



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**Desarrollo y validación del método analítico para
la cuantificación simultánea de mercurio y metil-
mercurio mediante HPLC-ICP-MS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO QUÍMICO:**

PRESENTA

VÍCTOR AARÓN GÓMEZ RAMÍREZ



CD.MX.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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: Profesor: María del Pilar Cañizares Macías

VOCAL: Profesor: María Eugenia López Lugo

SECRETARIO: Profesor: Ernesto Hernández Mendiola

1er. SUPLENTE: Profesor: Silva Citlalli Gama González

2° SUPLENTE: Profesor: Carlos Catana Ramírez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNAM, INSTITUTO DE GEOLOGÍA (LANGEM), LABORATORIO DE QUÍMICA ULTRAPURA E ICP-MS. INSTITUTO NACIONAL DE ECOLOGÍA Y CAMBIO CLIMÁTICO (INECC), LABORATORIO DE ESPECTROMETRÍA DE ABSORCIÓN Y EMISIÓN ATÓMICA.

ASESOR DEL TEMA: _____

ERNESTO HERNÁNDEZ MENDIOLA

SUPERVISOR TÉCNICO: _____

ING. VALIA MARITZA GOYTIA LEAL

SUSTENTANTE (S): _____

VÍCTOR AARÓN GÓMEZ RAMÍRE

Índice

Resumen	viii
1. Introducción.....	9
2. Antecedentes	12
2.1. Mercurio	12
2.2. Ciclo biogeoquímico del mercurio	13
2.3. Bioacumulación y biomagnificación.....	17
2.4. Efectos a la salud humana	17
2.5. Toxicidad del metil-mercurio.....	18
2.6. Convenio de Minamata.....	19
2.6.1. Legislación del metil-mercurio y el convenio de Minamata en México.	19
2.6.2. Consumo de pescado en México.	22
2.7. Métodos analíticos para la determinación de metil-mercurio y mercurio.....	23
2.7.1. Estudios sobre el mercurio.....	26
2.7.2. Investigaciones recientes en México de mercurio y metil-mercurio.....	28
2.8. Aspectos instrumentales.	30
2.8.1. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).....	30
2.8.2. ICP-MS.....	35
2.9. Procesamiento de datos y cromatograma	40
2.10. Validación de métodos	41
3. Hipótesis.....	44
4. Objetivo general	44
4.1. Objetivos particulares.....	44
5. Resumen de la metodología utilizada en el proyecto	45
6. Metodología (desarrollo <i>in extenso</i>).	47
6.1. Primera etapa. Experimentación en instituto de Geología. Selección de especies de pescado y metodología de tratamiento de muestras.	47
6.1.1. Liofilización y digestión de muestras	49
6.1.2. Tratamiento de muestra para análisis de mercurio total.....	50

6.1.3. Análisis de Hg total mediante ICP-MS.....	52
6.1.3.1. Evaluación y optimización de las condiciones del equipo	52
6.1.3.2. Secuencia de análisis.....	53
6.1.4. Metodología experimental de la primera etapa.....	54
6.2 Segunda etapa. Experimentación en Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.....	55
6.2.1. Pruebas de extracción de Hg y [Me-Hg] ⁺ mediante horno de microondas ..	55
6.2.2. Pruebas cromatograficas acoplado el sistema HPLC-ICP-MS.....	56
6.2.3. Pruebas iniciales del método.....	56
6.2.4. Análisis de muestras	58
7. Resultados y discusión.....	60
7.1. Primera etapa. Experimentación en instituto de Geología.....	60
7.1.1. Matriz libre de Hg.	60
7.1.2. Mercurio total en pescados comúnmente consumidos en México.	62
7.2. Segunda etapa. Experimentación en Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático.	65
7.2.1. Pruebas de extracción.....	65
7.2.2. Pruebas de acoplamiento HPLC-ICP-MS.....	68
7.2.3. Parámetros iniciales para el desarrollo del método.....	71
7.2.4. Análisis de [Me-Hg] ⁺ y Hg en pescados comúnmente consumidos en México, mediante HPLC-ICP-MS.....	77
8. Conclusiones.....	80
9. Bibliografía	82
APENDICE A	
Glosario de terminos.	91
APENDICE B	
Sustancias.....	93
Apéndice C	
Cálculos de para la comparación de 2 medias experimentales.....	96

Índice de figuras

Figura 1. Relación de emisiones del mercurio por diversas fuentes antropogénicas al ambiente (modificado de Loredo, 1999) [12].....	12
Figura 2. Ciclo del mercurio, distribución de las especies del mercurio [66]	14
Figura 3. Metilcobalamina [14].....	15
Figura 4. Proceso de metilación anaerobia [14]	16
Figura 5. a) Diagrama de bloques que muestra los componentes típicos de un HPLC [1]. b) Imagen de un HPLC Thermo Fisher Scientific. [2]	31
Figura 6. Módulo de automuestreador [4]	32
Figura 7. Columna: Proceso de separación del analito [4].....	33
Figura 8. Sistema esquematizado del HPLC-ICP-MS [3]	35
Figura 9. Diagrama de un espectrómetro de masa atómica[1].....	35
Figura 10. Sistema interno de un ICP-MS ICAP Q Thermo [4].....	36
Figura 11. Descripción de las parte de un ICP-MS [4].....	38
Figura 12. Cromatograma [5].....	40
Figura 13. Identificación grafica de los parámetros de validación de la respuesta del equipo [6].....	42
Figura 14. Metodología del proyecto.....	46
Figura 15. Diagrama de fases del agua presión temperatura [7].....	49
Figura 16. Esquema del funcionamiento del horno de microondas	51
Figura 17. Componentes de un vaso de digestión (liner) [8].....	51
Figura 18. Metodología experimental de la primera etapa	54
Figura 19. Metodología final de análisis mediante HPLC-ICP_MS.....	59
Figura 20. a) Curva de calibración sin matriz emitida por el equipo ICP-MS del ^{202}Hg cuentas por segundo (cps) Vs ($\mu\text{g/L}$). b) Acercamiento a los puntos bajos de la curva de calibración.....	60
Figura 21. a) Curva de calibración con matriz emitida por el equipo ICP-MS del ^{202}Hg cuentas por segundo (cps) Vs ($\mu\text{g/L}$). b) Acercamiento a los puntos bajos de la curva de calibración.....	63
Figura 22. Curva de calibración del ^{202}Hg cuentas por segundo (cps) Vs (mg/L), para el análisis de la tabla 11.....	66

Figura 23. Identificación de picos. Cromatograma punto de la curva adicionando mercurio y metil-mercurio.....	68
Figura 24. Identificación de picos. Cromatograma material de referencia certificado (SRM 1946 - Lake Superior Fish Tissue NIST).	69
Figura 25. Cromatograma para la definición y separación de picos de una muestra real de barracuda.....	71
Figura 26. Curvas de calibración para el Me ²⁰² Hg y para el ²⁰² Hg.....	72
Figura 27. Cromatograma de una muestra blanco de método.....	75
Figura 28. Representación gráfica del intervalo de trabajo a) intervalo de trabajo de [Me-Hg] ⁺ y b) intervalo de trabajo de [Me-Hg] ⁺ en µg/L..	75
Figura 29. Distribución t fuente Miller [69]	99

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los compuestos derivados del mercurio.....	14
Tabla 2. Datos de la NOM-242-SSA1-2009.....	20
Tabla 3. Concentraciones máximas permitidas o recomendadas de mercurio (Hg) en el pescado en diversos países. [9].....	22
Tabla 4. Datos de producción y consumo pesquero. [10].....	24
Tabla 5. Definiciones del concepto de validación en ISO 9000, ISO/IEC 17025 y Vocabulario Internacional de Metrología VIM	41
Tabla 6. Clasificación de especies de pecado por cantidad total de mercurio en tejido muscular.....	47
Tabla 7. Límites de sensibilidad.....	52
Tabla 8. Concentraciones de Hg en muestras de Lisa (<i>Mugil cephalus Lisa</i>) mediante ICP-MS.....	61
Tabla 9. Concentraciones de las muestras de jurel toro (<i>Caranx caninus</i>), Bagre (<i>Cathorops fuerthii</i>), barracuda (<i>Sphyraena</i>)	64
Tabla 10. Datos de las concentraciones emitidas por el equipo ICP-MS Thermo Fisher Scientific ICAP TQs, graficadas en la Figura 22.....	66
Tabla 11. Comparación de concentraciones entre extracción y digestión de mercurio total.....	67
Tabla 12. Pruebas de cromatografía variando las condiciones del HPLC.....	69
Tabla 13. Blancos de método, LDM y LCM.....	73
Tabla 14. Intervalo de trabajo.....	75
Tabla 15. Blancos adicionados.....	76
Tabla 16. cuantificación simultánea de metil-mercurio y mercurio mediante HPLC-ICP-MS.....	78
Tabla 17. prueba t de student (cálculos en Anexo b de esta tesis).....	78

Abreviaturas

EFSA: European Food Safety Authority.

uma: Unidad de masa atómica.

Hg o Hgo: Mercurio elemental.

[Me-Hg]⁺: Metil-mercurio.

(CH₃)₂Hg: Dimetil mercurio.

Hg²⁺: Cation mercurioso.

HgX_n: Compuesto de mercurio donde X puede ser OH⁻, Cl⁻, Br⁻.

CH₃HgCl: Cloruro de metil mercurio.

HgS: Sulfuro de mercurio.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Eficacia).

ICP-MS: Plasma acoplado inductivamente-espectrometría de masas (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry).

TOF: Analizador de tiempo de vuelo.

CVAAS: Cold Vapor-Atomic Absorption Spectrophotometry (espectrometría de absorción atómica de vapor frío).

CVAFS: Cold vapour atomic fluorescence spectroscopy (espectroscopia de fluorescencia atómica de vapor frío).

GC: Gas chromatography (cromatografía de gases).

RF: Radio Frecuencias.

CC: corriente continua.

ISO: International standards Organization (Organismo Internacional de Normalización).

IEC: International Electrotechnical Commission (Comisión de Electrotécnica Internacional).

VIM: International Vocabulary of Metrology (Vocabulario Internacional de Metrología).

ASTM: American Society for Testing and Materials (Sociedad Americana para Pruebas y Materiales).

Guía EURACHEM

ZMWG: Zero Mercury Working Group

OMS: Organismo Mundial de la Salud

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (organismos de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura).

NOM: Norma Oficial Mexicana

LMP: límites máximos permisibles

IGL: Instituto de Geología

INEEC: Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático

Resumen

El siguiente estudio, presenta el desarrollo y las pruebas iniciales del método analítico para la cuantificación simultánea de mercurio (Hg) y metil-mercurio ([Me-Hg]⁺) en tejido de pescado mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS. Se discuten las condiciones necesarias para extraer correctamente el Hg⁰ y [Me-Hg]⁺, así como las condiciones instrumentales en el HPLC y el ICPMS, bajo las cuales se realizaron las mejores mediciones y con las cuales se efectuaron las pruebas iniciales del método. Una vez desarrollado y aprobadas las pruebas del método, se realizó la cuantificación de Hg⁰ y [Me-Hg]⁺ en las tres especies de pescado de consumo en México (jurel, bagre y barracuda) con base en los reportes de la secretaría de pesca, para realizar una primera aproximación al riesgo en la salud por consumo de pescado contaminado con dichas especies de mercurio.

Los resultados de la validación arrojaron límites de detección adecuados para evaluar las cantidades más bajas de Hg y [Me-Hg]⁺ reportadas en la literatura. Así mismo, la precisión y exactitud obtenida resulto aceptable dentro de los parámetros propuestos.

Con respecto al contenido de Hg y [Me-Hg]⁺ en nuestro primer análisis, se encontró que el pescado que contiene mayor cantidad [Me-Hg]⁺ fue el jurel, seguido del bagre y por último la barracuda. Las primeras aproximaciones a la estimación del riesgo indican que existe un riesgo por consumo de pescado en México, sin embargo, hace falta realizar un estudio más amplio para poder tener certeza de dicha aseveración.

1. Introducción

En abril de 1956, en el pueblo de Minamata (Japón), una joven de la comunidad se presentó en el hospital de la planta Chisso con un cuadro médico que incluía adormecimiento de las extremidades e incapacidad de hablar y comer, ese fue el primer caso de la enfermedad que posteriormente fue conocida como “la enfermedad de Minamata” [11]. En ese mismo año, el número de personas con padecimientos similares comenzó a incrementarse por lo que la alarma por parte del gobierno de Kumamoto se activó, comenzando una ardua investigación por parte de la Universidad de Kumamoto [11].

Posteriormente en 1957 bajo la sospecha de que había un agente contaminante que tenía como fuente de origen pescados y mariscos y que afectaba a los humanos se optó por evitar la pesca en la zona [11].

Un año después ocurrió evento fortuito ocurrió; la empresa Chisso cambió su sistema de vertido de efluentes, del puerto de Hyakken en la bahía de Minamata a la piscina de Hachiman en la boca del mismo río, como consecuencia las personas de la población presentaron “la enfermedad de Minamata”. El Equipo de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Kumamoto llegó a la conclusión de que la sustancia causante de dicha enfermedad era un compuesto organometálico de mercurio llamado metil-mercurio, el cual se originaba a partir de los efluentes que arrojaba la empresa Chisso, hacia el río de Minamata [11]. Tuvieron que pasar 12 años desde que se presentaron los primeros casos, para que la empresa Chisso detuviera la manufactura de acetaldehído, en donde se utilizaban sales inorgánicas de mercurio como catalizadores del proceso, después de más de 50 años, hasta el 2013 se habían registrado cerca de 200,000 damnificados y los efectos de dicha contaminación son todavía notables en la población [11].

Si bien, el caso de Minamata ha sido un gran accidente en la historia, han ocurrido otros casos de contaminación por exposición a mercurio y sus derivados, por lo que, la preocupación sobre el uso y exposición a estos contaminantes ha tomado gran interés en los últimos años. Así en 2005 se establece el “Zero Mercury Working Group – ZMWG”, constituido por más de 95 organizaciones no gubernamentales de interés público defensoras del medio ambiente y la salud, de más de 52 países. Dicho

grupo ha luchado por eliminar el suministro, demanda y emisiones de mercurio de cualquier origen antropogénico, a fin de reducir al mínimo la presencia de mercurio en el medio ambiente [11].

Así en octubre de 2013 se emite finalmente el acuerdo con el cual los países firmantes se comprometen a “eliminar, dentro de lo posible, y si no, reducir al mínimo la oferta y comercio mundial de mercurio, su demanda global, la liberación antropogénica de mercurio al medio ambiente y la exposición a la vida humana y vida salvaje al mercurio” [67]. A pesar de que el convenio de Minamata fue firmado por varios países de Latinoamérica, entre ellos México, dicho acuerdo no entró en vigor sino hasta el año 2017.

No obstante, a pesar de los avances políticos para reducir las emisiones de mercurio (Hg), existen también fuentes naturales de mercurio; por ejemplo, las erupciones volcánicas, movilización natural o erosión de las rocas. Y actualmente se ha observado que la principal problemática sobre el mercurio, radica en la toxicidad de las diferentes especies organometálicas de él (principalmente las especies metiladas), ya que, comúnmente dichas especies tienden a bioacumularse y biomagnificarse en el tejido adiposo de los seres vivos. Dichos procesos comienzan cuando el mercurio metálico que se encuentra en zonas de aguas someras, es transformado por acción de las bacterias en especies organometálicas (principalmente metil-mercurio, [Me-Hg]⁺), las cuales son introducidas a la cadena trófica por los organismos filtradores y escalando por moluscos y llegando a los peces, los cuales son la principal fuente de acceso para el ser humano [11].

En México existe una regulación que establece límites máximos permisibles de metil-mercurio ([Me-Hg]⁺) en productos de la pesca (NOM-242-SSA1-2009) y en ella se establece como método de prueba la espectrofotometría de absorción atómica, desafortunadamente, dicho método no es selectivo, por lo que, sólo evalúa el contenido total de Hg. Así que poder aplicar la normatividad, se estima que más del 90% del Hg contenido en un pescado o marisco existe como metil-mercurio ([Me-Hg]⁺). Sin embargo, el contenido de las diferentes especies organometálicas de mercurio puede variar con respecto al tipo de pez y de la especie que lo contiene [62].

En años recientes, en países como Canadá o Estados Unidos, se han establecido regulaciones y patrones de consumo de los diferentes tipos de pescado de mayor consumo por país, y su contenido de metil-mercurio [9]. En México no se han establecido dichas regulaciones, porque se debe cuantificar con certeza el contenido de mercurio y de metal-mercurio en los diferentes tipos de pescados.

De tal forma, el presente trabajo tiene como objetivo desarrollar y realizar pruebas iniciales de un método de cuantificación simultánea de mercurio y metil-mercurio por medio del acoplamiento HPLC-ICP-MS, en tejido de pescado. Posteriormente, se utilizará dicho método para evaluar el contenido de mercurio y metil-mercurio en las tres especies de pescado de consumo en México. Lo cual, podrá sentar las bases para realizar estudios más amplios, que permitan de establecer regulaciones más específicas y se puedan sugerir patrones de consumo de pescado en México.

2. Antecedentes

2.1. Mercurio

Es un metal pesado distribuido homogéneamente en la corteza terrestre, tiene un origen magnamático (emanado a la corteza terrestre en diversos procesos geológicos), por ejemplo, el proceso de desgasificación de los volcanes provoca 25,000 a 12,500 de toneladas anuales de mercurio; que es llevado al suelo, a cuerpos de agua, aire, plantas animales siendo el humano el portador final de alguno de los procesos del ciclo, otra parte es generada por los humanos (Figura 1), al usar procesos industriales como la extracción artesanal de oro donde el mercurio es utilizado, también en amalgamas dentales, producción de cemento, combustión de combustibles fósiles, incineración de residuos, producción de diversos metales, etc [12].

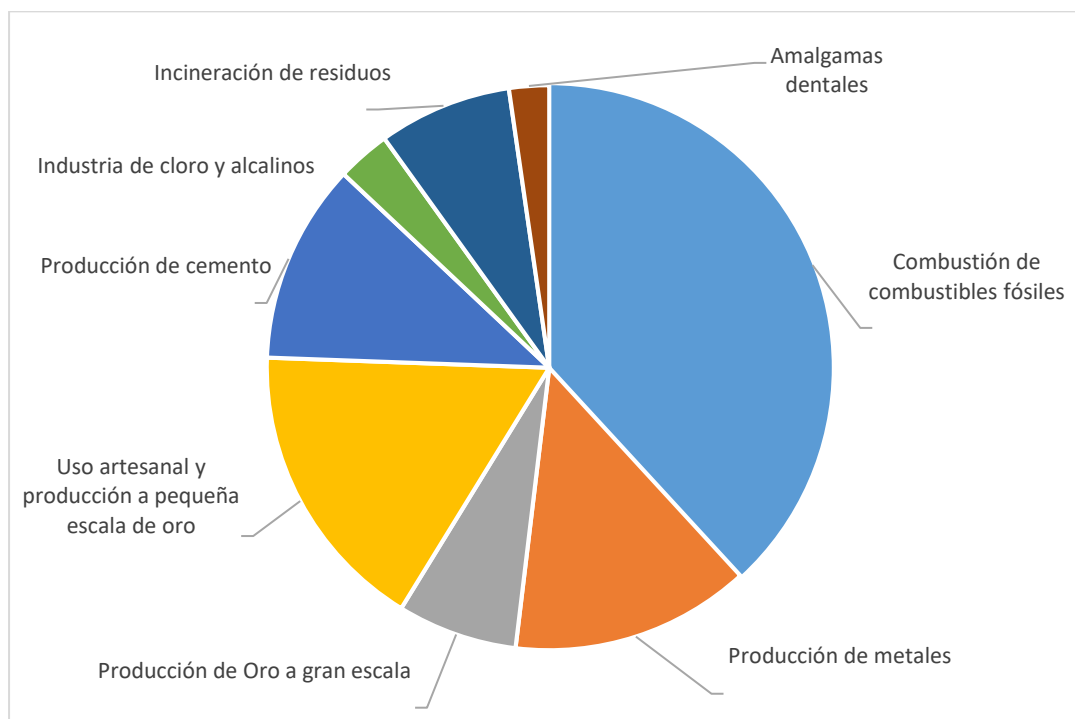


Figura 1. Relación de emisiones del mercurio por diversas fuentes antropogénicas al ambiente (modificado de Loredó, 1999) [12].

El mercurio es uno de los pocos metales que a temperatura ambiente es líquido. Debido a esto, su símbolo se deriva de la palabra griega Hydrargyrum que significa

agua plateada. Contiene una serie de isótopos siendo la masa ^{202}Hg la más abundante con 29.8% seguido por las masas ^{200}Hg con 23.13%, ^{201}Hg con 13.22%, ^{199}Hg con 16.4%, ^{198}Hg con 10.02%, ^{204}Hg con 6.85% y ^{196}Hg con 0.15%. Tiene un punto de fusión de $-38.9\text{ }^{\circ}\text{C}$, de ebullición a $357.3\text{ }^{\circ}\text{C}$, una tensión superficial elevada, poco soluble en agua siendo $56\text{ }\mu\text{g/L}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, alta solubilidad en ácido nítrico y ácido sulfúrico. Tiene un amalgamiento con varios metales como el cobre, oro, plata, platino, uranio, plomo, sodio. Se denomina metal pesado debido a su gran densidad de 13.6 g/cm^3 a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ [14], tiene una presión de vapor de 0.00212 mmHg a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ **(si no se encuentra en un recipiente cerrado se vaporiza con gran facilidad que permite incorporarse rápidamente al ambiente)**. La movilidad no solo se limita a procesos físicos sino también a medios químicos llegando al humano de diversas maneras y es un metal altamente tóxico para el humano cuando se encuentra en especies organometálicas [12, 50, 49].

2.2. Ciclo biogeoquímico del mercurio

Los compuestos de mercurio se distribuyen de diversas formas. En la Figura 2 se puede observar el ciclo completo del mercurio, el cual, se ve favorecido por factores como la concentración, movilidad, reducción, oxidación, formación de complejos y acumulación. Los factores anteriores son afectados por propiedades como el pH, la temperatura, presencia de componentes orgánicos, actividades microbianas y antropogénicas. Todo lo anterior genera que el humano mantenga un constante contacto con el mercurio y con sus especies químicas, en mayor o menor medida; no solo por contacto directo también se da indirecto como es el caso del metil-mercurio que llega a través de los peces [13].

