se dejó en agitación por 3min. La fibra se expuso 20 min para garantizar el equilibrio de

adsorción y se llevó al cromatógrafo de gases para la desorción térmica durante 15 min. Los tiempos de adsorción y de desorción se optimizaron previamente y se usó la profundidad de la fibra en el puerto de inyección recomendada por el fabricante. Después de cada experimento se lavó la fibra en MeOH con agitación durante 3min y se llevó al puerto de inyección a 250°C durante 30 min, este procedimiento se realizó para evitar posible efecto memoria de la fibra.

Método de detección. Se empleó un Cromatógrafo de gases Trace 1300 acoplado a espectrometría de masas-masas (GC-MS/MS) triple cuadrupolo TSQ 8000 de Thermo fisher, se usó un inyector Split/splitless en el modo splitless a 270°C, flujo de Split 60mL min⁻¹, tiempo del Split 3 min, volumen de inyección 1µL, purge flow: 5.0 mL min⁻¹, liner cónico con lana de vidrio desactivado de Agilent technologies y Helio como gas portador a un flujo de 1.0 mL min⁻¹. El programa temperatura del horno inició a 80°C por 1 minuto, hasta 100°C a 15°C min⁻¹ y finalmente se llevó a 240°C a 40°C min⁻¹ por 4 minutos. Se utilizó una columna analítica TG-5MS (5% fenil, 95% metilpolisiloxano) de 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm espesor de película. Las condiciones del detector fueron ionización positiva, temperatura de línea de transferencia de 270°C y temperatura de la fuente de iones de 220°C. La comparación de los espectros se realizó con la librería NIST MS search versión 2.0. La cuantificación de las especies se realizó a través del ion diagnóstico que presento mayor área y la identificación a través de la relación entre el ion precursor y dos iones producto (Q/q1, Q/q2), este procedimiento se empleó para calcular las concentraciones de MeHg en el CRM y MeHg, EtHg y PhHg en muestras blanco dopadas.

Análisis estadístico

Para evaluar la existencia de diferencias significativas entre los dos métodos propuestos se empleó una t de student y el análisis de varianza (ANOVA) para establecer si se presentó diferencias significativas entre las recuperaciones

de los métodos, se asumió que los datos siguieron una distribución normal y que las varianzas de los resultados de las recuperaciones fueron iguales.

Se usó la metodología de superficie de respuesta (RSM) basada en un diseño compuesto central circunscrito (CCC) para obtener una expresión polinómica que describe la respuesta óptima del pH, volumen y concentración del agente derivatizante, y tiempo y temperatura la derivatización, establecidas como críticas para la recuperación del MeHg en el MRC y de los otros organomercuriales en la muestra blanco dopada. (Giovanni 1983; Vatsala et al. 2001; Bas and Boyaci 2007). El diseño consistió en puntos cubo que provienen de un diseño factorial, puntos axiales y puntos centrales. Se realizaron siete repeticiones de los puntos centrales para estimar el error experimental. Los datos experimentales se analizaron por regresión múltiple. Se evaluó las diferencias significativas entre las variables independientes, los coeficientes de regresión y la significancia estadística de los términos del modelo a través del análisis de la ANOVA.

Se determinaron los coeficientes de regresión múltiple mediante mínimos cuadrados para predecir modelos polinomiales cuadráticos (Myers y Montgomery 1995). La matriz de diseño experimental, análisis de datos y el procedimiento de optimización se realizaron utilizando el paquete estadístico Modde 7.0. El grado de asociación entre las variables se determinó a través del análisis de correlación simple mediante el coeficiente de correlación lineal R, los cuales oscilaron entre -1 y +1 con un criterio de significancia a $P < 0.05$.

Resultados

En las Figuras 3 y 4 se muestran los cromatogramas en modo scan de los tratamientos efectuados con los dos agentes derivatizantes y con las dos técnicas de extracción. La grafica 3.a) muestra el tratamiento LLE con NaBEt_4 , en la cual se aprecia que el ruido instrumental de la línea base es predominante y que solo se pudo detectar el EtHg (tr: 2.47min). En parte b) se muestra el tratamiento con SPME, que tuvo una mejor línea base; además se observan el MeHg, EtHg y

PhHg (tr: 3.99, 6.42 y 10.32 min respectivamente), aunque los tres compuestos se analizaron a la misma concentración, la respuesta del PhHg no tuvo el mismo comportamiento con respecto a la señal de los otros compuestos. En esa misma figura se muestra un compuesto no identificado (tr: 1.72 min), es probable que sea un producto de degradación o un producto formado durante la derivatización; Lo anterior, debido a que el ion precursor contenía Hg, esta señal no supuso interferencia para el análisis, pero disminuye la respuesta de los compuestos de interés.

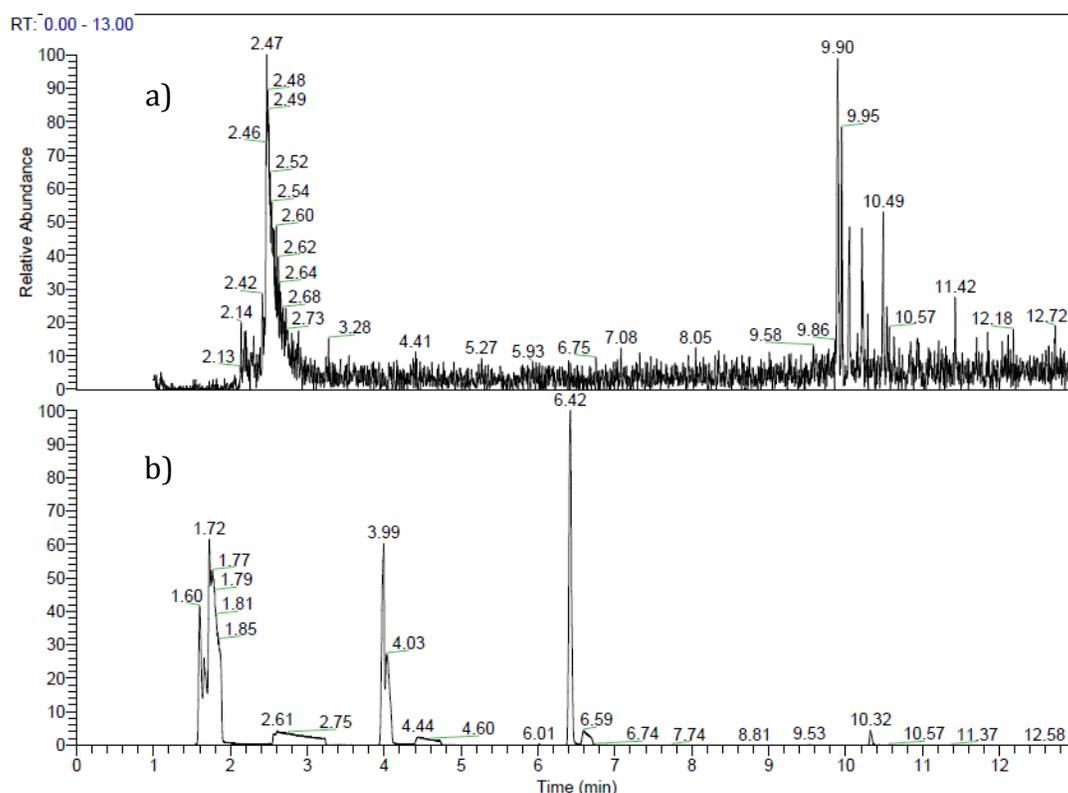


Figura 3 Cromatogramas obtenidos con los tratamientos derivatizando con NaBEt₄: a) SPME y b) LLE,

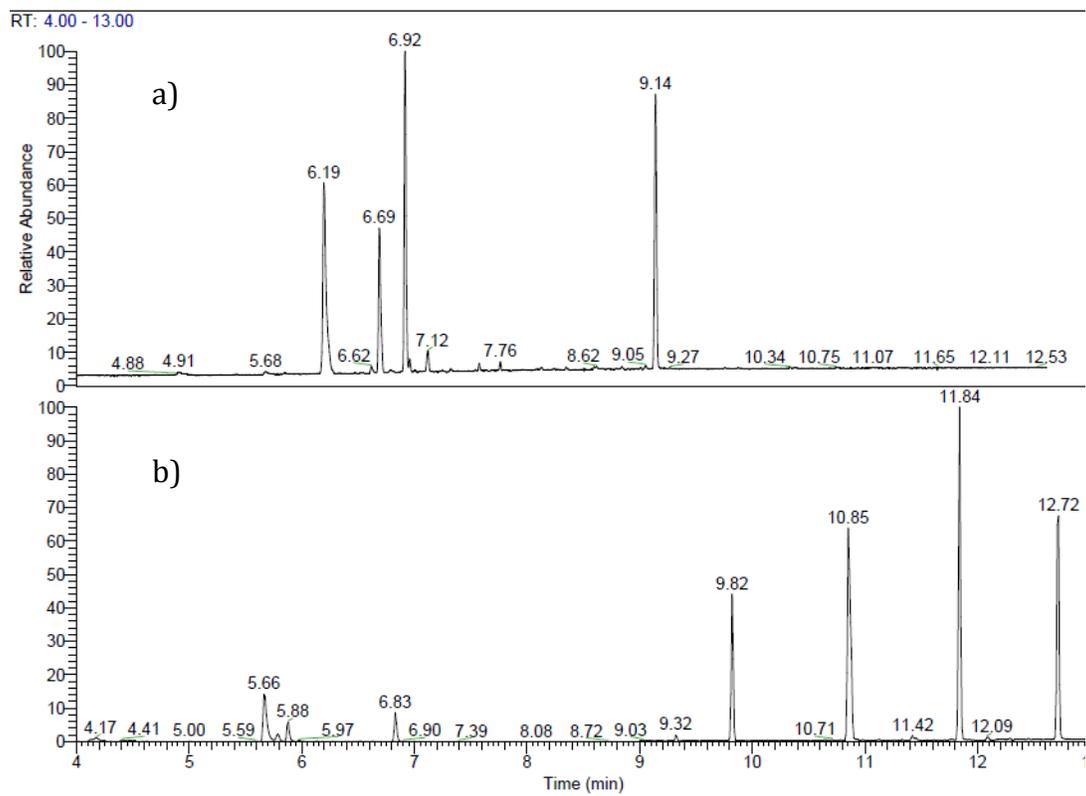


Figura 4 Cromatogramas obtenidos con los tratamientos derivatizados con NaBPh_4 : a) SPME y b) LLE.

En la Figura 4 a), el cromatograma del procedimiento LLE con NaBPh₄ evidencia una mejor línea base, simetría y resolución de los picos; además, se obtuvo respuestas equivalentes de las señales de los compuestos MeHg, EtHg y PhHg (tr: 6.19, 6.92 y 9.14 min, respectivamente). La señal con tr de 6.69 min se atribuyó al bifenilo formado durante la derivatización, la correspondencia de su espectro de masas fue comparable con la librería como se muestra en la figura 6. En la figura 4b) se muestra el tratamiento con SPME y NaBPh₄, aunque se nota una mejora significativa con respecto al figura 3b), no se presentó coelución en las señales, se observó supresión de la señal para el MeHg y el EtHg (tr: 5.66 y 6.83 min respectivamente), aumentó la señal del PhHg (tr: 10.85) y hubo nuevas señales de gran intensidad, sin generar interferencia para el análisis de los compuestos de interés. Con base en lo anterior, se determinó que la optimización se haría con extracción líquido-líquido y derivatización con NaBPh₄.

Las figuras 5, 6, 7 y 8 muestran los espectros de masa del fenilmetilmercurio (MeHgPh), del difenilo (DPh), del feniletilmercurio (EtHgPh), y del fenilfenilmercurio (PhHgPh), respectivamente. Estos fueron obtenidos para ambos métodos usando NaBPh₄; solo los espectros del DPh y del EtHgPh fueron comparados con la librería. La tabla 3 muestra los iones de identificación y de cuantificación utilizados y la tabla 4 resume los espectros de masas, indicando los fragmentos de las especies derivatizadas.

