



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología

Universidad Nacional Autónoma de México

Unidad Académica Mazatlán

UNAM
POSGRADO
Ciencias del Mar y
Limnología



**Determinación de mercurio orgánico en tejidos de aves y peces
de las costas de Sinaloa, México: implementación y validación
analítica**

T E S I S

que para obtener el grado académico de:
**Maestro en Ciencias
(Química Acuática)**

p r e s e n t a

JOSÉ ÁNGEL HERNÁNDEZ OSUNA

Directores de tesis:

**Dr. Federico Páez Osuna
Dr. Jorge Ricardo Ruelas Inzunza**

Comité tutorial:

**Dra. Ma. T. Leticia Rosales Hoz
Dra. Silvia Castillo Blum
Dr. Carlos R. Green Ruíz**



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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la oportunidad de vivir esta valiosa experiencia y por permitirme cumplir este anhelo que parecía ya improbable.

A mi entrañable familia por su amor, paciencia y comprensión (A mi esposa: Lupita, mis hijos: José Ángel, Jesús Alonso, Michel, Misael, Karen y mi maravillosa nieta Melissa).

A mis padres Ángel y Olivia por su amor, apoyo, por ser mi ejemplo de superación ante el tiempo y las adversidades.

A mis queridos hermanos Luís Alberto y Rocío por su amor y constante apoyo.

Al Dr. Federico Páez Osuna con gran afecto y admiración por sus enseñanzas, por ser guía fundamental en la elaboración de esta tesis y por su confianza.

A mi gran amigo, el Dr. Jorge Ruelas Inzunza, por su imprescindible apoyo y guía en la realización de este trabajo.

Al Dr. Carlos Green, a la Dra. Ma. T. Leticia Rosales y a la Dra. Silvia Castillo, por sus valiosas observaciones y aportaciones al presente trabajo.

A la DGEST por el apoyo financiero parcial, a través del proyecto “Diagnóstico y alternativa de la mitigación de contaminación por Cd, Cr, Hg y Pb, en dos sitios con actividad minera en el sur del estado de Sinaloa” (Clave 911.05-P).

Al Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología (CECYT), por su apoyo financiero parcial por medio del proyecto “niveles de metilmercurio en peces de interés comercial de las costas de Sinaloa (CECYT 2004)”.

A la DGETI y al CETIS 127 por las facilidades y el apoyo que me brindaron para la realización de este proyecto.

Al Q. Humberto Bojórquez Leyva por su valioso apoyo e instrucción en la realización de los análisis, en todo el trabajo de laboratorio y por su amistad.

A los M. en C. Sergio Rendón Rodríguez y Arturo Núñez Pasten por su colaboración en la recolección de peces.

A Maria Clara Ramírez Jáuregui por su importante colaboración en la obtención de material bibliográfico.

Al Lic. Pedro Allende Rosales por su apoyo en los servicios bibliotecarios que se requirieron.

Al Dr. Felipe Amezcua Martínez por su colaboración en la identificación de peces.

A Germán, Natalia, Magali y Chantal por todas las facilidades otorgadas para la realización de trámites administrativos y labor de gestoría.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Geoquímica y del Instituto: M en C. Fabiola Morales, Dra. Rosalía Alonso, Nydia, Korina, María Fernanda, David Enríque, Misael y Dulce.

A mis tíos, primos y sobrinos, en especial a Armando Romero y al Ingeniero Ernesto Hernández Rodríguez, por tener siempre palabras de aliento para conmigo.

A todos ellos, mi reconocimiento por siempre, ¡UN MILLON DE GRACIAS!

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Mercurio	1
1.2. Especiación del mercurio	6
1.3. Cuantificación de mercurio orgánico	7
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Estudios ambientales sobre de mercurio y metilmercurio en organismos marinos	10
2.2. Técnicas analíticas para especiación del mercurio en matrices ambientales	16
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo general	25
3.2. Objetivos particulares	25
4. HIPÓTESIS	26
5. METODOLOGÍA	27
5.1. Consideraciones sobre la implementación de la metodología	27
5.2. Limpieza de material y de medidas de seguridad	29
5.3. Reactivos, soluciones y material de referencia	29
5.4. Recolección, preservación y tratamiento de muestras	31
5.4.1. Aves	31
5.4.2. Peces	32
5.5. Instrumentación	32
5.6. Análisis de mercurio total	34
5.6.1. Digestión	34
5.6.2. Detección de mercurio total	34
5.7. Técnica para el análisis del mercurio orgánico	35
5.7.1. Esquema general de la técnica	35
5.7.2. Extracción	36
5.7.3. Intercambio iónico	36
5.7.4. Fotoxidación	37
5.7.5. Detección de mercurio orgánico	38
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
6.1. Determinación de la eficiencia de la resina en la columna	40
6.2. Optimización de la fotoxidación	40
6.3. Curvas de calibración de las soluciones estándar de MeHgCl y de las matrices analizadas por adición de estándares.	42

6.4. Cálculos de concentraciones de mercurio total y mercurio orgánico en los organismos estudiados	48
6.5. Concentraciones de mercurio orgánico y mercurio total en los organismos estudiados	51
6.6. Parámetros analíticos	54
6.6.1. Linealidad	54
6.6.2. Precisión y límite de detección	55
6.6.3. Validación de la técnica (Exactitud)	56
6.7. Análisis estadístico/Tratamiento de los datos	59
6.8. Confiabilidad y calidad analítica	62
6.9. Comparación de los niveles de mercurio orgánico en los organismos en relación a otros estudios	63
7. CONCLUSIONES	66
8. RECOMENDACIONES	69
9. LITERATURA CITADA	71

INDICE DE FIGURAS

Fig.1. El ciclo global del mercurio	4
Fig.2. Esquema general de la técnica analítica para la cuantificación de mercurio orgánico en tejidos biológicos	35
Fig.3. Descripción de las columnas de intercambio iónico	37
Fig.4. Cámara de irradiación de luz ultravioleta	38
Figura 5. Fotoxidación de Hg _{ORG} en extracto de tejido de <i>Lutjanus colorado</i> a una distancia de 30 cm de la fuente de luz	41
Figura 6. Fotoxidación de Hg _{ORG} en extracto de tejido de <i>Lutjanus colorado</i> a una distancia de 5-7 cm de la fuente de luz	42
Figura 7. Curva de calibración de las soluciones estándar de MeHgCl	43
Figura 8a. Curvas de calibración por adición de estándares de MeHgCl a extractos de músculo de las especies de peces estudiados.	45
Figura 8b. Curvas de calibración por adición de estándares de MeHgCl a extractos de músculo de las especies de peces estudiados.	46
Figura 9. Curvas de calibración por adición de estándares de MeHgCl a extractos de músculo de las especies de aves estudiadas.	47
Figura 10. Curva por adición de estándares del material de referencia certificado NIST-2977.	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios ambientales sobre mercurio total y mercurio orgánico	13
Tabla.2.Técnicas analíticas acopladas con detección específica para especiación de Hg	19
Tabla 3.Técnicas analíticas de especiación del mercurio, de esquemas de especiación y límites de detección	24
Tabla 4. Datos de las aves recolectadas	31
Tabla 5. Datos de los peces recolectados	33
Tabla 6. Concentraciones de mercurio orgánico y mercurio total en el tejido muscular de las aves y peces estudiadas.	53
Tabla 7. Porcentajes de mercurio orgánico en las aves y peces estudiadas	54
Tabla 8. Precisión y límite de detección para la cuantificación de HgORG en el tejido de <i>Phalacrocorax brasilianus</i> por curva directa.	56
Tabla 9. Porcentajes de recuperación de mercurio orgánico en el material de referencia	58
Tabla 10. Concentraciones de mercurio orgánico obtenidas mediante los experimentos de adición de estándares , con la desviación estándar y coeficientes de variación correspondientes	61
Tabla 11. Valores críticos, teóricos y experimentales de la prueba t-Student, para la prueba de hipótesis: comparación de dos medias.	62
Tabla 12. Niveles de mercurio orgánico encontrados en tejidos de peces pelágicos en las diferentes zonas geográficas.	65

Tabla : Abreviaturas

AAS	Espectrometría de absorción atómica
AES	Espectrometría de emisión atómica
AFS	Espectrometría de fluorescencia atómica
CE	Comunidad Europea
CGC-pyro-AFS	Cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de fluorescencia atómica vía pirolisis.
CRM	Materiales de referencia certificado
CV	Coeficiente de variación
CV-AAS	Espectrometría de absorción atómica con vapor frío
ET-AAS	Espectrometría de absorción atómica electrotérmica
FDA	Administración de Drogas y Alimentos
FPD	Detección fotométrica de flama
GC	Cromatografía de gases
GC-ECD	Cromatografía de gases acoplada a detección por captura de electrón
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IAEA	Agencia Internacional de Energía Atómica
ICP-MS	Espectrometría de masas de plasma inductivamente acoplado
LD	Límite de detección
MESL	Laboratorio de Estudios Ambientales Marinos
MIP-AES	Espectrometría de absorción atómica acoplada a plasma inducido por microondas
MS	Espectrometría de masas
NIST	Instituto Nacional de Pruebas de Estándares (por sus siglas en inglés).
NRCC	Consejo Nacional de Investigación de Canadá (por sus siglas en inglés)
SEMARNAT	Secretaría del medio ambiente y recursos naturales
UV	Ultravioleta

1. INTRODUCCION

1.1. Mercurio

Metales pesados es un término general y colectivo que se aplica al grupo de elementos que en la tabla periódica se identifica como metales y metaloides y que poseen una densidad superior a 5 g/cm^3 . Este término, aunque ambiguo, ha sido ampliamente utilizado para referirse a elementos como Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Pb, Ni y Zn, los cuales se asocian comúnmente con problemas de contaminación y de toxicidad (Páez Osuna, 1996). Entre los metales pesados, el mercurio (Hg) es uno de los contaminantes ambientales que representa un mayor peligro para los ambientes marinos (Storelli et al., 2002a; Palenzuela et al., 2004). Actualmente, a consecuencia de las actividades humanas, el mercurio es una de las principales amenazas de contaminación debido a que su concentración en el ambiente global se ha incrementado significativamente, alcanzando niveles potenciales de toxicidad (letal y subletal) en muchos organismos (Nriagu, 1990; Lindqvist et al., 1991; Sloss, 1995; Wagemann et al., 2000). Este elemento está involucrado en numerosos procesos industriales, lo que constituye el principal origen del mercurio en el agua (Palenzuela et al., 2004). La contaminación por mercurio, se ha convertido en un problema global debido a su presencia en fuentes naturales, antropogénicas y en los procesos de la cadena trófica (Syr-Song et al., 2004).

El mercurio es un elemento naturalmente presente en la corteza de la Tierra, en el agua y en la atmósfera, por lo que los organismos han estado expuestos a este elemento a través de su evolución en el planeta (Clarkson, 1994). El mercurio se extrae como sulfuro de mercurio (mineral de cinabrio). A lo largo de la historia, los yacimientos de cinabrio han sido la fuente mineral para la extracción comercial de mercurio metálico. La forma metálica se refina a partir del mineral de sulfuro de mercurio calentando el mineral a temperaturas superiores a los $540 \text{ }^\circ \text{C}$. De esta manera se vaporiza el mercurio contenido en el mineral, y luego se captan y enfrían los vapores para formar el mercurio metálico líquido (UNEP, 2002).

El mercurio está presente en el ambiente en varias formas físicas y químicas, dependiendo de las condiciones predominantes del medio. Las formas más

importantes del mercurio son: mercurio reducido o elemental (Hg^0), mercurio divalente u oxidado (Hg^{+2}), metilmercurio (CH_3Hg^+ representado más frecuentemente como MeHg), y mercurio particulado (Hg_p) (Lindqvist et al., 1991; Baeyens et al., 1996). Rara vez se le encuentra en su forma pura, como metal líquido; es más común en compuestos y sales inorgánicas. El mercurio puede enlazarse con otros compuestos como mercurio monovalente (Hg^{+1}) o divalente (Hg^{+2}). A partir del Hg^{+2} se pueden formar muchos compuestos orgánicos e inorgánicos de mercurio (Morel et al., 1998; Boening, 1999; UNEP, 2002).

Algunos de los compuestos inorgánicos del mercurio son: sulfuro de mercurio (HgS), óxido de mercurio (HgO) y cloruro de mercurio (HgCl_2). A estos compuestos también se les conoce como sales de mercurio. La mayoría de los compuestos inorgánicos de mercurio son polvos o cristales blancos, excepto el sulfuro de mercurio, que es rojo y se vuelve negro con la exposición a la luz. Algunas sales de mercurio (como el HgCl_2) son lo bastante volátiles para existir como gas atmosférico. Sin embargo, la solubilidad en agua y reactividad química de estos gases inorgánicos (o divalentes) de mercurio hacen que su depositación desde la atmósfera sea mucho más rápida, que la del mercurio elemental. Esto significa que la vida atmosférica de los gases de mercurio divalente es mucho más corta que la del gas de mercurio elemental (Munthe et al., 1991).

Debido a su elevada toxicidad y tendencia a bioacumularse, el mercurio es reconocido como un contaminante potencialmente peligroso en el ambiente marino. El principal sistema que afecta el mercurio en los seres humanos, es el sistema nervioso central y su exposición puede causar serios daños cerebrales, incluyendo alteraciones fisiológicas, disminución auditiva, pérdida de la vista, ataxia, pérdida del control motor y debilitamiento general. En casos severos de contaminación por mercurio pueden incluso provocar la muerte (Dixon y Jones, 1994).

El ciclo natural del mercurio es complejo (Burger y Gochfeld, 2000), e involucra su liberación de la corteza terrestre (rocas y minerales) mediante emisiones volcánicas

e intemperismo hacia la atmósfera y océanos. El mercurio elemental (Hg^0) es líquido a temperatura ambiente y también puede encontrarse en forma gaseosa. Las aguas naturales están generalmente sobresaturadas en Hg^0 en relación al aire con el cual están en contacto. El Hg^0 es poco reactivo, pero es problemático por su facilidad para transportarse en la atmósfera (Morel et al., 1998). En aguas oceánicas, después de formar un conjunto de especies químicas y presentar transformaciones biológicas, la mayor parte del Hg^{+2} se reduce a Hg^0 y regresa a la atmósfera; sólo una pequeña fracción se exporta permanentemente hacia los sedimentos (Mason et al., 1995). El regreso del mercurio desde la atmósfera a la superficie terrestre se realiza principalmente por precipitación húmeda como Hg^{+2} . La adsorción del mercurio en aerosoles tales como el hollín también promueve su depositación, especialmente donde los aerosoles son abundantes. En lagos, los principales mecanismos de pérdida de mercurio son la sedimentación y la emisión de gases. La importancia relativa de cada mecanismo no está aún claramente definida y parece estar en función de la concentración del mercurio reducible en el epilimnion. Procesos similares ocurren en los continentes (Morel et al., 1998).

El ciclo global del mercurio (Fig.1) puede ser fácilmente alterado debido a las emisiones producidas por las actividades antropogénicas (Fitzgerald y Mason, 1996; Carpi, 1997). El mercurio es un elemento que tiene varios usos, entre los que se pueden citar (Gutiérrez-Galindo, 1982): la fabricación de antisépticos, cloro, sosa cáustica y ácido sulfúrico; en la fabricación de dispositivos de medición (termómetros, barómetros, reóstatos, manómetros, etc.), de cloruro de polivinilo (PVC), de diferentes aparatos eléctricos (rectificadores, baterías, transistores, interruptores, lámparas fluorescentes, entre otros), en la extracción y purificación de metales y como catalizador. Otro uso es como constituyente de pinturas anticrustantes, pesticidas agrícolas, cementos, y en menor grado en el uso artesanal, odontológico (amalgamas y restauraciones dentales) y homeopático (Adams y Prince, 1976; Eisler, 1987; Burger, 1997; Páez-Osuna et al., 1993; Páez-Osuna et al., 1999; Moore, 2000; Uryu et al., 2001; González et al., 2002).

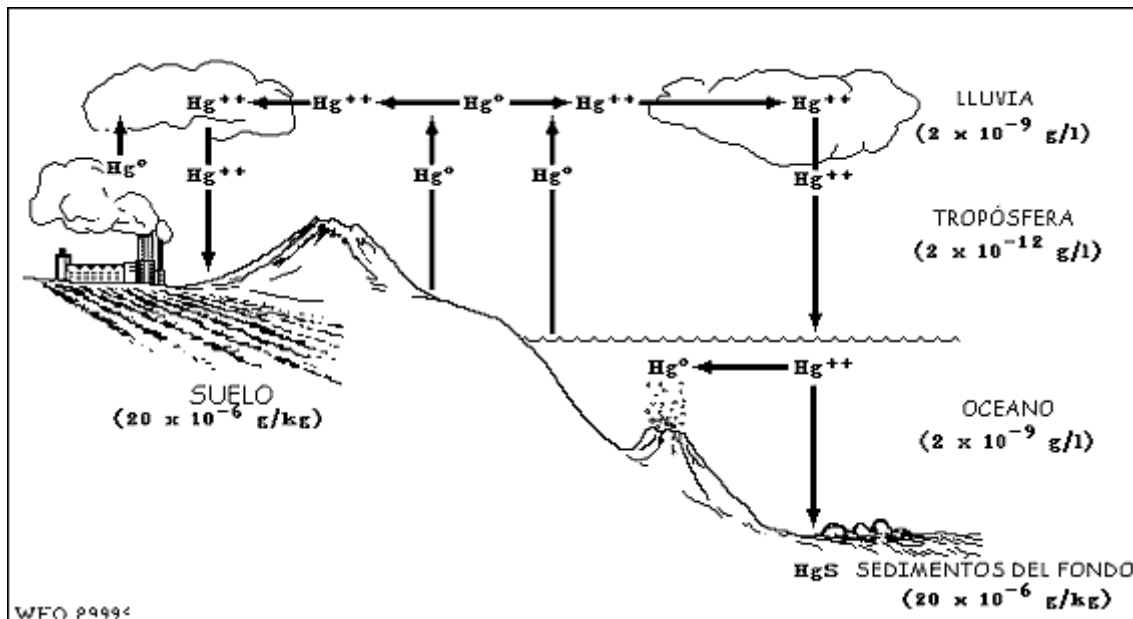


Figura 1. El ciclo global del mercurio. Los valores de las concentraciones fueron tomados de Lindqvist et al. (1984).

Debido a que el mercurio se oxida en forma relativamente lenta al estado de Hg^{+2} , su tiempo de residencia en la atmósfera es del orden de un año o menos. Este tiempo es suficiente para que el mercurio atmosférico se distribuya sobre todo el planeta antes de regresar a la tierra, lagos, océanos o a los polos. Por esta razón, mientras las emisiones de mercurio por actividades antropogénicas, son de fuentes puntuales concentradas en regiones industriales, la contaminación por este metal es realmente global, afectando las áreas más remotas del planeta. Con base a registros sedimentarios de lagos, se ha estimado que las entradas de mercurio a la atmósfera, se han triplicado en los últimos 150 años (Swain et al., 1992). Esto indica que dos terceras partes del mercurio que ahora se encuentra en la atmósfera y por lo tanto, en aguas oceánicas superficiales, es de origen antropogénico, y una tercera parte es de fuentes naturales (Morel et al., 1998).

A pesar de los esfuerzos por actualizar los inventarios, la exactitud de las estimaciones del balance global de mercurio, aun siguen dependiendo de inventarios de emisiones más recientes (MCS, 1999). La estimación global de

emisiones antropogénicas y naturales están cambiando conforme se reducen las emisiones y surge nueva información sobre emisiones naturales y recicladas. Algunas estimaciones generales sugieren que aproximadamente una mitad (2000 – 4000 toneladas por año) de las emisiones de mercurio global, son de actividades humanas y el resto (2200 – 4000 toneladas por año) son de fuentes naturales, las cuales pueden incluir el reciclado de mercurio antropogénico depositado en los océanos por emisiones en el pasado. (Mason et al., 1994, Pirrone et al., 1996; Porcella et al., 1996). Otras estimaciones globales de emisiones de mercurio antropogénico hacia la atmósfera sugieren que éstas varían desde 3600 a 4500 toneladas por año (Pacyna, 1987; Nriagu y Pacyna, 1989; Nriagu, 1990; Nriagu, 1993; Lindqvist et al., 1991; Baeyens et al., 1996; Bullock, 2000).

Cuando el mercurio se combina con carbono se forman compuestos conocidos como compuestos orgánicos del mercurio, alquilméricos u organomercuriales. Existe una gran cantidad de compuestos orgánicos de mercurio (como el dimetilmercurio, fenilmercurio, etilmercurio y metilmercurio), pero el más conocido de todos por su mayor relevancia ambiental es el metilmercurio (MeHg). Al igual que los compuestos inorgánicos, el metilmercurio y el fenilmercurio existen como sales (por ejemplo, cloruro de metilmercurio o acetato de fenilmercurio) (UNEP, 2002).

En los ambientes marinos, el mercurio existe en ambas formas: orgánica e inorgánica. El MeHg, es por mucho, el más tóxico de los compuestos orgánicos del mercurio que se encuentran comúnmente en la biota y el más común que generan los microorganismos y procesos naturales a partir de otras formas de mercurio. El MeHg es particularmente preocupante porque puede acumularse (bioacumulación y biomagnificación) en muchos peces de agua dulce y salada comestibles, así como en mamíferos marinos de consumo humano, en concentraciones de miles de veces mayores que las de las aguas circundantes (WHO/IPCS, 1990; US EPA, 1997). La mayor parte del mercurio liberado hacia los ambientes marinos es inorgánico (Hg^{+2}), pero puede convertirse a la forma de metilmercurio, por medio de la actividad bacteriana en los sedimentos (D'Itri, 1990). El metilmercurio que se forma entonces,

entra a los tejidos biológicos debido a su elevada afinidad por los lípidos. Como consecuencia de ello, el mercurio se acumula principalmente como metilmercurio en los organismos acuáticos con la consecuente amplificación del fenómeno a través de las cadenas tróficas (Storelli et al., 1998). El factor clave que determina la concentración de mercurio en la biota es la concentración de metilmercurio en el agua, la cual está controlada por la eficiencia relativa de los procesos de metilación y demetilación (Morel et al., 1998). La biomagnificación del metilmercurio en peces, se traduce en un incremento de sus niveles, del orden de 10^4 a 10^6 veces más que en el agua (USEPA, 1997).

La distribución del mercurio inorgánico y el MeHg en los tejidos de organismos es diferente entre otras razones, debido a que el mercurio inorgánico es insoluble en lípidos mientras que el MeHg es soluble. Los organismos marinos han mostrado diferentes proporciones de estas dos formas de mercurio, dependiendo de factores tales como, el nivel trófico, el tejido analizado, la talla y las habilidades de adaptación para transformar el mercurio orgánico a mercurio inorgánico (Thompson et al., 1990).

