



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

62

DETERMINACION DE MERCURIO POR ESPEC- TROSCOPIA DE ABSORCION ATOMICA EN SARDINAS ENLATADAS.

292

T E S I S

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

Héctor Antonio Martínez de Castro Astiazaran



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS. Tesis
AÑO 1976
FECHA _____
PROC. UT

284



QUIMICA

PRESIDENTE NINFA GUERRERO DE CALLEJAS

V O C A L ENRIQUE GARCIA GALEANC

Jurado asignado original-
mente según el tema.

SECRETARIO FRANCISCO FERNANDEZ NORIEGA

1er.SUPLENTE RUBEN BERRA CARCIA CGSS

2do.SUPLENTE CARLOS ROMO MEDRANO

Sitio donde se desarrolló el tema: Laboratorios del CIECCA de la SRH.

Nombre y firma del sustentante: Hector Antonio Martinez de Castro
Astiazaran.

Nombre y firma del asesor del tema: Francisco Fernandez Noriega



Con todo mi cariño y
amor a mis padres,
Dr. Héctor Martínez de Castro O.
Sra. Emma Astiazarán de Martínez de Castro.

A mis hermanos a quienes tanto
quiero Agustín, Emma y Cecilia.

Con sincero agradecimiento a Productos Pesqueros Mexicano S.A.-- de C.V., a través del Ing. Francisco Romero Juanes, Gerente de Con-- trol de Calidad por su ayuda prestada para la elaboración de esta té-- sis.

Mi agradecimiento también al Ing. Miguel Angel Arciniega T., -- por su valioso apoyo, lo mismo al Centro de Investigación y Entrena-- miento para el Control de la Calidad del Agua, de la Dirección Gene-- ral de Usos del Agua y Prevención de la Contaminación de la S.R.H., a través de su Director Dr. Jorge Aguirre Martínez.

Al Ing. Francisco Fernandez N., lo mismo que a mis maestros y-- sinodales les doy las gracias por su valiosa orientación.

I N D I C E

Pág.

INTRODUCCION 1

OBJETIVOS 3

✓ GENERALIDADES 5

7-10

TOXICOLOGIA DEL MERCURIO 11

SELECCION DE METODOS 16

✓ DESCRIPCION SUMARIA DEL METODO 29

PARTE EXPERIMENTAL 36

RESULTADOS Y DISCUSION 45

CONCLUSIONES 50

BIBLIOGRAFIA 52

INTRODUCCION.-

El problema de la contaminación por mercurio en alimentos data de muchos años atrás, pero el estudio de sus efectos tóxicos se ha venido desarrollando en éstas dos últimas décadas, en las cuales se ha estimado entre 1800 a 2000 individuos que han sido envenenados por algún compuesto del mercurio con una estimación de 120 a 150 muertes, de las cuales la mayoría han sido atribuidas a compuestos organomercuriales (6).

También ha cobrado importancia el desastre ocurrido en la bahía de Minamata, Japón (1953-1959), en el cual hubo una serie de intoxicaciones, debido al consumo del pescado altamente contaminado por éste metal, alcanzando 121 intoxicados de los cuales 46 murieron, por lo que se le ha venido llamando la enfermedad de Minamata (13), casos similares se han venido presentando en Niigata, Japón (1964-1965), y en diversos países como en -- Iraq (1956-1960), Paquistán (1961), Guatemala (1964-1965), y Estados Unidos (1969-1970), lo mismo en Canadá, Suecia y en la Unión Soviética en donde también se han encontrado índices de -- contaminación (6,10,13).

Investigadores suecos y japoneses fueron de los primeros en reportar la existencia de mercurio en la cadena alimenticia (19).

Datos obtenidos de estadísticas en 1968 donde cerca del -- 90% de los proveedores de mercurio en el mundo con una producción aproximada de 19 millones de lb., vienen de las siguientes siete fuentes: España, 22.4%; Italia, 20.4%; URSS, 17.6%; EUA, -- 11.3%; China, 7.8%; Yugoslavia, 6.1%; México, 5.2%; y todos --

los otros países 9.1% (6).

Se hicieron análisis del contenido total de mercurio en peces de cierta área de Estados Unidos antes y después de que empezara la producción de cierta fábrica, localizada en esa región, - que empleaba éste metal pesado y se encontró que la concentración de mercurio total en los peces de ésta área aumentaba paralelamente con el funcionamiento de la industria (30).

No cabe duda que ha medida que aumentan los desechos industriales el problema de la contaminación se va haciéndose mayor.

Es necesario por lo tanto una técnica analítica adecuada para la determinación del mercurio y en éstos últimos años la espectroscopía por absorción atómica ha tomado una gran importancia en éste tipo de análisis.

OBJETIVOS.-

La contaminación de metales pesados en los alimentos ha venido creando un serio problema ya que presentará graves peligros para la salud del hombre.

De todos los metales pesados el de interés en la elaboración de ésta tesis es la determinación del mercurio.

La contaminación de los mares aumenta día con día afectando por consecuencia su flora y fauna acuática. Se escogió a las sardinas en especial con la ventaja de que éste producto enlatado -- tiene un precio bastante económico y por consecuencia es un producto de alto consumo por la gran mayoría del pueblo mexicano, entonces es bastante interesante saber que grado de contaminación -- llegan a alcanzar estas muestras de acuerdo a los límites de toxicidad establecidos para éste tipo de productos.

Los productos analizados para ésta tesis fueron sardinas -- marca Peninsular y fueron suministrados por la compañía paraestatal Productos Pesqueros Mexicanos, S.A. de C.V., las muestras analizadas de acuerdo a las claves de los lotes señalan que provienen de sus filiales ubicadas en Escuinapa, Sin., La Reforma, Sin, Matancitas, Baja California Sur y Ensenada, Baja California Norte, indicando que dicho producto fué capturado en ambos lados de la Península de Baja California y además en las costas del Estado de Sonora y del Estado de Sinaloa.

Existen varios métodos para la determinación de mercurio en muestras biológicas, pero otro de los objetivos de ésta tesis es-

probar el método de Espectroscopía de Absorción Atómica y probar también diferentes técnicas en cuanto a la preparación de la - - muestra y observar que resultados se obtienen.

GENERALIDADES.-

El mercurio es el único metal que es líquido a temperatura ambiente, de color blanco plateado, con un peso atómico de 200.61 un punto de fusión de -39°C y un punto de ebullición de 356.9°C . Otra propiedad física del mercurio que fué conocida en la antigüedad es su habilidad de aliarse con todos los metales comunes excepto el fierro y el platino, para formar unas mezclas llamadas amalgamas que pueden ser sólidas o líquidas (6,8,22).

El mercurio forma dos tipos de sales, mercúricas y mercuriosas (3,8).

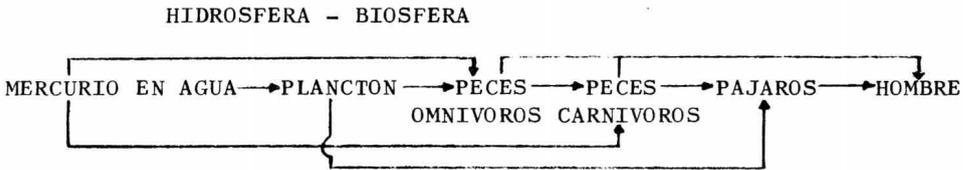
Con respecto al problema de la contaminación ambiental -- del mercurio, probablemente la propiedad física más importante es su volatilidad. Debido a su presión de vapor relativamente alta es fácilmente evaporado en la atmósfera.

El mineral más importante del mercurio es el cinabrio o sulfuro de mercurio (HgS), que es como se encuentra en las minas en su estado natural inorgánico (6,28).

El mercurio es encontrado en cantidades de huellas o trazas a través de la litósfera, hidrósfera y biósfera. En la biósfera las plantas y animales tienden a concentrar el mercurio -- (10).

La forma en que este metal ingresa en la cadena alimentaria del hombre es principalmente a través del alimento proveniente del medio acuático, debido a contaminación directa por las -

actividades industriales y agrícolas. Se han hecho algunos estudios de investigación y se ha encontrado que en los sedimentos y en los mismos peces, algunos microorganismos tienen la propiedad de transformar en condiciones anaeróbicas, el mercurio inorgánico en monometil o dimetilmercurio (6,10,30), ésto constituye un problema aún mayor ya que las formas metiladas son altamente tóxicas y son además biologicamente más movibles que los otros compuestos en que se puede encontrar el mercurio, de tal manera que el mercurio afecta y aumenta en cada nivel trófico de la cadena alimenticia, acumulándose por consiguiente en cada especie, hasta llegar al final de ésta cadena que es el hombre (10). A continuación se puede observar el siguiente esquema en donde se dá una idea de la relación que existe en dicha cadena.



El proceso de conversión bioquímico, viene siendo la llave de la concentración biológica del mercurio en la ecología acuática.

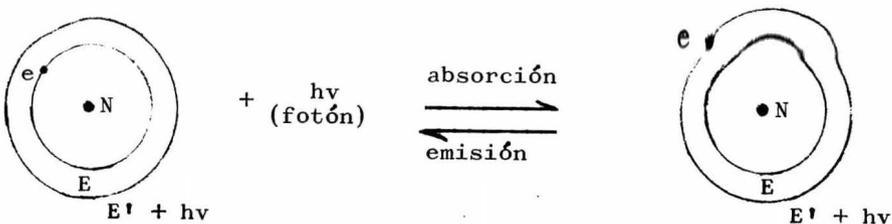
Es muy importante también hacer notar que la cantidad de mercurio que se va arrojando al medio ambiente, va aumentando a medida que se incrementan las industrias que emplean éste metal, por lo que es interesante ver cuales son las principales industrias consumidoras de mercurio (7,11,28), ésto se puede observar en la siguiente lista:

- Fábricas de pulpa y papel.
- Fábricas de pinturas especialmente las que fabrican anticorrosivos.
- Plantas productoras de fungicidas y pesticidas usados en la agricultura.
- Plantas electrolíticas productoras de sosa cáustica y cloro.
- Plantas manufactureras de plásticos.
- Industria farmacéutica.
- Fábricas de accesorios eléctricos, lámparas, etc.
- Plantas productoras de amalgamas.
- Plantas donde se usan procesos electrolíticos para purificar el agua.

5 La determinación de elementos traza o huella, mediante un método rápido, específico y sensible, ha venido siendo un reto para los analistas, sin embargo la espectroscopía por absorción atómica cumple con todos estos requisitos.

La espectroscopía por absorción atómica puede ser simplemente definida como la absorción de energía radiante por los átomos (4), en terminos generales viene siendo un método instrumental espectroanalítico (23).

La absorción de un fotón por un átomo en estado basal representa la absorción atómica como se puede ver en la siguiente figura:



N= Núcleo

e= Electrón

E= Nivel inicial de energía

E'+ hv= Nivel final de energía

Los métodos de absorción atómica dependen de la absorción de energía radiante por los átomos, ya que todos los átomos pueden absorber energía radiante pero solo a cierta longitud de onda correspondiente a los requerimientos de energía del átomo en particular (1).

Los átomos excitados por la absorción de energía radiante regresan eventualmente a sus niveles bajos de energía, de nuevo emitiendo radiación en ciertos casos.

El principio básico de absorción atómica puede describirse como el inverso de los métodos de emisión para la determinación de elementos metálicos. En todas las técnicas de emisión, la muestra se excita de algún modo para hacer que ésta emita radiación de interés, al mismo tiempo no puede evitarse que la muestra emita radiación que no sea de interés. En absorción atómica se lleva a cabo el proceso inverso, el elemento de interés en la muestra no se excita sino simplemente se disocia de sus enlaces químicos y se coloca en un estado no excitado, no ionizado y en su estado basal de energía, en estas condiciones el elemento es capaz de absorber radiación emitida en líneas discretas de ancho de banda angosta, - - (las mismas líneas que serían emitidas por el elemento al excitarse) (15,25).

Las líneas de emisión que deberán ser absorbidas por la muestra, se logran generalmente de lámparas de cátodo hueco, (una fuente

te llena de argón o neón a muy baja presión y que tiene el cátodo fabricado o revestido por el elemento que se va a analizar) (15).

Para utilizar la absorción atómica la muestra debe convertirse en un vapor atómico (25).

En la determinación de mercurio por este método de absorción atómica llegan a existir ciertas interferencias, considerando interferencia aquellos efectos que causan error en un análisis (25).

Pueden existir ciertos compuestos que presentes en la muestra podrían volatilizarse y absorber radiación en la línea de resonancia del mercurio dando valores incorrectos, dentro de estas sustancias están los compuestos orgánicos cíclicos y el vapor de agua (12,17), además yoduros, bromuros y tiosulfatos pueden interferir si están en grandes cantidades (24).

Los iones metálicos que son reducidos a su estado elemental con el cloruro estannoso pueden llegar a interferir en esta técnica de espectroscopía por absorción atómica sin flama, si son capaces de amalgamar al mercurio o de formar compuestos estables con el mismo (24).

Si se sospecha alguna interferencia es conveniente emplear el método de las Adiciones de Estándares, agregando cantidades conocidas de mercurio a la muestra y efectuando su determinación (24,29).

Existen técnicas experimentales auxiliares o subdivisiones-

dentro de la espectroscopía de absorción atómica que varían según el elemento que se desea analizar, así por lo tanto existe la utilización de la flama que es muy común en la mayoría de las determinaciones (23), pero en el caso del mercurio es diferente ya que la atomización se hace sin flama puesto que ha probado mejores resultados analíticos.

La flama es utilizada como productora de la población atómica aunque actúa también como acarreador del medio absorbente formado de átomos.

La espectroscopía de absorción atómica está basada en la utilización de un completo sistema instrumental que comprende principalmente lo siguiente (4,23,25):

- Un sistema emisor (ejem: lámparas de cátodo hueco que son las mas usadas)
- Un sistema productor de vapor atómico (ejem: el uso de -- flama o bién de una bomba aereadora).
- Un sistema de selección espectral (filtros, monocromadores)
- Un sistema de fotodetección (los usados principalmente -- son fototubos y fotodiodos).
- Un sistema medidor (directo o gráfico).

En la actualidad las casas productoras de éstos intrumentos han perfeccionado cada vez más su tecnología, simplificando y abaratando el costo de los mismos.

TOXICOLOGIA DEL MERCURIO.-

El mercurio y sus componentes pueden ser absorbidos por el organismo a través de las siguientes rutas: inhalación, ingestión o absorción por la piel (8,9,11,13,22), pero la acción tóxica realmente es asumida a la habilidad del mercurio de formar ligaduras fuertemente unidas a los grupos sulfhidrilos, presentes en todas las proteínas. Sin embargo se puede encontrar al mercurio ligado con grupos amino, fosforilo o carboxilo que están presentes en todas las células vivas, con los cuales el mercurio puede formar uniones muy fuertes (9,13).

Las manifestaciones tóxicas del mercurio pueden ser agudas o crónicas y en general el envenenamiento industrial tiende a ser crónico, mientras que el envenenamiento no industrial es agudo (6).

Los compuestos del mercurio son generalmente agrupados toxicológicamente en dos grandes clasificaciones:

1.- Inorgánicos, en los cuales el mercurio está presente ya sea como metal o en su forma iónica como sales mercúricas o mercuriosas.

El mercurio elemental es liposoluble y neutral con una presión de vapor muy significativa, la eliminación en nuestro organismo es principalmente a través de las rutas fecal y urinaria, sin embargo también ocurre la excreción a través del sudor y saliva (6).

Los síntomas de envenenamiento pueden ser como: gingivitis,-

estomatitis, y salivación excesiva, también un temblor involuntario de las extremidades y disturbios psicológicos como timidez, - irritabilidad o nerviosismo (6).

En autopsias realizadas en envenenados con mercurio inorgánico se encontró acumulación en el cerebro (13).

Además se han visto síntomas adicionales tales como debilidad, fatiga, palidez, pérdida de peso y problemas en la función - gastrointestinal como diarreas o cólicos (13).

2.- Orgánicos, en los cuales el mercurio está unido covalentemente al menos a un átomo de carbono (13). Los compuestos orgánicos de mercurio se distribuyen más uniformemente en el cuerpo - que los inorgánicos, concentrándose en diferentes partes del organismo principalmente en el hígado, sangre, cerebro, pelo y en la epidermis.

En contraste con los compuestos inorgánicos, los compuestos de metil mercurio, pasan rápidamente a través de la placenta y - se llegan a acumular en el feto, lo mismo puede sufrir intoxicaciones un niño lactante a través de la leche materna, por lo que estos niños producto de acumulaciones por compuestos mercuriales, presentaban síntomas de retraso mental y en algunos casos llegaban hasta la muerte (9,13).

La eliminación de estos compuestos en nuestro organismo es lenta y es hecha principalmente a través de las heces fecales, -- aunque también se eliminan por la vía urinaria (9,13).

Los síntomas de envenenamiento en general se manifiestan como alteraciones en el sistema nervioso central y algunos de estos síntomas pueden ser (9,13):

- 1.- Neurastenia; fatiga excesiva, dolor de cabeza, inestabilidad emocional o disturbios mentales.
- 2.- Parestesias; sensaciones de parálisis o estremecimientos en la boca, labios, dedos.
- 3.- Ataxia generalizada; dificultad en deglutir y en articular palabras.
- 4.- Dificultades en el sistema auditivo.
- 5.- Coma y en casos extremos la muerte.

LIMITES DE TOLERANCIA PARA EL MERCURIO.-

Existen límites máximos para la concentración de mercurio en peces y estos varían de acuerdo a las diferentes condiciones que - cada país establece, a continuación vienen algunos límites propuestos por los siguientes países (5,7,16,28):

Alemania:

- 0.4 p.p.m. en atún
- 0.7 p.p.m. para peces de alta mar
- 1.0 p.p.m. para peces de ríos y lagos

Canadá y Estados Unidos:

- 0.5 p.p.m.

Finlandia y Suecia:

- 1.0 p.p.m.

Noruega:

1.5 p.p.m.

Sin embargo en México no se han hecho estudios de investigación al respecto, no obstante los límites máximos permisibles para mercurio en peces son basados en lo que ha establecido la Food and Drug Administration (U.S.A.), en el cual el límite es de 0.5-p.p.m., (13).

Toxicologicamente hablando es de primordial importancia conocer cual es la cantidad admitida diariamente de metales trazas en personas.

La junta de la FAO/WHO del Comité Experto en Aditivos de Alimentos, ha establecido una cantidad máxima admitida diariamente de 43 μg de Hg para una persona de 60 Kg (26).

De observaciones hechas en aquellas personas que fueron afectadas en Minamata y Niigata, Japón, como también datos clínicos colectados en habitantes normales de Suecia y Finlandia, los cuales se muestran en la siguiente tabla, asociando efectos con niveles de mercurio en sangre y pelo.

NIVELES DE MERCURIO EN SANGRE Y PELO HUMANO

	Sangre		Pelo
	Sangre total	Glóbulos rojos	
	$\mu\text{g/g}$		
Caso fatal (Niigata, Japón)	1.3	2.4*	500
Nivel mas bajo observado al comienzo de los síntomas (Japón).	0.2	0.4*	50
Nivel de "seguridad" propuesto, (La concentración máxima permitida para personal laboral expuesto.	0.1	0.2	
Niveles mas altos observados en consumidores de pescado sin síntomas.			
Suecia y Finlandia	0.1 a 0.7	0.2 a 1.3*	
Japón	0.2 a 0.7*		50 a 200
Nivel "aceptable" para la población en general. +	0.02	0.04	6
"Normal"	0.003*	0.005	2

* Calculado.

+ Basado en la cantidad aceptable admitida diariamente de 0.03 mg de Hg para un hombre de 70 Kg.