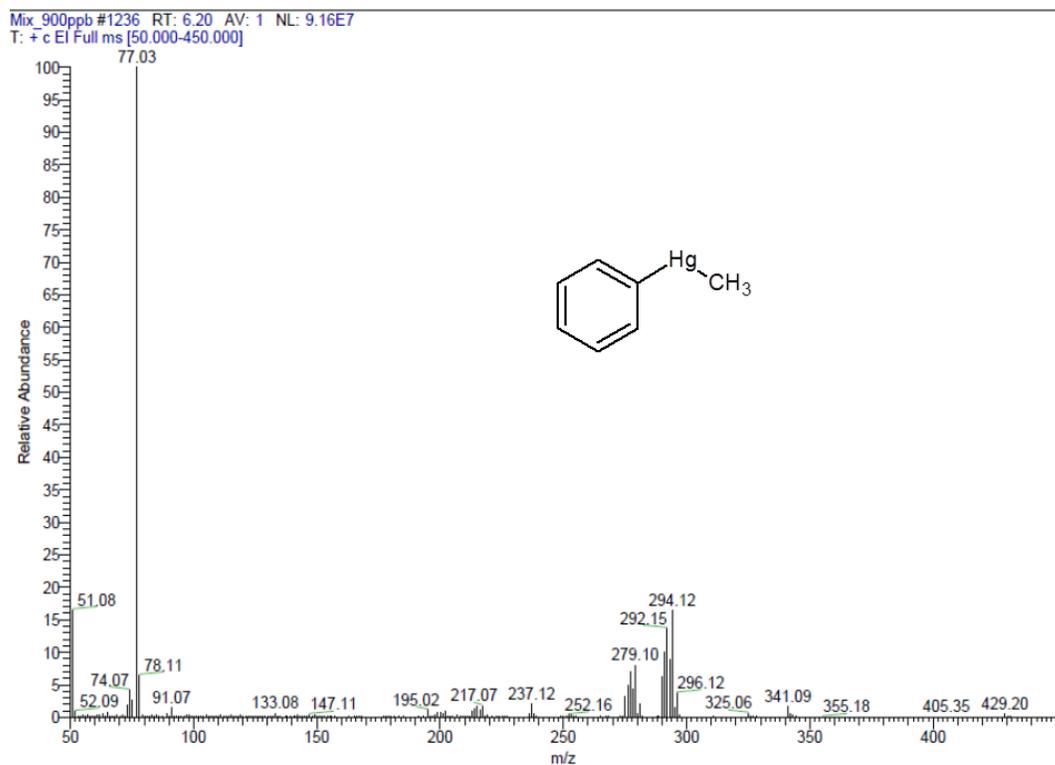


Figura 5 Espectro de masas del metilfenilmercurio

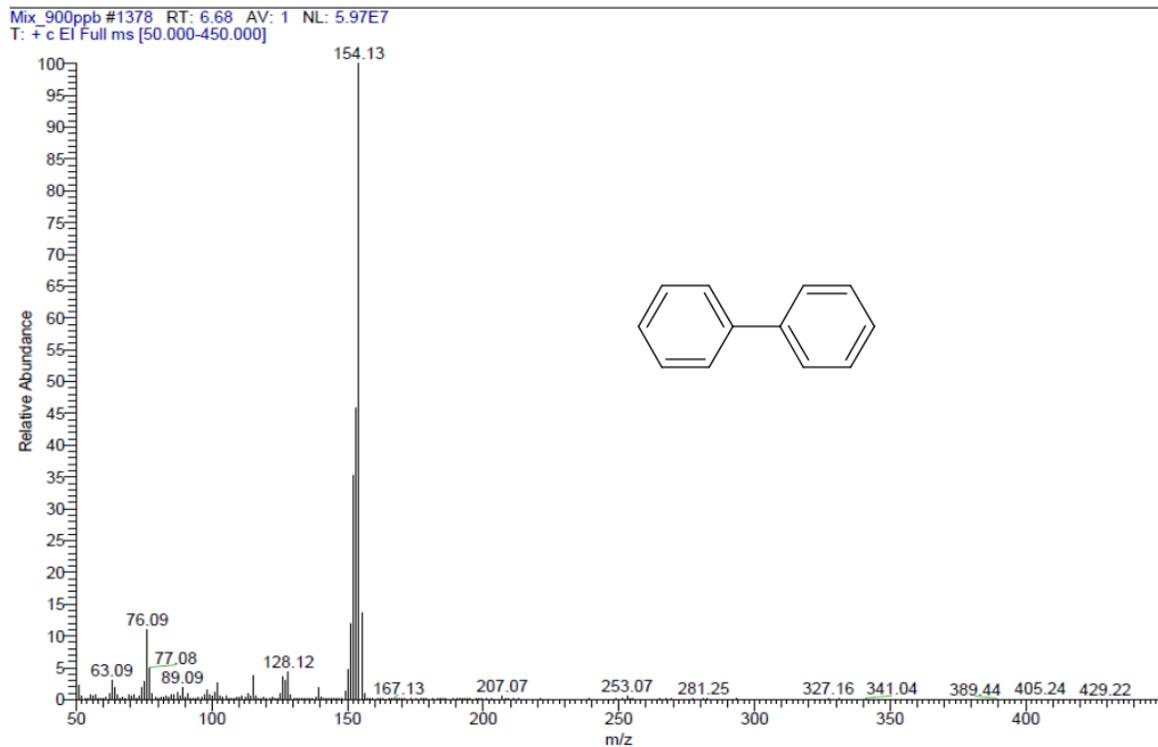


Figura 6 Espectro de masas del bifenilo producto de la derivatización

Mix_900ppb #1448 RT: 6.92 AV: 1 NL: 1.32E8
T: + c EI Full ms [50.000-450.000]

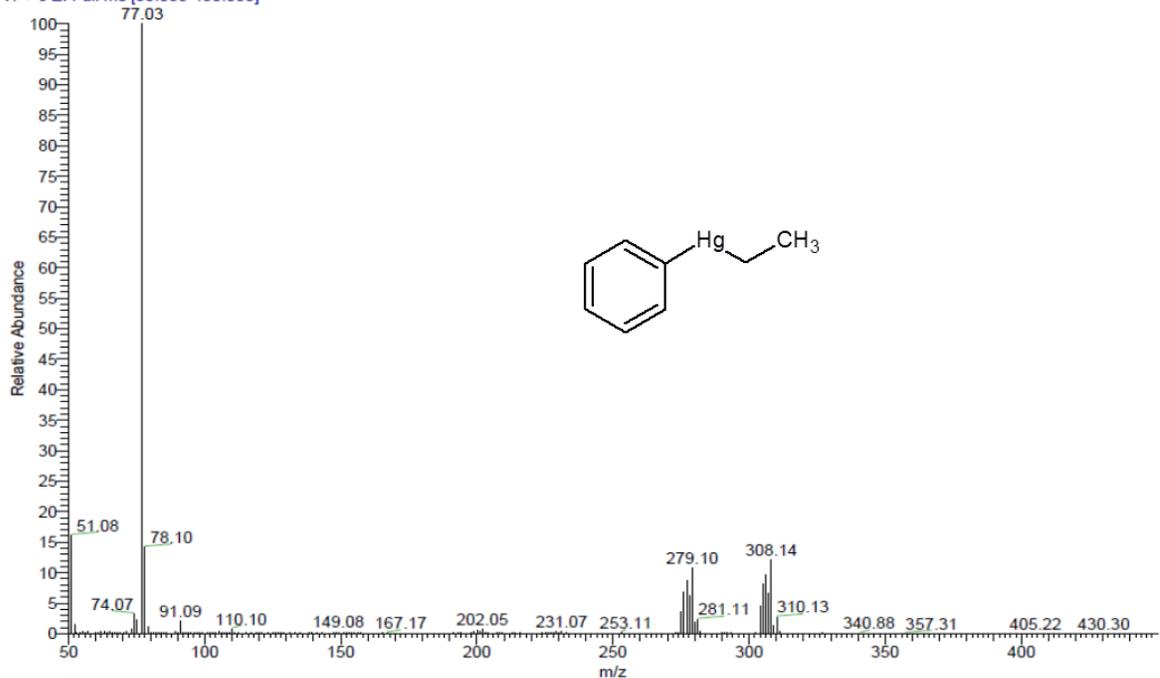


Figura 7 Espectro de masas del etilfenilmercurio

Mix_900ppb #2100 RT: 9.14 AV: 1 NL: 1.26E8
T: + c EI Full ms [50.000-450.000]

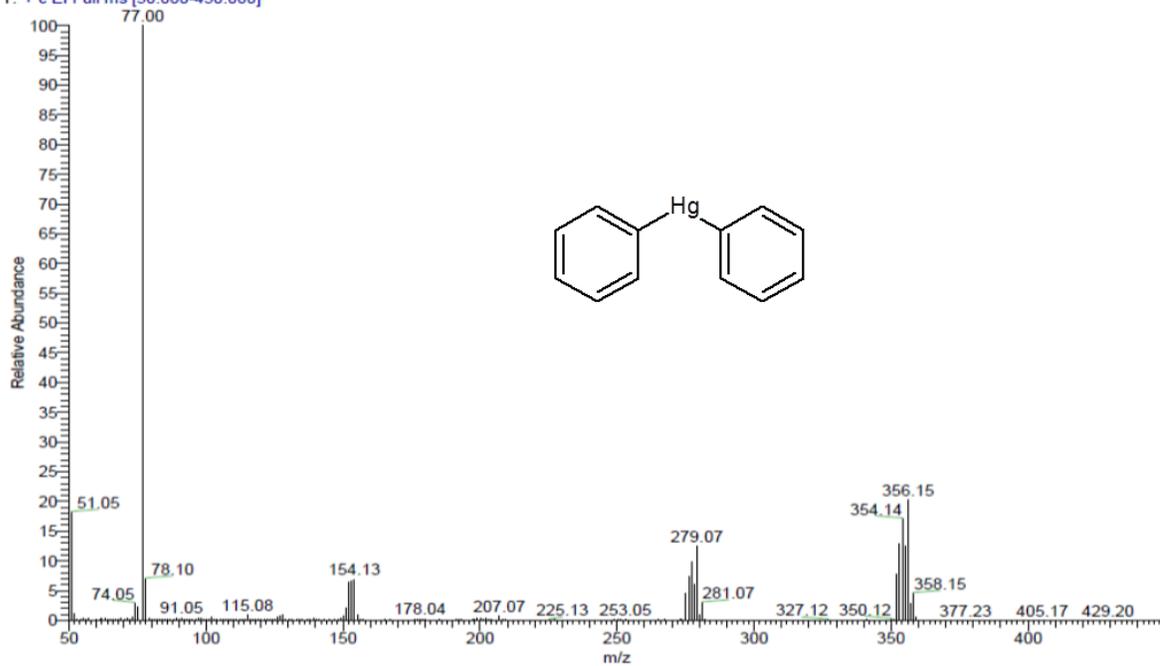


Figura 8 Espectro de masas del difenilmercurio

Tabla 3 Iones de identificación y confirmación de compuestos de interés

Método	Compuesto	NaBEt ₄		NaBPh ₄	
		Q1	q2-q3	Q1	q2-q3
SPME y LLE	MeHg	217	214 - 246	294	292 – 279
	EtHg	260	231 - 258	308	306 – 279
	PhHg	279	308 - 277	356	354 - 279

SPME: microextracción en fase sólida, LLE: extracción líquido líquido, MeHg: Metilmercurio, EtHg: Etilmercurio, PhHg: Fenilmercurio, NaBEt₄: Tetraetilborato de sodio, NaBPh₄: Tetrafenilborato de sodio, Q1: ion precursor molecular, q2-q3: iones fragmento

Tabla 4 Fragmentación de los compuestos derivatizados

MeHgPh		DiPhenyl		EtHgPh		PhHgPh	
Ion	Fragmento	Ion	Fragmento	Ion	Fragmento	Ion	Fragmento
77	C ₆ H ₅ ⁺	77	C ₆ H ₅ ⁺	77	C ₆ H ₅ ⁺	77	C ₆ H ₅ ⁺
217	CH ₃ Hg ⁺			279	C ₆ H ₅ Hg ⁺		
279	C ₆ H ₅ Hg ⁺	154	C ₆ H ₅ C ₆ H ₅ ⁺	308	C ₆ H ₅ Hg ⁺ CH ₂ CH ₃	279	C ₆ H ₅ Hg ⁺
294	C ₆ H ₅ Hg ⁺ CH ₃					356	C ₆ H ₅ Hg ⁺ C ₆ H ₅

Fragmento de los compuestos derivatizados MeHgPh: fenilmetilmercurio, DiPhenyl: Fenilfenilmercurio, EtHgPh: Feniletilmercurio, PhHgPh: Fenilfenilmercurio

Las superficies de respuesta se muestran en las figuras 9, 10 y 11 se presentan las condiciones optimizadas. La figura 9 muestra la optimización del MeHg, en donde se observa que el pH del tratamiento puede variar entre 3.6 y 4.3 y la concentración de derivatizante entre 1.9 a 2.2%, sin alterar la recuperación. En la figura 10, la optimización del EtHg se mantiene cercana al rango de pH del MeHg pero se disminuye la concentración de derivatizante entre un 2.0 a 2.2%; por su parte en el figura 11 se concluye que el PhHg presenta un comportamiento semejante al MeHg y se define un pH de 4.0 ± 0.2 y una concentración del agente derivatizante de 2.0% para su optimización. Para efectos de comparación se mantuvo en 0.8 mL el volumen del agente derivatizante con el fin de tener la

respuesta en condiciones críticas ya que esta variable resulto ser la de mayor influencia en la extracción.