1. 2. Especiación del mercurio

La toxicología y el comportamiento ambiental del mercurio son muy complejos, puesto que su toxicidad, movilidad y bioacumulación dependen de su forma química (D'Itri, 1990). El análisis de las especies químicas del mercurio es por lo tanto, necesario en estudios ambientales ya que es un factor fundamental que influye en su comportamiento, movimiento y destino en los ecosistemas acuáticos (Sanz-Landaluze et al., 2004; Palenzuela et al., 2004). Como se ha mencionado, los principales grupos de especies de mercurio son el mercurio elemental, y sus formas orgánicas e inorgánicas. La especiación es el término que se suele emplear para representar la distribución de determinada cantidad de mercurio entre sus diversas formas químicas y físicas en matrices o compartimentos ambientales (UNEP, 2002). En el presente trabajo para referirse a la fracción inorgánica de mercurio, es decir, al conjunto de compuestos inorgánicos presentes de este metal en una matriz ambiental, se representará como

Hg⁺² y a la fracción orgánica, es decir, a todos aquellos compuestos organomercuriales se simbolizará como Hg_{ORG}.

El conocimiento actual de la transformación del mercurio, distribución y acumulación en los ambientes acuáticos, ha mejorado significativamente en años recientes debido al avance de las técnicas analíticas para la detección de especies de mercurio en matrices ambientales. Con las técnicas modernas ahora es posible medir niveles de picogramos (Liang et al., 1996), lo cual era imposible en la década de los ochentas. El desarrollo de métodos analíticos; el renovado interés por la investigación sobre el mercurio ambiental debido al hallazgo de elevados niveles de mercurio en peces de lagos no impactados de agua dulce en Estados Unidos, Canadá y Escandinavia (Stephens, 1995; Andersson et al., 2004) y el incremento de la contaminación por mercurio de la minería en los países desarrollados, ha hecho necesario, reevaluar los datos existentes sobre la biogeoquímica del mercurio (Ikingura y Akagi, 1999).

Para lograr una determinación analítica confiable de las dos especies ambientalmente relevantes del mercurio: Hg⁺² y MeHg, por lo general, existen cuatro etapas a considerar individualmente: (1) La extracción de las especies del mercurio;(2) la preconcentración de las especies del extracto obtenido; (3) la separación del mercurio inorgánico del metilmercurio y; (4) la detección de cada una de las especies. Hasta hoy, se han implementado diversas estrategias considerando estas cuatro etapas, a través de diferentes sucesiones de técnicas analíticas, dependiendo de estudios comparativos en cuanto a precisión, exactitud y confiabilidad de dichas estrategias, a los recursos y equipamiento de los laboratorios (Sánchez-Uría y Sanz-Medel, 1998; Leermarkers et al., 2005).

1.3. Cuantificación de mercurio orgánico

Se sabe que los compuestos organometálicos (v. gr. metilmercurio, compuestos de metilarsénico o tributilestaño) pueden ser degradados de muchas maneras, incluyendo la acción de microorganismos, oxidación o aún por radiación ultravioleta. Por esta razón, la preservación del MeHg en su forma original y su concentración

relativa puede convertirse en una tarea difícil, particularmente cuando se requiere la extracción desde un sólido; la muestra matriz puede jugar un papel importante en la estabilidad de las especies investigadas. Mientras que en el agua este proceso no representa problema alguno, en la biota o sedimentos, la extracción, es la etapa más crucial del diseño completo de la estrategia analítica de especiación (Sánchez-Uría; Sanz-Medel, 1998). La etapa de extracción, es hasta nuestros días, uno de los puntos mas controversiales en el análisis de metilmercurio en muestras ambientales sólidas (Sanz-Landaluze et al., 2004).

La mayoría de los métodos empleados para la determinación de compuestos organometálicos están basados en la extracción de muestras sólidas, la cual se realiza para transferir el analito desde una matriz compleja hacia una solución más simple, directamente o para un tratamiento posterior (v. gr. derivación o purificación), la cual puede analizarse por técnicas comunes (cromatografía de gas o líquida), seguida por varios tipos de detección tales como la espectrometría de absorción atómica (AAS), la detección fotométrica de flama (FPD) o la espectrometría de masas (MS). La extracción debe hacerse de tal manera que el analito se separe de la matriz interferente sin pérdidas, contaminación o cambio de la especie y con un mínimo de interferencias. Durante la extracción existen riesgos sobre pérdidas probables del analito (v. gr. degradación) o que la recuperación no sea cuantitativa. Una práctica común, es compensar estas pérdidas corrigiendo los resultados mediante un factor de recuperación para lograr una mejor aproximación al valor real en el material. Estos factores de corrección se establecen después de varios estudios de recuperación, los cuales son un componente esencial para la validación de técnicas basadas en la extracción (Quevauviller y Morabito, 2000; Sanz-Landaluze et al., 2003).

En el presente estudio se describe la implementación de una estrategia analítica confiable para la determinación de mercurio orgánico en matrices ambientales (músculo de aves y peces) obtenidas en las costas de Sinaloa; basada en un proceso de extracción ácida (con HCl); en la separación de la fracción inorgánica por intercambio iónico y en una detección del Hg_{ORG} previa fotoxidación del mismo, por

espectrofotometría de absorción atómica de vapor frío de Hg^0 (CV-AAS) (May et al., 1987; Horvat, 1991; Barregard et al., 1993; MESL, 1997). Se analizaron tejidos de músculo de diez especies comerciales de peces y de cinco especies de aves acuáticas con la finalidad de observar el desempeño de la estrategia analítica diseñada. La técnica se validó, utilizando material de referencia certificado; asimismo, se determinó el mercurio total de los mismos tejidos (MESL, 1997), con el fin de contrastar los valores obtenidos con las concentraciones de mercurio orgánico en cada tejido y comparar los resultados con otros estudios realizados.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudios ambientales sobre mercurio y metilmercurio en organismos marinos.

El análisis de la especiación del Hg en muestras ambientales ha sido objeto de gran interés durante las últimas cuatro décadas, debido a los desastres ocurridos por contaminación de este metal, ocasionando la muerte de cientos de personas y dejando a otras seriamente afectadas. La causa de estos desastres ha sido, principalmente, por la metilación natural del mercurio inorgánico en el ambiente y por el uso directo del metilmercurio en la industria y aplicaciones agrícolas (Sanz-Landaluze et al., 2004). Estudios de tales casos se han conocido en diferentes áreas en el mundo, pero particularmente los más numerosos han sido en Asia. El caso más ampliamente difundido fue el de los envenenamientos por metilmercurio en la Bahía de Minamata, Japón, en los años 50s, conocido como “la enfermedad de Minamata” (Tsubaki e Irukayama, 1977). El impacto tóxico del metilmercurio es ampliamente reconocido y se han realizado estudios extensos sobre este compuesto en los últimos diez años (Draeback, 1992).

Últimamente, se ha incrementado el consumo humano de especies de peces depredadores de elevado nivel trófico, como una fuente de proteínas en la dieta de la población en los Estados Unidos de América. En este contexto, casi el 90% de los riesgos relacionados con el consumo de pescado se debe a la contaminación por mercurio (Anderson et al., 2004). La FDA (Food and Drug Administration) de Estados Unidos de América, advierte que no es recomendable para mujeres embarazadas la ingesta frecuente de atún, tiburón ó pez espada, ya que por sus hábitos alimenticios y su ciclo de vida, acumulan más mercurio en su organismo, afectando no sólo a la madre sino también al feto (Anderson et al., 2004).

Debido a los riesgos antes citados, el mercurio y las formas de mercurio orgánico están incluidos en la lista negra de compuestos que se deben monitorear en el marco de las regulaciones nacionales e internacionales, tales como las normas de la Comunidad Europea (CE) (Quevauviller et al., 2000). Las agencias administrativas y de la salud, comienzan a sensibilizarse en relación a la contaminación por mercurio, lo cual

ha estimulado el desarrollo de métodos más sensibles, más exactos y precisos. Ahora que se están promoviendo nuevas legislaciones con la finalidad de establecer límites para la concentración de metilmercurio en diferentes muestras ambientales, la demanda de los análisis de rutina de estas especies se ha incrementado significativamente (Sanz-Landaluze et al., 2004).

La FDA de los Estados Unidos de América, ha establecido como valor límite para consumo humano de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ (peso húmedo) de MeHg en peces. Los peces cuyas concentraciones exceden este valor, se consideran de alto riesgo para consumo humano y no pueden ser comercializados entre los estados de este país. En Canadá y varios estados de los E.U.A. desarrollaron un programa de advertencias sobre el riesgo de consumo, estableciendo un límite de $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ (peso húmedo) de MeHg en peces (Anderson et al, 2004). La Organización Mundial de la Salud (WHO por sus siglas en Inglés) recomienda una ingesta en adultos, menor a 0.3 mg de mercurio total por persona por semana con no más de 0.2 mg de metilmercurio. La legislación de la Comunidad Europea a partir de mayo de 1993, fijó un valor límite de $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso húmedo en peces para mercurio total; excepto para especies de elevado nivel trófico, tales como tiburón, atún y pez espada, para los cuales se elevó el límite a $1 \mu\text{g g}^{-1}$, y a partir de abril de 2002 fijó un nivel máximo de mercurio total en moluscos bivalvos de $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso húmedo. Sin embargo, no se establecieron límites para metilmercurio y otras especies organometálicas de mercurio, posiblemente debido a la dificultad intrínseca de los procedimientos analíticos para determinar la especiación del mercurio. En Japón, los peces cuyos contenidos de mercurio total exceden los $0.4 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso húmedo, se consideran inapropiados para consumo humano (Storelli et al., 2002; Gómez-Ariza et al., 2004). En Taiwán, el nivel de MeHg de referencia se estableció en $2 \mu\text{g g}^{-1}$ para peces migratorios y $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ (peso húmedo) de MeHg para otros peces (Syr-Song et al., 2004).

En México, los estudios ambientales del mercurio y su especiación son escasos. La Comisión para la Cooperación Ambiental del Plan Regional de Norteamérica, informó sobre bases per capita, que las emisiones de mercurio para Canadá y Estados

Unidos son equivalentes (aproximadamente 0.6 g/per capita por año, en 1995), pero las emisiones en México no se han cuantificado y constituyen un reto significativo poder desarrollar un inventario nacional exacto para iniciar reducciones donde sea necesario. En México debería determinarse si es necesario el uso de alertas o avisos sobre los riesgos por consumo humano de peces, en cualquier zona del país (Pilgrim et al., 2000).

En la tabla 1 se resumen algunos estudios ambientales sobre mercurio total y metilmercurio, realizados en diversas especies de organismos marinos tanto en nuestro país, como en otras zonas geográficas. De esta tabla se pueden hacer las siguientes observaciones:

En los diversos ecosistemas costeros en México, los niveles encontrados de mercurio total, en invertebrados acuáticos, no rebasaron los límites establecidos por las legislaciones internacionales y la norma oficial mexicana NOM-027-1-SSA-1193, con la excepción del estudio realizado por Ruelas et al, (2003) sobre la almeja gigante *Vesycomyias Gigas*, debido probablemente a la exposición de elevadas concentraciones de metales pesados en su hábitat (ventilas hidrotermales en la cuenca de Guaymas). En peces de río no se encontraron niveles de Hg que rebasaran los límites establecidos por las legislaciones correspondientes, con la excepción de los peces de río en Brasil (Malm, 1998), la cual se sabe es una zona impactada por la minería. Los niveles de Hg encontrados en tejido de músculo de peces demersales y pelágicos de elevado nivel trófico, por lo general, fueron mayores que en los peces de estuarios y lagos. En las costas de Veracruz, Villanueva y Páez-Osuna (1996), encontraron niveles elevados de Hg en peces (*Baidiella ronchus*). Los intervalos de concentraciones de Hg encontrados en tejido de músculo de peces pelágicos como atunes, peces espada y peces de los diferentes ecosistemas estudiados, mostraron niveles similares, rebasando en algunos casos los límites de riesgo de consumo establecidos por las legislaciones de la FDA, la CE o la WHO. Los niveles de Hg en tejidos de músculo en mamíferos, también fueron similares. Las concentraciones de Hg determinadas en riñón e hígado, de estos peces, fueron muy elevadas respecto a los otros tejidos, con elevadas proporciones de

mercurio inorgánico, sin embargo los niveles de mercurio orgánico son bajos. Este dato refleja la existencia de procesos de demetilación en el hígado (Storelli et al., 1988

Tabla 1: Estudios ambientales sobre mercurio total y metilmercurio en diferentes organismos

Organismo	Tejido	[Hg] ^T ($\mu\text{g g}^{-1}$)	[MeHg]	zona geográfica	Referencia
Microalgas					
<i>Codium amplivesiculatum</i>		0.099 ± 0.006		Guaymas, México	Green Ruíz et al. (2005)
<i>Enteromorpha clathrata</i>		0.134 ± 0.039			
<i>Gracilaria subsecundata</i>		0.095 ± 0.030			
<i>Ulva lactuta</i>		0.059 ± 0.029			
Invertebrados acuáticos					
<i>Corbicula fluminea</i>	m	<1		Cerro Prieto, México	Gutierrez-Galindo et al.(1998)
<i>Chione subrugosa</i>	ts	0.063 ± 0.002		Guaymas, México	Green Ruíz et al. (2005)
<i>Crassostrea gigas</i>	ts	0.23			
<i>Vesycomya Gigas</i>	ts	4.96		Guaymas, México	Ruelas-Inzunza et al. (2003)
<i>Crassostrea virgínica</i>	ts	0.099		Tabasco, México	Villanueva y Páez Osuna, (1996)
<i>Callinectes rathbunae</i>	m	<1			
<i>Macrobrachium acanthurus</i>	m	<1			
<i>Farfantopenaeus aztecas</i>	m	<1			
<i>Litopenaeus setiferus</i>	m	<1			
<i>Farfantopenaeus brevirostris</i>	m	0.21±0.07		Altata-Ensenada	Ruelas-Inzunza et al. (2004)
<i>Farfantopenaeus californiensis</i>	m	0.13±0.08		del Pabellón, México	
<i>Litopenaeus stylirostris</i>	m	0.30±0.36			
<i>Litopenaeus vannamei</i>	m	0.20±0.01			
<i>Xiphopenaeus kroyeri</i>	m	0.13±0.04			
Peces					
Piscívoros*	m	2 - 6		Tapajos, Madeira y Negro (Ríos de Brasil)	Malm (1998)
<i>Tilapia mossambica</i>	m	<1		Cerro Prieto, México (Río Hardy)	Gutierrez-Galindo et al.(1998)
<i>Baidiella ronchus</i>	m	3.59		Veracruz, México	Villanueva y Páez Osuna (1996)
<i>Pogonias cromis</i>	m	<1		lago Indiana, USA. bahía de Florida,USA	Douglas y Graves (2002)
<i>Pomatomus saltatrix</i>					
<i>Sphyrna tiburo</i>					
<i>Caranx hipps</i>					
<i>Chelon Labrosus</i>	m	0.0086-0.091		Estuario Nerbioi-Ibaizabal España	Sanz-Landaluze et al. (2004)
<i>Clupea harengus</i>	m	0.076		Estuario Tyne, Inglaterra	Dixon y Jones (1998)
<i>Merlangius merlangus</i>	m	0.141			
<i>Raja clavata</i>	m	0.097			
<i>Pleuronectes plateas</i>	m	0.028			
<i>Limanda limanda</i>	m	0.105			

Tabla 1: Estudios ambientales sobre mercurio total y metilmercurio en diferentes organismos (Continuación)

Organismo	Tejido	[Hg] _T	[MeHg]	zona geográfica	Referencia
		(µg g ⁻¹)			
Peces					
<i>Galeichtys peruvians</i>	h	7		Altata-Ensenada	Ruelas-Inzunza y
<i>Lutjanus colorado</i>	v	6.5		del Pabellón, México	Páez Osuna (2005)
<i>Cynoscion xanthulus</i>	m,h,v	<0.8		Guaymas, México	
<i>Mugil cephalus</i>	m,h,v				
<i>Opisthonema libertate</i>	m,h,v				
<i>Cathorops fuerthii</i>	m,h,v				
<i>Seriola lalandi</i>	m,h,v				
<i>Mugil curema</i>	m	0.08 0.57		Estero de Urías, México Estero de Teacapán, México	Rodríguez-Preciado (2004)
<i>Nezumia aequalis</i>	m	3.91		Escocia	Mormede y Davies (2001)
<i>Lepidion seques</i>	m				
<i>Raja fyllae</i>	m				
<i>Hippoglossus hipoglossus</i>	m	0.1-0.9		Groenlandia	Joiris et al.(1997)
<i>Hoplostethus Atlanticus</i>	m	0.052		Costas de Arabia Saudita	Al-Saleh y Al-Doush (2002)
<i>Cherublemma emmelas</i>	m	0.49 - 0.91		Golfo de California	Monzalvo-Santos (2003)
<i>Zalieutes Eláter</i>		0.31 - 0.69			
<i>Mullus barbás</i>	m	0.49,	0.44	Mar Adriático	Storelli et al. (2005)
<i>Merluccius merluccius</i>	m	0.4, 0.18, 0.09,	0.4 0.16 0.09	Mar Jónico Mar Adriático Mar Jónico	
<i>Galeus melastomus</i>	h	0.84-1.45		Mar Mediterráneo	Storelli et al. (2002 ^a)
<i>Xiphias gladius</i>	m	0.4 - 2.21		Suroeste, Oceano Atlántico	Méndez et al. (2001)
<i>Carcharhinus leucas</i>	m	<0.3		Golfo de California	Ruelas-Inzunza y
<i>Sphyrna lewini</i>	m	4.84			Páez-Osuna (2005)
<i>Thunnus obessus</i>	m	0.09-0.39		costas de Hawaii	Boush y Thieleke (1983)
<i>Thunnus albacares</i>					
<i>Thunnus alalunga</i>	m	0.22		Mar Mediterráneo	Storelli et al. (2002 ^b)
<i>Thunnus thynnus</i>	m	0.58			
Mamíferos marinos					
<i>Stenella longirostris</i>	m	0.14-1.90		Golfo de California	Ruelas-Inzunza et al.(2000)
	r	1.56-10.2			
	h	20.1-105			

Tabla 1: Estudios ambientales sobre mercurio total y metilmercurio en diferentes organismos
(Continuación)

Organismo	Tejido	[Hg] _T	[MeHg]	zona geográfica	Referencia
		(µg g ⁻¹)			
Mamíferos marinos					
<i>Eschrichtius robustus</i>	m	0.145	0.109	Golfo de California	Ruelas-Inzunza et al. (2003a)
	r	0.277	0.051		
	h	0.185	0.042		
<i>Stenella longirostris</i>	m	1.274	0.946		
	r	6.959	0.528		
	h	6.122	1.004		
Anfibios					
<i>Stenella coeruleoalba</i>	m	0.07-0.43		Mar Adriático	Storelli et al. (1998)
<i>Caretta caretta</i>	h	0.37-1.1	0.24-0.33		
Aves					
<i>Bubulcus ibis</i>	hu	< 1		Faiyum, Egipto	Mullié et al. (1992)
<i>Haliaeetus vocifer</i>	h	66-395		Lago Kariba, Zimbabwe	Douthwaite (1992)
<i>Larus argentus</i>	hu	<1		Mar de Wadden Alemania	Lewis et al.(1993)
	p	<1			
	h	<1			
<i>Sterna</i> **	h	1.5		Nueva York	Burger y Gochfeld (1997)
<i>Rynchops</i> **	p	5 - 40			
<i>Egretta</i> **					
<i>Anas y Phasianus</i> **					
<i>Chloephaga hybrida</i>	p	0.11-0.13		costa de Chile	Ochoa-Acuña (2002)
<i>Tachyeres pteneres</i>					
<i>Phalacrocorax atriceps</i>					
<i>Ardea albus</i>	p	1.4 -8.6		Everglades, Florida, USA	Rumbold et al. (2002)
<i>Pelecanus occidentales</i>	v	2.65±0.84		Altata Ensenada	Arvizu-Merín (2003)
<i>Plegadis Chi</i>	p	1.65±0.84		Ensenada del Pabellón, México	
<i>Bubulcus ibis</i>	c	1.19±0.49			
<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	m	1.09 ±0.52			
<i>Ardea alba</i>		0.59± 0.21			
<i>Anas clypeata</i>	hu	2.89±1.85		costa de Sinaloa, México	Raygoza-Viera (2004)
<i>Anas crecca</i>	hu	1.77±1.04			
<i>Anas discors</i>	hu	2.13±8.57			
<i>Anas acuta</i>	hu	1.76±3.35			
<i>Anas americana</i>	hu	1.23±1.44			
<i>Aythya affinis</i>	hu	2.47±1.95			
<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	hu	4.05±214			
<i>Dendrocygna autumnalis</i>	p	0.29±0.26			
<i>Anas cyanoptera</i>	p	1.45±0.95			

m=músculo, h=hígado, r=ríñón, v=visceras, ts=tejido suave

hu=huevos, p=plumas, c=corazón

* No se especifican especies en el estudio, ** Género

; Ruelas-Inzunza et al., 2003a).

Ikingura y Akagi (1999), estudiaron mediante experimentos de control, la metilación del mercurio y su distribución entre el sedimento, agua y peces, utilizando sedimentos con concentraciones adicionadas de cloruro mercúrico a niveles de 1, 5 y 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ como mercurio. La producción máxima de metilmercurio en el sedimento sucedió durante la primera semana de incubación, alcanzando concentraciones de 0.0455 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco. Las condiciones de equilibrio se establecieron después de 3 a 4 semanas de agregar mercurio a los sedimentos. La distribución de metilmercurio en sedimento y agua produjo niveles de MeHg de 0.025 - 0.154 $\mu\text{g L}^{-1}$ en los peces del acuario y de 26 (10^{-5}) $\mu\text{g L}^{-1}$ en peces libres de control después de una semana de incubación. La concentración de equilibrio de metilmercurio con los sedimentos adicionados con mercurio inorgánico en un nivel de 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ fue 1.75 veces superior que en los sedimentos que contenían 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ de estándar de mercurio inorgánico en los peces de los acuarios. Sin embargo, no hubo diferencia significativa en los niveles de equilibrio de metilmercurio entre los sedimentos que contenían inicialmente 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ y 10 $\mu\text{g g}^{-1}$. Por lo tanto, el incremento de la concentración de mercurio no originó una mayor producción de metilmercurio en el sedimento, concluyendo los autores que esto se debió a la posibilidad de que varios tipos de microorganismos con diferentes tolerancias al mercurio inorgánico, estén involucrados en la metilación del mercurio en diversos ambientes, así como las características fisicoquímicas del sedimento, (granulometría, composición química o mineralógica).