Este valor crítico en sangre de 0.2 $\mu\text{g Hg/g}$ fué calculado para corresponder al equilibrio de una cantidad admitida de 0.3 mg - de metil mercurio/día para un adulto de 70 Kg. Un factor de seguridad de 10 dá los siguientes niveles de "seguridad" para metil mercurio: en sangre total, 0.02 $\mu\text{g/g}$; para una cantidad aceptable o permitida diariamente de 0.03 mg/día para una persona de 70 Kg (13).

SELECCION DE METODOS.-

Existen varias técnicas para la determinación de mercurio en donde el tipo de análisis y la forma del método que se utiliza dependerá en gran parte de la clase de muestra que se desea analizar ya sea en aguas, tierra, aire o en alguna muestra biológica.

Se puede determinar en una muestra según lo que se quiera analizar ya sea el mercurio total inorgánico y orgánico o bien cada uno por separado, hay también técnicas para determinar los compuestos organomercuriales que separan e identifican solo el compuesto que se desea, como en algunos casos que se requiere saber de ~~la~~ -- existencia de algún compuesto muy tóxico, como puede ser el caso de la determinación del metilmercurio. Pero la mayoría de los métodos analizan el mercurio total de la muestra.

Es importante tomar en cuenta para efectuar un análisis muchos factores, como pueden ser, el tiempo requerido, el costo, la exactitud y sensibilidad del método que se desea utilizar o bien -- la disponibilidad de los materiales y reactivos que se empleen en dicho análisis.

La mayoría de los métodos requieren de una preparación de la muestra, con el objeto de dejar libre al mercurio de sus uniones -- con azufre y carbón en las moléculas orgánicas (6).

Esta materia orgánica puede ser destruída a través de dos -- formas: una que es por vía húmeda que se realiza en un medio fuertemente ácido, para lo cual se puede utilizar el ácido sulfúrico, -- el ácido nítrico, el ácido perclórico o bien mezclas de éstos en -- diferentes proporciones (16,19), además se utilizan agentes oxidan

tes tales como el peróxido de hidrógeno o bien el permanganato de potasio. La otra forma de destrucción de la materia orgánica es - por vía seca que consiste en quemar la muestra en una atmósfera - de oxígeno, ésto se puede llevar a cabo en un sistema cerrado pa- ra lo cual existe un matraz especial llamado de Schöniger o bien- puede quemarse la materia orgánica en una corriente de oxígeno -- (16,24).

Se debe tener mucha precaución en ambos casos para no tener pérdidas de mercurio debido a su alta volatilidad.

Los métodos más comunes para la determinación total de mer- curio en muestras biológicas son: determinación colorimétrica con ditizona, activación neutrónica, y espectroscopía por absorción a tómica.

Existen otros métodos pero no son muy usados frecuentemente como es la espectrometría de masas, en la cual la instrumentación empleada es muy cara y para efectuar los análisis se requiere de personal con mucha experiencia y habilidad, también la prepara--- ción de la muestra puede ser difícil y la interpretación del es--- pectro puede algunas veces ser tardada y tediosa. Pero la mejor - ventaja de éste método es el hecho de que otros elementos pueden ser determinados simultáneamente (6).

También existen las técnicas usando radioisótopos como la - llamada intercambio de isótopos, practicada en orina y en homoge- nados biológicos; para ésta técnica no se requiere de digestión - de la muestra, sin embargo los compuestos organomercuriales no son detectados mediante ésta técnica y ésto constituye la gran desven- taja para el método (6,7).

Las técnicas polarográficas han sido usadas para la deter--

minación de mercurio en soluciones acuosas. Para analizar tejidos por éste método se requiere de una separación preliminar de mercurio, que no es tan simple y rápida como la de los análisis colorimétricos con ditizona o los de espectroscopía por absorción atómica (6).

La fluorescencia atómica, es otra técnica en la cual es medida la intensidad de fluorescencia de los vapores de mercurio, excitados por una luz de una lámpara de mercurio, éste método se ha rechazado por su escasa sensibilidad (6,19).

Hay otro método un poco antiguo que se denomina de medición-microscópica, en el cual el mercurio estando en una solución ácida es depositado en un alambre de cobre el cual es sellado en un capilar de vidrio; después se calienta el alambre y se destila el mercurio, condensándose y colectándose en una o dos microgotas, cuyos diámetros son medidos en un microscopio contruido, con una escala micrométrica especial (11,16,20).

Existen además electrodos de ión-específico para determinar mercurio, combinado con un potenciómetro y un electrodo de referencia. Estos electrodos de ión-específico miden la cantidad de iones de mercurio libres en la solución y éstos representan sólo la fracción de iones mercurio que no han sido acomplejados por agentes hidroxilos, yoduros, cianuros, sulfuros u otros iones de tal manera que solo detecta una fracción del mercurio total en la solución pero ésta fracción puede bien ser fisiologicamente la mas importante (16).

Por otra parte tenemos las técnicas cromatográficas usadas en la separación e identificación de compuestos organomercuriales.

Las mas adecuadas son las de capa fina, papel y la de gas líquido, cada una requiere de una preparación a la muestra, efectuándose una extracción con solventes adecuados (6).

Estas técnicas son de suma importancia ya que los compuestos organomercuriales son altamente tóxicos, en especial los compuestos del metil mercurio, aún más que los correspondientes a compuestos del fenilmercurio (13). En estudios realizados en Suecia por análisis cromatográficos, en peces de aguas dulces, se encontró que el 92% del contenido total de mercurio era en la forma de compuestos derivados del metil mercurio y en peces marinos el porcentaje de éste mismo tipo de compuestos era de 82% del contenido total de mercurio (6).

Volviendo a los tres métodos citados en un principio, que vienen siendo los más usados para la determinación total de mercurio en muestras biológicas, se puede decir que el análisis colorimétrico se le ha llamado el método tradicional, aunque sea menos sensible que el de absorción atómica, y el de activación neutrónica (6,18).

Es necesario para efectuar un análisis por método colorimétrico de una digestión completa de la muestra, porque la materia orgánica que quedara en la solución podría combinarse con el mercurio y dificultar la extracción con la ditizona.

La oxidación de la muestra es por vía húmeda que es la que se ha venido usando con mayor frecuencia y la más adecuada para éste propósito, para lo cual se usan agentes oxidantes en un medio ácido caliente y controlado.

Hay que tener mucho cuidado para no tener pérdidas de mercurio por volatilización. Este método de oxidación por vía húmeda ha sido usado conjuntamente con el método colorimétrico con ditizona y en las determinaciones de absorción atómica por muchos años.

Este procedimiento tiene como desventaja el ser lento y la operación es tediosa.

Una vez estando la digestión completa, se agrega urea para eliminar cualquier óxido de nitrógeno que haya quedado, después se reduce cualquier sustancia oxidante remanente en la solución ya que podrían descomponer a la ditizona, para esto se puede emplear hidrazina o bien clorhidrato de hidroxilamina (2,16), y después de ajustar la acidez de la solución a un pH entre 2-4 (6,16), el mercurio es extraído con una solución de ditizona en un solvente orgánico como puede ser el cloroformo; esta reacción es relativamente específica para mercurio a este pH. En este paso llega a existir -- problemas ya que se puede presentar interferencia con el cobre, -- puesto que reacciona también con la ditizona (6).

Existe un procedimiento llamado de reversión, para eliminar la interferencia con el cobre, para lo cual se puede usar nitrito de sodio o bien tiosulfato de sodio. Se formará un complejo mercurio-tiosulfato, en la capa acuosa y el ditizonato de cobre no reacciona con el tiosulfato, entonces es eliminado, desechando la fase orgánica y después de descomponer el complejo mercurio-tiosulfato, el mercurio es de nuevo extraído con ditizona en cloroformo (6).

Después de este procedimiento de reversión para eliminar la interferencia con este metal se agrega el ácido etilendiamino te-

tracético (EDTA), para eliminar la reacción de cualquier remanente de cobre con la ditizona.

En otra técnica se agrega ac. acético que sirve como estabilizador del ditizonato de mercurio (6).

El mercurio puede ser extraído con ditizona en cloroformo y ser inmediatamente determinado colorimétricamente a 490 nm o bien extraiendo el mercurio con ditizona usando tetracloruro de carbono en la cual su absortividad es leída a 485 nm, puede también extraerse con benceno (6).

Para hacer el cálculo de la cantidad de mercurio en la muestra se compara el valor obtenido con una curva de calibración, en la cual se emplean soluciones estándares de mercurio y un testigo de referencia, efectuándose los mismos pasos de extracción que en la muestra (6).

Existe un problema con las grasas y ceras ya que en la digestión no pueden ser totalmente digeridas por los ácidos, la vía de solucionar ésto es eliminarla, enfriando la solución y filtrándola posteriormente (6,16,24).

Además se ha encontrado en estudios realizados a este respecto que la proporción es tan insignificante en estas grasas no digeridas, por lo que se sugiere su eliminación para evitar problemas posteriores (6).

Aparte de todo esto se han realizado varios cambios en todo el procedimiento tanto en la digestión como en la extracción del

mercurio, utilizando para ésto diferentes reactivos, tratando de - mejorar así el análisis colorimétrico e investigar además nuevas - técnicas con mejores resultados.

La otra técnica mencionada anteriormente también muy usada - en la determinación del mercurio total en muestras biológicas, co- mo el pescado, es la de activación neutrónica.

Esta técnica se basa en la activación con neutrones de los - isótopos naturales de mercurio existentes en la muestra. La concen- tración de mercurio en la muestra es determinada detectando las ra- diaciones de las especies radioactivas resultantes; se ha usado es- ta técnica además en muchas diferentes tipos de muestra como en pa- pel y semillas.

Con este método las muestras son irradiadas en tubos sella-- dos de cuarzo en un flujo de neutrones térmicos de 10^{12} neutrones/ cm^2 seg durante dos o tres días.

Después de un tiempo la radiación gama de 77 Kev del isótopo- 197 de mercurio (^{197}Hg), es medida con un analizador multicanal - (6).

Algunas variaciones técnicas se han realizado al método como también la separación química de mercurio del resto de la muestra- y de especies radioactivas que puedan interferir.

Se ha llegado a alcanzar sensibilidades altísimas utilizando este método y esto es la gran ventaja que presenta sobre los demás ya que detecta hasta ppb (partes por billón) en cada análisis, pe- ro viene siendo un poco lento, comparándolo con técnicas de absor-

ción atómica, sin embargo no requieren que las muestras sean digeridas lo cual constituye otro punto más a su favor (6). El inconveniente más grave es la necesidad de un reactor nuclear.

Aunque existe una de las variaciones al método que se llega a digerir la muestra ya irradiada, con el fin de obtener una presión mayor en la determinación y cuantificación del mercurio, siendo esto en material especial.

Otro factor que hay que tomar en cuenta es tener mucho cuidado con la temperatura normal de irradiación que es de 50°C, ya que se pueden tener pérdidas apreciables de mercurio, pero se han hecho estudios y modificaciones al respecto abatiendo la temperatura -- hasta -40°C, naturalmente acompañado de otra series de cambios (6).

El análisis de activación neutrónica es probablemente el más sensible y más confiable para determinar cantidades huella de mercurio en muestras biológicas, aunque como ya se dijo los análisis son tardados, además caros y requieren de personal muy bien adiestrado.

Probablemente el método más popular y más ampliamente usado en la determinación total de mercurio en muestras biológicas, es la espectroscopía por absorción atómica (6).

El método está basado en la medición de vapor de mercurio -- por absorción atómica, mediante el método sin flama o llamado también de vapor frío ya que la técnica usual con flama carece de sensibilidad para el análisis de residuos en tejidos, como el caso de las sardinas, por esto el método sin flama probó ser superior (6, -24, 27), para determinar cantidades trazas o huellas de mercurio. Además de ser más exacto, sensible y simple es rápido.

Sin embargo la muestra requiere de una digestión previa para destruir toda la materia orgánica presente.

Esta digestión se puede llevar a cabo por vía húmeda al igual que el método colorimétrico, esto necesita de cierto tiempo para obtener un buen resultado. Para lo cual se utilizan ácidos calientes, puede hacerse esta digestión en un matraz especial a reflujo constante o bien en baño María en matraces tapados adecuadamente, en este paso hay un punto muy importante que hay que tomar en cuenta que es el control de la temperatura, al igual que en cualquier digestión de materia orgánica en la que se deba determinar mercurio. Pues es bien sabido que serias pérdidas de mercurio pueden ocurrir debido a su volatilización, por lo que se debe tomar precauciones en no calentar la solución que contenga huellas de este elemento a muy alta temperatura, nó obstante se ha descubierto que todo el mercurio puede ser perdido aún a temperatura ambiente, en soluciones que contengan tan solo cantidades pequeñísimas de agentes reductores (16).

La manera más práctica y segura de evitar estas pérdidas es agregando una sustancia oxidante, como puede ser el permanganato de potasio o bien el peróxido de hidrógeno, aunque es más usado el primero, los cuales tienen un potencial de oxidación más alto que la relación existente entre $Hg(II)/Hg(I)$, (16,24).

Existe una posible dificultad que puede ser experimentada y es que el permanganato usado pueda contener ciertas huellas de mercurio, repercutiendo esto en un alto valor del testigo (16).

Además de ayudar el permanganato a evitar la volatilización del mercurio, es necesario para facilitar la oxidación completa de toda la muestra.

Por otra parte puede haber pérdidas debido a la adsorción - de huellas de mercurio en las paredes de vidrio de los matraces - empleados, adsorción también del mercurio en partículas coloidales sólidas y adsorción en emulsiones o grasas presentes, lo cual constituye otro problema pues afectará la exactitud de los resultados (7,12,19).

En ciertas ocasiones es necesario de ciertos requerimientos para completar mejor la destrucción de la materia orgánica, pues debido a esto en ciertas ocasiones habrá formación de espuma en el espectrofotómetro, por lo cual se pueden seguir diferentes procedimientos como pueden ser: a) dejar la solución con los ácidos y el permanganato toda una noche a temperatura ambiente, b) poner la solución en baño María a una temperatura constante de 50 a 60°C de una a tres horas, o bien c) colocar la solución en autoclave a 120°C y 15 lbs. de presión por 30 minutos aproximadamente (12,27), cabe mencionar que en cualquiera de estas opciones la muestra además del ácido que lleve deberá contener el oxidante para evitar pérdidas de mercurio y completar así la destrucción de la muestra orgánica.

Ha habido muchas variaciones en cuanto al uso mas adecuado de los ácidos durante la digestión y los que probaron mejores resultados y los más usados son el ac. nítrico, el ac. sulfúrico y el ac. perclórico aunque mezclados en diferentes combinaciones y concentraciones (12,24).

Existe otra manera de destruir la materia orgánica para liberar el mercurio, que es mediante la vía seca, la cual también se puede aplicar al método de absorción atómica, consistente en que--

mar la muestra en una atmósfera de oxígeno, lo cual tiene varias ventajas ya que es rápido y simple, además el oxígeno puede ser purificado del mercurio de una manera más fácil y barata que la purificación de los ácidos (16).

La volatilidad del mercurio es una ventaja en este caso ya que puede ser recuperado con bastante exactitud y precisión, aún de muestras que no se quemaron completamente y determinarse cuantitativamente el mercurio después de esta digestión.

La manera más adecuada de llevar a cabo ésto, es hacerlo en un sistema cerrado para lo cual se utiliza un frasco especial llamado de Schöniger o bien hacerse en una corriente de oxígeno- (16).

Después de efectuar la digestión, se hacen diluciones de la solución a un volumen constante, agregando agua bidestilada - éste paso de la dilución, junto con el de agregar el ácido o ácidos para la digestión y el de añadir el permanganato, deben hacerse con mucho cuidado evitando aumentos bruscos de temperatura para evitar ésto se usan baños de agua fría con cubos de hielo, manteniendo de esta manera la temperatura baja y evitando pérdidas de mercurio (27).

Una vez terminada la digestión, oxidación y dilución de la muestra el paso siguiente consiste en una reducción de toda la solución, para ésto es agregado una solución de clorhidrato de hidroxilamina (12,19,27), hasta que la solución se aclare, pues de esta manera sabremos que todo el permanganato en exceso está reducido, se agrega también una solución de cloruro estannoso, para reducir completamente a todo el mercurio presente en la so-

lución, e inmediatamente después de agregar el cloruro estannoso - se conecta el frasco con toda esta solución a una corriente de aire producida por una bomba aereadora y se hace burbujear en la solución, con el fin de volatilizar el mercurio, con este método el elemento es convertido en un vapor atómico que es lo que se desea obtener para introducirse y leerse en el espectrofotómetro.

Convertido el elemento en el vapor atómico, es colocado en un haz de luz emitido por una lámpara de cátodo-hueco, hecha del metal que está siendo determinado. Esta lámpara emite un espectro característico de este elemento. El espectro es particularmente intenso a una o varias líneas de resonancia. Los átomos que se encuentran en la nube de vapor, absorben energía en la línea de resonancia y la cantidad de radiación en la línea de resonancia será reducida por una cantidad proporcional al número de átomos del elemento (en este caso de mercurio), que se encuentran al paso del haz de luz. Un monocromador o selector, escoge la longitud de onda de la línea de resonancia y al final un fotodetector mide solamente la disminución de esa línea de resonancia, producida por la absorción de la muestra (6).

En la determinación del mercurio, la absorción en la línea de resonancia está en 2537 \AA , la cual es leída en la región del ultravioleta (6).

En si el procedimiento analítico de absorción atómica dura muy poco tiempo, a veces de un minuto, lo que sí toma tiempo es en la preparación de la muestra y aún así, esta preparación es un poco más rápida que la requerida para el método de extracción con di-tizona.

También en el método de absorción atómica se han realizado un sinúmero de modificaciones, tratando de mejorar su sensibilidad y - obtener una mayor exactitud y confiabilidad en el método.

DESCRIPCION SUMARIA DEL METODO.-

Este procedimiento describe la determinación de mercurio en tejidos de pescados o sardinas, por el método de espectroscopía por absorción atómica sin flama.

Basicamente el sistema opera como sigue:

100 ml de la muestra son tratados con ácidos sulfúrico y nítrico en la presencia de permanganato de potasio, para oxidar todo el mercurio presente en la forma de (Hg^{+2}). El exceso de permanganato es reducido a mercurio metálico con el cloruro estannoso. Un aereador es colocado en la solución con la muestra.

Una bomba aereadora mueve el aire a través de la solución, entonces el mercurio es evaporado y llevado en la forma de vapor a través de la celda de absorción. Absorbiendo el vapor de mercurio en forma atómica a 2537.7 \AA de la radiación emitida por la fuente luminosa con la lámpara de cátodo-hueco.

Este cambio de energía es entonces detectado y leído en la manera usual del espectrofotómetro de absorción atómica (14,21).

SECCION I

A.- EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS NECESARIOS.

El siguiente material y reactivos son usados para la operación estandar en el análisis de mercurio. Debe procurarse de preferencia que todos los reactivos estén libres de mercurio o lo más puro posi-

ble, lo mismo el material limpiarlo adecuadamente para evitar posibles contaminaciones que fueran fuentes de error en los resultados.

- Homogenizador para la muestra.
- Balanza analítica.
- Baño María o de agua con regulador de temperatura.
- Espectrofotómetro de absorción atómica, con su equipo de bomba aereadora y graficador.
- Micropipetas para un vol. de 0.1, 1.0 ml.
- Espátula acanalada.
- Matraces Erlenmeyer de 125 ml.
- Tapones de hule del No. 5.
- Botellas de DBO de 300 ml. con tapones de vidrio.
- Acido sulfúrico concentrado, $d= 1.84$
- Agua bidestilada o deionizada.
- Cristales de permanganato de potasio.
- Cristales de clorhidrato de hidroxilamina.
- Acido nítrico 5.6 N o al 35%.
- Acido sulfúrico 18 N o al 50%.
- Solución de clorhidrato de hidroxilamina al 1.5%.
- Solución de cloruro estannoso al 10%.
- Solución de permanganato de potasio al 5%.

