

## **Validación del método de determinación de mercurio en muestras de sedimentos y tejidos biológicos utilizando un Analizador Directo de Mercurio (DMA-80)**

### *Validation of the Mercury Determination Method in Sediment and Biological Tissue Using Direct Mercury Analyzer (DMA-80)*

*Ing. Yoelvis Bolaños-Álvarez, Lic. Kirenia Cos-Negret, MSc. Aniel Guillén-Arruebarrena, Tec. Ana Maray Torres-Martín  
yoelvis@ceac.cu*

*<sup>1</sup>Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos, Cuba*

Recibido: 9 de marzo de 2016

Aprobado: 2 de junio de 2016

#### **Resumen**

Este trabajo ha estado dirigido a la validación del método de determinación de mercurio en sedimentos y tejido biológico en un Analizador Directo de Mercurio DMA-80 a través de la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica. Los parámetros de la validación evaluados fueron linealidad, reproducibilidad intermedia, límites de detección y de cuantificación, incertidumbre combinada y expandida, los cuales se encuentran expuestos en la Norma Cubana NC TS 368:2010, *Guía para la validación de métodos de ensayo químicos*. Se emplearon materiales de referencia propios de las matrices en estudio. Todos los parámetros evaluados cumplieron los requisitos establecidos en la normativa vigente, lo cual garantiza una mayor confiabilidad de los resultados generados. El método validado es capaz de detectar y cuantificar niveles de mercurio que se encuentren en la naturaleza, satisfaciendo los estándares guías de calidad de sedimentos y los criterios técnicos de consumo de alimentos de diferentes normas nacionales e internacionales.

**Palabras clave:** mercurio, DMA, validación, sedimentos, tejido biológico.

#### **Abstract**

This project has been aimed at validating the method of determination of mercury in sediment and biological tissue in a Direct Mercury Analyzer DMA-80 through the technique of Atomic Absorption Spectrophotometry. The parameters of validation that were evaluated were linearity, intermediate reproducibility, limits of detection and quantification, calculation of uncertainty of measurements, which are set forth in the International Standard (TS 368: 2010 *Guide for the validation of test methods for food chemicals*). Reference materials own matrices under study were used. All parameters evaluated met the requirements of current legislation, which ensures greater reliability of the results generated. The validated method is able to detect and quantify levels of mercury found in nature, satisfying the guides sediment quality standards and technical criteria of food consumption of different national and international standards.

**Keywords:** mercury, DMA, validation, sediment, biological tissue.

## **Introducción**

El mercurio es uno de los elementos más tóxicos que existe en la naturaleza, por su impacto en el medio ambiente y en la salud del hombre se hace necesario estudiar sus concentraciones en diferentes matrices ambientales tanto abióticas como en organismos vivos [1].

Diferentes agencias internacionales han establecido valores numéricos de concentraciones de referencia de contaminantes con el objetivo de contar con reglamentaciones que asistan la gestión de control de la calidad ambiental de los sedimentos y su implicación en los seres vivos [2]. Con el objetivo de regular los niveles de mercurio en alimentos, la Norma Cubana NC 493:2008 *Contaminantes metálicos en alimentos como norma de consumo en alimentos* establece dichos criterios regulatorios. En ambos casos se debe contar con técnicas suficientemente sensibles para la cuantificación del mercurio.

En el Laboratorio de Ensayos Ambientales (LEA) del Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC) se cuenta con un Analizador Automático de Mercurio (DMA-80) el cual ha puesto a disposición de la ejecución de servicios científico-técnicos y diferentes investigaciones relacionadas con el estudio del mercurio en campo ambiental y en muchos casos, relacionados con la inocuidad alimentaria. Para poder reportar resultados es necesario demostrar la competencia del método mediante el proceso de validación.

El objetivo del presente trabajo es demostrar la idoneidad del método de determinación de mercurio en sedimentos y tejido biológico por DMA-80 mediante el desempeño de los parámetros asociados a la validación según la Norma Cubana NC TS 368:2010 *Guía para la validación de métodos de ensayo químicos*.

## **Materiales y métodos**

Este estudio fue realizado en el Laboratorio de Ensayos Ambientales (LEA) del Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC).

### ***Equipamiento utilizado. Fundamento del método***

Para la determinación del mercurio en las muestras de sedimentos y tejidos biológicos se utilizó un Analizador Directo de Mercurio (DMA-80, Milestone, Italia). El principio de funcionamiento de este equipo se basa en una primera etapa de secado de la muestra seguida de sucesivas etapas de descomposición térmica y atomización del mercurio.

Para el análisis de las muestras se emplean cubetas de cuarzo (Milestone DMA 8347). El control interno de la temperatura de cada una de las etapas se realiza mediante sensores internos. Para la reducción del Hg se emplea un sistema catalítico (Milestone DMA 8333) y los vapores de este elemento son atrapados en un amalgamador de oro (Milestone 8134), que ha sido diseñado para atrapar y preconcentrar el mercurio desde la corriente de oxígeno que transporta los productos de la descomposición térmica.