2.2. Técnicas analíticas para la especiación del mercurio en muestras ambientales

No obstante que existen numerosas técnicas para efectuar determinaciones exactas de concentraciones de mercurio total en sedimento, agua y biota de estudios de campo y de laboratorio en la literatura (Driscoll et al., 1994; Wang y Driscoll, 1995), datos confiables de metilmercurio aún son escasos. La dificultad en el análisis de concentraciones extremadamente bajas de metilmercurio, especialmente en agua y las pobres recuperaciones de metilmercurio en sedimento y biota son las principales razones que limitan la disponibilidad de datos confiables. En estudios previos se han utilizado métodos radioquímicos para investigar la especiación y distribución del

mercurio en sistemas acuáticos (Kudo et al., 1977; Akagi et al., 1979). Otros investigadores han utilizado métodos analíticos basados en el procedimiento de Westoo (1968) y en el procedimiento de Magos (1971) que implican una definición operacional del mercurio orgánico e inorgánico (Syr-Song et al., 2004). El primero involucra la adición de HCl o H₂SO₄ a diferentes concentraciones a los tejidos biológicos, con la ayuda de calor; para la extracción del MeHg; posteriormente se aísla y se detecta mediante cromatografía de gases y detector de captura de electrones (GC-ECD); el método de Magos involucra la reducción selectiva del Hg inorgánico con el ion estanoso Sn⁺². El Hg_{ORG} se reduce por el ion Sn⁺² después de añadir Cd⁰ en una solución fuertemente alcalina, el cual rompe los fuertes enlaces covalentes entre el Hg y el carbono (C-Hg). El Hg⁰ que se forma se determina por CV-AAS. La concentración del Hg_{ORG} se obtiene como una diferencia del Hg total y el mercurio inorgánico. (Magos, 1971; Barregard et al., 1993). Este método de absorción atómica selectivo, ha encontrado una gran aceptación y se ha aplicado ampliamente por que no requiere instrumentación costosa y sofisticada (Jacobs y Keeney, 1974; Olson y Cooper, 1975; Shin y Krenkel: 1976; Bartlet et al., 1977, WHO, 1990). Sin embargo, en matrices difíciles y con bajos niveles de metilmercurio, este método es poco específico, y tiene límites de detección pobres y acondicionamientos tediosos de las columnas cromatográficas (Quevauviller et al., 2000). En la mayoría de estos estudios iniciales, no se determinaron eficiencias de extracción de metilmercurio ni se utilizaron materiales de referencia certificados. También, la presencia de compuestos orgánicos interferentes redujo la exactitud de los análisis de metilmercurio. Esto limitó la confiabilidad de los datos de producción y distribución de metilmercurio en los diversos compartimentos ambientales en los sistemas acuáticos (Ikingura y Akagi, 1999). La necesidad cada vez mayor de monitorear el metilmercurio en peces, ha propiciado el desarrollo de algunos métodos nuevos (Horvat, 1996; Ubillús, 2000; Slaets y Adams, 2000; Gómez-Ariza et al., 2004; Sanz-Landaluze et al., 2004; Palenzuela et al., 2004; Syr-Song et al., 2004).

Actualmente existen numerosas publicaciones relativas a la contaminación por Hg, que implican el uso de métodos analíticos para la determinación de mercurio total y

sus especies orgánicas e inorgánicas en muestras ambientales. El método de cromatografía de gases, generalmente se utiliza cuando hay necesidad de medir selectivamente MeHg u otras especies orgánicas del Hg. Se ha utilizado ampliamente para la medición de MeHg en tejidos de peces. Una aproximación alternativa es la separación del MeHg del mercurio inorgánico por volatilización (Zelenko y Kosta, 1973), intercambio iónico (May et al., 1987) o destilación (Horvat et al., 1988), y la estimación del MeHg por separado mediante métodos no selectivos (por ejemplo, la absorción atómica). Algunos ejemplos de trabajos de implementación y desarrollo de técnicas analíticas que se han aplicado en estudios de especiación del mercurio, son los que se continuación se describen:

May et al. (1987) propusieron un método relativamente rápido y sensible (límite de detección $0.002 \mu\text{g g}^{-1}$ de MeHg) que consiste en la separación del Hg inorgánico del MeHg mediante cromatografía de intercambio iónico y la determinación simultánea por CV-AAS de las dos especies. La eficiencia del proceso de separación del Hg inorgánico se validó por el análisis de efluentes (principalmente MeHg y otras formas orgánicas del Hg) de la columna de intercambio iónico, por el método de GC-ECD. Las especies orgánicas particulares de Hg, como el fenilmercurio, etilmercurio (EtHg), no pueden ser cuantificadas por este método desarrollado por los autores; la experiencia práctica, basada en los análisis de efluentes de la columna de intercambio iónico, mediante GC-ECD, mostró que el contenido de Hg_{ORG} en todas las muestras biológicas fue idéntico a sus niveles de MeHg.

Horvat (1991) utilizó varias técnicas de aislamiento (intercambio iónico, extracción, volatilización, destilación) para separar el mercurio inorgánico en materiales biológicos certificados de referencia, y posteriormente detectó el Hg orgánico total mediante CV-AAS y/o GC-ECD, para la determinación de MeHg y EtHg en caso de estar presente. Los resultados obtenidos mediante las diferentes aproximaciones mostraron una buena concordancia. La autora concluyó que la ventaja de la cromatografía de gases es que permite la determinación de diferentes compuestos orgánicos, como se demostró en los CRMs de la IAEA donde se detectaron tanto

MeHg como EtHg; en la medición indirecta por CV-AAS se obtienen valores de mercurio orgánico total.

Sánchez-Uría y Sanz-Medel (1998) realizaron una revisión de los métodos para la especiación del Hg en muestras ambientales, estableciendo algunas conclusiones tales como que: La especiación involucra cuatro etapas que se deben considerar individualmente: (1) La extracción de la especies del Hg de las matrices ambientales, asegurando su integridad; (2) la preconcentración de las especies para alcanzar una concentración que sea detectable; (3) la separación del Hg inorgánico y el MeHg sin afectar sus niveles relativos de concentración y (4) la detección individual de cada especie previamente separada. Las técnicas cromatográficas, son las herramientas más poderosas en la separación de especies, sin embargo, existen aproximaciones no cromatográficas que pueden ser exitosas para separar adecuadamente una o dos especies en una muestra dada.

En este documento, citado previamente, se resumen las técnicas más comúnmente utilizadas en secuencia, como una estrategia integral contemplando las cuatro etapas mencionadas para la especiación de mercurio en muestras ambientales (Tabla 2).

Tabla 2. Técnicas analíticas acopladas con detección específica, para especiación del mercurio (Sánchez-Uría y Sanz-Medel, 1998).

Pretratamiento	Preconcentración	Separación	Detección
-Homogenización	-Trampa criogénica	G.C.	CV-AAS
-Preservación ácida	-Columna Cromatográfica	HPLC	ET-AAS
-Extracción de especies	- Columnas no cromatográficas: Alúmina Algodón sulfhidrido Ditiocarbamato Ditiazona - Empaques de cartucho - Métodos electroquímicos	No cromatográficas	MIP-AES ICP-MS ECD Electroquímica AFS

Hintelman (1999) comparó tres técnicas diferentes de extracción (digestión alcalina, digestión ácida o destilación a presión atmosférica) utilizadas para el análisis de MeHg en varias matrices, y evaluó la formación accidental de MeHg en cada una de éstas, usando el método de dilución isotópica. En la mayoría de las técnicas probadas hubo producción de $\text{CH}_3^{200}\text{Hg}^+$ a partir de $^{200}\text{Hg}^{2+}$ añadido a materiales de referencia certificados. Solamente usando la mezcla $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{KBr}/\text{CuSO}_4$ para la extracción, no hubo formación accidental de MeHg.

Ubillús et al. (2000) estudiaron y optimizaron un método simple para medir contenidos tanto de mercurio orgánico como de mercurio inorgánico en peces, usando la espectrofotometría de absorción atómica con vapor en frío (CV-AAS), con una reducción secuencial de la muestra digerida con cloruro estanoso y tetrahidroborato de sodio. Antes de la detección, las muestras se sometieron a una digestión húmeda alcalina. Debido a las interferencias de matriz, fueron necesarias curvas de calibración por adiciones de estándares a la matriz, para la determinación de mercurio orgánico e inorgánico. Los parámetros analíticos fueron: linealidad desde 0.010 a 0.200 μg de Hg en el recipiente de la reducción; límite de detección: 0.125 a 0.183 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso húmedo de muestra de mercurio y metilmercurio respectivamente; exactitud fue del 90% y 108.9% para mercurio y metilmercurio respectivamente, utilizando como material de referencia el DORM-2-NRC-CNRC. De acuerdo con los autores, el método ofrece la ventaja de no requerir equipo especial para medir el mercurio inorgánico y el mercurio orgánico simultáneamente en una muestra. Para evaluar su utilidad se aplicó en nueve diferentes tipos de peces y mejillones.

Quevauviller et al. (2000) realizaron una revisión de métodos probados en ensayos de colaboración para medir metilmercurio en peces y sedimento, incluyendo intercomparaciones y certificaciones de materiales de referencia en peces y sedimento. La mayoría de las técnicas para peces (Westoo, 1968; Magos, 1971; Horvat, 1991; May et al., 1987; Barregard, 1994; MESL, 1997) fueron aplicadas exitosamente, lo que resultó en la certificación del mercurio total y metilmercurio en dos materiales de referencia de atún, CRM 463 y CRM 464. Uno de los aspectos importantes para su

seguimiento estuvo basado en la pureza y preparación de las soluciones estándar. Las evaluaciones de la ejecución de los métodos descritos en este documento, muestran que la mayoría son técnicas comúnmente usadas para determinar MeHg en peces y sedimentos y que se pueden adecuar según el propósito.

Río-Segade y Tyson (2003), desarrollaron un método preciso y exacto para determinar mercurio inorgánico y mercurio total en muestras biológicas y ambientales. El sistema optimizado de inyección de flujo de mercurio permitió determinar por separado mercurio total y mercurio inorgánico, empleando como agente reductor borohidruro de sodio y un espectrofotómetro de absorción atómica de vapor frío (CV-AAS), como detector. El mercurio inorgánico se determinó selectivamente después de su reducción con NaBH_4 en una concentración de 10^{-4} en peso/volumen, mientras que el mercurio total se determinó después de la reducción con una solución al 0.75% en peso/volumen de NaBH_4 . Las curvas de calibración fueron lineales hasta $30 \mu\text{g L}^{-1}$. Los límites de detección basados en tres veces la desviación estándar del blanco fueron 0.024 y $0.0039 \mu\text{g L}^{-1}$ para las determinaciones de mercurio total y mercurio inorgánico, respectivamente. La exactitud del método se verificó mediante el análisis de extractos ácidos y alcalinos de cinco materiales de referencias biológicos y de sedimentos. Los procedimientos de extracción asistida por microondas originaron concentraciones mayores de las especies recuperadas de mercurio. El método por adición de estándares, sólo se requirió para calibración y cuando se analizaron las muestras biológicas.

Sanz- Landaluze et al. (2004) realizaron el análisis de MeHg en extractos de muestras sólidas ambientales mediante cromatografía de gases acoplado a microondas de plasma inducido y espectrometría de emisión atómica (GC-MIP/AES), después de la fase de etilación del extracto y la preconcentración de los productos volátiles en hexano. Con la finalidad de corregir las fuentes potenciales de errores aleatorios a lo largo del procedimiento analítico, estos autores propusieron el uso del mercurio inorgánico naturalmente presente en la muestra, como un estándar interno en el análisis de MeHg. En este trabajo, también se estudiaron las condiciones experimentales óptimas para

lograr una recuperación cuantitativa del MeHg, sin dañar su estructura química. La agitación magnética (sin calentamiento) de los sedimentos o tejidos de peces con HNO₃ 2M, o KOH al 10% metanólico respectivamente, durante 90 minutos, se consideraron como los procedimientos más efectivos para liberar el MeHg preservando su estructura. La exactitud del método fue verificada usando tres materiales de referencia certificados, uno en sedimento (CRM-580 y dos tejidos biológicos CRM-463 y DOLT-2). Los resultados estuvieron de acuerdo con los valores certificados. El límite de detección absoluto fue de 0.005 µg g⁻¹ de muestra.

Gómez-Ariza et al. (2004) desarrollaron dos metodologías para el análisis de especies de mercurio en alimentos marinos por cromatografía de gases acoplada a un detector AFS vía pirolisis. El primero de ellos está basado en la etilación de ambas especies, mercurio inorgánico y metilmercurio, en el cual no se requiere un barrido porque solo se utiliza una pequeña cantidad de muestra; en el segundo, las especies monoalquiladas de mercurio se extraen a una fase orgánica antes de la formación de los cloruros correspondientes. En este segundo caso, la eliminación de los compuestos interferentes de la matriz requiere de una etapa de barrido, lo que hace posible el tratamiento de cantidades mayores de muestra. De acuerdo a los autores, ambos procedimientos se consideraron complementarios ya que el intervalo de concentración aplicable para cada uno de ellos es diferente: 0.75-10 µg g⁻¹ de base seca como Hg para metilmercurio (método I) y 0.006 -1 µg g⁻¹ como Hg para metilmercurio (método II). El intervalo de aplicación de las muestras naturales puede seleccionarse fácilmente por un análisis preeliminar de mercurio total, debido a que la mayor parte del mercurio en los organismos marinos está presente como MeHg. Los métodos fueron validados con los materiales de referencia (BCR-463 y NIST-2977). Los límites de detección de MeHg variaron desde 0.0017 a 0.220 µg g⁻¹ de peso seco dependiendo de la metodología seleccionada y del peso de la muestra.

Syr-Song et al. (2004) desarrollaron un procedimiento analítico para determinar concentraciones de metilmercurio en peces. Este método implica una digestión asistida por microondas con una solución alcalina (hidróxido de tetrametilamonio), adición de

Cu⁺²; derivación del metilmercurio con tetrapropilborato de sodio, seguida por una extracción con n-heptano. El MeHg derivado se inyecta para su separación en una columna de cromatografía de gases y se detecta posteriormente mediante espectrometría de masas. El método se validó con tres materiales de referencia certificados, BCR CRM 464, NRC DORM-2 y el NRC DOLT-2. El límite de detección del procedimiento global fue de 0.040 µg g⁻¹ de tejido biológico para metilmercurio. La recuperación de metilmercurio fue de 91.2-95.3% para atún, 89.3-94.7% para marlin, y 91.7-94.8% para tiburón, respectivamente. Se concluyó que el método es apropiado para metilmercurio en peces.

Berzas-Nevado et al. (2005) desarrollaron un nuevo método sencillo y rápido para la especiación de mercurio inorgánico y metilmercurio en tejidos biológicos. El procedimiento está basado en la extracción cuantitativa asistida por microondas de muestras biológicas de mercurio con un extractante alcalino. Las especies extraídas del mercurio son etiladas y analizadas con cromatografía capilar de gases acoplada a un detector de fluorescencia atómica vía pirolisis (CGC-pyro-AFS, por sus siglas en inglés). El acoplamiento de la cromatografía capilar de gases con el detector de fluorescencia atómica fue con el objetivo de minimizar los límites de detección y el tiempo necesario para la determinación selectiva de los compuestos del mercurio. El uso de la extracción asistida por microondas sin una separación exhaustiva antes de la etilación redujo significativamente el tiempo total del análisis con respecto a procedimientos similares. El límite de detección fue de 2 (10⁻⁶) µg para MeHg (como Hg) y de un 1(10⁻⁶) µg para mercurio inorgánico. El método fue validado por materiales de referencia certificados DORM-2 y DOLT-2. Los estudios de recuperación de tejidos de músculo de peces por experimentos de adición con mercurio inorgánico y metilmercurio, se realizaron para verificar la confiabilidad del método. En todos los casos las recuperaciones fueron satisfactorias (92-105%).

En la tabla 3 se resumen algunos métodos desarrollados para la especiación del mercurio en muestras ambientales y algunas de sus características.

Tabla 3. Técnicas analíticas de especiación del mercurio, con diferentes esquemas de especiación y límites de detección.

Especies	Esquema de especiación	Consumo de muestra	Método de detección	Límite de detección	Referencia
Hg ⁺² / MeHg	Reducción secuencial selectiva basado en el uso de concentraciones diferentes de NaBH ₄ con 2 separadores gas-líquido	2.5 mL	CV-AAS	0.4 µg L ⁻¹ 0.6 µg L ⁻¹	Monteiro et al. (2001)
Hg ⁺² / MeHg	Especiación de Hg secuencial basado en la reducción selectiva usando una entrada doble	10 mL	CV-AAS	0.04 µg L ⁻¹ 0.08 µg L ⁻¹	Zachariadis et al. (2005)
Hg ⁺² / MeHg	Inyección de flujo continuo con absorción y descomposición de UV, seguida por una elusión selectiva	1000 mL	CV-AFS	7(10 ⁻⁵) µg L ⁻¹ 5(10 ⁻⁵) µg L ⁻¹	Bagheri (2001)
Hg ⁺² / Hg total	Especiación de mercurio basada en el uso de diferentes temperaturas en la celda de cuarzo.	3 mL	CV-AAS	0.02 µg g ⁻¹ 0.13 µg g ⁻¹	Torres et al. (2005)
MeHg	Cu-H ₂ SO ₄ -KBr-Tolueno	-----	GC-MIP-AES	8(10 ⁻⁵) µg	Donais et al. (1996)
Hg ⁺² / MeHg	Reducción secuencial con SnCl ₂ y NaBH ₄ y detección por CV-AAS	5 mL	CV-AAS	0.125 µg g ⁻¹ 0.185 µg g ⁻¹	Ubillús et al., 2000.
Hg ⁺² / MeHg	Etilación de las dos especies y GC acoplada a CV-AFS	1g	GC-CV-AFS	0.0017- 0.220 µg g ⁻¹	Gómez-Ariza et al. (2004)
Hg ⁺² / MeHg	Separación de las especies por cromatografía líquida (HPLC)	---	CV-AAS	4-16 µg L ⁻¹	Sánchez-Uría y Sanz-Medel, (1998)

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Implementar una técnica analítica confiable y accesible para detectar y cuantificar niveles de mercurio orgánico en músculo de aves y peces recolectados en las costas de Sinaloa.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la calidad de los parámetros analíticos (límite de detección, intervalo de aplicación, precisión y exactitud) de la estrategia analítica desarrollada para la detección de mercurio orgánico, a través de la comparación con otras técnicas desarrolladas para metilmercurio o mercurio orgánico.
- Efectuar las pruebas pertinentes de la técnica desarrollada, para su validación con material de referencia certificado.
- Conocer los niveles de concentración de mercurio orgánico y mercurio total en quince especies de aves y peces obtenidas de las costas de Sinaloa.
- Realizar un análisis estadístico de las diferencias de concentraciones de mercurio orgánico obtenidas por curva de calibración de soluciones estándar de MeHgCl (curva directa) y curvas de calibración por adición de estándares en cada matriz.
- Comparar y discutir las concentraciones absolutas y relativas de mercurio orgánico de las distintas especies analizadas, con las concentraciones de mercurio orgánico en aves y peces de otras zonas geográficas.

4. HIPOTESIS

1. La técnica analítica propuesta permite determinar concentraciones de mercurio orgánico confiables en tejidos de músculo de aves y peces.
2. Mediante la técnica analítica propuesta se obtienen datos de concentraciones más exactos de mercurio orgánico, utilizando el método por adición de estándares, en aquellas matrices que presentan interferencias en el análisis.
3. Las interferencias de matriz dependen de la especie en cuestión.
4. El mercurio presente en músculo de aves y peces a analizar, se encuentra principalmente en su forma orgánica.

5. METODOLOGIA

5.1. Consideraciones sobre la implementación de la metodología

En la metodología analítica que se desarrolló, se seleccionaron para su análisis, tejidos de peces, de especies consideradas de elevado nivel trófico, que pueden presentar niveles detectables de metilmercurio; además por su importancia ambiental, comercial y sus posibles repercusiones en la salud humana. También se seleccionaron tejidos de aves acuáticas ya que son de los organismos más sensibles a los cambios en las condiciones ambientales de una región, debido a la actividad humana (Rendón-Von Osten y García-Guzmán, 1996). Además, son depredadores de alto nivel trófico y pueden estar expuestas a concentraciones significantes de mercurio, por lo tanto, pueden servir como bioindicadores de patrones espaciales y temporales de concentración de mercurio en los ecosistemas acuáticos (Walsh, 1990; Furness y Camphuysen, 1997).

Con base en ensayos preliminares y en trabajos precedentes de especiación del mercurio citados en la literatura, (Hintelmann, 1999; Ubillús et al., 2000; Quevauviller et al., 2000; Syr-Song et al., 2004; Sanz-Landaluze et al., 2004) donde las recuperaciones de la extracción no son por lo general completas, presentando problemas de interferencia de matrices en muchos de ellos, se decidió usar el método de adición de estándares para considerar las posibles interferencias en cada una de las especies analizadas. La aplicación del método por adición de estándares tiende a compensar las variaciones causadas por interferencias espectrales y químicas de la disolución del analito (Skoog et al., 1997).

Las recuperaciones pueden ser determinadas por el análisis de matrices de materiales de referencia certificados (CRM) y por adición de un elemento o compuesto puro al material de prueba (aproximación por dilución isotópica; por adición de estándares o por el uso de estándares internos). Aunque cabe señalar que el uso de los CRM permite una evaluación de la ejecución del método analítico global más que una evaluación particular de la eficiencia de la extracción.

No existe un método estandarizado para evaluar las eficiencias de extracción de una técnica analítica en particular. Sin embargo, Leemakers et al. (2005) concluyen que para la certificación de mercurio total y de metilmercurio en sedimentos estuarinos, recomiendan el uso del método de adición de estándares, como la mejor manera de determinar la eficiencia de extracción del método. Esto se realizó mediante la adición de estándares al material de análisis en tres diferentes niveles de concentración antes de la extracción.

El principal obstáculo del método de adición de estándares es que no siempre el compuesto utilizado como estándar, se enlaza a la matriz de la misma manera que los compuestos naturalmente presentes que se analizan. La mejor estrategia y las condiciones para los experimentos de adición de estándar o estándar interno, aun es materia de debate dentro de la comunidad científica, sin embargo se pueden considerar algunas recomendaciones (Quevauviller y Morabito, 2000):

(i) Permitir un largo período de equilibrio en el caso de muestras sólidas (suelos, sedimentos, biota), para “estimular” tanto como sea posible una adsorción natural del estándar. Se recomienda generalmente, un tiempo de equilibrio para la adsorción del estándar, de 24 horas o un mínimo de 12 horas.

(ii) Las pruebas de recuperación deben ser realizadas para cada especie en particular, puesto que la eficiencia de extracción cambia de una especie a otra.

(iii) Las matrices reales a usarse deberán ser tan similares a la matriz desconocida como sea posible.

Otro de los problemas que representa este método, es el de seleccionar un número adecuado de niveles de concentración del analito en la muestra de prueba; un número elevado de niveles de concentración implica una mejor exactitud en la evaluación de la recuperación. Sin embargo, al mismo tiempo, se incrementan los costos analíticos con el incremento de número de niveles, el análisis es mucho más

largo y las dificultades de reproducir correctamente los experimentos de adición se incrementan. Además, cuando se eligen experimentos con más de diez niveles de concentración en relación al analito de la matriz, por ejemplo, se corre el riesgo de una sobrestimación del mismo. (Quevauviller y Morabito, 2000).

5.2. Limpieza de material y medidas de seguridad

El material de vidrio, de plástico y otros utensilios empleados en los análisis, se lavaron de acuerdo a los procedimientos sugeridos por Moody y Lindstrom (1977) para evitar la contaminación de las muestras; una vez lavados y secos, el material se almacenó en bolsas de plástico libres de Hg, hasta su utilización.

Los compuestos orgánicos del mercurio, y especialmente el metilmercurio, son extremadamente tóxicos en los seres humanos. Pueden causar daños neurológicos así como un mal funcionamiento de los riñones. El contacto directo con la piel puede conducir a la muerte (Lebel et al., 1988; Sanz-Landaluze et al., 2004). Por ello, cuando se manipuló el cloruro de metilmercurio (CH_3HgCl), para la preparación de las soluciones estándar; se realizó con la ropa adecuada y en la campana de extracción de gases. La disposición de los desechos con mercurio, se hizo conforme la hoja de seguridad del reactivo.