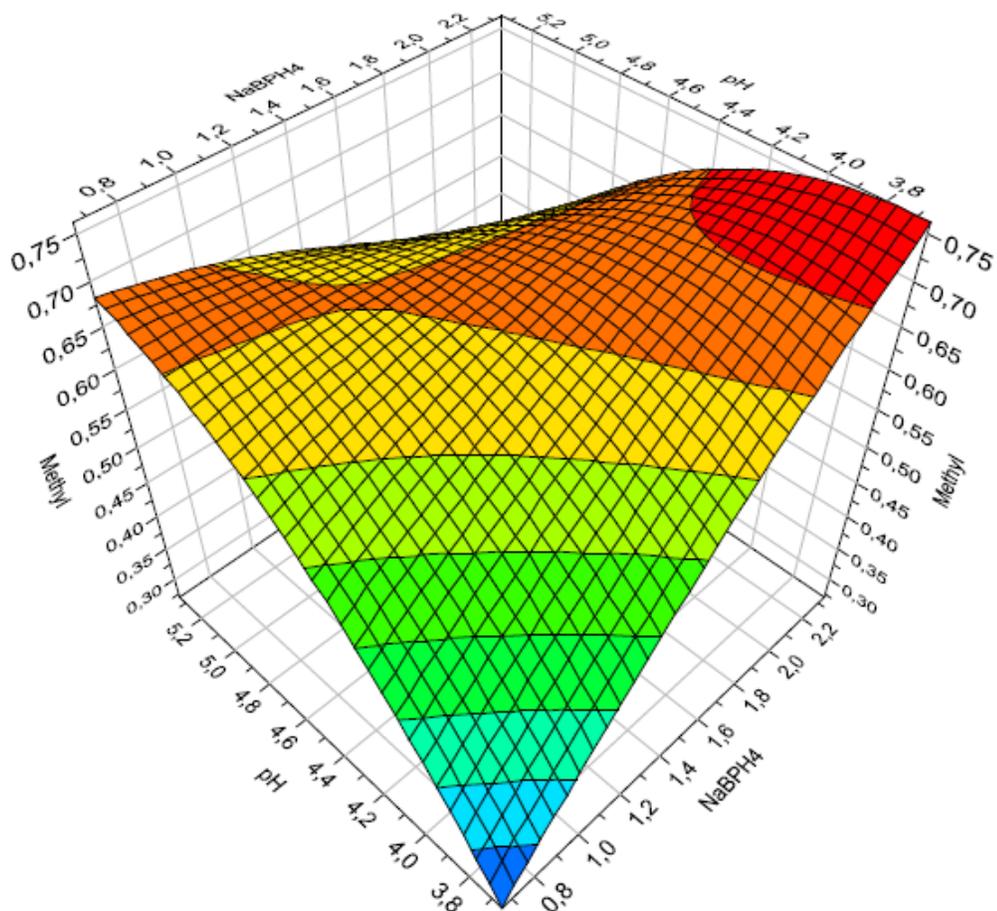


Figura 9 Superficie de respuesta de la optimización del methylmercury

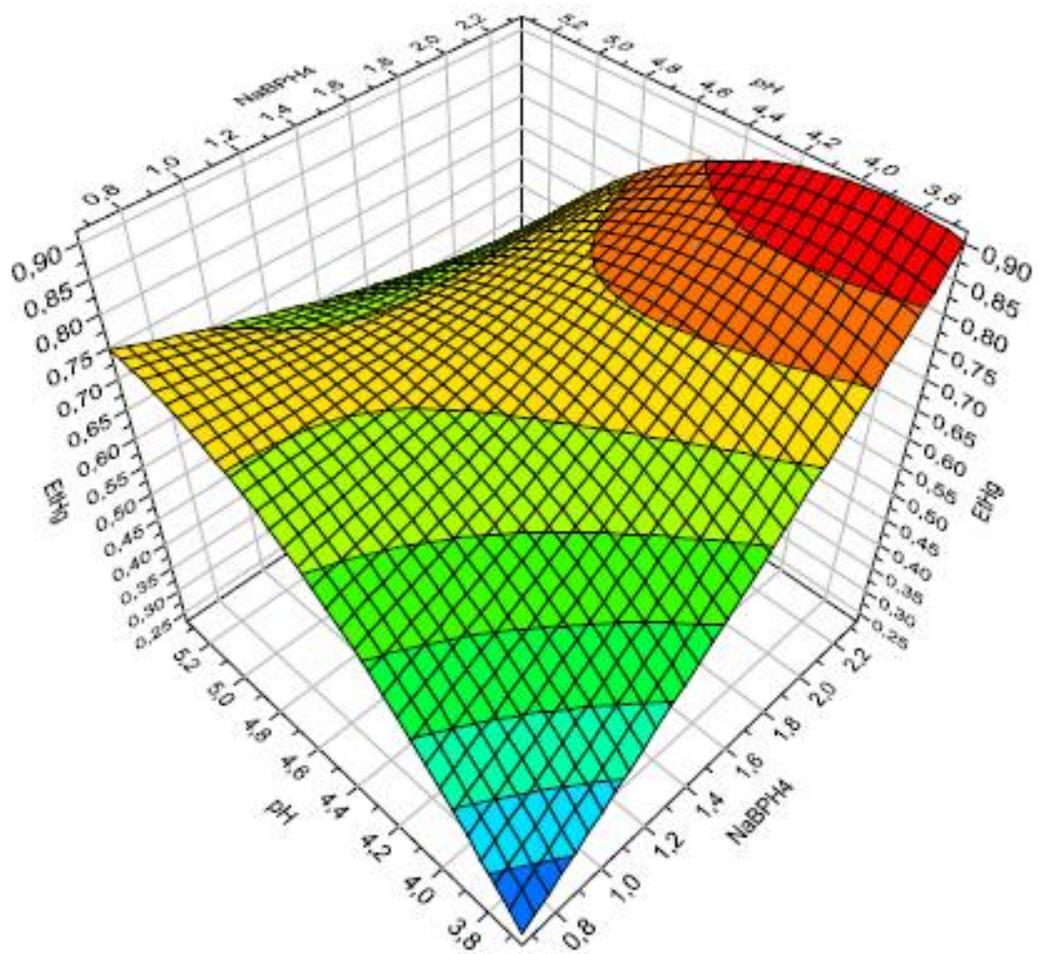


Figura 10 Superficie de respuesta de la optimización del etilmercurio

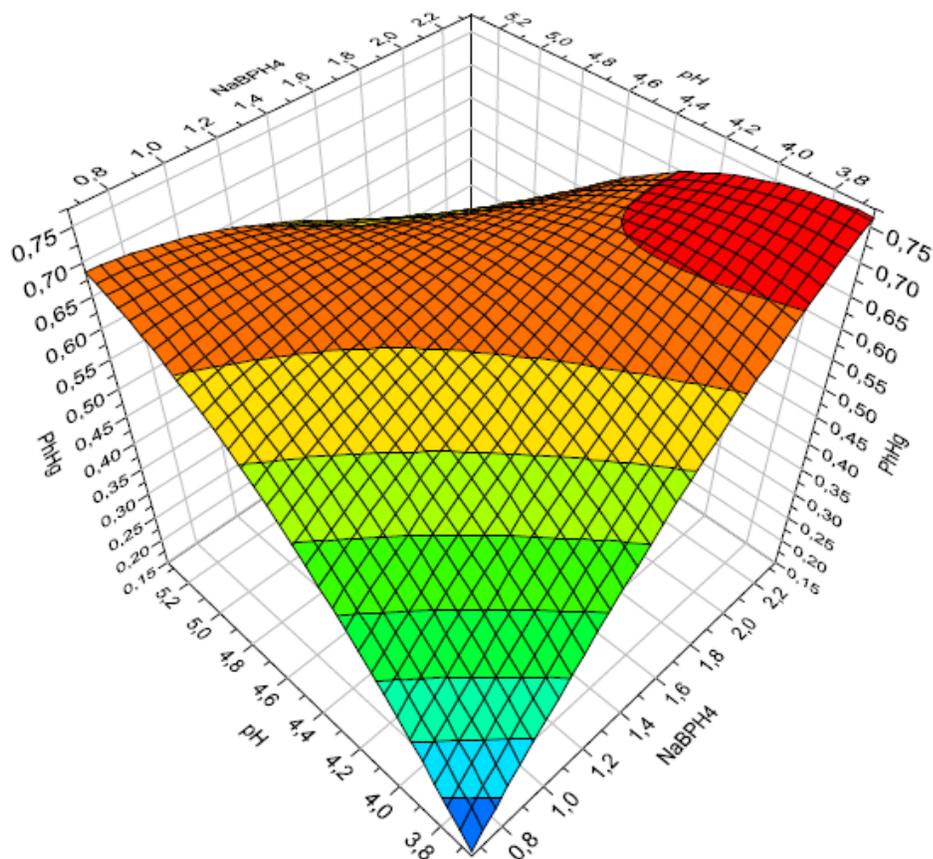


Figura 11 Superficie de respuesta de la optimización del fenilmercurio

La anterior metodología permitió (1) verificar el efecto de las variables que intervienen en la etapa de extracción sobre la respuesta analítica y (2) determinar los valores óptimos de los factores que dan respuesta analítica máxima. Se estableció que las variables que afectan directamente el método son el pH de la solución, y la concentración y el volumen del derivatizante. El tiempo, la temperatura, la agitación en la digestión y en la extracción y el volumen del KOH/MeOH, se evaluaron previamente y se mantuvieron constantes durante la optimización. El método alcanzó un tiempo total de análisis de 15 min. La tabla 5 muestra las condiciones de la optimización del método y los resultados al aplicar el método al MRC.

Tabla 5 Condiciones optimizadas del método LLE

Digestión		Extracción		
Parámetro	Resultado	Parámetro	Resultado	
Vol KOH/metanol	3ml	pH	4.0 (Rango 3.8 – 4.2)	
Tiempo (Ciclos)	2 h(6 ciclos 15min)	Vol y [] NaBPh ₄	0.8ml - 2.0%	
Temperatura	30°C	Agitación	3min	
MRC	Determinado (µgKg ⁻¹)	%R	CV (%)	Certificado (µg Kg ⁻¹)
SRM 2976	25.99 ± 0,49	92,51%	7,13	28,09 ± 0,31

Discusión

Estudio de los Métodos

El análisis de los compuestos EtHg y PhHg, se realizó con el objetivo de evaluar su comportamiento cromatográfico y establecer su viabilidad como posible estándar interno para validar el método de cuantificación y aplicarlo en procedimientos de rutina. Rodil et al 2002 (Yang, Colombini, Maxwell, Mester, & Sturgeon, 2003; Yang, Mester, & Sturgeon, 2003) usaron el EtHg para cuantificar MeHg y el Hg²⁺ en muestras biológicas, (R. Rodil et al., 2002). El PhHg permite la identificación y cuantificación de MeHg y EtHg como analitos en muestras biológicas, siempre y cuando se derivatice con NaBPh₄. Por lo anterior, se determinó el uso del PhHg como estándar interno del método desarrollado.

En ambas metodologías la digestión del tejido se desarrolló con KOH/MeOH, porque en comparación con las digestiones acidas o con otras bases, esta mezcla ha permitido mejores recuperaciones, menor tiempo de digestión y no formación de precipitados; los cuales son atribuidos a la derivatización con NaBPh₄ y a la digestión con hidróxido de tetrametilamonio, (Tutschku, Schantz, & Wise, 2002). En la LLE se han utilizado hexano, heptano e isooctano, pero se seleccionó el hexano porque a diferencia del heptano disminuye la formación de emulsiones

durante la agitación y por su parte el iso-octano posee una menor capacidad de extracción debido a la presencia de ramificación en su estructura (Tutschku et al., 2002). Antes del análisis cromatográfico la limpieza del extracto se garantizó mediante la precipitaciones de fracciones lipídicas extraídas a -20 durante 2 h, este procedimiento demostró la reducción del efecto matriz al evaluar la recuperación con el material de referencia con y sin el proceso.

Se ha discutido que el efecto matriz en el análisis de las especies de Hg se produce por interacción con la cisteína de las proteínas, para evitarlo se adicionó una solución de Cu^{2+} para generar competencia con el Hg y evitar su fijación a grupos sulfhídricos, tanto en la SPME como para la LLE. La temperatura en los métodos siempre se mantuvo en 30°C para evitar degradación, pérdida de los compuestos por volatilidad y acelerar la digestión de la muestra; adicionalmente, en la SPME un aumento en la temperatura producía condensados en la fibra, dificultando el análisis por GC-MS. En trabajos previos se ha demostrado que la agitación es determinante en el análisis por ambas metodologías de extracción, debido a que facilita el punto de equilibrio entre el tiempo y la vigorosidad para favorecer siempre la disponibilidad de las especies en el espacio de cabeza o en el agente extractante. En este estudio se logró una reducción en el tiempo de agitación por el uso de sistemas mecánicos.

Comparación entre SPME y LLE

Ambas técnicas permitieron evidenciar diferencias significativas en la recuperación; aunque muchas publicaciones consideran la SPME como una técnica más limpia y que emplea menor cantidad de solvente respecto a la LLE, su respuesta cromatográfica, el tiempo de derivatización, y la adsorción y desorción en la fibra, la hace menos practica que la LLE. A su vez, la repetibilidad y la reproducibilidad del método evaluadas entre días y con diferentes analistas mostraron menor desviación entre los resultados. Finalmente, el tratamiento con

SPME presentó diferencias en las señales y sus respectivos Tr entre una inyección a otra, evidenciando la dependencia de la respuesta por el analista.

Comparación entre NaBEt₄ y NaBPh₄

La elección del agente derivatizante se basó en las señales de los compuestos, la resolución y la selectividad mostrada en los cromatogramas y el comportamiento químico permitieron descartar el NaBEt₄. Rodil et al 2005 (M. d. R. Rodil, 2005) reportaron que el NaBEt₄ es menos estable, más higroscópico y más costoso. Por su parte el NaBPh₄ resuelve los problemas de pasivación en la columna presentados con el uso del NaBEt₄. Se concluyó que el NaBPh₄ no permite analizar el Hg²⁺ ya que no permite la diferenciación entre los compuestos PhHg y Hg; pero, posee la ventaja de permitir el análisis de los tres organomercuriales del estudio.