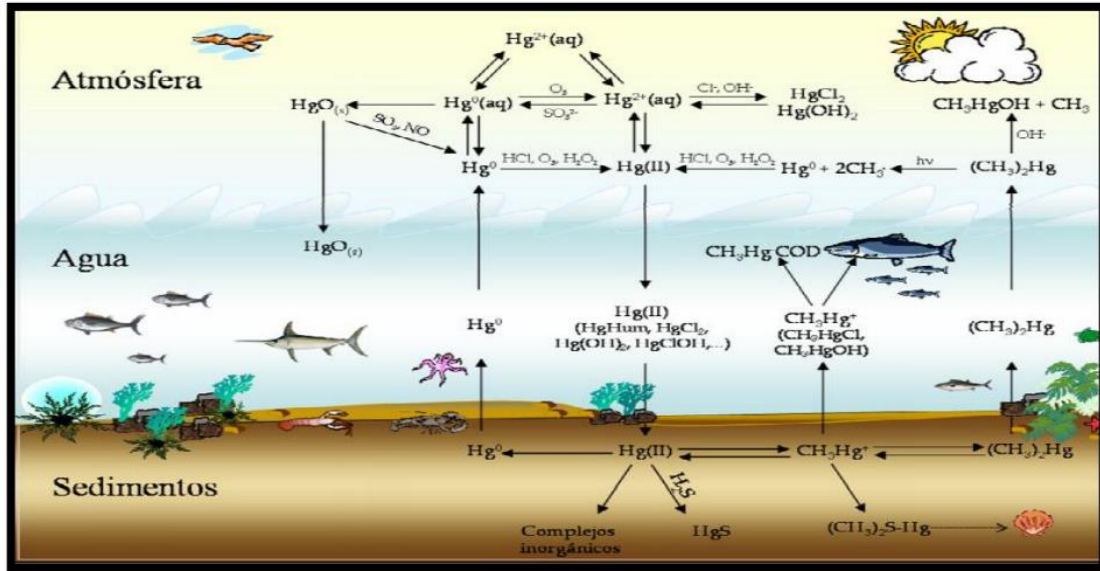


Figura 2. Ciclo del mercurio, distribución de las especies del mercurio.[66]

Cada especie de mercurio se distribuye de diferentes formas en la naturaleza debido a sus propiedades. Las especies las podemos dividir en tres grupos por sus propiedades [14]:

Tabla 1. Clasificación de los compuestos derivados del mercurio.[14]

Altamente volátiles	Altamente solubles en agua	Poco solubles en agua
Hg^0 , $(CH_3)_2Hg$	Hg_2^+ , HgX_2 , HgX_3^- , HgX_4^{2-} ($X=OH^-$, Cl^- , Br^-)	CH_3HgCl , CH_3HgS^- , HgS

El mercurio elemental se encuentra de forma gaseosa junto con el dimetil-mercurio en la atmosfera en su forma líquida Hg^0 , en disolución, en sedimentos minerales como lo es el cinabrio, y así también, en compuestos orgánicos representados por tres formas habituales: dimetil-mercurio, metil-mercurio y fenilmercurio. Cada una de estas especies sigue una formación diferente en la naturaleza; por ejemplo, para la formación de HgS debe estar el mercurio con sulfuros y ausencia de oxígeno, una vez formado si se expone a oxígeno se obtiene sulfuros y sulfitos de mercurio. La transformación de mercurio a especies orgánicas como el metil-mercurio o el dimetil-mercurio suele ser llevado a cabo en procesos

biológicos; se ha identificado una serie de procesos bioquímicos de su formación [14]:

En el ciclo, el mercurio (Hg^0) llega al lecho marino en los sedimentos como reservorio de los metales pesados, donde se dan procesos de adsorción, desorción de resuspensión. Aquí se encuentran microorganismos capaces de llevar a cabo la síntesis de mercurio a metil-mercurio o dimetil-mercurio, dicha transformación se puede dar una transferencia tanto enzimática como no enzimática de grupos metil de la metilcobalamina (CH_3-B_{12}) al mercurio inorgánico, este proceso ocurre en extractos libres de células y en células vivientes anaeróbicas como en la bacteria *Metano omelianski* entre otras [14]. Un mecanismo descrito a través de la metilcobalamina es el siguiente:

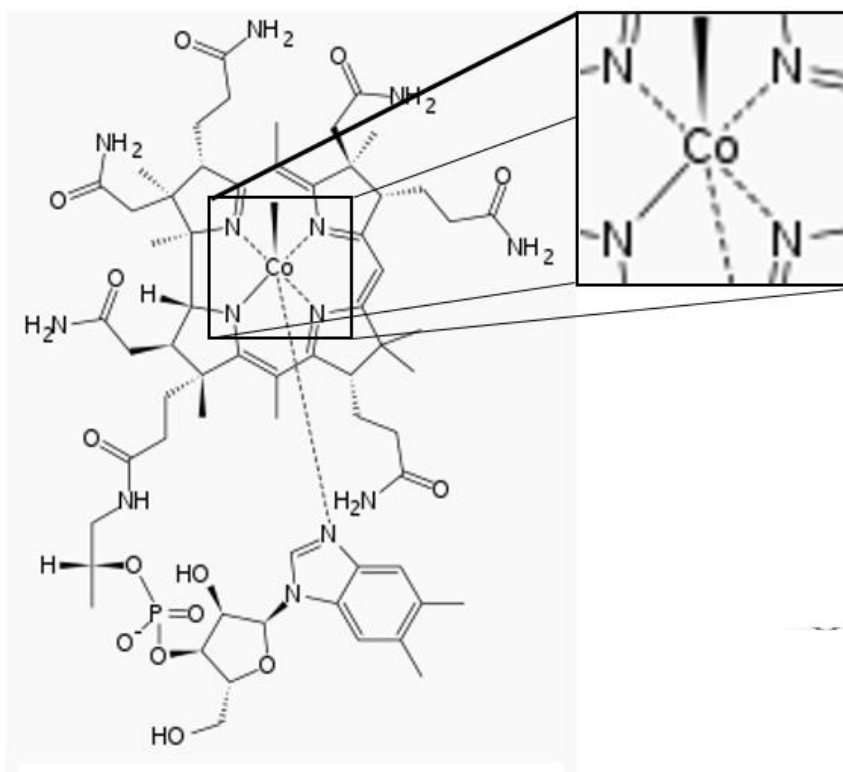


Figura 3. Metilcobalamina [14]

A pesar de que es una molécula grande, el proceso de metilación se observa mejor acotando en la parte del cobalto, a continuación, se muestra el esquema que resume la formación de metil-mercurio:

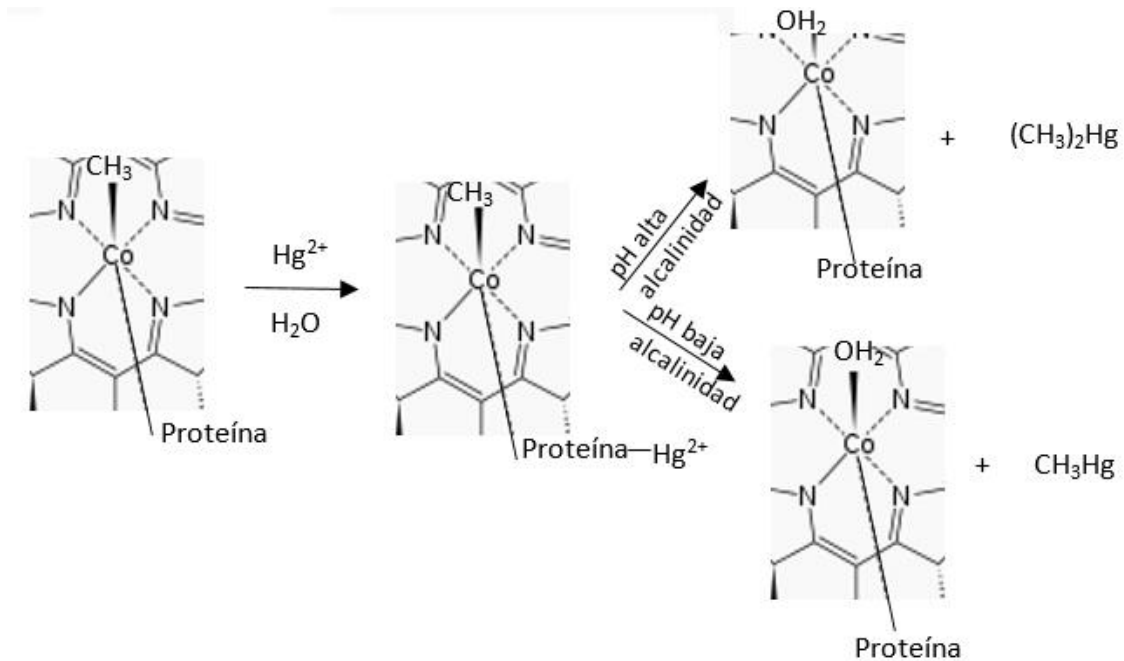


Figura 4. Proceso de metilación anaerobia [14]

Otro ejemplo de un proceso de metilación enzimática de mercurio es el enlace de la homocisteína como error en la síntesis de metionina por la *Neurospora* (género de hongo de los ascomicetos) [14]. Estos procesos no solo son propios de un pequeño grupo de microorganismos, también se dan en bacterias aeróbicas como anaeróbicas y hongos, donde los procesos bioquímicos pueden ser catalizados debido a factores como la temperatura, el estrato en que se encuentran los organismos, la cantidad de mercurio, niveles de sulfuros, potencial redox, presencia de materiales fúlvicos y húmicos, procesos enzimáticos, contenido de nutrientes en el sustrato, pH del suelo, entre otros procesos [14].

La formación de metil-mercurio se encuentra en un equilibrio con su formación y su degradación [14]. Como se observa en la Figura 4 en procesos bajo las condiciones adecuadas puede generar el dimetil-mercurio, siendo inestable a pH bajos por eso la mayor cantidad de metil-mercurio se genera en aguas profundas donde predominan las condiciones adecuadas [15,46].

2.3. Bioacumulación y biomagnificación

Una vez transformado el mercurio elemental en metil-mercurio por acción de las bacterias, éste último se introduce en la cadena trófica por medio de los organismos filtradores y de los crustáceos que se alimentan de los sedimentos y de las especies que viven en el lecho marino [15].

Posteriormente, peces pequeños y otros crustáceos más grandes consumen los organismos filtradores y debido a que las especies organometálicas del mercurio tienen afinidad por las moléculas lipídicas, por lo que el metil-mercurio se deposita en el tejido graso de los organismos, el metil-mercurio no se elimina del organismo rápidamente. Por lo que, si un organismo tiene una dieta con productos que contienen esta especie de mercurio, seguirá incorporándose sin ser eliminado, a este proceso se llama bioacumulación. Por otro lado, conforme se aumenta en el nivel de la cadena trófica, las especies tienden a ser más grandes (mayor cantidad de metil-mercurio por $\text{Kg}_{\text{masa corporal}}$), lo que implica mayor cantidad de tejido graso y un mayor reservorio para que se deposite el metil-mercurio acumulado, a este proceso se le conoce como biomagnificación. De la misma forma, el metil-mercurio puede llegar a la punta de la cadena trófica que son los humanos [15], volviéndose un problema de salud pública.

2.4. Efectos a la salud humana

Según Ferner (1999) [16], la inhalación del mercurio elemental representa el 80% de absorción en el cuerpo y permitiendo que una gran parte del mercurio atraviese la membrana alveolar; una vez en el cuerpo ingresa a la sangre donde una parte es absorbida por los glóbulos rojos y otra parte permanece en el torrente sanguíneo. Se da una rápida distribución en el cuerpo llegando al sistema nervioso y otros órganos. Transcurridas unas horas de ingresar al cuerpo comienzan a ser percibido varios síntomas por parte de pacientes expuestos, los síntomas varían dependiendo de la cantidad presente de Hg, si es alta los síntomas son tos, disnea, letargo, inquietud, fiebre y signos de neumonitis [16].

Cuando se tiene una intoxicación crónica, el sistema nervioso central se ve afectado y se manifiestan temblores en músculos faciales y extremidades, se

presentan cambios notables en el carácter como son la timidez, irritabilidad, entre otros. Es importante mencionar que la ingesta oral representa un bajo riesgo cuando no es frecuente la exposición. Se tiene información acerca de que la absorción es de 1.429 mg/kg de masa corporal y de manera percutánea es igualmente baja, sin embargo, cuando se encuentra en forma de otras especies como sales inorgánicas o compuestos organometálicos aumenta su peligrosidad y absorción de manera significativa, pasa de 2% a 95%. [16]

2.5. Toxicidad del metil-mercurio

Como se mencionó, en el apartado anterior, el proceso de bioacumulación y biomagnificación del metil-mercurio se da gracias a sus propiedades lipofílicas y a su capacidad de unirse a algunas proteínas, lo cual, incrementa notablemente la toxicidad del compuesto organometálico con respecto a su especie metálica. Los síntomas que se pueden presentar por intoxicación del metil-mercurio depende en gran medida de la cantidad ingerida del compuesto. Según “Ministerio de Medio Ambiente” del Gobierno de Japón, algunos de los síntomas presentados por consumir pescado contaminado por metil-mercurio pueden ser: trastornos sensoriales, ataxia, contracción concéntrica del campo visual, y desordenes auditivos. Sin embargo, si una madre es expuesta durante el embarazo a altos niveles de metil-mercurio, su bebé puede sufrir de la “Enfermedad de Minamata fetal” y podrá mostrar síntomas diferentes a la versión adulta. En los casos de intoxicación de placenta por metil-mercurio, puede causar retraso psicomotor y parálisis cerebral severa. Se sabe que a diferencia de las sales de mercurio y del mercurio elemental, el metil-mercurio puede presentar neurotoxicidad selectiva, por ejemplo, el metil-mercurio es lipofílico y es capaz de cruzar la placenta con gran facilidad a diferencia del mercurio metálico, el cual, se va directamente al cerebro. Por lo tanto, el mayor daño es principalmente en los fetos y en menores niveles para los adultos [12, 15, 18].

Existen datos sobre el periodo de vida media biológica del metil-mercurio en el cuerpo humano, esta información revela que para el metil-mercurio es de 120 días o más, mientras que para el mercurio elemental (Hg^0) es de 60 días, mientras que para

el mercurio inorgánico (Hg^{2+}) es de 48 días por lo que además de ser más tóxico, el periodo de afectación también es mayor [17].

2.6. Convenio de Minamata.

Teniendo como antecedentes una serie de accidentes (como el caso de Minamata) y resultados de varias investigaciones sobre el mercurio, metil-mercurio y demás compuestos de mercurio, la preocupación sanitaria y tras años de lucha en 2013 se abrió la discusión a nivel mundial sobre las emanaciones de mercurio, creándose el “Convenio de Minamata” el cual entró en vigor el 16 de agosto del 2017 y donde los países se comprometen a disminuir las emisiones de mercurio. En la página oficial del convenio, los puntos más destacables son: a) “La prohibición de nuevas minas de mercurio,” b) “La eliminación gradual de las existentes” c) “La reducción del uso del mercurio en una serie de productos y procesos.” d) “La promoción de medidas de control de las emisiones a la atmósfera, emisiones al subsuelo y al agua, así como la regulación del sector de la minería artesanal y a pequeña escala. El Convenio también se encarga de vigilar y regular el almacenamiento provisional de mercurio y su eliminación una vez que se convierte en residuo, los puntos contaminados de mercurio y temas sanitarios.” [18].

2.6.1. Legislación del metil-mercurio y el convenio de Minamata en México.

México es un país participante y comprometido a cumplir con las normas del convenio. En la tesis propuesta por Eric Ferad Cruz en 2017 afirma que México no cuenta con las políticas para cumplir las metas [19]. En cuanto al metil-mercurio en tejido de pescado, ya existe una norma que limita la cantidad de metil-mercurio, mercurio y otros elementos; la NOM-242-SSA1-2009 especifica los límites permisibles, se indica los métodos de prueba para ciertos elementos y condiciones de productos de la pesca; frescos, refrigerados, congelados y procesados para diversos metales. Aunque no se encontró el método de prueba en dicha

normatividad para metil-mercurio, solo especifica para el metil-mercurio los límites máximos permisibles.

Tabla 2. Datos de la NOM-242-SSA1-2009

Especificación	TIPO	ESPECIES	LIMITE MAXIMO
Metil-mercurio	Productos frescos, refrigerados y congelados (parte comestible)	Pescados como atún, marlín, mero, y bonito	1.0 mg/kg
		Otras	0.5 mg/kg
	Productos de la pesca procesados	Pescados como atún, marlín, mero, y bonito	1.0 mg/kg
		Otras	0.5 mg/kg

En la tabla 2 podemos observar las diferencias que tiene la normativa mexicana con el resto del mundo, en la mayoría de los casos límites permitidos de la normativa mexicana comparados con otros países son más altos, además que en algunos países son distintos para diferentes sectores de la población.

Tabla 3. Concentraciones máximas permitidas o recomendadas de mercurio (Hg) en el pescado en diversos países. [9]

País/ Organización	Tipos de peces	Concentración máxima permitida	Criterio
Canadá	Todos los peces, excepto tiburón, pez espada o atún fresco o congelado (expresado como mercurio total en la parte comestible del pescado)	0.5 mg/kg de Hg total	Directrices/ tolerancias de diversos contaminantes químicos en Canadá
	Límite máximo permisible para los que consumen grandes cantidades de pescado, como las poblaciones aborígenes	0.2 mg/kg de Hg total	
Japón	Pescado	0.4 mg/Kg de Hg total /kg 0.3 mg/Kg de Metil-Hg (como referencia)	Ley de sanidad de los alimentos – Norma provisional para pescado y marisco
Reino Unido	Pescado	0.3 mg de Hg/kg (carne húmeda)	Norma legal europea
Estados Unidos	Pescado ,peces, moluscos y otros animales acuáticos (FDA)	1 mg/Kg de Metil-Hg	Nivel de acción de la FDA
	Los estados, tribus y territorios son responsables de emitir recomendaciones sobre el consumo de pescado capturado localmente. Nivel de activación para muchos departamentos estatales de salud.	0.5 mg/Kg de Metil-Hg	Nivel de activación local
OMS/FAO	Todos los peces, excepto depredadores	0,5 mg de Metil-Hg/kg	Nivel de directrices del Codex Alimentarius de la FAO/OMS

	Peces depredadores (tales como tiburón, pez espada, atún, lucio y otros).	1 mg de Metil-Hg/kg	
--	---	---------------------	--

También dichos países dan una ingesta tolerable, por ejemplo, La Unión Europea bajo recomendaciones de la EFSA aprobó una ingesta semanal tolerable provisional de 1.6 µg/kg peso corporal [20], países como Japón aprobaron una ingesta semanal tolerable provisional de 0.17 mg de metil-mercurio (0.4 µg/kg pc por día) [21], otro ejemplo es la dosis de referencia de la EPA en Estados Unidos es de 0.15 µg de metil-mercurio/kg de peso corporal por día [9], se puede observar que estas recomendaciones varían entre cada país, ya que cada país realiza su propio estudio, mientras que en México no se encontró una recomendación de ingesta tolerable [9].

2.6.2. Consumo de pescado en México.

Teniendo en cuenta la necesidad de México de mejorar las normas, monitorear el metil-mercurio en peces y dar recomendaciones de consumo, a continuación, se presentarán una serie de datos referentes a la producción y consumo de pescado:

Tabla 4. datos de producción y consumo pesquero. [10]

	Producción de producto marino. (Toneladas)	Consumo per cápita (Kg)	Productos pesqueros de mayor producción
2011	1,660,475.15	Sin información	Tilapia, sardina, camarón, ostión, carpa, atún, trucha, charal, bagre, almeja y lobina. [23]
2013	1,746,276.73	8.91	
2015	1,704,153	12.01	
2016	1,752,339	12.6	
2017	2,070,958	Sin información	

Revisando los datos de la pesca con mayor detalle, de los años mostrados en la tabla 4, se tiene que en el litoral del Pacífico se realiza la captura del 80% del volumen de la producción pesquera total, en tanto que el litoral del Golfo y el Caribe

participan con el 17% y las entidades sin litoral contribuyeron con el 3% aproximadamente.

Como podemos observar en la tabla anterior la producción de productos de pesca ha ido en aumento, esta tendencia no parece cambiar la FAO pronostica un 42% de crecimiento para el 2030 en la producción pesquera Mexicana [24], también se puede observar que el consumo per cápita ha ido en aumento, según SAGARPA del 2012 al 2016 aumentó 3.7 Kg de consumo per cápita, creando una necesidad de revisar las cantidades de metil-mercurio contenido en mercurio, para poder advertir a la población el riesgo asociado al consumo [25].

Revisando en las investigaciones recientes no se pudieron encontrar datos del 2011 al 2017 que relacionen especies de pescado con la cantidad de metil-mercurio en México, aunque en el año 2013 se publicó un informe resumido realizado por Sylvie de Grosbois[26], por encargo del Secretariado de la Comisión para la Cooperación Ambiental (CCA) de América del Norte, donde nos da una relación de cantidad de mercurio total contenida en diversas especies de pescado, pero no otorga información exacta sobre el metil-mercurio que es la especie de mercurio que causan un daño significativo al humano y es proveniente de los peces[26].

2.7. Métodos analíticos para la determinación de metil-mercurio y mercurio.

A partir del accidente de Minamata y el creciente consumo de pescado, se han desarrollado una serie de técnicas para poder detectar y cuantificar metil-mercurio en matrices alimentarias (como en músculo de pescado). Una de las primeras técnicas desarrollada para la cuantificación se basaba en una lixiviación en medios ácidos y una posterior extracción en solventes orgánicos, la separación es por medio de cromatografía de gases y una detección de captura de electrones. Sin embargo, esta técnica fue poco a poco abandonada debido a su falta de especificidad, límites de detección deficientes y acondicionamiento tedioso de las columnas (es importante debido a una creciente necesidad de monitoreo). Lo anterior

llevo a la necesidad de nuevas técnicas y con ello una verificación del análisis, que condujo a un trabajo de interlaboratorios para conseguir materiales de referencia. Los trabajos de interlaboratorios han resultado en una mejora en la evaluación de los métodos analíticos; un ejemplo de estos ejercicios fue realizado por Community Bureau of Reference (BCR), que en 1989 envió tejido de pescado a 13 laboratorios a 7 países, centraron el análisis en metil-mercurio y mercurio total. Los ejercicios fueron para 2 técnicas, una dedicada a una extracción por el método de Westöeö seguido de GC-EDC y las técnicas basadas en la reducción selectiva de formas orgánicas del mercurio a Hg^0 y su posterior determinación por 3 métodos (Absorción Atómica de Vapor Frío (CVAAS), análisis de activación de neutrones (NAA) y dilución de isótopos en Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ID – ICPMS)). Este grupo se encargó de cuantificar las especies orgánicas y todas las especies se tomaron como metil-mercurio, los autores definen los resultados como aceptables [27].

El ejemplo descrito, fue parte de un programa gradual de mejoramiento en la calidad de los análisis. se realizaron 3 pasos; el primer análisis fue de 1987 a 1988 disoluciones simples, de 1988 a 1989 extractos limpios y crudos, por último 1989 al 1990 con extractos y muestras reales, seguido de una certificación de materiales de referencia, de 1991 a 1994. Con cada uno del ejercicio se obtuvieron resultados interesantes, por ejemplo, ejercicio llevado a cabo de 1988 a 1989 resultó en una gran dificultad de reproducibilidad. Se encontró que el GC capilar ofrece buenas posibilidades, pero es obstaculizado por la falta de columnas en el mercado. El ejercicio de 1989 a 1990 resultó en la conclusión de que las columnas empaquetadas para los GC son ineficientes ante columnas capilares CP-SIL. A lo largo de los siguientes años se siguieron desarrollando una serie de ejercicios como el llevado a cabo por Organismo Internacional de Energía Atómica (IAEA por sus siglas en ingles) en 1989, que ha ayudado a mejorar la cuantificación de metil-mercurio en el mundo, en este ejercicio se encontró que para métodos donde se usa destilación, hay resultados de desviaciones estándar altos debido a que destilaciones largas creaban compuestos de interferencia, con baja eficiencia, este proceso se basa en una destilación del metil-mercurio, seguido de una separación por intercambio iónico, una

posterior descomposición del mercurio con irradiación UV y su detección. Se han propuesto otras formas de extraer, separar y cuantificar tales como disolución alcalina seguida de extracción con disolvente, extracción con líquido supercrítico, lixiviación ácida seguida de extracción con disolvente e intercambio iónico, digestión por microondas, cromatografía líquida de alto rendimiento y cromatografía de gases, mientras que para detección se usa CVAAS, CVAFS, ICP-MS y GC ^ ECD [27].

2.7.1. Estudios sobre el mercurio en peces.

Como se mencionó, los estudios para llegar a medir el mercurio y metil-mercurio han sido amplios a lo largo de la historia. Los más recientes, mencionan una serie de análisis que optimizan los estudios anteriores al usar una mezcla de varios métodos tanto de extracción como de cuantificación. A continuación, se hará una breve descripción de las investigaciones con niveles óptimos de cuantificación, estudios para encontrar y dar explicación a diversos problemas ambientales derivados del metil-mercurio:

En China en el 2018 se analizó la concentración de mercurio total y metil-mercurio en 9 especies de peces comerciales en 2 granjas Marinas, se midieron isótopos de ^{13}C y ^{16}N para identificar la fuente de alimento si era natural o artificial (se les daba comida artificial a los peces y se les daba un seguimiento en los niveles tróficos). Los valores de mercurio resultaron bajos en relación a los límites de seguridad recomendados por diversos países. Se detectó una mayor concentración de Hg en los músculos seguido del hígado, se encontró que el intestino fue un órgano crítico para la biotransformación de Hg. El porcentaje de metil-mercurio difiere mucho entre las especies estudiadas, aunque no todas las especies se alimentaban de la comida artificial, los autores concluyeron que la bioacumulación de Hg en diferentes especies de peces puede depender de la biotransformación de Hg interna, así como sus procesos biocinéticos [28].