B.- OPERACION Y PREPARACION DE LA MUESTRA.

Si es posible todas las muestras deben ser corridas por duplicado, lo mismo para el testigo y los estándares, para verificar la pureza de los reactivos y llevarlos a través de los mismos pasos de todo el procedimiento.

1.- Pesar entre 0.5 - 1.0 g de una muestra representativa del-

tejido de la sardina bien homogenizado, dentro de un matraz erlenmeyer de 125 ml. El peso de la muestra ($\pm 1\%$), es determinado pesando el matraz antes y después de la adición de la muestra. La muestra de la sardina ya homogenizada es transferida al fondo del matraz, mediante el uso de una espátula acanalada y teniendo cuidado de no tocar la paredes de dicho matraz.

2.- Agregar despacio y con cuidado 30 ml. de ácido sulfúrico concentrado al matraz erlenmeyer. Procurar tener frío el ácido y la muestra. Tapar la entrada del matraz con un tapón de hule del No. 5 y dejar el matraz por 15 min. aproximadamente a temperatura ambiente.

3.- Agite un poco el matraz para ayudar a dispersar la muestra y colocar después el matraz en un baño María a $50^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$, por un mínimo de dos horas.

4.- Quite la muestra del baño de agua y observe la solución. La muestra digerida estará altamente colorida, pero no deberá contener materia no disuelta. Si quedan algunas partículas visibles, significa que la digestión no está completa y por lo tanto deberá de continuarse, agregando 5 ml más de ácido sulfúrico concentrado y seguir calentando aproximadamente por una hora más.

5.- Enfríe la muestra a temperatura ambiente y muy lentamente transfiera el contenido a una botella de DBO de 300 ml, conteniendo 50 ml de agua bidestilada libre de mercurio. Hay que tener precaución con la botella de DBO, puesto que no está hecha de material pyrex o refractario, por lo que no debe someterse a cambios bruscos de temperatura, para lo cual se emplea un baño de agua fría con cu-

bos de hielo, evitando problemas.

6.- Enjuague el matraz con 20 ml de agua bidestilada libre de mercurio (enjuagando dos veces con 10 ml cada una) y agregar el agua de enjuague a la botella de DBO.

7.- Agregar lentamente cristales de permanganato de potasio a la botella. Hay que tener mucho cuidado de que no suba muy alto la temperatura empleando el baño de agua fría. Después de ésto la muestra se volverá café obscura y espumosa, cuando la espuma baje, se agrega más permanganato de potasio hasta que el color púrpura persista, lo cual indica que existe un exceso de permanganato, que debe tener la solución. Después calentar en baño María a 50° - 60°C o bien meter las muestras en autoclave a 120°C y 15 lbs de presión por 30 minutos como mínimo.

8.- Los reactivos en este paso y el permanganato de potasio - son agentes oxidantes:

a).- Añadir 5 ml de ac. nítrico 5.6 N y agite, esperar cerca de 45 seg.

b).- Añadir 5 ml de ac. sulfúrico 18 N y agitar, esperar cerca de 45 seg.

9.- Los reactivos en este paso son agentes reductores.

a).- Añadir 5 ml de la solución al 1.5% de clorhidrato de hidroxilamina y agitar. Después de esta adición la muestra deberá tornarse clara, para lo cual hay que esperarse cierto tiempo, (aprox.- 20 seg). Si ésto no ocurre, hay que agregar cristales de clorhidrato de hidroxilamina hasta obtener una solución clara, no colorida, debe permanecer la botella tapada como precaución.

b).- Añadir 5 ml de la solución al 10% de cloruro estannoso e inmediatamente insertar el aereador en la botella de DBO, con la -

muestra.

Nota: Si después de este paso, está aún presente cierta materia no disuelta, significa que el proceso de la digestión no fué completo, para ésto deberá prepararse una nueva muestra.

10.- Lea o bién grafique el valor de la muestra. La gráfica - puede obtenerse de un graficador especial acoplado al espectrofotómetro. La lectura también la puede dar directamente el aparato.

Nota: Es muy importante y conveniente usar después de obtener la lectura, la trampa para mercurio que es una celda con carbón activado, la cual está adaptada directamente al circuito de la bomba aereadora con el fín de evitar posibles contaminaciones con los vapores de mercurio.

11.- Quitar el aereador después de haber eliminado el mercurio y colocarlo en un frasco de DBO con agua destilada limpia.

SECCION II

A.- PREPARACION DE TESTIGOS Y ESTANDARES.

Las soluciones estándares son preparadas a partir de una dilu^ución con una solución estandar de mercurio conteniendo 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, que a su vez es hecha a partir de la solución patrón de mercurio de -- 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para obtener la solución patrón se disuelve 1.080 g de óxido de mercurio (II), HgO , en un volumen mínimo de ácido clorhídrico (1 + 1) y se afora a un litro con agua deionizada o bidestilada, que esté libre de mercurio.

Nota: en la actualidad existen ciertas casas comerciales que venden preparada con bastante exactitud esta solución patrón de mercurio.

Las soluciones estándares y los testigos deberán prepararse -- por duplicado como sigue:

1.- Añadir 2 gotas de una solución al 5% de permanganato de potasio a cada botella de DBO.

2.- Hacer varias soluciones agregando la cantidad de la sol., estandar de mercurio como se indica en la siguiente tabla.

Para los testigos o blancos no se agrega absolutamente nada -- que contenga mercurio, solo los reactivos y aforar después a 100 -- mililitros con agua bidestilada, al igual que la usada con las -- muestras.

TABLA PARA TESTIGO Y ESTANDARES.-

<u>Solución estandar de mercurio</u>	<u>Contenido de mercurio</u>
0.0 ml	0.0 (Testigo)
0.1 ml	0.1 µg (Estandar)
0.2 ml	0.2 µg "
0.5 ml	0.5 µg "
1.0 ml	1.0 µg "

3.- Seguir los procedimientos básicos al igual que para las -- muestras en la sección I,B, 2.

Hay que tener cuidado en marcar cada botella, etiquetándolas - de acuerdo al contenido de mercurio, para obtener un mejor control.

B.- LAVADO DE TODO EL MATERIAL DE VIDRIO.-

Este paso es muy importante para prevenir cualquier contaminación posible con mercurio, que pudiera falsar los resultados.

El procedimiento deberá ser como sigue:

- 1.- Lavar muy bien y cuidadosamente las botellas y matraces, usando jabón o detergente y agua bien caliente.
- 2.- Enjuagar una o dos veces con agua caliente de la llave.
- 3.- Lavar con aproximadamente 50 ml de ácido nítrico concentrado.
- 4.- Enjuagar dos o tres veces con agua caliente de la llave.
- 5.- Enjuagar dos veces con agua bidestilada e invertir la botella para que escurra y se seque.
- 6.- Tapar las botellas y matraces con sus tapones correspon--dientes y previamente lavados de la misma manera.

Nota: se puede además emplear una mezcla crómica y ácido clorhídrico concentrado para obtener una mejor seguridad en el lavado - (21).

PARTE EXPERIMENTAL.-

El primer lote de sardinas que se analizó, consistió en diez latas. Pesándose aproximadamente un gramo de muestra por cada la ta. Esta muestra tomada es producto de una homogenización de todo el contenido de la lata, en la cual venían un promedio de seis - sardinas medianas, acompañadas de una salsa de tomate con aceite. La homogenización se efectuó en una licuadora lavada de acuerdo a las instrucciones citadas anteriormente para material de vidrio, - de tal manera que la muestra pesada contenía una parte de el con- tenido homogéneo total de la lata de sardina.

Durante el procedimiento de preparación de la muestra, que - fué siguiendo los pasos normales de la técnica citada con anterio- ridad, solo se efectuaron pequeñas modificaciones. No se utilizó- el autoclave para completar la digestión, ni se empleó baños de a gua fría al efectuar las diluciones, ni al agregar los ácidos y - el permanganato.

Los testigos y estándares se corrieron de igual manera que - las muestras. El material se lavó adecuadamente, además todas las muestras, estándares y testigos se hicieron por duplicado.

La temperatura del baño María fué mantenida constantemente a 55°C durante 3 horas.

Una vez digerida la muestra se añadieron los agentes oxidan- tes y reductores, para leerse posteriormente en el aparato.

La lectura de los resultados fueron obtenidos en un espectro- fotómetro de absorción atómica, (Perkin-Elmer 403), con su adita-

mento especial de la bomba aereadora que viene con su desecante y trampa para el vapor de mercurio, además de ésto viene un graficador acoplado también al aparato , de donde se obtiene directamente la gráfica de todos los resultados.

La calibración del espectrofotómetro se hace de acuerdo a los requerimientos del aparato que vienen en un instructivo que a compañía a dicho aparato, además se deben tomar en cuenta ciertos parámetros de operación para mercurio, que vienen a continuación, (20):

INSTRUMENTO	PERKIN-ELMER	MODELO 403
LONGITUD DE ONDA	2536	Å
ANCHO DE BANDA	7	Å
FUENTE DE LUZ	LAMPARA DE CATODO-HUECO	6mA
SISTEMA DE ASPERCIÓN	BOMBA AEREADORA	

Al final se guardó parte de la muestra en frascos de vidrio-tapados y perfectamente lavados según las instrucciones citadas - con anterioridad para material de vidrio, teniendo de esta manera oportunidad de realizar más análisis con la misma muestra, en caso de que hubiera necesidad de hacerlo. Estos frascos debidamente etiquetados fueron guardados en refrigeración.

Para la modificación B o segunda gráfica obtenida se repite ron los análisis del primer lote, con las mismas diez muestras de sardinas, nada más que con ciertas variaciones en cuanto a la par te experimental. Para esta ocasión se pesaron por cada lata 5 y - 10 gramos, aproximadamente de la muestra ya homogenizada anteriormente, en sus matraces respectivos. Se digirieron utilizando en - esta ocasión, autoclave a 120°C y 15 lbs. de presión durante 3 ho

ras, se agregó permanganato suficiente para destruir la materia orgánica presente, todo lo demás fué en igual forma que para los análisis anteriores lo mismo sucedió para la lectura de los resultados. Se hicieron también testigos y estándares por duplicado de igual forma que la muestra.

La modificación C, o gráfica #3 corresponde a otro lote de diez latas de sardinas, completamente diferentes del primer lote analizado. Para esta determinación se volvió a pesar 5 y 10 gramos de muestra por cada lata, pero en este caso la homogenización de la muestra fué hecha en la licuadora, unicamente de las sardinas, sin la salsa entomatada con aceite, que viene acompañando al producto. Se agregó agua bidestilada para ayudar a moler las sardinas siendo una cantidad constante para todas las latas analizadas.

Para los primeros tres resultados obtenidos, no se utilizó el autoclave para la digestión, lo mismo que para los primeros cuatro estándares y un testigo leídos. Para el resto de los análisis - - contando los estándares y testigos, se efectuó digestión en autoclave durante seis horas. Los pasos restantes fueron hechos en igual forma que todas las muestras realizadas con anterioridad, además no se usó el baño de agua fría durante las diluciones.

Este siguiente análisis cuyos resultados corresponden a la modificación D en la gráfica #4, fué realizado en un nuevo lote de 10 latas de sardinas, diferente a las de los anteriores análisis. Pero en este caso se pesó la cantidad de 0.5 g de muestra, haciéndose unicamente 10 análisis sin duplicado pero, corriéndose estándares y testigos por duplicado.

Aquí la muestra homogénea correspondía a trozos de la sardina tomados de la parte carnosa cercana a la cabeza, eliminando la salsa que acompaña a la sardinas y no se agregó agua bidestilada como

como en el caso anterior.

El procedimiento de preparación y lectura fué hecho en igual forma que el citado anteriormente en la "Descripción Sumaria del Método", pero no se usó autoclave en la digestión, sin embargo se empleó baños de agua fría con cubos de hielo en todos los pasos, cuando se efectuaban diluciones lo mismo que al agregar el perman ganato de potasio.

En el momento de la aereación de la muestra, se empleó de - dos a tres gotas de alcohol octílico para las muestras con sardinas (7), como un agente antiespumante debido a que en el momento de efectuar la lectura, de no tener el antiespumante, la espuma - sube tanto que podría llegar a dañar seriamente el aparato, ad-- más se agregó alcohol octílico a los estándares pero no a sus du- plicados.

Se repitieron los 10 análisis anteriores para ésto se pesó - una cantidad aproximada de 0.5 g de muestra tomando de la sardina en la misma forma como se hizo en los 10 análisis anteriores y si guiendo el procedimiento normal para digestión, pero en este caso metiendo las muestras en autoclave por 2:30 horas, para completar dicha digestión, además la utilización de baño de agua fría en to dos los pasos de diluciones en los cuales sube muy alto la tempe- ratura. No se usó alcohol octílico como antiespumante pués no fué necesario, además se metieron estándares de Hg y cuatro testigos. De todo ésto se obtuvo los resultados de la modificación E, en la gráfica #5.

Para la siguiente determinación se efectuó un nuevo análisis por duplicado con las mismas diez muestras, que ya han sido analiu

zadas con anterioridad y de cuyos resultados se han obtenido las gráficas 4 y 5. Para estos análisis se siguió la misma operación con las mismas variantes, que las empleadas para la obtención de los resultados anteriores que se encuentran en la gráfica #5. - Siendo el peso de la muestra de 0.5 g, igualmente se corrieron - testigos y estándares, obteniéndose de estos resultados la gráfi ca #6, que corresponde a la modificación F.

La modificación G, es producto de una investigación para observar la influencia del permanganato de potasio en los testigos y estándares. Para ésto se prepararon cuatro grupos de testigos- y estándares con cantidades de 0.5 y 1.0 μg de Hg.

Al primer grupo se le añadió permanganato de potasio antes- de la digestión en autoclave, solo se agregaron gotas de la sol. al 5% de KMnO_4 después de la misma.

Al segundo grupo se añadió de unas 2 a 5 gotas de la sol. - al 5% de KMnO_4 antes de meter las muestras en el autoclave.

Al tercer grupo se agregó 10 ml de una solución al 5% de -- KMnO_4 y después se metieron en el autoclave.

Al cuarto grupo se agregó una cucharadita con la espátula a canalada, de cristales de permanganato de potasio, colocándose - después en el autoclave.

La duración del autoclave para todos los grupos fué de una- hora a 120°C y 15 libras de presión.

Los testigos contenían los mismos reactivos que los estándares excepto mercurio y fueron corridos en igual forma que los mismos.

El método seguido para estos análisis, fué de acuerdo a la operación normal, solo efectuando algunos cambios citados poste---riormente.

La solución de permanganato era libre de mercurio. Además - las soluciones de ácido nítrico y sulfúrico fueron añadidas antes de colocar las muestras en el autoclave.

Para obtener la modificación H, correspondiente a la gráfica #8, se probó un nuevo método, el de las Adiciones de Estándares - de mercurio (24,25,29). Este método consiste basicamente en agregar cantidades conocidas de mercurio a las muestras de sardinas - previamente homogenizadas, ésto al principio de la preparación de dichas muestras y correr las muestras de igual manera como se ha estado haciendo, en anteriores análisis, lo mismo se prepararon - testigos, los cuales siguieron las mismas condiciones que las - muestras.

Solo algunos cambios se efectuaron durante la técnica. Para-ésto se pesaron aproximadamente 0.5g de muestra, haciéndose por - duplicado las latas No. 27 y 28 del mismo lote de diez latas que se ha venido empleando para la obtención de las gráficas 4, 5, y 6.

Después de sacar las muestras del baño María, durante dos horas y media, se agregaron los estándares.

A la muestra No. 27 no se le agregó nada de mercurio, pero a

la 27^a se agregó 0.1 μg de Hg, después a la muestra No. 28 se agregó un estandar de 0.2 μg de Hg; y a la 28^a, 0.5 μg de Hg, también se corrieron dos testigos.

Después se agregó el permanganato en cristales y los ácidos nítrico y sulfúrico, colocándose posteriormente todas las botellas en el autoclave a 120°C por 2:30 horas. Una vez frías a temperatura ambiente se agregaron los agentes reductores y se procedió a su lectura.

En seguida se efectuó el análisis de cinco latas de sardinas - de un lote completamente nuevo, llevándose a cabo por el método de las adiciones de estándares, correspondiendo a la modificación I.

Se hicieron por duplicado todas las muestras lo mismo que para los estándares y testigos, pesando aproximadamente 0.5 g de la muestra homogenizada en un mortero perfectamente limpio. Para ésto se eliminó el jugo o salsa de tomate que acompaña a las sardinas y únicamente se tomó la parte más carnosa cercana a la cabeza de la sardina, donde se ha estudiado que se encuentra la acumulación máxima de mercurio (7), ésto sin tomar en cuenta a las víceras ya que este producto viene limpio.

Después de pesar las muestras se añadió dos gotas de sol. al 5% de permanganato de potasio a todos los frascos, tanto muestras como testigos y estándares, en seguida se agregaron los estándares a las muestras de sardina, siendo las cantidades de 0.1 y 0.2 μg de Hg, además se hicieron aparte estándares con cantidades de 0.1, 0.2, y 0.5 μg de Hg, después se agregó el ácido sulfúrico concentrado y se colocaron 2:30 horas en baño María a 55°C, pasado ésto se efec--

tuó la dilución a 100 ml con agua bidestilada empleando baños de agua fría durante la dilución. Una vez frías la muestras se añadió una cucharadita con la estpátula acanalada, de KMnO_4 en cristales a todas las botellas de DBO y se colocaron dos horas en autoclave a -120°C y 15 lbs de presión, se sacaron y se procedió normalmente a--gregando los ácidos nítrico y sulfúrico, después los agentes reductores para colocar la bomba aereadora y leer la cantidad de mercurio en el espectrofotómetro.

Estos resultados se obtuvieron tomando directamente la lectura del espectrofotómetro ya que el graficador se encontraba descompuesto en esta ocasión.

Después de ésto se analizaron otro lote de cinco latas de sardinas siendo todas diferente de las muestras analizadas anteriormente. Para estas se siguió el mismo método de las adiciones estándares. Efectuándose por duplicado tanto muestras como estándares y -testigos. La técnica seguida para estas muestras fué semejante a la usada para las anteriores, solo hubo ciertas variaciones en cuanto al tiempo empleado durante la digestión. En esta ocasión fué de 2 -horas en baño María y de 1:30 horas en el autoclave, todo lo demás se efectuó de igual manera que las cinco muestras anteriores.

Para estos análisis se obtuvieron los resultados en la gráfica No. 10, los cuales corresponden a la modificación J.

Por último se efectuaron algunos análisis empleando solamente-estándares y testigos. Para ésto se corrieron varios estándares con concentraciones de 0.1, 0.2, 0.5 y 1.0 μg de Hg, unos tratados en-iguales condiciones que las empleadas para la modificación J, es dede

cir con digestión empleando baño María y autoclave y los otros estándares fueron tratados sin digestión eliminando el baño María y el autoclave; también para los testigos un grupo fué metido a digestión y el otro no. Todo ésto corresponde a la modificación K.

RESULTADOS Y DISCUSION.-

Los resultados de la modificación A se toman como aceptables, aunque no se utilizó autoclave en la digestión, solo se empleó el baño María por tres horas, pero se alcanzó a digerir la muestra -- que pesaba aproximadamente un gramo, hay que tomar en cuenta que este peso es en base húmeda ya que la muestra era un homogenizado de toda la lata de sardina, las tres últimas muestras se echaron a perder, sin embargo los resultados de la modificación B, no son -- tan aceptables siendo las mismas muestras que las anteriores solo que en este caso se pesó 5 y 10 gramos por cada lata teniendo como resultado una formación de una capa de grasa que no se alcanzó a -- digerir, habiéndose usado el autoclave y en la mayoría de las muestras se dificultaba la lectura; solo la muestra No. 7 alcanzó a -- dar un valor más legible.