La formación del difenilo como especie de derivatización fue reportada por Cail y colaboradores (Y. Cai, Monsalud, & Furton, 2000b) y es un indicador de que el agente derivatizante se encuentra en exceso, lo cual garantiza derivatizar todas las especies de interés.

Identificación y cuantificación

La confirmación de los compuestos se realizó a través de los espectros de masas; los iones de identificación y de cuantificación se eligieron en base de la probabilidad de ocurrencia con respecto a otros compuestos presentes en la matriz (proteínas, grasas) y en el solvente. A pesar de que el ion 77 presenta mayor intensidad con respecto a los otros, no se tiene en cuenta a que puede ser una contribución debido al hexano. Se eligieron los otros iones de mayor intensidad y en escala de área; se tuvo en cuenta la respuesta de mayor a menor, asignando el ion de cuantificación Q primero, seguido de los iones de confirmación q2 y q3. Estos iones presentan diferencia de 2 unidades m/z, debido a la composición isotópica del Hg (Clémens et al., 2012).

Optimización

En un estudio previo se optimizó el proceso de digestión de las muestras con base en el estudio realizado por Lu Yang, et al (Yang, Mester, et al., 2003), con una reducción del volumen de agente digestor de 20 a 3.0mL, con resultados comparables; de igual forma se evaluó el tiempo, la temperatura y la operatividad de la digestión, evidenciando que el uso de ciclos cortos de ultrasonido y reposo entre ellos garantiza la digestión del tejido sin presentar pérdidas por degradación de las especies químicas. Igualmente, se evidenció el efecto de la temperatura sobre el proceso, permitiendo hasta 40°C sin alterar la estabilidad térmica de los compuestos y disminuyendo el tiempo de tratamiento.

Para mejorar eficiencia de extracción por la metodología de RSM se tuvo en cuenta varios parámetros como el pH en la derivatización, la concentración y volumen del agente derivatizante, el tiempo y la temperatura de extracción, el volumen de disolvente y la velocidad de agitación. El pH es importante para la formación del complejo de derivatización y para la extracción. El efecto del volumen y la concentración del agente derivatizante sobre la eficiencia de la extracción mostraron relación directamente proporcional con la intensidad de la señal de los compuestos de interés: Dada la posible acomplejación competitiva con otros iones coexistentes, se aumentó la disponibilidad del agente derivatizante para mejorar la transferencia de masa en equilibrio. Para la optimización se mantuvo el volumen del agente en su menor concentración de estudio con el propósito de estudiar el caso más crítico para obtener mejores resultados.

Para simplificar el análisis de los resultados obtenidos, se realizó una ANOVA. Se estudiaron los índices de los valores F y P. Cuando los valores p fueron menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo en el nivel de confianza del 95%, por lo que se concluyó que el pH del medio, la concentración y volumen del agente derivatizante fueron significativos para todos los compuestos. Los valores F miden la contribución de cada factor en la variación de la respuesta. Como se puede observar en los gráficos de superficie de

respuesta, el factor que más afecta a la extracción en el tratamiento de LLE de los compuestos orgánicos del Hg es la concentración del agente derivatizante. Por su parte, en el sistema LLE, la velocidad de agitación afecta la dinámica de extracción por su efecto sobre la transferencia de masa de los analitos, en todos los procesos de extracción se aplicó agitación y no se incluyó como variable de estudio, porque se tomó de referencia estudios previos (Kuballa et al., 2009). El efecto de diferentes volúmenes de hexano mostró que las eficiencias de extracción fueron mejores cuando se utilizan volúmenes bajos con una adecuada agitación.

Conclusiones

La optimización de los factores asociados al análisis de MeHg, permitió obtener un método adecuado, el cual empleo volúmenes pequeños de reactivos y es amigable con el ambiente, debido a la reducción de los residuos generados durante el tratamiento de la muestra. Entre las ventajas alcanzadas:

- La combinación de la LLE con la derivatización con NaBPh₄ reduce el tiempo de análisis, la manipulación de la muestra y mejora el comportamiento cromatográfico del ensayo.
- Al optimizar bajo un enfoque de diseño experimental se mejoraron las condiciones operativas para la extracción de las especies orgánicas de Hg de interés; de igual se obtuvo información acerca del efecto de cada variable sobre la recuperación empleando un número reducido de experimentos.
- La RSM tiene varias ventajas en comparación con los métodos clásicos de optimización. En primer lugar, RSM ofrece gran cantidad de información a partir de un número pequeño de experimentos. Los métodos clásicos demandan mucho tiempo y necesitan un número mayor de experimentos

para explicar el comportamiento del método. En segundo lugar, en la RSM es posible observar el efecto de la interacción de los parámetros independientes de la respuesta, especialmente en los procesos de derivatización. La figuras 3d del modelo aclara fácilmente estos efectos para la combinación binaria de los parámetros independientes.

- Disminuir el uso de solventes orgánicos fue objeto de estudio en el tratamiento de muestras para hacer uso mesurado de éstos por su alto valor y toxicidad, disminución en la producción de desechos y obtener resultados comparables con los obtenidos a través de métodos tradicionales de análisis, favoreciendo la aceleración en procesos de extracción (Tobiszewski, Mechlińska, Zygmunt, & Namieśnik, 2009). Por lo anterior, el método desarrollado y optimizado es más económico, menos nocivo para el medio ambiente y se ajustan al marco de la "química analítica verde"

Referencias bibliográficas

- Cai, Y., & Bayona, J. M. (1995). Determination of methylmercury in fish and river water samples using in situ sodium tetraethylborate derivatization following by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 696(1), 113-122. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)01177-G](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(94)01177-G)
- Cai, Y., Monsalud, S., & Furton, K. G. (2000a). Determination of methyl- and ethylmercury compounds using gas chromatography atomic fluorescence spectrometry following aqueous derivatization with sodium tetraphenylborate. *Chromatographia*, 52(1-2), 82-86.
- Cai, Y., Monsalud, S., & Furton, K. G. (2000b). Determination of methyl-and ethylmercury compounds using gas chromatography atomic fluorescence spectrometry following aqueous derivatization with sodium tetraphenylborate. *Chromatographia*, 52(1-2), 82-86. doi: 10.1007/bf02490797
- Centineo, G., Blanco González, E., & Sanz-Medel, A. (2004). Multielemental speciation analysis of organometallic compounds of mercury, lead and tin in natural water samples by headspace-solid phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1034(1–2), 191-197. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.01.051>
- Centineo, G., González, E. B., García Alonso, J. I., & Sanz-Medel, A. (2006). Isotope dilution SPME GC/MS for the determination of methylmercury in tuna fish samples. *Journal of Mass Spectrometry*, 41(1), 77-83. doi: 10.1002/jms.960
- Clémens, S., Monperrus, M., Donard, O. F. X., Amouroux, D., & Guérin, T. (2012). Mercury speciation in seafood using isotope dilution analysis: A review. *Talanta*, 89(0), 12-20. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.064>
- Costa-Fernandez, J. M., Lunzer, F., Pereiro-Garcia, R., Sanz-Medel, A., & Bordel-Garcia, N. (1995). Direct coupling of high-performance liquid chromatography to microwave-induced plasma atomic emission spectrometry via volatile-species generation and its application to mercury

- and arsenic speciation. [10.1039/JA9951001019]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 10(11), 1019-1025. doi: 10.1039/ja9951001019
- Chen, S.-S., Chou, S.-S., & Hwang, D.-F. (2004). Determination of methylmercury in fish using focused microwave digestion following by Cu²⁺ addition, sodium tetrapropylborate derivatization, n-heptane extraction, and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1024(1–2), 209-215. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.015>
- Díez, S., & Bayona, J. M. (2008). Determination of Hg and organomercury species following SPME: A review. *Talanta*, 77(1), 21-27. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.06.027>
- Gaona, X., & Valiente, M. (2003). Stability study on a Westöö-based methodology to determine organomercury compounds in polluted soil samples. *Analytica Chimica Acta*, 480(2), 219-230.
- Hempel, M., Chau, Y. K., Dutka, B. J., McInnis, R., Kwan, K. K., & Liu, D. (1995). Toxicity of organomercury compounds: Bioassay results as a basis for risk assessment. *The Analyst*, 120(3), 721-724.
- Hipler, J., Hoppe, H. W., Mosel, F., Rettenmeier, A. W., & Hirner, A. V. (2009). Comparative determination of methyl mercury in whole blood samples using GC–ICP-MS and GC–MS techniques. *Journal of Chromatography B*, 877(24), 2465-2470. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.004>
- Jiang, H., Hu, B., Chen, B., & Zu, W. (2008). Hollow fiber liquid phase microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of methylmercury in human hair and sludge samples. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63(7), 770-776. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2008.04.011>
- Krull, I. S., Bushee, D. S., Schleicher, R. G., & Smith, S. B. (1986). Determination of inorganic and organomercury compounds by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma emission spectrometry with cold vapour generation. [10.1039/AN9861100345]. *Analyst*, 111(3), 345-349. doi: 10.1039/an9861100345

- Kuballa, T., Leonhardt, E., Schoeberl, K., & Lachenmeier, D. (2009). Determination of methylmercury in fish and seafood using optimized digestion and derivatization followed by gas chromatography with atomic emission detection. *European Food Research and Technology*, 228(3), 425-431. doi: 10.1007/s00217-008-0949-0
- Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P., & Horvat, M. (2005). Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 24(5), 383-393.
- Logar, M., Horvat, M., Akagi, H., & Pihlar, B. (2002). Simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury compounds in natural waters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374(6), 1015-1021. doi: 10.1007/s00216-002-1501-x
- Mao, Y., Liu, G., Meichel, G., Cai, Y., & Jiang, G. (2008). Simultaneous speciation of monomethylmercury and monoethylmercury by aqueous phenylation and purge-and-trap preconcentration followed by atomic spectrometry detection. *Analytical Chemistry*, 80(18), 7163-7168.
- Menéndez García, A., Fernández Sánchez, M. L., Sánchez Uría, J. E., & Sanz Medel, A. (1996). Speciation of mercury by continuous flow liquid-liquid extraction and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry detection. *Microchimica Acta*, 122(3-4), 157-166. doi: 10.1007/bf01245778
- Mondal, B. C., Das, D., & Das, A. K. (2001). Application of a new resin functionalised with 6-mercaptopurine for mercury and silver determination in environmental samples by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 450(1-2), 223-230. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01385-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01385-X)
- Ong, K., Lim, L., Ghanthimathi, S., Ibrahim, N., & Nasir, Z. (2014). Speciation: Determination of Methylmercury in Fish Samples with HPLC-ICP-MS. In A. Z. Aris, T. H. Tengku Ismail, R. Harun, A. M. Abdullah & M. Y. Ishak (Eds.), *From Sources to Solution* (pp. 375-378): Springer Singapore.
- Pena-Pereira, F., Lavilla, I., & Bendicho, C. (2009). Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic

- ultratrace analysis and speciation: A review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 64(1), 1-15. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2008.10.042>
- Puk, R., & Weber, J. H. (1994). Determination of mercury(II), monomethylmercury cation, dimethylmercury and diethylmercury by hydride generation, cryogenic trapping and atomic absorption spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 292(1-2), 175-183.
- Risticovic, S., Vuckovic, D., & Pawliszyn, J. (2011). Application of Solid-Phase Microextraction in Determination of Organic Compounds from Complex Environmental Matrices *Biophysico-Chemical Processes of Anthropogenic Organic Compounds in Environmental Systems* (pp. 369-411): John Wiley & Sons, Inc.
- Rodil, M. d. R. (2005). *Desarrollo de nuevas estrategias de preparación de muestra aplicadas al control de contaminantes medioambientales a niveles traza*. Doctor en Química, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela. Retrieved from <http://dspace.usc.es/bitstream/10347/9695/1/b19460971.pdf>
- Rodil, R., Carro, A. M., Lorenzo, R. A., Abuín, M., & Cela, R. (2002). Methylmercury determination in biological samples by derivatization, solid-phase microextraction and gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 963(1-2), 313-323. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00644-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00644-1)
- Sánchez, D. M., Martín, R., Morante, R., Marín, J., & Munuera, M. L. (2000). Preconcentration speciation method for mercury compounds in water samples using solid phase extraction followed by reversed phase high performance liquid chromatography. *Talanta*, 52(4), 671-679.
- Tobiszewski, M., Mechlińska, A., Zygmunt, B., & Namieśnik, J. (2009). Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(8), 943-951. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2009.06.001>

