



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Desarrollo de metodología analítica para la determinación de cromo y selenio en músculo de *Oreochromis niloticus*, mediante ICP-MS.**

***TESIS***

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**Carlos Miguel Meza Cruz**



**MÉXICO, D.F.**

**AÑO 2014**



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.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesora: Liliana Virginia Raquel Saldívar y Osorio

**VOCAL:** Profesor: Ciro Eliseo Márquez Herrera

**SECRETARIO:** Profesor: María Guadalupe Espejel Maya

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Silvia Citlalli Gama González

**2° SUPLENTE:** Profesor: María Teresa de Jesús Rodríguez Salazar

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO DE ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA, DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dra. Liliana Virginia Raquel Saldívar y Osorio** \_\_\_\_\_

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

**Dra. María Teresa de Jesús Rodríguez Salazar** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**Carlos Miguel Meza Cruz** \_\_\_\_\_

## **Dedicatorias.**

*A mis padres, sin ustedes no podría haber llegado hasta aquí, este triunfo es también de ustedes, muchas gracias por todo lo que siguen haciendo por mí y por mi nueva familia. En verdad espero que Dios me permita regresarles un poco de lo mucho que me dan. Muchas gracias por siempre apoyar mis decisiones y por jamás haberme impuesto algo por la fuerza. Soy muy afortunado al tenerlos como padres.*

*A mis hermanos, Paola y Lalo, espero que este trabajo los siga motivando para que continúen con esa curiosidad por la Química. Me gustaría mucho verlos pasar por las aulas de CU algún día.*

*A mi esposa Lupita por motivarme a mejorar mi situación académica, fue una experiencia muy bonita poder compartir clases contigo, gracias por darme a Sarahí, nuestra pequeña bebe, ustedes son mi nueva motivación, muchas gracias por las alegrías que traen a mi vida.*

*A mis abuelos, Martha, Sara y Goyo, por cuidarme amorosamente durante mi infancia, una gran parte de mi curiosidad por las cosas de la naturaleza surgió durante las visitas a sus casas. Sin duda alguna fueron hechos determinantes para decidirme a estudiar una carrera científica.*

*A la Doctora Liliana, por el gran apoyo que nos sigue brindando a mi familia y a mí, por todas esas muestras de afecto. Muchas gracias también por la oportunidad de dar clases a los compañeros de la facultad, con eso cumplí un pedacito de la inquietud que tenía por ser docente, gracias por la confianza que deposito en mí para llevar el control de sus grupos. También gracias por la oportunidad de realizar este trabajo en su laboratorio.*

*A la Doctora Mayte, muchísimas gracias por avivar en mí el gusto por la química analítica, por todas tus enseñanzas y consejos, sin tu dirección no habiéramos logrado tan buenos resultados. Gracias por los buenos y malos momentos, por las muestras de afecto hacia tus supervisados, y también por infundir miedo en nuestros corazones y motivarnos a “sacar” las cosas, muchísimas gracias por todo el tiempo que invertiste en las sesiones de asesoramiento.*

*A mi amigo y compañero de laboratorio, Carlos Flores, con quien pude compartir los logros y dificultades que se presentaron de una manera divertida y al mismo tiempo responsable. No hubiera sido lo mismo con otro compañero para el proyecto, agradezco que haya sido contigo y no con alguien irresponsable jejeje. Gracias también por despertar en mi curiosidad por la maestría.*

*Al señor David Cavita, sin sus asesorías durante la secundaria y la prepa jamás me hubieran gustado los cálculos, yo quería estudiar cualquier cosa que no tuviera matemáticas hasta que me ayudo a entenderlas y despertó en mí el gusto por la docencia, usted es una de las principales razones por las cuales me decidí a estudiar Química, muchísimas gracias por ayudarme a encontrar mi pasión en la vida.*

## **Agradecimientos.**

*A la UNAM, por permitir mi formación universitaria desde la preparatoria en sus aulas.*

*A la Facultad de Química por ser mi segunda casa durante 6 años.*

*A los miembros del jurado, por sus valiosos comentarios y observaciones para la corrección de este trabajo.*

*A los proyectos PAPIIT (IN229911), PAPIME (PE201211) y PAL (3400-02). Por el financiamiento para la realización de este proyecto.*

*"No lo intentes. Hazlo, o no lo hagas, pero no lo intentes." Maestro Yoda, Star Wars.*

## Índice.

<b>1. Resumen</b>	<b>8</b>
<b>2. Objetivos</b>	<b>10</b>
<b>2.1 Objetivo general</b>	<b>10</b>
<b>2.2 Objetivos particulares</b>	<b>10</b>
<b>3. Hipótesis</b>	<b>11</b>
<b>4. Marco teórico</b>	<b>12</b>
<b>4.1 Minerales presentes en alimentos</b>	<b>12</b>
<b>4.2 Cromo</b>	<b>13</b>
<b>4.3 Selenio</b>	<b>13</b>
<b>4.4 Sitios de recolección de muestras</b>	<b>14</b>
<b>4.5 Descripción de la Tilapia (<i>Oreochromis sp.</i>)</b>	<b>16</b>
<b>4.6 Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS)</b>	<b>17</b>
<b>4.7 Sistema de introducción de muestras</b>	<b>18</b>
<b>4.8 Ionización de la muestra</b>	<b>19</b>
<b>4.9 Región de la interfase</b>	<b>20</b>
<b>4.10 Analizador de masas cuadrupolar</b>	<b>22</b>
<b>4.11 Sistema de detección de iones</b>	<b>23</b>
<b>4.12 Interferencias en ICP-MS</b>	<b>25</b>
<b>4.13 Validación de la metodología</b>	<b>26</b>
<b>4.14 Parámetros de desempeño analítico</b>	<b>27</b>
<b>4.14.1 Límite de detección instrumental (LoDI) y Límite de cuantificación instrumental (LoQI)</b>	<b>27</b>
<b>4.14.2 Intervalo lineal y de trabajo</b>	<b>28</b>

4.14.3 Exactitud y precisión	28
5. Metodología	29
5.1 Equipos, reactivos y material	30
5.1.1 Equipo	30
5.1.2 Reactivos y soluciones	30
5.1.3 Material	30
5.1.4 Materiales de Referencia Certificados	31
5.2 Recolección de muestras	31
5.3 Tratamiento físico	31
5.4 Tratamiento químico	32
5.5 Diluciones gravimétricas	33
5.6 Introducción de disoluciones al equipo	34
5.7 Isótopos analito y estándar interno	35
5.8 Parámetros de desempeño analítico	36
5.8.1 Límite de detección instrumental (LoDI) y Límite de cuantificación instrumental (LoQI)	36
5.8.2 Intervalo lineal y de trabajo	36
5.8.3 Exactitud y precisión	37
5.9 Aplicación de la metodología a muestras reales	37
6. Resultados y discusión	38
6.1 Optimización de las condiciones instrumentales	38
6.2 Elección de los isótopos analitos	40
6.3 Parámetros de desempeño analítico	47
6.3.1 Límite de detección instrumental (LoDI) y Límite de cuantificación instrumental (LoQI)	48

<b>6.3.2 Intervalo lineal</b>	<b>48</b>
<b>6.3.3 El intervalo de trabajo</b>	<b>50</b>
<b>6.4 Aplicación de la metodología a muestras reales</b>	<b>50</b>
<b>6.5 Concentraciones de cromo y selenio en muestras únicas</b>	<b>52</b>
<b>6.6 Concentraciones de selenio en muestras reales</b>	<b>54</b>
<b>6.7 Concentraciones de cromo y selenio reportadas en la literatura</b>	<b>56</b>
<b>6.7.1 Cromo</b>	<b>56</b>
<b>6.7.2 Selenio</b>	<b>57</b>
<b>6.8 Normatividad</b>	<b>58</b>
<b>6.8.1 Cromo</b>	<b>59</b>
<b>6.8.2 Selenio</b>	<b>61</b>
<b>7. Conclusiones</b>	<b>65</b>
<b>8. Bibliografía</b>	<b>67</b>

## 1. Resumen.

Además de ser parte importante de la dieta humana, el pescado es un buen indicador de la contaminación por metales traza en los ecosistemas acuáticos, dentro de este grupo de elementos se encuentran el cromo y el selenio, éstos se encuentran presentes en hormonas, vitaminas, enzimas y otras proteínas con funciones biológicas particulares. Una deficiencia de los mismos trae como consecuencia desórdenes metabólicos que son atribuidos a la ausencia o decremento de la actividad de algunas enzimas implicadas en el metabolismo.

Los metales presentes en ecosistemas acuáticos pueden ser de origen natural, provenientes de rocas y del suelo o bien derivados de las actividades humanas, incluyendo la industria, las aguas residuales domésticas, descarga agrícola, minería, eliminación de residuos sólidos y la deposición atmosférica.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar la metodología analítica para la determinación de cromo y selenio en muestras de músculo de pescado (*Oreochromis niloticus*), recolectadas en dos municipios de Veracruz (Tlacotalpan y Acula).

En Acula se encuentra la Laguna El Salado, la cual es la propuesta de sitio contaminado debido a que recibe aporte de descargas directas de los ingenios azucareros San Cristóbal y San Gabriel a través del Canal Candalloa. Por otra parte, en Tlacotalpan (Patrimonio cultural de la humanidad) se encuentra la Laguna Lagartera, donde se espera que los niveles de contaminación sean más bajos, al ser un lugar más conservado.

El tratamiento químico se realizó mediante una digestión, en sistema cerrado, con HNO<sub>3</sub> (concentrado) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). La determinación de ambos elementos se llevó a cabo mediante espectrometría de masas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS). Durante el desarrollo de la metodología se evaluaron los siguientes parámetros de desempeño: exactitud y precisión, límite de detección instrumental, límite de cuantificación instrumental, intervalo lineal e intervalo de trabajo.

De manera general, se obtuvieron valores de % error relativo y %RSD menores al 20% en los tres materiales de referencia certificados (DORM-4, DOLT-4 y TORT-2), empleando las siguientes parejas isótopo analito/ estándar interno: <sup>82</sup>Se/<sup>89</sup>Y y <sup>53</sup>Cr/<sup>74</sup>Ge. Por lo tanto, la metodología resultó ser exacta y precisa para la determinación de ambos analitos.

Los límites de detección y cuantificación instrumentales para cromo fueron de 3.67 y 7.47 µg/L, mientras que para selenio fueron de 0.18 y 0.49 µg/L, respectivamente.

El intervalo lineal para la determinación de cromo fue de 10-120 µg/L. Para selenio se obtuvo un intervalo lineal de 5-150 µg/L.

El intervalo de trabajo para cromo fue de 7.47-80.56  $\mu\text{g/L}$ , mientras que para el selenio fue de 0.49-286.98  $\mu\text{g/L}$ .

Una vez que la metodología fue desarrollada, se procedió a analizar 60 muestras que fueron recolectadas en la laguna de La Lagartera (Tlacotalpan) y la laguna El Salado (Acula). Los rangos de concentraciones encontradas fueron: [0.40-0.62] y [0.21-0.71] mg/kg de Cr, y de [0.39-3.20] y [0.17-4.44] mg/kg de Se, para las muestras de Tlacotalpan y Acula, respectivamente.

Finalmente, los intervalos de concentración obtenidos, se compararon con datos reportados en la literatura y con lo establecido por distintas legislaciones (México, Unión Europea y Estados Unidos).

## **2. Objetivos.**

### **2.1 Objetivo general.**

Desarrollar la metodología analítica para la determinación de cromo y selenio en músculo de pescado, mediante Espectrometría de Masas con fuente de ionización por Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS), y su posterior aplicación a muestras reales procedentes del estado de Veracruz.

### **2.2 Objetivos particulares.**

Optimización de las condiciones analíticas e instrumentales.

- I) Propuesta y selección de los isótopos analitos.
- II) Identificación de las interferencias poliatómicas e isobáricas potenciales, así como la minimización y/o corrección de las mismas.
- III) Propuesta y selección de los estándares internos.

Evaluación de los parámetros de desempeño del método.

- I) Evaluación de la exactitud y precisión.
- II) Evaluación de los límites de detección y cuantificación instrumentales.
- III) Evaluación del intervalo lineal y de trabajo.

Aplicación de la metodología desarrollada a muestras reales.

- I) Evaluación de la concentración de Cr y Se, presente en el músculo de mojarra tilapia, procedentes del estado de Veracruz.
- II) Comparación de los resultados obtenidos de las muestras con los reportados en literatura nacional e internacional.
- III) Determinar si las concentraciones de cromo y selenio encontradas en las muestras, se encuentran por debajo de los límites establecidos por normatividad nacional e internacional.

### **3. Hipótesis.**

- I) La optimización de las condiciones instrumentales, junto con la correcta elección de los isótopos, estándar interno y analito, permitirá obtener valores aceptables de precisión y exactitud en las mediciones analíticas.
  
- II) Los niveles de cromo y selenio en músculo de las muestras estarán dentro del intervalo de concentraciones reportadas en literatura nacional e internacional.
  
- III) Las concentraciones de cromo y selenio en músculo para las muestras de Tlacotalpan, serán menores que las encontradas para las muestras procedentes de Acula.
  
- IV) Las concentraciones de cromo y selenio se encontrarán en niveles inferiores o cercanos a los establecidos por la normatividad nacional e internacional.

## **4. Marco teórico.**

### **4.1 Minerales presentes en alimentos.**

El pescado es una importante fuente de proteínas de origen animal, y vitaminas. Su consumo está ampliamente distribuido a nivel mundial debido a su alto contenido de proteína, bajo contenido de grasa saturada y porque además, están presentes ácidos grasos omega reconocidos por contribuir a mantener una buena salud.

Históricamente, los minerales se han clasificado como principales o trazas, dependiendo de su concentración en vegetales y animales. Esta clasificación surgió debido a que los métodos analíticos no permitían determinar concentraciones más bajas de los elementos, con mucha precisión. Entonces, el término traza se utilizaba para indicar la presencia de un elemento que no podía medirse de manera precisa. Hoy en día, los métodos e instrumentos modernos permiten medidas muy precisas de prácticamente todos los elementos de la tabla periódica. No obstante, los términos principal y traza se siguen empleando para describir los minerales presentes en los sistemas biológicos (Fennema, 2000).