En los tres primeros resultados de la modificación C, que corresponde a un nuevo lote de sardinas diferente de las anteriores, hubo formación de espuma por lo que se interrumpió su lectura, además estas tres primeras muestras no se habían metido al autoclave para que se completara la destrucción de la materia orgánica y sí se obtuvieron resultados sin el problema de la espuma en las -- muestras restantes con digestión. Cabe mencionar que estas muestras correspondían a las sardinas molidas con un poco de agua pero sin el jugo o salsa de tomate en el que venían acompañadas, que -- contenía una capa aceitosa considerable.

Las modificaciones D, E, F y H, corresponden a un mismo lote de sardinas solo que en cada modificación se realizaron ciertos -- cambios en la técnica.

Para las muestras de la modificación D, se pretendió no utilizar el autoclave, sin embargo la muestra No. 21 no se alcanzó a leer por la formación de espuma, a pesar de que la cantidad de muestra correspondía a una más pequeña (0.5 g); que las pesadas anteriormente, pero de aquí en adelante las muestras corresponden unicamente al peso de la sardina, procediendo a usar un antiespumante en este caso el alcohol octílico (7). De esta manera sí se obtuvieron resultados en las muestras restantes. Se observó los resultados de los estándares comparando los que contenían antiespumante de los que no y todas las señales eran más bajas en aquellos que contenían el alcohol octílico, tomándose en cuenta para efecto de los resultados todos los estándares conteniendo el anti espumante.

La muestra No. 27 dió un valor muy alto en la modificación D posiblemente debido a contaminación posterior, sin embargo se repitieron los análisis en las modificaciones E y H, nada más que en este caso sí se empleó autoclave para completar la digestión de toda la materia orgánica, observándose que el valor dá más bajo en estas modificaciones. El resultado de los cuatro testigos de la modificación E, están aceptables, además el resultado de las muestras es bastante aceptable.

Los resultados de la modificación F, son rechazados en su totalidad, la razón es debida a contaminación de testigos ya que su valor dió demasiado alto.

En la modificación G se puede ver la posible influencia que tiene el permanganato sobre testigos y estándares.

El primer grupo analizado que fué metido al autoclave sin permanganato solo se añadieron gotas de la solución del mismo después de sacarlas del autoclave, dió como resultados señales muy bajas - tanto en los testigos como en los estándares, comparándolos con - las lecturas de los grupos restantes.

Los grupos 2, 3 y 4 dan lecturas más semejantes entre si, aun que los resultados del grupo 3 y 4 tienen más similitud tanto en - sus testigos como en los estándares teniendo en consideración que - ambos grupos tienen un exceso de $KMnO_4$ uno en solución y el otro - en cristales, contrario al grupo 2 que solo contenía gotas de la - solución al 5% de permanganato de potasio.

En cuanto al resultado de los testigos de los cuatro grupos, - sí aumenta el valor con el exceso de permanganato pero no una cantidad considerable de tomarse en cuenta.

En la modificación H, se probó el método de las Adiciones de Estándares con el uso del autoclave y exceso de permanganato de - potasio.

Para ésto se escogieron la muestra No. 27 debido a su valor - tan alto que resultó en la gráfica 4 de la modificación D, tratan do de verificar de nuevo ese valor y además se tomó la muestra No. 28 debido a que el resto se encontraba contaminado con hongos.

Los resultados fueron bastante buenos según este nuevo método ya que la lectura de los estándares dieron de acuerdo a la canti-- dad contenida de mercurio.

Enseguida se obtuvieron buenos resultados utilizando este método de las Adiciones de Estándares con las cinco nuevas muestras cuyos resultados vienen de la modificación I, además usando el baño María y el autoclave con exceso de permanganato en cristales, - se alcanzó a digerir bastante bien sin presentarse problemas posteriores.

Los resultados de la modificación J, son bastante aceptables donde se repite el método anterior con nuevas muestras solo acortando los tiempos de digestión tanto en autoclave como en baño María, obteniendo una digestión completa de la muestra.

Para efecto de los resultados se dan todos en p.p.m. (partes por millón), donde:

$$\frac{\mu\text{g Hg}}{\text{g de muestra}} = \text{p.p.m. de Hg}$$

o bien puede hacerse la relación a volumen:

$$\frac{\mu\text{g Hg}}{\text{ml de muestra}} = \text{p.p.m. de Hg}$$

y de esta manera estandarizar los resultados en una misma unidad (6,19,20,21,27).

Los resultados finales se pueden apreciar en la tabla No. 1.

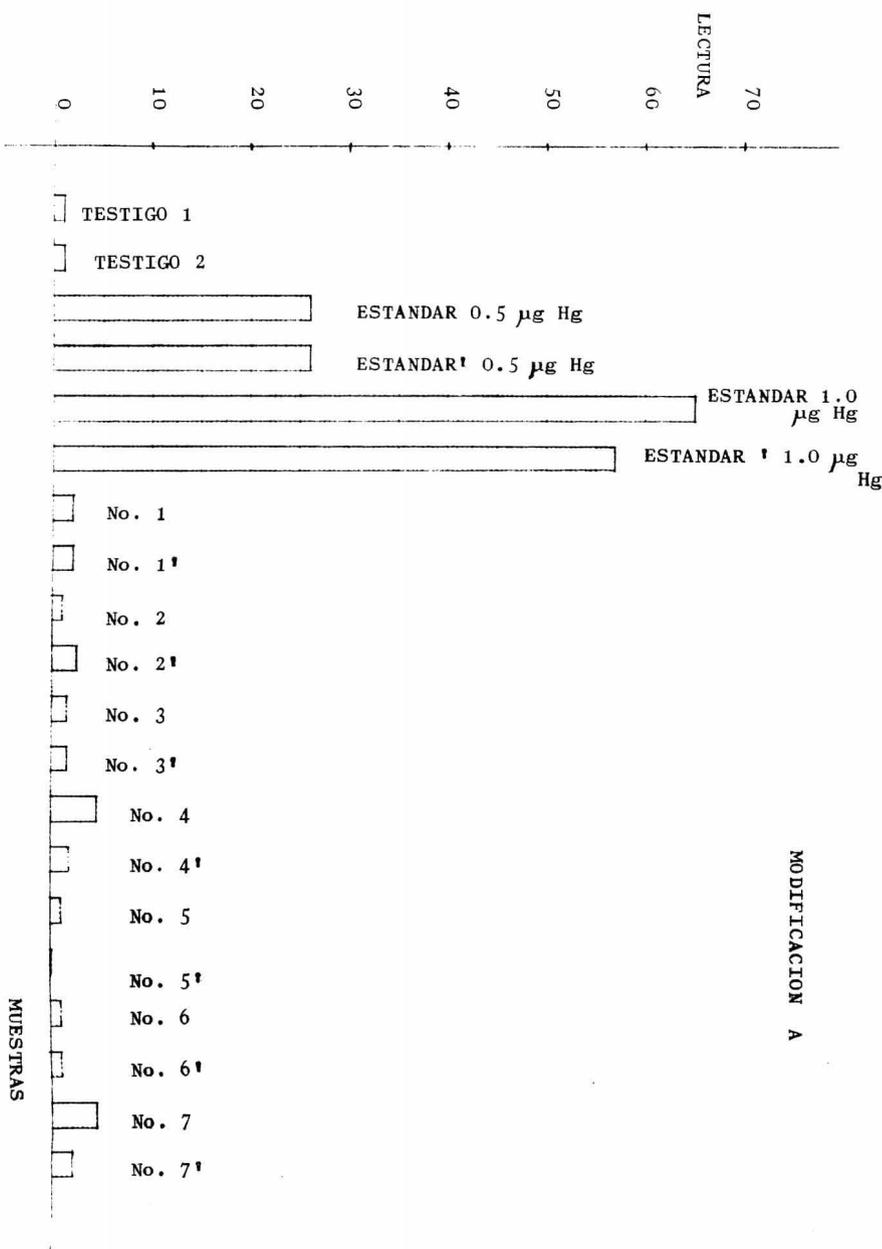
T A B L A No. 1

MODIFICACIONES	A	B		D	E	F	H
LATA No. 1	0.018	0.001	LATA No. 21	0	0.181	0	
LATA No. 2	0.027	0.001	LATA No. 22	0.190	0.195	0	
LATA No. 3	0.009	0.001	LATA No. 23	0.132	0.273	0	
LATA No. 4	0.039	0.001	LATA No. 24	0.360	1.807	0	
LATA No. 5	0.005	0.001	LATA No. 25	0.452	0.337	0	
LATA No. 6	0.005	0.001	LATA No. 26	0.130	0.246	0	
LATA No. 7	0.040	0.156	LATA No. 27	4.162	0.145	0	0.15
LATA No. 8	-	0.001	LATA No. 28	0.093	0.194	0	0.15
LATA No. 9	-	0.001	LATA No. 29	0.056	0.142	0	
LATA No. 10	-	0.001	LATA No. 30	0.076	0.193	0	
CLAVES	07			07'			

MODIFICACIONES	C		I		J
LATA No. 11	0	LATA No. 31	0.001	LATA No. 36	0.096
LATA No. 12	0	LATA No. 32	0.001	LATA No. 37	0.168
LATA No. 13	0	LATA No. 33	0.001	LATA No. 38	0.109
LATA No. 14	0.104	LATA No. 34	0.001	LATA No. 39	0.258
LATA No. 15	0.088	LATA No. 35	0.001	LATA No. 40	0.285
LATA No. 16	0.114				
LATA No. 17	0.043	CLAVES	04'		04''
LATA No. 18	0.055				
LATA No. 19	0.001				
LATA No. 20	0.001				
CLAVE	04				

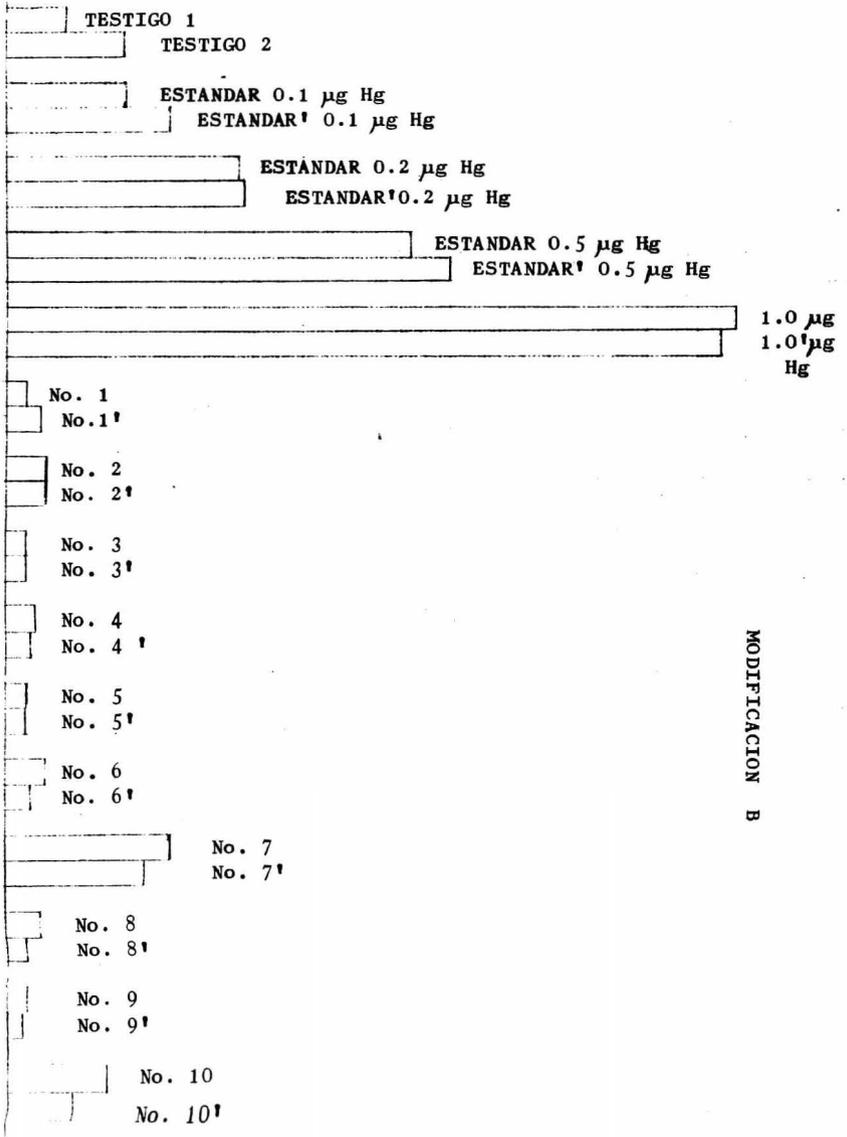
RESULTADOS DE LAS SARDINAS EN ppm DE Hg.

*Los resultados son promedio de menos de cinco determinaciones.