- Tutschku, S., Schantz, M. M., & Wise, S. A. (2002). Determination of Methylmercury and Butyltin Compounds in Marine Biota and Sediments Using Microwave-Assisted Acid Extraction, Solid-Phase Microextraction, and Gas Chromatography with Microwave-Induced Plasma Atomic Emission Spectrometric Detection. *Analytical Chemistry*, 74(18), 4694-4701. doi: 10.1021/ac020128u
- Välimäki, I., & Perämäki, P. (2001). Determination of Mercury Species by Capillary Column GC-QTAAS with Purge and Trap Preconcentration Technique. *Microchimica Acta*, 137(3-4), 191-201. doi: 10.1007/s006040170011
- Yan, X.-P., Yin, X.-B., Jiang, D.-Q., & He, X.-W. (2003). Speciation of Mercury by Hydrostatically Modified Electroosmotic Flow Capillary Electrophoresis Coupled with Volatile Species Generation Atomic Fluorescence Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75(7), 1726-1732. doi: 10.1021/ac026272x
- Yang, L., Colombini, V., Maxwell, P., Mester, Z., & Sturgeon, R. E. (2003). Application of isotope dilution to the determination of methylmercury in fish tissue by solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1011(1–2), 135-142. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01122-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01122-1)
- Yang, L., Mester, Z., & Sturgeon, R. E. (2003). Determination of methylmercury in fish tissues by isotope dilution SPME-GC-ICP-MS. [10.1039/B301299A]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18(5), 431-436. doi: 10.1039/b301299a

Capítulo 4
Determinación de especies de
mercurio en tejido de pescado
mediante cromatografía de gases
acoplado a espectrometría de
masas, validación del método de
acuerdo con la Directiva
2002/657/CE de la Comunidad
Europea

Introducción

El desarrollo y validación de un método para la identificación y cuantificación de especies organometálicas presenta muchos desafíos. La cuantificación de Metilmercurio (MeHg) es de gran importancia por ser una especie más tóxica que el mercurio (Hg) inorgánico, ya que estas especies se bioacumulan en la cadena alimentaria y constituyen hasta el 90% de la concentración total de mercurio en el tejido de pescado (Yin, Wu, Li, & Yan, 2012). Por lo anterior, la sensibilidad y la selectividad en el análisis de la especiación en bajas concentraciones de compuestos organomercuriales lleva la utilización de técnicas instrumentales sensibles para separación como la cromatografía de gases (GC) (Carrasco, Díez, & Bayona, 2009), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Ong et al., 2014) y la electroforesis capilar (CE) (Bai & Fan, 2010), entre otras; acopladas a sistemas de detección como espectrometría de absorción (AAS) (Serafimovski, Karadjova, Stafilov, & Cvetković, 2008), espectrometría de fluorescencia atómica (AFS) (Abrankó, Kmellár, & Fodor, 2007), inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) (Y. Li & Hu, 2007) y Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Chung & Chan, 2011), cada con ventajas y desventajas (Díez & Bayona, 2008; Hippler et al., 2009) para su aplicación. A pesar de los alcances en selectividad y sensibilidad para el análisis metilmercurio (MeHg) y etilmercurio (EtHg), el tratamiento de la muestra es determinante para la especiación del mercurio (Hg) (Carrasco et al., 2007; L. H. Reyes, Rahman, & Kingston, 2009) y debe ser robusta, rápida, y reproducible para garantizar la estabilidad de los compuestos (Clémens et al., 2012; Yin et al., 2012).

La validación del método, la trazabilidad metrológica y la incertidumbre de la medición son determinantes para garantizar la calidad del resultado y la metrología; adicionalmente, son componentes determinantes para presentar resultados precisos, comparables en el tiempo y reproducibles experimentalmente. Entre las metodologías de validación de procedimientos analíticos se destacan los

referidos en la norma ISO 17025 (requisitos generales para la competencia de laboratorios de ensayo y calibración) (ICONTEC., 2003), la guía Eurachem (aptitud para el uso de métodos de análisis) (Ellison & Williams, 2012) y la directiva de la Comisión Europea sobre "la validación del método para contaminantes" (Antignac, Le Bizec, Monteau, & Andre, 2003); sin embargo, hay pocos estudios de conformidad con las directrices anteriores sobre la validación para la determinación de MeHg en matrices alimentarias (L. Reyes et al., 2008; Sannac, Fisicaro, Labarraque, Pannier, & Potin-Gautier, 2009).

El objetivo de este estudio fue la validación de una metodología analítica rápida, robusta y sensible para la determinación de MeHg y EtHg en tejido de pescado y mariscos. El procedimiento empleado se desarrolló mediante extracción con hidróxido de potasio metanólico, derivatización por fenilación en fase acuosa, extracción líquido líquido con hexano y determinación por cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas. La validación se siguió de acuerdo con modelos alternativos de la Directiva CD 2002/657/CE (Antignac et al., 2003) y los parámetros desarrollados fueron: selectividad, linealidad y rango, límite de decisión ($CC\alpha$), capacidad de detección ($CC\beta$), repetibilidad, reproducibilidad, recuperación y veracidad (con material de referencia certificado, CRM); adicionalmente, la metodología se aplicó a muestras comerciales para verificar la aptitud y robustez del método.

Materiales y métodos

Muestras. Se empleó trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) como blanco obtenidas de criadero de alta montaña, nueve marcas comerciales de atún (*Thunnus*) enlatado, tanto en agua como en aceite, seis tipos de mariscos comerciales (*Illex coindetii*, *Mytilus edulis*, *Ostrea columbiensis*, *Loligo vulgaris*, *Penaeus monodon*, *Melongena melongenay* surimi) y 2 tipos de pescado congelado (*Merluccius merluccius* y *Salmo salar*), todos se obtuvieron en

supermercados de la ciudad de Medellín–Colombia; previamente, se drenó el agua y el aceite de los atunes, los mariscos y a los pescados se les eliminó las partes no comestibles. Cada muestra fue procesada para reducir su tamaño hasta obtener una pasta uniforme y se almacenó en tubos cónicos a -4°C hasta el análisis.

Reactivos. Se usaron ácido clorhídrico (HCl) 37 %, hexano (C_6H_{14}) grado residuo y ácido acético glacial (CH_3COOH) todos de J.T. Baker. Acetato de sodio trihidratado ($\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) de Carlo Erba. Ácido Nítrico (HNO_3) 65% suprapure y grado reactivo, hidróxido de Potasio (KOH), metanol (MeOH) grado residuo, acetato de cobre (II) monohidratado ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2\cdot\text{H}_2\text{O}$)–(AcCu) todos de Merck. Tetrafenilborato de sodio ($\text{Na}[\text{B}(\text{C}_6\text{H}_5)_4]$)–(TPB) de Sigma Aldrich. Cloruro de Metilmercurio (CH_3HgCl) 96.0%, cloruro de Etilmercurio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{HgCl}$) 95.5% y cloruro de fenilmercurio ($\text{C}_6\text{H}_5\text{HgCl}$) 93.8% de Dr. Ehrenstorfer, como estándares. Materiales de referencia certificados (CRM): SRM 2976-Mussel Tissue (Trace Elements & Methylmercury) Freeze-dried del National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, EE.UU) y NMIJ CRM 7402-a: Trace Elements, Arsenobetaine and Methylmercury in Cod Fish Tissue del National Metrology Institute of Japan (NMIJ).

Extracción y Determinación

Soluciones. Se prepararon las soluciones: TPB al 2%, AcCu a 40mM, buffer de ácido acético-acetato de sodio 200mM a pH 4.0, en agua desionizada. Solución metanólica de KOH 25%. Las soluciones estándar de MeHg y EtHg se prepararon en metanol a concentraciones de 20.0, 50.0, 80.0, 150.0, 500.0 y 900.0 $\mu\text{g/L}$; además, se prepararon soluciones de 40.0, 60.0 y 80.0 $\mu\text{g/L}$ para dopar las muestra.

Método de extracción. Se pesó entre 0.4 a 0.6 mg en un tubo de centrifuga de 15 ml, se adicionó 3.0 ml de solución de KOH metalonico y se agitó por 2min, posteriormente se llevaron al baño ultrasonido a una temperatura de 30°C y 6 ciclos de 15 min, entre ciclo y ciclo se dejó en reposo 3 minutos. Se acondiciono el pH con ácido acético hasta 4.0 y se adiciono 3.0 ml de buffer acetato. Se, adiciono 1.0 ml de solución de AcCu y 0.8 ml del agente derivatizante, se tapó el tubo y llevó a agitación por 3 min a temperatura ambiente. La extracción se realizó mediante la adición de 2.0 ml hexano, se agito durante 2 min, se centrifugó durante 5 min a una fuerza centrífuga relativa (RCF) de 1575 y luego se realizó freezer out para la precipitación de lípidos, finalmente se tomó 1.5 ml del sobrenadante y se llevó al cromatógrafo para el análisis. Este procedimiento se efectuó tanto para el material de referencia certificado, como para las muestras blanco y las diferentes muestras de pescados y mariscos.

Método de detección. Se empleó un Cromatografo de gases Trace 1300 acoplado a espectrometría de masas triple cuadrupolo TSQ 8000 de ThermoFisher, se usó estándar externo por curva de calibración para la cuantificación. Se usó un inyector Split/splitless en el modo splitless a 270°C, un flujo de Split 60mL min⁻¹, tiempo del Split 3 min, volumen de inyección 1µL, Purge flow: 5.0 mL min⁻¹, Liner cónico con lana de vidrio desactivado de Agilent technologies El gas portador es helio a un flujo de 1.0 mL min⁻¹. El programa temperatura del horno inició a 80°C por 1 minuto, posterior se subió a 100°C a 15°C min⁻¹ y finalmente se llevó a 240°C a 40°C min⁻¹ por 4 minutos. Se utilizó una columna analítica TG-5MS (5% fenil, 95% metil polisiloxano) de 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm espesor de película. Las condiciones del detector: ionización positiva, temperatura de línea de transferencia: 270°C, temperatura de la fuente de iones: 220°C, rango de m/z: 50–450 en el modo scan, los iones de seguimiento: m/z 292, 294 y 279 para MeHg, fueron monitoreados desde el minuto 6.00 a 6.80 y m/z 308, 306 y 279 para EtHg, estos iones se monitorearon entre los minutos 6.80 y 8.50.

Criterios de confirmación. Para considerar una muestra como positiva en el análisis de MeHg y EtHg, se calculó la relación entre los iones q_2/Q y q_3/Q , para lo cual se determinó la desviación estándar y el valor promedio de estas relaciones en las soluciones de calibración. Este resultado se empleó como criterio de calidad en el análisis de las muestras, estableciendo los valores de las relaciones que deben de cumplir con las tolerancias máximas permitidas establecidas por la Directriz de la Comisión 2002/657/EC.

Validación del método La validación se realizó de acuerdo con la directiva 2002/657/CE (Willetts y la Madera 2000; Feinberg 1996). El plan experimental de validación se muestra en la tabla 1 y se obtuvo a través de la validación de matriz completa “en casa” sobre un diseño factorial, que permitió la variación de condiciones y una rápida validación. Entre las condiciones se tuvo en cuenta la evaluación sistemática del pH, el orden de adición de soluciones, distintos analistas (robustez del método), temperaturas de extracción y la de digestión. Como confirmación se evaluó la capacidad de detección ($CC\beta$), el límite de decisión ($CC\alpha$), la veracidad, la recuperación, la precisión, la selectividad, la especificidad, la aplicabilidad y la robustez

Tabla 6 Plan experimental de validación

Día	Procedimiento	Parámetros evaluados	Numero de experimentos
1	10 blancos de matriz, 14 blanco matriz enriquecido cada punto de la curva	Linealidad y especificidad: en solvente y en matriz	24
2	10 blancos de matriz y 6 MCR de cada uno	Especificidad y veracidad en MRC	22
3	24 muestras enriquecidas Op1: 8 por cada nivel de MRPL (20, 30 y 40 $\mu\text{g/L}$)	Repetibilidad	24
4	48 muestras enriquecidas Op1 y Op2: 24 para cada analista como el día 3.	Repetibilidad y Reproducibilidad	48
5	24 muestras enriquecidas Op1: 8 por cada nivel de MRPL (20, 30 y 40 $\mu\text{g/L}$)	Repetibilidad:	24
Total experimentos			142

Nota: para un total de 5 curvas, evaluando así la linealidad y el rango de trabajo.

Op 1: Operador 1 y Op 2: operador 2

Resultados

Especificidad, linealidad y sensibilidad

La especificidad se evaluó analizando 20 blancos de muestra, para los cuales no se observaron respuestas que propician interferencias en el análisis a los tiempos de retención de los analitos. La tabla 2 muestra la linealidad y la sensibilidad del método, las cuales se evaluaron mediante curvas de calibración midiendo siete puntos cada uno por duplicado obre la matriz, se estableció el rango de trabajo y para cada procedimiento se determinó su ecuación matemática que precie el comportamiento lineal de la respuesta en el análisis, el ajuste y los márgenes de aceptabilidad de calidad se definieron como $R^2 \geq 0,975$ y residuales menores al 20%. El CC_α y CC_β se determinaron mediante la curva de calibración, siendo CC_α igual a 2.33 la desviación estándar del intercepto sobre la pendiente y el CC_β se calculó a través la concentración correspondiente al CC_α más 1.64 veces la desviación estándar de la reproducibilidad intralaboratorio; la base para su cálculo se muestran en las ecuaciones 1 y 2.

$$CC_\alpha = \frac{2,33 * S_a}{m} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$CC_\beta = [CC_\alpha] + 1,64 SD_{\text{intralaboratorio}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Tabla 7 linealidad y sensibilidad del método

Analito	Pendiente	Intercepto	r^2	Residuales	NR ^a (mg/kg)	CC_α ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	CC_β ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
MeHg	12440.8	172161	0.9988	$\leq 10\%$	0.5 ^b y 1.0 ^c	13,888	14,550
EtHg	6676.75	-93065.2	0.9982	$\leq 10\%$	NA	15,639	16,066

^a NR: nivel de referencia

Estos resultados son acordes a las necesidades analíticas del objetivo del método que incluyó la extracción alcalina, la fenilación en fase acuosa y la determinación por GC/MS. Si bien, estudios realizados por GC-ICP-MS han alcanzado niveles de sensibilidad más bajos que los reportados (Poperechna & Heumann, 2005) (Chung & Chan, 2011), se consideró que los resultados obtenidos son óptimos para el análisis en muestras de pescados y de mariscos, resaltando que la aplicación de la especiación orgánica de metales por GC-MS es una alternativa más rentable y accesible que la GC-ICP-MS. En cuanto a los valores de referencia máximos en alimentos, los valores obtenidos, se alcanza la determinación directa de los niveles de especies de Hg en pescado establecidos por el Codex como nivel de referencia (NR) para el metilmercurio es 1 mg kg⁻¹ para peces predadores y 0,5 mg kg⁻¹ para el resto del pescado (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2013).