5.3. Reactivos, soluciones y material de referencia

Todos los reactivos usados fueron grado analítico. Las soluciones de HCl 6M y HNO_3 8M se prepararon por dilución, usando agua de calidad Milli-Q (18.2 mΩ cm) y utilizando los siguientes ácidos: HNO_3 (65%, grado analítico, bajo en Hg- Merck), y HCl (30%, Suprapur-Merck) respectivamente. Para la preparación de la solución de SnCl_2 , 25% peso-volumen y 25% volumen-volumen de HCl, se usó SnCl_2 (grado analítico normal o bajo en Hg, Merck). Para la preparación de la solución de dicromato de potasio al 1% peso-volumen, se utilizó $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (grado analítico Merck).

Para las columnas de intercambio iónico se utilizó resina DOWEX 1 x 8 (forma Cl^- , No. de malla 100-200). De acuerdo con la nomenclatura del fabricante, es una

resina aniónica de una base fuerte, constituida por un copolímero de divinilbenceno (DVB)- estireno con un 8% de DVB.

Para la preparación de las soluciones estándar de metilmercurio se utilizó cloruro de metilmercurio (CH_3HgCl) grado analítico (Sigma-Aldrich), más comúnmente representado como MeHgCl : se prepararon dos soluciones estándar primarias de 128 y 130 (10^6) $\mu\text{g Hg L}^{-1}$, disolviendo la cantidad correspondiente MeHgCl en una mezcla de acetona-agua (1% en volumen) y aforando a 50 mL. A partir de éstas, se prepararon semanalmente soluciones estándar secundarias de 1000 $\mu\text{g Hg L}^{-1}$, las cuales se mantuvieron en la oscuridad a 4°C aproximadamente.

En algunos análisis preliminares, fue necesario el uso de silicón antiespumante (Merck), ya que se generaba espuma debido probablemente a la saponificación de ácidos grasos y producía un descenso en la señal de absorbancia en el espectrofotómetro de absorción atómica (Gómez-Ariza, 2004).

Se empleó también, una solución estándar primaria de absorción atómica de cloruro de mercurio (HgCl_2) (Sigma-Aldrich) 10^6 $\mu\text{g Hg L}^{-1}$, como estándar de mercurio inorgánico (Hg^{+2}), haciendo las correspondientes diluciones, como se describe en la metodología.

El material de referencia certificado que se analizó fue el NIST-2977, el cual corresponde a un tejido suave de mejillón y que fue obtenido de la National Bureau of Standards de los Estados Unidos de América.

5.4. Recolección, preservación y tratamiento de muestras

5.4.1. Aves

La recolección de las aves se llevó a cabo en las lagunas interiores del Estado de Sinaloa, con la ayuda de cazadores deportivos. Se tramitó el permiso de la SEMARNAT para la caza de las aves acuáticas en el área de estudio. Los organismos se transportaron a baja temperatura (4° C) al laboratorio de Geoquímica y Contaminación Costera del Instituto de Ciencias del Mar de la UNAM, Unidad Académica Mazatlán. La identificación de las aves se realizó con la ayuda de guías de campo (Jaques y Ollivier, 1960; Torres-Gómez et al., 1985; Peterson y Chalif, 1989). En la tabla 4 se presentan los datos de las aves así como las fechas y sitios de recolección de las mismas.

Después de la identificación, todos los organismos se lavaron con agua corriente y se pesaron en una balanza granataria. Las disecciones se realizaron con un bisturí de acero inoxidable y se seleccionó tejido de músculo correspondiente a la porción ventral del organismo para su análisis. Una vez hechas las disecciones, los tejidos se mantuvieron congelados (< 4° C) hasta su liofilización.

Tabla 4. Datos de las aves recolectadas.

Espece	Nombre común	No. de organismos	Peso Total Húmedo (g)	Fecha de recolección	Sitio de recolección
<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Cormorán oliváceo	1	803.1	Feb./02	Chiricahueto, Sin.
<i>Pelecanus occidentalis</i>	Pelícano café	1	3750	Feb./00	Chiricahueto, Sin.
<i>Anas clypeata</i>	Pato cucharón	1	427.3	Feb./02	H. Caimanero, Sin
<i>Anas discors</i>	Cerceta clara	1	378.5	Mar./02	Ejido los Adobes, Sin.
<i>Aythya affinis</i>	Pato boludo	1	734	Feb./02	Ejido Vázquez Moreno, Sin.

5.4.2. Peces

Los peces se recolectaron con la ayuda de pescadores de las costas de Sinaloa. Los organismos se transportaron al laboratorio en bolsas de polietileno previamente lavadas y cubiertas con hielo. Para la recolección de las especies se utilizó anzuelo, línea o chinchorro, dependiendo de la especie. Se identificaron los peces por el personal especializado del Laboratorio de Ictiología de la Unidad Académica Mazatlán del ICMYL/UNAM con la ayuda de claves de identificación taxonómica (Fischer et al., 1995). Los organismos se pesaron en una balanza granataria y se midió su talla desde la boca hasta la aleta caudal (longitud total), con un ictiómetro. La disección del tejido se realizó con un bisturí de acero inoxidable y se seleccionó tejido muscular correspondiente a la porción dorsal media del organismo, para su análisis. Una vez hechas la disecciones, los tejidos se mantuvieron congelados ($< 4^{\circ} \text{C}$) hasta su liofilización. En la tabla 5 se presentan los datos biométricos de las especies estudiadas, así como los sitios y fechas de su recolección.

Las muestras de aves y peces se liofilizaron por 72 h a -49°C y 133×10^{-3} mbar y posteriormente se molieron con un mortero de ágata automático (Retsch) por 10 minutos. Las muestras una vez pulverizadas y homogenizadas se almacenaron en bolsas de polietileno previamente lavadas para la etapa de extracción.

Se sabe relativamente muy poco sobre la estabilidad del metilmercurio en muestras biológicas durante su almacenamiento. Las muestras húmedas son generalmente almacenadas en congelación a bajas temperaturas, liofilizadas en la oscuridad o, algunas veces, esterilizadas. En algunos organismos, el metilmercurio puede descomponerse debido a congelaciones y descongelaciones repetidas de las muestras (particularmente en bivalvos). (Leermakers et al., 2005).

5.5. Instrumentación

La instrumentación requerida en las diferentes etapas del análisis fue la siguiente: balanza digital Excell; balanza analítica electrónica Sartorius CP224 S;

plancha de calentamiento Cimarec; agitador orbital Daigger; liofilizadora Labconco (72 h a $-49\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 133×10^{-3} mbar); Mortero automático Retsch; lámpara de luz ultravioleta de 100 W y un espectrofotómetro de absorción atómica Varian SpectrAA-220 equipado con un accesorio de generación de vapor VGA-77.

Tabla 5. Datos de los peces recolectados.

Especie	Nombre común	No. de organismos	Peso Total Húmedo (g)	Longitud total (cm)	Fecha de recolección	Sitio de recolección
<i>Gerres cinereus</i>	Mojarra	2	245- 262	22-23	Ene./04	Teacapan, Sin.
<i>Caranx caninus</i>	Jurel común	3	45 – 72	14-18	Mar./04	Bahía de Topolobampo, Sin.
<i>Carcharhinus leucas</i>	Tiburón chato	1	11 000	106	Dic./1998	Ensenada del Pabellón, Sin.
<i>Lutjanus colorado</i>	Pargo rojo	1	372	29	Jun./ 2003	Estero de Urías, Sin.
<i>Roncador steariasii</i>	Roncador manchado	1	88	19	Mar./04	Bahía de Topolobampo, Sin.
<i>Haemulon sexfasciatum</i>	Ronco almejero	3	77 – 134	17.5-22	Nov./03	Laguna Santa María, Sin.
<i>Trachionotus paitensis</i>	Pámpano paloma	1	285	30	Nov./03	Laguna Santa María, Sin.
<i>Elops affinis</i>	Malacho del pacífico	1	251	38	Nov./03	Laguna Santa María, Sin.
<i>Nematistius pectoralis</i>	Papagayo	4	139-173	23-25	Mar./04	Bahía de Topolobampo, Sin.
<i>Thunnus albacares</i>	Atún aleta amarilla	1	10, 000	*	Jul./05	Pacífico oriental mexicano (20°, 07' N 120° 04' W)

*la flota comercial responsable de la recolección de atunes, no determinó su longitud total.

5.6. Análisis de mercurio total

5.6.1. Digestión

Se pesaron 0.25 gramos de tejido liofilizado y homogenizado, se agregaron 5 mL de HNO₃ concentrado en recipientes de teflón (Savillex) de cierre hermético. Se dejaron en una plancha de calentamiento a 120 °C durante tres horas. Una vez fríos los recipientes de teflón, se vaciaron los contenidos a un recipiente de plástico previamente lavado y se aforaron a 25 mL con agua Milli-Q. La digestión con un ácido fuerte tiene la finalidad de descomponer las muestras, oxidar y convertir cualquiera de las formas orgánicas presentes a mercurio inorgánico (Hg⁺²) (MESL, 1997). Se guardaron las muestras digeridas hasta su detección.

5.6.2. Detección de mercurio total

Se tomaron 10 mL de cada solución digerida para la detección de mercurio total, se agregaron 2 mL de HNO₃, 200 µL de K₂Cr₂O₇ y se aforaron a 20 mL. Se preparó un blanco y tres soluciones estándar de cloruro de mercurio (HgCl₂) con 5, 10 y 20 µg L⁻¹ para la curva de calibración. Se leyeron las concentraciones en µg L⁻¹ de mercurio total de las soluciones digeridas por espectrofotometría de absorción atómica de vapor frío (CV-AAS), de acuerdo al procedimiento de Hatch y Ott (1968), modificado por Loring y Rantala (1995). Se realizaron dos determinaciones réplicas de mercurio total por cada tejido.

5.7. Técnica para el análisis de mercurio orgánico

5.7.1. Esquema general de la técnica analítica

La técnica analítica implementada para la detección de mercurio orgánico consta de cuatro etapas generales: (1) extracción ácida, (2) la separación del mercurio inorgánico por intercambio iónico, (3) la conversión del mercurio orgánico a mercurio inorgánico o divalente (Hg^{+2}) mediante la fotoxidación con luz ultravioleta y (4) la detección por espectrofotometría de absorción atómica de vapor frío (CV-AAS). En la figura 2 se esquematiza la estrategia analítica realizada:

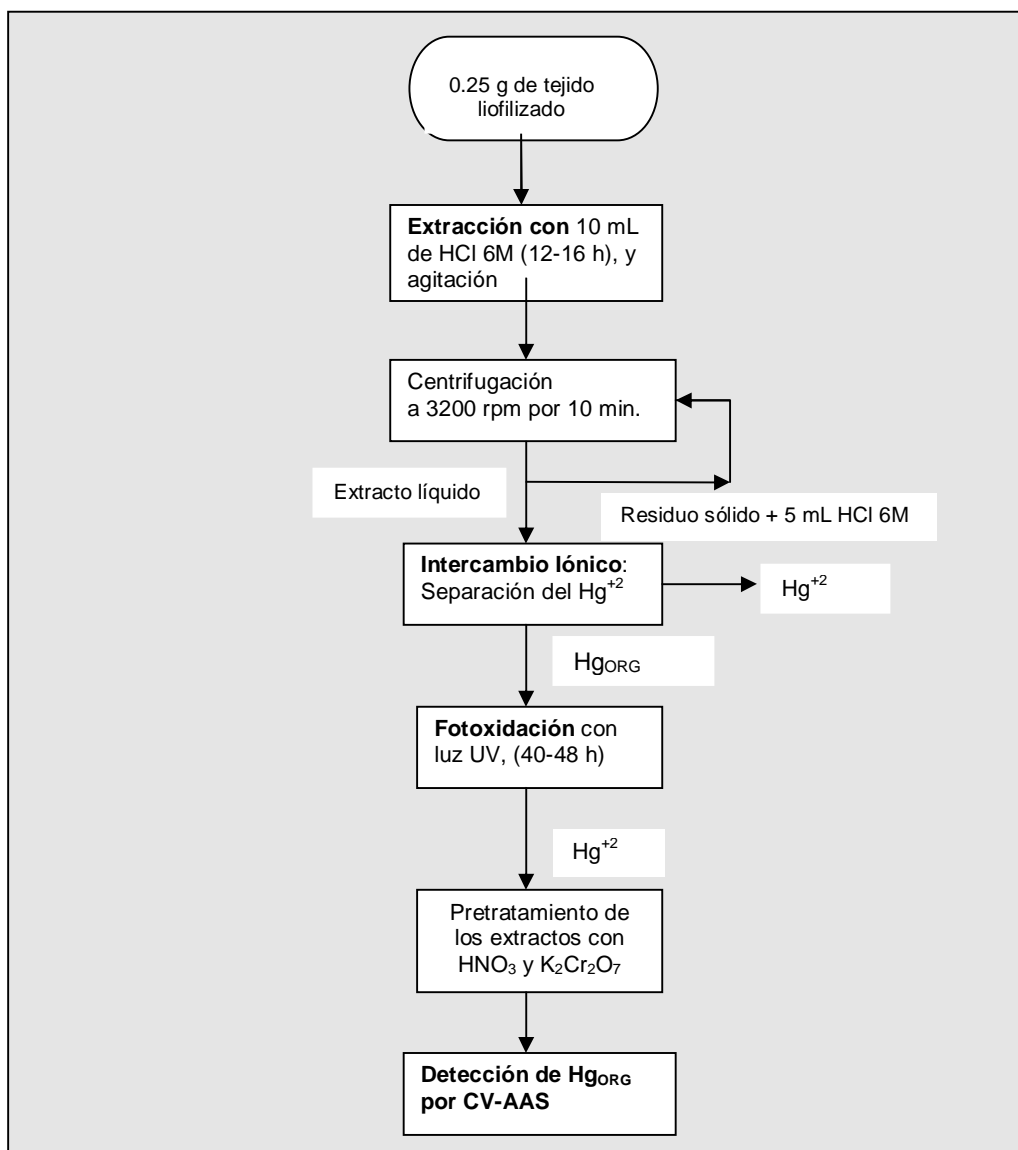


Figura 2. Esquema general de la técnica analítica para la cuantificación de Hg_{ORG} en tejidos biológicos.

5.7.2. Extracción

Se pesaron de 0.2 a 0.25 gramos de material biológico liofilizado y homogenizado en un recipiente de vidrio con tapa. Para la extracción del mercurio inorgánico (Hg^{+2}) y mercurio orgánico (Hg_{ORG}) se agregaron 10 mL de una solución de HCl 6M y se adicionó una cantidad de solución estándar de MeHgCl , previamente determinada, cubriendo el recipiente con papel aluminio (el almacenamiento en la oscuridad es importante para evitar pérdidas de mercurio orgánico por fotooxidación). (May et al., 1987; Horvat, 1991; Barregard et al., 1993; MESL, 1997). Se dejan en agitación durante la noche (de 12 a 14 horas), como lo sugiere el método por adición de estándar, para que haya un tiempo adecuado de equilibrio y una adsorción del estándar (Quevauviller y Morabito, 2000). El extracto ácido y el sólido residual se separan por centrifugación a 3200 rpm, durante 10 minutos. El primer extracto se pasa a la columna de intercambio iónico y el sólido se centrifuga de nuevo con 5 mL de una solución HCl 6M, el segundo extracto se pasa también por la columna de intercambio iónico y el residuo se desecha.

5.7.3. Intercambio iónico

La separación del Hg^{+2} del Hg_{ORG} , se llevó a cabo mediante columnas de intercambio iónico, usando una resina Dowex 1x8 (forma Cl, no. de malla 100 - 200) en la oscuridad. Antes de usarse la resina, se purificó y se acondicionó cuidadosamente. Para este propósito la resina de intercambio iónico se enjugó durante toda la noche, en una solución al 20% de HNO_3 y después de la decantación del ácido, se lavó la resina con agua Milli-Q.

Para el acondicionamiento de las columnas, se adicionó la resina mediante una pipeta a las columnas de vidrio hasta una altura de 1.5 cm (Fig. 3), colocando en el fondo y en la parte superior tapones de lana de vidrio. Se lavaron las columnas previamente, adicionando 10 mL de HNO_3 8M, posteriormente se adicionan 10 mL agua destilada y finalmente 10 mL de HCl 6M. Las columnas se envuelven con papel aluminio. Se lavó de nuevo la resina adicionando en el siguiente orden: 10 mL de agua

Milli-Q, 10 mL de HNO₃, 10 mL de agua Milli-Q y 10 mL de HCl para evitar posibles contaminaciones durante la manipulación de los materiales (MESL, 1997). Durante los lavados se ajusta el flujo de cada columna a 1.5 mL min⁻¹ aproximadamente.

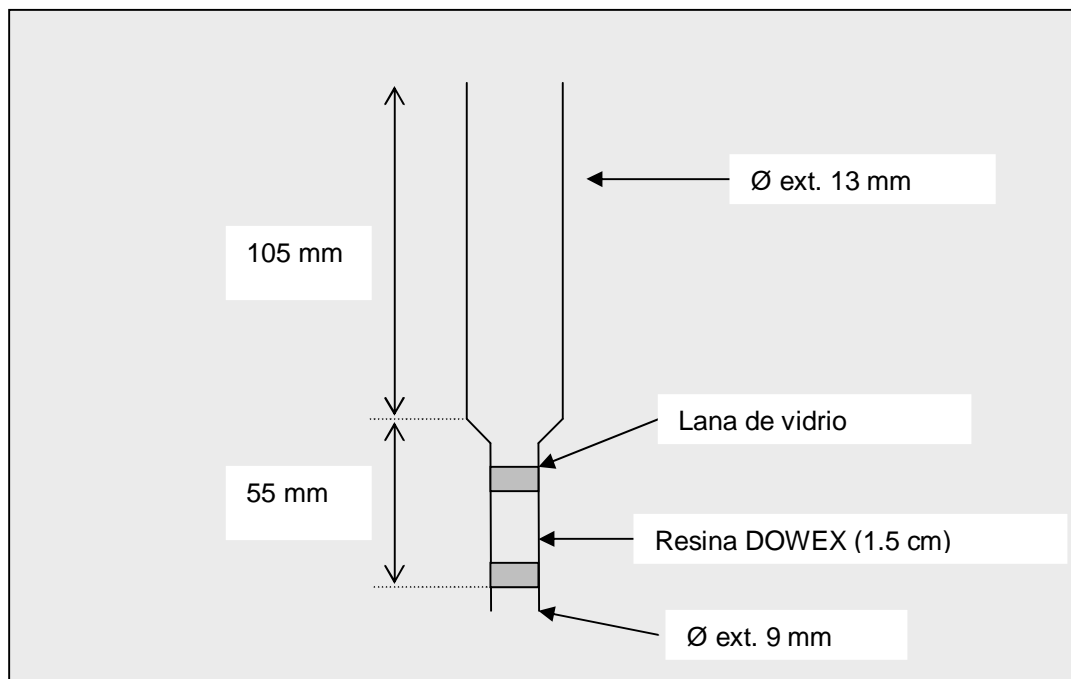


Figura 3. Descripción de las columnas de intercambio iónico.

El primero y segundo extracto se hacen pasar por la columna correspondiente. El mercurio inorgánico (Hg⁺²) se adsorbe en la resina como complejo de cloro (HgCl₄²⁻) debido al intercambio aniónico con el ion cloruro (Cl⁻) de la resina y el Hg_{ORG} se eluye principalmente como cloruro de metilmercurio (MeHgCl) (May et al., 1987; MESL, 1997). Los efluentes de las columnas se colectaron en tubos de cuarzo y se aforaron a 20 mL con agua milli-Q para proceder a su fotoxidación.

5.7.4. Fotoxidación

Con la finalidad de convertir el mercurio orgánico en (Hg⁺²) y poder detectarlo mediante CV-AAS, los efluentes de las columnas colectados en los tubos de cuarzo, se colocan en una cámara de irradiación UV, equipada con una lámpara de luz ultravioleta

de 100 Watts durante 40-48 horas (Fig. 4). Los tubos se colocaron en posición inclinada, con un ángulo de 15° aproximadamente, en una gradilla de acrílico adecuada para ello, a una distancia de 5-7 cm de la fuente de luz, con la finalidad de aumentar en lo posible la superficie de la solución irradiada. No obstante que el periodo de irradiación UV parece ser muy largo, este proceso tiene la ventaja de ser aun más eficaz que el método de digestión con HNO₃ (May et al, 1987).

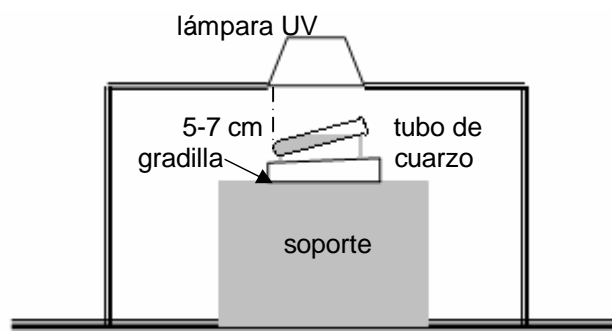


Figura 4. Cámara de irradiación de luz UV.

Para evitar pérdidas por evaporación, los tubos se taparon con papel parafilm, y un tapón de vidrio, ya que durante las pruebas preliminares se observó que estos se calentaban a unos 40°C aproximadamente debido a la proximidad de la lámpara y había pérdidas del extracto por evaporación.

5.7.5. Detección de mercurio orgánico

Se tomaron 5-10 mL de extracto y se adicionaron 2 mL de HNO₃, 200 µL de K₂Cr₂O₇ y se aforaron a 20 mL. Se utilizaron diferentes volúmenes de extracto, dependiendo si el tejido analizado generaba espuma en el espectrofotómetro. Se dejaron por un mínimo de cuatro horas antes de su detección, se hizo lo anterior con la finalidad de estabilizar la solución, ya que hay un consenso sobre los efectos positivos de un bajo pH y una elevada fuerza iónica para estabilizar las especies de mercurio en solución, particularmente cuando existen agentes oxidantes y complejantes evitando su

deposición en las paredes de los contenedores (Sánchez-Uría y Sanz-Medel, 1998). De la misma manera, se preparó un blanco y tres soluciones estándar de cloruro de mercurio inorgánico (HgCl_2) con 5, 10 y 20 $\mu\text{g Hg L}^{-1}$ para correr y registrar la curva de calibración en el espectrofotómetro de absorción atómica.

La detección se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica de vapor en frío, de acuerdo al procedimiento de Hatch y Ott (1968), modificado por Loring y Rantala (1995), cuyo principio consiste en descomponer la materia orgánica de la muestra, con HNO_3 y vaporizar el mercurio inorgánico (Hg^{+2}) de la solución digerida mediante la reducción con cloruro estanoso (SnCl_2) a mercurio elemental. El Hg^0 en forma de vapor fluye hacia la celda del espectrofotómetro ayudado por una corriente de gas nitrógeno como gas portador, donde se hace incidir un haz de luz ultravioleta y se mide su absorbancia. El equipo mide la absorbancia y de acuerdo a la curva de calibración previamente registrada con las soluciones estándar, convierte la lectura en concentración de mercurio inorgánico en $\mu\text{g Hg L}^{-1}$. Los flujos utilizados fueron los siguientes: del agente reductor fue de 1 mL min^{-1} ; del agua milli-Q de 1 mL min^{-1} y del extracto de la muestra a analizar fue de 8 mL min^{-1} .