Los elementos traza incluyen el hierro, yodo, flúor, zinc, selenio, cobre, manganeso, cromo, molibdeno, cobalto y níquel. Estos se encuentran presentes en hormonas, vitaminas, enzimas y otras proteínas con funciones biológicas particulares. Una deficiencia de los mismos trae como consecuencia desórdenes metabólicos que son atribuidos a la ausencia o decremento de la actividad de algunas enzimas implicadas en el metabolismo.

La concentración de un nutriente en los alimentos no es necesariamente un indicador fiable del valor de dicho alimento como fuente del nutriente en cuestión. La biodisponibilidad se define como la proporción de nutriente en el alimento ingerido que resulta asequible para su utilización en procesos metabólicos. En el caso de los nutrientes minerales, la biodisponibilidad está determinada en primera instancia por la eficiencia de la absorción desde el lumen intestinal a la sangre. En algunos casos, sin embargo, los nutrientes absorbidos pueden estar en forma no utilizable.

Además de ser parte importante de la dieta humana, el pescado es un buen indicador de la contaminación por metales traza en los ecosistemas acuáticos. La alta toxicidad, bioacumulación y persistencia en el ambiente de algunos metales hacen que sean peligrosos afectando la salud de los organismos involucrados en la cadena alimenticia.

Los metales presentes en estos ecosistemas pueden ser de origen natural, provenientes de rocas y del suelo o bien derivados de las actividades humanas, incluyendo la industria, las aguas residuales domésticas, descarga agrícola, minería, eliminación de residuos sólidos y la deposición atmosférica (Djedjibegovic y Larssen, 2012).

#### **4.2 Cromo.**

El cromo es un nutrimento que se encuentra en la naturaleza en combinación con otras sustancias; está distribuido por toda la corteza terrestre. De los estados de oxidación más importantes en cuanto a sus efectos sobre la salud humana, las formas más importantes son la trivalente ( $\text{Cr}^{3+}$ ) y la hexavalente ( $\text{Cr}^{6+}$ ).

La forma trivalente es la más estable y biológicamente activa, es también la forma en la que se encuentra en los alimentos y es indispensable para el metabolismo humano. Por otro lado, la forma hexavalente, es un fuerte oxidante que proviene principalmente de fuentes industriales tales como la manufactura del acero inoxidable, pigmentos y cromatos, entre otros. Consumido en pequeñas cantidades, es reducido a  $\text{Cr}^{3+}$  por el ambiente ácido del estómago. Cuando es inhalado produce irritación y se le acepta como un agente carcinogénico.

#### **4.3 Selenio.**

Es un oligoelemento esencial para los mamíferos. En los alimentos suele estar almacenado en forma de análogos de aminoácidos azufrados como la L-selenometionina, la L-

selenocisteína y L-selenocistina los cuales pueden ser incorporados a las proteínas (Lucas y Valle, 2000).

La actividad biológica del selenio está mediada principalmente a través de las selenoproteínas respectivas e incluye acciones antioxidantes, la activación y la degradación de las hormonas tiroideas y la mejora de la inmunidad.

Entre los síntomas de intoxicación por selenoaminoácidos (“enfermedad alcalina”) están: dermatitis, fatiga, mareo, pérdida de cabello y uñas (o pezuña en el caso de los bovinos), problemas gastrointestinales, ictericia y caries.

Aunque el envenenamiento por selenio o selenosis es muy raro se han presentado algunos casos de toxicidad humana por ejemplo, selenosis crónica endémica en personas de origen chino que consumieron cultivos con alto contenido de este elemento, se estimó que la ingesta media fue de 5 mg/día. Se observaron efectos como deformación de las uñas, pérdida del cabello y lesiones cutáneas (Zwolak y Zaporowska, 2012).

#### **4.4 Sitios de recolección de muestras.**

En la región del Papaloapan se produce una gran cantidad de Tilapia según datos recabados del censo más reciente de la SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación) a través de CONAPESCA (Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca) del anuario 2010, donde reportan que la producción a nivel nacional fue de 77,702 ton (de los cuales 757 ton fueron producidas en Oaxaca y 14,836 ton en Veracruz); así la producción en la cuenca representó un 20 % de la producción nacional (Lorenzo, 2011).

La Cuenca Baja del Papaloapan también conocida como El Sotavento Veracruzano es parte de las once regiones del Estado de Veracruz. Se encuentra en la extensa comarca bañada por el río Papaloapan a partir de una altura máxima de los 10 metros sobre el nivel del mar en el municipio de Otatitlán que limita con el estado de Oaxaca.

El territorio es abarcado por el río Papaloapan desde su entrada hasta su desembocadura.

El Sotavento Veracruzano (figura 1) está formado por Acula, Alvarado, Amatlán, Carlos A. Carrillo, Cosamaloapan, Chacaltianguis, Ignacio de la Llave, Ixmatalhuacan, Otatlán, Tlacojalpan, Tlacotalpan, Tlaxicoyan, Tres Valles, Tuxtilla, Cotaxtla y Tierra Blanca (Imagen 1). En conjunto estos municipios tienen una longitud norte que va de los 18° 10' a los 18° 50' y una Longitud oeste que es de 95°44' a 96° 39'



**Figura 1.** Sotavento veracruzano (Subsecretaría de Medio Ambiente del Estado de Veracruz, 2000)

En Acula se encuentra la Laguna El Salado, la cual es la propuesta de sitio contaminado debido a que recibe aporte de descargas directas de los ingenios azucareros San Cristóbal y San Gabriel a través del Canal Candalloa.

Mientras que en Tlacotalpan podemos encontrar a la Laguna Lagartera, donde se supone, hay menos contaminación, debido a que esta laguna permanece aislada de fuentes antropogénicas de contaminación.

#### 4.5 Descripción de la Tilapia (*Oreochromis sp.*).

La Tilapia (*Oreochromis sp.*) es un pez nativo de África cuyo cultivo se inició en 1820. De este continente se ha extendido a gran parte del mundo, siendo considerada la tercera especie más cultivada después de las carpas y los salmónidos. La Tilapia se encuentra representada aproximadamente por 100 especies, muchas de ellas han sido introducidas en diversos países del mundo. Esta especie es resistente a enfermedades, se reproduce con facilidad, consume una gran variedad de alimentos y tolera agua con bajas concentraciones de oxígeno disuelto. Comúnmente, es cultivada en estanques, jaulas y arrozales inundados. La mayoría de las especies de Tilapia pueden crecer en agua dulce y algunas se adaptan al agua de mar, donde pueden alcanzar un peso de unos 3 kg, el peso comercial es de 230 g en promedio. Todas estas características hacen que la Tilapia sea una especie de cultivo apta en la mayoría de los países en vías de desarrollo.

En México en el año 1964, la Dirección General de Pesca, del entonces Instituto Nacional de Investigaciones Biológico Pesqueras (hoy Instituto Nacional de la Pesca), introdujo a la Tilapia procedente de Auburn, Alabama, EUA. La cual fue depositada en la estación piscícola de Temascal, Oaxaca (Morales, 2003). Las especies que se incluyeron en aquel tiempo fueron *T. aurea*, *T. melanopleura* y *T. mossambica*. Posteriormente, en 1978, se introdujo la *T. nilotica*. En 1981, se introduce una variedad de Tilapia roja, esta especie se originó como resultado de las siguientes cruzas:

a) *O. mossambicus* y *O. niloticus* en Taiwán y

b) *T. mossambica* y *T. urolepis hornorum* provenientes de Florida, EUA.

En 1986, llegó a México la Tilapia nilotica roja procedente de la Universidad de Stirling en Inglaterra, con dos variedades, negra y roja, depositándose en Zacatepec, Morelos (Lorenzo, 2011).

#### **4.6 Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS).**

Para el análisis de metales que se encuentran en concentraciones a nivel de trazas, es necesario contar con técnicas de análisis que sean capaces de cuantificar con precisión y rapidez una amplia variedad de elementos. Desde principios de los años ochenta, la técnica de ICP-MS se ha desarrollado hasta convertirse en una de las técnicas más importantes para el análisis elemental, debido a sus bajos límites de detección para la mayoría de los elementos, su alto grado de selectividad y su razonable buena precisión y exactitud. Esta técnica es aplicable a muestras tan diversas como lo son: muestras biológicas, clínicas, geoquímicas, de fármacos, entre otras (Morton, 2009).

La técnica ICP-MS combina una fuente de ionización de plasma con la espectrometría de masas. El principio consiste en transportar la muestra en forma de aerosol hacia la fuente de ionización, que consiste en un plasma generado por una fuente de radiofrecuencia, en donde la muestra es atomizada y ionizada. Posteriormente los iones positivos son dirigidos al espectrómetro de masas donde, con ayuda de un analizador de masas, se obtiene la relación masa-carga ( $m/z$ ) de los iones al pasar por un sistema de detección (Torres, 2013). Cabe mencionar que el ICP opera a presión atmosférica y a alta temperatura mientras que el espectrómetro de masas requiere alto vacío y una temperatura ambiente, por lo tanto, se necesita una interfase para reducir la presión y la temperatura.

La descripción del equipo de ICP-MS puede dividirse en las siguientes partes:

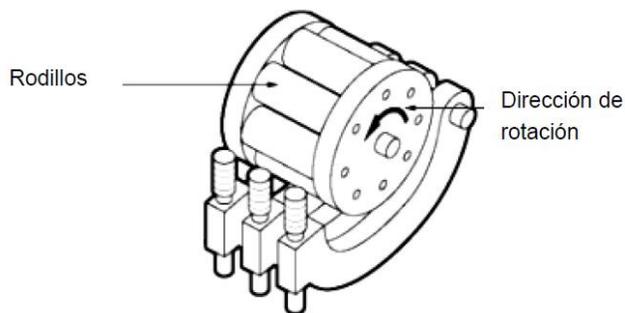
#### 4.7 Sistema de introducción de muestras.

La introducción de las muestras es un paso crítico para el análisis ya que si el flujo de la muestra no es continuo pueden presentarse errores experimentales en las mediciones. La muestra puede ser introducida al plasma como gas, líquido o sólido. Para las muestras líquidas, lo más común es la generación de un aerosol mediante un nebulizador neumático o ultrasónico.

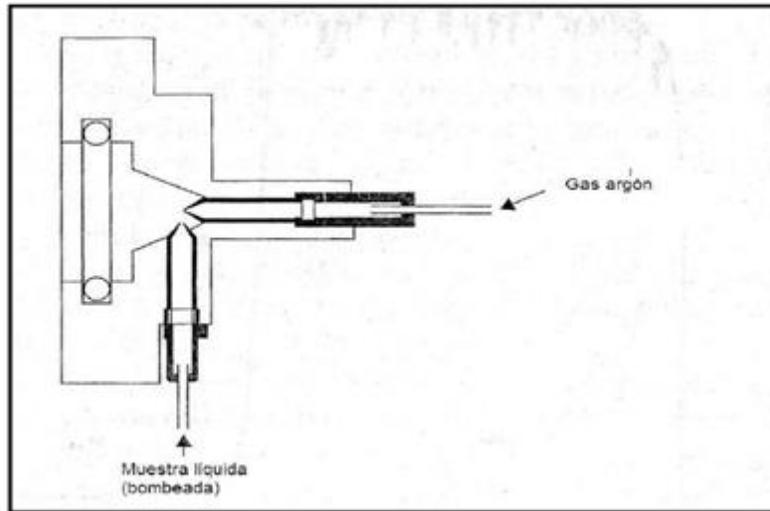
Si bien existen diferentes tipos de nebulizadores, su principio de funcionamiento es básicamente el mismo.

Entre los más comunes se encuentran el nebulizador concéntrico neumático y el nebulizador de flujo cruzado.

En el proceso de introducción se utiliza una bomba peristáltica (figura 2), que por succión auxilia la entrada de la muestra líquida con una manguera de aproximadamente 2 mm de diámetro. La muestra líquida llega al nebulizador de flujo cruzado (figura 3) donde se inyecta el gas nebulizador (por lo general argón) a alta velocidad con el objetivo de formar un aerosol. El aerosol llega a la cámara de nebulización en donde las gotas que tienen un diámetro mayor a 100  $\mu\text{m}$  son drenadas debido a que si éstas llegaran al plasma lo enfriarían provocando una reducción en la precisión y un aumento de interferencias (Fosgard, 2007). Sólo alrededor del 1% de las gotas se transportan a través de un pequeño tubo de inyección en la antorcha del ICP hasta llegar al plasma.



**Figura 2.** Bomba peristáltica (Perkin Elmer,2005)

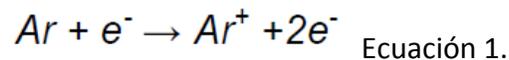


**Figura 3.** Nebulizador de flujo cruzado (Sabine, 2007).

#### 4.8 Ionización de la muestra.

El plasma inductivamente acoplado tiene la finalidad de deshidratar la muestra, atomizarla (romper su estructura molecular), excitar los átomos presentes y por último ionizarlos; esto se logra gracias a las temperaturas de entre 6000 a 10,000 K que alcanzan este tipo de plasmas.

Un plasma se define como un gas ionizado, es decir, una mezcla gaseosa que posee una concentración significativa de iones y de electrones. Si el gas empleado es argón entonces, deberá establecerse el siguiente equilibrio:



Para obtener un plasma es necesario contar con una fuente de energía externa que provoque la ionización del gas y lo mantenga estable.

El plasma ICP se forma al iniciar la excitación del gas con la aplicación de un campo de radio frecuencia en la bobina de Tesla que rodea la antorcha. Los electrones provenientes de la

descarga colisionan con los átomos neutros del argón ionizándolos. Los iones y electrones continúan colisionando hasta alcanzar un plasma estable (Sabine, 2007).