En 2018 una publicación de Estados Unidos reveló datos sobre estuarios que sugieren que el aumento de los insumos de metil-mercurio, la pérdida de humedales asociados con el cambio climático y la presión antropogénica del uso de la tierra aumentarán las concentraciones de Metil-mercurio en las redes alimentarias en este tipo de ecosistemas [29].

También en el año 2018 se publicó en China un método donde se desarrolló un péptido de unión al metil-mercurio en la superficie de un *Escherichia coli*, mostrando afinidad y selectividad con el metil-mercurio, se consiguió eliminar cerca de 96% de metil-mercurio de 12 μM de metil-mercurio. Usando microscopia electrónica y se confirmó la presencia de metil-mercurio en la membrana de las

células. Finalmente, la acción superficial de la *E. coli* protegió eficazmente a los peces de la contaminación por metil-mercurio [30].

También en Estados Unidos en 2018 se publicó el desarrollo de un método de extracción selectiva para metil-mercurio en suelos y sedimentos contaminados utilizando medios ácidos como el HCl, también con HNO₃. En ambos casos la extracción fue óptima, mientras que en medios básicos los resultados no fueron favorables y su cuantificación fue mediante generación química de vapor acoplado a un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente, obteniendo límites de detección para medios ácidos resultaron de 0.08µg/L [31].

Otro estudio en Brasil el año 2014 evaluó los factores de biomagnificación de metil-mercurio y mercurio inorgánico a través de cadenas alimenticias (micro plancton, camarón, pescados, entre otras especies) encontrando resultados notables, mayor cantidad de metil-mercurio que mercurio inorgánico, lo interesante fue que mientras el metil-mercurio aumentó al aumentar la posición trófica, el mercurio inorgánico no presentaba esta característica [32].

En el Año 2013 en Sudáfrica se publicó un artículo donde se estudiaba el género, tamaño y ciclo de vida en relación con la composición química de la de la especie de tiburón (*Mustelus mustelus*), se encontró que los niveles de proteínas, lípidos, cenizas, aminoácidos y la mayoría de los minerales no se vieron afectados por las etapas de género, tamaño o ciclo de vida de la especie, pero las hembras embarazadas contenía niveles altos de metales como aluminio y cobre, mientras que el mercurio se encontraba en altos niveles en machos grandes [33].

En España en 2010 se publicó un artículo en donde se analizaron 27 muestras de pez espada comercializadas en dicho país en 2005, el 37% de las muestras superaron el límite de Hg establecidas por la legislación Española (1mg/Kg de peso húmedo). También se encontró un riesgo debido a que la población consumen esta especie en España. Se tienen ingestas de Hg y [Me-Hg]⁺ que exceden los límites de ingesta diaria tolerables, concluyen recomendaciones sobre el consumo de pez espada [34].

2.7.2. Investigaciones recientes en México de mercurio y metil-mercurio en peces.

En el Año 2018, Delgado-Álvarez en su artículo determinan mediante espectrofotometría de absorción atómica el contenido de mercurio total en músculo e hígado de muestras compuestas de las especies *Mugil cephalus* y *M. curema*, recolectadas durante noviembre de 2013 y principios de 2014, en las lagunas costeras Altata-Ensenada del Pabellón, Ceuta y Teacapán-Agua Brava del estado de Sinaloa. Los resultados de Delgado-Álvarez, mostraron que el contenido de mercurio total en músculo variaba entre 0.11 a 0.39 µg/g, mientras que el intervalo de concentraciones encontradas para el hígado fue de 0.12 a 3.91 µg / g. Si bien los niveles totales de Hg en los músculos fueron más bajos que el límite máximo oficial permitido (NOM-242-SSA1-2009). Los valores de HQ (pie de página) calculados para metil-mercurio tomando como población afectada a los habitantes más jóvenes de una comunidad de pescadores, resultó un cociente de peligro mayor que uno (HQ > 1), lo cual, indicaba que existía un posible riesgo para algunas comunidades de pescadores de la costa del Pacífico Mexicano [36].

También en 2018, se estudió la distribución de As, Hg y Se en las especies barrilete (*Katsuwonus pelamis*, Linnaeus, 1758) y atún aleta amarilla (*Thunnus albacares*, Bonnaterre, 1788) en el Pacífico Oriental y se determinaron concentraciones elementales en el músculo e hígado y también se analizaron en el contenido estomacal, se determinó que el riesgo para la salud se encontró que ni el As y ni el Hg estaba por encima de los límites permisibles (NOM-242-SSA1-2009) [35].

Otro estudio en el año 2018 evaluó la exposición de mercurio en una población del noroeste del país, la evaluación fue a través de medir el contenido de mercurio en atún enlatado y congelado, marlín ahumado, tilapia, sierra del Pacífico, pez delfín y ojo de buey los resultados estuvieron en un intervalo de 0.01 y 0.23 µg/g de peso húmedo, ninguno de los valores estaba por encima del límite establecido

“HQ: Es un cociente de peligro o Hazard Quotient para contaminantes químicos no cancerígenos, evalúa diferentes tipos de riesgo entre la dosis diaria de exposición estimada (para cada receptor crítico) y la ingesta diaria aceptable (ADI), concentración de referencia (RFC), dosis de referencia (RfD), entre otros, según corresponda: $HQ = \frac{\text{Dosis de exposición (mg/kg/día)}}{\text{Dosis de referencia (mg/kg/día)}}$ ” [52]

por México. También se evaluó en consumo en grupos de niños y los adultos, con el porcentaje más alto de la población en riesgo. Los resultados resaltan la necesidad de estrategias adecuadas que consideren la exposición al mercurio como parte de las políticas de salud pública asociadas con el consumo de pescado en México [64].

En 2018 se trató de determinar los indicadores de estrés oxidativo y concentraciones en muestras de hígado, riñón y músculo de tiburones mako juveniles (*Isurus oxyrinchus*) de Baja California Sur. Las concentraciones de plomo (Pb), cadmio (Cd), mercurio (Hg) y arsénico (As) se determinaron mediante espectrofotometría de absorción atómica y también se cuantificó la producción del radical superóxido, este fue medido como un indicador de la producción de especies reactivas de oxígeno; la peroxidación lipídica y los niveles de las proteínas carboniladas se cuantificaron como indicadores de daño oxidativo y la actividad de las enzimas antioxidantes, superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y glutatión-S -transferasa (GST) se evaluó como indicador de las defensas antioxidantes La concentración de Cd fue menor en el músculo que en el riñón ($p < 0.05$) encontrando una concentración de Hg fue mayor en el músculo que en el hígado y el riñón ($p < 0.05$) [68].

En el año 2017, Cantoral et al., llevaron a cabo un breve estudio sobre el consumo de pescados y mariscos en México, para estimar la exposición a mercurio, metil-mercurio y grasas poliinsaturadas. En dicho estudio Cantoral del Instituto Nacional de Salud Pública, observó que actualmente existe un riesgo a la salud por exposición a metil-mercurio derivado del consumo de pescados y mariscos en México. Según los autores, las principales especies de pescado que representan un riesgo son: *Thunnus* (atún) enlatado, *Engraulidae* (anchoa), *Epinephelinae* (mero) y *Galeorhinus galeus* (cazón). No obstante, dichas aseveraciones, fueron realizadas mediante una revisión bibliográfica. Por lo que para confirmar seriamente si existe un riesgo a la salud, se tendría que analizar la concentración de metil-mercurio en dichas especies de pescado [55].

Como se puede observar en los estudios anteriores, las concentraciones de metil-mercurio solamente se han estimado. De tal forma, En este trabajo se

combinaron una serie de métodos modernos para la extracción, separación y cuantificación de metil-mercurio. Será una extracción ácida en un horno de microondas separando el mercurio elemental de metil-mercurio por HPLC y cuantificada por ICP-MS, sin embargo, para poder entender en su mayoría a este trabajo se explicará y profundizará en los métodos analíticos, método de separación utilizado, procesos de tratamiento de las muestras antes de explicar lo realizado.

2.8. Aspectos instrumentales.

2.8.1. Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC)

Como se mencionó en el Capítulo 2.7, la separación del mercurio para su cuantificación en matriz de pescado se puede realizar por diferentes métodos. Sin embargo, uno de los métodos más eficaces es HPLC por su alta precisión, eficiencia, rapidez y bajos límites de detección, actualmente en otras partes del mundo, se ha optado por utilizar el acoplamiento de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con la espectrometría de masas (ICP-MS) [37:27].

La cromatografía líquida de alta eficiencia se encuadra dentro de la cromatografía por elución. En esta, un líquido que funciona de disolvente (fase móvil) circula en íntimo contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria), una serie de sustancias (analito) se encuentra en la fase móvil y es transportada a lo largo de una columna que está empacada por la fase estacionaria, la muestra experimenta una serie de interacciones físicas y químicas de ambas fases que gradualmente causan la separación de la muestra, al final del proceso eluyen los componentes de la muestra separados en un orden creciente de interacción con ambas fases, es decir el componente de la muestra que menos interacciones experimentó para su retención emerge primero siendo el de mayor interacciones el último. La técnica de HPLC sigue este principio para separar compuestos orgánicos, inorgánicos, con una capacidad de separar macromoléculas, materiales poliméricos, especies iónicas y una serie de grupos funcionales de alto peso molecular sin la necesidad que sean térmicamente estables o volátiles [37:27].

Esta técnica ha tenido un crecimiento en sus tecnologías de forma acelerada. No obstante, el funcionamiento de estos equipos es similar entre ellos. Actualmente,

los equipos constan de 5 módulos bases: un sistema de bombeo (una o varias bombas), inyector de muestras (manual o automático), columna dentro de un horno (con o sin precolumna), detector (uno o varios) y por último un sistema de recolección y procesador de datos, en la siguiente figura se esquematiza el sistema HPLC [3].

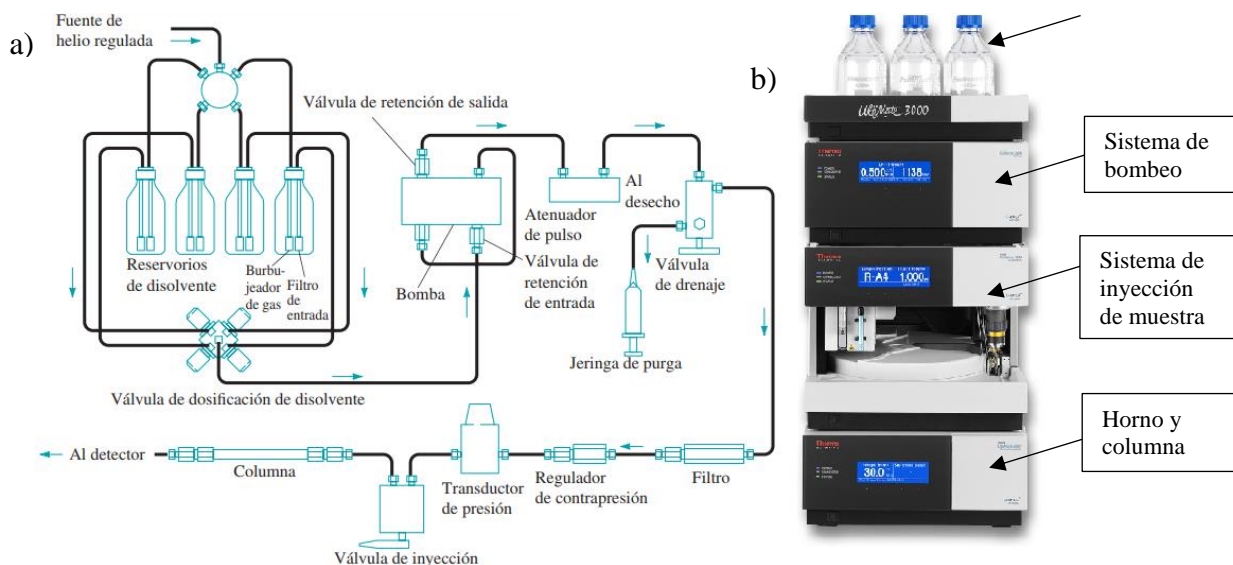


Figura 5 a) Diagrama de bloques que muestra los componentes típicos de un HPLC [1]. b) Imagen de un HPLC Thermo Fisher Scientific [2].

a) Sistemas de Bombeo.

El módulo de bombas del HPLC brinda flujo constante al sistema proveniente de los reservorios (recipientes que se encuentran generalmente en la parte superior del equipo), los reservorios pueden tener una serie de mangueras con filtros para evitar que los sólidos tapen el sistema, también deben de estar desgasificados (ya que en análisis de bajo flujo pueden alterar el flujo a lo largo del análisis), existen de diversos tipos de bombas como peristálticas, de pistón o de jeringa y debe tener una serie de válvulas para poder purgarla antes de cada análisis para evitar que los burbujas de aire que afecten el flujo, otras causas de error del flujo pueden ser fugas (el equipo tiene sensores para detectar estos tipos de errores) o efectos del diámetro de tubo. Este equipo responde a básicamente a 2 tipos de configuraciones una isocráticas y otra con gradientes, las configuraciones isocráticas utilizan la misma fase móvil en

las mismas proporciones a lo largo del todo el cromatograma, mientras que los gradientes de elusión permiten variar la fase móvil durante el análisis [3].

b) Sistemas de inyección.

La mayoría de los equipos HPLC utilizan inyectores de válvulas o de bucle ya sean manuales o automáticos, debido a la precisión que debe utilizar al inyectarse siempre el mismo volumen, disminuye significativamente el error humano y el volumen de la jeringa. Resisten presiones de 500 bares, su función es realmente sencilla, es un rotor que alterna las posiciones de las válvulas de inyección; entrada de la fase móvil, salida de la fase móvil y desechos, primero se inyecta en un bucle aún sin tocar la fase móvil, allí se mide la cantidad de muestra y el exceso se desecha. El hecho físico de inyectar consiste en girar el rotor interno 60°, seguido de una inyección donde entra a la fase móvil, tienen un doble desagüe que evita el pico de presión causado por el giro interno del rotor debido que el giro bloquea momentáneamente los conductos, está representado en la Figura 6 [3].

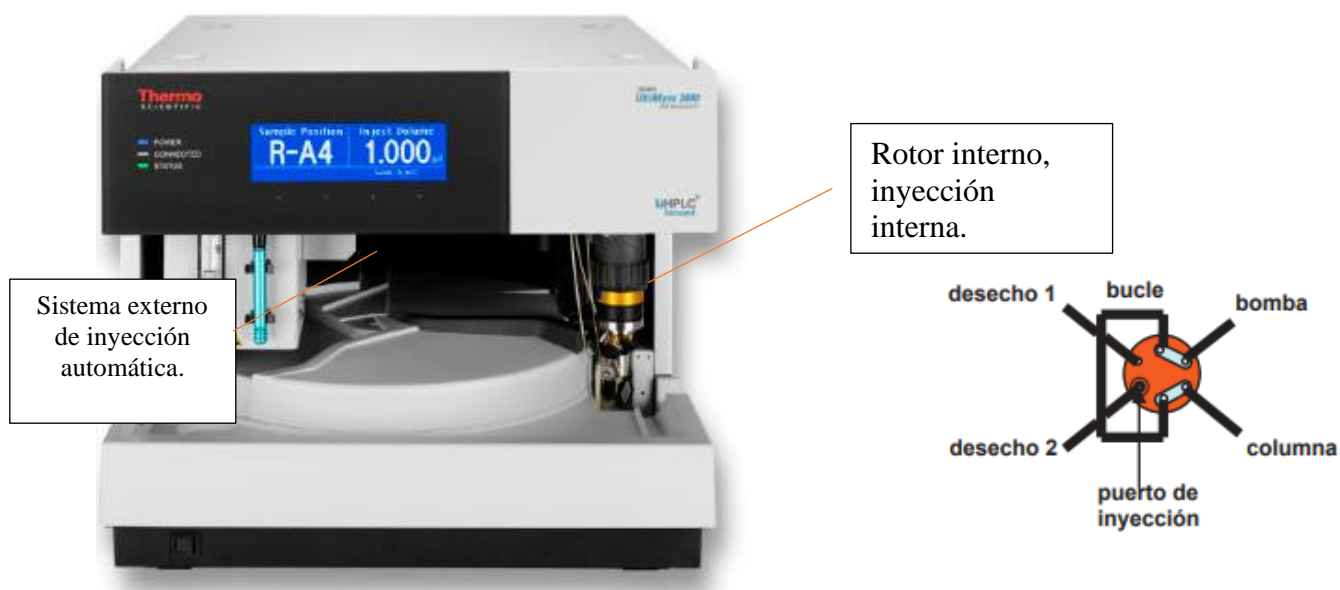


Figura 6. Módulo de automuestreador [4]

Para que la muestra sea inyectada se debe cumplir cierta característica como: estar en estado líquido, las muestras sólidas deben ser disueltas en un disolvente compatible con la fase móvil, la inyección debe estar entre 1 μL a 100 μL . Preparar las muestras debe incluir dilución, reconcentración, filtración, extracción, ultrafiltración o derivación [38].

c) Columna y horno.

Los equipos de HPLC tienen un centro donde sucede la separación y las interacciones, tanto físicas como químicas entre la muestra y la fase estacionaria así mismo en la fase móvil (estas interacciones son amplias y difieren para cada compuesto), debido a que es necesario mantener las condiciones de análisis, para ello las columnas están en un horno para un control de la temperatura o bien para variar la temperatura y así agudizar los picos del cromatograma, mejorar la resolución y sensibilidad del equipo [3].

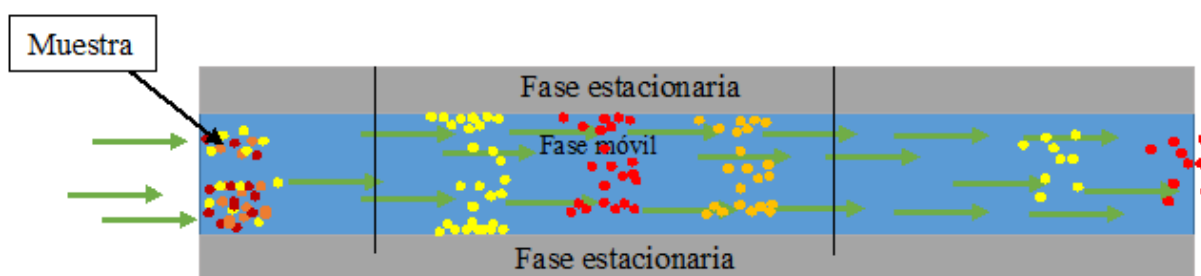


Figura 7. Columna: Proceso de separación del analito [4]

Los tipos de columnas han ido cambiando y mejorando conforme se ha optimizado el equipo, sufriendo mejoras e innovaciones que han contribuido a alargar su vida útil, rellenas con partículas cada vez más rígidas y de tamaño cada vez más homogéneo. Existen de rellenos porosos de gran variedad de diámetros de poro, nuevos núcleos poliméricos, zirconio, titanio, carbón poroso, hidroxiapatita, alúmina,

etc. Han aparecidos nuevas fases y mejores con recubrimiento exhaustivo de mayor efectividad, así con materiales estructurales de las carcasas alternos al acero (vidrio, plástico, polímeros). Cada periodo de tiempo (establecido por los analistas) la columna debe ser verificada mediante un test específico de patrones, donde se observan los patrones que afectan su eficiencia y resolución, si la columna no pasa el test esta debe de ser regenerada, ya que su uso lleva que se acumulen impurezas, lo idóneo es bombear una fase móvil lo más lejano a la naturaleza de la fase estacionaria, se le hace pasar una serie de disolventes cuidando la presión pues cada solvente tiene propiedades específicas [3].

d) Sistema de detección.

El sistema de detección es ICP-MS es una técnica de análisis diferente, esta se acopló al HPLC; mientras que un HPLC funciona para separar analitos, el ICP-MS cuantifica isótopos. Es una técnica híbrida debido a que proceden de dos precursores muy diferentes gobernados por un mismo ordenador (Figura 8), estas técnicas híbridas y especialmente HPLC-ICP-MS presenta varias ventajas importantes para el análisis, las ventajas que presenta sobre otros equipos de detección son: análisis de un gran número de elementos e isótopos de la tabla periódica de manera simultánea, la capacidad de determinar los isótopos individuales de cada elemento, lo anterior posibilita la realización de relación y dilución de isotópica, pero las principales ventajas por el cual se eligió el ICP-MS es su alta precisión y bajos límites de detección. También, este tipo de equipos contienen desventajas; por ejemplo, tolerancia del plasma, supresión de la ionización, problemas con el bloqueo de la interfase y deriva de la señal, presencia de interfase espectral, que generalmente son desconocidas y variables, intervalo lineal limitado. En la sección 2.8.2. Se explicará de manera breve la parte técnica del equipo ICP-MS debido a su complejidad [3, 39].

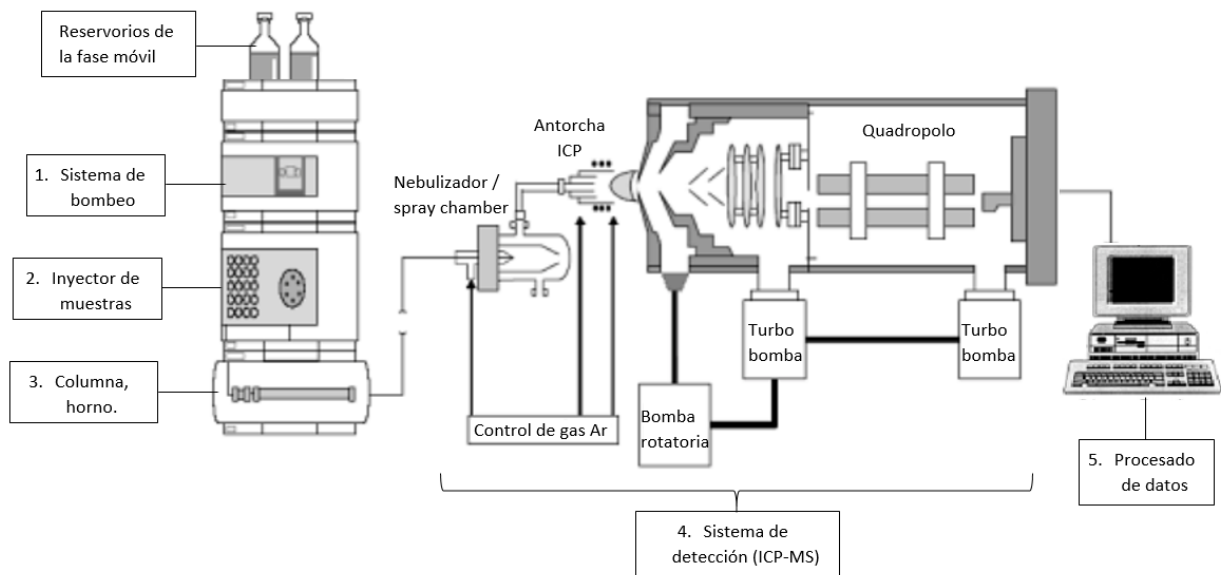


Figura 8. Sistema esquematizado del HPLC-ICP-MS [3]

2.8.2. ICP-MS

La espectrometría atómica está dividida en 2 tipos: la espectrometría atómica óptica y espectrometría de masa atómica, la técnica de ICP-MS está contenida dentro de la segunda, el diagrama de flujo de estos equipos es el siguiente:

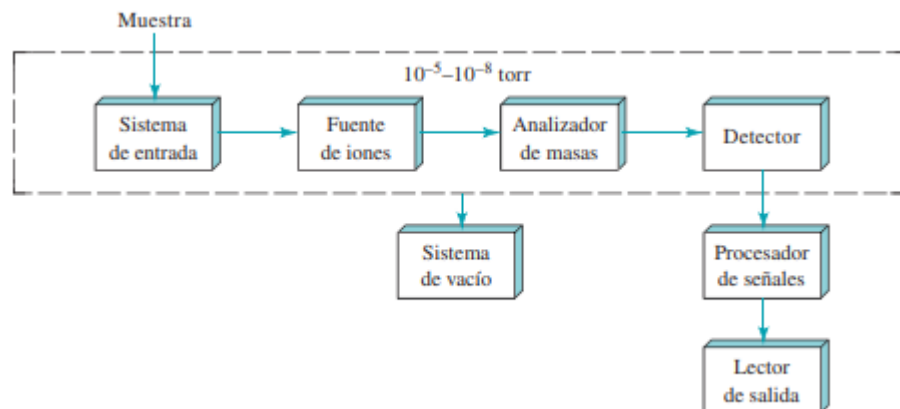


Figura 9 Diagrama de un espectrómetro de masa atómica. [1]

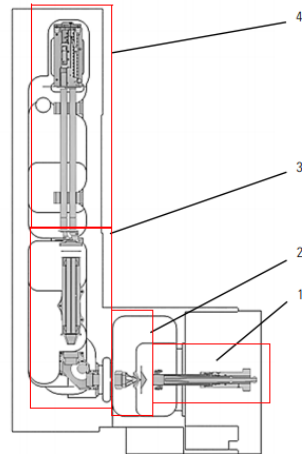
En esta técnica al igual que la mayoría que engloba la espectrometría atómica solo se puede realizar en un medio gaseoso, por lo tanto, el primer paso es una

atomización del líquido que se inyecta al equipo, un proceso en el cual una muestra es volatilizada y descompuesta en pequeñas partículas para posteriormente producir iones en estado gaseoso. La producción de los iones se da cuando una muestra líquida (en este caso proveniente del HPLC) comienza la formación de un aerosol en estado líquido en el nebulizador (ver Figura 11), este aerosol es arrastrado por Argón inyectado hacia el plasma de alta energía (fuente de iones) que se encuentra en el centro de una bobina de radiofrecuencias (ver Figura 11), en el plasma sucede un proceso de desolvatación que elimina el disolvente, a continuación la muestra es vaporizada para formar un aerosol en estado gaseoso, sigue una atomización que disgrega las moléculas gaseosas del analito en el aerosol generando átomos neutros, le sigue una ionización de los átomos neutros por parte de la energía del plasma, todo lo anterior sucede en la primera sección del equipo (ver inciso *b*) de la Figura 10).