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Determinación de la eficiencia de la resina en la columna de intercambio iónico

Con la finalidad de verificar si la separación del mercurio inorgánico en las columnas de intercambio iónico era cuantitativa, se realizaron pruebas para estimar la eficiencia de separación de la resina. Se preparó una solución estándar de cloruro de mercurio (HgCl_2) con una concentración de $10^{-4} \mu\text{g L}^{-1}$ y se adicionaron diferentes cantidades de esta solución a 7 columnas de intercambio iónico, previamente lavadas y acondicionadas como lo indica la metodología. Se midieron las concentraciones conocidas de Hg^{+2} antes y después de pasar por las columnas mediante CV-AAS. La eficiencia de la resina para la separación de Hg^{+2} se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Eficiencia} = [\mu\text{g de Hg}^{+2}(\text{retenidos en la columna}) / \mu\text{g Hg}^{+2}(\text{antes de la columna})] * 100$$

Se obtuvo un promedio de los porcentajes de Hg^{+2} retenido en las siete columnas utilizadas, obteniendo un valor de 99.56%, por lo que se puede considerar que es una separación cuantitativa.

6.2. Optimización de la fotoxidación

En las pruebas preeliminares, se observó que la fotoxidación del mercurio orgánico en los extractos, variaba sensiblemente con la distancia a la cual se colocaban los tubos de cuarzo de la lámpara UV, así como con el tiempo de irradiación. Por lo que se realizaron pruebas con un mismo tejido variando la distancia y el tiempo de irradiación para determinar las condiciones experimentales óptimas.

Se realizaron pruebas usando tejido muscular del cormorán (*Phalacrocorax brasilianus*) y del pargo rojo (*Lutjanus colorado*). En la Figura 5, se muestran los resultados que se obtuvieron con la fotoxidación de los extractos del pargo.

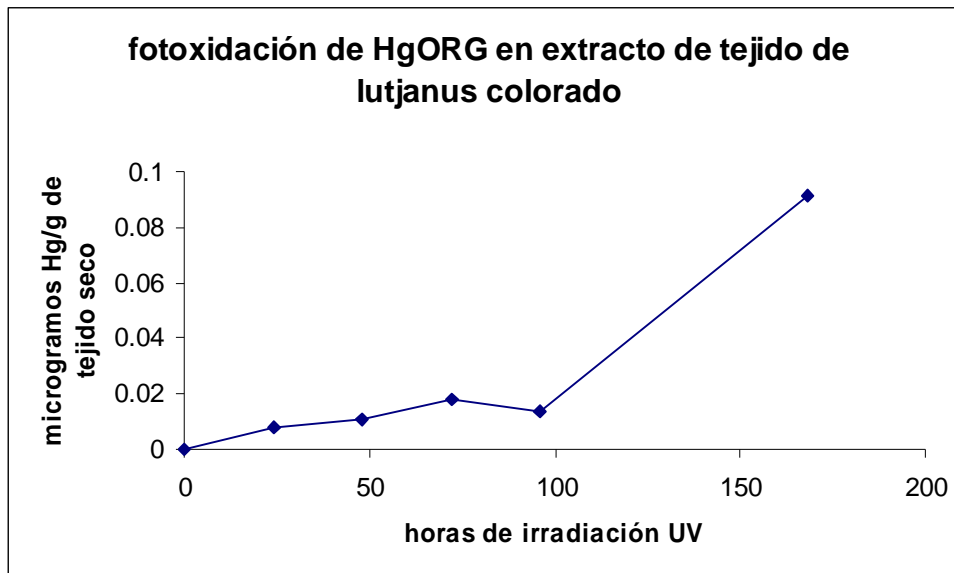


Figura 5. Fotoxidación de Hg_{ORG} en extracto de tejido de *Lutjanus colorado* a una distancia de 30 cm de la fuente de luz.

Cuando se incrementó el tiempo de exposición de los extractos a la luz UV, aumentó significativamente la concentración de Hg que se detectó en éstos, sin embargo, los niveles de concentración fueron muy bajos (Fig. 5), por lo que se probó con el mismo tejido pero a una distancia de 5-7 cm de la fuente de luz (May et al, 1987), como se describe previamente en la metodología y se detectó una concentración máxima de mercurio orgánico a un tiempo de 48 horas (Fig.6). Fue necesario tapar los tubos de cuarzo para evitar pérdidas por evaporación del extracto ya que estos se calentaban aproximadamente a unos 40°C debido a la proximidad de la lámpara.

Durante estas pruebas también se observó que los extractos que generalmente presentaban mayores niveles de mercurio de un mismo tejido, después de la fotoxidación, eran aquellas que no presentaban turbidez y no generaban espuma en el espectrofotómetro, es decir, aquéllos extractos que probablemente habían sido oxidados en forma completa.

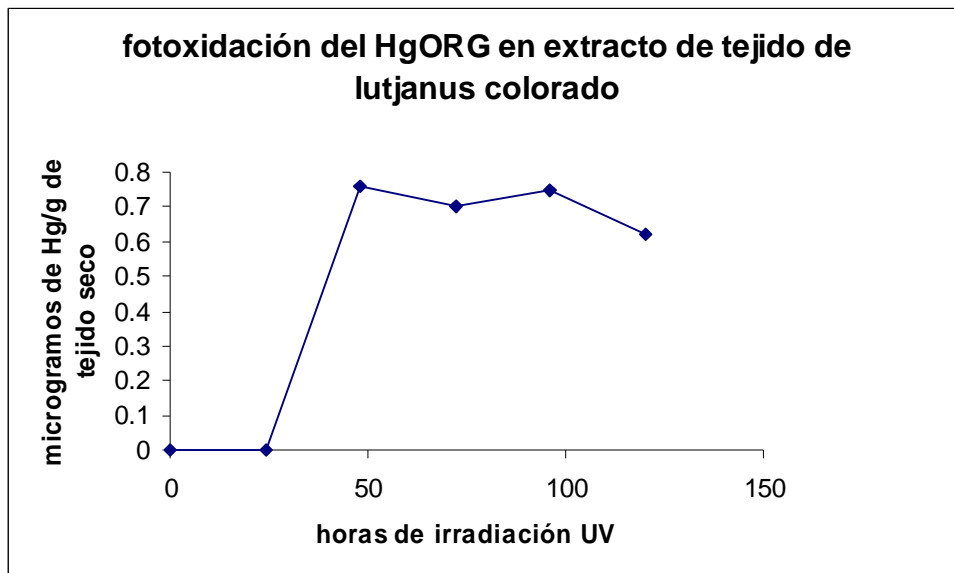


Fig. 6. Fotoxidación de Hg_{ORG} en extracto de tejido de *Lutjanus colorado* a una distancia de 5-7 cm de la fuente de luz.

Las matrices de organismos marinos se caracterizan por elevadas concentraciones de grasas (Gómez-Ariza et al., 2004), y cuando no se logra su oxidación completa se saponifican generando espuma, evitando así la reducción del mercurio en la fase orgánica bajo las condiciones del método y consecuentemente su detección en el espectrofotómetro como vapor de Hg⁰. Por otra parte, las especies predominantes del mercurio a un pH bajo y a elevadas concentraciones de cloruros (condiciones de los extractos), son el complejo dicloromercúrico (HgCl₂) y el cloruro de metilmercurio MeHgCl, las cuales se caracterizan por su elevada solubilidad en lípidos y por lo tanto son parcialmente retenidos en los tejidos grasos de los organismos (Morel et al., 1998).

6.3. Curva de calibración de las soluciones estándar de MeHgCl y de las matrices analizadas por adición de estándares.

Para comparar los niveles de recuperación de mercurio orgánico mediante la técnica diseñada en soluciones estándar simples (estándar de MeHgCl en solución acetona-agua al 1%), con muestras ambientales reales, primero se

construyó una curva aplicando la técnica para la determinación de mercurio orgánico a un blanco y tres soluciones de estándar cuyas concentraciones fueron 0.5, 5 y 10 $\mu\text{g Hg L}^{-1}$ como MeHgCl (Fig.7).

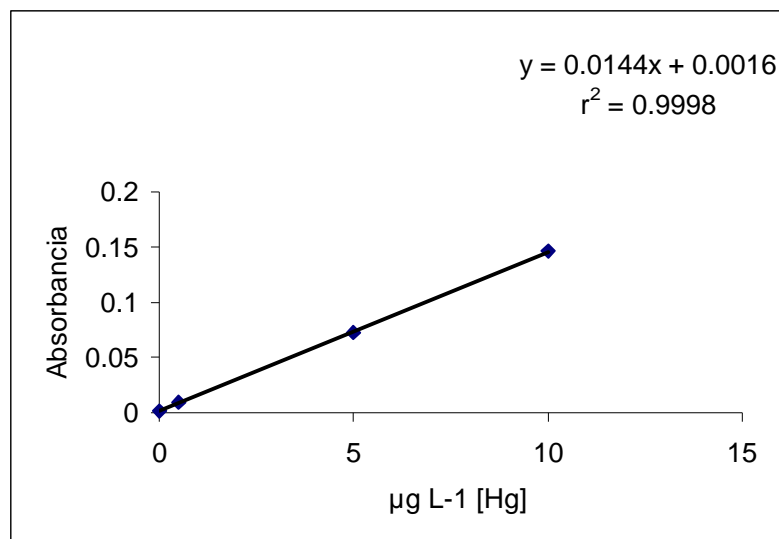


Figura 7. Curva de calibración de las soluciones estándar de MeHgCl.

Posteriormente, para la determinación de las concentraciones de mercurio orgánico en los diferentes tejidos seleccionados, a 0.25 gramos de muestra de tejido problema, se adicionaron cantidades conocidas de estándar de cloruro de metilmercurio de acuerdo a los niveles de concentración de mercurio total naturalmente presente en esta muestra. Es decir, para construir cada curva se adicionaron diferentes cantidades del estándar a cinco muestras respectivamente del mismo tejido.

Se procesaron mediante la técnica analítica completa para la detección de mercurio orgánico en cada corrida, un blanco y diez muestras para construir dos curvas. En las figuras 8a, 8b y 9, se muestran las curvas de calibración que se obtuvieron. Para la construcción de dichas curvas, se consideró la lectura de la absorbancia, respecto a la cantidad de estándar adicionado en $\mu\text{g Hg L}^{-1}$ como MeHgCl.

No obstante que el método por adición de estándar es una aproximación excelente al problema común de las interferencias de matriz, también presenta numerosas desventajas: difícil de automatizar y por lo general se utilizan mayores cantidades de muestra que en otros métodos. En términos estadísticos, su principal desventaja es que es un método de extrapolación y por consiguiente es menos preciso que las técnicas de interpolación (Miller y Miller, 1988). Debido a que se obtuvieron algunas curvas de calibración con desviaciones estándar muy elevadas (Tabla 10), se repitieron las curvas de las cuales se disponía de tejido suficiente para éstas pruebas (*Gerres cinereus*, *Carcharhinus leucas*, *Trachionotus paitensis*, *Nematistius pectoralis*, *Thunnus albacares* y *Pelecanus occidentalis*). Para la construcción de la curva 2 de estas especies, se incrementó el número de puntos y se adicionaron de nuevo soluciones estándar al tejido en cuestión, dentro del intervalo de concentración donde la curva 1 se comportó linealmente, con la finalidad de mejorar la precisión (Miller y Miller, 1988).

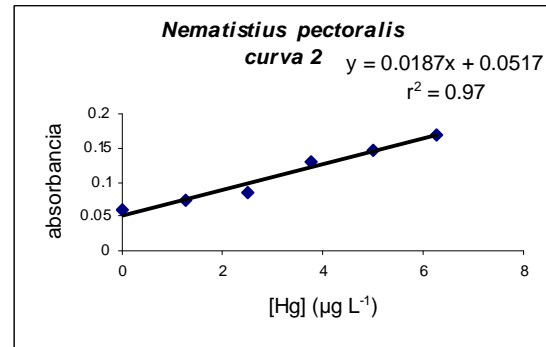
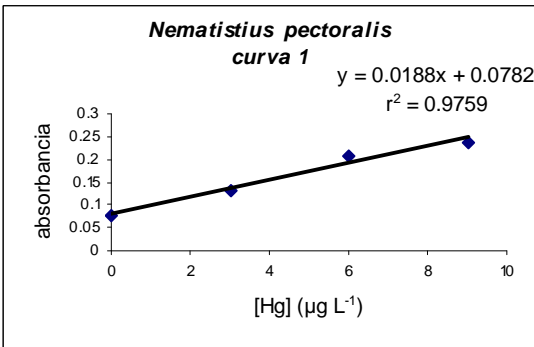
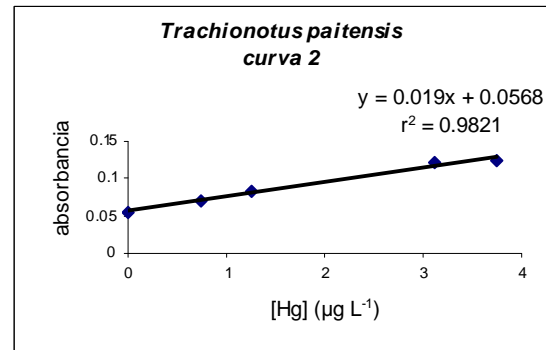
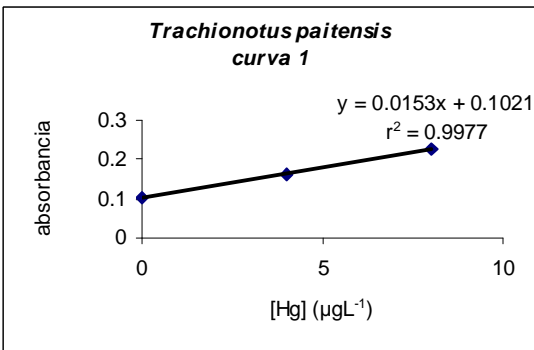
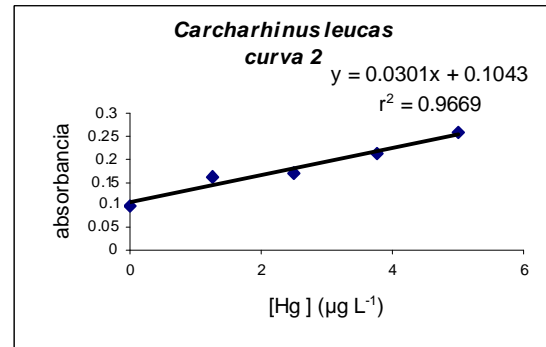
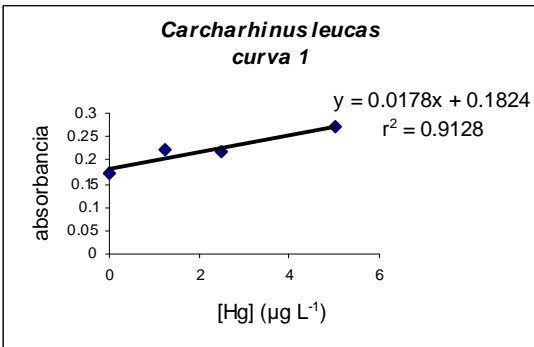
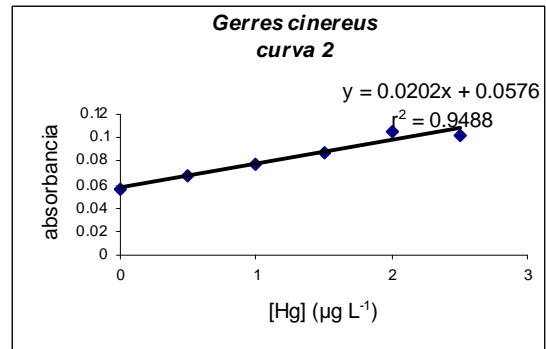
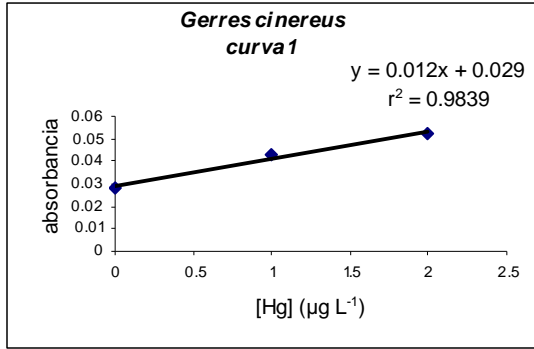


Figura 8a. Curvas de calibración por adición de estándares de MeHgCl a extractos de músculo de las especies de los peces estudiados.

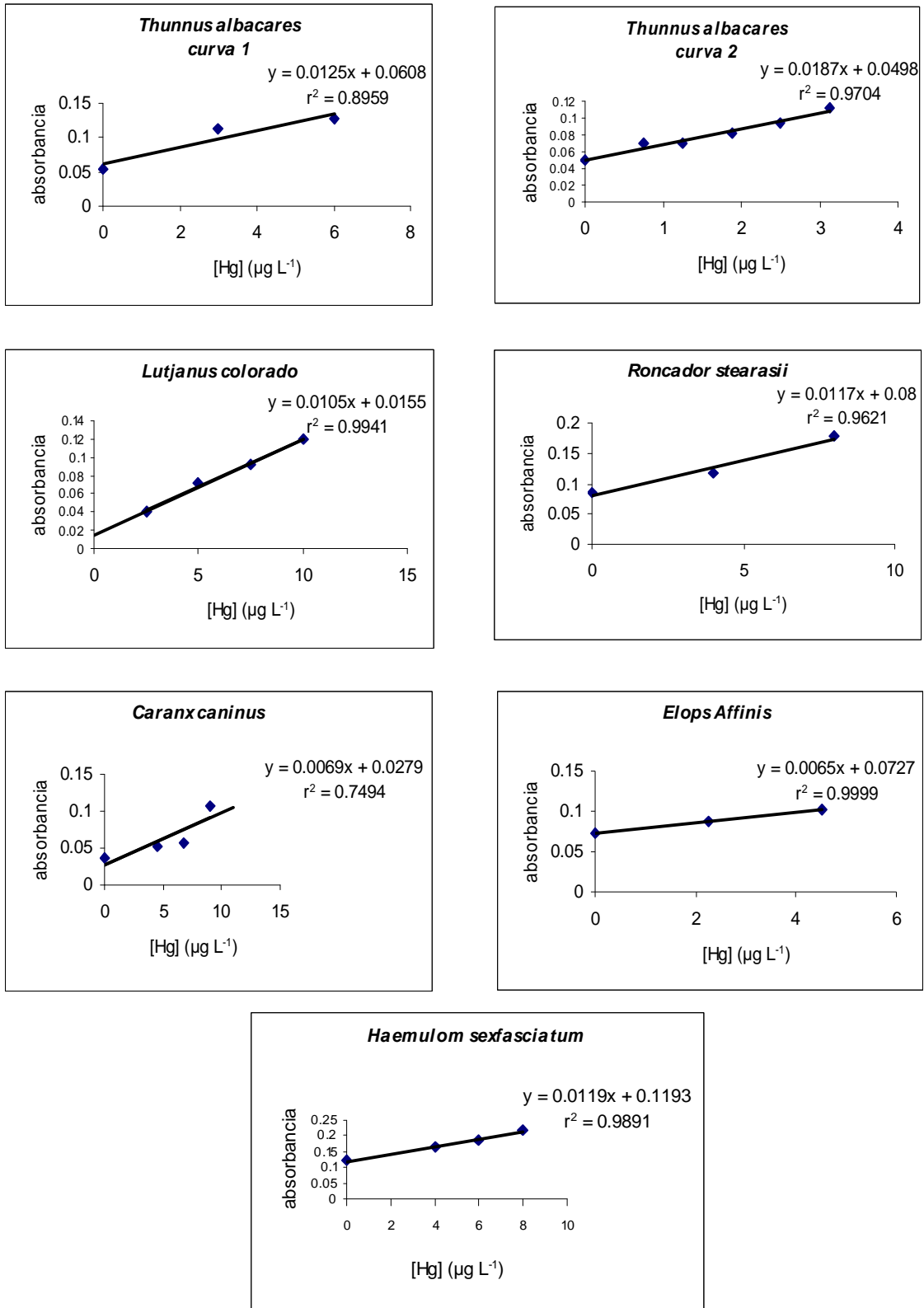


Figura 8b. Curvas de calibración por adición de estándares de MeHgCl a extractos de músculo de las especies de los peces estudiados.

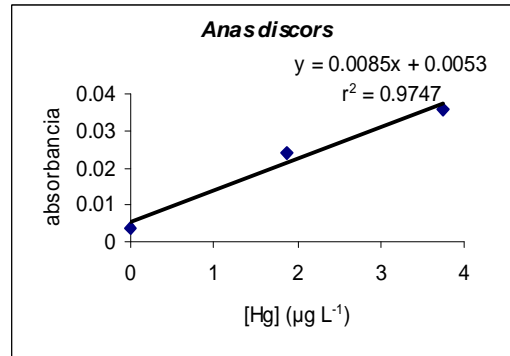
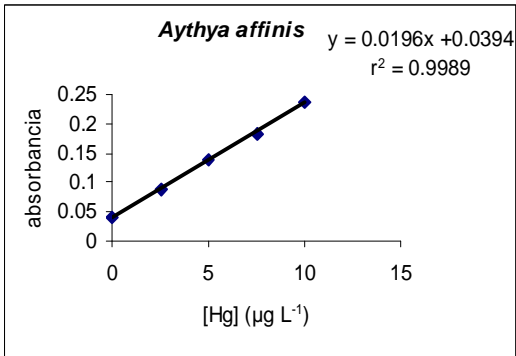
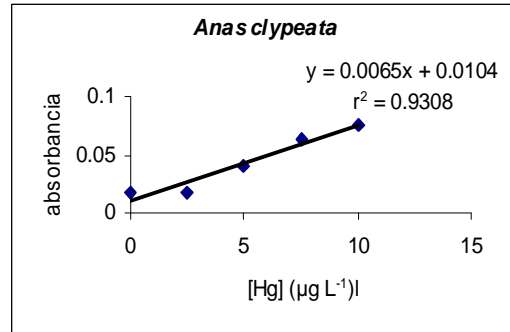
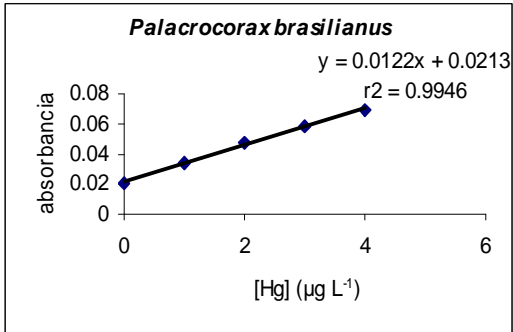
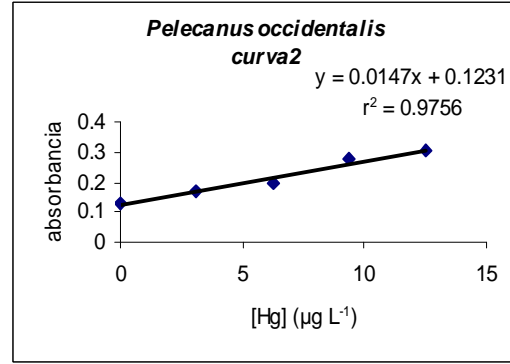
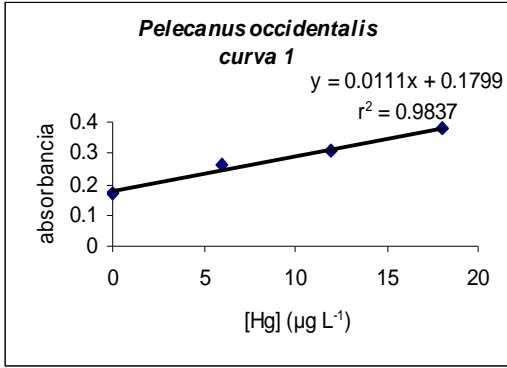


Figura 9. Curvas de calibración por adición de estándares de MeHgCl a extractos de músculo de las especies de las aves estudiadas.