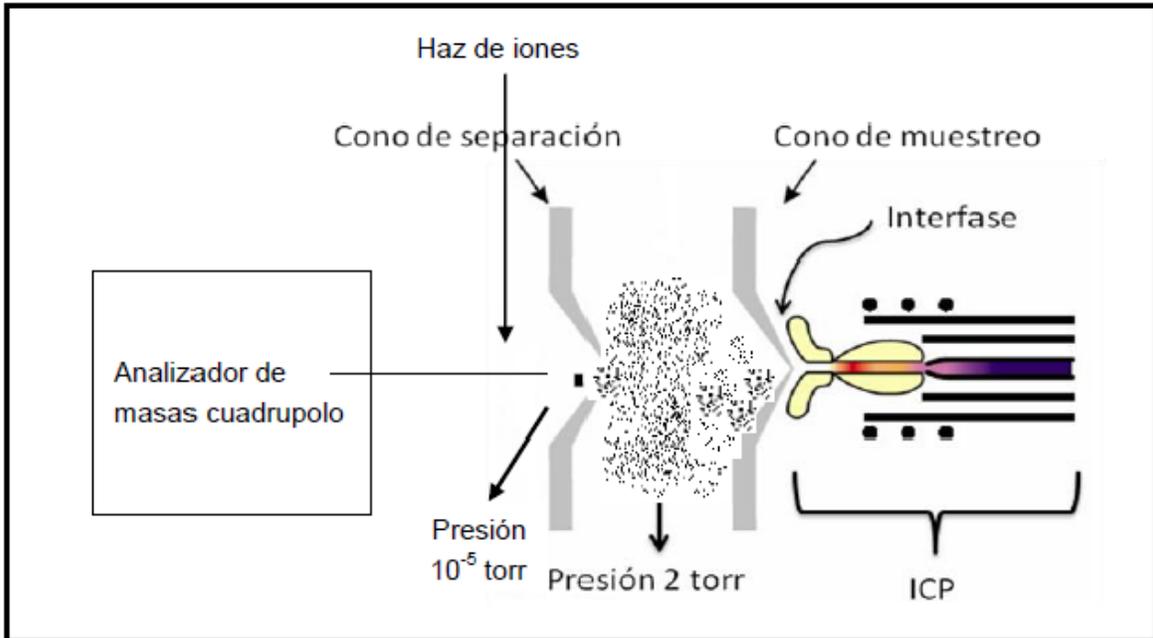
El plasma de argón es adecuado debido a que su primera energía de ionización es relativamente alta (1520 kJ/mol). Lo cual permite la ionización de más de 90% de los elementos de la tabla periódica, sólo con las excepciones de He, F y Ne debido a que tienen una energía de ionización mayor que la del argón.

#### **4.9 Región de la interfase.**

La introducción de los iones que se generan en el plasma dentro del sistema de detección presenta una dificultad: el plasma inductivamente acoplado opera a presión atmosférica, mientras que el discriminador de masas y el detector están en un espacio a alto vacío.

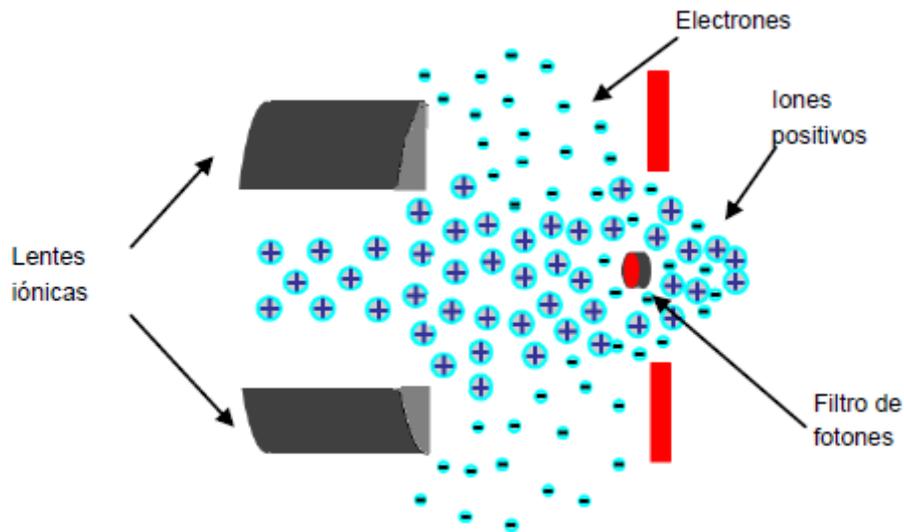
Debido a que los requisitos de presión son diferentes, el equipo incluye una región de interfase que transfiere los iones del plasma al espectrómetro de masas a través de reducción de la presión.

Una vez que la muestra se ioniza, los iones pasan a través de la interfase hacia el analizador de masas. En este paso los iones pasan de presión atmosférica a baja presión, esto se logra al tener el plasma alineado horizontalmente con el cono de muestreo o “sampler” (generalmente de níquel, cobre o platino con un diámetro de 0.8-1.2 mm). Los iones pasan a través de este cono de muestreo y después por el cono discriminador o “skimmer” (con diámetro de entre 0.4-1 mm) los cuales están alineados con el plasma. Entre ambos conos existe un vacío (aproximadamente 2 torr), que es generado por una bomba mecánica, donde la mayoría de los átomos de argón se eliminan por el vacío producido en la zona. (figura 4) (Torres, 2013).



**Figura 4.** Interfase del equipo ICP-MS (Torres, 2013).

Después de que los iones abandonan el cono discriminador, se dirigen hacia el analizador de masas, donde se encuentran con el filtro de fotones, en donde éstos, se frenan. Posteriormente los iones positivos y negativos pasan por una zona de baja presión (aproximadamente 10<sup>-5</sup> torr) en donde se produce la separación de carga y los electrones se difunden rápidamente, resultando un flujo de iones de carga positiva, estos iones pasan por las lentes iónicas (figura 5).



**Figura 5.** Lentes iónicas (Torres, 2013).

Las funciones de estas lentes son (Rodríguez, 2001):

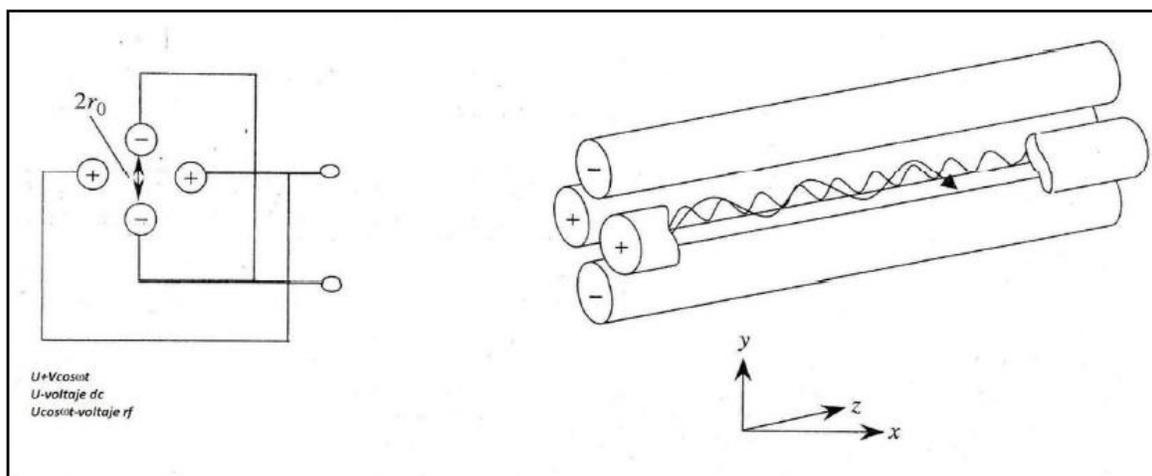
- a) Realinear los iones para ser transmitidos eficientemente hacia el analizador de masas.
- b) Atrapar a los fotones y especies energéticamente neutras (emitidos por el plasma) para eliminar el ruido que pueden originar si alcanzan el detector.

Finalmente los iones positivos se siguen manteniendo realineados hasta alcanzar una rendija la cual conecta con el analizador cuadrupolo.

#### **4.10 Analizador de masas cuadrupolar.**

El analizador de masas más empleado es el cuadrupolo electromagnético (figura 6). Está formado por cuatro barras metálicas cilíndricas paralelas en forma equidistante, dos de ellas están cargadas positivamente y las dos restantes cargadas negativamente. Las barras se someten a una combinación de corrientes continuas y alternas de tal manera que cambian su polaridad de manera continua, debido a esto los iones se mueven circularmente a través del eje de cuadrupolo.

Los iones se separan según su relación masa carga ( $m/z$ ), por lo que, bajo condiciones dadas de corriente alterna y directa, los iones de una relación  $m/z$  específica pasarán a través del analizador y llegarán al detector.

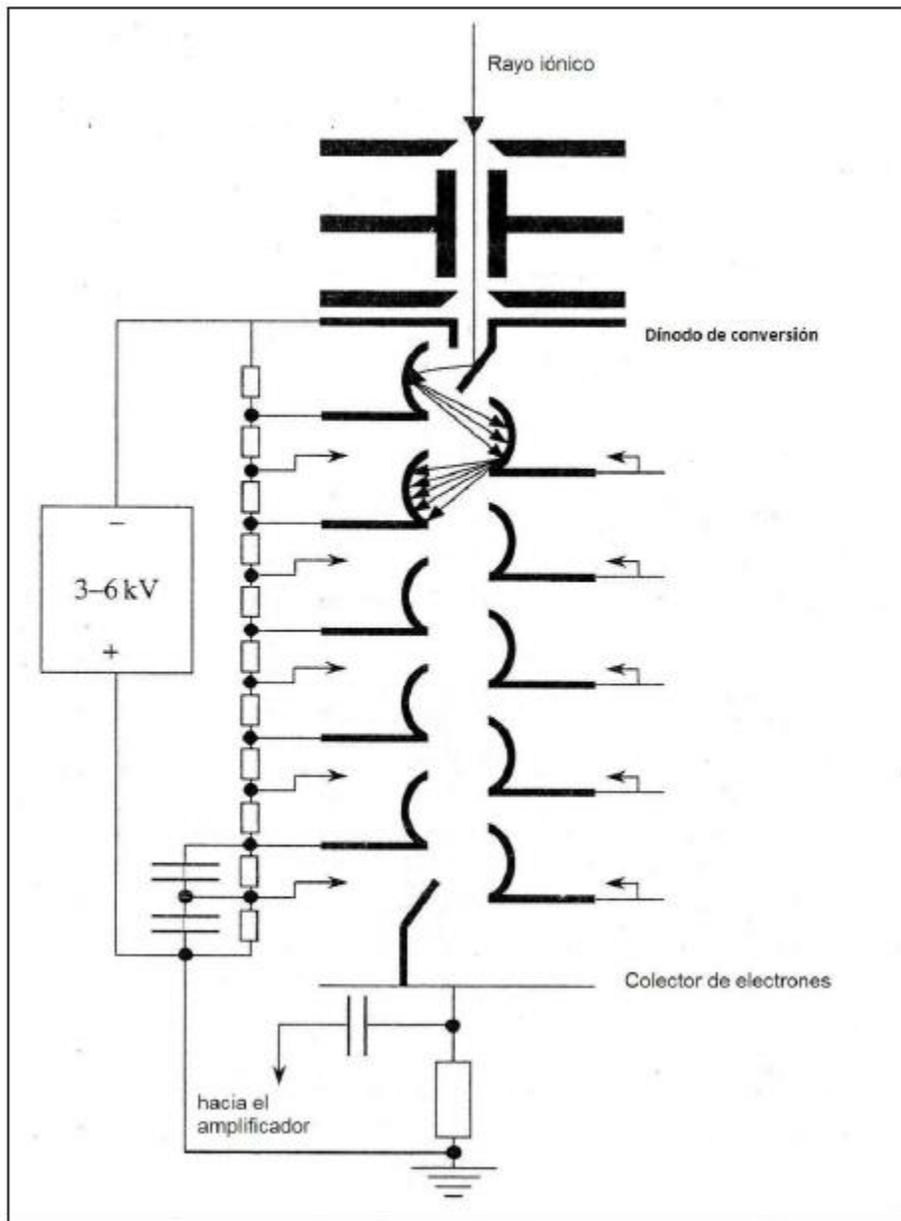


**Figura 6.** Analizador de masas cuadrupolar (Sabine 2007).

#### 4.11 Sistema de detección de iones.

Cuando los iones separados dejan el sistema analizador de masas son recolectados y detectados usando un sistema de detección de iones apropiado el cual está localizado dentro de la región que se encuentra a ultra alto vacío en el equipo.

El multiplicador de electrones secundarios es uno de los detectores más utilizados dentro de los equipos de espectrometría de masas gracias a que aumenta la sensibilidad en varios órdenes de magnitud (figura 7).



**Figura 7.** Multiplicador de electrones secundario (Sabine, 2007).

Consiste en una serie de dinodos conectados a potenciales cada vez mayores. Una vez que los iones pasan el área del cuadrupolo, se atraen hacia el detector al aplicar un alto voltaje en su interior. Cuando un ión positivo choca con el primer dinodo se emiten electrones secundarios los cuales son atraídos por el siguiente dinodo que tiene mayor diferencial de voltaje generando un mayor número de electrones secundarios y así sucesivamente hasta generar el denominado efecto cascada.

Por último el detector envía las señales correspondientes de las lecturas a una computadora donde se pueden analizar (Sabine, 2007).

#### **4.12 Interferencias en ICP-MS.**

Algunas veces se presentan serios problemas de interferencias en la espectrometría de masas atómica, que se pueden clasificar en cuatro grupos: solapamientos isobáricos, interferencias poliatómicas, óxidos refractarios e iones doblemente cargados (Skoog, 2001).