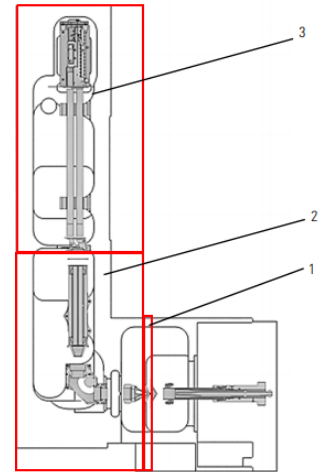
Una vez creados los iones, el equipo los dirige con una serie de guías y lentes para ser llevados a un analizador de masas donde son separados por su relación masa-carga (m/z). Los iones con valores específicos de masa-carga se recolectan en el detector y se convierten en una señal eléctrica, el sistema de procesador de señales interpreta esta señal eléctrica para producir un espectro de masa o en este caso un cromatograma, cuando se interpreta una señal el ICP-MS sin estar acoplado con el HPLC emite un espectro donde en el *eje y* está dada por la intensidad de cuentas medidas de un elemento por segundo (cps) y en el *eje x* encontramos una, mientras que cuando acoplamos el HPLC arroja un cromatograma el *eje y* está dado por intensidad de cuentas medidas de un elemento (cts) y *eje x* es tiempo (s). En el espectrómetro son detectados masas entre 7 a 250 uma con analizadores de diversos tipos (cuadripolo, triple cuadripolo, TOF, etc.). A continuación, una breve esquematización del ICP-MS para su mayor comprensión [3]:



a) Imagen sistema externo de un ICP-MS ICAP Q Thermo, visto de frente [4]



b) Imagen sistema interno de un ICP-MS ICAP Q Thermo, visto de frente, dividido por secciones por función:
 1. Sistema de introducción de muestra.
 2. Interfase.
 3. Óptica de iones.
 4. Analizador de masa.[4]



c) Imagen sistema interno de un ICP-MS ICAP Q Thermo, visto de frente, dividido por presión:
 1. Vacío de interfase.
 2. Vacío intermedio.
 3. Alto vacío . [4]

Figura 10 Sistema interno de un ICP-MS ICAP Q Thermo [4]

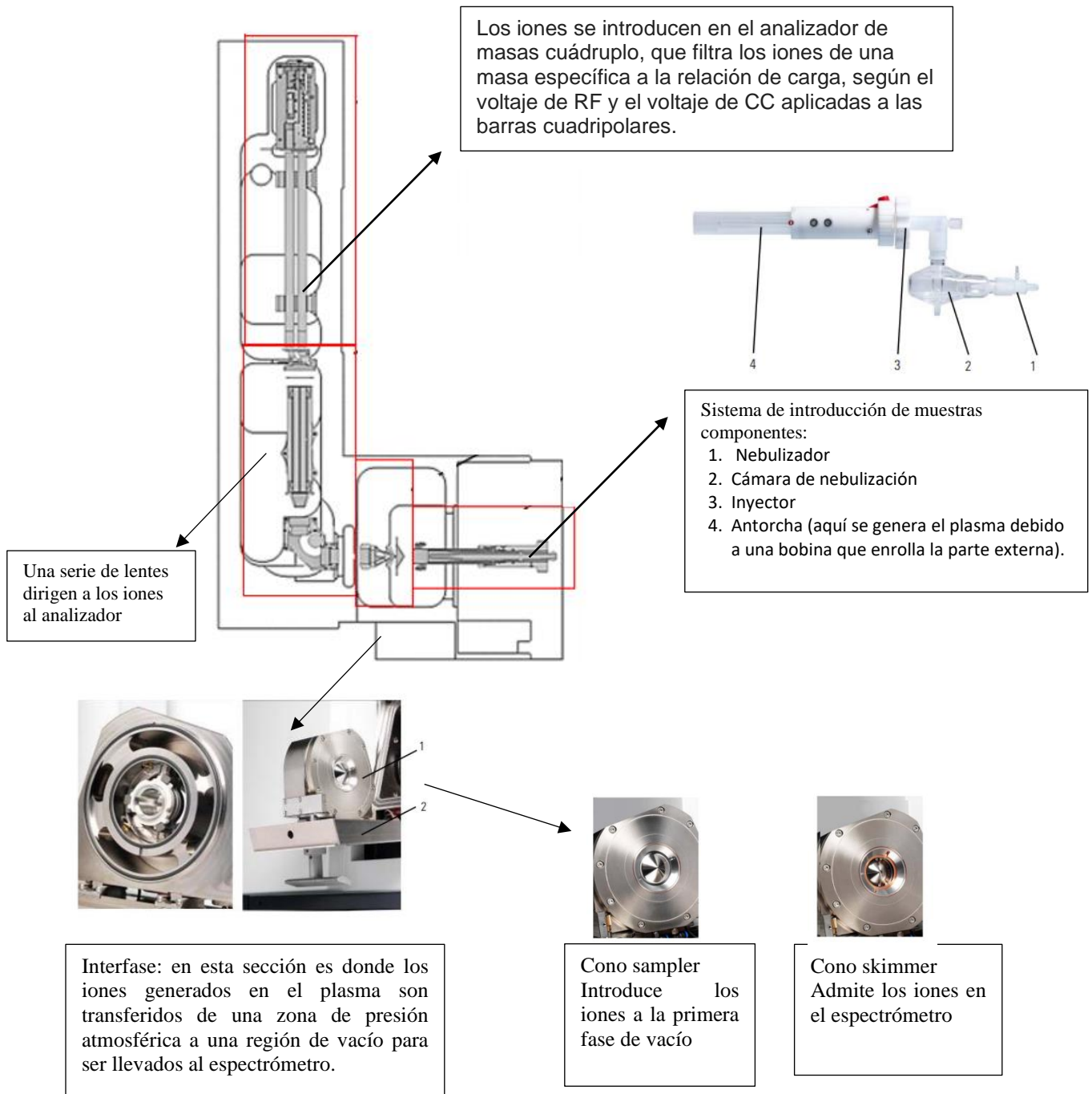


Figura 11 Descripción de las parte de un ICP-MS [4]

a) Interferencias en ICP-MS

Traslape isobárico: Es cuando 2 elementos poseen 2 isótopos con la misma relación masa-carga, por ejemplo, si medimos el isótopo ^{64}Zn y en la muestra existe el isótopo ^{64}Ni en el análisis de ultra trazas el níquel será un interferente para el zinc. Se sabe que para isótopos con masa-carga impar no se presenta esta interferencia, esta interferencia se magnifica cuando la matriz de estudio se vuelve más compleja [39].

Traslape poliatómico: La formación de aductos homogéneos o heterogéneos son los causantes de esta interferencia por ejemplo Ar^{2+} interfiere con el ^{80}Se , o la formación de ArO^+ interfiere con ^{56}Fe [39].

Óxidos moleculares: Son especies que se forman por un exceso de oxígeno en el plasma, el cual puede provenir de diversas fuentes como los óxidos dañan la entrada de la interfase y causan interferencias isobáricas, esta interferencia se elimina moviendo la posición de la antorcha [39].

Iones doble cargados: Esta interferencia se presenta cuando los elementos tienen un bajo potencial de ionización, como los elementos alcalinos, algunas tierras raras y ciertos materiales de transición, los cuales se cargan gracias a la alta energía del plasma [39].

Ruido de fondo: Está compuesto por el ruido químico en el instrumento que se refiere a factores ambientales como presión, temperatura, humedad, entre otros, y el ruido instrumental que está compuesto por ruido térmico debido al movimiento de térmico de los electrones en resistencias que conforman el equipo eléctrico del sistema y ruido de disparo debido al movimiento de los electrones dentro de las conexiones del equipo [39].

Todas estas interferencias deben ser tomadas en cuenta debido a la alta sensibilidad del equipo [39].

2.9. Procesamiento de datos y cromatograma

Una computadora une el funcionamiento de ambos equipos tanto el detector como los demás módulos por medio de un programa, los datos recibidos son graficados por la computadora generando un cromatograma, aunque la computadora puede calcular áreas bajo los picos aquí unos componentes del cromatograma:

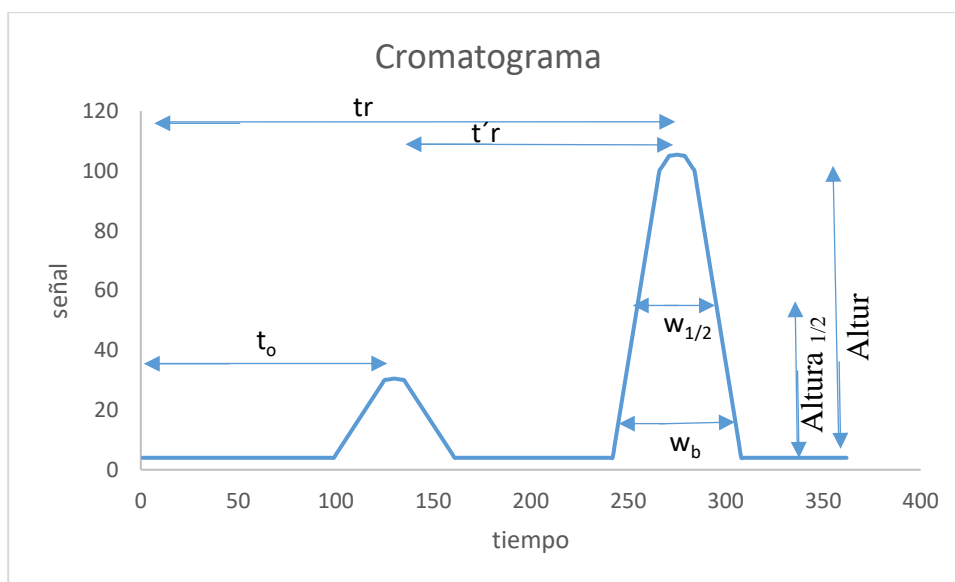


Figura 12 Cromatograma [5]

Tiempo de retención (t_r) El tiempo que un soluto permanece en la columna. Se mide desde el momento de la inyección hasta la elución del máximo del pico. Es característico del soluto para condiciones de operación constantes. Auxiliar en la identificación de los solutos [5].

Tiempo muerto (t_o) El tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria. Tiempo que cualquier soluto permanece en fase móvil. Representa el espacio vacío de la columna [5].

Tiempo de retención ajustado (t'_r) Mide el tiempo que el componente permanece en fase estacionaria. $t'_r = t_r - t_o$ [5].

Ancho a la base (w_b) Es la porción de la línea base intersectada por las tangentes al pico. Para un pico gaussiano es igual a 4σ . Tradicionalmente usado en el cálculo de la eficiencia del sistema [5].

Ancho a la mitad de la altura ($w_{1/2}$) Una medida más reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema (platos teóricos) [5].

2.10. Validación de métodos

La validación del método analítico, es la confirmación de que un método es apto para ser realizado con fines de evaluación de cierto parámetro [6].

La validación se realiza a través de **pruebas iniciales de desempeño**, en donde se establecen los parámetros analíticos para un laboratorio y un analista determinado. Diversos organismos han definido el término de validación, por ejemplo, en la Tabla 5 se mencionan las definiciones aceptadas por la comunidad analítica.

Tabla 5. Definiciones del concepto de validación en ISO 9000, ISO/IEC 17025 y Vocabulario Internacional de Metrología VIM [6]

Definición	Referencia
Confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto.	ISO 9000
Confirmación, a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.	ISO/IEC 17025
Verificación, donde los requisitos especificados son adecuados para un uso previsto.	VIM

Una validación completa contempla los siguientes parámetros:

1) Intervalo lineal: Es la capacidad de un método para dar una respuesta analítica que es directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra dentro de un intervalo dado [40].

2) Intervalo de trabajo: Intervalo en el cual el método proporciona resultados en una incertidumbre aceptable [40].

3) Límite de detección (LDM): Es el nivel en el cual la detección del analito se vuelve problemática [40].

4) Límite de cuantificación (LOQ): Es el mínimo nivel de analito que puede ser determinado con precisión y veracidad o incertidumbre de medición aceptable. [40]

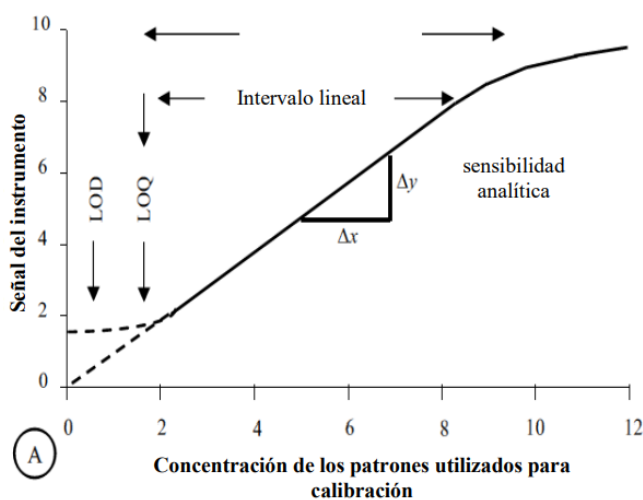


Figura 13 Identificación gráfica de los parámetros de validación de la respuesta del equipo [6]

5) Repetibilidad: Variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo [40].

6) Robustez: Es la medida de su capacidad de permanecer inalterado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal [40].

7) Selectividad (o Especificidad): Es el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin inferencia de otros componentes de comportamiento similar [40].

8) Sensibilidad: El cambio en la respuesta de un instrumento de medición dividido por el correspondiente cambio del estímulo [40].

9) Precisión: Variación en los resultados cuando las mediciones se realizan en un solo laboratorio, pero en condiciones que no son más variables que las condiciones de repetibilidad [40].

10) Exactitud: Es la proximidad de concordancia entre un resultado de una medición y el valor de referencia aceptado. El término exactitud cuando se aplica a una serie de resultados de prueba, involucra una combinación de componentes aleatorios y una componente error sistemático o sesgo [40].

11) Recuperación: Cantidad del analito recuperada en la porción de muestra o muestra adicionada cuando esta es conducida a través de un método analítico completo, y que permite evaluar la eficiencia de la extracción, proceso de preparación e interferencias que puedan existir al aplicarlo. Se expresa en porcentajes [40].

Para la finalidad de esta tesis, se realizó una validación que llamaremos “pruebas iniciales del método”, las cuales, si bien no llegan a ser una validación completa, sí desarrolla siete de los once parámetros de una validación, pero debido a lo extenso de tema, en esta tesis no se desarrollaron todos.

Planteamiento del problema

En México, se estima que existe una exposición al metil-mercurio derivado del consumo de pescados, no obstante, hasta el momento no se ha desarrollado la metodología para la cuantificación de mercurio y metil-mercurio que permita cuantificar el riesgo asociado a la salud.

3. Hipótesis

Las pruebas iniciales para la validación del método analítico de la especiación de mercurio permitirán cuantificar simultáneamente el mercurio y metil-mercurio en tejido de pescados, abriendo la posibilidad de evaluar confiablemente el riesgo a la salud, derivado del consumo de pescado en México.

4. Objetivo general.

Realizar pruebas iniciales de un método analítico para la cuantificación simultánea de mercurio y metil-mercurio mediante HPLC-ICP-MS

4.1. Objetivos particulares.

- Poner en marcha un método analítico para el análisis de metil-mercurio mediante HPLC-ICP-MS.
- Establecer las condiciones del método de extracción y el análisis de metil-mercurio en tejido de pescado mediante HPLC-ICP-MS.
- Reportar las cantidades de metil-mercurio en ciertas especies de pescados.

5 Resumen de la metodología utilizada en el proyecto

El presente estudio se dividió en dos etapas, utilizando dos diferentes espectrómetros de masas, en la primera se trabajó en las instalaciones del Instituto de Geología (IGL) y en la segunda, se trabajó en las instalaciones del Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC).

La primera etapa consistió en la selección de tres diferentes especies de pescados, con un reporte de alto contenido de Hg en México y en la realización de pruebas de digestión y en el análisis del contenido total de mercurio mediante ICP-MS (un Agilent Technologies 750 ce).

La segunda etapa consistió en la realización de pruebas de extracción utilizando las mismas especies de pescado y buscando la mejor separación de mercurio y metil-mercurio. Dentro de esta etapa, se realizó el acoplamiento del HPLC con el ICP-MS (un Thermo scientific iCAP-Q) para establecer las mejores condiciones de análisis.

Posteriormente, se realizaron ensayos para determinar simultáneamente el contenido de mercurio y metil-mercurio en las especies de pescado antes mencionadas, y se procedió a realizar pruebas iniciales de desempeño del método.

Finalmente, los resultados de concentración total de mercurio obtenidos en la primera etapa, se compararon con los resultados obtenidos de concentraciones de mercurio y metil-mercurio, obtenidos en la segunda etapa.

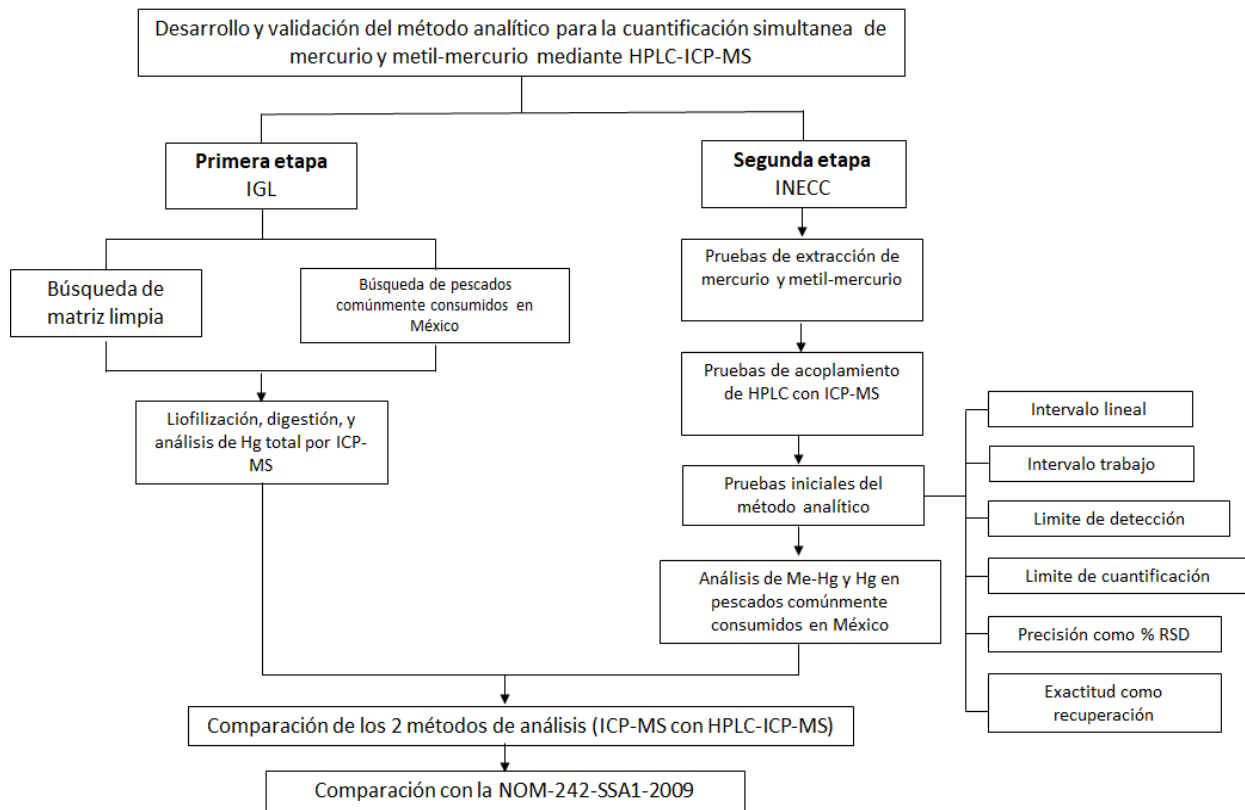


Figura 14. Metodología del proyecto.

6. Metodología (desarrollo *in extenso*).

6.1. Primera etapa. Experimentación en instituto de Geología.










Selección de especies de pescado y digestión de muestras.

Con la finalidad de obtener una matriz lo más parecida a las muestras de pescado reales, pero que además no contuviera al analito (Hg) o que apareciera en bajas concentraciones, se realizó una búsqueda bibliográfica detallada sobre qué especies de pescado de consumo en México reportaban las mayores y menores concentraciones de mercurio total. En el informe elaborado por Sylvie de Grosbois [26] en 2013 que habla sobre cantidades de mercurio en varias especies de pescados, se encontró que las dos especies con menor cantidad de mercurio, fueron *Cynoscion xanthulus* (Corvina boca naranjada) con 0.0 mg/Kg de Hg y *Mugil cephalus Lisa* (Lisa rayada) con 0.022 mg/Kg de Hg [26]. Sin embargo, debido a la dificultad de encontrar a la venta el pescado Corvina boca naranjada y a que presenta un bajo contenido de mercurio, se optó por utilizar músculo de la especie Lisa rayada para realizar la validación del método.

Asimismo, se seleccionaron las especies de pescado con un consumo común en México para utilizarlas como muestras problema una vez que se hubo concluido con la validación del método. Las especies seleccionadas fueron: *Caranx caninus* (Jurel toro), *Cathorops fuerthii* (Bagre) y *Sphyraena* (Barracuda), que según la Sylvie de Grosbois [26], presentan concentraciones de Hg total en un intervalo de 0.355 a 0.664 mg/Kg (Tabla 6).

Por otro lado, para poder establecer el intervalo de trabajo, se buscaron los límites máximos permisibles (LMP) de mercurio inorgánico y metil-mercurio en la normatividad mexicana. Como se mencionó en el *Capítulo 2.6.1.* en la NOM-242-SSA1-2009 [62], el LMP para productos frescos y refrigerados es de 1.0 mg/kg de metil-mercurio, de tal forma, se optó por utilizar 1.0 mg/kg como el punto medio de la curva de calibración y de ahí desprender nuestro intervalo de trabajo.

Tabla 6. Clasificación de especies de pescado por cantidad total de mercurio en tejido muscular [26]

Nombre científico	Nombre	Apariencia	Concentración reportada en mg/Kg
<u><i>Seriola lalandi</i></u>	Medregal rabo amarilla		0.764
<u><i>Caranx caninus</i></u> *	Jurel toro*		0.664
<u><i>Cathorops fuerthii</i></u> *	Bagre*		0.460
<u><i>Sphyrna ensis</i></u> *	Barracuda* Mexicana		0.355
<u><i>Oligoplites saurus</i></u>	Piña sietecuecos, zapatero		0.348
<u><i>Sphyrna lewini</i></u>	Cornuda común		0.320
<u><i>Galeichthys peruvianus</i></u>	Bagre de faja		0.317
<u><i>Haemulon sexfasciatum</i></u>	Burro rayado, Ronco callana		0.298
<u><i>Trachinotus paitensis</i></u>	Paloma Pompano		0.284

6.1.1. Liofilización y digestión de muestras

Como se mencionó en el apartado 2.1, una de las propiedades físicas del mercurio es su alta volatilización, ya que presenta una alta presión de vapor a condiciones ambientales, por lo cual, para evitar pérdidas durante el secado de las muestras, se optó por realizar un proceso de liofilización.