6.4. Cálculos de las concentraciones de mercurio total y mercurio orgánico.

Para describir como se obtuvieron las concentraciones de Hg_T y Hg_{ORG} se muestran los cálculos en las especies: *Gerres cinereus* y *Phalacrocorax brasilianus*:

a) *Gerres cinereus*

En las dos determinaciones Hg_T que se realizaron, las concentraciones detectadas fueron 6.782 y 4.056 $\mu g L^{-1}$. El volumen de la solución (Vol) que se analizó fue de 0.020 L. El factor de dilución (FD) del extracto fue de 2.5 y el peso de tejido liofilizado fue de 0.25 g. La expresión que se utilizó para los cálculos fue la siguiente:

$$[Hg_T] = (\mu g L^{-1}) (Vol) (FD) / \text{gramos de tejido seco}$$

Las concentraciones que se obtuvieron Hg_T fueron 1.356 y 0.932 $\mu g g^{-1}$ respectivamente, por lo que la media y la desviación estándar fueron,

$$[Hg_T] = 1.144 \pm 0.30 \mu g g^{-1}$$

Para obtener la concentración de Hg_{ORG} , se calculó por el método de adición de estándares y por curva directa.

Adición de estándares: para *Gerres cinereus* la ecuación de la curva fue $y = 0.012 x + 0.029$, por lo que despejando x cuando la abscisa tiene un valor de cero (absorbancia), y considerando solo el valor absoluto:

$$x = 0.029 / 0.012 = 2.42 \mu g L^{-1}$$

Donde $x = [Hg_{ORG}]$ en la solución

Si el volumen de la solución analizada fue de 0.025 L (Vol), el factor de dilución (FD) del extracto fue 4 y 0.25 los gramos de tejido liofilizado que se utilizaron, se aplicó la siguiente expresión:

$$[\text{Hg}_{\text{ORG}}] = (\mu\text{g L}^{-1}) (\text{Vol}) (\text{FD}) / \text{gramos de tejido seco}$$

$$[\text{Hg}_{\text{ORG}}] = 0.968 \pm 0.169 \mu\text{g g}^{-1}$$

El cálculo de las desviaciones estándar a partir de los experimentos de adición se describe en la sección 6.7.

Curva directa: cuando no se agregó solución estándar al tejido, la absorbancia fue de 0.0281 (restada la lectura del blanco), por lo tanto, sustituyendo en la ecuación de la curva de calibración de soluciones estándar (curva directa) de la figura 7, la concentración de Hg_{ORG} fue:

$$0.0281 = 0.0144 x + 0.0016$$

Despejando el valor de x, que representa la concentración de Hg_{ORG} :

$$x = (0.0281 - 0.0016) / 0.0144 = 1.84 \mu\text{g L}^{-1}$$

Si el volumen de la solución analizada fue de 0.025 L, el factor de dilución (FD) fue de 4 y los gramos de tejido liofilizado que utilizaron fueron 0.25, se aplicó la fórmula anterior como en los cálculos por adición de estándares:

$$[\text{Hg}_{\text{ORG}}] = 0.736 \pm 0.438 \mu\text{g g}^{-1}$$

La determinación de la desviación estándar por curva directa se describe en la sección 6.6.2.

b) *Phalacrocorax brasilianus*

Para el cálculo de Hg_T se obtuvieron las siguientes lecturas en el espectrofotómetro: 7.321 y 6.822 $\mu\text{g L}^{-1}$, el volumen de la solución analizada, que fue de 0.02 L, el factor de dilución del extracto fue de 2.72 y los gramos de tejido liofilizado fueron 0.27 y 0.24 en las dos determinaciones. Respectivamente. Se aplicó la misma expresión que en la sección anterior, obteniendo,

$$[Hg_T] = 1.487 \pm 0.008 \mu\text{g g}^{-1}$$

Adición de estándares: Se tiene que la ecuación de la curva de calibración correspondiente es $y = 0.0122 x + 0.0213$, por lo que despejando x cuando la abscisa tiene un valor de cero (absorbancia), y considerando solo el valor absoluto....

$$x = 0.0213 / 0.0122 = 1.7459 \mu\text{g L}^{-1}$$

Donde

x = concentración de Hg_{ORG} en la solución

Si el volumen de la solución analizada fue de 0.025 L, el factor de dilución fue de 4, y los gramos de tejido liofilizado que se utilizaron, fueron 0.25g, entonces

$$[Hg_{ORG}] = 0.698 \pm 0.069 \mu\text{g g}^{-1}$$

El cálculo de las desviaciones estándar a partir de los experimentos de adición se describe en la sección 6.7.

Curva directa: cuando no se agregó solución estándar al tejido, la absorbancia fue de 0.02 (restada la lectura del blanco), por lo tanto, a partir de la ecuación de la curva directa $y = 0.0144x + 0.0016$, la concentración de Hg_{ORG} que se obtiene es de:

$$0.02 = 0.0144 x + 0.0016$$

Despejando el valor de x :

$$x = (0.02 - 0.0016) / 0.0144 = 1.277 \mu\text{g L}^{-1}$$

Si el volumen de la solución analizada fue de 0.025 L, el factor de dilución de 4 y 0.25 los gramos de tejido seco que se utilizaron, entonces,

$$[\text{Hg}_{\text{ORG}}] = 0.511 \pm 0.052 \mu\text{g g}^{-1}$$

Las concentraciones de Hg_T y Hg_{ORG} en estas especies y en el resto de las especies analizadas se obtuvieron mediante los mismos cálculos y se muestran en la tabla 6, en la sección siguiente.

6.5. Concentraciones de mercurio orgánico y mercurio total en los organismos estudiados

En la Tabla 6, se muestran las concentraciones obtenidas de mercurio total y de mercurio orgánico de cada una de las matrices, tanto por el método de adición de estándar como por curva directa.

Las concentraciones relativas de metilmercurio o mercurio orgánico en músculo de peces varían por lo general, entre un 60 y 100 % (May et al., 1987; WHO, 1989; Storelli et al., 2002). Para cuantificar la diferencia en la bioacumulación del mercurio inorgánico y el mercurio orgánico en las primeras etapas de la cadena trófica, se necesitan considerar tres factores: Las concentraciones relativas de Hg^{+2} y MeHg, la proporción de cada especie en su forma lipídica permeable, HgCl_2 y MeHgCl y la eficiencia de asimilación de los organismos herbívoros. Aun en aguas oceánicas, donde la concentración de Hg^{+2} es relativamente mas elevada que la concentración de MeHg, el mercurio orgánico es mayormente bioacumulado en los organismos herbívoros que el mercurio inorgánico (Morel et al., 1998). Adicionalmente, la transferencia eficiente del MeHgCl a través de los elevados niveles de la cadena alimenticia, parece deberse a su solubilidad en lípidos, lo cual permite su parcial retención en los tejidos grasos de los organismos. En peces, sin embargo, los niveles de MeHg en

tejido muscular es más importante que en lípidos, evidenciando que la bioacumulación de este no puede explicarse solo por su liposolubilidad. En el caso de peces, parece haber una elevada especificidad de las paredes del intestino por la absorción del MeHg. El metilmercurio es reabsorbido en un proceso denominado recirculación enterohepática (Gordon y Skett, 1986), lo cual ocasiona una retención de mercurio en los organismos durante largos periodos. Además, el metilmercurio es conocido por su afinidad por los grupos nucleofílicos en enzimas involucradas en las síntesis proteicas, reacciona con los aminoácidos que contienen el grupo sulfhidrilo (-HS), como la cisterna con el plasma (Dixon y Jones, 1994). El complejo de metilmercurio se forma a partir de la hidrólisis del glutatión como cisteína, la cual es un constituyente de este péptido. La estructura de este complejo de cisteína es muy parecida a la de un gran aminoácido neutral, como la metionina (Clarkson, 1994).

Para el cálculo de las concentraciones relativas de mercurio orgánico que muestran en la tabla 7, se utilizaron los datos de concentración obtenidos por el método de adición de estándares, en razón de que es el método que produce las concentraciones más exactas, como se discute en las secciones siguientes. En esta tabla se observa que de las diez especies de peces analizadas, siete están dentro de este intervalo y solo tres presentaron un porcentaje menor de mercurio orgánico. Considerando que las concentraciones relativas fueron calculadas con el valor de las concentraciones medias en cada tejido, estas concentraciones pudiesen ser un poco más elevadas que las estimadas, si tomamos en cuenta las desviaciones estándar. En aves, también se ha encontrado en tejido de músculo principalmente metilmercurio o mercurio orgánico (Thompson et al., 1991; Houserová et al., 2006). En el caso de las cinco especies de aves analizadas, en este estudio, tres presentaron mayormente mercurio orgánico (*Pelecanus occidentalis*, *Anas clypeata* y *Aythya affinis*).

Tabla 6. Concentraciones de mercurio orgánico y mercurio total en el tejido muscular de diversas especies de peces y aves.

Especies	Mercurio total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mercurio orgánico ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	X \pm D. E. (n = 2)	Por adición de estándares (n = 5) X \pm D. E.	por curva directa
Peces			
<i>Gerres cinereus</i>	1.146 \pm 0.30	*0.912 \pm 0.155	*1.245 \pm 0.438
<i>Caranx caninus</i>	0.786 \pm 0.175	**0.809 \pm 0.291	0.475
<i>Charcharinus Leucas</i>	2.490 \pm 0.798	1.109 \pm 0.213	*2.149 \pm 1.199
<i>Lutjanus colorado</i>	0.707 \pm 0.705	**0.236 \pm 0.071	0.153
<i>Roncador stearnsii</i>	1.106 \pm 0.154	***1.094 \pm 0.361	0.931
<i>Haemulom sexfasciatum</i>	2.412 \pm 0.088	**1.604 \pm 0.176	1.340
<i>Trachionotus paitensis</i>	1.077 \pm 0.127	0.957 \pm 0.124	*1.187 \pm 0.767
<i>Nematistius pectoralis</i>	1.837 \pm 0.083	*0.885 \pm 0.176	*1.258 \pm 0.619
<i>Elops affinis</i>	1.335 \pm 0.108	***1.790 \pm 0.377	0.790
<i>Thunnus albacares</i>	0.807 \pm 0.72	*0.852 \pm 0.060	*1.064 \pm 0.062
Aves			
<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	1.487 \pm 0.008	0.698 \pm 0.069	*0.511 \pm 0.052
<i>Pelecanus occidentalis</i>	2.854 \pm 0.027	2.680 \pm 0.262	*2.776 \pm 0.693
<i>Anas clypeata</i>	0.473 \pm 0.447	***0.512 \pm 0.379	0.373
<i>Anas discors</i>	0.766 \pm 0.073	0.200 \pm 0.147	0.049
<i>Aythya affinis</i>	1.057 \pm 0.273	0.643 \pm 0.048	0.885

*n=6; **n=4; ***n=3 *'n=2

Tabla 7. Porcentajes de mercurio orgánico en las aves y peces estudiados.

Organismo	% HgORG
Peces	
<i>Gerres cinereus</i>	79.6
<i>Caranx caninus</i>	100
<i>Carcharhinus Leucas</i>	44.5
<i>Lutjanus colorado</i>	33.4
<i>Roncador stearasii</i>	98.9
<i>Haemulom sexfasciatum</i>	66.5
<i>Trachionotus paitensis</i>	92.6
<i>Nematisitius pectorales</i>	48.2
<i>Elops affinis</i>	100
<i>Thunnus albacares</i>	100
Aves	
<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	47.0
<i>Pelecanus occidentales</i>	93.9
<i>Anas clypeata</i>	100
<i>Anas discors</i>	26.1
<i>Aythya affinis</i>	60.8

6.6. Parámetros Analíticos

6.6.1 Linealidad

El método presentó buena linealidad en las curvas, en todo el intervalo de concentraciones adicionadas del estándar de MeHgCl en cinco especies: *Charcharhinus leucas* (0 - 5 $\mu\text{g L}^{-1}$), *Lutjanus colorado* (0 - 10 $\mu\text{g L}^{-1}$), *Haemulom sexfasciatum* (0 - 8 $\mu\text{g L}^{-1}$), *Roncador stearasii* (0 - 8 $\mu\text{g L}^{-1}$) y *Nematistius pectoralis* (0 - 9 $\mu\text{g L}^{-1}$), mientras que en *Thunnus albacares* y *Elops affinis* solo hubo linealidad de 0 a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ del intervalo total de concentraciones adicionadas. En *Gerres cinereus* el método presentó linealidad de 0 a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ y en *Trachionotus paitensis* de 0 a 8 $\mu\text{g L}^{-1}$. El método presentó buena linealidad en los niveles de concentración de MeHgCl en que fueron adicionadas todas las matrices de aves, excepto en *Anas discors* que presentó linealidad solo en el intervalo de 0 a 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Fig. 8a, 8b, 9).

6.6.2. Precisión y límite de detección (por curva directa).

La precisión se define como el grado de concordancia entre mediciones repetidas de una misma cantidad de muestra en una o varias corridas (Miller y Miller 1988). El cálculo de la precisión es para evaluar la reproducibilidad de los valores obtenidos en una misma muestra a través del seguimiento de la técnica desde los pasos iniciales.

El límite de detección se define como la concentración más pequeña de un analito que puede detectarse con certeza razonable (Jonson y Maxwell, 1981) generalmente calculada como dos o tres veces la desviación estándar del ruido del fondo del instrumental (Van Loon, 1980). Para este análisis se seleccionó tejido de una ave (*Phalacrocorax brasilianus*) y se realizaron seis determinaciones de mercurio orgánico en una corrida de la técnica analítica completa. Los valores de absorbancia leídos se presentan en la Tabla 8. Se convirtieron a $\mu\text{g g}^{-1}$ con la curva de calibración de las soluciones estándar (Fig. 7), restando antes la lectura del blanco a cada una de ellas. La reproducibilidad o desviación estándar de los análisis realizados al misma tejido fue de $0.163 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ y el límite de detección (dos veces la desviación estándar) de $0.326 \mu\text{g L}^{-1}$ o bien, 0.052 y $0.104 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ de peso seco de muestra, respectivamente.

También se calcularon las desviaciones estándar por curva directa de seis tejidos (*G. cinereus*, *C. leucas*, *T. paitensis*, *N. pectoralis* y *P. occidentalis*) a partir de dos determinaciones independientes de mercurio orgánico. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 8. Precisión y límite de detección para la cuantificación de Hg_{ORG} en el tejido de *Phalacrocorax brasilianus* por curva directa.

No de determinaciones	Absorbancia	Concentración de Hg _{ORG} (µg L ⁻¹)
1	0.0233	1.5069
2	0.0221	1.4236
3	0.0286	1.875
4	0.0233	1.5069
5	0.0258	1.6806
6	0.0223	1.5486
Promedio		1.5903
Desviación Estándar		0.16286
Límite de Detección		0.32572

6.6.3. Validación de la Técnica (Exactitud)

La exactitud se define como la proximidad al valor verdadero de un estándar o muestra conocida cuya matriz debe ser similar a la de las muestras a analizar (Miller y Miller, 1988). Se estima a partir del análisis de éste estándar o muestra conocida y de su comparación con los valores obtenidos del análisis de las muestras problema. La exactitud se mide en términos de porcentaje de recuperación (%R) que se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\%R = (\text{valor medido}/\text{valor de referencia}) \times 100$$

A partir de la curva de calibración por adición de estándar que se obtuvo en el análisis del material de referencia utilizado (Fig.10) y de la curva de calibración de las soluciones estándar de MeHgCl (Fig. 7), la cual se ha denominado en el presente trabajo, curva directa, se realizaron los siguientes cálculos:

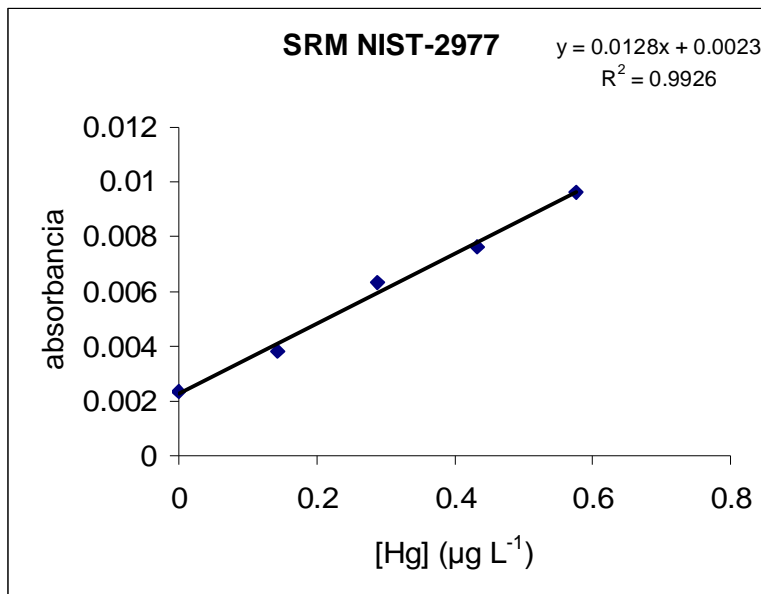


Figura 10. Curva por adición de estándares del material de referencia certificado NIST-2977.

a) Por adición de estándares: En la curva de la figura, si se prolonga la recta hasta que se intercepte con la abscisa (cuando la absorbancia es cero), se obtiene el valor negativo de la concentración de Hg_{ORG} en el extracto de la muestra analizada, si se toma solo el valor absoluto entonces:

Cuando $y=0$ $x = 0.0023/0.0128 = 0.1797 \mu\text{g L}^{-1}$

Donde $x =$ concentración de Hg_{ORG} en el extracto

Puesto que el factor de dilución (FD) fue de 2, el volumen (Vol) de la solución analizada fue de 0.02 L y 0.2 los gramos de tejido del material de referencia utilizado, entonces,

$$[Hg_{ORG}] = (\mu\text{g L}^{-1})(FD) (Vol)/0.2 \text{ g} = 0.03592 \mu\text{g g}^{-1}$$

Aplicando la fórmula para el % de recuperación expresada anteriormente, sabiendo que el valor que se reporta para el material de referencia analizado,

NIST-2977 que corresponde a tejido de mejillón es de $0.0362 \pm 1.7 \mu\text{g}$ de MeHg (Hg_{ORG}) como Hg /g de peso seco, se obtiene:

$$\% R = (0.03592 / 0.0362) \times 100 = 99.2 \%$$

b) Por curva directa: Cuando no se agrega solución estándar al material de referencia ($x=0$), la lectura correspondiente de absorbancia es de 0.00233 (restada la lectura del blanco), por lo tanto, usando la curva de calibración directa de la figura 7:

$$0.00233 = 0.0144 x + 0.0016$$

Despejando x $x = (0.00233 - 0.0016) / 0.0144 = 0.0507 \mu\text{g L}^{-1}$

Haciendo los mismos cálculos por dilución del extracto,

$$[\text{Hg}_{\text{ORG}}] = (\mu\text{g L}^{-1}) (\text{FD}) (\text{Vol}) / 0.2 \text{ g} = 0.01014 \mu\text{g g}^{-1}$$

Con lo cual se obtiene un % de recuperación de:

$$\% R = (0.010140 / 0.0362) \times 100 = 28.01\%$$

En la Tabla 9 se resumen los resultados, tanto por el método de adición estándares como por curva de calibración directa.

Tabla 9. Porcentajes de recuperación de mercurio orgánico en el material de referencia.

Material de referencia	Valor de referencia ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Por adición de estándar ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Por curva directa ($\mu\text{g g}^{-1}$)
NIST-2977 (Tejido suave de mejillón)	0.0362 ± 1.7	0.03592	0.01014
% recuperación		99.2%	28.01%

6.7. Análisis estadístico y tratamiento de los datos

Con la finalidad de hacer un análisis comparativo de los dos métodos (curva directa y adición de estándares), se realizó la prueba estadística de la comparación de medias de dos muestras, en siete de los quince tejidos analizados y de los cuales se obtuvo el dato de desviación estándar por ambos métodos (Miller y Miller, 1988). La aceptación ($t_{\text{exp}} < t_{\text{teórica}}$) de la hipótesis nula (H_0) implica que las concentraciones de mercurio orgánico obtenidas por curva directa y por adición de estándares, pertenecen a la misma población de datos, es decir, se requiere probar si la diferencia de medias ($x_1 - x_2$) es significativamente diferente de cero. Se asume que las desviaciones estándar pertenecen a poblaciones distintas, por lo que se emplearon las ecuaciones:

$$t = (x_1 - x_2) / (s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^{1/2}$$

Donde el número de grados de libertad, se obtienen de la siguiente expresión:

$$\text{G.L.} = \left\{ (s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2)^2 / \left[(s_1^2/n_1)^2/n_1 + 1 \right] + \left[(s_2^2/n_2)^2/n_2 + 1 \right] \right\} - 2$$

Para el cálculo de las desviaciones estándar o los intervalos de confianza de los datos de concentraciones de mercurio orgánico obtenidas mediante la curva por adición de estándares de los tejidos estudiados, se utilizaron las siguientes ecuaciones (Miller y Miller, 1988):

$$s_{XE} = s_{y/x} / b \left\{ 1/n + y^2/b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2 \right\}^{1/2}$$

Donde s_{XE} = desviación estándar de extrapolación del valor de concentración de Hg_{ORG} .

$s_{y/x}$ = es un estadístico que representa la desviación estándar de los valores de la absorbancia experimentales, con respecto a los valores de absorbancia obtenidos con la ecuación de regresión y se calcula mediante la ecuación:

$$s_{y/x} = \left\{ \sum (y_i - \bar{y})^2 / n - 2 \right\}^{1/2}$$

b= es la pendiente de la ecuación de la regresión

n= es el número de datos de la curva

$\sum (x_i - \bar{x})^2$ = es la suma de las diferencias al cuadrado de las concentraciones de los estándares adicionados de MeHgCl, respecto a la media de estos valores.

Para el cálculo de los límites de confianza de los valores obtenidos de las concentraciones de Hg_{ORG} para cada matriz, no se consideró el valor del estadístico t. Los resultados se muestran en la tabla 10. Como se explicó en la sección 6.3, se repitieron las curvas para ciertos tejidos donde se obtuvieron desviaciones estándar elevadas y había cantidad suficiente de estos. Donde se tenían dos curvas por tejido, se seleccionó la curva con menor desviación estándar, salvo en los casos de *T. paitensis* y *N. pectoralis*, las cuales presentaron desviaciones ligeramente mayores en la segunda curva, pero se seleccionaron estas debido a que tienen un mayor número de datos que por lo general conducen a un valor más exacto de concentración. En las segundas curvas, se incrementó el número de puntos dato y se ajustó al intervalo de linealidad que presentaron las matrices en las primeras curvas.