- Solapamientos isobáricos: Son causados por isótopos de otros elementos que tienen masas muy cercanas con una diferencia de aproximadamente 0.005 m/z. Este problema se disminuye utilizando ecuaciones de corrección incluidas en el software del equipo o bien reportadas en la literatura.
- Interferencias poliatómicas: Se producen por las reacciones entre la matriz de la muestra, los componentes del plasma de argón, el aire del medio y el agua. Para minimizar este tipo de interferencias en los últimos años se han introducido nuevas tecnologías, como el método de plasma frío, la tecnología de la celda de colisión (CCT), la celda de reacción dinámica ICP-MS (ICP-DRC-MS), entre otras.
- Óxidos refractarios: Estas especies se forman a causa del oxígeno y el agua, al entrar en contacto con el plasma y a su vez forma óxidos con los componentes del mismo y con la matriz de la muestra. Se pueden formar  $MO^+$ ,  $MO^{2+}$  y  $MO^{3+}$  pero se pueden eliminar al controlar la potencia para la RF y el flujo del gas nebulizador.

- Iones doblemente cargados: La mayoría de los elementos químicos que se pueden analizar mediante ICP-MS sólo son ionizados a carga  $1^+$  sin embargo, hay elementos que alcanzan su segunda energía de ionización por debajo de la primera energía de ionización del plasma, formando iones de carga  $2^+$ . La formación de estas especies se minimiza al controlar el flujo del gas nebulizador. A flujos bajos, la temperatura aumenta desplazando el equilibrio hacia la formación de iones de carga  $2^+$ .

Además de las interferencias de tipo espectral mencionadas anteriormente, existen las interferencias no espectrales como lo son los efectos de la matriz. Estos efectos suelen causar una reducción en la señal del analito, aunque en ciertas condiciones experimentales se observa un aumento de dicha señal. El efecto de la matriz es bastante general produciéndose a elevadas concentraciones de casi cualquier elemento contaminante. Por lo general, dichos efectos se pueden minimizar utilizando disoluciones más diluidas, modificando el proceso de introducción de la muestra, o separando las especies que lo provocan. También pueden ser compensados de forma significativa utilizando un estándar interno apropiado, es decir, introduciendo un elemento estándar interno que tenga aproximadamente la misma masa y potencial de ionización que el analito, y que además, no esté presente de forma significativa en la matriz a analizar (Skoog, 2001).

#### **4.13 Validación de la metodología.**

La validación se define como: el proceso de verificación de que un método es adecuado a su propósito, o sea, para resolver un problema analítico particular.

Consiste en el proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones de un método además de identificar las influencias que pueden modificar dichas características.

Al realizar mediciones analíticas es necesario determinar el resultado correcto, pero además, se debe de tener la capacidad de demostrar que dicho resultado lo es, si el

resultado de una medición no es confiable entonces tiene poco valor, para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que de este modo cualquier decisión basada en éste pueda tomarse con confianza. Por lo tanto la validación del método permite demostrar que el método es adecuado para su propósito (CENAM, 2005).

Una de las formas de llevar a cabo la validación es el uso de un material de referencia certificado (MRC), estos materiales tienen que ser de naturaleza similar a las muestras reales, esto significa que deben tener una composición similar.

#### **4.14 Parámetros de desempeño analítico.**

Durante la validación de un método se determinan los siguientes parámetros:

##### **4.14.1 Límite de detección instrumental (LoDI) y Límite de cuantificación instrumental (LoQI).**

EL LoDI se refiere a la menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo condiciones establecidas. Es la concentración promedio equivalente a la señal analítica de 10 blancos muestra (b) más tres veces la desviación estándar (s) de la señal, ecuación 2 (EURACHEM, 1998).

$$\text{LoD} = b + 3s \quad \text{Ecuación 2}$$

Por otra parte el LoQI, es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión, de repetibilidad y veracidad. Se expresa como la concentración promedio equivalente de la señal analítica de 10 blancos muestra (b) más diez veces la desviación estándar (s) de la señal, ecuación 3 (EURACHEM, 1998).

$$\text{LoQI} = b + 10s \quad \text{Ecuación 3}$$

#### 4.14.2 Intervalo lineal y de trabajo.

El intervalo lineal se obtiene al realizar la inspección visual de la curva para la identificación de los valores aberrantes si los hay y pueden ser discriminados, posteriormente se calcula el coeficiente de correlación el cual debe de ser mayor o igual a 0.999 (EURACHEM, 1998). El intervalo de trabajo, es el intervalo de concentraciones de las disoluciones de las muestras reales medidas. El límite inferior está definido por el límite de cuantificación y el superior es la concentración máxima en las muestras reales analizadas multiplicadas por dos, para asegurar que las concentraciones de las muestras tengan el menor error posible. Por lo tanto es el intervalo de concentraciones en las que puede aplicarse la metodología (EURACHEM, 1998).

#### 4.14.3 Exactitud y precisión.

La exactitud es el grado de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. Se determina mediante el porcentaje de error relativo, el cual debe ser  $\pm 20\%$  (European commission, 2009). El porcentaje de error relativo se obtiene con la ecuación 4, donde el valor aceptado como verdadero es el valor de referencia.

$$\% \text{ Error relativo} = \left( \frac{\text{Valor experimental} - \text{Valor de Referencia}}{\text{Valor de Referencia}} \right) * 100$$

Ecuación 4

La precisión es la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas (Rodríguez, 2001). Se determina mediante el porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) y el método será preciso si el  $\%RSD \leq 20\%$  (European commission, 2009). El %RSD se calcula con la ecuación 5, donde “DESVEST” es la desviación estándar de los resultados y “x” es el promedio de los resultados.

$$\%RSD = \left( \frac{DESVEST}{x} \right) * 100$$

Ecuación 5

## 5. Metodología.

A continuación se presenta la estrategia experimental empleada (Figura 8).



Figura 8. Esquema de bloques de la estrategia experimental.

## **5.1 Equipos, reactivos y material.**

### **5.1.1 Equipo.**

- Espectrómetro de masas ICP-MS, modelo Elan DRC-e, Perkin Elmer.
- Equipo de digestión vía húmeda en sistema cerrado, Milestone microwave laboratory systems, mls 1200 Mega.
- Balanza analítica, Sartorius modelo BP 221s.
- Estufa Heraeus modelo RB 360.
- Desionizador Barnstead subron corporation.

### **5.1.2 Reactivos y soluciones.**

- $\text{HNO}_3$  (concentrado) ultrex II , J.T Baker
- $\text{HNO}_3$  (Grado R.A.) al 30% (V/V) J.T Baker
- $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%) ultrex II , J.T Baker
- Soluciones de estándares (High Purity) de Y, Ge, Se y Cr de 1000  $\mu\text{g/L}$
- Solución daily. Smart tune solution Std. ELAN & DRC-e al 1%  $\text{HNO}_3$  de 10  $\mu\text{g/L}$  Ba, Be, Ce, Co, In, Mg, Pb, Rh y U. Perkin Elmer Pure, Atomic Spectrometry Standard.
- Solución estándar multielemental (Cr y Se) de 10 mg/L y 0.2 mg/L.
- Solución de estándares internos (Y, Ge y Sc) de 10 mg/L y 0.2 mg/L.
- Gas argón grado ultra alta pureza (99.999%).

### **5.1.3 Material.**

- Espátula con cubierta de teflón.
- Cuchillo de cerámica.
- Charolas de polietileno.
- Papel filtro Whatman No.42.
- Recipientes de polietileno de 10, 25, 50 y 100 mL.
- Matraces aforados de 10, 25 y 50 mL y 1L.

- Cajas de petri.
- Bolsas de polietileno.
- Pipetas volumétricas de 1 y 5 mL.
- Morteros de cerámica.
- Micropipetas (20-200  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L y 500-5000  $\mu$ L).

#### **5.1.4 Materiales de Referencia Certificados.**

- DORM-4 (proteína de pescado), DOLT-4 (hígado de cazón) y TORT-2 (hepatopáncreas de langosta), National Research Council of Canada.

#### **5.2 Recolección de muestras.**

En el mes de Octubre de 2012 se recolectaron 60 muestras de la especie *Oreochromis niloticus*, procedentes de los municipios de Acula y Tlacotalpan (Veracruz), 30 especímenes de cada lugar.

#### **5.3 Tratamiento físico.**

Una vez que las muestras fueron transportadas al laboratorio se procedió a conservarlas en refrigeración, a una temperatura aproximada de -20 °C en bolsas de plástico individuales (Djedjibegovic, 2012).

Se procedió a lavar el material debido que por ser un análisis a nivel de trazas es de especial importancia seguir un procedimiento de lavado muy riguroso, el cual consistió en:

- Lavado con agua de la llave.
- Se sumergió en solución de detergente Hyclin al 15% (detergente neutro libre de fosfatos) por ocho horas.
- Se enjuagó con agua de la llave.

- Se sumergió en  $\text{HNO}_3$  grado reactivo al 30% (V/V) durante ocho horas.
- Se enjuagó diez veces con agua desionizada
- Se dejó escurrir y secar a temperatura ambiente en un lugar apropiado, limpio y seco.
- Se almacena en bolsas de polietileno.

Después se realizó la disección del músculo de la mojarra empleando un cuchillo de cerámica (previamente lavado mediante el procedimiento descrito).

Se almacenaron en bolsas de polietileno con su respectivo código de identificación y se conservaron en refrigeración.

Posteriormente se secaron las muestras en vidrios de reloj o cajas de Petri (considerando un porcentaje de humedad de 70-75%, porcentaje determinado previamente con una muestra comercial) a una temperatura menor de  $60^\circ\text{C}$  para prevenir la volatilización del cromo (Shu Feng, 1998).

Cuando las muestras de tejido alcanzaron un peso constante se llevó a cabo un proceso de pulverización y homogeneización, en un mortero de porcelana, se guardaron en bolsas de polietileno, en un lugar con baja humedad y a temperatura ambiente, hasta que fueron sometidas al proceso de digestión en la siguiente etapa.

#### **5.4 Tratamiento químico.**

Se pesó 1 gramo de cada uno de los materiales de referencia certificados y de las muestras, registrando el peso exacto.

Se llevó a cabo una digestión previa con una muestra de práctica (muestra de origen comercial) para determinar las cantidades adecuadas de reactivos a utilizar para que la misma fuera digerida por completo. Se añadieron 3 mL de  $\text{HNO}_3$  (ULTREX II Ultrapure reagent) con una pipeta Beral y se dejó en predigestión por dos horas, posteriormente se añadió 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ULTREX II Ultrapure reagent) y se dejó en reposo por dos horas más.

Para los blancos se llevó a cabo el mismo procedimiento pero excluyendo la adición de muestra.

Para la digestión húmeda se empleó el programa de digestión del equipo de microondas Milestone MLS 1200 Mega (tabla 1), seleccionado con base en la literatura (Campbell, 1992). Seguido de 10 minutos de ventilación dentro del equipo.

Tabla 1. Programa de digestión empleado.

PASO	POTENCIA (W)	TIEMPO (min)
1	250	1
2	0	2
3	250	5
4	400	10

Se enfriaron las muestras después de ser digeridas a temperatura ambiente y por un tiempo de 20 minutos.

Se filtraron las disoluciones con papel Whatman No. 42 y se llevaron al aforo de 10 mL con agua desionizada.

Se trasvasaron a recipientes de plástico para su conservación y se guardaron en el refrigerador, para posteriormente realizar las diluciones gravimétricas.

### **5.5 Diluciones gravimétricas.**

El propósito de diluir las muestras fue con la finalidad de disminuir las interferencias de matriz y de asegurar que la concentración de los analitos en MRC y muestras se encontrara dentro del intervalo lineal (Rodríguez, 2001).

Se decidió diluir gravimétricamente y no volumétricamente debido a que la balanza analítica es un instrumento de alta precisión y sensibilidad, poseyendo un margen de error muy bajo (incertidumbres pequeñas, de 0.1 mg o menos) (Torres, 2013).

Las muestras y blancos se diluyeron gravimétricamente a 1:2 y 1:10. (Tabla 2)

Tabla 2. Preparación de diluciones gravimétricas.

Dilución	Muestra (g)	Estándar interno (g) (30 µg/L)	Agua desionizada (g)	Masa total (g)
1:2	5	1.5	3.5	10
1:10	1	1.5	7.5	10

### 5.6 Introducción de disoluciones al equipo.

En cada sesión el procedimiento consistía primeramente en esperar media hora para la estabilización del plasma, posteriormente se introducía la solución daily, para verificar que las condiciones de trabajo fueran adecuadas.

Después se introduce la curva de calibración y finalmente las muestras correspondientes, comenzando con los blancos, luego las muestras más diluidas hasta las muestras más concentradas.

En la tabla 3, se muestran las condiciones elegidas para trabajar los materiales de referencia certificados y las muestras, el motivo para usar estas condiciones se menciona en la parte de análisis de resultados.

Tabla 3. Condiciones finales elegidas para la determinación.

<b>Parámetro</b>	<b>Valor/descripción</b>
Flujo del gas nebulizador	0.81 L/min
Flujo del gas auxiliar	1.2 L/min
Flujo del gas plasmógeno	13.5 L/min
Potencia de radiofrecuencia del ICP	1100 W
Voltaje de lentes iónicas	6 V
Nebulizador	Flujo cruzado
Conos discriminador y de muestreo	Níquel
Número de réplicas	3

### 5.7 Isótopos analito y estándar interno.

Las parejas de isótopo analito - estándar interno elegidos fueron el  $^{53}\text{Cr}$  con  $^{74}\text{Ge}$  y  $^{82}\text{Se}$  con  $^{89}\text{Y}$ , debido a que mostraron los mejores resultados de exactitud y precisión en los materiales de referencia certificados, tales resultados se discutirán más adelante.

## **5.8 Parámetros de desempeño analítico.**

Una vez elegidas las condiciones instrumentales adecuadas y los isótopos analitos con sus respectivos estándares internos, se procedió a determinar los parámetros de desempeño analíticos con la finalidad de identificar las limitaciones del método y los factores que pueden cambiar los resultados y así verificar que la metodología es apropiada para los analitos de estudio (EURACHEM,1998).