Grosso modo, la liofilización es un proceso de secado por congelamiento, en este proceso el agua se elimina por medio de temperaturas bajo cero y es seguido de un proceso de vacío Figura 16 [43].

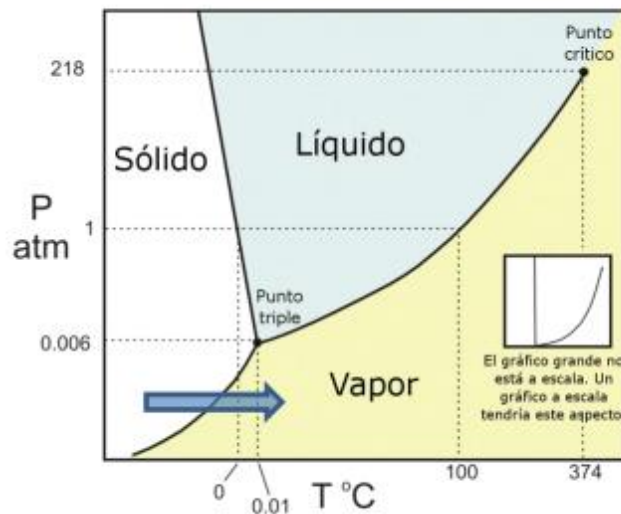


Figura 15. Diagrama de fases del agua (presión vs temperatura) [7].

El proceso de liofilización además de conservar el mercurio en las muestras, presenta una serie de ventajas en comparación con métodos convencionales:

- La facilidad de remover el líquido promueve un manejo aséptico [58].
- Estabilidad de la muestra seca [58].
- Al no ser calentada la muestra no existe una afectación en la composición [58].
- La humedad residual es muy baja [58].
- La conservación de la muestra es mayor [58].
- Facilidad para tratar posteriormente la muestra [58].

El proceso de liofilización para del músculo de Mugil cephalus (Lisa) extraídos del lomo fue:

1. Se cortan en piezas de pescado con un peso aproximado de 50 g.
2. Cada pieza es colocada en un vaso de precipitado de 50 mL donde se cubren con parafilm.
3. Se hacen pequeños huecos al parafilm y se llevaron a la liofilizar durante 24 hrs a 0.85 mBar y -47°C.

Mientras que para los pescados Caranx caninus (Jurel toro), Cathorops fuerthii (Bagre) y Sphyraena (Barracuda) la liofilización fue durante 48 hrs a 0.85 mBar y -47°C.

Una vez terminado el secado se midió su masa para determinar el porcentaje de humedad de cada muestra y se procedió a la molienda, el proceso es el siguiente:

1. Se agrega cada muestra liofilizada a un molino que fue previamente limpiado.
2. Se muelen hasta que se observar una muestra homogénea.
3. Al terminar se limpia el molino (con Extrain, agua tipo 1) y secado con papel kimwipes en ese orden, se guardan y se etiquetan en bolsas de plástico herméticas.

6.1.2. Tratamiento de muestra para análisis de mercurio total.

Las digestiones de las muestras de pescado fueron realizadas en un horno de microondas de vaso cerrado. En una técnica llamada como MAD (microwave-assisted digestion). Las ventajas que presenta este tipo de tratamiento son menores tiempos de digestión que otros sistemas, alta eficiencia, menor consumo del disolvente, reducción de contaminación con el medio ambiente y riesgo mínimo de perdida de compuestos volátiles. En la Figura 17, se puede observar un esquema interno del Horno, mientras que en la Figura 18 se puede observar un vaso de digestión (liner) con su sistema de seguridad [41].

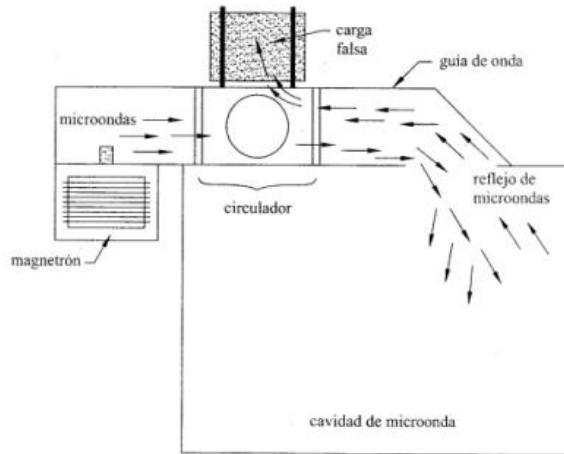


Figura 16. Esquema del funcionamiento del horno de microondas [42]

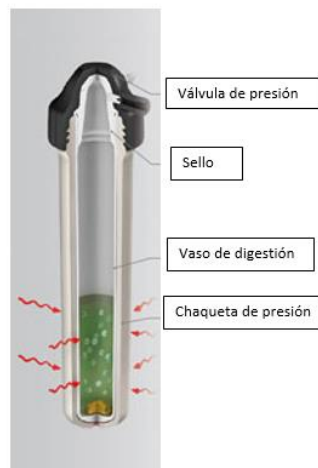


Figura 17. Componentes de un vaso de digestión (liner) [8]

Las muestras de músculo de pescado de las especies seleccionadas (Lisa, jurel toro, Bagre y Barracuda) se trataron (una vez liofilizadas), bajo el siguiente procedimiento para determinar las concentraciones de mercurio total:

1. Directamente en la balanza analítica medir la masa de 200 mg de muestra liofilizada y molida en un liner forrado de aluminio
2. Agregar 2 mL de peróxido de hidrógeno
3. Dejar durante 12 horas en predigestión, terminado el tiempo se agregar 4 mL de HNO_3 .
4. Introducir el liner al horno de microondas Anton Par a condiciones de 200°C y 20 bar durante 50 min.

5. Terminado el proceso llevar a un volumen de 50 mL con una disolución de In-Re (estándares internos del ICP-MS) en HNO₃ al 2%.

Es una destrucción completa de la muestra, permitiendo no filtrar la muestra ya que se encontraba homogénea en fase líquida, el equipo no detecto perdidas de muestra como la fuga de vapores o derrame de las muestras durante la digestión.

6.1.3. Análisis de Hg total por ICP-MS.

6.1.3.1. Evaluación y optimización de las condiciones del equipo

Los análisis se realizaron en un ICP-MS Agilent 7500a, para la optimización de las condiciones del análisis. Antes de iniciar cualquier análisis se realiza un tuning (sintonización) donde se revisan una serie de parámetros para verificar la respuesta del equipo, la generación de óxidos, iones con doble carga y el %RSD. Para dicha optimización, se utiliza una disolución de 1 µg/L que contiene elementos que permiten optimizar la señal del equipo siguiendo masas de elementos que representan todo el intervalo de masas que el ICP-MS que puede detectar ($m/Z+ =$ de 7 a 340 umas), de tal forma se puede elegir ⁷Li, ⁵⁹Co, ²³⁸U, con masas 7, 59 y 238, respectivamente. Los parámetros antes mencionados, deben de estar dentro de límites recomendados por el fabricante y en términos de analíticos a este paso se le llama verificación del equipo y se tiene que cumplir para que prosiga al análisis. En la Tabla 7 se muestran los parámetros recomendados por el fabricante.

RSD: Desviación estándar relativa.

Tabla 7. Límites de sensibilidad

Analito	Limite	Estabilidad RSD
Bkg 4.5	< 1 CPS	
Bkg 220.7	< 2 CPS	
^7Li	> 50,000 CPS	< 2 %
^{59}Co	> 100,000 CPS	< 2 %
^{238}U	> 300,000 CPS	< 2 %
^{115}In	>220,000 CPS	< 2 %
^{140}Ce . $^{16}\text{O}/^{140}\text{Ce}^2$	< 0.02	
$^{137}\text{Ba}^{++}/^{137}\text{Ba}$	< 0.03	

Cuando la verificación del equipo no cumple con los límites establecidos, se debe realizar una serie de modificaciones a las condiciones del equipo (flujo de gas argón, posición del plasma al contacto con la interfase, etc.).

6.1.3.2. Secuencia de análisis.

A partir de una serie de pruebas se llegó a una secuencia de análisis, que se constituye de varias secciones, a lo largo del proceso se destina a limpiar el equipo de posible contaminación, una curva de calibración, estándares de verificación y lotes analíticos.

➤ Secciones de limpieza: son llamados “Wash” constituidos por una disolución de ácido HNO_3 10%, HCl 2% destinados a limpiar de manera agresiva al analito y la matriz el equipo con una disolución de HNO_3 2%, 1% de HCl , este proceso permite acondicionar al equipo y a la matriz de las muestras a analizar. Estas disoluciones

Bkg: Proviene de la palabra Background o ruido de fondo.

son inyectadas al inicio del análisis, después de la curva de calibración, después de los estándares de verificación, al final del lote analítico y al final del análisis.

➤ La curva de calibración: constituida de una serie de disoluciones adicionadas con estándares a diferentes concentraciones. Es inyectada de menor a mayor concentración antes del lote analítico, para evitar contaminación de las disoluciones a concentraciones bajas por las de mayores concentraciones.

➤ Estándares de verificación: estos aseguran un análisis óptimo (se descartan interferencias debida a la preparación de la matriz y de las sustancias utilizadas, decaimiento de la señal, entre otras), están constituidos por una disolución adicionada a mitad del intervalo de la calibración, blanco de método, blanco de reactivos y material de referencia certificados. Los blancos de método y reactivos se inyectan después de la sección de lavado para asegurar que no exista contaminación del equipo, se inyectan nuevamente después de tener la curva de calibración, secciones de lavado y cada lote analítico (ahora con la disolución al punto medio de la curva, los materiales de referencia se inyectan después del lote analítico).

6.1.4. Metodología experimental de la primera etapa

A lo largo de esta sección se describieron los pasos que se llevaron a cabo en la primera etapa del proyecto realizado en el Instituto de Geología, donde se analizó los pescados con menor y mayor concentración de mercurio, a continuación, una esquematización:

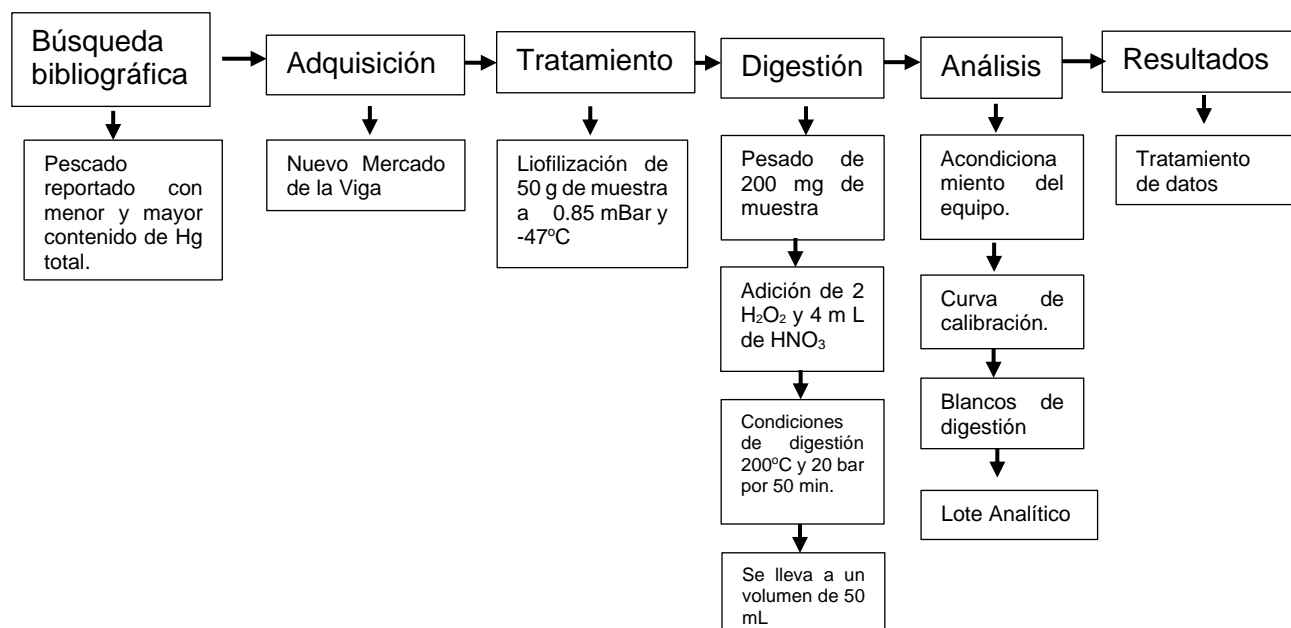


Figura 18. Metodología experimental de la primera etapa

6.2. Segunda etapa. Experimentación en Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC).

6.2.1. Pruebas de extracción de Hg y [Me-Hg]⁺ mediante horno de microondas

La técnica de extracción mediante horno de microondas (combina los métodos empleados de la extracción tradicional con el horno de microondas). Es una técnica relativamente nueva que presenta ventajas como: disminuir los tiempos de análisis, costos y de maximizar la extracción del analito, lo anterior se puede deber a los gradientes de calor y masa en la misma dirección, lo cual, deriva en una mayor cinética de extracción [43].

Las muestras fueron liofilizadas y pesadas bajo el mismo procedimiento explicado en la primera etapa del proyecto (sección 6.1.).

Basado en Reyes [41] se comenzaron a realizar pruebas de extracción de los analitos mencionados, acompañados de su respectivo análisis mediante ICP-MS. Con base en dichas pruebas, se estableció la mejor metodología de extracción:

1. En un liner del horno de microondas forrado con aluminio se pesan 200 mg de músculo de pescado liofilizado.
2. Se agregan 10 mL de disolución de extracción (5 mol/L de HCl y 0.25 mol/L de NaCl).
3. En un horno de microondas Anton Par, se introducen los liners conteniendo el tejido de pescado y la disolución extractante y se someten a un periodo de calentamiento de 10 min a 60 °C, un tiempo de rampa de 3 min.

Debido a que la extracción no destruye el músculo de pescado, se realizaron pruebas de centrifugado, al observar que no se podían separar las muestras mediante este proceso se optó por filtrar las muestras y se aforaron a 25 mL con la disolución de extracción.

6.2.2. Pruebas cromatográficas acoplado el sistema HPLC-ICP-MS.

Se realizó una identificación de los picos, se inyectaron por separado una disolución de 1 mg/L de mercurio inorgánico y otra de metil-mercurio, también se inyectó una curva combinada con una proporción menor de Hg comparada con las adiciones de metil-mercurio que permitió identificar los tiempos de retención, seguido se realizó una serie de modificaciones a las condiciones cromatográficas del equipo HPLC para mejorar la separación de los componentes, también para disminuir el ancho y reducir los tiempos de retención cuidando la calidad del análisis, las condiciones modificadas fueron la temperatura de la columna, las relaciones de los disolventes en la fase estacionaria, flujo de la bomba. La fase móvil está compuesta por una disolución de acetato de amonio, Metanol, agua MQ y mercaptoetanol.

6.2.3. Pruebas iniciales del método.

Para la validación del método se prepararon 3 curvas de calibración, 10 Blancos adicionados, 10 blancos de método para cumplir con los siguientes parámetros intervalo lineal, intervalo de trabajo, límite de detección, límite de cuantificación, recuperación, repetibilidad, exactitud.

a) Linealidad

Este parámetro se verificó a través de las curvas de calibración donde se pretendió que tuvieran una tendencia lineal en su respuesta del equipo y obtener una regresión lineal muy cercana a 1.

b) Límite de detección y límite de cuantificación

La guía EURACHEM establece que el límite de detección de una sustancia se realiza con 10 medidas replicadas del blanco, es decir matrices sin analito detectable, las fórmulas para calcular el límite de detección fueron [6]:

Ecuación 1:

$$LDM = \bar{X} + 3\sigma'$$

Ecuación 2:

$$LCM = LDM + 2\sigma' \text{ hasta } 10\sigma'$$

Ecuación 3:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

σ : Desviación estándar.

n: Es el número de réplicas de observación.

\bar{X} : promedio

Fuente de las fórmulas: Guía EURACHEM [6]

c) Intervalo de trabajo

Se midieron 5 grados de concentraciones por triplicado obteniendo la linealidad hasta el punto más alto de la curva de calibración, este punto se definió a partir de la NOM-242-SSA1-2009 [62] y la medición de los pescados de consumo en México se verificó que estuviera dentro del intervalo propuesto, EURACHEM define el intervalo de trabajo a partir LOQ y el punto más alto donde se mantiene lineal el resultado [6].

d) Exactitud

La exactitud es la proximidad de valores entre sí o a un valor de referencia, ésta se deriva a 2 componentes recuperación y precisión (Örnemark, 2014).

e) Recuperación

Se deriva a partir de 10 muestras adicionadas a mitad de la curva, los cuales pasaron por el método analítico. La fórmula para expresar este parámetro es el siguiente:

Ecuación 6:

$$\%R = \left(\frac{(\bar{X} - X_0)}{X_{\text{teo}}} \right) 100$$

X_0 : concentración de la muestra sin adicionar.

\bar{X} : promedio de las muestras adicionales

X_{teo} : valor teórico.

Fuente de la fórmula: Morillas et al., 2016

f) Precisión

Parámetro de validación que nos indica la proximidad de los resultados entre sí, la diferencia con la veracidad en esta se busca una proximidad a un punto de referencia. Se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la propagación de los resultados, se utilizan conceptos como la desviación estándar, calculada a partir de los resultados obtenidos mediante la realización de mediciones repetidas en un material adecuado en condiciones específicas [6].

g) Repetibilidad

Esta es una medida de la variación en los resultados cuando el análisis se lleva a cabo por un analista en el mismo equipo en un corto plazo, esta se realizó a través de la desviación estándar, varianza y desviación estándar relativa (Örnemark, 2014).

6.2.4. Análisis de muestras

El análisis de las muestras se desarrolló en un HPLC marca Thermo modelo ultimate 3000 y un ICP-MS ICAP Q Thermo, tanto la sintonización como la secuencia de análisis fueron muy similares y siguiendo la misma recomendación que en el apartado 6. 3..

Se realizó una evaluación de la columna cada cierto tiempo para observar la eficiencia de la columna para separar los picos, si se encontraba que era baja, se realizaba una regeneración de columna.

Una diferencia comparada con la primera sección es la introducción de muestra, fue a través del HPLC, siendo inyectada por el módulo automatizado y la lectura de

datos fue a través de un cromatograma, midiendo el área bajo la curva y obteniendo cuentas (cts) de un isótopo como señal emitida por el equipo en vez de cuentas por segundo que se obtienen si medimos solo en el ICP-MS (cps).

A continuación, se presenta un diagrama donde se resume el método analítico final para analizar muestras.

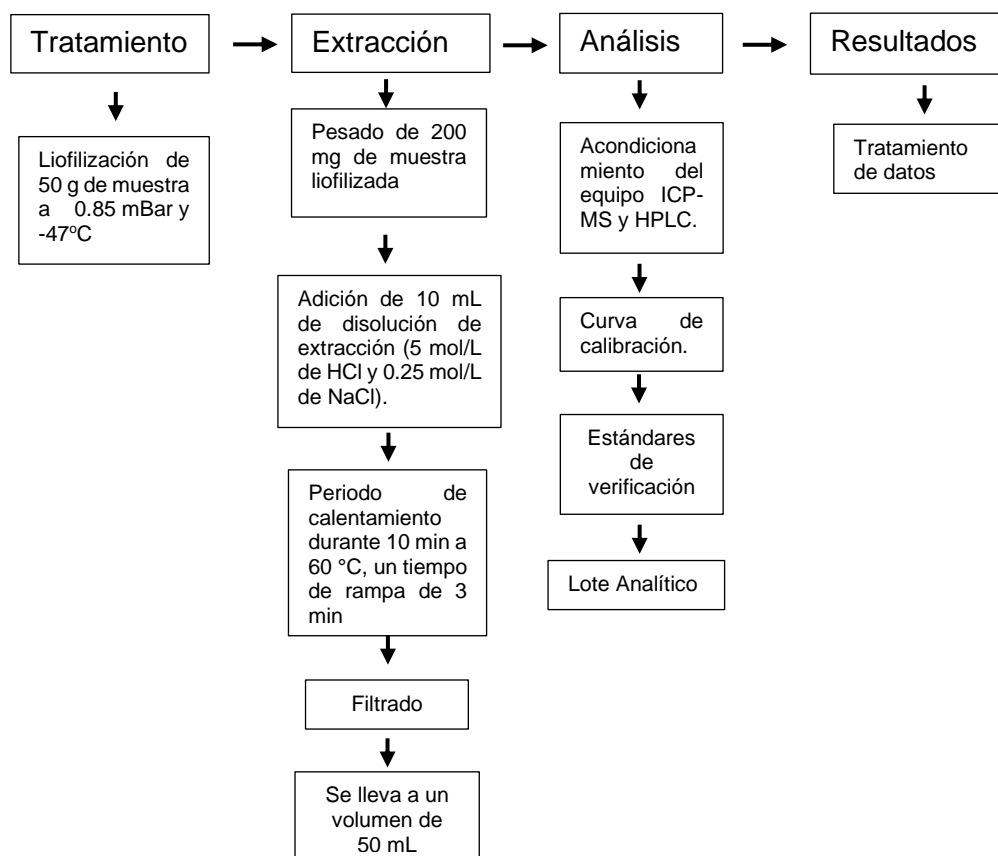


Figura 19. Metodología final de análisis mediante HPLC-ICP-MS

7. Resultados y discusión.

7.1. Primera etapa. Experimentación en instituto de Geología

7.1.1. Matriz libre de Hg. (primera etapa)

En la primera etapa de este estudio se buscó una matriz de pescado limpia, es decir, una matriz que no tuviera mercurio o que presentara las concentraciones más bajas de dicho metal. Para determinar las concentraciones de mercurio total en la matriz de pescado, se realizó una curva de calibración acuosa con los siguientes puntos (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 10 µg/L), dicha curva de calibración se muestra en la Figura 20.