Veracidad

La tabla 8 muestra los resultados de veracidad a través del análisis de seis muestras de cada uno de los CRM, se determinó la concentración, el valor medio de las concentraciones, la desviación estándar y el coeficiente de variación (CV%). El cálculo de la veracidad se efectuó a través de la ecuación 3, estableciendo la relación en porcentaje entre concentración media detectada por el factor de recuperación (FR) y la concentración del MRC reportado.

$$\text{Veracidad (\%)} = \frac{[\bar{X}_{MeHg \text{ o } EtHg}] * FR}{[CRM]} * 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Tabla 8 Análisis de veracidad a través de material de referencia certificado

MRC	Determinado (µg/Kg)	CV (%)	Certificado (µg/Kg)
SRM 2976	28.09 ± 0,49	7,13	28,09 ± 0,31
NMIJ CRM 7402- a	580.0 ± 0,10	8,95	580.0 ± 0,02

Precisión y exactitud

Se realizó la recuperación enriqueciendo una muestra blanco a 1, 1.5 y 2 veces el límite de funcionamiento mínimo según lo establecido por la directiva 2002/657/CE. Para cada nivel fortificación se dispuso de 8 muestras, se determinó la concentración, la media, la desviación estándar, la recuperación y el CV%. La tabla 4 detalla el procediendo y los resultados obtenidos dentro de días, entre días y entre analistas dentro de días. La recuperación se evaluó en porcentaje por la relación del contenido medio de las especie de Hg con respecto al nivel de fortificación.

Repetibilidad, reproducibilidad y robustez

Se evaluaron 24 muestras de matriz fortificadas a 1, 1.5 y 2 veces el límite mínimo de funcionamiento (MRPL), cada nivel con 8 muestras, a las cuales se les calculo la concentración, la desviación estándar y el CV (%). Se repitió el análisis conservando las condiciones establecidas en el método pero con operador diferente y entre días, se determinó el CV (%). La tabla 5 muestra los resultados obtenidos en la validación. La robustez como medida de la capacidad del procedimiento analítico de no ser afectado por variaciones pequeñas se optimizó en el método aplicando el test de Youden y Steiner, en la cual se evaluó variaciones de factores como diferentes analistas, agitación y temperatura, pH del medio, volumen y concentración de derivatizante, en este sentido, se determinó que las últimas tres variables, son sensibles a variaciones y por lo tal siempre se deben controlar para obtener mejores recuperaciones.

Tabla 9 Análisis de la repetibilidad y reproducibilidad del método

Analito	Repetibilidad (%CV)	Reproducibilidad (%CV)
MeHg	5,07	6,23
EtHg	3,13	2,36

Tabla 10 Precisión y exactitud del método desarrollado "dentro-día, entre-días y entre analistas"

Analito	Fortificación (µg/kg)	Dentro-día Op1 (n = 6)			Entre-días Op1 (n = 3 díasx 6 determinaciones)			Dentro-día Op2 (n = 6)		
		Medida± 2 SD (µg/kg)	RSD	Recuperación (%)	Medida ± 2 SD (µg/kg)	RSD	Recuperación (%)	Medida ± 2 SD (µg/kg)	RSD	Recuperación (%)
MeHg	20.0 ^a	19,21± 0,96	4,97	96,02	20,28±1,37	6,70	101,40	15,42±1,52	9,84	77,09
	30.0 ^b	31,07±0,97	3,11	103,59	30,28±1,61	5,36	100,93	28,00±2,43	8,69	93,33
	40.0 ^c	41,43±1,16	2,79	103,57	40,79±1,29	3,16	101,96	37,06±1,35	3,63	92,64
EtHg	20.0 ^a	20,06±0,73	3,64	100,31	18,79±0,57	3,012	93,93	19,76±0,45	2,27	98,73
	30.0 ^b	28,54±1,23	4,54	95,15	28,71±0,84	2,96	95,71	29,36±0,37	1,27	97,86
	40.0 ^c	40,57±1,11	2,74	101,42	39,56±1,35	3,40	98,89	39,44±0,48	1,23	98,59

Op, operador: desviación relativa estándar en condiciones de repetibilidad (RSDr) (seis replicas en cada nivel).

SD: desviación estándar

RSD: desviación estándar relativa

Fortificaciones: ^a1.0, ^b1.5, ^c2.0 veces el Límite mínimo de funcionamiento exigido (MRPL)

Análisis en muestras reales

La tabla 11 muestra los resultados obtenidos de la aplicación del método desarrollado a trece marcas de atún enlatado, seis tipos de mariscos y dos tipos de pescado fresco. Se evidencia poca prevalencia de MeHg en las muestras de pescados y mariscos procesados ya las muestras en la cuales se detectó el contenido de MeHg, éste sobrepasaban el nivel de referencia (NR) recomendado por la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2013).

Tabla 11 Análisis en muestras reales

Muestra	Lote 1	Lote 2
	($\mu\text{g}/\text{Kg}$)	($\mu\text{g}/\text{Kg}$)
Atún 1	< CC α	< CC α
Atún 2	< CC α	< CC α
Atún 3	141,10 \pm 1,53	142,18 \pm 1,53
Atún 4	< CC α	< CC α
Atún 5	< CC α	< CC α
Atún 6	NF	NF
Atún 7	< CC α	< CC α
Atún 8	497,10 \pm 19,57	510,93 \pm 19,57
Atún 9	< CC α	< CC α
Atún 10	< CC α	< CC α
Atún 11	109,63 \pm 2,31	111,26 \pm 2,31
Atún 12	NF	NF
Atún 13	< CC α	NF
Surini	NF	NF
<i>Merluccius</i>	59,46 \pm 2,78	60,08 \pm 2,78
<i>Salmo</i>	NF	NF
<i>Illex coindetii</i>	< CC α	< CC α

<i>Ostrea columbiensis</i>	NF	NF
<i>Mytilus edulis</i>	NF	NF
<i>Melongena Melongena</i>	NF	NF
<i>Loligo vulgaris</i>	< CC α	< CC α
<i>Penaeus monodon</i>	NF	NF

Discusión

La especificidad demostró ser adecuada para el análisis de trazas de MeHg en muestras de pescado procesado, crudo y mariscos. Para establecer el rango de análisis, se realizó la evaluación de siete muestras blanco dopadas a diferentes concentraciones, y se estableció un rango lineal de concentración entre 20.0 y 900.0 $\mu\text{g/L}$, se obtuvo que en el extremo inferior del rango, los factores limitantes son los valores más próximos al CC β , pero significativamente, en el extremo superior, hay mayores limitaciones en función de la respuesta del sistema del instrumento. Experimentalmente, la señal instrumental tuvo que disminuir el nivel de concentración, pasando de un límite superior de 1500.0 $\mu\text{g/L}$ al establecido de 900.0 $\mu\text{g/L}$; debido al no cumplimiento de los parámetros de calidad propuestos, aunque se demostraba un intervalo de respuesta lineal por la regresión lineal, para el punto de 1500.0 $\mu\text{g/L}$ el análisis de los residuales fueron en todos los casos mayores al 20%, no cumpliendo con las especificaciones dadas para el método propuesto. Sin embargo, el rango de concentración de análisis, espaciadamente es acorde a las respuestas esperadas tanto en el MRC como en las muestras reales en cumplimiento de las normativas para el MeHg. La heterocedasticidad de varianzas se evaluó comprobando el aumento de la varianza entre los niveles de concentración más bajos y más altos usando una prueba F para un nivel de confianza del 95%. Las curvas de calibración se utilizaron para elaborar modelos de la desviación estándar, para la concentración de MeHg y EtHg y definir el factor

de ponderación de las regresiones para lo cual se observaron relaciones lineales entre la respuesta y las concentraciones.

En estudios, se ha discutido el efecto matriz durante la extracción de especies de MeHg con soluciones de KOH, produciendo en bajas recuperaciones en el análisis, este hecho se ha atribuido al contenido de aminoácidos azufrados presentes en tejido de peces y mariscos (Carrasco & Vassileva, 2014). Hintelmann y Nguyen (H. Hintelmann & H. T. Nguyen, 2005) postularon que tales interferencias provienen probablemente de la matriz orgánica restante en la extracción de la muestra. El proceso de digestión alcalina se realizó con calentamiento inferior a 30°C, para favorecer la saponificación y liberar el MeHg. La adición Cu^{2+} se efectuó como compuesto de competencia del MeHg para impedir la quelación del Hg con los grupos sulfhidrilo de la matriz (Chen et al., 2004). El freezer out, se empleó para favorecer la precipitación de lípidos solubilizados en extractante. La estimación de veracidad permitió comprobar que el sesgo no es significativo, los errores sistemáticos pudieron corregirse y se estableció la exactitud del método equivalente a su precisión.

Conclusiones

Se desarrolló y validó un método para la determinación de MeHg y EtHg en muestras de pescado y mariscos, previa fenilación acuosa, extracción con hexano y detección por GC-MS. La saponificación con metanol alcalino y la extracción asistida por ultrasonido con hexano disminuyó las pérdidas por procesamiento. Se consideró el efecto matriz y para contrarrestar este efecto sobre las muestras biológicas, se empleó calentamiento durante la digestión asistida por microondas, la adición de Cu^{2+} y la aplicación de freezer out para reducir el efecto asociado al contenido de aminoácidos con grupos sulfhidrilos y ácidos grasos liberados en el proceso de digestión. El uso de estándar externo demostró ser útil para la identificación y cuantificación y para corregir el efecto matriz. El método analítico se validó de acuerdo con la directiva 2002/657/CE de la Comunidad Europea;

adicionalmente, se tuvieron en cuenta recomendaciones de las directrices ISO 17025 y EURACHEM. El método demostró buena selectividad, especificidad y límite de decisión ($CC\alpha$); además, los límites de detección ($CC\beta$) para MeHg y EtHg fueron menores que el valor MRPL. La metodología propuesta puede ser utilizada como método de rutina para la determinación de MeHg y EtHg en muestras de pescados y mariscos.

Agradecimientos

Se agradece al Instituto de Ciencia y Tecnología Alimentaria INTAL, por su colaboración y asesoría.

Referencias bibliográficas

- Abrankó, L., Kmellár, B., & Fodor, P. (2007). Comparison of extraction procedures for methylmercury determination by a SPME-GC-AFS system. *Microchemical Journal*, 85(1), 122-126. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2006.04.001>
- American Public Health Association, A. W. W. A., Water Pollution Control Federation. (2005). Metal by Flame Atomic Absorption. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater *Method 3111*. New York: American Public Health Association, American Water Works Association.
- Antignac, J.-P., Le Bizec, B., Monteau, F., & Andre, F. (2003). Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the “2002/657/EC” European decision: guideline and application. *Analytica Chimica Acta*, 483(1–2), 325-334. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)01379-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(02)01379-X)
- Bai, X., & Fan, Z. (2010). 3-Mercaptopropyltrimethoxysilane coated capillary micro-extraction coupled to capillary electrophoresis for the determination of

- methylmercury, phenylmercury and mercury in biological sample. *Microchimica Acta*, 170(1-2), 107-112. doi: 10.1007/s00604-010-0393-2
- Baklanov, A. N., & Chmilenko, F. A. (2001). Use of Ultrasound in Sample Preparation for the Determination of Mercury Species by Cold-Vapor Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 56(7), 641-646. doi: 10.1023/a:1016792205748
- Bank, M. S. (2012). *Mercury in the Environment: Pattern and Process*: University of California Press.
- Batley, G. E. (1989). *Trace Element Speciation Analytical Methods and Problems*: Taylor & Francis.
- Berzas Nevado, J. J., Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C., Krupp, E. M., Guzmán Bernardo, F. J., Rodríguez Fariñas, N., Jiménez Moreno, M., . . . Patiño Ropero, M. J. (2011). Comparison of gas chromatographic hyphenated techniques for mercury speciation analysis. *Journal of Chromatography A*, 1218(28), 4545-4551. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.05.036>
- Bloom, N. S., Colman, J. A., & Barber, L. (1997). Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 358(3), 371-377. doi: 10.1007/s002160050432
- Cai, Y., & Bayona, J. M. (1995). Determination of methylmercury in fish and river water samples using in situ sodium tetraethylborate derivatization following by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 696(1), 113-122. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)01177-G](http://dx.doi.org/10.1016/0021-9673(94)01177-G)
- Cai, Y., Monsalud, S., & Furton, K. G. (2000a). Determination of methyl- and ethylmercury compounds using gas chromatography atomic fluorescence spectrometry following aqueous derivatization with sodium tetraphenylborate. *Chromatographia*, 52(1-2), 82-86.
- Cai, Y., Monsalud, S., & Furton, K. G. (2000b). Determination of methyl- and ethylmercury compounds using gas chromatography atomic fluorescence