En la Tabla 11 se muestran los resultados de los valores del estadístico t teórico y experimental, para la prueba de hipótesis. Los valores críticos se obtienen de la distribución t-Student para una probabilidad del 90%.

Tabla 10. Concentraciones de mercurio orgánico obtenidas mediante los experimentos de adición de estándares, con la desviación estándar y los coeficientes de variación correspondientes.

Especie	Concentraciones de Hg _{ORG} (µg g ⁻¹)			
	curva 1	CV(%)	curva 2	CV(%)
Peces				
<i>Gerres cinereus</i>	0.968±0.179	18.5	0.912± 0.155	17.0
<i>Caranx caninus</i>	0.809± 0.291	36.0		
<i>Carcharhinus leucas</i>	1.387± 0.495	35.7	1.109±0. 213	19.2
<i>Lutjanus colorado</i>	0.236±0.71	30.1		
<i>Roncador stearasii</i>	1.094± 0.361	33.0		
<i>Haemulom sexfasciatum</i>	1.604± 0.176	11.0		
<i>Trachionotus paitensis</i>	1.068± 0.085	8.0	0.957± 0.124	13.0
<i>Nematisitius pectoralis</i>	0.666± 0.165	24.8	0.885± 0.176	19.9
<i>Elops affinis</i>	1.790± 0.377	21.1		
<i>Thunnus albacares</i>	0.884± 0.512	57.9	0.852± 0.060	7.0
Aves				
<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	0.698± 0.069	9.9		
<i>Pelecanus occidentalis</i>	2.593± 0.380	14.7	2.680± 0.262	9.8
<i>Anas clypeata</i>	0.512± 0.379	74.0		
<i>Anas discors</i>	0.200± 0.147	73.5		
<i>Aythya affinis</i>	0.643± 0.048	7.5		

De la Tabla 10, se observa que las concentraciones de mercurio orgánico obtenidas por los dos métodos, de las siete especies, dos presentaron diferencias significativas (*Thunnus albacares* y *Phalacrocorax brasilianus*). En el resto de los tejidos, las concentraciones de mercurio orgánico, no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, cabe hacer notar que, con excepción del *P. brasilianus*, en el cual se obtuvo la desviación estándar a partir de seis determinaciones independientes (por curva directa), en el resto de las especies, las desviaciones se obtuvieron a partir de dos determinaciones. En los dos tejidos antes mencionados, que presentaron diferencias significativas, los datos de las

desviaciones estándar que se calcularon para cada método fueron menores en relación a los demás tejidos.

Tabla 11. Valores críticos teóricos y experimentales de la distribución t-Student, para la prueba de hipótesis: comparación de dos medias.

Organismo	t exp	t teórico con P(90%)	Ho
Peces			
<i>Gerres cinereus</i>	0.042	6.31	se acepta
<i>Carcharhinus leucas</i>	2.21	6.31	se acepta
<i>Trachionotus paitensis</i>	1.42	6.31	se acepta
<i>Nematisitius pectoralis</i>	0.146	6.31	se acepta
<i>Thunnus albacares</i>	5.2	1.94	se rechaza
Aves			
<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	5.35	1.83	se rechaza
<i>Pelecanus occidentalis</i>	1.16	6.31	se acepta

6.4. Confiabilidad y calidad analítica

Realizando un análisis comparativo de cada uno de los parámetros analíticos de la estrategia completa diseñada, en relación a otras técnicas desarrolladas, y considerando que es una técnica no cromatográfica, se puede decir que los datos obtenidos tienen una calidad aceptable; por las siguientes razones:

(a) Exactitud: Mediante la técnica empleada se obtuvo un buen nivel de recuperación del material de referencia NIST-2977 (99.2%) por el método de adición de estándar, considerando que en diversos trabajos en la literatura, se reportan niveles de recuperación similares o menores en la cuantificación de mercurio orgánico (Ubillús, 2000; Quevauviller y Morabito, 2000). Además, la concordancia con los niveles de mercurio total encontrados en los mismos tejidos analizados mediante la técnica ampliamente conocida y aplicada de Hatch y Ott (1968), modificado por Loring y Rantala (1995), confirman la validez de los niveles de concentración de Hg_{ORG} detectados mediante la técnica analítica propuesta.

(b) Precisión: No obstante que el método por adición de estándar produce desviaciones estándar elevadas; se considera que estos valores son aceptables, ya que del total de tejidos analizados, solo dos presentaron coeficientes de variación elevados: de más del 70% para *Anas discors* y para *Anas clypeata*; en el resto de los tejidos, los coeficientes fluctuaron entre un 7 y 36 % aproximadamente. La media de las concentraciones de mercurio orgánico de todos los tejidos analizados fue de $0.999 \mu\text{g g}^{-1}$ como Hg y la media de las desviaciones estándar fue de $0.194 \mu\text{g g}^{-1}$ (peces: $1.024 \pm 2.00 \mu\text{g g}^{-1}$, aves: $0.947 \pm 0.181 \mu\text{g g}^{-1}$). Otros trabajos han registrado coeficientes de variación alrededor del 60% o más en algunos casos, en la medición de metilmercurio o mercurio orgánico (Storelli et al., 2005; Houserová et al., 2007). Por otra parte, al repetir las curvas por adición de estándares, se obtuvieron concentraciones de Hg_{ORG} , relativamente cercanas a las obtenidas con las primeras curvas y las desviaciones por lo general disminuyeron (Tabla 10). Por curva directa se obtuvo una precisión de $0.052 \mu\text{g Hg g}^{-1}$ de muestra, como MeHgCl y un CV del 10%.

(c) Límite de detección: El límite de detección (LD) calculado como dos veces la desviación estándar que se obtuvo por curva directa, fue de aproximadamente $0.104 \mu\text{g de Hg}_{\text{ORG g}^{-1}}$ de tejido seco o bien de $0.3257 \mu\text{g de Hg}_{\text{ORG L}^{-1}}$. Este valor es menor, en relación con algunos límites de detección reportados en la literatura, sin embargo existen diversas técnicas analíticas basadas en una separación cromatográfica muy sensibles, con límites de detección del orden de picogramos (Tabla 3). El LD calculado en la presente metodología, permite detectar niveles de mercurio orgánico que están por debajo de los valores límite de riesgo (entre 0.4 y $2 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso húmedo), establecidos por las regulaciones internacionales para consumo de peces y otros organismos marinos (Storelli et al, 2002; Gómez-Ariza et al., 2004; Syr-Song et al., 2004).

6.9. Comparación de los niveles de mercurio orgánico en organismos, en relación a otros estudios.

En la tabla 12, se presentan niveles de concentraciones de mercurio orgánico o metilmercurio, de algunos tejidos de músculo de peces pelágicos de diversas localidades reportados en la literatura y se presentan también, las concentraciones de mercurio orgánico determinadas en este estudio, de algunas especies de peces, únicamente con la finalidad de hacer una comparación cualitativa de los valores. Esto es en razón de que no se podría realizar algún análisis estadístico, ya que solo se analizó un solo tejido por especie. En esta tabla se puede observar que los niveles encontrados en este estudio están por debajo de los encontrados en peces de otras zonas, sin embargo, los niveles encontrados de mercurio orgánico son moderadamente elevados ($0.236-1.79 \mu\text{g g}^{-1}$ de tejido seco, como Hg), por lo que es necesario realizar estudios más amplios sobre la dinámica y distribución del mercurio orgánico o metilmercurio en agua, biota y sedimento en las zonas costeras de Sinaloa y en general de nuestro país.

No obstante que existen muchos trabajos de cuantificación de mercurio total en diversos tejidos de aves piscívoras en la literatura, hay pocos datos disponibles de metilmercurio o mercurio orgánico en tejido de músculo de aves, en diversas zonas geográficas (Henny et al., 2002, Fournier et al., 2002, Heinz y Hoffmann, 2004, Houserová et al., 2006). Houserová et al., (2007), realizaron un estudio de niveles de metilmercurio en tres especies de aves (*Buteo buteo*, *Podiceps cristatus*, *Phalacrocorax carbo*) en un ecosistema acuático de Záhlinice en la República Checa, en tejidos de músculo, intestino, hígado y riñón. Los contenidos relativos de MeHg en los tejidos de músculo estuvieron entre el 71.3% y el 93.7%. Los valores medios de las concentraciones de MeHg en los tejidos de músculo de variaron entre $1.017 \mu\text{g g}^{-1}$ (*Buteo buteo*) a $3.036 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco (*Phalacrocorax carbo* adultos), como Hg.

Tabla 12. Niveles de mercurio orgánico encontrados en tejidos de peces pelágicos en diferentes zonas geográficas.

Especies	Localidades	Concentración $\mu\text{g g}^{-1}$ peso seco Hg_{ORG}	
		media \pm D. E.	rango
<i>Merlangus merlangus</i>	Mar Báltico ¹	0.027 \pm 0.006	0.0198 - 0.0403
<i>Xiphias gladius</i>	Chile ²	6.05 \pm 0.065	5.99 - 6.118
<i>Galeus melastomus</i>	Mar Adriático (Italia) ³	2.11 \pm 0.960	0.470 -3.70
<i>Galeus melastomus</i>	Mar Egeo ³	1.55 \pm 1.23	0.58 - 4.32
<i>Merluccius merluccius</i>	Mar Jónico (Grecia) ⁴	0.090 \pm 0.070*	n.d.- 0.30
<i>Merluccius merluccius</i>	Mar Adriático (Italia) ⁴	0.160 \pm 0.100*	0.040- 0.048
<i>Carcharhinus leucas</i>	Costa de Sinaloa(México) ⁵	1.109 \pm 0.213	-
<i>Thunnus albacares</i>	Costa de Sinaloa(México) ⁵	0.852 \pm 0.060	-
<i>Haemulon sexfasciatum</i>	Costa de Sinaloa(México) ⁵	1.604 \pm 0.176	-

n.d.= no detectable, 1May K. et al.(1987); 2 Ubillús et al.,2000; 3 Storelli et al., 2002c; 4 Storelli et al., 2005; 5 Este estudio.

Esta última especie de cormorán presentó los mayores niveles de MeHg. De acuerdo con Boening (2000), el cormorán doble cresta, parece ser de las especies que más eficientemente acumulan elevados niveles de mercurio. En el presente estudio, las dos especies que presentaron los mayores niveles de mercurio orgánico fueron el *Phalacrocorax brasilianus* y *Pelecanus occidentalis* (Tabla 6), que son aves piscívoras. En el resto de las especies analizadas (*Anas discors*, *Aythya affinis* y *Anas clypeata*), las cuales son omnívoras, los niveles fueron menores. Las concentraciones de mercurio orgánico encontrados en el tejido muscular en las aves del ecosistema acuático de Záhlinice, fueron mayores que los encontrados en este estudio. Los concentraciones relativas de Hg_{ORG} estuvieron entre 26.1 y 100%.

7. CONCLUSIONES

(1) La técnica analítica que se propone en el presente trabajo para la cuantificación de mercurio orgánico en músculo de aves y peces, es un método confiable. Los parámetros analíticos (exactitud, precisión y límite de detección) que se obtienen en relación a otros que se han publicado mediante diversos métodos para la cuantificación de metilmercurio o mercurio orgánico, así lo confirman. Considerando que es una técnica no cromatográfica, el límite de detección, la exactitud, y las desviaciones estándar están en un nivel aceptable. Esto es, un porcentaje de recuperación cercano al 100% del material de referencia; un límite de detección menor a los valores de riesgo de contaminación por mercurio y desviaciones estándar que permiten que los resultados sean reproducibles.

(2) La técnica propuesta tiene un bajo costo en relación a otras técnicas que requieren separaciones cromatográficas (GC o HPLC) y una detección con espectrometría de masas (MS), o fluorimetría (AFS).

(3) La presente técnica permite la detección del mercurio orgánico, como mercurio inorgánico, mediante espectrofotometría de absorción atómica con generación de vapor en frío (CV-AAS). Este tipo de detección es ampliamente utilizado en los laboratorios ambientales, por lo que esta técnica es factible de ser implementada con relativa facilidad. También, el hecho de manipular el mercurio orgánico como inorgánico implica una mayor estabilidad del mercurio y consecuentemente, menores riesgos para la salud durante la ejecución de la técnica.

(4) Puesto que es un método por lotes o grupos de muestras, es posible flexibilizar los tiempos de uso del espectrofotómetro. Una vez estabilizados los extractos con ácido nítrico y dicromato de potasio, permite el almacenamiento de extractos durante un cierto tiempo (días a semanas) y así analizar un mayor número de muestras en una sola corrida.

(5) Entre las desventajas de la técnica están que el tiempo de análisis es largo y consecuentemente la probabilidad de errores en la ejecución de la misma es elevada. Así mismo, no se pueden obtener resultados en tiempo real.

(6) Otras de las desventajas de la técnica, es que es una técnica de aproximación no cromatográfica y por lo tanto, no se puede cuantificar metilmercurio, sino mercurio orgánico. No obstante que en peces, se ha demostrado que los niveles son equivalentes o aproximadamente iguales.

(7) Cuando es necesario emplear el método por adición de estándares para compensar las interferencias de matriz, el tiempo y el costo del análisis se incrementa, así como cantidades de muestra que se requieren.

(8) El tipo de matriz es fundamental en la calidad de los resultados, por ello es necesario realizar análisis previos para cuantificar el mercurio total, con la finalidad de diseñar adecuadamente los experimentos de adición de estándares, en caso de ser necesario, ya que no todas las matrices presentan interferencias. Así mismo, la determinación previa de mercurio total, permite contar con el esquema de especiación completo (formas orgánica e inorgánica del mercurio).

(9) Las especies que presentaron diferencias significativas entre las concentraciones de mercurio orgánico obtenidas por curva directa y adición de estándares, fueron: *Thunnus albacares* y *Phalacrocorax brasilianus*. Estas especies presentaron las desviaciones estándar más bajas por ambos métodos.

(10) Si un tejido no se digiere completamente (fotooxidación completa), los extractos generan problemas de saponificación, formación de espuma en el detector y consecuentemente se incrementan las interferencias de matriz, debido a la liposolubilidad del mercurio orgánico.

(11) La forma predominante de mercurio en los tejidos de músculo, tanto en peces, como en aves, es la forma orgánica. De los diez tejidos de peces analizados, en siete de ellos se obtuvo un porcentaje entre el 60% a 100%. En aves, en tres de cinco especies, también estuvieron en estos porcentajes, como se ha observado en la generalidad de los estudios realizados en tejidos de músculo de aves y peces en la literatura.

(12) Los niveles de mercurio orgánico en los organismos, estuvieron por debajo de aquellos encontrados en especies de otras zonas de estudio, sin embargo, no se puede concluir acerca de nivel de contaminación de la zona, debido a que el número de muestras analizadas pudieron ser insuficientes y no representativas en este estudio. No obstante, cabe señalar que las fluctuaciones en las concentraciones de mercurio orgánico encontradas en las diversas especies analizadas: peces ($0.236 - 1.79 \mu\text{g g}^{-1}$ como Hg) y aves ($0.20 - 2.68 \mu\text{g g}^{-1}$ como Hg), sugieren la necesidad de estudios mas amplios sobre el impacto ambiental que involucre la especiación del mercurio, biomonitoreos de aves y peces, así como de otros organismos, con la finalidad de conocer la acumulación de mercurio orgánico en las cadenas tróficas, y en general, de la biogeoquímica de las especies del mercurio en los ecosistemas acuáticos de Sinaloa y en general de nuestro país.

8. RECOMENDACIONES

Del presente estudio se hacen las siguientes recomendaciones para la aplicación de la técnica propuesta en futuros trabajos de especiación de mercurio:

Si bien es cierto que el tiempo de análisis es largo, para su aplicación en análisis de rutina, se sugiere el cálculo de factores medios de recuperación para una amplia variedad de matrices, con un mínimo de tres diferentes niveles de concentración de mercurio orgánico, con la finalidad de obtener factores de recuperación mas representativos y así abatir los tiempos y costos del análisis. El uso de estos factores, además del análisis de un material de referencia certificado cada determinado lote de muestras, permitiría un adecuado control de calidad de los datos obtenidos mediante esta técnica.

Actualmente, no existen métodos generales aplicables para la estimación de recuperaciones que estén totalmente exentos de inconvenientes. Esto es particularmente así, en el campo de la especiación analítica, en el cual no se tenía el hábito de aplicar factores de corrección. En la práctica, un estudio completo para estimar la recuperación de la extracción en cada caso en particular (para cada matriz analizada y para cada compuesto) es posible, pero el tiempo que se consume no permite que sea aplicable para análisis de rutina. El uso de los CRMs y los experimentos de adición son solo alternativas, las cuales tienen ciertas limitaciones expresadas anteriormente. (Quevauviller-Morabito, 2000; Leermarkers et al, 2005).

Para una evaluación de las interferencias de matriz, se sugiere cuantificar el contenido de ácidos grasos y hacer análisis estadísticos comparativos en un mínimo de tres niveles de concentración de mercurio en cada matriz, contrastando las concentraciones obtenidas por curva directa y por curva de adición de estándares.

Se sugiere tomar todas las medidas de seguridad y limpieza necesarias, indicadas en la metodología, particularmente, en la manipulación del estándar de cloruro de metilmercurio y en la realización de los análisis, para evitar accidentes y posibles contaminaciones que alteren los resultados de la especiación. Es importante preparar soluciones estándar secundarias de MeHgCl semanalmente, mantenerlas en adecuada refrigeración ($<4^{\circ}\text{C}$) y en la oscuridad para evitar su envejecimiento y la pérdida del estándar.

8. LITERATURA CITADA

- Adams W. J., Prince H. H., 1996. Mercury levels in the tissues of ring-necked pheasant fed two mercurial fungicides. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 15(3):316-323.
- Al – Saleh I., Al - Doush., 2002. Mercury content in Shrimp and Fish species from the Gulf Cost of Saudi Arabia. *Environmental Contamination and Toxicology* 68: 576-583.
- Anderson H. A., Harahan L. P, Smith, A. Draheim L., Kanarek, Olsen J., 2004. The role sport-fish consumption advisories in mercury risk communication: a 1998-1999 12-state survey of women age 18-45. *Environmental Research*. 95: 315-324.
- Akagi H., Mortimer D. C., Miller D. R., 1979. Mercury methylation and partition in aquatic systems. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 1979; 80: 889-892.
- Arvizu - Merín L. M., 2003. Niveles de concentración de mercurio en tejidos de cinco especies de aves acuáticas residentes del sistema lagunar Altata- Ensenada del Pabellón Sinaloa, recolectadas durante el invierno de 1999-2000. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico del Mar, Mazatlán, Sinaloa: 160.
- Baeyens W., Ebinghaus R., Vasiliev, O. (Eds.), 1996. *Global and Regional Mercury Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances*. NATO ASI Series. Kluwer Academic Press, Dordrecht.
- Bagheri H., Gholami A., 2001. Determination of very low levels of dissolved mercury (II) and methylmercury in river waters by continuous flow with on-line UV decomposition and cold-vapour atomic fluorescence spectrometry after pre-concentration on a silica-gel-2-mercaptobenzimidazol sorbent. *Talanta* 55: 1141-1150.
- Bartlet P. D., Craig P. J., Morton S. F., 1977. Behaviour of mercury species in isolated estuarine sediment samples-growth and decay of methylmercury during storage. *Nature* 267:606-608.
- Barregard L., Horvat M, Schutz A., 1993. No indication of in Vivo Methylation of inorganic Mercury in Chloralkali Workers. *Environmental Research* 67: 160-167.

- Boening D. W., 1999. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* 40 (2000): 1335-1351.
- Boush G. M., Thieleke J. R., 1983. Total mercury content in Yellowfin and Bigeye Tuna. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 30: 291-297.
- Bullock O. R., 2000. Modeling assessment of transport and deposition patterns of anthropogenic mercury air emissions in the United States and Canada. *The Science of the Total Environment* 259: 145-157.
- Burger J., 1993. Metals in avian feathers: Bioindicators of environmental pollution. *Reviews in Environmental Toxicology*, 5: 203-311.
- Burger J., 1997. Ecological effects and biomonitoring for mercury in tropical ecosystems. *Water Air and Soil Pollution*. 97: 265-272.
- Burger J., Gochfeld M., 1997. Risk, mercury levels, and birds: relating adverse laboratory effects to field biomonitoring. *Environmental Research*, 75: 160-172.
- Burger J., Gochfeld M., 2000. Metals levels in feathers of 12 species of seabirds from Midway Atoll in the northern Pacific Ocean. *The Science of the Total Environment*, 257: 37-52.
- Carpi A., 1997. Mercury from combustion sources: a review of the chemical species emitted and their transport in the atmosphere. *Water, Air, and Soil Pollution*, 98:241-254.
- Clarkson T. W., 1994. The Toxicology of Mercury and its Compounds In.: Watras C.J., Huckabee J. W. (Eds.), *Mercury Pollution, Integration and Synthesis*, 631-641. Lewis Publishers, USA.
- D'Itri F. M., 1990. The biomethylation and cycling of selected metals and metalloids in aquatic sediments. In: *Sediments: Chemistry and Toxicity of In-Place Pollutants* (Baudo R, Giesy J, Muntau H, eds.) Lewis, Ann Arbor, MI, *Environmental Research* 40: 210-244.
- Dixon R., Jones B., 1994. Mercury concentrations in stomach contents and muscle of five species from the North East Coast of England. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 28. No.12: 741-745.
- Donais M. K., Uden P. C., Schantz, M. M., Wise S. A., 1996. Development, validation, and application of a method for the Quantification of methylmercury in biological

marine materials using gas chromatography atomic emission detection. *Analytical Chemistry*, 68: 3859-3866.

Douglas G. S., Graves A. G., 2002. A comparison of mercury in estuarine fish between Florida Bay and the Indian River Lagoon, Florida, USA. *Estuarine Research Federation*. 24 (4): 597-609.

Douthwaite R. J. 1992. Effects of DDT on the Fish Eagle (*Haliaeetus vocifer*) population of Lake Kariba in Zimbabwe. *Ibis*, 134: 250-258.

Draeback. I. in: M. Stoepler (Editor), 1992. Hazardous Metals in the Environment. Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Vol. 12, Elsevier, Amsterdam, 1992.

Driscoll C.T., Yan C., Schofield C. L., Munson R., Holsapple J., 1994. The mercury cycle and fish in the Adirondack lakes. *Environmental Science Technology* 1994; 28: 136-143.

Eisler R., 1987. Mercury hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report 85 (1.10): 90.

Fischer W., Krupp F., Schneider W., Sommer C., Carpenter K. E. y Niem V. H., 1995. Guía FAO para la identificación de especies para los fines de la pesca. Pacífico centro oriental. Volumen II. Vertebrados-Parte 1. Roma: 647-1200.

Fitzgerald W. F. Mason R. P., 1996. The global mercury cycle: Oceanic and anthropogenic aspects. 85-108. En: Baeyens et al., (Eds.). Global and regional mercury cycles: Sources, fluxes and mass balances. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Fournier F., Kasarov, W. H., Kenow K. P., Meyer M. W. Hines R. K., 2002. The oral bioavailability and toxicokinetics of methylmercury in common loon (*Gavia immer*) chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* 133: 703-714.