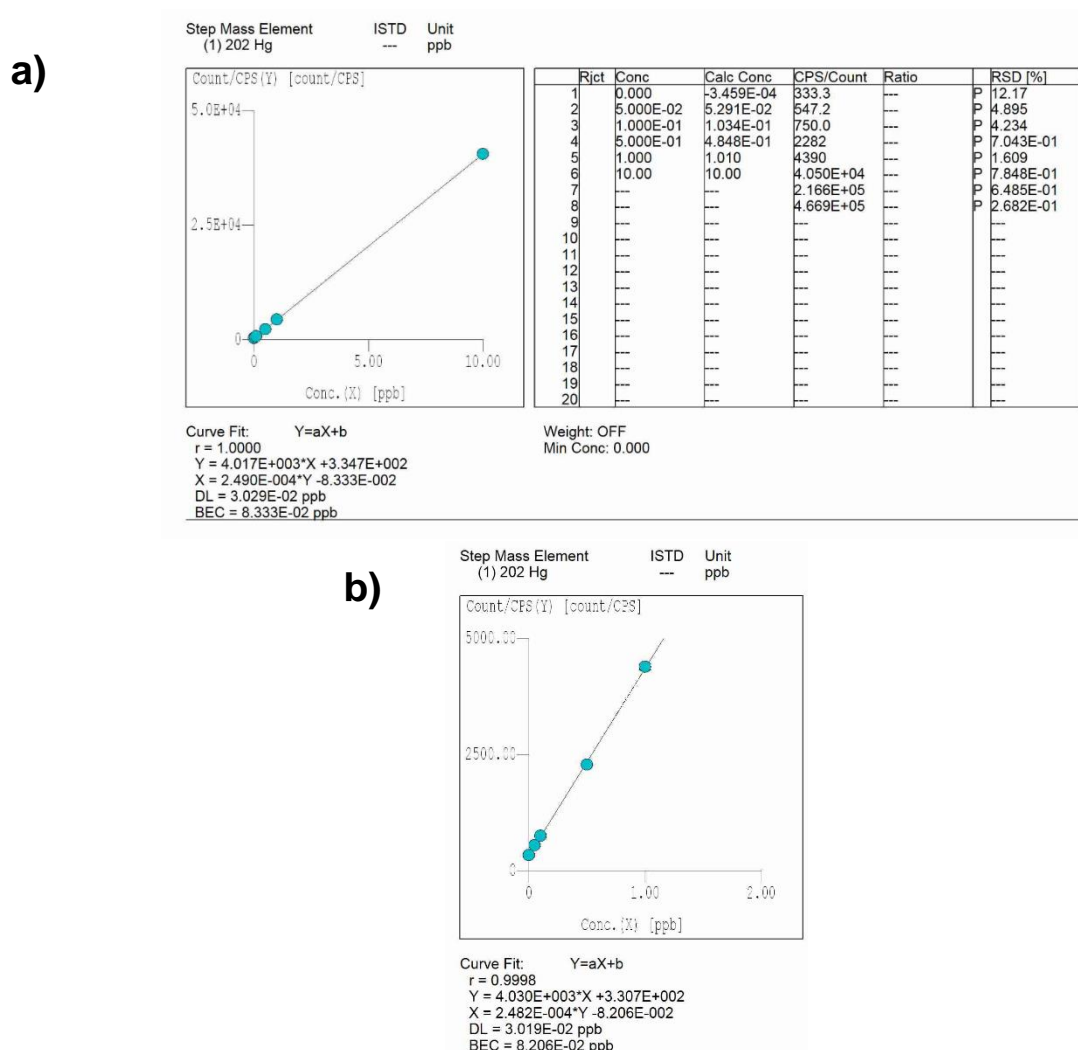


Figura 20. a) Curva de calibración sin matriz emitida por el equipo ICP-MS del ²⁰²Hg cuentas por segundo (cps) Vs (µg/L). b) Acercamiento a los puntos bajos de la curva de calibración.

En la Figura 20a, se puede observar que el blanco de reactivos da una señal de 333.3 cps, lo cual represente el ruido de fondo instrumental y de los reactivos utilizados. Los siguientes puntos de la curva de calibración (0.05, 0.1 y 0.5 $\mu\text{g/L}$) dan señales de 547.2, 750 y 2,282 cps, respectivamente.

Se prepararon 10 blancos de método que contuvieran 200 mg (aprox.) de la matriz del pescado seleccionado como matriz limpia y se sometieron al proceso de digestión mencionado en el apartado 6.1.2. Una vez obtenidos los digeridos, se midieron con la curva de calibración de la Figura 20 para determinar las concentraciones totales de Hg en la matriz. Los resultados de dichos análisis se muestran en la Tabla 8, que representan las concentraciones totales de mercurio obtenidas para la especie de pescado Lisa rayada. En dicha tabla se presentan las concentraciones acuosas ($\mu\text{g/L}$) y las concentraciones convertidas a matriz sólida (mg/kg) para facilidad de comparación.

Tabla 8. Concentraciones de Hg en muestras de Lisa mediante ICP-MS

Muestra	muestra (mg)	Hg $\mu\text{g/L}$	Hg mg/kg
2	0.25	0.35	0.07
3	0.20	0.23	0.06
4	0.20	0.17	0.04
5	0.20	0.22	0.05
6	0.20	0.20	0.05
7	0.20	0.45	0.11
8	0.20	0.20	0.05
9	0.20	0.41	0.10
10	0.20	0.39	0.10
\bar{X}		0.35	0.07
σ		0.34	0.04

Todas las concentraciones de Hg obtenidas para la matriz “libre de analito”, resultaron entre el segundo y tercer punto de la curva de calibración acuosa (0.1 y 0.5 $\mu\text{g/L}$), a pesar de que nuestra matriz libre de Hg presenta en promedio concentraciones de 0.07 $\mu\text{gHg/g}_{\text{pescado}}$, al compararlas con el LMP de la NOM-242-SSA1-2009 [62] (1 $\text{mgHg/kg}_{\text{pescado}}$), representan menos que el 10% del valor de la norma, por lo cual, podemos concluir que esta matriz, aunque no está libre de Hg, no representa ninguna interferencia para fines de validación.

7.1.2. Mercurio total en pescados comúnmente consumidos en México.

Posteriormente se analizaron las muestras de pescado seleccionadas, que se reportan como de consumo común en México. Se utilizó una curva de calibración con matriz, a la cual se le adicionaron las siguientes concentraciones (0, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 $\mu\text{g/L}$). En la Figura 21 se presenta dicha curva de calibración y en la Tabla 9 se presentan las concentraciones de Hg total para las tres especies de pescados analizadas.

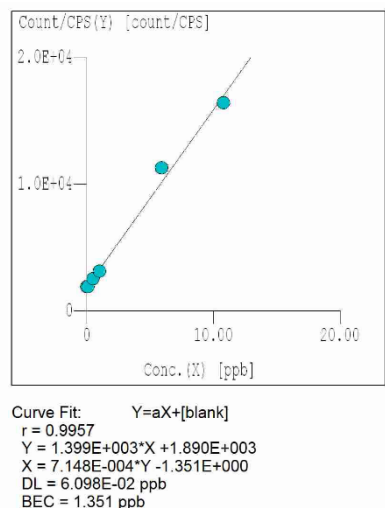
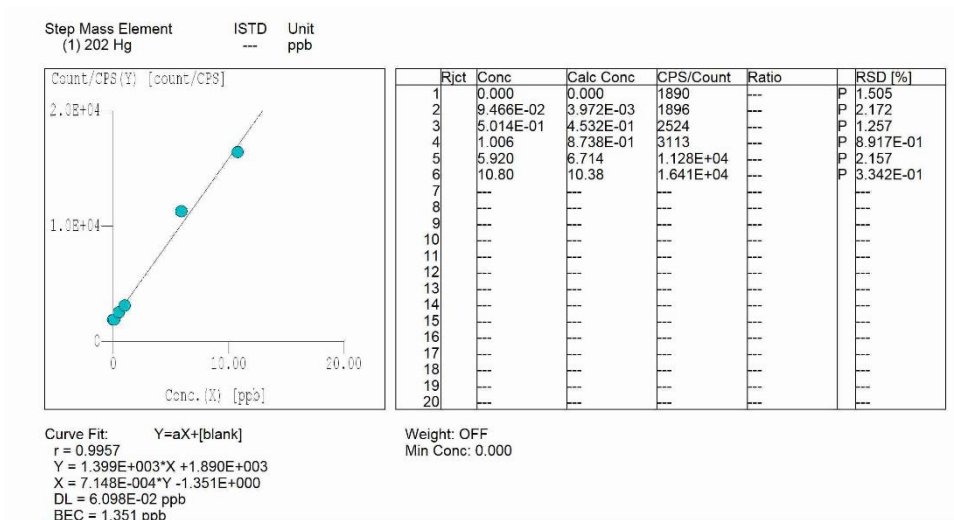


Figura 21. a) Curva de calibración con matriz emitida por el equipo ICP-MS del ^{202}Hg cuentas por segundo (cps) Vs ($\mu\text{g/L}$). b) Acercamiento a los puntos bajos de la curva de calibración.

Estos análisis permitieron verificar qué muestras de diferentes pescados, caen dentro del intervalo de trabajo propuesto (0, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 ppb), sin embargo, lo importante a observar, es que varias de las muestras analizadas, superaron el LMP propuesto en la NOM-242-SSA1-2009 (1mg/kg) [62].

Tabla 9. Concentraciones de las muestras de jurel toro (*Caranx caninus*), Bagre (*Cathorops fuerthii*), barracuda (*Sphyraena*)

Muestra	Hg μg/L	Hg mg/kg
Bagre 1	6.87	1.75
Bagre 2	5.89	1.51
Bagre 3	6.92	1.80
Bagre 4	7.18	1.82
\bar{X}	6.72	1.72
σ	0.56	0.14
Barracuda 1	1.74	0.45
Barracuda 2	2.45	0.64
Barracuda 3	1.88	0.46
Barracuda 4	3.68	0.95
\bar{X}	2.44	0.62
σ	0.88	0.23
Jurel 1	5.68	1.40
Jurel 2	3.64	0.93
Jurel 3	5.66	1.47
Jurel 4	8.82	2.06
\bar{X}	5.95	1.64
σ	2.14	0.36
LMP _{NOM-242-SSA1-2009}		1

Específicamente, las especies Bagre y Jurel exceden el LMP. En el caso del Bagre lo excede por 0.72 μg/g y en el caso del Jurel por 0.64 μg/g en comparación con la norma, para el caso de la barracuda no excede el LMP establecido por la norma. Si asumimos que la concentración de metil-mercurio representa el 90% en el tejido de pescado, podríamos decir que, en el caso del Bagre y Jurel, la

concentración de metil-mercurio excedería los LMP establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009. Sin embargo, debido a que solamente se analizó mercurio total, dicha aseveración, aún no se puede afirmar.

7.2. Segunda etapa. Experimentación en Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático

7.2.1. Pruebas de extracción

Como se mencionó en la metodología, uno de los aspectos importantes para la determinación correcta de las diferentes especies de mercurio, es el proceso de extracción.

Dicho procedimiento se llevó a cabo mediante horno de microondas, y posteriormente se midieron las concentraciones totales de mercurio mediante ICP-MS (ubicado en el INECC). Se prepararon las mismas muestras que las que se analizaron por digestión total.

Se realizó una curva de calibración (Figura 22) y se utilizó para cuantificar los resultados de la tabla 11, en este caso se utilizó un intervalo de trabajo amplio 0.5-100 µg/L debido a que se iba a realizar el primer análisis y no se tenía la certeza de la cantidad encontrada en los pescados. En la Tabla 10 se presentan los resultados arrojados por el equipo iCAP-Q mediante el software QTEGRA. En dichas tablas se pueden observar las concentraciones obtenidas, así como el error asociado a cada medición (como % RSD).

Además, en la Figura 22 se presenta la curva de calibración obtenida, así como su regresión lineal.

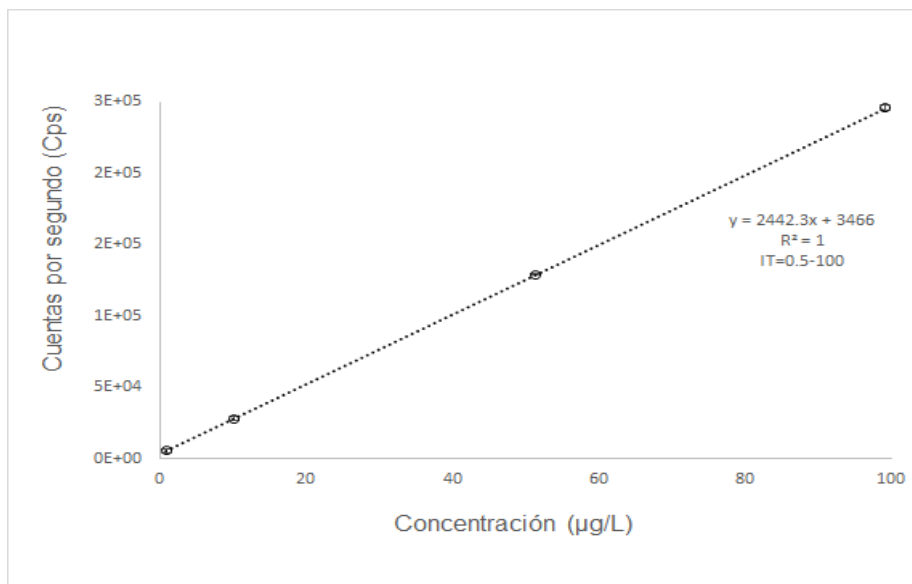


Figura 22. Curva de calibración del ²⁰²Hg cuentas por segundo (cps) Vs (mg/L), para el análisis de la tabla 11.

Tabla 10 Datos de las concentraciones emitidas por el equipo ICP-MS Thermo Fisher Scientific ICAP TQs, graficadas en la Figura 22

Standards:				Standards:			
Analysis Index: 5				Analysis Index: 6			
Analysis Name: S270218-3				Analysis Name: S270218-4			
Analysis Type: STD				Analysis Type: STD			
Analysis Started at: 3/2/2018 12:24:59 PM				Analysis Started at: 3/2/2018 12:27:17 PM			
Standard (Stock): S200218-10				Standard (Stock): S200218-11			
Standard DF: 1				Standard DF: 1			
Category	Concentration average	Concentration RSD	Standard Concentration	Category	Concentration average	Concentration RSD	Standard Concentration
7Li (KED)	78.947 %	N/A		7Li (KED)	178.948 %	N/A	
45Sc (KED)	107.295 %	N/A		45Sc (KED)	105.547 %	N/A	
89Y (KED)	101.090 %	N/A		89Y (KED)	104.655 %	N/A	
103Rh (KED)	100.773 %	N/A		103Rh (KED)	101.959 %	N/A	
115In (KED)	101.211 %	N/A		115In (KED)	101.293 %	N/A	
159Tb (KED)	98.557 %	N/A		159Tb (KED)	98.649 %	N/A	
165Ho (KED)	98.918 %	N/A		165Ho (KED)	96.521 %	N/A	
175Lu (KED)	98.582 %	N/A		175Lu (KED)	96.282 %	N/A	
200Hg (STD)	0.983 ppb	6.3 %	1.000 ppb	200Hg (STD)	9.994 ppb	2.3 %	10.000 ppb
202Hg (STD)	0.922 ppb	11.2 %	1.000 ppb	202Hg (STD)	10.097 ppb	2.8 %	10.000 ppb
209Bi (KED)	94.920 %	N/A		209Bi (KED)	92.828 %	N/A	

Standards:				Standards:			
Analysis Index: 7				Analysis Index: 8			
Analysis Name: S270218-5				Analysis Name: S270218-6			
Analysis Type: STD				Analysis Type: STD			
Analysis Started at: 3/2/2018 12:29:36 PM				Analysis Started at: 3/2/2018 12:31:55 PM			
Standard (Stock): S200218-12				Standard (Stock): S200218-13			
Standard DF: 1				Standard DF: 1			
Category	Concentration average	Concentration RSD	Standard Concentration	Category	Concentration average	Concentration RSD	Standard Concentration
7Li (KED)	442.110 %	N/A		7Li (KED)	89.474 %	N/A	
45Sc (KED)	119.414 %	N/A		45Sc (KED)	115.736 %	N/A	
89Y (KED)	109.554 %	N/A		89Y (KED)	107.888 %	N/A	
103Rh (KED)	108.326 %	N/A		103Rh (KED)	104.274 %	N/A	
115In (KED)	108.243 %	N/A		115In (KED)	102.866 %	N/A	
159Tb (KED)	104.429 %	N/A		159Tb (KED)	99.797 %	N/A	
165Ho (KED)	103.208 %	N/A		165Ho (KED)	100.194 %	N/A	
175Lu (KED)	101.207 %	N/A		175Lu (KED)	98.058 %	N/A	
200Hg (STD)	51.287 ppb	0.8 %	50.000 ppb	200Hg (STD)	99.357 ppb	0.7 %	100.000 ppb
202Hg (STD)	51.472 ppb	0.3 %	50.000 ppb	202Hg (STD)	99.255 ppb	0.3 %	100.000 ppb
209Bi (KED)	97.159 %	N/A		209Bi (KED)	93.333 %	N/A	

Una vez obtenidas las concentraciones por el proceso de extracción se compararon con aquellas concentraciones obtenidas por el proceso de digestión total (realizado en el Instituto de Geología). Así, en la tabla 11 se presentan las concentraciones obtenidas mediante extracción y las concentraciones obtenidas mediante digestión total.

Tabla 11. Comparación de concentraciones entre extracción y digestión de mercurio total.

	Proceso extracción INECC	Proceso digestión IGL
	Hg	Hg
Muestra	µg/g	µg/g
Bagre	1.83	1.75
	2.02	1.51
	1.91	1.80
	-	1.82
\bar{X}	1.92	1.72
σ	0.094	0.14
Barracuda	0.67	0.45
	0.73	0.64
	0.77	0.46
	-	0.95
\bar{X}	0.73	0.62
σ	0.047	0.23
Jurel	1.94	1.40
	2.60	0.93
	2.42	1.47
	-	2.06
\bar{X}	2.32	1.64
σ	0.34	0.36

Se puede observar que los resultados mediante extracción (INECC) en general son más altos que los obtenidos mediante digestión (IGL), esto puede deberse a que fueron medidos con curvas de calibración diferentes, en el caso del INECC se midió con una curva de 0 a 100 ppb, debido a que era un primer acercamiento y no se

sabía en que zona de la curva caerían los pescados analizados. Observamos que las concentraciones “caen” en la zona baja de la curva de calibración que normalmente es reportado como la zona con mayor error ($\pm 30\%$). Por otro lado, en el caso del IGL se midió con una curva de calibración de 0 a 10 ppb, en donde los pescados caen en la parte central de la curva, que es la zona de mayor confiabilidad ($\pm 10\%$).

Después de las observaciones realizadas, podemos decir que el proceso de extracción es eficiente para obtener todas las especies de mercurio, ya que las condiciones de la extracción utilizadas, no alteran la concentración ni la forma química, lo cual concuerda con lo observado por Reyes [41].

7.2.2. Pruebas de acoplamiento HPLC-ICP-MS

Una vez verificado el proceso de extracción, se procedió a realizar el acoplamiento de los equipos (HPLC con ICP-MS). Posteriormente, se realizó la identificación de los picos, inyectando una curva de calibración con una proporción menor de metil-mercurio que de mercurio inorgánico (Figura 23), y para verificar los resultados se inyectaron materiales de referencia certificados (Figura 24), de los cuales sabemos la proporción de metil-mercurio con mercurio inorgánico.

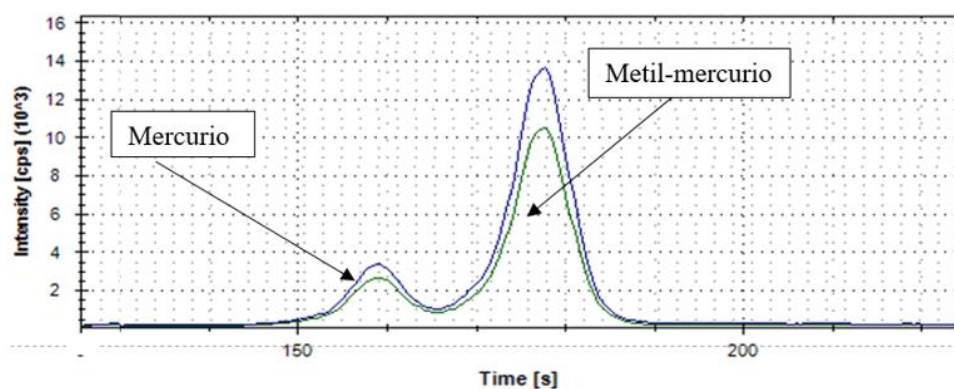


Figura 23. Identificación de picos. Cromatograma punto de la curva adicionando mercurio y metil-mercurio

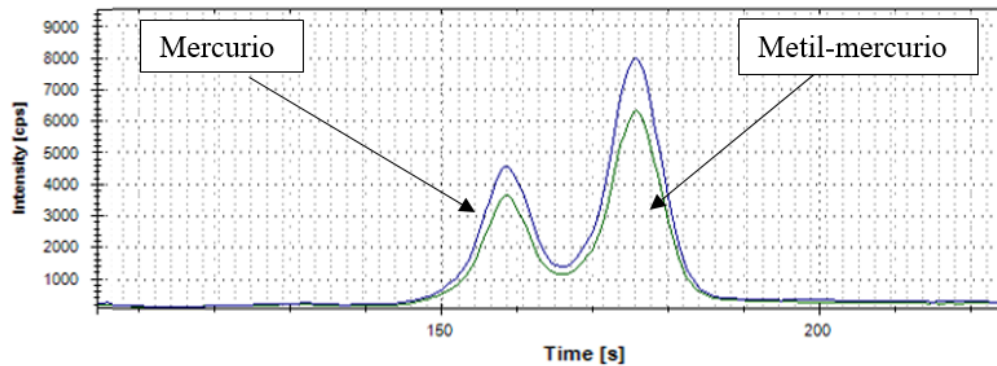
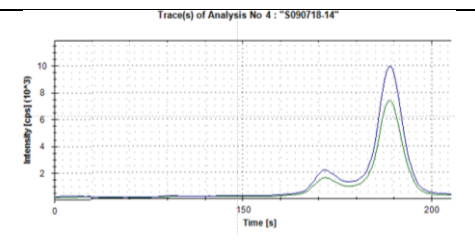
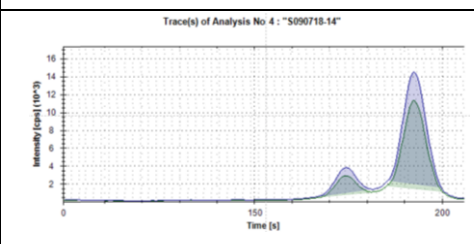
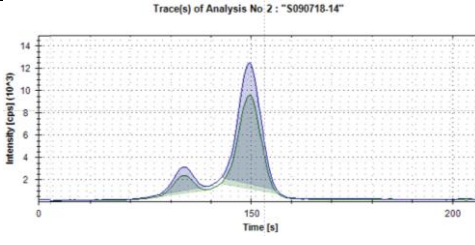
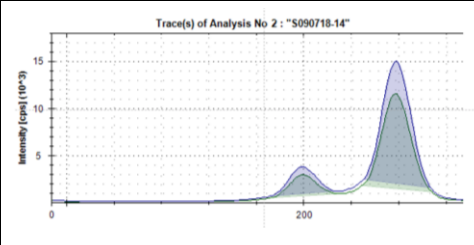


Figura 24. Identificación de picos. Cromatograma material de referencia certificado (SRM 1946 - Lake Superior Fish Tissue NIST).

Para identificación de los picos se concluyó que, el primero en aparecer es el mercurio inorgánico, mientras que en el segundo es el metil-mercurio; ya que se utilizó el 2-mercaptoetanol en la fase móvil, que en contacto con la muestra formó especies acomplejadas tanto con el Hg como el metil-mercurio, las especies acomplejadas se adhieren a la columna al contacto con ésta, pero debido a que las especies una vez que fueron acomplejadas con el 2-mercaptoetanol modificaron la afinidad con los otros componentes de la fase móvil de diferente forma provocando que sean arrastrados a tiempos diferentes, obteniendo primero al mercurio con menor afinidad seguido del metil-mercurio [44].

Como se mencionó en la metodología, una vez identificados los picos del cromatograma, se procedió a modificar las condiciones del HPLC para poder tener una medición óptima (mejor separación y definición de picos, menor tiempo de análisis, etc.). En la Tabla 11 se muestra un resumen de las condiciones que fueron probadas y la respuesta que se tenía en el cromatograma.

Tabla 12. Pruebas de cromatografía variando las condiciones del HPLC.

Prueba 130718	Prueba 190718c
T=40 °C, flujo=1mL/min, 0.1% mercaptoetanol	T=30 °C, flujo=1mL/min, 1% mercaptoetanol
	
Prueba 190718d	Prueba 190718e
T=50 °C, flujo=1.3mL/min, 1% mercaptoetanol	T=32 °C, flujo=0.8mL/min, 1% mercaptoetanol
	

Como se puede observar en la tabla 11, la temperatura del horno que calienta la columna no afecta significativamente la definición ni la separación de los picos, por ello se decidió trabajar en la recomendación de 30 °C [41]. Por otro lado, un aumento en el flujo de la fase móvil, produce una disminución del tiempo de retención de los picos, sin embargo, el aumento del flujo de fase móvil, también aumenta la entrada fluido al plasma del ICP-MS, que combinado con la matriz salina de la muestra, causaba que el plasma se “ahogara” y se apagara, de tal forma, se buscó un flujo alto, pero que no afectara las condiciones del plasma.

También se observa, la variación de la cantidad de mercaptoetanol en la fase móvil, pudimos observar que, entre mayor concentración de mercaptoetanol, mejor era la separación de los picos y que la ausencia de éste, provocaba una separación ineficiente.