- spectrometry following aqueous derivatization with sodium tetraphenylborate. *Chromatographia*, 52(1-2), 82-86. doi: 10.1007/bf02490797
- Carrasco, L., Díez, S., & Bayona, J. M. (2007). Methylmercury determination in biota by solid-phase microextraction: Matrix effect evaluation. *Journal of Chromatography A*, 1174(1-2), 2-6. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.09.051>
- Carrasco, L., Díez, S., & Bayona, J. M. (2009). Simultaneous determination of methyl- and ethyl-mercury by solid-phase microextraction followed by gas chromatography atomic fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1216(51), 8828-8834. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.043>
- Carrasco, L., & Vassileva, E. (2014). Determination of methylmercury in marine biota samples: Method validation. *Talanta*, 122(0), 106-114. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.027>
- Cazes, J. (2004). *Analytical Instrumentation Handbook, Third Edition*: Taylor & Francis.
- Ceccatelli, S., Daré, E., & Moors, M. (2010). Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, 188(2), 301-308. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.04.007>
- Centineo, G., Blanco González, E., & Sanz-Medel, A. (2004). Multielemental speciation analysis of organometallic compounds of mercury, lead and tin in natural water samples by headspace-solid phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1034(1-2), 191-197. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2004.01.051>
- Centineo, G., González, E. B., García Alonso, J. I., & Sanz-Medel, A. (2006). Isotope dilution SPME GC/MS for the determination of methylmercury in tuna fish samples. *Journal of Mass Spectrometry*, 41(1), 77-83. doi: 10.1002/jms.960
- Clémens, S., Monperrus, M., Donard, O. F. X., Amouroux, D., & Guérin, T. (2012). Mercury speciation in seafood using isotope dilution analysis: A review. *Talanta*, 89(0), 12-20. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.064>

- Clevenger, W. L., Smith, B. W., & Winefordner, J. D. (1997). Trace Determination of Mercury: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 27(1), 1-26. doi: 10.1080/10408349708050578
- Costa-Fernandez, J. M., Lunzer, F., Pereiro-Garcia, R., Sanz-Medel, A., & Bordel-Garcia, N. (1995). Direct coupling of high-performance liquid chromatography to microwave-induced plasma atomic emission spectrometry via volatile-species generation and its application to mercury and arsenic speciation. [10.1039/JA9951001019]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 10(11), 1019-1025. doi: 10.1039/ja9951001019
- Chen, S.-S., Chou, S.-S., & Hwang, D.-F. (2004). Determination of methylmercury in fish using focused microwave digestion following by Cu²⁺ addition, sodium tetrapropylborate derivatization, n-heptane extraction, and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1024(1–2), 209-215. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.015>
- Chung, S. W.-c., & Chan, B. T.-p. (2011). A reliable method to determine methylmercury and ethylmercury simultaneously in foods by gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry after enzymatic and acid digestion. *Journal of Chromatography A*, 1218(9), 1260-1265. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.112>
- Dadfarnia, S., & Haji Shabani, A. M. (2010). Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals—A review. *Analytica Chimica Acta*, 658(2), 107-119. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2009.11.022>
- de la Guardia, M., & Garrigues, S. (2012). *Handbook of Green Analytical Chemistry*. Wiley.
- Delgado, A., Prieto, A., Zuloaga, O., de Diego, A., & Madariaga, J. M. (2007). Production of artifact methylmercury during the analysis of certified reference sediments: Use of ionic exchange in the sample treatment step to minimise the problem. *Analytica Chimica Acta*, 582(1), 109-115. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.08.051>

- Demuth, N., & Heumann, K. G. (2001). Validation of Methylmercury Determinations in Aquatic Systems by Alkyl Derivatization Methods for GC Analysis Using ICP-IDMS. *Analytical Chemistry*, 73(16), 4020-4027. doi: 10.1021/ac010366+
- Díez, S., & Bayona, J. M. (2008). Determination of Hg and organomercury species following SPME: A review. *Talanta*, 77(1), 21-27. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2008.06.027>
- Dua, A., & Gupta, N. (2005). Mercury Toxicology as Assessed Through Fish Scales. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 74(6), 1105-1110. doi: 10.1007/s00128-005-0695-y
- Ebdon, L., & Evans, E. H. (1998). *An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry*: Wiley.
- Ellison, S. L. R., & Williams, A. (2012). *Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. www.eurachem.org
- Emteborg, H., Bjorklund, E., Odman, F., Karlsson, L., Mathiasson, L., Frech, W., & Baxter, D. C. (1996). Determination of methylmercury in sediments using supercritical fluid extraction and gas chromatography coupled with microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. [10.1039/AN9962100019]. *Analyst*, 121(1), 19-29. doi: 10.1039/an9962100019
- Emteborg, H., Hadgu, N., & Baxter, D. C. (1994). Quality control of a recently developed analytical method for the simultaneous determination of methylmercury and inorganic mercury in environmental and biological samples. [10.1039/JA9940900297]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 9(3), 297-302. doi: 10.1039/ja9940900297
- Emteborg, H., Snell, J., Qian, J., & Frech, W. (1999). Sources of systematic errors in mercury speciation using Grignard reagents and capillary gas chromatography coupled to atomic spectrometry. *Chemosphere*, 39(7), 1137-1152. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00183-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00183-6)
- Falter, R., Hintelmann, H., & Quevauviller, P. (1999). Conclusion of the workshop on "sources of error in methylmercury determination during sample

- preparation, derivatisation and detection". *Chemosphere*, 39(7), 1039-1049.
doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00177-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00177-0)
- Farina, M., Rocha, J. B. T., & Aschner, M. (2011). Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. *Life Sciences*, 89(15–16), 555-563. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2011.05.019>
- Filippelli, M., Baldi, F., Brinckman, F. E., & Olson, G. J. (1992). Methylmercury determination as volatile methylmercury hydride by purge and trap gas chromatography in line with Fourier transform infrared spectroscopy. *Environmental Science & Technology*, 26(7), 1457-1460. doi: 10.1021/es00031a025
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2013). *Documento de debate sobre la revisión del nivel de referencia para el metilmercurio en el pescado y peces predadores*. Moscú (Federación Rusa).
- Gaona, X., & Valiente, M. (2003). Stability study on a Westöö-based methodology to determine organomercury compounds in polluted soil samples. *Analytica Chimica Acta*, 480(2), 219-230.
- Gil, S., Fragueiro, S., Lavilla, I., & Bendicho, C. (2005). Determination of methylmercury by electrothermal atomic absorption spectrometry using headspace single-drop microextraction with in situ hydride generation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60(1), 145-150. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2004.10.008>
- Grandjean, P., Weihe, P., Debes, F., Choi, A. L., & Budtz-Jørgensen, E. (2014). Neurotoxicity from prenatal and postnatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology*, 43(0), 39-44. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ntt.2014.03.004>
- Health, A. C. S. *Regulating Mercury Emissions from Power Plants: Will It Protect Our Health*: Am Cncl on Science, Health.
- Hempel, M., Chau, Y. K., Dutka, B. J., McInnis, R., Kwan, K. K., & Liu, D. (1995). Toxicity of organomercury compounds: Bioassay results as a basis for risk assessment. *The Analyst*, 120(3), 721-724.

- Hight, S. C., & Cheng, J. (2005). Determination of total mercury in seafood by cold vapor-atomic absorption spectroscopy (CVAAS) after microwave decomposition. *Food Chemistry*, 91(3), 557-570. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.004>
- Hintelmann, H., & Nguyen, H. (2005). Extraction of methylmercury from tissue and plant samples by acid leaching. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(2), 360-365. doi: 10.1007/s00216-004-2878-5
- Hintelmann, H., & Nguyen, H. T. (2005). Extraction of methylmercury from tissue and plant samples by acid leaching. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381(2), 360-365.
- Hippler, J., Hoppe, H. W., Mosel, F., Rettenmeier, A. W., & Hirner, A. V. (2009). Comparative determination of methyl mercury in whole blood samples using GC-ICP-MS and GC-MS techniques. *Journal of Chromatography B*, 877(24), 2465-2470. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.06.004>
- Horvat, M., Bloom, N. S., & Liang, L. (1993). Comparison of distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples: Part 1. Sediments. *Analytica Chimica Acta*, 281(1), 135-152. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(93\)85348-N](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(93)85348-N)
- Horvat, M., Byrne, A. R., & May, K. (1990). A modified method for the determination of methylmercury by gas chromatography. *Talanta*, 37(2), 207-212. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0039-9140\(90\)80024-A](http://dx.doi.org/10.1016/0039-9140(90)80024-A)
- Horwitz, W., & Chemists, A. o. O. A. (2000). *Official methods of analysis of the AOAC: Association of Official Analytical Chemists*.
- ICONTEC. (2003). *Norma tecnica colombiana NTC-ISO-IEC 17025 : requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibracion: Icontec*.
- Jia, X., Han, Y., Liu, X., Duan, T., & Chen, H. (2011). Speciation of mercury in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 66(1), 88-92. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2010.12.003>

- Jiang, H., Hu, B., Chen, B., & Zu, W. (2008). Hollow fiber liquid phase microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry for the determination of methylmercury in human hair and sludge samples. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63(7), 770-776. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2008.04.011>
- Junghans, R. P. (1983). A review of the toxicity of methylmercury compounds with application to occupational exposures associated with laboratory uses. *Environmental Research*, 31(1), 1-31. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0013-9351\(83\)90059-2](http://dx.doi.org/10.1016/0013-9351(83)90059-2)
- Krishna, M. V. B., Ranjit, M., Karunasagar, D., & Arunachalam, J. (2005). A rapid ultrasound-assisted thiourea extraction method for the determination of inorganic and methyl mercury in biological and environmental samples by CVAAS. *Talanta*, 67(1), 70-80. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.02.007>
- Krull, I. S., Bushee, D. S., Schleicher, R. G., & Smith, S. B. (1986). Determination of inorganic and organomercury compounds by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma emission spectrometry with cold vapour generation. [10.1039/AN9861100345]. *Analyst*, 111(3), 345-349. doi: 10.1039/an9861100345
- Kuballa, T., Leonhardt, E., Schoeberl, K., & Lachenmeier, D. (2009). Determination of methylmercury in fish and seafood using optimized digestion and derivatization followed by gas chromatography with atomic emission detection. *European Food Research and Technology*, 228(3), 425-431. doi: 10.1007/s00217-008-0949-0
- Leal, L. O., Elsholz, O., Forteza, R., & Cerdà, V. (2006). Determination of mercury by multisyringe flow injection system with cold-vapor atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 573-574(0), 399-405. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.078>
- Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P., & Horvat, M. (2005). Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 24(5), 383-393.

- Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P., & Horvat, M. (2005). Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 24(5), 383-393. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2004.01.001>
- Li, B., Shi, J. B., Wang, X., Meng, M., Huang, L., Qi, X. L., . . . Ye, Z. H. (2013). Variations and constancy of mercury and methylmercury accumulation in rice grown at contaminated paddy field sites in three Provinces of China. *Environmental Pollution*, 181(0), 91-97. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.021>
- Li, Y., & Hu, B. (2007). Sequential cloud point extraction for the speciation of mercury in seafood by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 62(10), 1153-1160. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2007.07.005>
- Lindqvist, O., & Rodhe, H. (1985). Atmospheric mercury—a review*. *Tellus B*, 37B(3), 136-159. doi: 10.1111/j.1600-0889.1985.tb00062.x
- Liu, G., Cai, Y., & O'Driscoll, N. (2011). *Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury*. Wiley.
- Loconto, P. R. (2005). *Trace Environmental Quantitative Analysis: Principles, Techniques and Applications, Second Edition*: Taylor & Francis.
- Logar, M., Horvat, M., Akagi, H., & Pihlar, B. (2002). Simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury compounds in natural waters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374(6), 1015-1021. doi: 10.1007/s00216-002-1501-x
- Lorenzo, R. A., Vázquez, M. J., Carro, A. M., & Cela, R. (1999). Methylmercury extraction from aquatic sediments: A comparison between manual, supercritical fluid and microwave-assisted techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18(6), 410-416. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00118-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00118-1)
- Mailman, M., Stepnuk, L., Cicek, N., & Bodaly, R. A. (2006). Strategies to lower methyl mercury concentrations in hydroelectric reservoirs and lakes: A