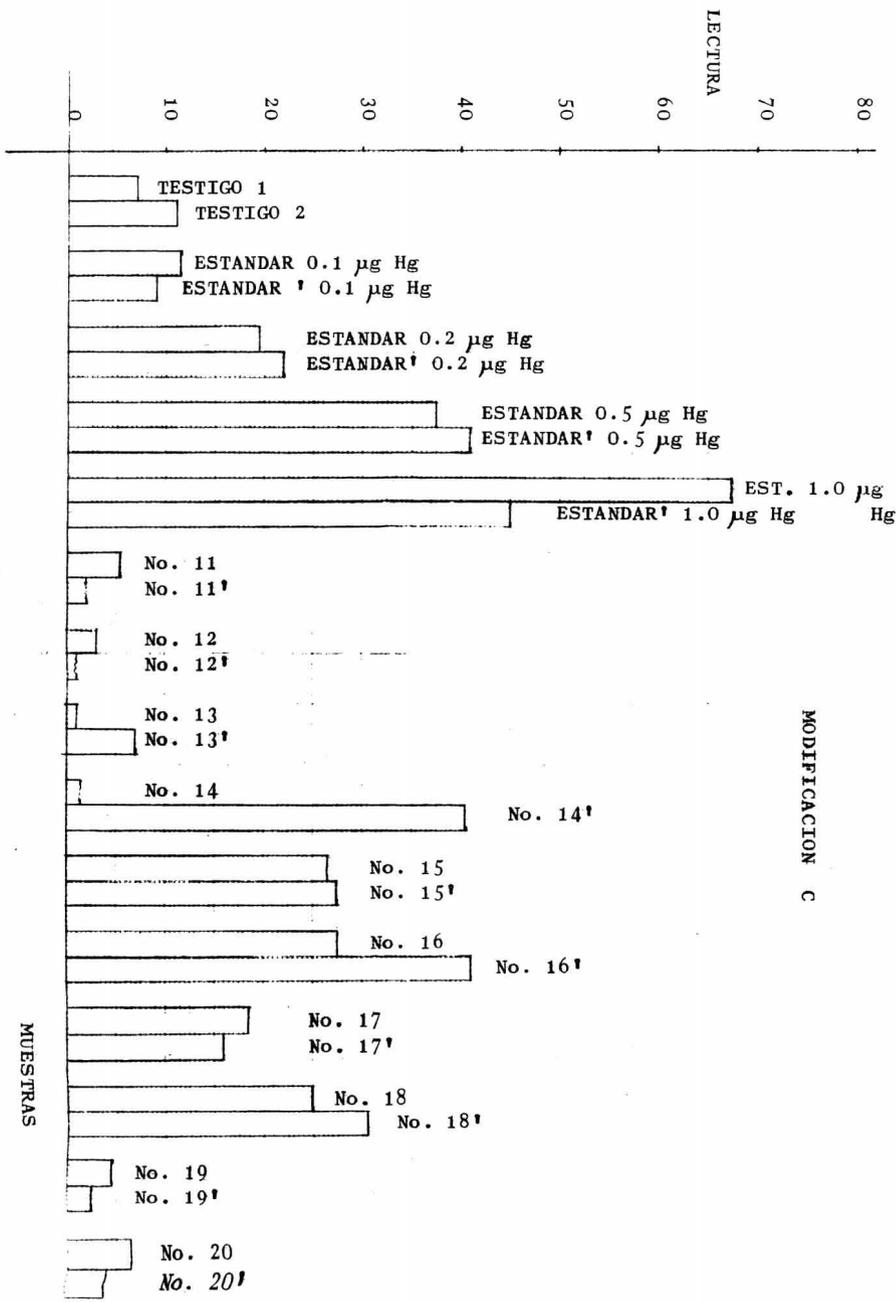
LECTURA

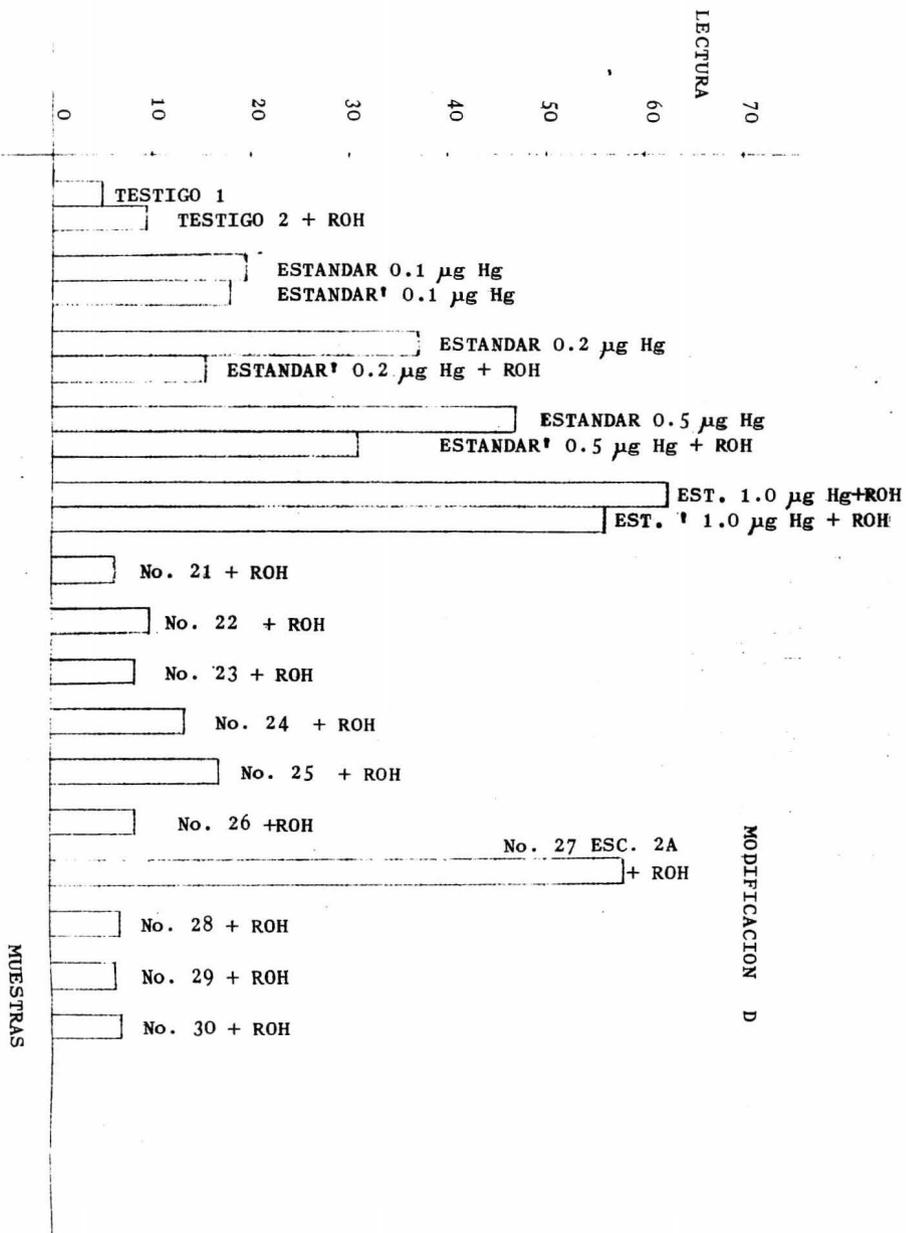
0 10 20 30 40 50 60 70 80



MODIFICACION B

MUESTRAS

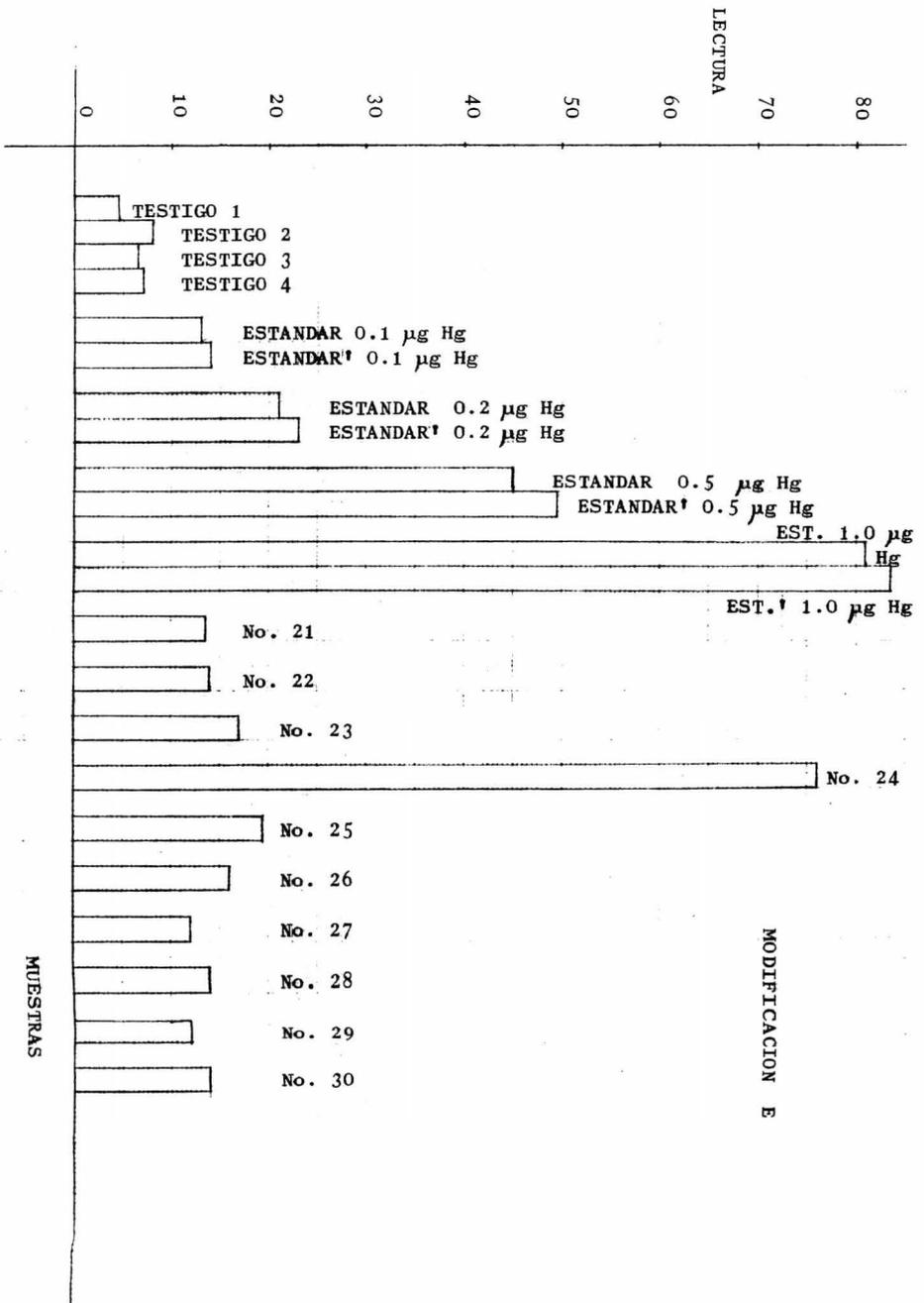


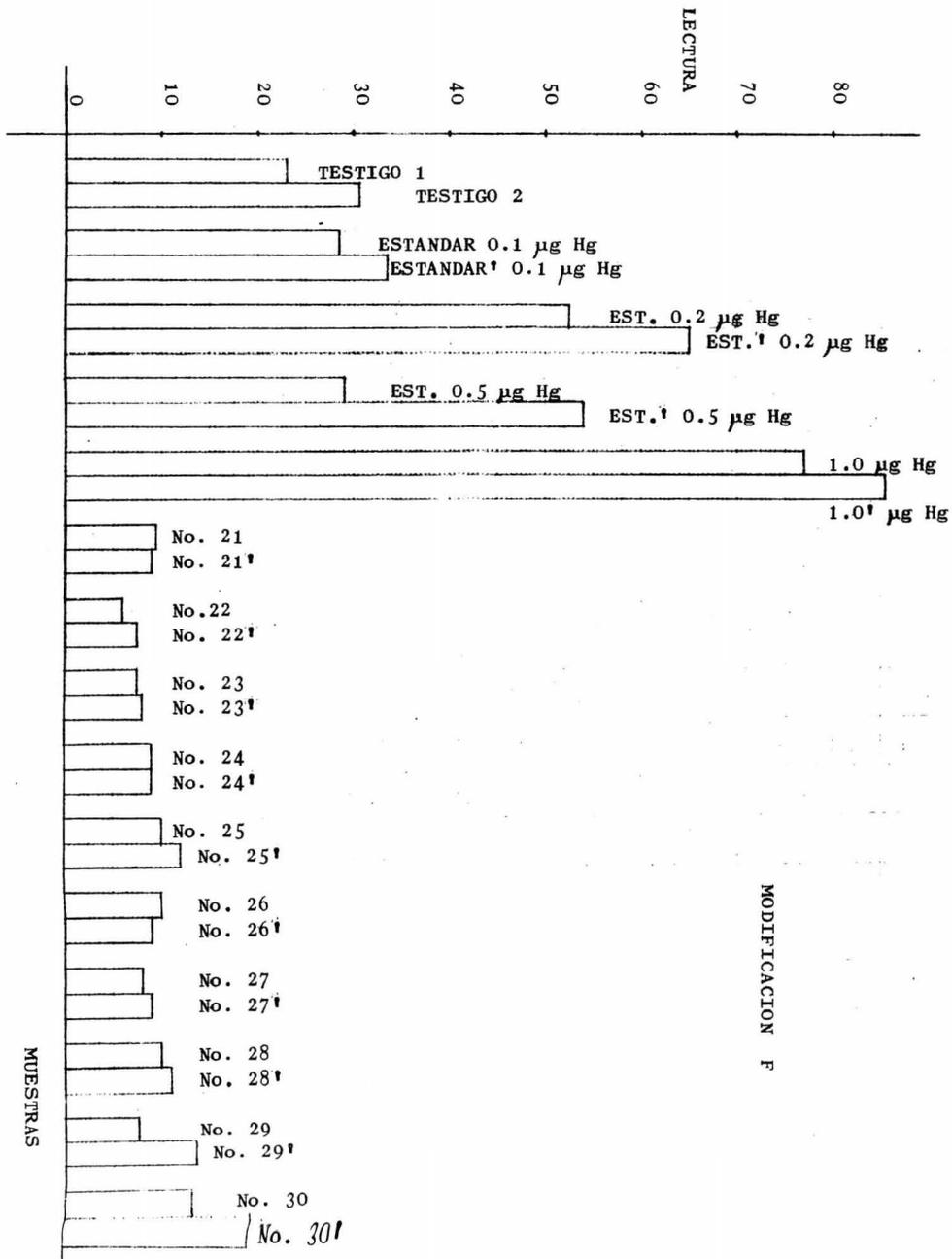


MUESTRAS

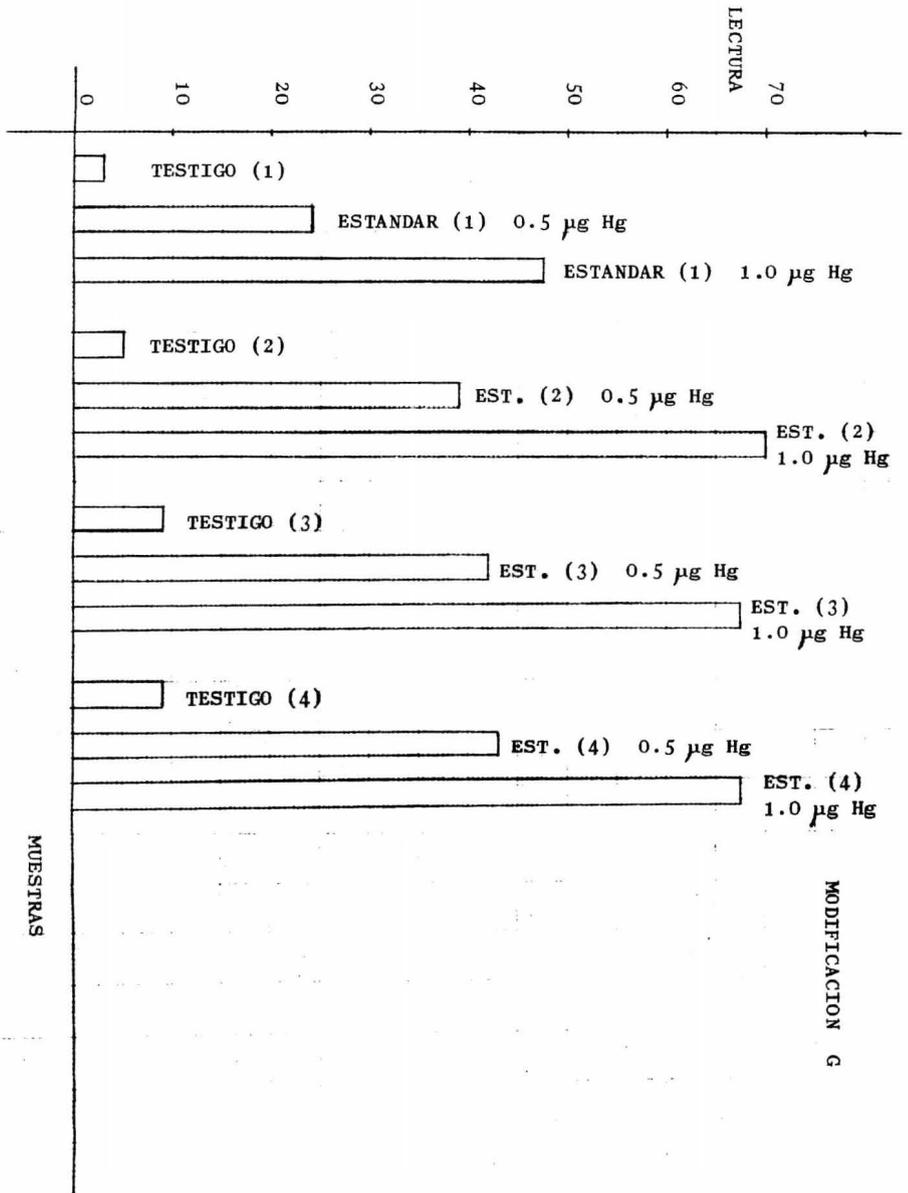
LECTURA

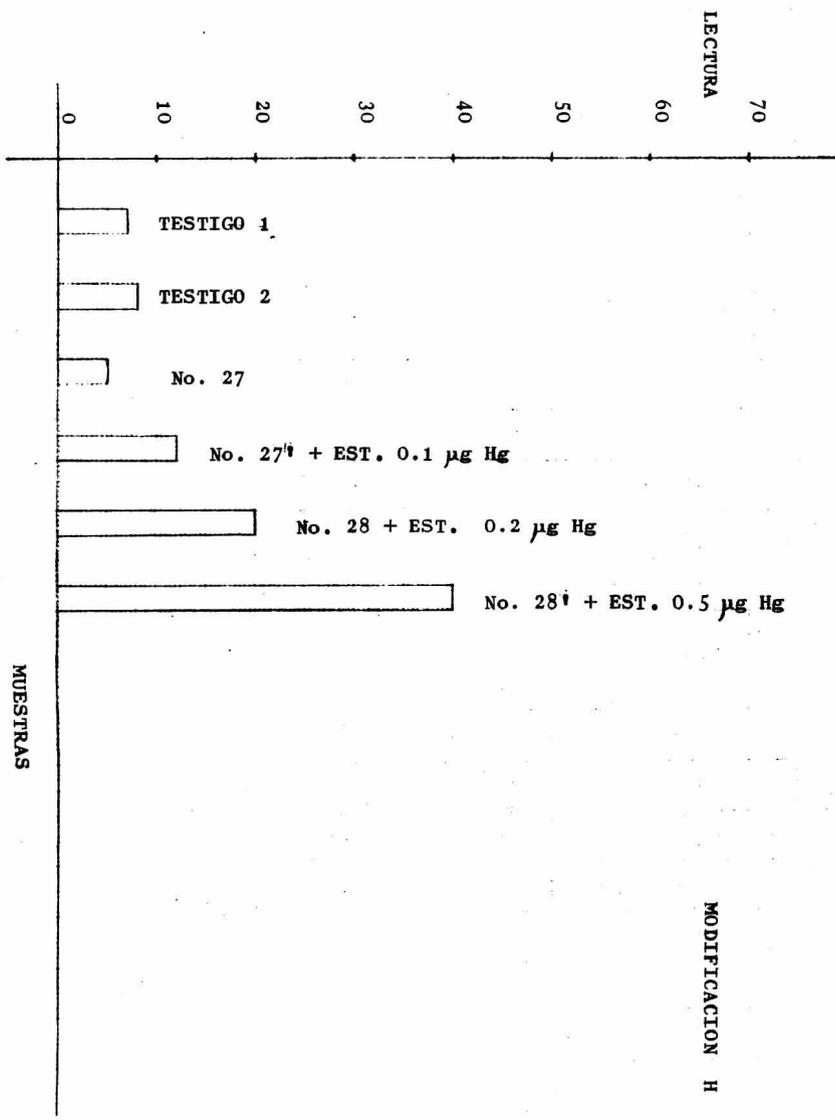
MODIFICACION D





MODIFICACION F

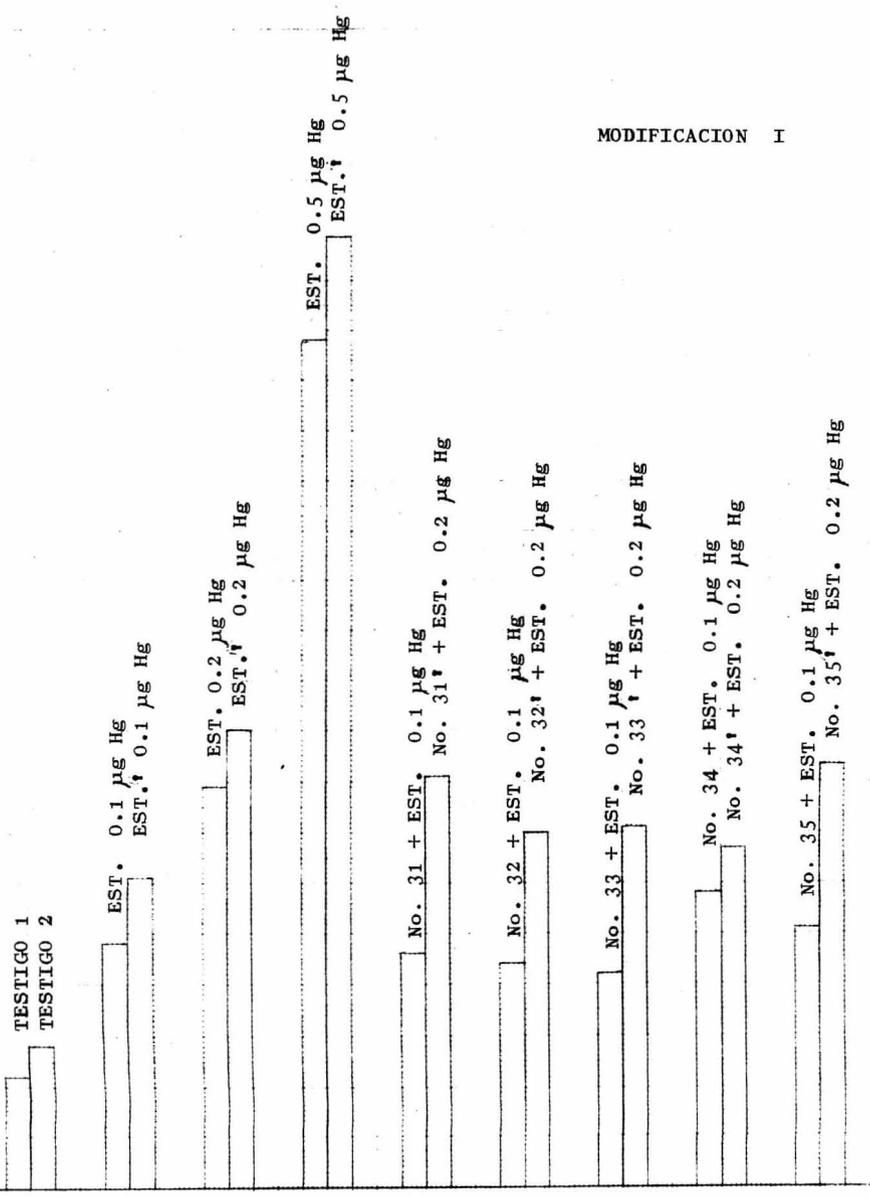




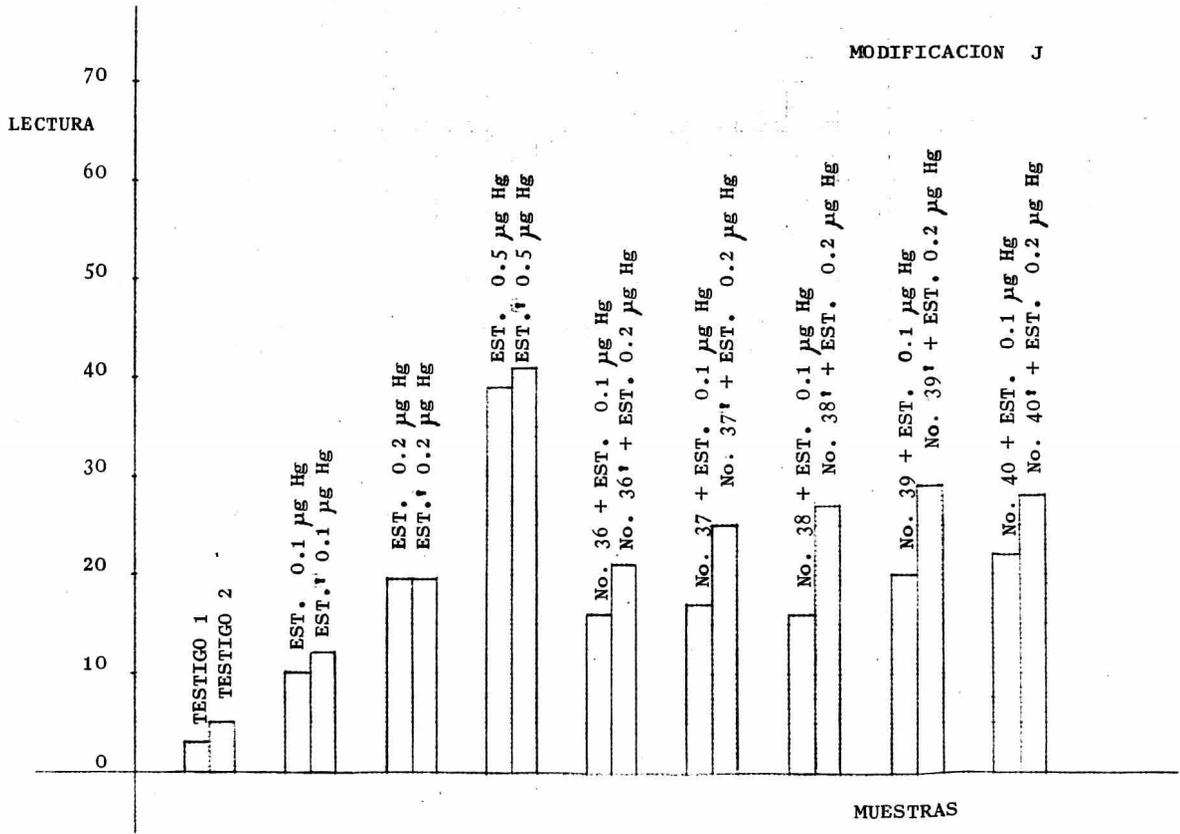