Bajo estos experimentos, se llegó a la conclusión de que las mejores condiciones de análisis son: una fase móvil de 0.06 mol/L de acetato de amonio, una relación 30 - 70 de Metanol - agua tipo 1 y 0.1 % mercaptoetanol, a una temperatura de la columna de 30 °C, con 0.5 mL/min de flujo de la fase móvil y una inyección de 100 μ L. En la siguiente figura podemos observar el cromatograma de una muestra de barracuda, observamos la separación de los picos y la resolución del cromatograma.

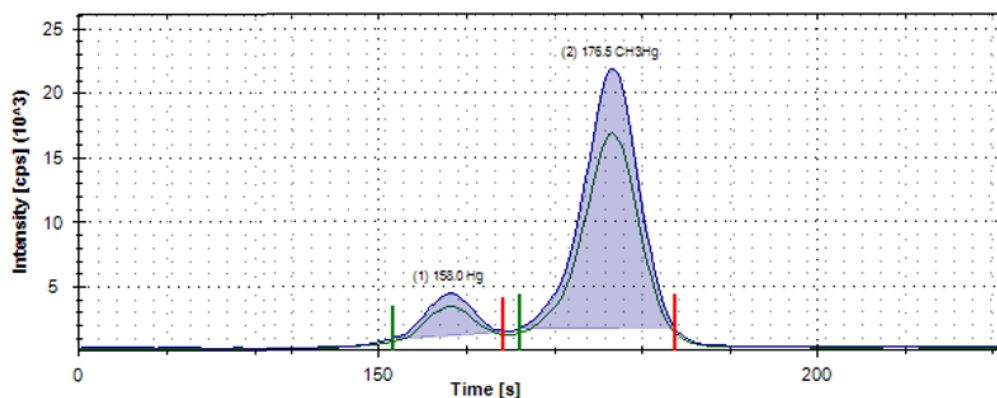


Figura 25. Cromatograma para la definición y separación de picos de una muestra real de barracuda.

7.2.3. Parámetros iniciales para el desarrollo del método

En el presente estudio se realizó pruebas iniciales para una primera evaluación del método analítico propuesto, por lo que sólo se determinaron los siguientes parámetros: intervalo lineal (IL), intervalo de trabajo (IT), límite de detección (LDM), límite de cuantificación (LCM), precisión (repetibilidad) y exactitud (% recobro).

a) Intervalo lineal (IL)

Debido a su modo de detección dual (modo pulsos y análogo), el ICP-MS tiene la capacidad de presentar una respuesta lineal de más de 6 órdenes de magnitud, por lo que, bajo nuestras condiciones de concentración, el ICP-MS nunca pierde

la linealidad, por lo cual, observamos que el intervalo lineal y el intervalo de trabajo pueden ser muy parecidos.

Dicho lo anterior, en la Figura 26 se presenta el IL para metil-mercurio y mercurio. En dichas graficas se puede observar el intervalo lineal establecido para ambos analitos, el cual fue de 1.2 a 25 µg/L para mercurio y de 0.5 a 25 µg/L para metil-mercurio.

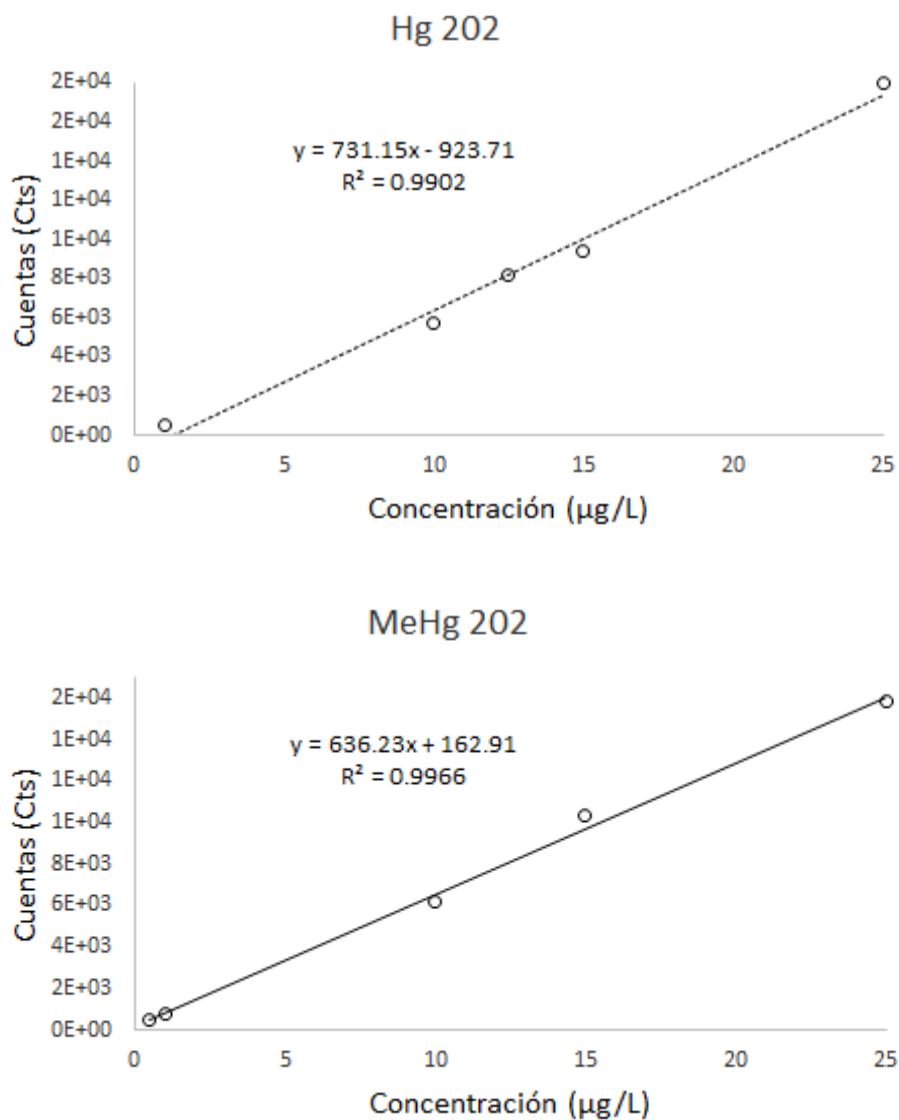


Figura 26. curvas de calibración para el Me²⁰²Hg y para el ²⁰²Hg

b) Límite de detección y límite de cuantificación

Los parámetros de LDM y LCM se presentan en la Tabla 12 y se realizó siguiendo las recomendaciones de la guía EUROCHEM, se utilizaron 10 blancos de método con matriz libre de analito, en la figura 27 se observa un cromatograma para uno de los blancos de método preparados, tal y como lo arroja el HPLC-ICP-MS.

Tabla 13 Blancos de método, LDM y LCM

#	Nombre	Concentraciones ($\mu\text{g/L}$)		Concentraciones ($\mu\text{g/g}$)	
		Hg	[Me-Hg] ⁺	Hg	[MeHg] ⁺
1	BM191018-4	0.98	0.20	0.12	0.02
2	BM191018-5	0.98	0.23	0.12	0.03
3	BM191018-6	0.92	0.22	0.11	0.02
4	BM191018-7	0.97	0.26	0.11	0.03
5	BM191018-8	0.95	0.25	0.11	0.03
6	BM191018-9	0.98	0.32	0.12	0.04
7	BM191018-10	0.87	0.14	0.10	0.02
8	BM191018-11	0.88	0.12	0.11	0.01
9	BM191018-12	0.90	0.14	0.11	0.02
10	BM191018-13	0.85	0.16	0.10	0.02
	\bar{X}	0.93	0.20	0.11	0.02
	σ	0.05	0.06	0.01	0.01
x	LDM	1.07	0.39	0.13	0.05
	LCM	1.17	0.52	0.14	0.06

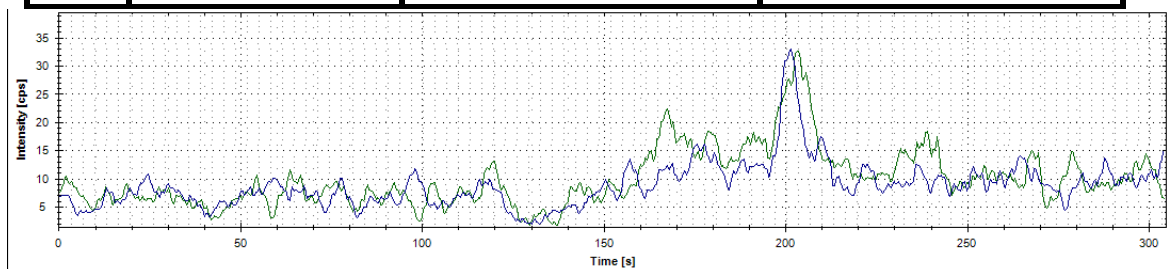


Figura 27. Cromatograma de una muestra blanco de método.

Los resultados obtenidos para el LDM son satisfactorios debido a que se encuentran en un intervalo alrededor de nuestro punto más bajo de la curva de calibración, con certeza podemos detectar con mayor probabilidad el analito en muestras con bajo contenido de este.

Para el LCM también es muy bajo este nos dice que a partir de 0.14 µg/g para el mercurio y 0.06 µg/g para el metil-mercurio se puede realizar un cálculo con mayor certeza, mientras que debajo de estos valores no es posible calcularlos. Los dos puntos nos dicen que el método analítico es fiable para detecciones de analito a concentraciones bajas. Mientras que en la figura 27 se observa el cromatograma de un blanco de método, se observa ruido electrónico y dos picos casi imperceptibles en los tiempos correspondientes al metil-mercurio y al mercurio.

c) Intervalo de trabajo

Los intervalos lineal y de trabajo pueden ser muy parecidos, de tal forma, en la Figura 26 se presenta el IT. Dichas gráficas, nos permiten establecer el criterio de aceptación para el IT, el cual, se representa como el coeficiente de correlación (R^2). Nuestro criterio de aceptación para asegurar un modelo matemático correcto fue de $R^2 \geq 0.990$ [45].

En dicha Figura 28 observamos que el R^2 para metil-mercurio fue de 0.9966, mientras que para Hg fue de 0.9902. Estos dos coeficientes nos dicen que el modelo matemático que se tiene es muy adecuado para interpolar concentraciones dentro de este intervalo.

Tabla 14 Intervalo de trabajo

	Hg µg/L	[Me-Hg] ⁺ µg/L	Hg µg/g	[Me-Hg] ⁺ µg/g
Intervalo de trabajo	1.2 – 25.0	0.52 – 25.0	0.14 – 3.0	0.06 – 3.0

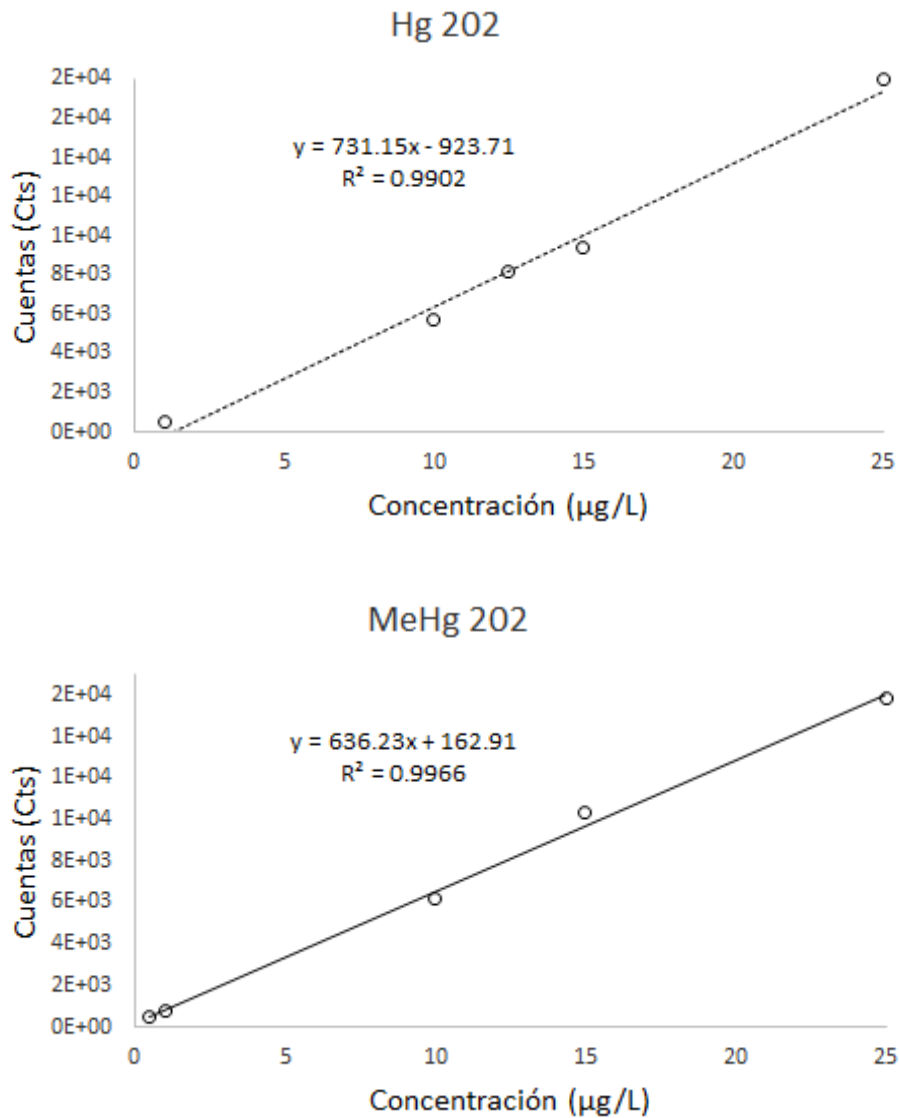


Figura 28 Representación gráfica del intervalo de trabajo a) intervalo de trabajo de [Me-Hg]⁺ y b) intervalo de trabajo de [Me-Hg]⁺ en µg/L

El IT está comprendido desde el LCM que representa el primer punto de la curva, en donde las mediciones a dicha concentración presentan una confiabilidad aceptable (según la literatura $\pm 30\%$). Por otro lado, el IL llega hasta 3 µg/g permitiendo que los valores LMP que marca la norma (NOM-242-SSA1-2009), “caigan” en el punto medio de la curva, garantizando mayor precisión analítica.

d) Exactitud y precisión

En la Tabla 15 se presentan los valores para los blancos adicionados a la mitad de la curva (1.5 µg/g).

Tabla 15 Blancos adicionados

#	Nombre de la muestra	Concentraciones (µg/L)		Concentraciones (µg/g)	
		[Me-Hg]+	Hg	[Me-Hg]+	Hg
1	BA191018-1	14.10	12.52	1.57	1.36
2	BA191018-2	14.02	12.32	1.45	1.24
3	BA191018-3	14.23	12.58	1.55	1.36
4	BA191018-4	13.58	13.21	1.60	1.30
5	BA191018-5	13.95	13.31	1.70	1.35
6	BA191018-6	14.02	12.96	1.58	1.31
7	BA191018-7	14.04	13.38	1.74	1.38
8	BA191018-8	13.94	14.12	1.76	1.33
9	BA191018-9	12.68	13.14	1.70	1.37
10	BA191018-10	15.52	14.66	1.73	1.39
	σ	0.69	0.72	0.10	0.05
	σ^2	0.48	0.52	0.01	0.00
	%RSD	5	5	6	4
	\bar{X}	14.01	13.22	1.64	1.33
	% Recuperación	112.06	105.76	109.17	88.93

La exactitud se evaluó a partir del porcentaje de recuperación, ya que este, nos dice que tan aproximado estamos de un valor teórico, en este caso, el punto medio de la curva de calibración, el cual es de 1.5 µg/g para los 2 analitos (Hg y [Me-Hg]⁺). En la Tabla 14, se puede observar, valores acertados para nuestras mediciones, ya que se encuentran en todos los casos a excepción del mercurio que aparece debajo de nuestro intervalo establecido que es un porcentaje de recuperación entre 88% y

112%, que comparados con los valores recomendados de la EPA 6020b donde nos recomienda una recuperación de +/- 35% del valor verdadero para la técnica ICP-MS [71].

Así mismo, la precisión en términos de repetibilidad, se evaluó a partir de los blancos adicionados a mitad de la curva, en este estudio, los parámetros matemáticos utilizados fueron la desviación estándar y el % RSD, los cuales, nos muestran la desviación existente entre el universo “n” de muestras.

Para nosotros, el parámetro más importante fue el % RSD (por sus siglas Relative Standard Desviación), que nos indica la variación de los resultados con respecto al valor promedio de las mediciones. La recomendación por parte de la EPA 6020b un RSD < 20% para ICP-MS [71], se puede observar que para el mercurio es del 4% y para el metil-mercurio es de 6% estos valores se encuentran por debajo de la recomendación como lo marca esta recomendación demostrando una buena repetibilidad de las muestras.

7.2.4. Análisis de [Me-Hg]⁺ y Hg en pescados comúnmente consumidos en México, mediante HPLC-ICP-MS

Una vez realizadas y aceptadas estas pruebas iniciales para el método analítico se procedió a realizar la cuantificación de metil-mercurio y mercurio por el método propuesto, en muestras de pescado de consumo común en México. Las muestras medidas en esta etapa, fueron las mismas que se analizaron por mercurio total anteriormente (Capítulo 7.1.2.). De tal forma, en la Tabla 16 se muestran las concentraciones de Hg y de [Me-Hg]⁺ obtenidas para dichas muestras, también en la tabla 17 se hizo un cálculo para determinar si la diferencia entre los resultados obtenidos es significativa o no.

Tabla 16 cuantificación simultánea de [Me-Hg]⁺ y Hg mediante HPLC-ICP-MS

Muestra	Hg	[Me-Hg] ⁺	Hg + [Me-Hg] ⁺	[Me-Hg] ⁺	Hg total IGL
	(µg/g)			%	(µg/g)
Jurel -2	1.07	1.29	2.36	54.50	1.64
Bagre-1	0.45	1.83	2.28	79.40	
Bagre -2	0.50	1.72	2.22	77.10	
\bar{X}	0.48	1.78	2.25	78.25	1.72
σ	0.04	0.08	0.04		
Barracuda-1	0.19	0.62	0.81	76.50	
Barracuda -2	0.10	0.74	0.84	88.10	
\bar{X}	0.15	0.68	0.83	82.30	0.62
σ	0.06	0.08	0.02		
LMP NOM		1			

Tabla 17 prueba t de student (cálculos en Anexo b de esta tesis)

		Bagre	Barracuda	Jurel	
INECC (ICP-MS)- INECC (HPLC-ICP-MS)	t_{el}	4.98	1.22	1.79	
	Grados de libertad	3	3	2	
	$\alpha=0.05$	t_c	3.18	3.18	4.3
		Comparación	$t_{el} > t$	$t_{el} < t$	$t_{el} < t$
		¿Es significativa la diferencia?	Si	No	No
	$\alpha=0.01$	t_c	5.84	5.84	9.92
		Comparación	$t_{el} < t$	$t_{el} < t$	$t_{el} < t$
		¿Es significativa la diferencia?	No	No	No

En la tabla 16 se realizó la comparación de la suma de las especies de mercurio ($\text{Hg} + [\text{Me-Hg}]^+$) analizadas por el método HPLC-ICP-MS con el primer análisis en el Instituto de Geología, mientras que en la tabla 17 se realizó un análisis estadístico para la comparación de resultados entre estos dos análisis, el análisis estadístico arroja que la diferencia de resultados para estas especies no representa una diferencia significativa a un nivel de error α a 1%. Si bien a pesar que el método no está validado, estos resultados nos dan indicios que la metodología analítica presentada, para la determinación simultánea de mercurio y de metil-mercurio mediante HPLC-ICP-MS puede llegar a ser adecuada.

Lo siguiente y más interesante, es que las concentraciones obtenidas para Jurel y Bagre se encuentran por encima de los límites máximos permisibles propuestos en la NOM-242-SSA1-2009 para el metil-mercurio. En el caso de Jurel, el LMP es superado por $0.29 \mu\text{g/g}$ mientras que, para el Bagre, el LMP es superado por $0.78 \mu\text{g/g}$.

Finalmente, en dicha tabla también se puede observar que el porcentaje del metil-mercurio en el mercurio total, no es el mismo para todas las especies de pescado, lo cual, difiere con otras investigaciones y documentos, por ejemplo, en el documento presentado por González-Estecha, (2014) [70] y Hall, B. [22] nos hablan de que más del 90% de mercurio contenido en un pescado se encuentra como la especie metil-mercurio. Sin embargo, para poder determinar cuál es el porcentaje de metil-mercurio con respecto a la especie de pescado se requiere de un estudio más amplio.

8. Conclusiones.

En el presente estudio, se realizaron pruebas iniciales del método analítico para la cuantificación simultánea de Hg y [Me-Hg]⁺ en pescado, se establecieron parámetros como el intervalo lineal, LDM, LCM, intervalo de trabajo, precisión (como repetibilidad) y exactitud (como % de recuperación). Hasta el momento, no existe ningún método normalizado (ni en la EPA, ni en ASTM, ni en otros métodos de referencia), que permita una comparación directa de los parámetros obtenidos. No obstante, se puede concluir que el LDM para estas pruebas iniciales, permite detectar concentraciones de (0.13 mg/kg de Hg y 0.05 mg/kg de [Me-Hg]⁺) y cuantificar concentraciones de (0.14 mg/kg de Hg y 0.06 mg/kg de [Me-Hg]⁺). El método desarrollado parece tener la capacidad de cuantificar simultáneamente y con una alta confiabilidad, bajas concentraciones de Hg y de [Me-Hg]⁺. Por otro lado, al considerar el LMP de metil-mercurio para pescados exhibido en la NOM-242-SSA1-2009 (1 mg/kg), cae en el punto medio de la curva, con lo cual, podemos concluir que la precisión (como % RSD) y la exactitud (% REC) del método desarrollado, es menor que el 6% y mayor que el 88%, respectivamente, lo cual concuerda con la mayoría de los métodos normalizados para la espectrometría de masas. Así mismo, en el presente trabajo, se probaron diversas condiciones instrumentales de trabajo y de preparación de muestras, obteniendo, las mejores condiciones analíticas, las cuales resultaron ser; en la digestión en microondas con 200 mg de muestra, una adición de 10 mL de disolución de extracción (5 mol/L de HCl y 0.25 mol/L de NaCl) con periodo de calentamiento durante 10 min a 60 °C, un tiempo de rampa de 3 min, mientras que las condiciones del HPLC son una fase móvil de 0.06 mol/L de acetato de amonio, una relación 30 - 70 de Metanol - agua y 0.1 % mercaptoetanol, a una temperatura de la columna de 30 °C, con 0.5 mL/min de flujo de la fase móvil y una inyección de 100 µL. Dichos resultados y observaciones, dan indicios de que el método para cuantificar simultáneamente mercurio y metil-mercurio mediante HPLC-ICP-MS es satisfactorio.

Lo más importante a subrayar, es que en esta tesis, se presentan los parámetros iniciales de una metodología capaz de identificar y cuantificar simultáneamente el mercurio y metil-mercurio en tejido de pescado, abriendo la posibilidad de que en un futuro, se pueda estimar confiablemente el riesgo a la salud asociado con el consumo de pescados y mariscos con alto contenido de mercurio, lo cual, nos lleva a la necesidad de en un futuro, plantear un estudio más amplio en donde se realice un inventario de las concentraciones de Hg y [Me-Hg]⁺ en los pescados y mariscos de mayor consumo en el territorio mexicano, y con dichas concentraciones, estimar el riesgo a la salud por exposición a metil-mercurio derivado del consumo de productos del mar en México.