Los parámetros de desempeño del método que fueron evaluados son los siguientes:

### **5.8.1 Límite de detección instrumental (LoDI) y Límite de cuantificación instrumental (LoQI).**

Para obtener el LoDI se siguió el siguiente procedimiento:

- Se analizaron 10 blancos de calibración independientes.
- Se obtuvieron las concentraciones en  $\mu\text{g/L}$  para cromo y selenio.
- Se obtuvo el promedio ( $\bar{b}$ ) y la desviación estándar ( $s$ ) de las mediciones.
- Se sustituyeron los datos en la ecuación 2.

Por otra parte el LoQI, se expresa como el LoDI más diez veces la desviación estándar ( $s$ ) de los blancos muestra, ecuación 3.

### **5.8.2 Intervalo lineal y de trabajo.**

El intervalo lineal se obtiene al realizar la inspección visual de la curva para la identificación de los valores aberrantes si los hay y pueden ser discriminados, posteriormente se calcula el coeficiente de correlación el cual debe ser mayor o igual a 0.999 (EURACHEM, 2005).

Para esto se prepararon 4 curvas de [1-150  $\mu\text{g/L}$ ] de Cr y Se incluyendo sus respectivos blancos de calibración (0  $\mu\text{g/L}$ ).

Todos los puntos de la curva fueron preparados gravimétricamente de la siguiente manera:

Intervalo [1-150 µg/L] estándar de Cr y Se + EI (Ge e Y) [30 µg/L] + 20 mL HNO<sub>3</sub> 1 % v/v y se llevaron a 50 g con agua desionizada.

Para obtener la curva de calibración, se graficó el cociente de las señales del isótopo analito entre el isótopo del estándar interno versus la concentración (µg / L) del analito.

Los valores no concordantes fueron eliminados con base en la inspección visual de la curva de calibración y además del análisis de proporcionalidad entre las concentraciones experimentales obtenidas.

El intervalo de trabajo, es el intervalo de concentraciones de las disoluciones de las muestras reales medidas. El límite inferior está definido por el límite de cuantificación y el superior es la concentración máxima en las muestras reales analizadas multiplicadas por dos, para asegurar que las concentraciones de las muestras tengan el menor error posible. Por lo tanto es el intervalo de concentraciones en las que puede aplicarse la metodología (EURACHEM, 1998).

### **5.8.3 Exactitud y precisión.**

La exactitud y precisión se obtuvieron al analizar los tres materiales de referencia certificados mencionados anteriormente, dichos materiales fueron analizados por triplicado (n=3).

### **5.9 Aplicación de la metodología a muestras reales.**

Una vez establecidos los parámetros de desempeño de la metodología, se procedió a aplicar la misma a las muestras reales procedentes del estado de Veracruz, de un total de 60 muestras, 10 se analizaron por triplicado y el resto fueron muestras únicas.

## 6. Resultados y discusión.

### 6.1 Optimización de las condiciones instrumentales del ICP-MS.

Con la finalidad de obtener el valor de flujo más adecuado para el gas nebulizador se determinaron los siguientes parámetros a 0.77, 0.81 y 0.85 L/min:

- Cuentas por segundo (cps): De acuerdo con la información proporcionada por el manual del equipo deben obtenerse los siguientes valores al analizar la solución "Daily", que se emplea para verificar que las cps sean adecuadas para masas bajas (Mg), masas medias (In) y masas altas (U):

Mg > 5000 cps

In > 25000 cps

U > 20000 cps

- % Óxidos: Se calcula como el cociente de las cps obtenidas para CeO entre las obtenidas para el Ce. Se elige la especie CeO porque es la más refractaria, lo que significa que si logramos un porcentaje bajo de la misma entonces cualquier otra especie que se encuentre como óxido será eliminada ¿disociada? con seguridad. El criterio es obtener un % Óxidos < 3%.
- % Especies doblemente cargadas: Se calcula como el cociente de las cps obtenidas para Ba<sup>++</sup> entre las obtenidas para el Ba. Se elige la especie Ba<sup>++</sup> porque es la que tiene la segunda energía de ionización más baja, lo que significa que si logramos un porcentaje bajo de la misma entonces cualquiera otra especie doblemente cargada no se presentará. El criterio es obtener un % de especies doblemente cargadas < 3%.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Modificación del flujo del gas nebulizador.

<b>Flujo del gas nebulizador (L/min)</b>		<b>0.77</b>	<b>0.81</b>	<b>0.85</b>
Cuentas por segundo (cps)	Mg	6112.577	8766.949	15856.934
	In	13295.923	19724.32	32653.171
	U	17160.375	25036.157	39849.913
%RSD	Mg	1.1	1.7	2.3
	In	0.9	0.6	2.35
	U	0.7	0.7	2.6
%Óxidos		2	2.6	1.9
%Especies doblemente cargadas		3.5	3.8	3.2

Como puede observarse en la tabla anterior, las cps para masas medias y altas, cuando tenemos un flujo de 0.77 L/min, no cumplen con el criterio antes mencionado, sin embargo podemos lograr un aumento en las cps al aumentar el flujo del gas nebulizador a 0.85 L/min. No obstante sacrificamos precisión (expresada como %RSD), por lo cual se decidió emplear un flujo intermedio de 0.81 L/min para el que se obtiene una precisión aceptable y además valores de % de óxidos menores a 3%. Como se puede observar hay un 3.8 % de especies doblemente cargadas, se decidió aceptar este valor ya que ninguno de los analitos a cuantificar presenta especies con doble carga. Respecto a los valores obtenidos para las cps, se nota que en el caso del Mg el valor es efectivamente mayor a 5000 y tomando en

consideración que el Cr y el Se se encuentran en el rango de masas bajas, no influye que los cps para In sean un poco menores.

## 6.2 Elección de los isótopos analitos.

Los isótopos analitos se seleccionan tomando en cuenta cuáles son los más abundantes y también por el número de interferencias que presentan. El selenio presenta seis isótopos estables naturales mientras que el cromo presenta cuatro, siendo el  $^{52}\text{Cr}$  y  $^{80}\text{Se}$  los más abundantes, sin embargo el  $^{80}\text{Se}$  presenta interferencia de tipo isobárica con el  $^{80}\text{Kr}$ , para corregir estas interferencias a veces se utilizan ecuaciones de corrección, reportadas en la literatura o bien sugeridas por el software del equipo (ver tabla 6).

Los estándares internos se eligen con base en las características de los analitos de interés, por lo tanto se seleccionan elementos con unidades de masa atómica y energías de ionización similares a las que poseen los analitos, cabe mencionar que es sólo una suposición que se hace con base en los conceptos teóricos, sin embargo es imprescindible realizar el experimento para encontrar la pareja más adecuada.

Se cuantificaron los isótopos analitos y se probaron los estándares internos mostrados en la tabla 5.

Tabla 5. Isótopos y estándares internos propuestos.

Isótopos analitos	Energía de ionización (kJ/mol)	Estándar interno propuesto	Energía de ionización (kJ/mol)
$^{52}\text{Cr}$ , $^{53}\text{Cr}$	652,9	$^{45}\text{Sc}$ , $^{72}\text{Ge}$ , $^{74}\text{Ge}$	Sc: 633,1 Ge: 762
$^{77}\text{Se}$ , $^{78}\text{Se}$ , $^{82}\text{Se}$	941	$^{89}\text{Y}$ , $^{72}\text{Ge}$ , $^{74}\text{Ge}$	Y: 599,58 Ge: 762

Tabla 6. Principales interferencias poliatómicas e isobáricas para los isótopos analitos de interés (PROY-NMX-AA-131/2-SCFI-2008; Cubadda, 2003; Pick, 2010).

Isótopo	% Abundancia relativa	Interferencias poliatómicas	Interferencias isobáricas	Ecuaciones de corrección
$^{52}\text{Cr}$	83.76	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}$ , $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^1\text{H}$ , $^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}$ , $^{37}\text{Cl}^{15}\text{N}$ , $^{36}\text{S}^{16}\text{O}$ , $^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}$ , $^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}$ , $^{36}\text{Ar}^{15}\text{NH}$ , $^{34}\text{S}^{16}\text{O}$ , $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$	$^{52}\text{Fe}^+$	No reportadas
$^{53}\text{Cr}$	9.55	$^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}$ , $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$ , $^{36}\text{Ar}^{17}\text{O}$ , $^{36}\text{Ar}^{16}\text{OH}$ , $^{38}\text{Ar}^{15}\text{N}$ , $^{38}\text{Ar}^{14}\text{NH}$ , $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}$ , $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}$ , $^{35}\text{Cl}^{17}\text{OH}$ , $^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}$ , $^{36}\text{S}^{17}\text{O}$	$^{52}\text{Fe}^+$	No reportadas
$^{77}\text{Se}$	7.63	No reportadas	Ninguna	No reportadas
$^{78}\text{Se}$	23.78	$^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}$ , $^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ca}$	$^{78}\text{Kr}$	No reportadas
$^{82}\text{Se}$	8.73	$^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}_2$ , $^{40}\text{Ar}_2$ $^1\text{H}_2$	Ninguna	- $0.198433 * I(^{83}\text{Kr})$

A pesar de que el Kr no es una especie predominante en el plasma, se utilizó la ecuación de corrección para el  $^{82}\text{Se}$  (tabla X) al hacer las determinaciones.

Como ya se ha mencionado antes, es necesario utilizar materiales de referencia certificados (Tabla 7) para la validación de la metodología.

Tabla 7. Materiales de referencia certificados propuestos para la validación de la metodología analítica mediante ICP-MS.

* MRC	Concentración de Cr (mg/kg)	Concentración de Se (mg/kg)
DORM-4 (proteína de pescado)	1.87 ± 0.16	3.56 ± 0.34
DOLT-4 (hígado de cazón)	1.4	8.3 ± 1.3
TORT-2 (hepatopáncreas de langosta)	0.77 ± 0.15	5.63 ± 0.67

\*Proporcionados por el National Research Council of Canada.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para los materiales de referencia, sólo aparecen los analitos y estándares internos que dieron los mejores resultados (tablas 8 a 10) para el cromo y (tablas 11 a 13) para el selenio.

Tabla 8. Resultados para Cr en DORM-4.

Valor certificado (mg/kg)	Analito	EI	[mg/kg]	Exactitud % Error relativo	Precisión %RSD
1.87 ± 0.16	<sup>52</sup> Cr	<sup>72</sup> Ge	1.95	4.50	0.14
		<sup>74</sup> Ge	1.81	-3.44	1.13
		<sup>45</sup> Sc	1.48	-20.78	2.41
	<sup>53</sup> Cr	<sup>72</sup> Ge	1.83	-1.92	9.95
		<sup>74</sup> Ge	1.84	-1.62	12.35
		<sup>45</sup> Sc	1.63	-13.00	2.02

Tabla 9. Resultados para Cr en DOLT-4.

Valor certificado (mg/kg)	Analito	El	[mg/kg]	Exactitud % Error relativo	Precisión %RSD
1.4	<sup>52</sup> Cr	<sup>74</sup> Ge	1.05	-25.22	5.50
		<sup>72</sup> Ge	1.19	-14.71	0.55
	<sup>53</sup> Cr	<sup>74</sup> Ge	1.46	4.00	2.54
		<sup>45</sup> Sc	1.06	-24.32	6.43

Tabla 10. Resultados para Cr en TORT-2.

Valor certificado (mg/kg)	Analito	El	[mg/kg]	Exactitud % Error relativo	Precisión %RSD
0.77 ± 0.15	<sup>52</sup> Cr	<sup>72</sup> Ge	0.80	4.20	5.72
		<sup>74</sup> Ge	0.86	11.17	5.93
	<sup>53</sup> Cr	<sup>72</sup> Ge	0.82	6.69	29.22
		<sup>45</sup> Sc	0.90	17.11	34.71

Respecto al MRC DORM-4 (tabla 8), puede notarse que el mejor resultado, en cuanto a exactitud (-1.62%) se obtuvo con el isótopo analito <sup>53</sup>Cr junto con el estándar interno <sup>74</sup>Ge, aunque no haya sido el mejor en cuanto a precisión, el resultado de 12.35% RSD se considera como aceptable debido a que es menor a 20% (European Commission, 2009).

En cuanto al DOLT-4 (tabla 9) el mejor resultado para exactitud (4.00%) nuevamente se obtuvo con el isótopo analito  $^{53}\text{Cr}$  junto con el estándar interno  $^{74}\text{Ge}$ , aunque no haya sido el mejor en cuanto a precisión, el resultado de 2.54% RSD se considera como aceptable debido a que es menor al 20%.

Finalmente para TORT-2 (tabla 10) el mejor resultado de exactitud se obtuvo para el isótopo analito  $^{52}\text{Cr}$  junto con el estándar interno  $^{72}\text{Ge}$ , con valores de 4.20% de error relativo y un 5.72 %RSD.

Como puede verse, con la pareja  $^{53}\text{Cr}/^{74}\text{Ge}$  se obtuvieron los mejores resultados para DORM-4 (proteína de pescado) y DOLT-4 (hígado de cazón), lo cual es muy importante, ya que se requiere aplicar la metodología en músculo de pescado, es decir una matriz que consiste principalmente en proteínas, por lo tanto la metodología es aplicable para la determinación en las muestras reales.

También se obtuvieron buenos resultados para el material correspondiente al hígado de cazón lo cual demuestra que la metodología también puede ser aplicada a otro tipo de tejidos similares.

Por otra parte la tabla 10 (TORT-2) no muestra los resultados correspondientes a la pareja  $^{53}\text{Cr}/^{74}\text{Ge}$ , debido a que los cálculos de %error relativo y %RSD dieron resultados por arriba de 100% para ambos parámetros. Lo anterior podría deberse a errores experimentales durante las lecturas, sería necesario realizar el análisis de los materiales de referencia certificados de nuevo. Los mejores resultados, de exactitud y precisión, para este material de referencia certificado, se obtuvieron con la pareja  $^{52}\text{Cr}/^{72}\text{Ge}$ .