LECTURA

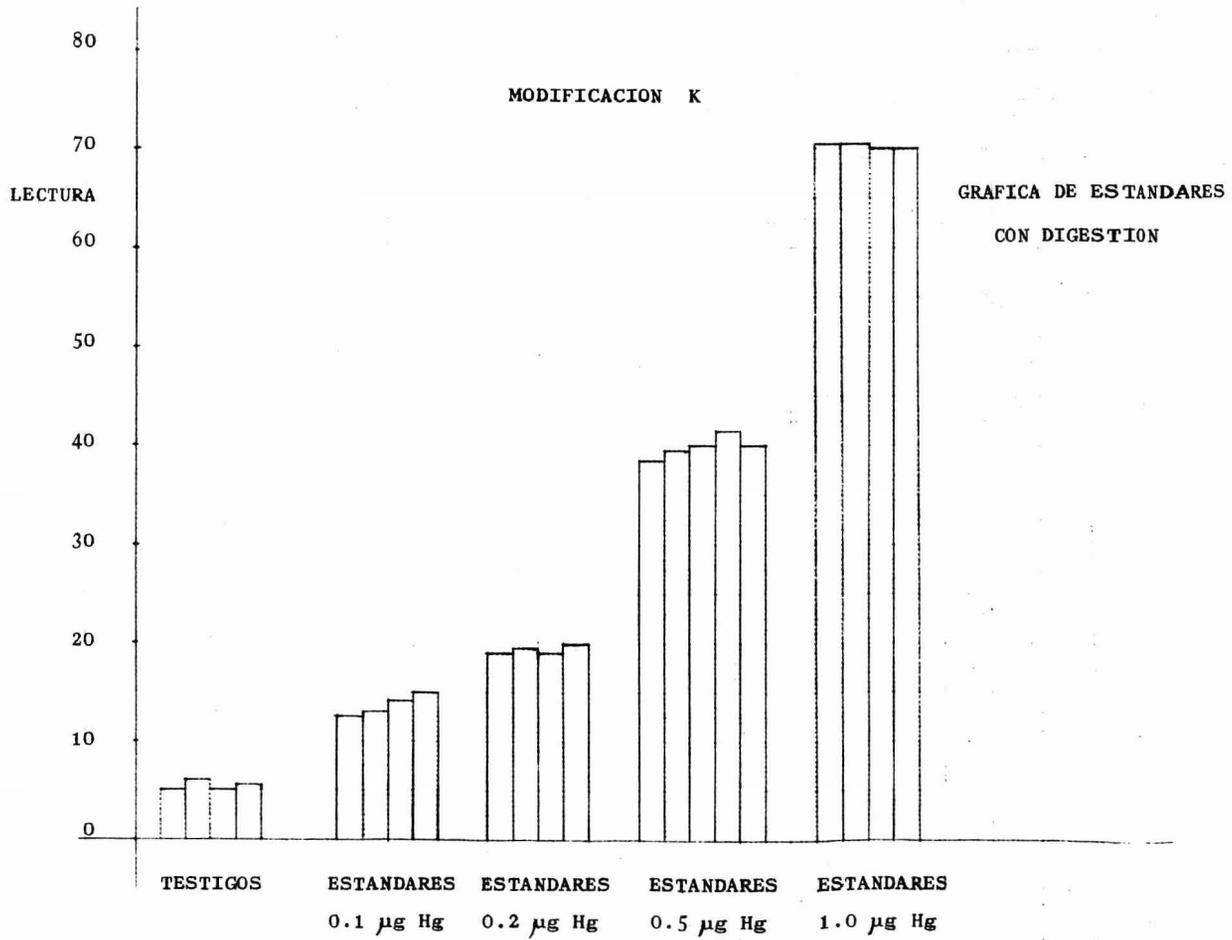
MODIFICACION I

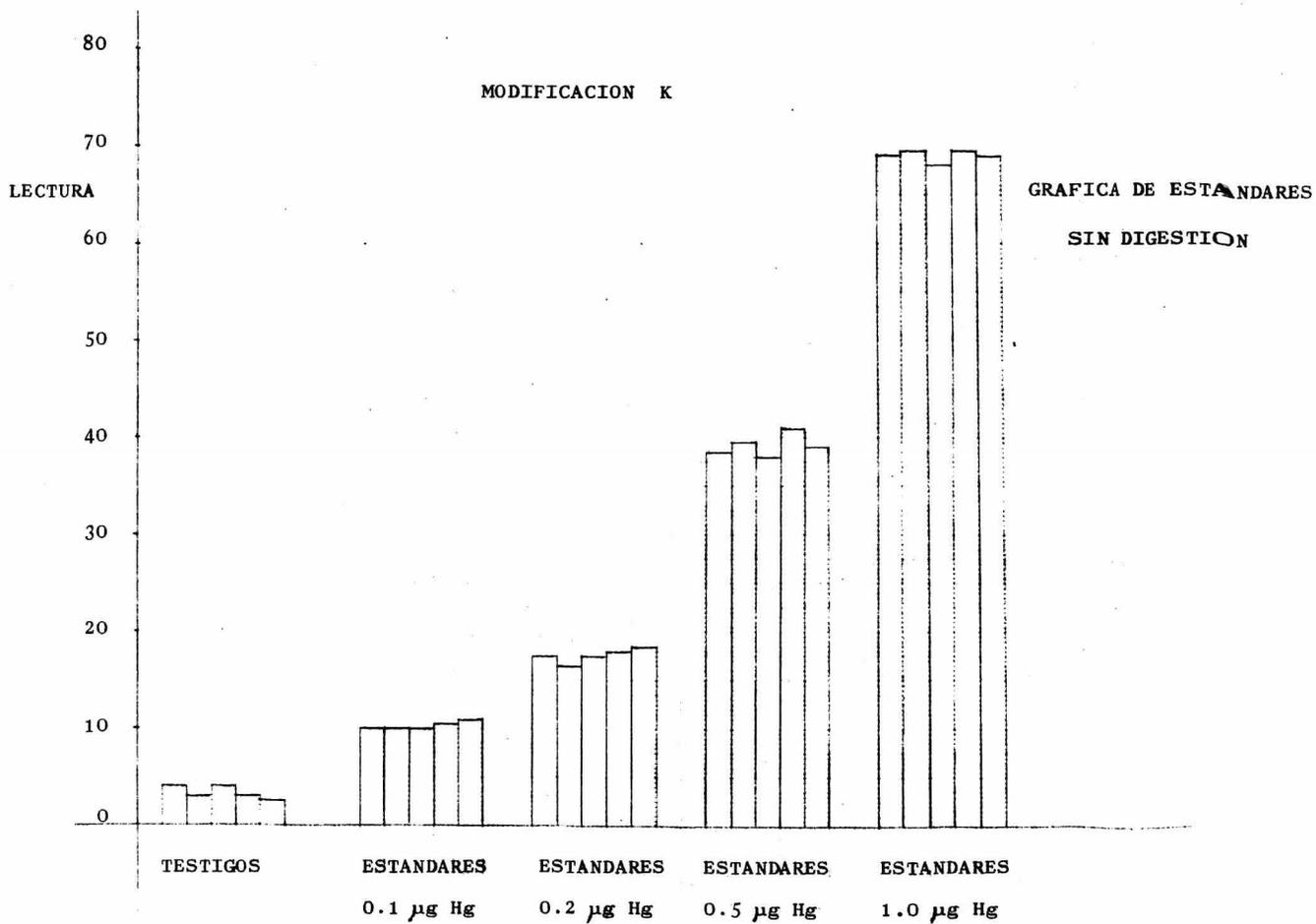
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
09
08
07
06
05
04
03
02
01
0

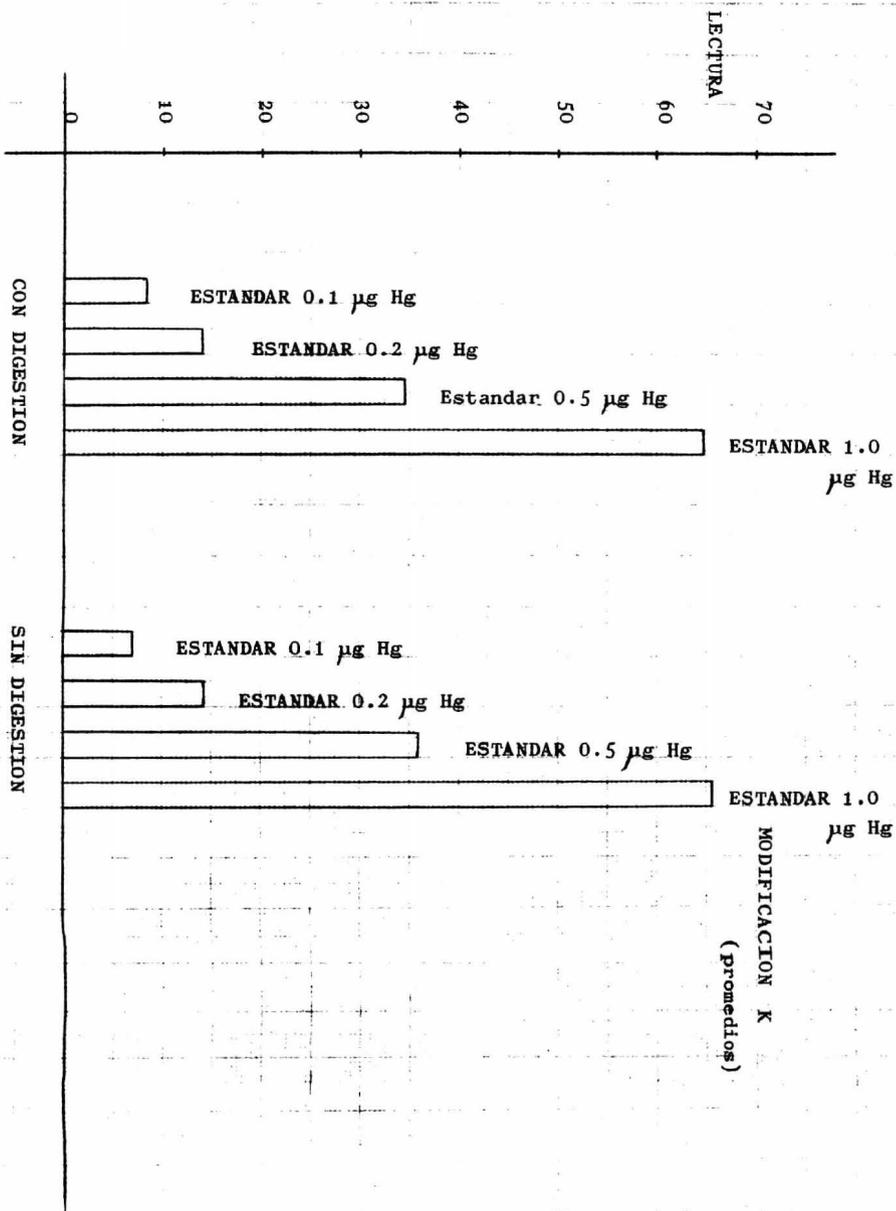


MUESTRAS



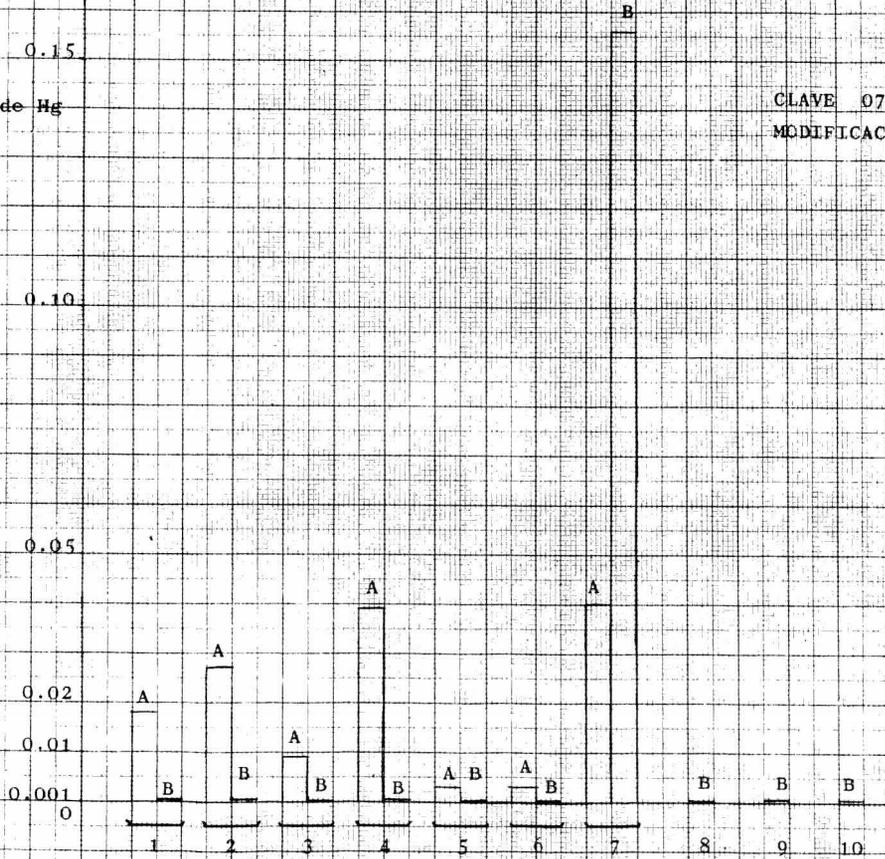


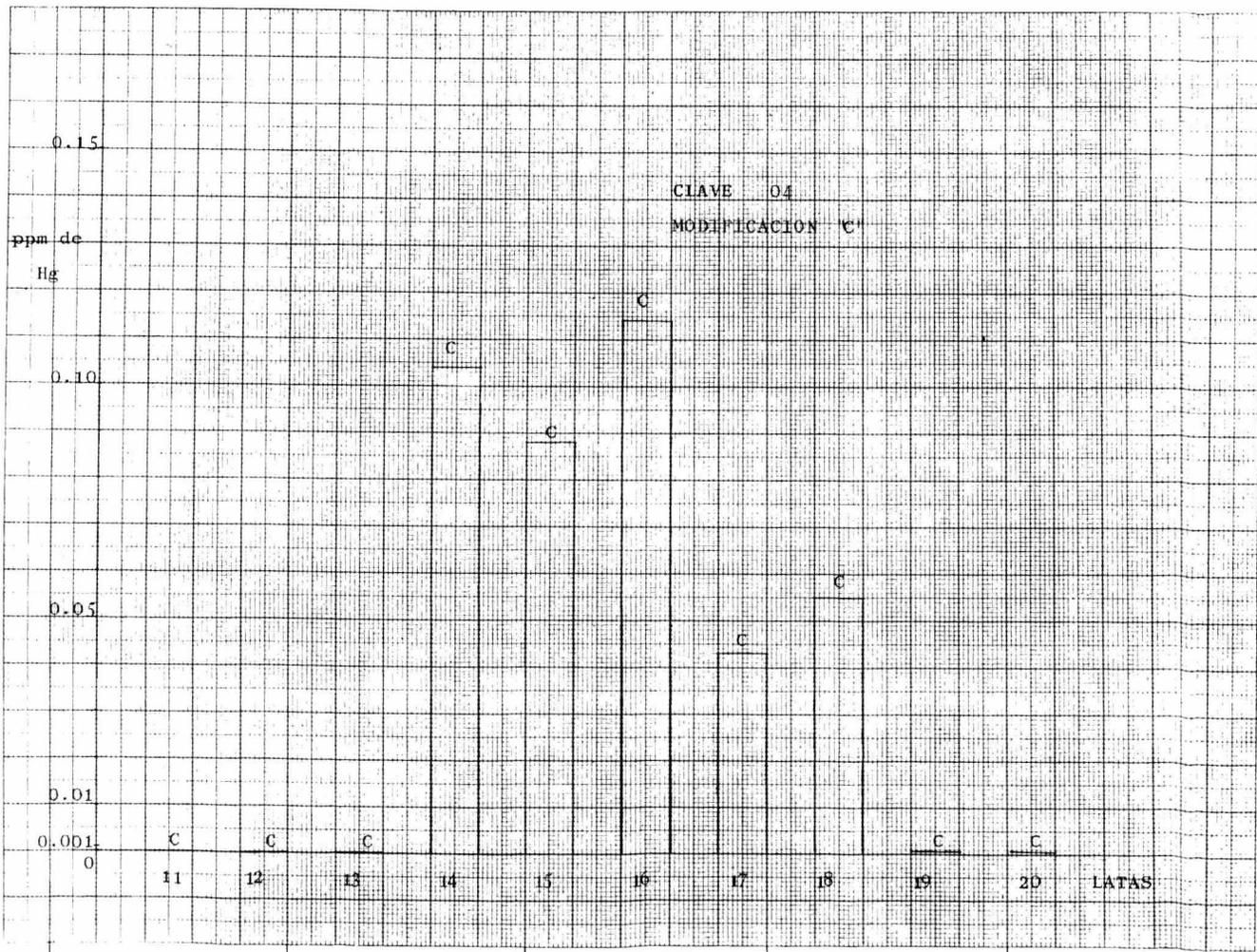


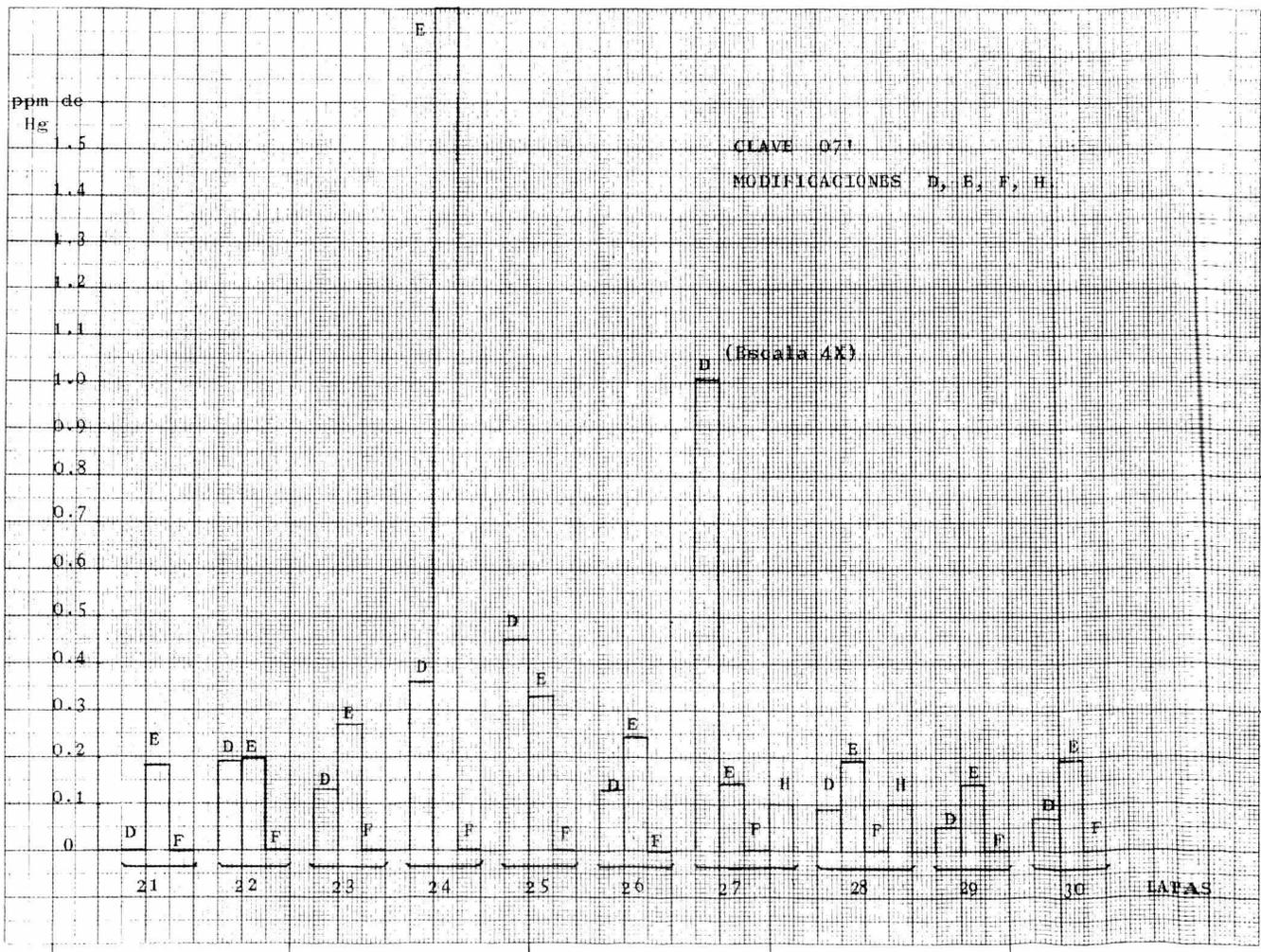


ppm de Hg

CLAVE 07
MODIFICACIONES A, B.