- review. *Science of The Total Environment*, 368(1), 224-235. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.09.041>
- Mao Tseng, C., De Diego, A., Martin, F. M., Amouroux, D., & F. X. Donard, O. (1997). Rapid Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury in Biological Reference Materials by Hydride Generation, Cryofocusing, Atomic Absorption Spectrometry After Open Focused Microwave-assisted Alkaline Digestion. [10.1039/A700956I]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12(7), 743-750. doi: 10.1039/a700956i
- Mao Tseng, C., De Diego, A., Martin, F. M., & F. X. Donard, O. (1997). Rapid and Quantitative Microwave-assisted Recovery of Methylmercury From Standard Reference Sediments. [10.1039/A700832E]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 12(6), 629-635. doi: 10.1039/a700832e
- Mao, Y., Liu, G., Meichel, G., Cai, Y., & Jiang, G. (2008). Simultaneous speciation of monomethylmercury and monoethylmercury by aqueous phenylation and purge-and-trap preconcentration followed by atomic spectrometry detection. *Analytical Chemistry*, 80(18), 7163-7168.
- Menéndez García, A., Fernández Sánchez, M. L., Sánchez Uría, J. E., & Sanz Medel, A. (1996). Speciation of mercury by continuous flow liquid-liquid extraction and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry detection. *Microchimica Acta*, 122(3-4), 157-166. doi: 10.1007/bf01245778
- Milestone. (2009). *MILESTONE SK-10 and SK-12 ROTORS USER MANUAL*. Sorisole, Italy: Milestone.
- Mondal, B. C., Das, D., & Das, A. K. (2001). Application of a new resin functionalised with 6-mercaptopurine for mercury and silver determination in environmental samples by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 450(1-2), 223-230. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01385-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01385-X)
- Navarro, M., López, M. C., López, H., & Sánchez, M. (1992). Microwave dissolution for the determination of mercury in fish by cold vapour atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 257(1), 155-158. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670\(92\)80164-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2670(92)80164-3)

- Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., & Friberg, L. (2011). *Handbook on the Toxicology of Metals*: Elsevier Science.
- Ong, K., Lim, L., Ghanthimathi, S., Ibrahim, N., & Nasir, Z. (2014). Speciation: Determination of Methylmercury in Fish Samples with HPLC-ICP-MS. In A. Z. Aris, T. H. Tengku Ismail, R. Harun, A. M. Abdullah & M. Y. Ishak (Eds.), *From Sources to Solution* (pp. 375-378): Springer Singapore.
- Ortega, L. A., Garcia, J. G., & Fontanety, M. I. (2001). *VALIDACION DE METODOS ANALITICOS*. Barcelona, España.
- Pena-Pereira, F., Lavilla, I., & Bendicho, C. (2009). Miniaturized preconcentration methods based on liquid–liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 64(1), 1-15. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2008.10.042>
- PerkinElmer. (2008). *Atomic Absorption Spectrometry Methods Manual* (5 ed.).
- Pirrone, N., & Mahaffey, K. R. (2005). *Dynamics of Mercury Pollution on Regional and Global Scales: Atmospheric Processes and Human Exposures Around the World*: Springer.
- Pontes, F. V. M., Carneiro, M. C., Vaitsman, D. S., Monteiro, M. I. C., Neto, A. A., & Tristão, M. L. B. (2014). Investigation of the Grignard reaction and experimental conditions for the determination of inorganic mercury and methylmercury in crude oils by GC–ICP-MS. *Fuel*, 116(0), 421-426. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2013.08.025>
- Poperechna, N., & Heumann, K. (2005). Simultaneous multi-species determination of trimethyllead, monomethylmercury and three butyltin compounds by species-specific isotope dilution GC–ICP–MS in biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 383(2), 153-159. doi: 10.1007/s00216-005-0036-3
- Popp, M., Hann, S., & Koellensperger, G. (2010). Environmental application of elemental speciation analysis based on liquid or gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma mass spectrometry—A review.

Analytica Chimica Acta, 668(2), 114-129. doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2010.04.036>

- Puk, R., & Weber, J. H. (1994). Critical review of analytical methods for determination of inorganic mercury and methylmercury compounds. *Applied Organometallic Chemistry*, 8(4), 293-302. doi: 10.1002/aoc.590080404
- Puk, R., & Weber, J. H. (1994). Determination of mercury(II), monomethylmercury cation, dimethylmercury and diethylmercury by hydride generation, cryogenic trapping and atomic absorption spectrometric detection. *Analytica Chimica Acta*, 292(1-2), 175-183.
- Quetel, C. R., Snell, J. P., Aregbe, Y., Abranko, L., Jokai, Z., Brunori, C., . . . Bjorn, E. (2005). Methylmercury in tuna: demonstrating measurement capabilities and evaluating comparability of results worldwide from the CCQM P-39 comparison. [10.1039/B505368D]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 20(10), 1058-1066. doi: 10.1039/b505368d
- Quevauviller, P., & Morabito, R. (2000). Evaluation of extraction recoveries for organometallic determinations in environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(2-3), 86-96. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00193-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00193-4)
- Rahman, L., Corns, W. T., Bryce, D. W., & Stockwell, P. B. (2000). Determination of mercury, selenium, bismuth, arsenic and antimony in human hair by microwave digestion atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*, 52(5), 833-843. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140\(00\)00436-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0039-9140(00)00436-7)
- Reyes, L., Mizanur Rahman, G. M., Fahrenholz, T., & Skip Kingston, H. M. (2008). Comparison of methods with respect to efficiencies, recoveries, and quantitation of mercury species interconversions in food demonstrated using tuna fish. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(8), 2123-2132. doi: 10.1007/s00216-008-1966-3
- Reyes, L. H., Rahman, G. M. M., & Kingston, H. M. S. (2009). Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues. *Analytica Chimica Acta*, 631(2), 121-128. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2008.10.044>

- Ri, amp, x, o-Segade, S., & Bendicho, C. (1999). Selective Reduction Method for Separate Determination of Inorganic and Total Mercury in Mussel Tissue by Flow-Injection Cold Vapor Technique. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42(3), 245-252. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/eesa.1998.1753>
- Risticevic, S., Vuckovic, D., & Pawliszyn, J. (2011). Application of Solid-Phase Microextraction in Determination of Organic Compounds from Complex Environmental Matrices *Biophysico-Chemical Processes of Anthropogenic Organic Compounds in Environmental Systems* (pp. 369-411): John Wiley & Sons, Inc.
- Rodil, M. d. R. (2005). *Desarrollo de nuevas estrategias de preparación de muestra aplicadas al control de contaminantes medioambientales a niveles traza*. Doctor en Química, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela. Retrieved from <http://dspace.usc.es/bitstream/10347/9695/1/b19460971.pdf>
- Rodil, R., Carro, A. M., Lorenzo, R. A., Abuín, M., & Cela, R. (2002). Methylmercury determination in biological samples by derivatization, solid-phase microextraction and gas chromatography with microwave-induced plasma atomic emission spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 963(1-2), 313-323. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00644-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00644-1)
- Rodríguez, M. d. R. R. (2005). *Desarrollo de nuevas estrategias de preparación de muestra aplicadas al control de contaminantes medioambientales a niveles traza*. Doctorado en Química, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10347/9695>
- Sánchez, D. M., Martín, R., Morante, R., Marín, J., & Munuera, M. L. (2000). Preconcentration speciation method for mercury compounds in water samples using solid phase extraction followed by reversed phase high performance liquid chromatography. *Talanta*, 52(4), 671-679.
- Sannac, S., Fisicaro, P., Labarraque, G., Pannier, F., & Potin-Gautier, M. (2009). Development of a reference measurement procedure for the determination of methylmercury in fish products. *Accreditation and Quality Assurance*, 14(5), 263-267.

- Selin, N. E. (2009). Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A Review. *Annual Review of Environment and Resources*, 34(1), 43-63. doi: doi:10.1146/annurev.enviro.051308.084314
- Serafimovski, I., Karadjova, I., Stafilov, T., & Cvetković, J. (2008). Determination of inorganic and methylmercury in fish by cold vapor atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Microchemical Journal*, 89(1), 42-47. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2007.11.003>
- Shah, A. Q., Kazi, T. G., Baig, J. A., Afridi, H. I., & Arain, M. B. (2012). Simultaneously determination of methyl and inorganic mercury in fish species by cold vapour generation atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 134(4), 2345-2349. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.109>
- Por la cual se modifica parcialmente la Resolución número 776 de 2008, RESOLUCIÓN 122 del enero 26 DE 2012 C.F.R. (2012).
- Taylor, V. F., Carter, A., Davies, C., & Jackson, B. P. (2011). Trace-level automated mercury speciation analysis. [10.1039/C0AY00528B]. *Analytical Methods*, 3(5), 1143-1148. doi: 10.1039/c0ay00528b
- Tobiszewski, M., Mechlińska, A., Zygmunt, B., & Namieśnik, J. (2009). Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(8), 943-951. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2009.06.001>
- Tseng, C. M., De Diego, A., Wasserman, J. C., Amouroux, D., & Donard, O. F. X. (1999). Potential interferences generated during mercury species determination using acid leaching, aqueous ethylation, cryogenic gas chromatography and atomic spectrometry detection techniques. *Chemosphere*, 39(7), 1119-1136. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(99\)00182-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(99)00182-4)
- Tutschku, S., Schantz, M. M., & Wise, S. A. (2002). Determination of Methylmercury and Butyltin Compounds in Marine Biota and Sediments Using Microwave-Assisted Acid Extraction, Solid-Phase Microextraction,

- and Gas Chromatography with Microwave-Induced Plasma Atomic Emission Spectrometric Detection. *Analytical Chemistry*, 74(18), 4694-4701. doi: 10.1021/ac020128u
- Ure, A. M. (1975). The determination of mercury by non-flame atomic absorption and fluorescence spectrometry : A review. *Analytica Chimica Acta*, 76(1), 1-26. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)81980-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0003-2670(01)81980-2)
- Välimäki, I., & Perämäki, P. (2001). Determination of Mercury Species by Capillary Column GC-QTAAS with Purge and Trap Preconcentration Technique. *Microchimica Acta*, 137(3-4), 191-201. doi: 10.1007/s006040170011
- Water, U. S. E. P. A. O. o., Science, U. S. E. P. A. O. o., Engineering, T., & Division, A. (2001). *Method 1630: Methyl Mercury in Water by Distillation, Aqueous Ethylation, Purge and Trap, and CVAFS*: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, Office of Science and Technology, Engineering and Analysis Division.
- Yan, X.-P., Yin, X.-B., Jiang, D.-Q., & He, X.-W. (2003). Speciation of Mercury by Hydrostatically Modified Electroosmotic Flow Capillary Electrophoresis Coupled with Volatile Species Generation Atomic Fluorescence Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 75(7), 1726-1732. doi: 10.1021/ac026272x
- Yang, L., Colombini, V., Maxwell, P., Mester, Z., & Sturgeon, R. E. (2003). Application of isotope dilution to the determination of methylmercury in fish tissue by solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1011(1–2), 135-142. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)01122-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9673(03)01122-1)
- Yang, L., Mester, Z., & Sturgeon, R. E. (2003). Determination of methylmercury in fish tissues by isotope dilution SPME-GC-ICP-MS. [10.1039/B301299A]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 18(5), 431-436. doi: 10.1039/b301299a
- Yin, X. B., Wu, P., Li, Y., & Yan, X. P. (2012). 3.22 - Mercury Speciation and Binding to Biomacromolecules. In J. Pawliszyn (Ed.), *Comprehensive Sampling and Sample Preparation* (pp. 435-460). Oxford: Academic Press.

ANEXOS

Anexo 1 Artículos publicado y sometidos

Daniel Esteban León Perez, Gustavo Antonio Peñuela mesa. "Trascendencia del metilmercurio en el ambiente, la alimentación y la salud humana". En: Colombia Producción + Limpia ISSN: 1909-0455 , v.6 fasc.2 p.108 - 116 ,2011

Daniel Esteban León Perez, Claudio Jiménez Cartagena, María Alejandra Salazar Gómez, Marta Lucia Hernández Ángel, "Validation of an analytical method for the determination of mercury in shrimp and fish". – Sometido, evaluado y aceptado para su publicación en la revista Producción + Limpia ISSN: 1909-0455

Daniel Esteban León Perez, Ana María Muñoz Jiménez, Claudio Jiménez Cartagena. Optimization y comparation of two analytical methods to quantify the methylmercury in fish. – Preparado para publicar

Daniel Esteban León Perez 1, Ana María Muñoz Jiménez 2, Claudio Jiménez Cartagena. Determination of mercury species in seafood with Gas Chromatography–Mass Spectrometry Validation of the Method According to Commission Decision 2002/657/EC. – Preparado para publicar

Daniel Esteban León Perez, Claudio Jiménez Cartagena. El mercurio: toxicológica, especiación orgánica y retos analíticos – Capitulo de libro – Preparado para publicar

Daniel Esteban León Pérez, Claudio Jiménez Cartagena. La contaminación ambiental como fundamento investigativo y de responsabilidad social. – Capitulo de libro – Preparado para publicar

Anexo 2 Participación de eventos

Presentación en modalidad Oral en el II Congreso Internacional de investigación e Innovación en Ingeniería, Ciencia y Tecnología de Alimento. Con el Trabajo “Optimización de un método por microextracción en fase sólida para el análisis de metilmercurio en pescado”. Realizado en la ciudad de Medellín - 27 al 30 de mayo de 2014.

Presentación en modalidad Oral en el Seminario Internacional Seguridad, calidad y funcionalidad de alimentos: Retos de la innovación alimentaria en un mercado global. Red CYTED-Cornucopia. Con la presentación: “Liberaciones antropogénicas de mercurio en Colombia: Metodologías y validación”. Realizado en la ciudad de Medellín – 26 a 28 de Mayo de 2014