Por lo tanto, se puede decir que la pareja  $^{53}\text{Cr}/^{74}\text{Ge}$ , es la mejor opción para realizar los análisis en las muestras reales.

Tabla 11. Resultados para Se en DORM-4.

Valor certificado (mg/kg) $3.56 \pm 0.34$	Analito	El	[mg/kg]	Exactitud % Error relativo	Precisión %RSD
	<sup>78</sup> Se		<sup>72</sup> Ge	4.26	19.69
<sup>74</sup> Ge			4.13	16.11	8.40
<sup>89</sup> Y			4.02	13.05	7.57
<sup>82</sup> Se		<sup>72</sup> Ge	4.36	22.58	5.33
		<sup>74</sup> Ge	4.41	23.90	4.67
		<sup>89</sup> Y	4.20	18.10	13.08

Tabla 12. Resultados para Se en DOLT-4.

Valor certificado (mg/kg) $8.3 \pm 1.3$	Analito	El	[mg/kg]	Exactitud % Error relativo	Precisión %RSD
	<sup>77</sup> Se		<sup>72</sup> Ge	9.61	15.83
<sup>74</sup> Ge			9.44	13.79	0.95
<sup>78</sup> Se		<sup>72</sup> Ge	8.97	8.02	1.34
		<sup>74</sup> Ge	9.63	16.07	0.18
		<sup>89</sup> Y	9.86	18.85	2.94
<sup>82</sup> Se		<sup>72</sup> Ge	9.36	12.74	5.71
		<sup>74</sup> Ge	9.56	15.18	0.18
		<sup>89</sup> Y	8.89	7.11	5.13

Tabla 13. Resultados para Se en TORT-2.

Valor certificado (mg/kg)	Analito	EI	[mg/kg]	Exactitud % Error relativo	Precisión %RSD
5.63 ± 0.67	<sup>77</sup> Se	<sup>72</sup> Ge	7.13	26.55	0.24
		<sup>74</sup> Ge	6.97	23.87	1.16
	<sup>78</sup> Se	<sup>89</sup> Y	7.15	27.01	0.77
	<sup>82</sup> Se	<sup>72</sup> Ge	7.21	28.09	2.87
		<sup>89</sup> Y	5.95	5.60	2.09

Respecto al MRC DORM-4 (tabla 11), puede notarse que el mejor resultado, en cuanto a exactitud (13.05%) se obtuvo con el isótopo analito <sup>78</sup>Se junto con el estándar interno <sup>89</sup>Y, aunque no haya sido el mejor en cuanto a precisión, el resultado de 7.57 % RSD se considera como aceptable debido a que es menor al 20%.

En cuanto al DOLT-4 (tabla 12) el mejor resultado para exactitud (7.11%) y precisión (5.13%) se obtuvo con el isótopo analito <sup>82</sup>Se junto con el estándar interno <sup>89</sup>Y, aunque no haya sido el mejor en cuanto a precisión, el resultado de 5.13% RSD se considera como aceptable debido a que es menor al 20%.

Finalmente para TORT-2 (tabla 13) el mejor resultado de exactitud se obtuvo para el isótopo analito <sup>82</sup>Se junto con el estándar interno <sup>89</sup>Y, con valores de 5.60% de error relativo y un 2.09 %RSD.

Como puede verse, con la pareja <sup>82</sup>Se/<sup>89</sup>Y se obtuvieron los mejores resultados para DOLT-4 (hígado de cazón) y TORT-2 (hepatopáncreas de langosta). También se obtuvieron buenos resultados para DORM-4 (proteína de pescado) con la diferencia de que la pareja isótopo analito/estándar interno, con los mejores valores de precisión y exactitud, resulto ser <sup>78</sup>Se/<sup>89</sup>Y. Sin embargo, lo ideal es que se escogiera la misma pareja de isótopos para los análisis en diferentes matrices, por lo tanto se puede considerar buena opción elegir

también a la pareja  $^{82}\text{Se}/^{89}\text{Y}$ , ya que presenta valores de exactitud y precisión de 18.10 y 13.08, respectivamente en DORM-4 (tabla 11).

Por lo tanto, se puede decir que la pareja  $^{82}\text{Se}/^{89}\text{Y}$ , es la mejor opción para realizar los análisis en las muestras reales.

El  $^{82}\text{Se}$  resulto ser el mejor isótopo analito, en teoría se esperaba que fuera el  $^{78}\text{Se}$  al ser el isótopo más abundante, sin embargo este último tiene como interferente isobárico al  $^{78}\text{Kr}$  y una interferencia de tipo poliatómica con  $^{40}\text{Ar}^{38}\text{Ar}$  que es una especie muy abundante en un plasma de Ar.

Por otra parte, en la elección de los isótopos del cromo se prefirió al  $^{53}\text{Cr}/^{74}\text{Ge}$ , a pesar de que el  $^{52}\text{Cr}$  también era una opción debido a que presento los mejores valores de precisión y exactitud para los materiales de referencia certificados DORM-4 y DOLT-4, que son los más similares a la matriz de estudio.

### **6.3 Parámetros de desempeño analítico.**

Una vez que se eligieron los isótopos analitos con sus respectivos estándares internos, se procedió a establecer las condiciones analíticas y los parámetros de desempeño analíticos con la finalidad de identificar las limitaciones del método y los factores que pueden cambiar los resultados y así verificar que la metodología es apropiada para los analitos de estudio (EURACHEM,1998).

Los parámetros de desempeño del método que fueron evaluados son los siguientes:

### 6.3.1 Límite de detección instrumental (LoDI) y Límite de cuantificación instrumental (LoQI).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 14:

Tabla 14. Límites de cuantificación y detección instrumentales calculados para cromo y selenio.

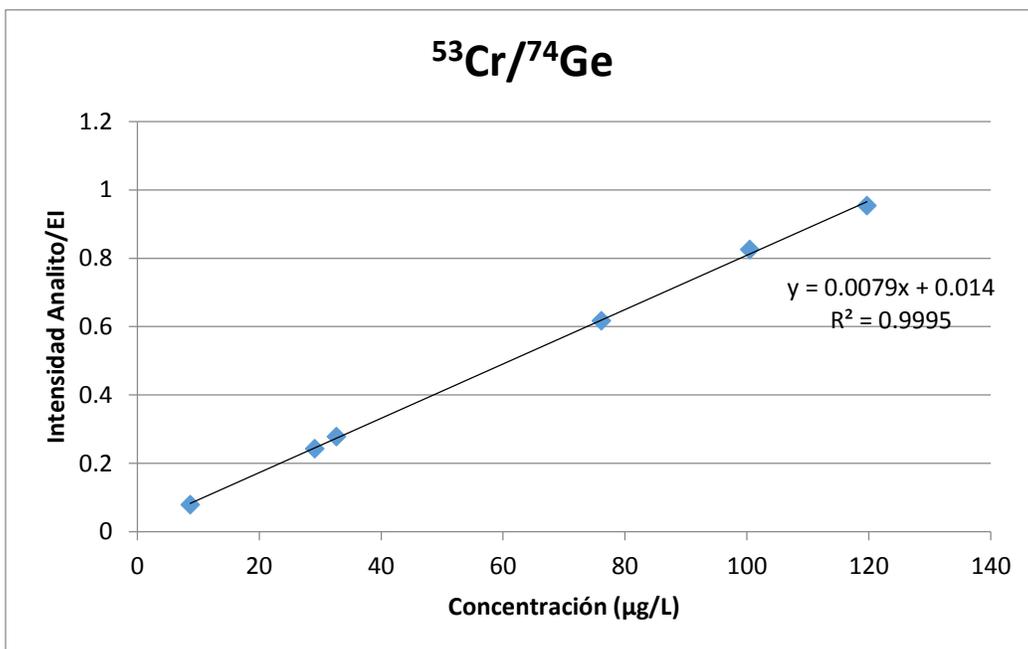
Analito	LoDI ( $\mu\text{g/L}$ )	LoQI ( $\mu\text{g/L}$ )
Cromo	3.67	7.47
Selenio	0.18	0.49

Como puede notarse el equipo presenta mayor sensibilidad para detectar selenio que cromo, ya que el límite de cuantificación para el selenio es casi 16 veces más pequeño que para el cromo.

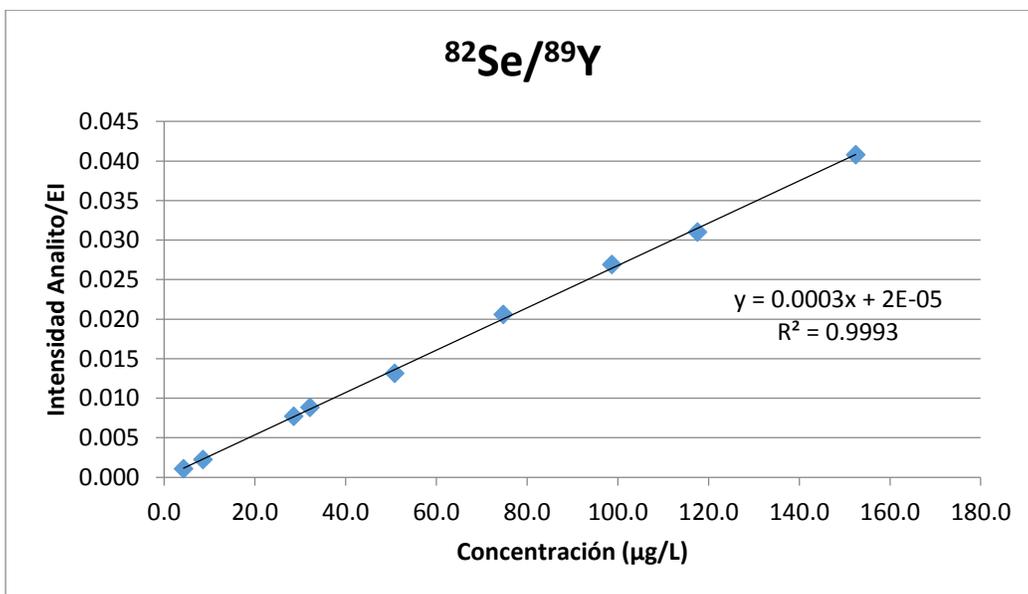
### 6.3.2 Intervalo lineal.

Los valores no concordantes fueron eliminados con base en la inspección visual de la curva de calibración y además del análisis de proporcionalidad entre las concentraciones experimentales obtenidas, lo cual dio como resultado un intervalo lineal de 10-120  $\mu\text{g/L}$  para el  $^{53}\text{Cr}$  con el estándar interno  $^{74}\text{Ge}$ . Por otra parte, se obtuvo un intervalo lineal de 5-150  $\mu\text{g/L}$  para el  $^{82}\text{Se}$  con el estándar interno  $^{89}\text{Y}$  (gráficas 1 y 2).

Gráfica 1. Curva de calibración para la cuantificación del isótopo analito  $^{53}\text{Cr}$ , con el estándar interno  $^{74}\text{Ge}$ .



Gráfica 2. Curva de calibración para la cuantificación del isótopo analito  $^{82}\text{Se}$ , con el estándar interno  $^{89}\text{Y}$ .



### 6.3.3 El intervalo de trabajo

El límite inferior del intervalo de trabajo queda definido por el límite de cuantificación y el superior por la concentración más alta encontrada en las muestras, multiplicada por un factor de dos. De acuerdo con lo anterior el intervalo de trabajo para la determinación de  $^{53}\text{Cr}$  fue de 7.47-80.56  $\mu\text{g/L}$ , debido a que la concentración de cromo más elevada en las muestras reales fue de 40.28  $\mu\text{g/L}$ .

De manera análoga para el  $^{82}\text{Se}$  se eligió un intervalo de trabajo de 0.49-286.98  $\mu\text{g/L}$ .

### 6.4 Aplicación de la metodología a muestras reales.

Una vez establecidos los parámetros de desempeño de la metodología, se procedió a aplicar la misma a las muestras reales procedentes del estado de Veracruz, de un total de 60 muestras, 10 se analizaron por triplicado y el resto fueron muestras únicas.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para las muestras analizadas por triplicado.

Tabla 15. Concentraciones promedio de las determinaciones por triplicado para las muestras procedentes de Acula (n=3).

Muestra	Se		Cr	
	[mg/kg]	% RSD	[mg/kg]	% RSD
A-24	1.57	3.31	0.45	2.88
A-25	0.59	41.08	0.44	8.55
A-31	1.28	5.13	0.33	2.82
A-32	1.09	17.45	0.39	8.66
A-57	1.72	5.6	0.5	1.35
Intervalo de concentraciones	[0.59-1.72]		[0.33-0.50]	

Tabla 16. Concentraciones promedio de las determinaciones por triplicado para las muestras procedentes de Tlacotalpan (n=3).

	Se		Cr	
Muestra	[mg/kg]	% RSD	[mg/kg]	% RSD
T-05	1.1	1.93	0.42	8.9
T-25	2.7	8.63	0.54	0.87
T-53	1.2	2.09	0.49	2.34
T-57	1.3	2.81	0.56	1.02
T-60	1.6	3.64	0.46	6.99
Intervalo de concentraciones	[1.1-2.7]		[0.42-0.56]	

Como puede observarse en las tablas anteriores, para las muestras procedentes de Acula se obtuvieron intervalos de concentración para cromo de [0.33-0.50] mg/kg y para selenio de [0.59-1.72] mg/kg. Para las muestras procedentes de Tlacotalpan se obtuvieron intervalos de concentración para cromo de [0.42-0.56] mg/kg y para selenio de [1.1-2.7] mg/kg. Además, en general, se obtuvieron valores de %RSD menores a 20%, por lo tanto estos resultados permiten concluir que la metodología fue precisa, lo cual significa que pudo ser aplicada para la determinación de cromo y selenio en las 48 muestras restantes.

## 6.5 Concentraciones de cromo y selenio en muestras únicas.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para las muestras únicas.