Furness R. W., Camphuysen, K.C., 1997. Seabirds as monitors of the marine environment. *Journal of Marine Science* 54: 726-737.

Gómez-Ariza J. L., Lorenzo F., García-Barrera T., Sánchez-Rodas D., 2004. Analytical approach for routine methylmercury determination in seafood using gas

- chromatography-atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 511 (2004): 165-173.
- González F., Schalsha E., Becerra J., Silva M. 2002. Mercury in a marine trophic chain. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 68: 448-454.
- Gordon G., Skett P. 1986. *Introduction to Drug Metabolism*. Chapman and Hall, New York, N Y.
- Green-Ruiz C., Ruelas-Inzunza J., Páez-Osuna F., 2005. Mercury in surface sediments and benthic organisms and benthic organisms from Guaymas Bay, east coast of the Gulf of California. *Environmental Geochemistry and Health* 27: 321-329.
- Gutiérrez-Galindo E. A. 1982. Comentario sobre el metabolismo de metales pesados en organismos marinos. *Ciencias Marinas*. 8(1): 134-138.
- Gutiérrez-Galindo E., Flores- Muñoz G., Aguilar-Flores A., 1988. Mercury in freshwater fish and clams from the Cerro Prieto geothermal field of Baja California, México. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 41:201-207.
- Hatch W. R., Ott W. L., 1968. Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry. *Analytical Chemistry* 40. 2085-2087.
- Heinz G. H., Hoffmann D. J., 2004. Mercury accumulation and loss in mallards. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 222-224.
- Henny C. J., Hill E. F., Hoffmann D. J., Spalding M. G., Grove R. A., 2002. Nineteenth century mercury: hazard to wading birds and cormorants of the Carson River, Nevada. *Ecotoxicology* 11: 213 -231.
- Hintelmann H., 1999. Comparison of different techniques used for methylmercury analysis with respect to accidental formation of methylmercury during sample preparation. *Chemosphere*. 39: 1093 -1105.
- Horvat M., May K., Stoepler, A., Byrne, R., 1988. Comparative studies of methylmercury determination in biological and environmental samples. *Applied Organometallic Chemistry* 2: 515-524.
- Horvat M., 1991. Determination of methylmercury in biological certified reference materials. *Water, Air and Soil Pollution*, 56: 95-102.

- Horvat M., 1996. Mercury analysis and speciation in environmental samples. In: Baeyens W., Ebinghaus R., Vasiliev O. (Eds.), Global and Regional Cycles: Sources, Fluxes and Mass Balances. NATO ASI Series. Kluwer Academic Press, Dordrecht: 1-31.
- Houserová P., Matejíček D., Kubán V., Pavlíčková J., Komárek, J., 2006. Liquid Chromatographic- Cold Vapor Atomic Fluorescence Spectrometric (HPLC/CV-AFS). Determination of Mercury Species. Journal of Separation Science 29: 248-255.
- Houserová P., Kubán V., Krácmár S., Sitko J., 2007. Total mercury and mercury species in birds and fish in an aquatic ecosystem in the Czech Republic. Environmental Pollution 145: 185 -194.
- Ikingura. J. R., Akagi H., 1999. Methylmercury production and distribution in aquatic systems. The Science of the Total Environment 234: 109-118.
- Jacobs L.W., Keeney D.R., 1974. Methylmercury formation in mercury treated river sediments during in situ equilibration. Journal of Environmental Quality 3: 121-126.
- Jaques H. E., Ollivier R. 1960. How to know the water birds. Pictured Key Nature Series 1st edition. W.M.C. Brown Company-Publishers. IOWA, USA. 159.
- Johnson, Maxwell, 1981. Rock and mineral analysis, 2d. Edition. Wiley interscience Ed. USA.
- Joiris C. R., Ali I. B., Holsbeek L., Kanuya K. M., Tekele-Michael Y., 1997. Total and organic mercury in Grennland and Barent sea demersal fish Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 58: 101-107.
- Kudo A., Akagi H., Mortimer D. C., Miller D. R., 1977. Equilibrium concentrations of methylmercury in Ottawa river sediments. Nature 220: 419 - 420.
- Lebel J., Mergler D., Branches F., Luccote M., Amorim M., Larribe F., Dolbec J., 1998. Neurotoxic Effects of Low-Level Methylmercury Contamination in the Amazinian Basin. Environmental Research, Section A 79: 20-32.
- Leermarkers M., Baeyens W., Quevauviller Ph., Horvat M., 2005. Mercury in environmental samples: Speciation, arftifacts and validation. Trends in Analytical Chemistry. Vol.24, No.5: 383-393.

- Liang L., Horvat M., Danilchik P., 1996. A novel analytical method for determination of picogram levels of total mercury in gasoline and other petroleum based products. *The Science of the Total Environment* 187:57-64.
- Lindqvist O., Jernelov A., Johansson K., Rodhe R., 1984. Mercury in the Swedish environment: global and local sources, Solna, National Swedish Environment Protection Board:105 (Report No.1816).
- Lindqvist O., Johansson K., Aastrup M., Anderson A., Bringmark L., Hovsenius G., Hakanson, L., Iverfeldt A., Meili M., Timm B., 1991. Mercury in the Swedish environment: recent research on causes, consequences and corrective methods. *Water Air Soil Pollution*. 55: 1-261.
- Loring O. H., Rantala R. T., 1995. Manual for geochemical analysis of marine sediments and suspended particulate matter. *Reference Methods of Marine Pollution Studies* No. 63.
- Magos L. 1971. Selective Atomic-absorption Determination of Inorganic Mercury and Methylmercury in Undigested Biological Samples. *Analyst*. 96: 847-853.
- Malm O. 1998. Gold Mining as a Source of Mercury Exposure in the Brazilian Amazon. *Environmental Research* 77a: 73 -78.
- Mason R. P., Fitzgerald W. F., Morel F. M. 1994. The biogeochemical cycling of elemental mercury: anthropogenic influences. *Geochimica Cosmochimica Acta* 58:3191-3198.
- Mason R. P., Fitzgerald W. F., Morel F. M., 1995. The role of microorganism in elemental mercury formation in natural waters. *Water Air Soil Pollution*. 80:775-787.
- Marine Environmental Studies Laboratory, MESL.,1997. International Atomic Energy Agency. Inorganique Laboratory. Standard Operating Procedures. Monaco, 66.
- May K., Stoepler M., Reisinger K., 1987. Studies in the ratio total mercury/methylmercury in the aquatic food chain. *Toxicological and Environmental Chemistry* 13:153-159.
- Méndez E., Guidice H., Pereira A., Inocente G., Medina D. 2001. Total mercury content-fish Weight relationship in Swordfish (*Xiphias gladius*) caught in the

- Southwest Atlantic Ocean. *Journal of Food Composition and Analysis* 14: 453-460.
- Mercury Case Study, 1999. A report developed under the Continental Pollution Pathways initiative 393 St. Jacques West, Bureau 200, Montreal, Quebec, Canada H2Y 1N9: Commission for Environmental Cooperation. Electronic. <http://www.cciw.ca/eman,1999>.
- Miller J. C. ; Miller J. N., 1988. *Statistics for analytical chemistry*. John Wiley and Sons, Second Edition. New York, USA, 101-127, 227.
- Monteiro L. R., Granadeiro J. P., Furness R. W., Oliveira P. 1999. Contemporary patterns of mercury contamination in the Portuguese Atlantic inferred from mercury concentrations in the seabirds tissues. *Marine environmental Research* 47: 137-156.
- Monteiro A. C. P., de Andrade L. S. N., de Luna A. S., de Campos R. C., 2002. Sequential quantification of methylmercury in biological materials by selective reduction in the presence of mercury (II), using two gas-liquid separators. *Spectrochimica Acta. Part B*, 57: 2103-2112.
- Monzalvo-Santos., K. 2003. Determinación de mercurio en 2 especies de peces pelágicos (*Cherublemma emmelas* y *Zalieutees elater*) de la zona del talud del Golfo de California. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Sinaloa.
- Moody J. R., Lindstrom R. N., 1977. Selection and cleaning of plastic containers for storage of trace elements samples. *Analytical Chemistry* 49: 2264-2267.
- Moore C. J., 2000. A review of mercury in the environment (Its occurrence in marine fish). Office of Environmental Management. Marine Resources Division. South Carolina Department of Natural Resources: 22.
- Morel F. M., Kraepiel A. M., Amyot M., 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual Review of Ecological Systems*. 29:543-566.
- Mormede S., Davies M. I., 2001. Trace elements in deep-water fish species from the Rockall trough. *Fisheries Research* 51:197-206.
- Munthe, J., Xiao, Z. F. and Lindqvist, O. (1991): The aqueous reduction of divalent mercury by sulfite. *Water, Air and Soil Pollution* 56, 621 - 630, 1991.

- Mullié W. C., Massi A., Focardi, S., Renzoni A. 1992. Residue levels of organochlorines and mercury in cattle egret, *Bubulcus Ibis*, eggs from the Faiyum Oasis, Egypt. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 48: 739-746.
- Nriagu J. O., Pacyna J. M., 1989. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 1989: 333: 134-139.
- Nriagu, J. O., 1990. Global metal pollution. *Environment* 32: 7-33.
- Nriagu J. O., 1993. Legacy of mercury pollution. *Nature* 363: 589.
- Ochoa-Acuña H., Sepúlveda M. S., Gross T. S., 2002. Mercury in feathers from Chilean birds: Influence of location, feeding strategy, and taxonomic affiliation. *Marine Pollution Bulletin*. 44: 340-349.
- Olson B. H., Cooper R. C., 1975. Comparison of aerobic and anaerobic methylation of mercuric chloride by San Francisco Bay sediments. *Water Research*; 10:113-116.
- Pacyna, J. M. 1987. Atmospheric emissions of arsenic, cadmium, lead and mercury from high temperature processes in power generation and industry. In: Hutchinson, T. C. & Meema, K. M., Ed. *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the environment*, New York, Chichester, Brisbane, Toronto, John Wiley & Sons: 69-88 (SCOPE 31).
- Páez-Osuna F., Osuna-López J. L.; Izaguirre-Fierro G., Zazueta-Padilla H. 1993 Heavy metals in oysters from a Subtropical coastal lagoon associated with and agricultural drainage basin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 50: 915-921.
- Páez-Osuna, 1996. Efecto de los Metales. In: Botello A. V., Rojas-Galaviz, J. L., Benítez J. A., Zárate-Lomelí D. (Eds.) *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: diagnóstico y tendencias*. Universidad Autónoma de Campeche. Campeche, México. EPOMEX Serie Científica, México, 5: 349-361.
- Páez-Osuna F., Guerrero-Galván S. R., Ruiz-Fernández A. C. 1999. Discharge of nutrients from shrimp from coastal waters of the Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin*. 38(7): 585-592.

- Palenzuela B., Manganiello L., Ríos A., Valcárcel M., 2004. Monitoring inorganic mercury and methylmercury species with liquid chromatography-piezoelectric detection. *Analytica Chimica Acta* 511 (2004): 289-294.
- Peraza-Vizcarra R. 1973. Características hidrográficas y distribución de los sedimentos en el sistema estuarino Bahía de Altata-Ensenada del Pabellón Sinaloa. Tesis de Licenciatura. UABC: 64.
- Peterson R. T., Chalif. 1989. Aves de México: Guía de Campo identificación de todas la especies encontradas en México, Guatemala, Belice y el Salvador. Editorial Diana. 1^{era} Edición. México, 496.
- Pilgrim W., Schroeder W., Porcella D. B., Santos-Burgoa C., Montgomery S., Hamilton A., Trip L., 2000. Developing consensus: mercury science and policy in the NAFTA countries (Canada, The United States and Mexico). *The Science of the Total Environment*. 261: 185-193.
- Pirrone N., Keeler G., Nriagu J.O., 1996. Regional differences in worldwide emissions of mercury to the atmosphere. *Atmospheric Environmental* 30: 2981-2987.
- Porcella D. B., Chu P., Allan M. A. 1996. Inventory of North American mercury emissions to the atmosphere. In: Baeyens et al., editors. *Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances*. Kluwer Academic Publishers, 1996: 179-190.
- Quevauviller Ph., Morabito R., 2000. Evaluation of extraction recoveries for organometallic determinations in environmental matrices. *Trends in analytical chemistry*, vol. 19, Nos. 2+3 : 86-96.
- Quevauviller Ph., Filippelli M., Horvat M., 2000. Method performance evaluation for methylmercury determination in fish and sediment. *Trends in analytical chemistry*, vol. 19, Nos. 2+3: 157-166.
- Raygoza-Viera J. R., 2004. Concentración y distribución de mercurio en tejidos de nueve especies de aves acuáticas migratorias y residentes capturadas en la costa de Sinaloa. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, U. N. A. M. Mazatlán, Sin., 117.
- Rendón-Von Osten J., García-Guzmán J., 1996. Evaluaciones del impacto ambientales de las actividades humanas en Laguna Madre, Tamaulipas: 512-540.

- En Vázquez Botello A., Rojas-Galaviz J. L., Benítez J. A., Zárata-Lomelí (Eds). Golfo de México, contaminación e impacto ambiental: diagnóstico y tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica, 5: 666.
- Río-Segade S., Tyson J. F., 2003. Determination of inorganic mercury and total mercury in biological and environmental samples by flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry using sodium borohydride as the sole reducing agent. *Spectrochimica acta part B* 58: 797 – 807.
- Rodríguez-Preciado A. (2004) Análisis comparativo de la concentración de mercurio en el tejido muscular de la lisa *Mugil Curema* (Valenciennes, 1836) de los esteros Urías y Teacapán, Sinaloa, México. Tesis de Licenciatura, Escuela Nacional de pesquerías / Universidad Autónoma de Nayarit.
- Ruelas-Inzunza J. R., Páez-Osuna F, Pérez-Cortes H., 2000. Distribution of Mercury in Muscle, Liver and Kidney of the Spinner Dolphin (*Stenella longirostris*) stranded in the Southern Gulf of California. *Marine Pollution Bulletin* Vol. 40, No. 11:1063-1066.
- Ruelas-Inzunza J. R., Horvat, M., Páez-Osuna F., Pérez Cortes H., 2003a. Methylmercury and total mercury distribution in tissues of gray whales and spinner dolphins stranded along the lower Gulf of California, Mexico. *Ciencias Marinas* 29(1):1-8.
- Ruelas-Inzunza J. R., Soto L. A., Páez-Osuna F., 2003b. Heavy-metal accumulation in the hydrothermal vent clam *Vesycomyas gigas* from Guaymas basin, Gulf of California. *Deep-Sea Research I* 50: 757-761.
- Ruelas-Inzunza J. R., García-Rosales S. B., Páez-Osuna F., 2004. Distribution of mercury in adult penaeid shrimps from Altata-Ensenada del Pabellón lagoon (SE Gulf of California). *Chemosphere*. 57 (11): 1657-1661.
- Rumbold D. G., Niemczyk S. L., Fink L. E., Chandrasekhar T., Harkanson B., Laine K. A. 2001. Mercury in eggs and feathers of great egrets (*Ardea albus*) from Florida Everglades. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 41: 501-507.
- Sadiq M. 1992. *Toxic Metal Chemistry in Marine Environment*. Marcel Dekker, New York.

- Sánchez-Uría J. E., Sanz Medel A., 1998. Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples. *Talanta* 47:509-524.
- Sanz-Landaluze J., Diego de A., Raposo J. C., Madariaga, J. M., 2003. Routine analysis of mercury species using commercially available instrumentation; chemometric optimisation of the instrumental variables. *Analytica Chimica Acta* 486: 255-267.
- Sanz-Landaluze J., Diego de A., Raposo J. C., Madariaga, J. M., 2004. Methylmercury determination in sediments and fish tissues from the Nerbioi-Ibaizabal estuary (Basque Country, Spain). *Analytica Chimica Acta*. 508:107-117.
- Schober S. E., Sionks. T. H., Jones R. L., Bolger P. M., McDowell M., Osterloh J., Garret E. S., Canady R.A., Dillon C.F., Sun Y., Joseph C.B., Mahaffey K.R., 2003. Blood mercury levels in US children and women of childbearing age, 1999-2000. *Journal of American Medical Association* 289: 1667-1674.
- Shin E. B., Krenkel P. A., 1976. Mercury uptake by fish and biomethylation mechanism. *J WPCF* 1976; 48/3; 473-501.
- Skoog A., West M., Holler J., 1997. *Fundamentos de Química Analítica*. Editorial Reverté. 4ª edición. Barcelona. Vol. II: 628.
- Slaets S., Adams F. C., 2000. Determination of organomercury compounds with a miniaturized automated speciation analyzer. *Analytica Chimica Acta*; 414: 141-149.
- Sloss L. L., 1995. *Mercury Emissions and Effects: The Role of Coal*. IEA Coal Research Publications, London.
- Stephens G. R., 1995. Mercury concentrations in fish in a remote Canadian Arctic Lake. *Water Air Soil Pollut* 1995: 80: 633-636.
- Storelli M. M., Ceci E., Marcotrigiano G. O., 1998. Comparison of Total Mercury, Methylmercury, and Selenium in Muscle Tissues and in the Liver of *Stenella couruleoalba* (Meyen) and *Caretta caretta* (Linnaeus). *Environmental Contamination and Toxicology* 61: 541.
- Storelli M. M., Ceci E., Marcotrigiano G. O., 2002a. Mercury Speciation and Relationship Between Mercury and Selenium in Liver of *Galeus melastomus* from

- Mediterranean Sea. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 69:516-522.
- Storelli M. M., Giacominielli R. S., Marcotrigiano G. O., 2002b. Total and methylmercury residues in tuna-fish from Mediterranean Sea. Food Additives and Contamination. 19 No.8:715 -720.
- Storelli M. M., Giacominielli-Stuffler R., Marcotrigiano G., 2002c. Mercury Accumulation and speciation in muscle tissue of different species of sharks from Mediterranean Sea, Italy. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 68:201-210.
- Storelli M. M., Storelli A., Giacominielli R. S., Marcotrigiano G. O., 2005. Mercury speciation in the muscle of two commercially important fish, hake (*Merluccius merluccius*) and striped mullet (*Mullus barbatus*) from the Mediterranean sea: estimated weekly intake. Food Chemistry 89:295-300.
- Swain E. B., Engstrom D. R., Brigham M. E., Henning T. A., Brezonik P. L., 1992. Increasing rates of atmospheric mercury deposition in midcontinental North America. Science. 257: 784-787.
- Swiergosz R., 1998. Mercury accumulation in the muscles and feathers of pheasants, *Phasianus colchicus* (L.1758). BioMetals 2:139-143.
- Syr-Song Chen, Shin-Shou Chou, Deng-Few Huang, 2004. Determination of methyl mercury in fish using focused microwave digestion following by Cu^{2+} addition, sodium tetrapropylborate derivatization, n-heptano extraction, and gas chromatography-mass spectrometry. Journal of chromatography A, 1024: 209-215.
- Thayer J. S., 1984. Organometallic Compounds and Living Organisms, Academia Press, Orlando, FL.
- Thompson D. R., Stewart F. M., Furness R. W., 1990. Using seabirds to monitor mercury in marine environments the validity of convention ratios tissue comparisons. Marine Pollution Bulletin 21: 339-342.
- Thompson D. R., Hamer K. C., Furness R. W., 1991. Mercury accumulation in great skuas, *Catharacta skua* of known age and sex, and its effects upon breeding and survival. Journal of Applied Ecology 28: 672-684.

- Thompson D. R., 1996. Mercury in birds and terrestrial mammals. En: Nelson-Beyer, W., Heinz G. H., and Redmon-Norwood A. W. Environmental contaminants in wildlife: Interpreting tissue concentrations, SETAC Special Publications series. CRC Lewis publishers, New York, USA: 341-356.
- Torres-Gómez G., Vargas-Isla J., Holmgren-Urpá M., Jara-Díaz., 1985. Las aves marinas de México: una revisión bibliográfica. Universidad Autónoma Metropolitana. División de Ciencias Biológicas y de la Salud. Unidad Xochimilco: 10.
- Torres D. P., Vieira M. A., Ribeiro A. J., Curtius A. J., 2005. Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated by with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 20: 289-294.
- Tsubaki T., Irukayama K., (Eds.). 1977. Minamata Disease: Methylmercury Poisoning, Kodensha, Tokyo.
- Ubillús F., Alegría A., Barberá R., Farré R., Lagarda M. J., 2000. Methylmercury and inorganic mercury determination in fish by cold vapour generation atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 71 (2000) 529-533.
- UNEP, 2002. Executive Summary of the Global Mercury Assessment. p. 26. Electronic <http://www.chem.unep.ch/mercury/report/GMA-report-TOC.htm>.
- Uryu Y., Malm O., Thornton I., Payne I., Cleary D., 2000. Mercury contamination of fish and its implications for other wildlife of the Tapajós Basin, Brazilian Amazon. *Conservation Biology*. 15(2): 438-446.
- USEPA (US Environmental Protection Agency), 1997. Mercury Study Report to Congress, Volume III: Fate and Transport of Mercury in the environment. EPA-452/R-97-005 USEPA, Office of Air Quality Planning and Standards Office of Research and Development, Washington D. C.
- Van Loon, 1980. Analytical atomic absorption spectroscopy, selected methods. Academic Press. USA.
- Villanueva F. S; Páez Osuna, 1996. Niveles de metales en el Golfo de México: agua sedimentos y organismos. In: Botello A. V., Rojas-Galaviz J. L., Benítez J. A. y

- Zárate-Lomelí D. (Eds.) Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. EPOMEX Serie Científica, 5:666.
- Wagemann R., Trebacz E., Boila G., Lockhart W. L. 2000. Mercury species in the liver of ringed seals. *The Science of the Total Environment*. 261: 21-32.
- Walsh P. M., 1990. The use of birds as monitors of heavy metals in the marine environment. In "Heavy Metals in the Marine Environment" (Furness R. W. and Rainbow P. S., Eds):183-204, CRC Press, Boca Raton, F. L.
- Wang W., Driscoll C. T., 1995. Patterns of total mercury concentrations in Onondaga Lake, New York. *Environmental Sciences Technology* 1995; 29/9: 2261-2266.
- Westöö, G., 1968. Determination of methylmercury salts in various kind of biological material. *Acta Chemical Scandinavica* 22: 2277-2280.
- World Health Organization (WHO), 1976. *Environmental Health Criteria 1: Mercury*, Geneva, World Health Organization: 132.
- World Health Organization (WHO), 1989. *Mercury-Environmental Aspects*. WHO, Geneva, Switzerland.
- World Health Organization (WHO), International Program on Chemical Safety., 1990. "Environmental Health Criteria 101: Methylmercury." World Health Organization, Geneva.
- Zachariadis G. A., Anthemidis A. N., Dafisis J. A., Stratis J. A., 2005. On-line speciation of mercury and methylmercury by cold vapor atomic absorption spectrometry using selective solid phase extraction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 19 : 63-65.
- Zelenko L., Kosta L. 1973. A new method for the isolation of methylmercury from biological tissue and its determination at parts per million levels by gas chromatography. *Talanta*. 20: 115-123.