CLAVE 041
MODIFICACION I

0.004

ppm de Hg

0.003

0.002

0.001

0

I

I

I

I

I

31

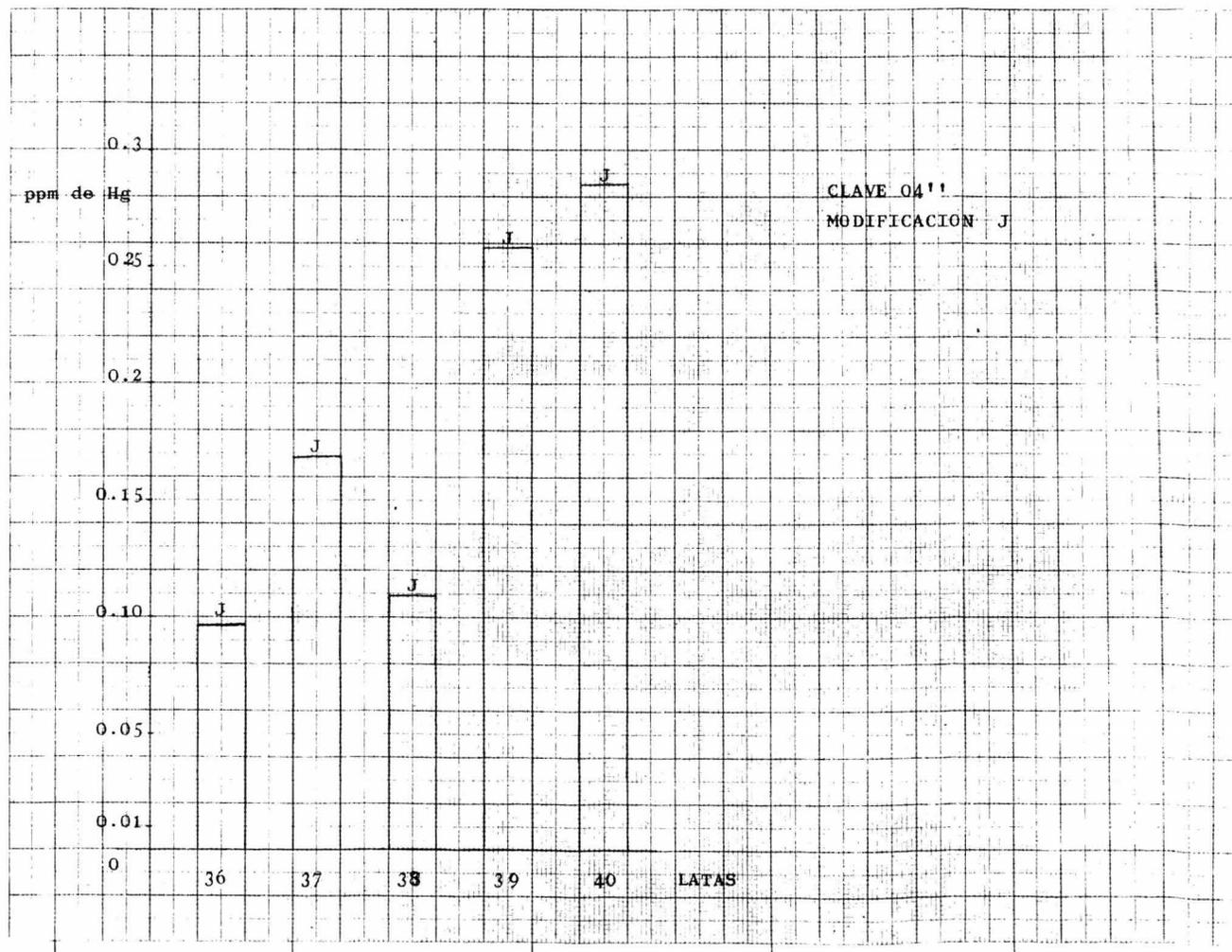
32

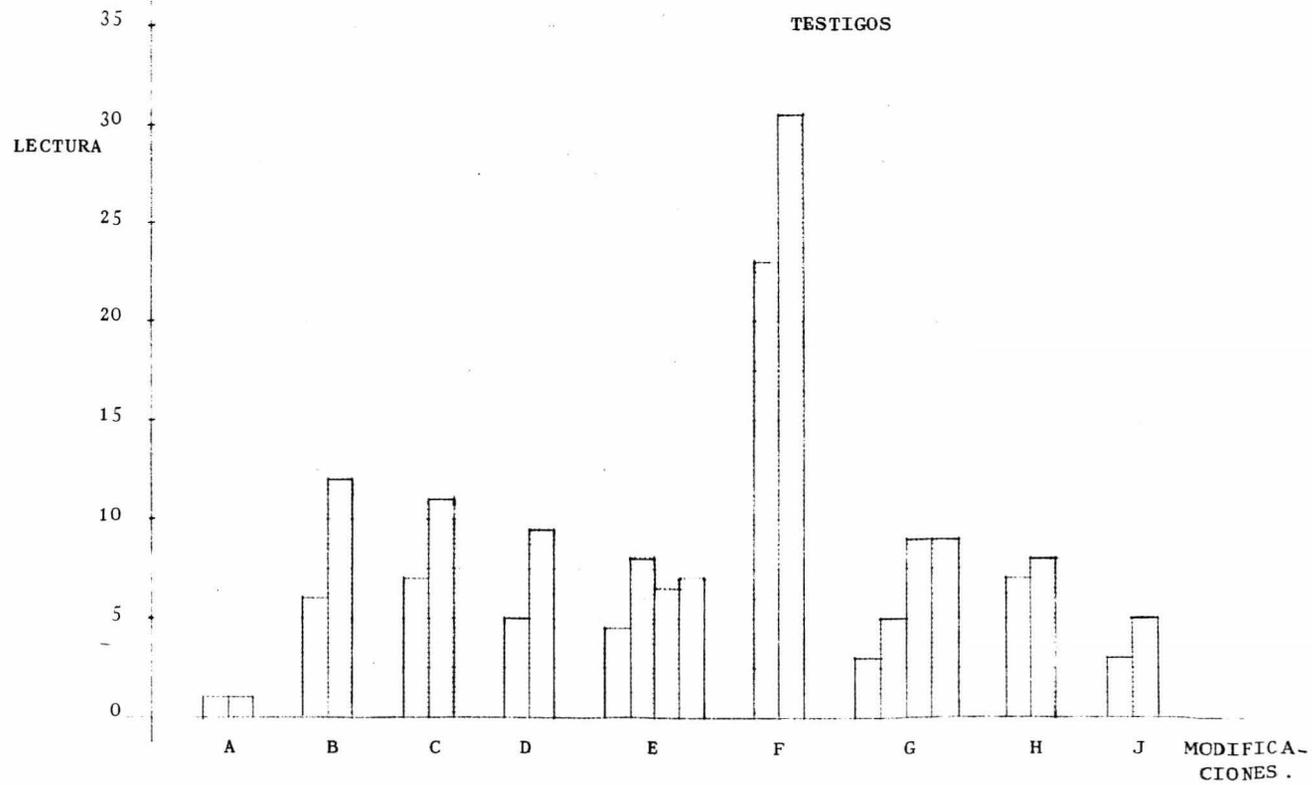
33

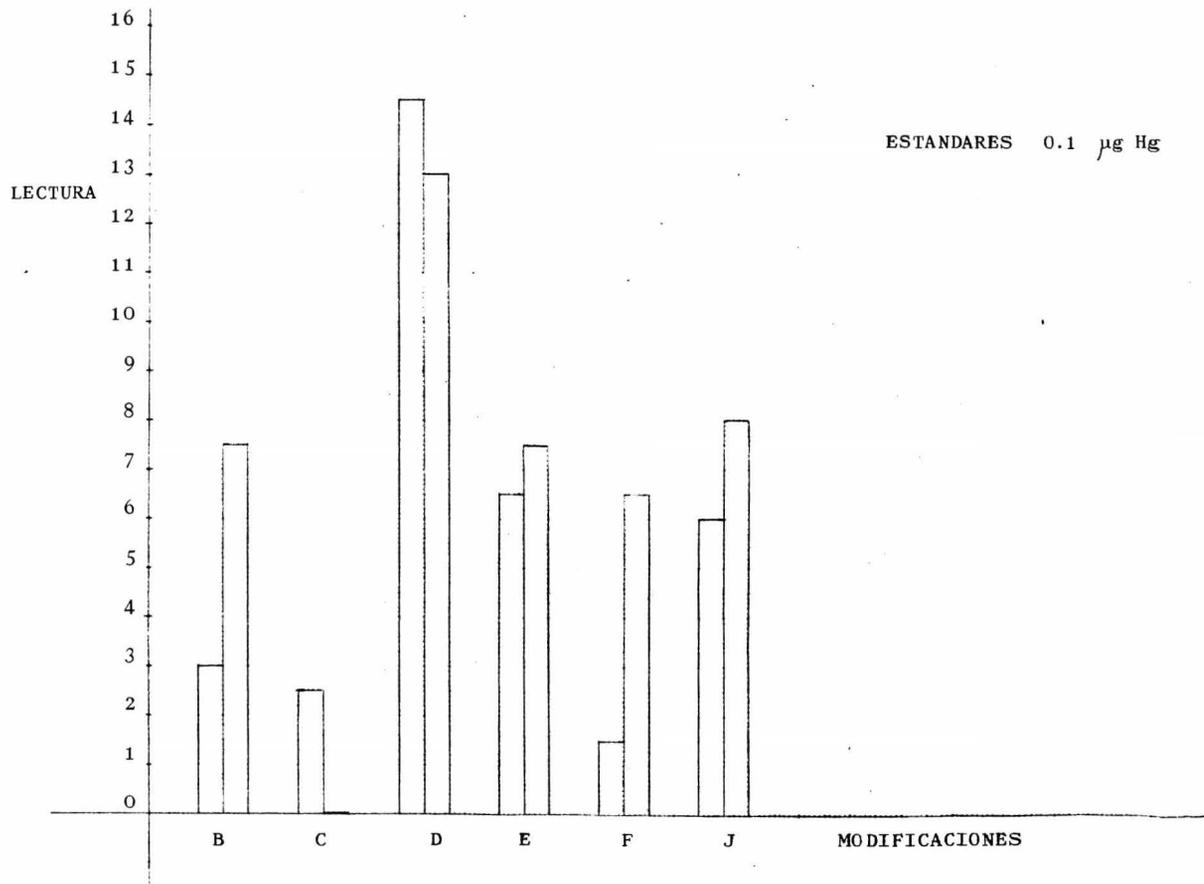
34

35

LATAS

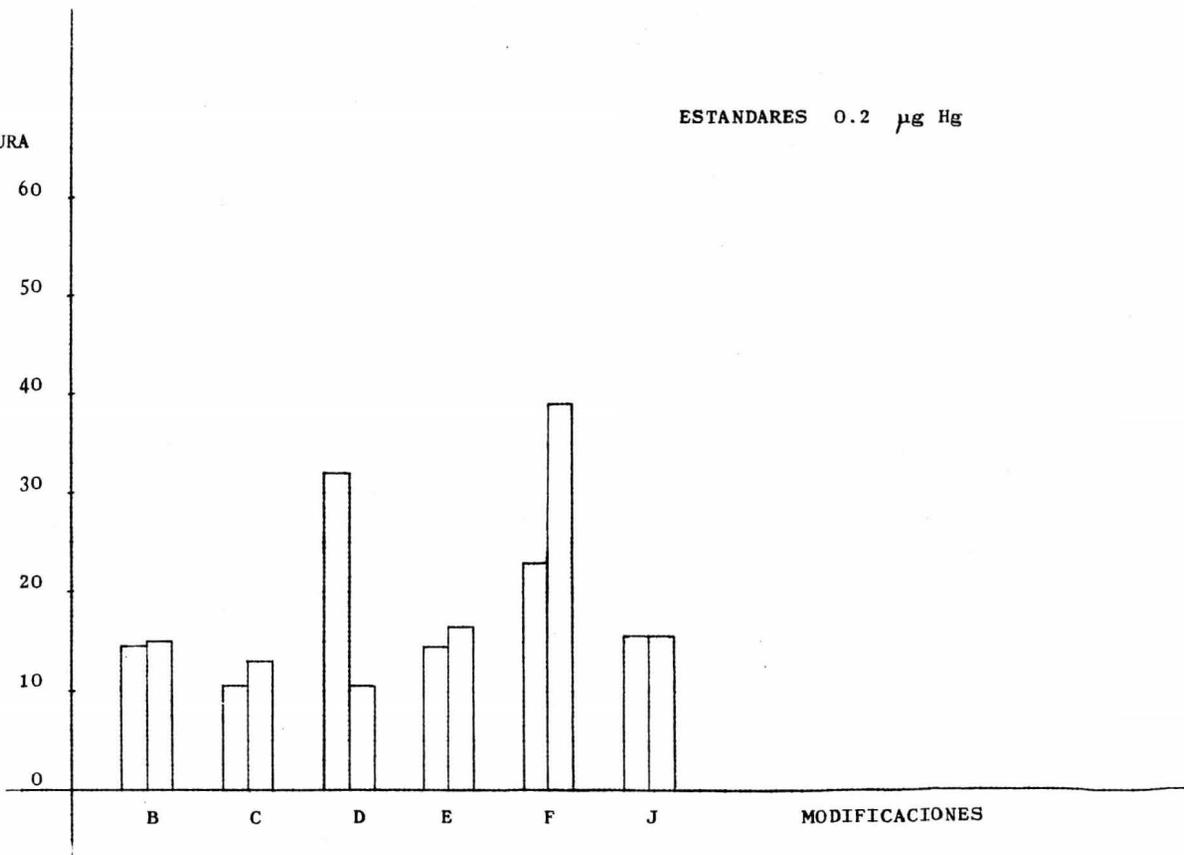


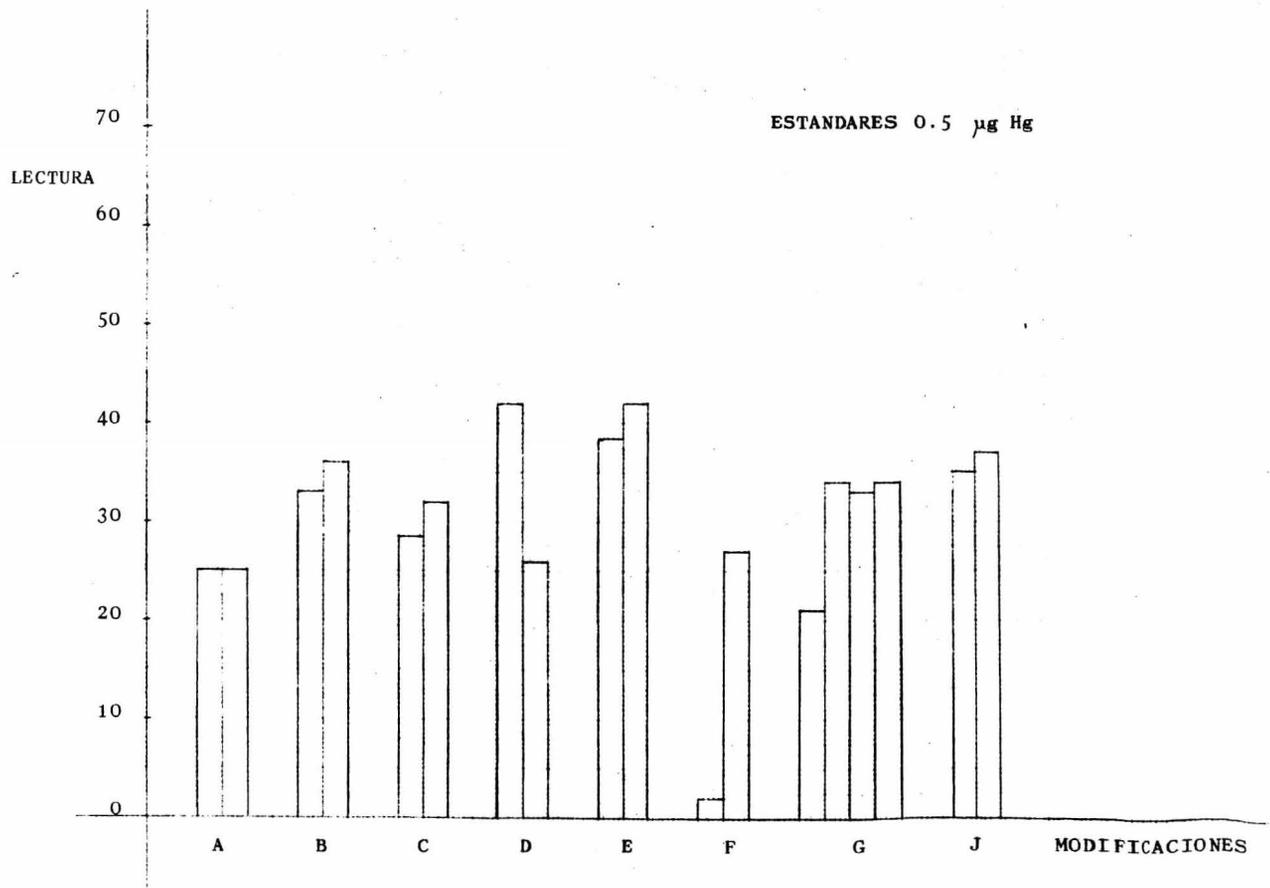




LECTURA

ESTANDARES 0.2 $\mu\text{g Hg}$





LECTURA

60

50

40

30

20

10

0

0.1-0.2

B

0.1-0.2

C

0.1-0.2

D

0.1-0.2

E

0.1-0.2

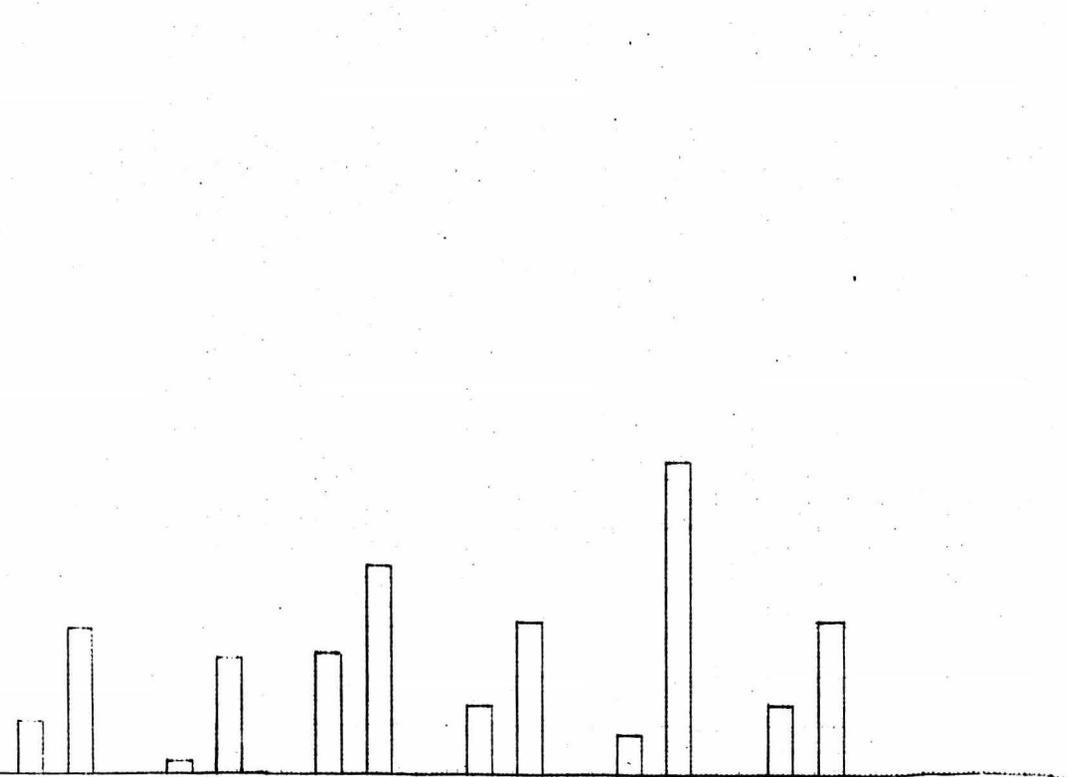
F

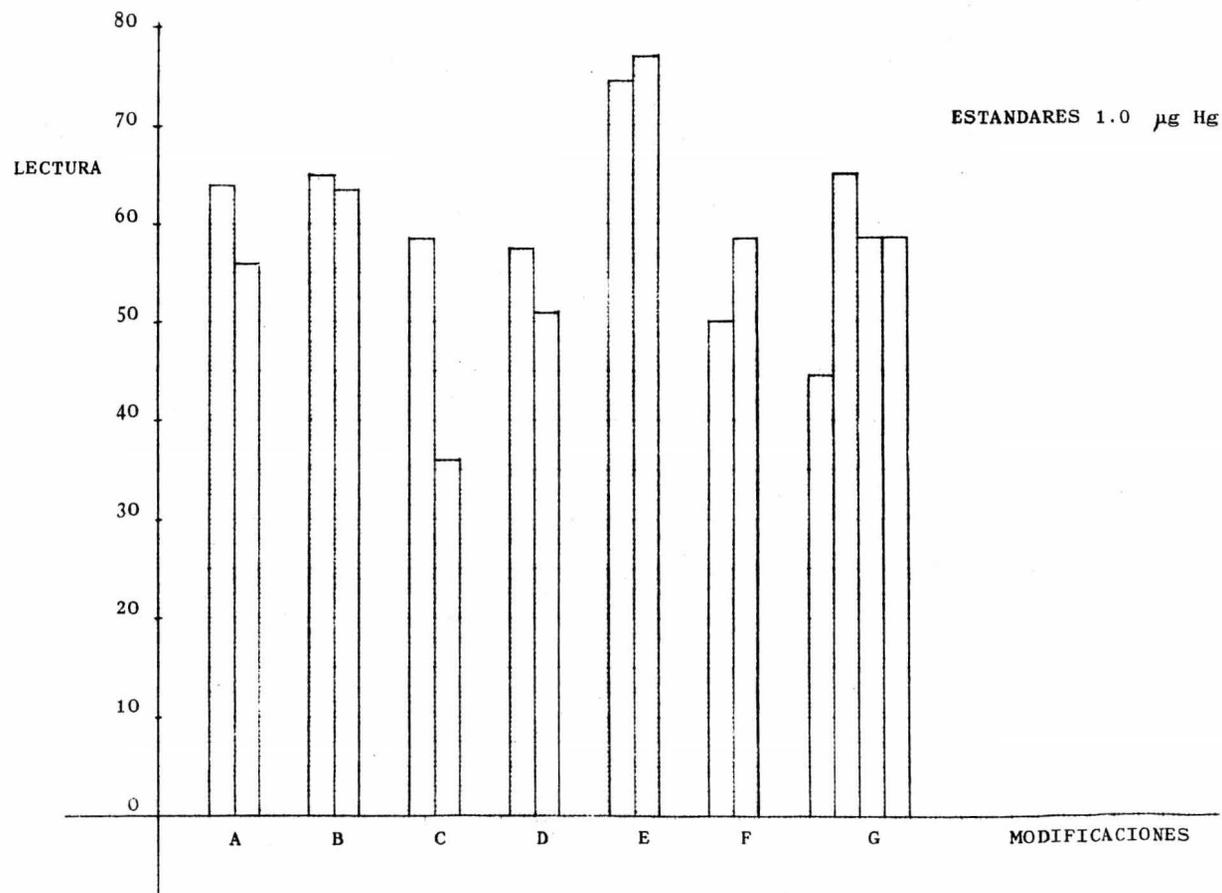
0.1-0.2

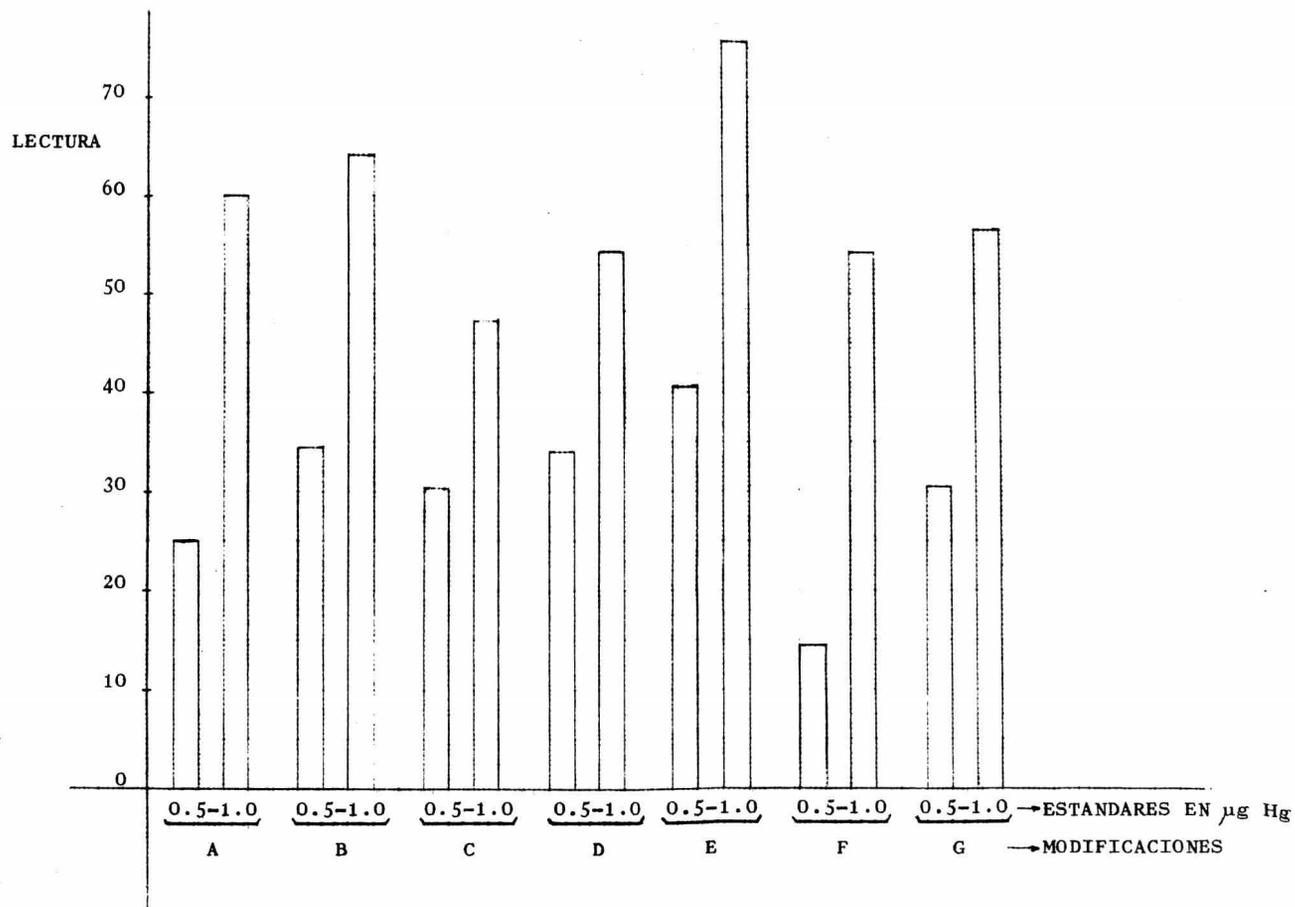
J

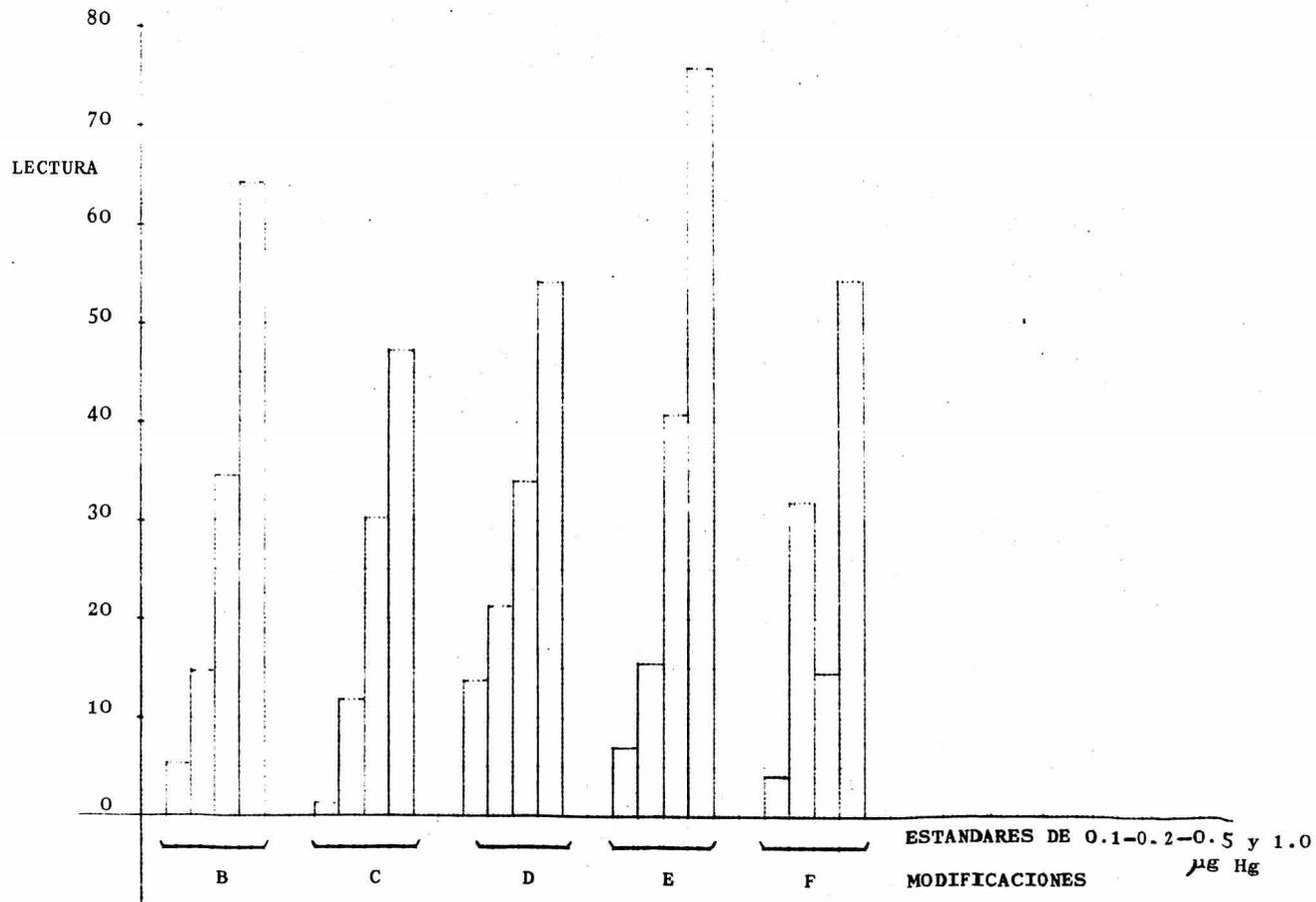
→ESTANDARES ES $\mu\text{g Hg}$

→MODIFICACIONES









CONCLUSIONES.-

Todas las muestras resultaron con valores abajo del límite de toxicidad, establecido por el Codex Alimentarius, por lo que se concluye que aunque existe una ligera contaminación por mercurio en -- las sardinas analizadas, no es de consideración, (0.151 - 0.313 , - p.p.m. encontradas y el límite es 0.5 p.p.m.).

El método de Espectroscopía por Absorción Atómica sin flama, - probó ser adecuado para este tipo de análisis siempre y cuando se - emplee, la lámpara de mercurio de cátodo-hueco y la bomba aereadora.

Cuando se trata de productos biológicos no se puede determi-- nar el mercurio, si no se destruye completamente la materia orgáni-- ca presente, usándose el autoclave para mejorar la digestión, a -- 120°C y 15 lbs de presión, por un mínimo de 1:30 horas para una can tidad de muestra entre 0.5 - 1.0 gramos.

Además para obtener una buena digestión y oxidación de la ma-- teria orgánica y no tener pérdidas de mercurio por volatilización - es conveniente poner exceso de permanganato de potasio en cada mues tra.

Es recomendable la Adición de Estándares cuando se encuentran cantidades pequenísimas de mercurio ya que se ayuda a aumentar la - señal para poder ser detectada por el espectrofotómetro.

Además los iones metálicos que son reducidos al estado elemen-- tal por el cloruro estannoso, pueden llegar a interferir en esta - técnica sin flama, si son capaces de amalgamarse con el mercurio y- formar compuestos estables.

Por ésto si alguna interferencia es sospechada puede ser comprobada, agregando cantidades conocidas de mercurio a la muestra y redeterminar (Método de Adición de Estándares). En este caso debe ser medida la absorción no atómica.

Con el empleo de baños de agua fría durante las diluciones se evitó en cierta manera las posibles pérdidas de mercurio por volatilización.

El lavado de todo el material utilizado en estas determinaciones deberá ser como se indica en la página 35, para evitar al máximo posibles contaminaciones que puedan alterar los resultados.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Amos M.D., Bennett P.A., Matousek J.P., Basic atomic Absorption Spectroscopy, Varian Techtron, Australia, (1975).
- 2.- Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, Ed. 11, USA., (1970).
- 3.- Burriel M.F., Química Analítica Cualitativa, Ed. Paraninfo, Madrid, 185, (1972).