Tabla 17. Concentraciones de Cr en muestras procedentes de los municipios de Acula y Tlacotalpan (en peso seco).

Tlacotalpan		Acula	
Muestra	[mg/kg]	Muestra	[mg/kg]
MTT 01	0.55	MTA 01	0.37
MTT 02	0.44	MTA 02	0.48
MTT 03	0.40	MTA 03	0.34
MTT 04	0.60	MTA 04	0.57
MTT 06	0.50	MTA 05	0.64
MTT 07	0.50	MTA 06	0.48
MTT 08	0.48	MTA 07	0.63
MTT 09	0.40	MTA 08	0.21
MTT 10	0.47	MTA 09	0.52
MTT 11	0.46	MTA 10	0.47
MTT 13	0.50	MTA 11	0.63
MTT 14	0.48	MTA 12	0.36
MTT 15	0.50	MTA 13	0.43
MTT 16	0.53	MTA 14	0.27
MTT 17	0.52	MTA 15	0.39
MTT 18	0.54	MTA 16	0.63
MTT 19	0.51	MTA 17	0.59
MTT 20	0.47	MTA 18	0.43
MTT 21	0.62	MTA 19	0.65
MTT 22	0.41	MTA 20	0.71
MTT 23	0.44	MTA 21	0.57
MTT 24	0.43	MTA 22	0.52
MTT 26	0.47	MTA 23	0.42
MTT 27	0.49	MTA 27	0.56
MTT 28	0.45	MTA 28	0.67
MTT 29	0.56	MTA 29	0.45
MTT 30	0.55	MTA 30	0.56
<b>Intervalo</b>		<b>Intervalo</b>	
<b>[0.40-0.62]</b>		<b>[0.21-0.71]</b>	

Como se observa en la tabla 17, el intervalo de concentraciones de cromo en el músculo de mojarra fue [0.40-0.62] mg/kg para las muestras procedentes de Tlacotalpan, mientras que para las procedentes de Acula el intervalo fue [0.21-0.71] mg/kg.

De acuerdo con lo anterior se puede ver que el intervalo para las muestras de Tlacotalpan se encuentra dentro del intervalo de concentraciones para las muestras procedentes de Acula, por lo tanto no parece haber diferencia significativa entre ambos intervalos.

## 6.6 Concentraciones de selenio en muestras reales.

Tabla 18. Concentraciones de Se en muestras procedentes de los municipios de Acula y Tlacotalpan (en peso seco).

Tlacotalpan		Acula	
Muestra	[mg/kg]	Muestra	[mg/kg]
MTT 01	1.48	MTA 01	2.65
MTT 02	1.04	MTA 02	4.44
MTT 03	2.03	MTA 03	2.19
MTT 04	1.06	MTA 04	1.90
MTT 06	0.39	MTA 05	0.17
MTT 07	0.40	MTA 06	0.19
MTT 08	2.44	MTA 07	1.20
MTT 09	1.19	MTA 08	1.93
MTT 10	1.99	MTA 09	1.63
MTT 11	1.72	MTA 10	3.32
MTT 13	2.27	MTA 11	2.84
MTT 14	2.39	MTA 12	3.73
MTT 15	1.42	MTA 13	2.44
MTT 16	2.36	MTA 14	4.09
MTT 17	2.37	MTA 15	1.52
MTT 18	2.37	MTA 16	3.10
MTT 19	1.97	MTA 17	1.74
MTT 20	0.70	MTA 18	2.21
MTT 21	1.66	MTA 19	2.72
MTT 22	2.43	MTA 20	2.21
MTT 23	1.11	MTA 21	2.82
MTT 24	2.73	MTA 22	0.56
MTT 26	2.14	MTA 23	2.58
MTT 27	3.20	MTA 27	0.85
MTT 28	1.56	MTA 28	2.01
MTT 29	2.25	MTA 29	3.16
MTT 30	2.65	MTA 30	2.62
<b>Intervalo</b>		<b>Intervalo</b>	
<b>[0.39-3.20]</b>		<b>[0.17-4.44]</b>	

Como se observa en la tabla 18, el intervalo de concentraciones de selenio en el músculo de mojarra fue [0.39-3.20] mg/kg para las muestras procedentes de Tlacotalpan, mientras que para las procedentes de Acula el intervalo fue [0.17-4.44] mg/kg.

De acuerdo con lo anterior se puede ver que el intervalo para las muestras de Tlacotalpan se encuentra dentro del intervalo de concentraciones para las muestras procedentes de Acula, por lo tanto no parece haber diferencia significativa entre ambos intervalos.

## 6.7 Concentraciones de cromo y selenio reportadas en la literatura.

Una vez obtenidos los intervalos de concentraciones para cromo y selenio en músculo de mojarra para ambos muestreos, se compararon con concentraciones de estos metales reportados en la literatura.

### 6.7.1 Cromo.

A continuación en la tabla 19 se muestran las concentraciones de cromo en pescado reportadas en la literatura.

Tabla 19. Intervalos de concentraciones de Cr reportadas en diversas especies de pescado.

[mg/kg]	Lugar	Referencia bibliográfica
[0.2-1.87]	India	Sankar, 2007
[0.058-0.573]	Francia	Gúerin, 2011
[0.04-1.75]	Turquía	Türkmen, 2008
[0.154-3.994]	México	Vázquez, 2008

De acuerdo con la tabla anterior se observa que en la publicación de Vázquez se reporta el intervalo de concentraciones más amplio [0.154-3.994] mg/kg mientras que el intervalo más pequeño [0.058-0.573] mg/kg se reporta en el estudio llevado a cabo por Guérin en Francia.

Resumiendo la tabla anterior se tiene un intervalo de concentraciones para cromo de [0.04-3.994] mg/kg. Al comparar este intervalo con el obtenido para las muestras procedentes del municipio de Tlacotalpan que fue de [0.40-0.62] mg/kg, nos permite concluir que las concentraciones obtenidas se encuentran dentro del intervalo esperado teóricamente. De igual manera, comparando el intervalo de concentraciones obtenido para las muestras procedentes del municipio de Acula que fue de [0.21-0.71] mg/kg, se puede

concluir que también se encuentran dentro de los intervalos reportados por los autores citados anteriormente.

### 6.7.2 Selenio.

A continuación se muestran las concentraciones de selenio en pescado reportadas en la literatura.

Tabla 20. Intervalos de concentraciones de Se reportadas en diversas especies de pescado.

[mg/kg]	Lugar	Referencia bibliográfica
[0.03-0.95]	India	Sankar, 2007
[0.020-0.761]	Francia	Gúerin, 2011
[0.003-0.2]	Brasil	Medeiros, 2012
[0.25-5.6]	México	Guzmán, 2010

De acuerdo con la tabla anterior se observa que en la publicación de Guzmán se reporta el intervalo de concentraciones más amplio [0.25-5.6] mg/kg mientras que el intervalo más pequeño [0.003-0.2] mg/kg se reporta en el estudio llevado a cabo por Medeiros en Brasil.

Resumiendo la tabla anterior se tiene un intervalo de concentraciones para selenio de [0.003-5.6] mg/kg. Al comparar este intervalo con el obtenido para las muestras procedentes del municipio de Tlacotalpan que fue de [0.39-3.20] mg/kg, nos permite concluir que las concentraciones obtenidas se encuentran dentro del intervalo esperado teóricamente. De igual manera, comparando el intervalo de concentraciones obtenido para las muestras procedentes del municipio de Acula que fue de [0.17-4.44] mg/kg, se llega a la conclusión de que también se encuentran dentro de los intervalos reportados por los autores citados anteriormente.

## 6.8 Normatividad.

En la tabla 21 se muestran los valores de ingesta diaria recomendada según las diferentes legislaciones.

Tabla 21. Valores de ingesta diaria recomendados.

<b>Elemento</b>	<b>México (IDS*)</b>	<b>España y Unión Europea (CDR**)</b>	<b>Estados Unidos de Norte América (RDI***)</b>
Cromo	22 µg	40 µg	120 µg
Selenio	41 µg	55 µg	70 µg

\*Ingesta Diaria Sugerida de acuerdo con la NOM-051-SCFI/SSA1-2010, Especificaciones generales de etiquetado para alimentos y bebidas no alcohólicas preenvasados- Información comercial y sanitaria.

\*\* Cantidades Diarias Recomendadas según el anexo de la norma de etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios (aprobada por el Real Decreto 930/1992).

\*\*\* Ingesta Diaria de Referencia de acuerdo con la FDA en el CFR, Title 21, Volume 2, Part 101, Subpart A.

### 6.8.1 Cromo.

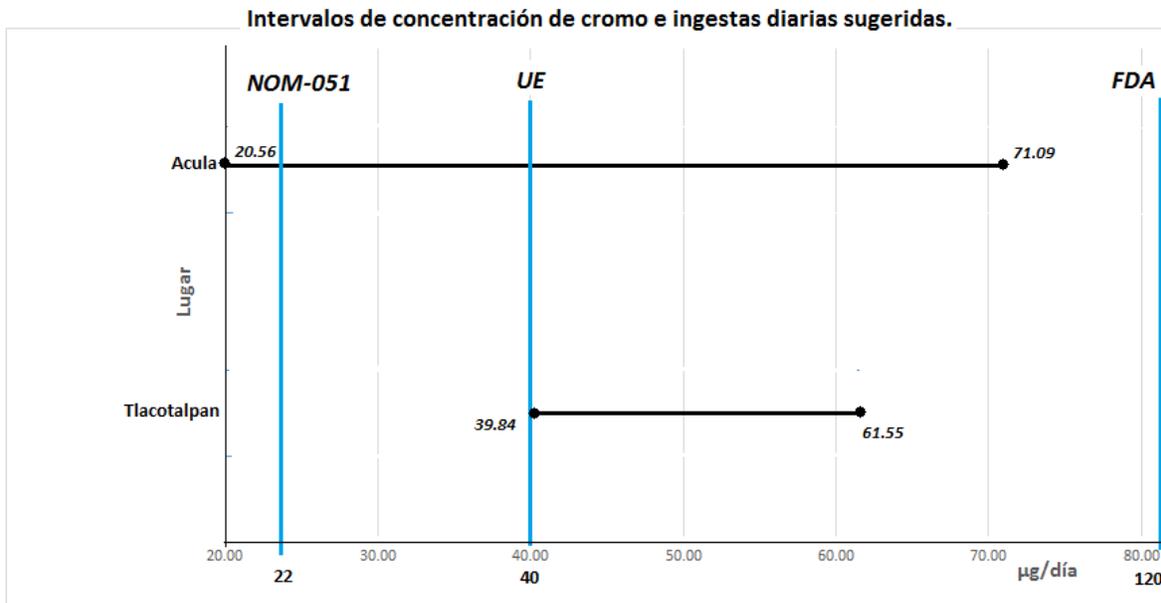
En la tabla 22 se muestran las concentraciones de cromo que una persona ingeriría asumiendo un consumo de 100g de músculo de mojarra por día.

Tabla 22. Concentraciones encontradas expresado como  $\mu\text{g Cr /día}$  para ambos municipios.

Tlacotalpan		Acula	
Muestra	[ $\mu\text{g/día}$ ]	Muestra	[ $\mu\text{g/día}$ ]
MTT 01	54.98	MTA 01	37.44
MTT 02	43.95	MTA 02	47.65
MTT 03	39.84	MTA 03	34.47
MTT 04	59.88	MTA 04	56.59
MTT 06	49.74	MTA 05	64.05
MTT 07	49.74	MTA 06	47.58
MTT 08	48.21	MTA 07	63.24
MTT 09	39.88	MTA 08	20.56
MTT 10	47.14	MTA 09	52.45
MTT 11	45.96	MTA 10	47.07
MTT 13	49.82	MTA 11	63.12
MTT 14	48.00	MTA 12	35.79
MTT 15	50.22	MTA 13	43.07
MTT 16	52.59	MTA 14	26.77
MTT 17	52.13	MTA 15	38.59
MTT 18	54.09	MTA 16	62.61
MTT 19	51.04	MTA 17	58.94
MTT 20	46.84	MTA 18	42.55
MTT 21	61.55	MTA 19	65.35
MTT 22	41.43	MTA 20	71.09
MTT 23	43.64	MTA 21	56.73
MTT 24	42.63	MTA 22	52.40
MTT 26	46.85	MTA 23	42.46
MTT 27	48.56	MTA 27	56.24
MTT 28	45.49	MTA 28	66.90
MTT 29	56.09	MTA 29	44.91
MTT 30	55.04	MTA 30	56.19
<b>Intervalo</b>	<b>[39.84-61.55]</b>	<b>Intervalo</b>	<b>[20.56-71.09]</b>

En la gráfica 3 se muestran los intervalos de concentración de cromo encontrados, expresados como  $\mu\text{g Cr /día}$  con la finalidad de comparar con la ingesta diaria sugerida por las distintas legislaciones.

Gráfica 3.



En la gráfica anterior se observa que las muestras procedentes de Tlacotalpan presentan un intervalo de concentraciones de  $[39.84-61.55] \mu\text{g/día}$ , este intervalo rebasa la Ingesta Diaria Sugerida de  $22 \mu\text{g}$  establecida en la NOM-051-SCFI/SSA1-2010. Este intervalo también es superior a la Cantidad Diaria Recomendada de  $40 \mu\text{g}$  establecida por la Unión Europea, aunque el límite inferior de dicho intervalo está muy cerca del valor establecido.

La FDA establece una Ingesta Diaria de Referencia de  $120 \mu\text{g}$ , por lo tanto el intervalo de concentraciones para las muestras de Tlacotalpan se encuentra por debajo de lo establecido.

En cuanto a las muestras procedentes de Acula, se tiene que presentan un intervalo de concentraciones de [20.56-71.09]  $\mu\text{g}/\text{día}$ , algunas de las muestras de este intervalo rebasan la Ingesta Diaria Sugerida de 22  $\mu\text{g}$  establecida en la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 y también la Cantidad Diaria Recomendada de 40  $\mu\text{g}$  establecida por la Unión Europea.