9. Bibliografía

1. Skoog, D.A. ,West, D. M & Holler, F. J. (1997). Fundamentos de química analítica (Vol.2). Reverté.
2. Thermo fisher Scientific. 07 de junio de 2019. APA style. Recuperado de <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/IQLAAAGABHFAPBMBFC>.
3. García de Marina Bayo, Adrián y Yusá Marco, D. J. (2016) HPLC instrumental. Colección Académica. Editorial UPV.
4. Scientific, T. (2012.) iCAP Q Operating Manual. Revision B–1288090. Luettu.
5. Callejas, Francisco Rojo. (2018) CROMATOGRAFÍA. Recuperado de http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Conceptos_cromatografia_19973.pdf.
6. Morillas, P. P., Terra, A. I., Uribe, C., Manstrmonaco, G., Prieto, J. L., & Torres, M (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos-Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados: Eurolab España. 2nd ed.
7. Universidad de Granada, 19 de agosto de 2018. Recuperado de <http://www.fciencias.ugr.es>.
8. Metrohm Siam. 05 de noviembre de 2018. Recuperado de http://www.metrohmsiam.com/petrochemist/MetrohmSiam_PETROCHEMIST_08.html.
9. Químicos, P. P. (2005). Evaluación mundial sobre el mercurio. Programa Interorganismos para la Gestión Racional de las Substancias Químicas (IOMC). Ginebra, Suiza.
10. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca. 2018. Recuperado de http://www.campomexicano.gob.mx/raw_pesca_gobmx/seccionar.php.
11. Ministerio de medio ambiente, Gobierno de Japón. (2013) Enseñanzas de la enfermedad de Minamata y el manejo del mercurio en Japón. Tokio, Japón : División

de la salud y seguridad medioambiental Recuperado de https://www.env.go.jp/chemi/tmms/pr-m/mat01/es_full.pdf.

12. Loredó, J., Ordóñez, A., Gallego, J. R., Baldo, C., & García-Iglesias, J. (1999). Geochemical characterisation of mercury mining spoil heaps in the area of Mieres (Asturias, northern Spain). *Journal of Geochemical Exploration*, 67(1-3), 377-390.

13. Sulca López, M. A., & Alvarado Iparraguirre, D. E. (2018). Asociación de la resistencia al mercurio con la resistencia a antibióticos en *Escherichia coli* aislados del litoral de Lima, Perú. *Revista peruana de biología*, 25(4), 445-452.

14. Jiménez Gómez, A. M. Interacción del mercurio con los componentes de las aguas residuales (Tesis doctoral, Universidad Nacional de Colombia-Sede Manizales).

15. GARNICA, IBT. Daniela estefania Valladolid. (2016) "Transferencia trófica de selenio y mercurio en depredadores pelagicos mayores del sureste del golfo de california" . Ciudad de México : Universidad Nacional AUTÓNOMA DE México.

16. Langford, N. J., & Ferner, R. E. (1999). Toxicity of mercury. *Journal of human hypertension*, 13(10), 651. Recuperado de <https://www.nature.com/articles/1000896>

17. Samdaya, & Laborales, s. p. r. (2001). Toxicología del mercurio. Actuaciones preventivas en sanidad laboral y ambiental. Recuperado de [https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/35008763/espanol.pdf?response-content-](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/35008763/espanol.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3D%20TOXICOLOGIA_DEL_MERCURIO._ACTUACIONES_PR.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20190721%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20190721T045920Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=7d0ae8019833a16775839f07373772f8aaf7c94716489f391d7412c202a6d005)

[disposition=inline%3B%20filename%3D%20TOXICOLOGIA_DEL_MERCURIO._ACTUACIONES_PR.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20190721%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20190721T045920Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=7d0ae8019833a16775839f07373772f8aaf7c94716489f391d7412c202a6d005](https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/35008763/espanol.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3D%20TOXICOLOGIA_DEL_MERCURIO._ACTUACIONES_PR.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20190721%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20190721T045920Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=7d0ae8019833a16775839f07373772f8aaf7c94716489f391d7412c202a6d005).

18. Convenio De Minamata Sobre EL Mercurio (4 de MARZO de 2017). APA style. Recuperado de

<http://www.mercuryconvention.org/Convenio/Texto/tabid/5690/language/es-CO/Default.aspx>.

19. Cruz, Eric Ferad. Convenio de minamata y regulación de mercurio en México. , 2017. (Tesis Licenciatura) Ciudad de México, Instituto Politecnico Nacional.

20. European Commission. (2006). Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. Off J Eur Union, 364(365–324). Recuperado de <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1881/oj>. 9.

21. Nakagawa, R., Yumita, Y., & Hiromoto, M. (1997). Total mercury intake from fish and shellfish by Japanese people. *Chemosphere*, 35[12], 2909-2913. doi:10.1016/S0045-6535(97)00351-2

22. Hall, B. D., Bodaly, R. A., Fudge, R. J. P., Rudd, J. W. M., & Rosenberg, D. M. (1997). Food as the dominant pathway of methylmercury uptake by fish. *Water, Air, and Soil Pollution*, 100(1-2), 13-24.

23. Sanchez, Mario Aguilar. fiacui.com (03 de septiembre de 2019.) APA style. Recuperado de <https://fiacui.com/2017/Tilapia/Jueves%2028%20sep/Copia%20de%2005%20Situacion%CC%81n%20actual%20de%20la%20acuicultura%20en%20Me%CC%81xico%20COMISIONADO%20MARIO%20AGUILAR%20SANCHEZ%20CONAPESCA.pdf>.

24. LA, C. A., LA, A. Y., & TODOS, N. P. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. ROMA: FAO. Pag 11. Recuperado de <http://naval582.com/pesca/pdf/informe.pesca.fao.pdf>

25. Servicio de Informacion Agroalimentaria y Pesquera. Pagina oficial del gobierno de México. 03 de julio de 2019. Pagina oficial del gobierno de México. Recuperado de http://www.campomexicano.gob.mx/raw_pesca_gobmx/seccionar.php.

26. de Grosbois, S. B. (2013). Informe resumido sobre contenido de mercurio en tejidos de peces de México.

27. Quevauviller, P., Filippelli, M., & Horvat, M. (2000). Method performance evaluation for methylmercury determination in fish and sediment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(2-3), 157-166. DOI: 10.1016/S0165-9936(99)00202-2
28. Li, W., & Wang, W. X. (2019). Inter-species differences of total mercury and methylmercury in farmed fish in Southern China: Does feed matter?. *Science of The Total Environment*, 651, 1857-1866. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.10.095
29. Taylor, V. F., Buckman, K. L., Seelen, E. A., Mazrui, N. M., Balcom, P. H., Mason, R. P., & Chen, C. Y. (2019). Organic carbon content drives methylmercury levels in the water column and in estuarine food webs across latitudes in the Northeast United States. *Environmental pollution*, 246, 639-649. DOI: doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.064
30. Liu, M., Lu, X., Khan, A., Ling, Z., Wang, P., Tang, Y., ... & Li, X. (2019). Reducing methylmercury accumulation in fish using *Escherichia coli* with surface-displayed methylmercury-binding peptides. *Journal of hazardous materials*, 367, 35-42. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2018.12.058
31. Denmark, I. S., Begu, E., Arslan, Z., Han, F. X., Seiter-Moser, J. M., & Pierce, E. M. (2018). Removal of inorganic mercury by selective extraction and coprecipitation for determination of methylmercury in mercury-contaminated soils by chemical vapor generation inductively coupled plasma mass spectrometry (CVG-ICP-MS). *Analytica chimica acta*, 1041, 68-77. DOI: 10.1016/j.aca.2018.08.049
32. Seixas, T. G., Moreira, I., Siciliano, S., Malm, O., & Kehrig, H. A. (2014). Differences in methylmercury and inorganic mercury biomagnification in a tropical marine food web. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 92(3), 274-278. DOI: 10.1007/s00128-014-1208-7
33. Bosch, A. C., Sigge, G. O., Kerwath, S. E., Cawthorn, D. M., & Hoffman, L. C. (2013). The effects of gender, size and life-cycle stage on the chemical composition of smoothhound shark (*Mustelus mustelus*) meat. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(10), 2384-2392. DOI: 10.1002/jsfa.6100

34. Torres-Escribano, S., Vélez, D., & Montoro, R. (2010). Mercury and methylmercury bioaccessibility in swordfish. *Food Additives and Contaminants*, 27(3), 327-337. DOI: 10.1080/19440040903365272
35. Ruelas-Inzunza, J., Šlejkovec, Z., Mazej, D., Fajon, V., Horvat, M., & Ramos-Osuna, M. (2018). Bioaccumulation of As, Hg, and Se in tunas *Thunnus albacares* and *Katsuwonus pelamis* from the Eastern Pacific: tissue distribution and As speciation. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(20), 19499-19509. DOI: 10.1007/s1135
36. Delgado-Alvarez, C. G., Frías-Espericueta, M. G., Ruelas-Inzunza, J., Becerra-Álvarez, M. J., Osuna-Martínez, C. C., Aguilar-Juárez, M., ... & Voltolina, D. (2017). Total mercury in muscles and liver of *Mugil* spp. from three coastal lagoons of NW Mexico: concentrations and risk assessment. *Environmental monitoring and assessment*, 189(7), 312. DOI: 10.1007/s1066
37. Susana, Romero García Aida. (08 de noviembre de 2018.) APA style. Recuperado de <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf>.
38. Calderón, Rosendo Basabe. (2004) Diseño de un metodo para identificar y cuantificar cocaína en sangre, por HPLC/MS (Tesis). Ciudad de México : Universidad Nacional Autónoma de México.
39. Encarnacion, Javier Eduardo Canales. (2018). Evaluacion de As, Cd, Hg y Pb en placenta y cordón umbilical por medio de Espectrometria de masa con plasma acoplado inductivo (ICP-MS). (Tesis) Ciudad de México : Universidad Nacional autónoma de México.
40. COFEPRIS. (2017) Criterios para la validación interna y confirmación de métodos fisicoquímicos. CDMX. Recuperado de <https://www.gob.mx/cofepris/documentos/criterios-de-aplicacion>
41. Reyes, L. H., Rahman, G. M., & Kingston, H. S. (2009). Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues. *Analytica Chimica Acta*, 631[2], 121-128. DOI:10.1016/j.aca.2008.10.044

42. Canales, Javier Eduardo. (2018). Evaluación de As, Cd, Hg, y Pb en placenta y cordón umbilical por medio de espectrometría de masas con plasma por acoplamiento inductivo (ICP-MS). (Tesis). Ciudad de México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2018.
43. V.G.Beoletto, M.de las Mercedes Oliva, J.M.Marioli, M.E.Carezzano, M.S. (2016). Antibiotic Resistance, Mechanisms and New Antimicrobial Approaches, Chapter 14 - Antimicrobial Natural Products Against Bacterial Biofilms. págs. 291-307.
44. Guzmán Mar, J. L., Hinojosa Reyes, L., Ruiz, R., Joscan, E., Hernández Ramírez, M. A., & Cerdà Martín, V. (2013). Especiación de mercurio en vacunas pediátricas mediante cromatografía multijeringa acoplada a espectroscopia de fluorescencia atómica. *Química Hoy*, 3(2), 22-28. Recuperado de <http://eprints.uanl.mx/id/eprint/3506>
45. ICH, International Conference Harmonization. (2009). validation of analytical methods for pharmaceutical analisis. Yokohama, Japón : OONA McPOLIN.
46. OCHIAI, E. (1985) QUIMICA BIOINORGANICA, REVERTE, págs. 12-309.. págs. 12-309.
47. SAGARPA. SAGARPA. (06 de Octubre de 2018.) Recuperado de <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/mexico-alcanza-meta-en-consumo-de-pescados-y-mariscos>.
48. PROFECO. PROFECO. (18 de Octubre de 2018) Recuperado de <https://www.profeco.gob.mx/encuesta/mirador/2010/cuaresma%20pescados2010.pdf>
49. Cano, S. E. (2012). Contaminación con mercurio por la actividad minera. *Biomédica*, 32(3). Recuperado de <https://www.redalyc.org/pdf/843/84324092001.pdf>
50. Marín, Berenice González. (2018). Efectos del mercurio sobre la vía de señalización WNT en ovarios adultos de *Drosophila melanogaster*. (Tesis) Ciudad de México : Universidad Nacional Autónoma de México.

51. A.M.A, Asociacion Madrileña de Ataxias. (19 de Marzo de 2019) APA style. Recuperado de <http://www.atamad.org/index.php/que-es-la-ataxia.html>.
52. Molina, A. (2012) GUÍA DE EVALUACIÓN DE IMPACTO AMBIENTAL, Servicio de Evaluación Ambiental, pág. 43.
53. Unión de Científicos Comprometidos con la Sociedad (UCCS). (2013). Preocupación actual por la exposición ambiental a mercurio y sus derivados. *Ciencias* 107-108, julio 2012-febrero 2013, 62-64
54. Acevedo-Merino, A., Garrido-Pérez, C., Nebot-Sanz, E., & Sales-Márquez, D. (2005). Fenómenos de dilución y autodepuración de un vertido de aguas residuales urbanas en un ecosistema litoral: el caso del estuario del Río Iro (Suroeste de España). *Ciencias marinas*, 31(1B), 221-230. Recuperado de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-38802005000200009,
55. Cantoral, A., Batis, C., & Basu, N. (2017). National estimation of seafood consumption in Mexico: Implications for exposure to methylmercury and polyunsaturated fatty acids. *Chemosphere*, 174, 289-296. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.01.109
56. Coates, D. (2002). Inland capture fishery statistics of Southeast Asia: current status and information needs. RAP publication, 11, 114.
57. PROYECTO DE NORMA MEXICANA PROY-NMX-AA-131/1-SCFI-2008. Recuperado de <http://legismex.mty.itesm.mx/normas/AA/proy0909/proy-nmx-aa-131-1-scfi08.pdf>
58. Administration, US Food and Drug. (2018) Guide to inspections of lyophilization of parenterals. Inspection Guide.
59. Rodríguez Fernández, R. Uso de polímeros de impronta molecular para la simplificación del análisis de mercurio total y metil-mercurio.
60. gbcbiotech. (06 de agosto de 2018). Recuperado de http://www.gbcbiotech.com/genomicaypesca/pesca_en_mexico.html.

61. INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2010) El sector alimentario en México 2010. Aguas Calientes, Ags. México. Recuperado de http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/integracion/sociodemografico/SAM/2010/sam2010.pdf
62. NORMA Oficial Mexicana de Salud NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. CIUDAD DE MÉXICO : Diario oficial. De 17 de Febrero del 2019 Recuperado de <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4295/salud2a/salud2a.htm>
63. Díaz Zamora, R. (2017). Ventajas y desventajas del análisis por ICP-MS de metales pesados en muestras biológicas. Recuperado de <https://repositorio.ins.gob.pe/handle/INS/1011>
64. Zamora-Arellano, N. Y., Betancourt-Lozano, M., Ilizaliturri-Hernández, C., García-Hernández, J., Jara-Marini, M., Chávez-Sánchez, C., & Ruelas-Inzunza, J. R. (2018). Mercury Levels and Risk Implications Through Fish Consumption on the Sinaloa Coasts (Gulf of California, Northwest Mexico). *Risk Analysis*, 38(12), 2646-2658. DOI: 10.1111/risa.13185
65. Marsh, D. O., Myers, G. J., Clarkson, T. W., Amin-Zaki, L., Tikriti, S., & Majeed, M. A. (1980). Fetal methylmercury poisoning: clinical and toxicological data on 29 cases. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 7(4), 348-353. DOI: 10.1002/ana.410070412
66. Ñauñay, L., & Pablo, J. (2018). Evaluación de la actividad biosorbente de la cáscara de naranja y espiga de arroz para la remoción de mercurio inorgánico en disolución acuosa (Tesis de Licenciatura, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo).
67. Lennett, D., & Gutierrez, R. (2015). Convenio de Minamata sobre el mercurio: Manual de ratificación y aplicación.

68. Alavez, M. V. (2009). Indicadores de estrés oxidativo relacionados con la presencia de elementos traza (plomo, cadmio, mercurio y arsénico), en diferentes tejidos de tiburón mako (*isurus oxyrinchus*).
69. J. C. Miller, J. N. 2010, Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, 6th ed., Pearson, Harlow, ISBN 978-0-273730422.
70. González-Estecha, M., Bodas-Pinedo, A., Guillén-Pérez, J. J., Rubio-Herrera, M. Á., Martínez-Álvarez, J. R., Herráiz-Martínez, M. Á., ... & Martínez-Astorquiza, T. (2014). Documento de consenso sobre la prevención de la exposición al metilmercurio en España. *Nutrición Clínica y Dietética Hospitalaria*, 34(3), 105-123.
71. EPA. (2014). Method SW 6020b: Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.

APENDICE A

Glosario de términos

Mercurio elemental: mercurio en su estado basal.

Mercurio orgánico: compuestos derivados del mercurio que están coordinados con alguna molécula orgánica.

Mercurio total: Mercurio contenido en una matriz sin importar si es orgánica o inorgánica.

Curva de calibración: Una curva de calibración es la representación gráfica de una señal que se mide en función de la concentración de un analito

Analito: Es nuestro objetivo de análisis.

Matriz: la matriz es todo aquello que no es analito dentro de nuestra muestra.

Blanco de método: Es una matriz libre de analito en la cual se añaden todos los reactivos en los mismos volúmenes y proporciones como son usados en el procesamiento de la muestra. El blanco de método se lleva a través de todo el procedimiento de preparación de muestra y analítico. Se usa para documentar la contaminación resultante del proceso analítico, para que sea aceptable para su uso, la concentración de cualquier analito de interés no debe ser mayor que el más alto que el límite de detección del método o mayor al 5% del límite regulatorio para determinado fin (según la norma correspondiente) para el analito correspondiente.

Blanco adicionado: Es una matriz libre de analito y de naturaleza similar a las muestras a las que se aplicará el método, que se adiciona con una concentración conocida de los analitos de interés y se procesa y analiza a través de todo el método igual que una muestra real. Se usa para evaluar el desempeño del método.

Material de referencia certificado:

Muestra adicionada: Una muestra elegida del lote analítico a la que se le aplicará el método, que se adiciona con una concentración conocida de los analitos de interés, se procesa y analiza a través de todo el método igual que una muestra independiente.

Muestra adicionada duplicada: cada lote analítico: Duplicado de la muestra adicionada elegida del lote analítico a la que se le aplicará el método, que se adiciona con una concentración conocida de los analitos de interés, se procesa y analiza a través de todo el método igual que una muestra independiente.

Agua tipo 1: 18,2 MΩ.cm (a 25° C) y un TOC inferior a 5 µg/Kg proveniente de un equipo Merk MQ

Plasma: partículas colisionando que generan Ar⁺ y alta densidad de electrones a alta temperatura (de 6000 a 10000 K).

APENDICE B

Sustancias

- HCl
Grado: Ultrex
marca JT Baker
Lt: E09787
- HNO₃
Grado: Ultrex
marca JT Baker
Lt: 0000118837
- Estándar de Hg
Marca: High purity
concentración: 10.023± 0.57µg/mL
Lt. K2HG02142
- Estándar de Au
Marca: High purity
concentración: 10000 µg/mL
Lt. 162736
- NaCl Analizer
Marca: JT Baker
Lt: 32314
- Cloruro de metil-mercurio (II)
Marca: ALDRICH
Lt. 12611BJ
- Acetato de amonio
Marca: J.T. baker
Grado: HPLC
Lt: 0000018739

- Metanol
 Marca: Honeywell Burdick and Jackson
 Grado: HPLC/GC
 Cat. No. 230-4
- Mercaptoetanol $\leq 99.0\%$
 Lt. 12328HH
- **Equipos**
- ***Sistema de purificación de agua***
 Características: Caudal 2 L/min
 Marca: Merk
 Modelo: Milli-Q® Reference
- ***Liofilizadora de mesa.***
 Características: 2.5 LT, 115V.
 Marca: THOMAS SCIENTIFIC.
 Modelo: TS5118R08.
- ***Baño ultrasónico aquasonic***
 Marca: VWR scientific
 Modelo: P250HT
- ***Sistema de reacción de microondas***
 Marca: Anton Para
 Modelo: multiwave 3000.
- **Equipo ICP-MS**
 Marca: Thermo Scientific
 Modelo: iCAP Q
- **Equipo ICP-MS**
 Marca: Agilent Technologies 7500
 Modelo: G3272A
 Serie: JP14101090
- ***Balanza analítica calibrada***
 Marca: Adams
 Modelo: AE438448

INECC

Bitácora de referencia: BE/LCROM/11/06

- ***Balanza analítica calibrada***

Marca: Mettler Toledo

Modelo: AB135-S

IGL-LAGEMI

Apéndice C

Cálculos de para la comparación de 2 medias experimentales

Tabla 18 información para el cálculo de la comparación

		Bagre	Barracuda	Jurel
IGL	\bar{X}	1.72	0.62	1.64
	σ	0.14	0.23	0.36
	n	4	4	4
INECC	\bar{X}	1.92	0.73	2.32
	σ	0.094	0.047	0.34
	n	3	3	3
HPLC	\bar{X}	2.25	0.83	2.36
	σ	0.04	0.02	0
	n	2	2	1

Tabla 19 Datos de significancia para la cuantificación de Hg total en ICP-MS entre el Instituto de Geología (IGL) mediante digestión y el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC) extracción.

$\alpha= 0.05$	Bagre	Barracuda	Jurel
t_{el}	2.12	0.78	2.53
S	0.12	0.18	0.35
Grados de libertad	5	5	5
t_c	2.57	2.57	2.57
Decisión	$t_{el} < t_c$	$t_{el} < t_c$	$t_{el} < t_c$
¿Es significativa la diferencia?	No	No	No

Tabla 20 Datos de significancia para la cuantificación de Hg total entre la digestión y análisis en ICP-MS en el Instituto de Geología (IGL) y la extracción y análisis en HPLC-ICP-MS en el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC).

	Parámetros	Bagre	Barracuda	Jurel	
INECC (ICP-MS)- INECC (HPLC-ICP-MS)	t_{el}	4.51	2.73	0.10	
	Grados de libertad	3	3	2	
	$\alpha=0.05$	t_c	3.18	3.18	4.3
		Comparación	$t_{el} > t$	$t_{el} < t$	$t_{el} < t$
		¿Es significativa la diferencia?	Si	No	No
	$\alpha=0.02$	t_c	4.54	4.54	6.96
		Comparación	$t_{el} < t$	$t_{el} < t$	$t_{el} < t$
		¿Es significativa la diferencia?	No	No	No

Tabla 21 Datos de significancia para los datos de Hg total entre la extracción ICP-MS y HPLC-ICP-MS en el Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC).

$\alpha= 0.05$	Bagre	Barracuda	Jurel
t_{el}	4.51	2.73	0.10
s	0.08	0.04	0.34
Grados de libertad	3.00	3.00	2.00
t_c	3.18	3.18	4.3
Decisión	$t_{el} > t_c$	$t_{el} < t_c$	$t_{el} < t_c$
¿Es significativa la diferencia?	Si	No	No

Ejemplo de cálculo de Bagre

Ecuaciones usadas

$$t_e = \frac{(x_1 - x_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)\sigma_1 + (n_2 - 1)\sigma_2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Donde

t_e : La t_e es la t calculada a través de resultados

n : Es el número de valores para obtener el promedio.

σ : Es la desviación estándar

x : Promedio

para obtener los datos de la tabla 18 y tomando los datos de la tabla 17:

Calculamos la t experimental

$$t_e = \frac{(1.72 - 1.92)}{0.12 \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{4}}} = 2.11$$

$$s = \sqrt{\frac{(4 - 1)0.14 + (3 - 1)0.094}{4 + 3 - 2}} = 0.12$$

Grados de libertad $4 + 3 - 2 = 5$

Calculamos la t_c de la figura 29 t_5 a $\alpha = 0.05$ es 2.57 y como $2.11 < 2.57$ se rechaza la hipótesis es significativa la diferencia de los promedios.

<i>Valor de t para un intervalo de confianza de</i>	<i>90%</i>	<i>95%</i>	<i>98%</i>	<i>99</i>
<i>Valor crítico de t para valores de P de número</i>	<i>0.10</i>	<i>0.05</i>	<i>0.02</i>	<i>0.01</i>
<i>de grados de libertad</i>				
1	6.31	12.71	31.82	63.00
2	2.92	4.30	6.96	9.86
3	2.35	3.18	4.54	5.84
4	2.13	2.78	3.75	4.77
5	2.02	2.57	3.36	4.40
6	1.94	2.45	3.14	3.71
7	1.89	2.36	3.00	3.50
8	1.86	2.31	2.90	3.36
9	1.83	2.26	2.82	3.25
10	1.81	2.23	2.76	3.17
12	1.78	2.18	2.68	3.05
14	1.76	2.14	2.62	2.97
16	1.75	2.12	2.58	2.92
18	1.73	2.10	2.55	2.88
20	1.72	2.09	2.53	2.86
30	1.70	2.04	2.46	2.75
50	1.68	2.01	2.40	2.68
∞	1.64	1.96	2.33	2.58

Figura 29 Distribución t fuente Miller [69]