- 4.- Christian G.D., Feldman F.J., Applications in Agriculture, Biology and Medicine, Atomic Absorption Spectroscopy, Ed. Wiley-Interscience, USA., (1970).
- 5.- Der Tagesspiegel, Contaminación de mercurio de la riqueza pesquera.
- 6.- D'Itri F.M., The environmental mercury problem, Ed. CRC Press, USA., (1972).
- 7.- Ehrlich F.L.E., La contaminación de alimentos por metales pesados y la subsecretaría de mejoramiento del ambiente. SSA, Sub. de Mejoramiento del Ambiente, Dir. Gral. de Investigación, Mex., (1974).
- 8.- Fairhall L.T., Industrial Toxicology, Ed. The Williams & Wilkins Co., USA., 76-77, (1957).
- 9.- Felton J.S., Heavy metal poisoning: Mercury and lead., Ann. Int. Med., 76, 781-785, (1972).
- 10.- Goldwater L.J., Mercury in the environment, Sci. Am., 224, No.5, 15-21, (1971).
- 11.- Holden A.V., Present Levels of Mercury in Man and his Environment.
- 12.- Jeffus M.T., Elkins J.S., Kenner C.T., Determination of mercury in biological materials, JAOAC, 53, No.6, 1172-1175, (1970).

- 13.- Joselow M.M., Louria D.B., Browder A.A., Mercuria--
lism: Environmental and occupational aspects, Ann.-
Int. Med., 76, 119-127, (1972).
- 14.- Kahn H.L., A mercury analysis system, At. Absorption
Newsletter, 10, No.2, 58-59, (1971).
- 15.- Kahn H., Instrumentación para Espectrofotometría por
Absorción Atómica, The Perkin-Elmer Corp.
- 16.- Lamm C.G., Ruzicka J., The Determination of Traces of
Mercury by Spectrophotometry, Atomic Absorption, Ra-
dioisotope Dilution and Other Methods.
- 17.- Manning D.C., Non-flame methods for mercury determina-
tion by atomic absorption, At. Absorption Newsletter,
9, No.5, 97-99, (1970).
- 18.- Moffitt A.E., Kupel R.E., A rapid method employing --
impregnated charcoal and atomic absorption spectro---
photometry for the determination of mercury in atmos-
pheric, biological and aquatic samples, At. Absorption
Newsletter, 9, No.6, 113-118, (1970).
- 19.- Munns R.K., Holland D.C., Metals and other elements,-
JAOAC, 54, No.1, 202-205, (1971).
- 20.- Perkin-Elmer, Analytical Methods for Atomic Absorp---
tion Spectrophotometry, Standard conditions-Food pro-
ducts, USA, (1971).
- 21.- Perkin-Elmer, Mercury Analysis System, Instructions,-
USA., (1972).
- 22.- Putman J.S., El azogue y la muerte lenta, Nat. Geo---
graph., 142, No.4, 507-527, (1972).
- 23.- Ramirez M.J., Atomic Absorption Spectroscopy, Ed. El-
sevier, (1968).

- 24.- Rowe C.J., Food Analysis by Atomic Absorption Spectroscopy, Varian Techtron, 7-11,25,26, USA., (1973).
- 25.- Slavin, Atomic Absorption Spectroscopy, Ed. Wiley.
- 26.- Somers E., The toxic potential of trace metals in foods, J. Food Sci., 39, 215-217, (1974).
- 27.- Thorpe V.A., Determination of mercury in food products - and biological fluids by aeration and flameless atomic absorption spectrophotometry, JAOAC, 54, No.1, 206-210, (1971).
- 28.- Valdez Z.F., El mercurio como contaminante del medio - marino, Ministerio de Pesquería, Dir. Gral. de Investigación Científica y Tecnológica, Lima, Perú, (1971).
- 29.- Varian Techtron, Analytical Methods for Flame Spectroscopy, Standard conditions, Mercury, Australia, (1972).
- 30.- Wood J.M., A progress report on mercury, Environ., 14, No.1, 33-39, (1972).