La FDA establece una Ingesta Diaria de Referencia de 120  $\mu\text{g}$ , por lo tanto el intervalo de concentraciones para las muestras de Acula se encuentra por debajo de lo establecido.

### **6.8.2 Selenio.**

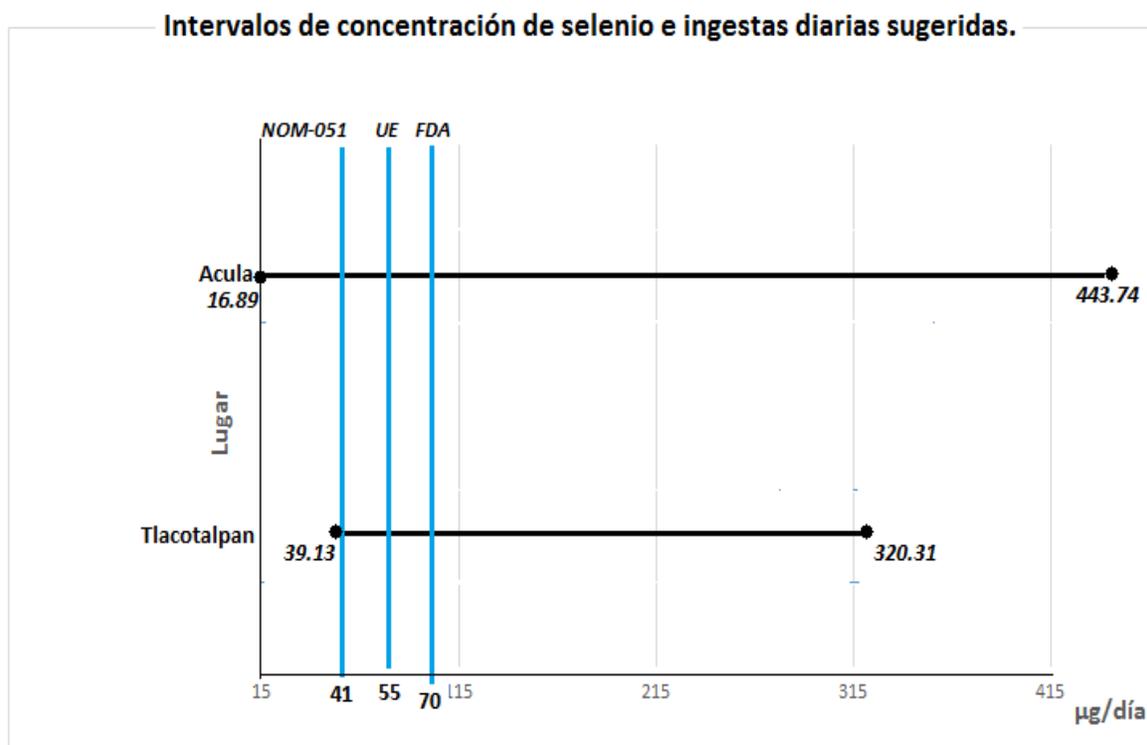
En la tabla 23 se muestran las concentraciones de selenio que una persona ingeriría asumiendo un consumo de 100g de músculo de mojarra por día.

Tabla 23. Concentraciones encontradas expresado como  $\mu\text{g Se /día}$  para ambos municipios.

Tlacotalpan		Acula	
Muestra	$[\mu\text{g/día}]$	Muestra	$[\mu\text{g/día}]$
MTT 01	147.90	MTA 01	265.07
MTT 02	103.64	MTA 02	443.74
MTT 03	202.83	MTA 03	219.42
MTT 04	105.66	MTA 04	189.73
MTT 06	39.13	MTA 05	16.89
MTT 07	39.75	MTA 06	19.26
MTT 08	243.64	MTA 07	120.06
MTT 09	118.51	MTA 08	193.25
MTT 10	199.06	MTA 09	163.31
MTT 11	172.38	MTA 10	331.56
MTT 13	226.77	MTA 11	284.48
MTT 14	239.17	MTA 12	373.21
MTT 15	142.00	MTA 13	244.22
MTT 16	236.14	MTA 14	409.41
MTT 17	236.62	MTA 15	152.21
MTT 18	236.61	MTA 16	310.14
MTT 19	196.68	MTA 17	173.72
MTT 20	69.73	MTA 18	221.39
MTT 21	165.62	MTA 19	272.26
MTT 22	243.26	MTA 20	221.13
MTT 23	110.81	MTA 21	282.43
MTT 24	273.34	MTA 22	55.93
MTT 26	214.26	MTA 23	257.68
MTT 27	320.31	MTA 27	84.93
MTT 28	155.69	MTA 28	200.82
MTT 29	225.19	MTA 29	316.36
MTT 30	265.16	MTA 30	261.58
<b>Intervalo</b>		<b>Intervalo</b>	
<b>[39.13-320.31]</b>		<b>[16.89-443.74]</b>	

En la gráfica 4 se muestran los intervalos de concentración de selenio encontrados, expresados como  $\mu\text{g Se /día}$  con la finalidad de comparar con las ingestas diarias sugeridas por las distintas legislaciones.

Gráfica 4.



En la gráfica anterior se observa que las muestras procedentes de Tlacotalpan presentan un intervalo de concentraciones de [39.13-320.31]  $\mu\text{g/día}$ , la mayoría de las concentraciones en este intervalo rebasa la Ingesta Diaria Sugerida de 41  $\mu\text{g}$  establecida en la NOM-051-SCFI/SSA1-2010. Este intervalo también es superior a la Cantidad Diaria Recomendada de 55  $\mu\text{g}$  establecida por la Unión Europea y la Ingesta Diaria de Referencia de 70  $\mu\text{g}$  establecida por la FDA.

En cuanto a las muestras procedentes de Acula, se tiene que presentan un intervalo de concentraciones de [16.89-443.74]  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , algunas de las muestras de este intervalo

rebasan la Ingesta Diaria Sugerida de 41  $\mu\text{g}$  establecida en la NOM-051-SCFI/SSA1-2010 y también la Cantidad Diaria Recomendada de 55  $\mu\text{g}$  establecida por la Unión Europea.

La FDA establece una Ingesta Diaria de Referencia de 70  $\mu\text{g}$ , por lo tanto el intervalo de concentraciones para las muestras de Acula se encuentra por encima de lo establecido.

Por lo tanto el intervalo de concentraciones para las muestras de Tlacotalpan y Acula, en general, se encuentran muy por encima de lo establecido para selenio.

## **7. Conclusiones.**

Se demostró que al optimizar las condiciones instrumentales, y elegir correctamente los isotopos analitos y estándares internos, se obtuvieron valores aceptables de exactitud y precisión. También la limpieza adecuada del material tuvo un papel importante en la obtención de estos resultados.

Cabe mencionar que no se utilizó la celda de reacción dinámica del equipo, por lo tanto haber obtenido tales resultados sin emplear la celda es muy importante, ya que se evitó un gasto innecesario y, además, se evita el uso de gases peligrosos como lo son el metano y el hidrógeno.

Una de las ventajas de emplear esta técnica es que el tiempo de análisis es relativamente corto, por lo tanto permite introducir más muestras al equipo en cada sesión. Sin embargo, el tiempo necesario para preparar las muestras es demasiado, considerando que esta metodología podría emplearse para análisis de rutina.

Además de optimizar las condiciones instrumentales, se deben de optimizar también las condiciones para el proceso de digestión, por ejemplo determinar si se puede emplear otro programa de digestión que permita digerir la muestra de manera satisfactoria en un tiempo menor. También se debe considerar la posibilidad de reducir los tiempos de pre digestión. Todo esto con la finalidad de reducir los tiempos de análisis.

En cuanto a las muestras reales, como se esperaba, los niveles de cromo y selenio en el músculo de las muestras se encuentran dentro del intervalo de concentraciones reportadas en la literatura. Debido a que las concentraciones publicadas se referían tanto a lugares contaminados, como a no contaminados.

Aparentemente no hay diferencia significativa entre los niveles de cromo y selenio encontrados para las muestras de ambos municipios. Se necesitaría hacer un muestreo en donde el tamaño de muestra fuera mayor para poder aceptar o descartar esta hipótesis de manera segura.

Aunque los niveles de cromo y selenio, en la mayoría de las muestras, superan las ingestas diarias sugeridas, basándose en un consumo diario de 100 g, no representan un riesgo para la salud para la población en general ya que la mojarra tilapia no es un alimento que se consuma diariamente; sin embargo podría representar un riesgo para las personas que lo consuman de manera más constante, como por ejemplo, los pobladores de Acula y Tlacotalpan, en especial personas de bajos recursos económicos.

Este estudio puede servir como referencia para investigaciones más profundas y especializadas, ya que proporciona una referencia sobre los niveles de cromo y selenio en el músculo de una de las especies más consumidas de pescado en nuestro país. Esto es muy importante, ya que actualmente no hay estudios similares sobre la problemática que representan los desechos de los ingenios azucareros para los ecosistemas acuáticos del municipio de Acula.

Si bien no parece haber diferencia significativa entre los intervalos de concentración de cromo y selenio, podrían presentarse diferencias significativas para otros metales que se encuentren más relacionados con el tipo de desechos que vierten los ingenios azucareros.

## 8. Bibliografía.

Agencia Estatal, Boletín Oficial del Estado (2009),

<http://www.boe.es/boe/dias/2009/11/07/pdfs/BOE-A-2009-17652.pdf>

Campbell, M; Vermeir, G; Dams, R. (1992), *Influence of Chemical Species on the Determination of Mercury in a Biological Matrix (Cod Muscle) Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 7, 617-621.

Cubadda, F; et al. (2003), *Chromium determination in foods by quadrupole inductively coupled plasma–mass spectrometry with ultrasonic nebulization*. Food Chemistry, 81, 463-468.

Diario Oficial de la Federación, NOM-o51-SCFI/SSA1-2010,

[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5137518&fecha=05/04/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5137518&fecha=05/04/2010)

Diario Oficial de la Federación, PROY-NMX-AA-131/2-SCFI-2008,

<http://200.77.231.100/work/normas/nmx/2009/proy-nmx-aa-131-2-scfi08.pdf>

Djedjibegovic, J; Larssen, T. (2012), *Contents of cadmium, copper, mercury and lead in fish from the Neretva river (Bosnia and Herzegovina) determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS)*, Food Chemistry 131, 469–476.

EURACHEM, (1998). *A focus for analytical chemistry in Europe. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Reino Unido: Teddington. Primera edición.

European Commission, (2009). *Method Validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*.

Fennema, O (2000). *Química de los alimentos*. Tercera edición, editorial Acribia, pp 745-753

Food and Drug Administration, Code of Federal Regulations Title 21 (2012),  
<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcr/cfrsearch.cfm?fr=101.9>

Fosgard, N. (2007). *Inductively Coupled Plasma Spectrometry for Speciation Analysis: Development and applications*. Tesis de doctorado, Departamento de Química Física y Química Analítica, Universidad de Upsala.

Guérin, T; et al. (2011). *Determination of 20 trace elements in fish and other seafood from the French market*, Food Chemistry, 127, 934-942

Guzmán, L; et al. (2010). *Ánàlisis de especies de selenio y mercurio en muestras de pescado*. Revista Salud Pública y Nutrición, Edición especial No. 1-2010.

Lorenzo, J. (2011). *Efecto de tres métodos de cocción sobre el contenido nutricional de la mojarra Tilapia (Oreochromis sp.)*, Papaloapan Veracruz, Universidad de Papaloapan, Tesis de Licenciatura, 73 pp.

Medeiros, R; et al. (2012). *Determination of inorganic trace elements in edible marine fish from Rio de Janeiro State, Brazil*, Food Control, 23, 535-541

Morton J. (2009). *ICP-MS Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, Chapter 9: ICP Applications. Reino Unido: Blackwell Publishing Ltd.

Nuray, E; Özkan, O. (2006). *Proximate composition and mineral contents in aqua cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*), sea bream (*Sparus aurata*) analyzed by ICP-MS*, Food Chemistry, 102, 721-725.

Pick, D; et al. (2010). *Reduction of polyatomic interferences in biological material using dynamic reaction cell ICP-MS*, Microchemical Journal, 95, 315-319

Rodríguez M. (2001). *Evaluación de metodologías analíticas para la determinación de arsénico en muestras sólidas ambientales*. Tesis de maestría, Facultad de Química UNAM.

Sabine J. (2007). *Inorganic Mass Spectrometry: principle and applications*. Ed. John Wiley and sons. United Kingdom.

Sankar, T. et al. (2007). *Heavy metal concentration in fish, shellfish and fish products from internal markets of India vis-à-vis international standards*, Food chemistry, 102, 612-620.

Shu- Feng C., Shih-Jen, J. (1998), *Determination of arsenic, selenium and mercury in fish samples by slurry sampling electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 13, 673–677.

Sistema Nacional de Información Municipal. (2005). *Enciclopedia de los Municipios y Delegaciones de México*.

Skoog, D; et al. (2001). *Principios de análisis instrumental*, quinta edición; Mc Graw Hill, México.

Torres G. (2013). Desarrollo de metodología analítica para la determinación de plomo y níquel en especies marinas, mediante ICP-MS. Tesis de licenciatura, Facultad de Química UNAM.

Türkmen, M., Türkmen, A., Tepe, Y., Töre, Y., & Ates.(2009). *Determination of metals in fish species from Aegean and Mediterranean Seas*. Food Chemistry, 113, 233-237.

Valle, P; Lucas, B. (2000). *Toxicología de Alimentos*. Instituto Nacional de Salud Pública.

Vázquez, F; et al. (2008). *Metales pesados en tejido muscular del bagre Ariopsis felis en el sur del golfo de México*. Latin American Journal of Aquatic Research. 36(02):223-233.

Zwolak, I., Zaporowska H. (2012). *Selenium interactions and toxicity: a review*. Cell Biol Toxicol, 28, 31–46.