Una vez se alcanza el tiempo de la etapa de amalgamación se libera el mercurio a una temperatura de 850 °C para pasar a través de un sistema de dos celdas ópticas donde es cuantificado mediante espectrofotometría de absorción atómica. El sistema de detección contiene una lámpara de mercurio que emite una luz a una longitud de onda de 253,65 nm y un detector UV de diodo de silicio para cuantificar el mercurio. Para la evaluación de la señal se utiliza el área bajo el pico generado de la medición.

El método de medición se basa en el método 7473 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos [3].

#### *Limpieza de la cristalería*

Todo el material usado fue descontaminado antes de los análisis. Se utilizó detergente neutro y agua destilada en una limpieza previa de las cubetas de cuarzo, seguido de 6 horas en una solución de HNO<sub>3</sub> al 10 % (v/v) a temperatura ambiente. Finalmente, se enjuaga tres veces con agua ultrapura desionizada con una resistividad  $\geq 18,2$  M $\Omega$ ·cm obtenida de un sistema Milli-Q<sup>TM</sup> (E-Pure, Barnstead). Las cubetas de cuarzo son sometidas a 600 °C por 20 min y posteriormente se le aplica un ciclo de limpieza en el equipo de medición.

#### *Reactivos y soluciones*

Para la preparación del blanco de calibración se utiliza HNO<sub>3</sub> grado ultrapuro al 65 % (AppliChem) y agua ultrapura desionizada con una resistividad  $\geq 18,2$  M $\Omega$ ·cm obtenida de un sistema Milli-Q<sup>TM</sup> (E-Pure, Barnstead). Los estándares de trabajo se prepararon a partir de una solución estándar de Hg (1003  $\pm$  5 mg/L trazable a NIST). Se utilizaron cubetas de cuarzo utilizadas para la medición de las muestras (Milestone DMA 8347).

#### *Preparación de las muestras*

Para el tejido biológico se toman 100 g de muestra y se bate en la batidora con cuchillas de acero inoxidable hasta convertir el material en una mezcla homogénea. El proceso de batir debe realizarse de forma intermitente con el objetivo de no elevar la temperatura del material a mezclarse muelen en una batidora. Para evitar la pérdida de mercurio en

todas las muestras el secado se realiza mediante una liofilizadora (Alpha 1-2 LD, Modelo CHRIST).

### *Preparación para la medición*

Para las mediciones de las muestras se tomó una alícuota de 40 mg de material seco y se ubicaron en las cubetas de cuarzo. La pesada de las muestras se realizó en una balanza analítica con cuatro cifras decimales (Modelo Sartorius, Alemania; máximo: 200 g; error: 0,1 mg).

### *Parámetros de la validación*

Para realizar la validación del método se siguieron los puntos del procedimiento de validación del LEA [4], y el protocolo de validación elaborado a partir de los criterios establecidos en la NC TS 368:2010 *Guía para la validación de métodos de ensayo químicos* [5].

### *Linealidad*

Se realizó una curva de calibración por cada una de las dos celdas de medición. Para la celda 1 se trabajó entre 0 y 0,2 mg/L, mientras que para la celda 2 el rango se estableció entre 0,3 y 10 mg/L. Para ambas celdas se utilizaron 6 niveles de concentración y 3 réplicas en cada uno de los puntos. En las figuras 1 y 2 se pueden observar las curvas de calibración realizadas.

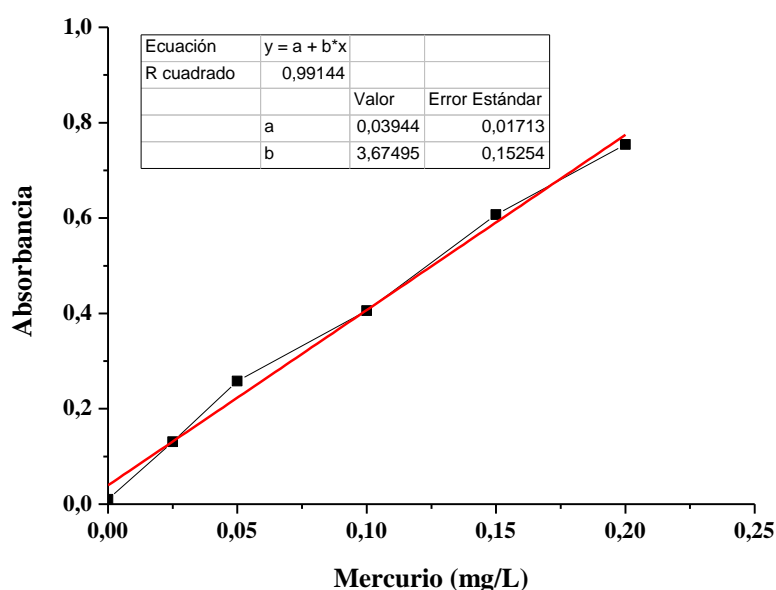


Figura 1. Rango de calibración para la celda 1

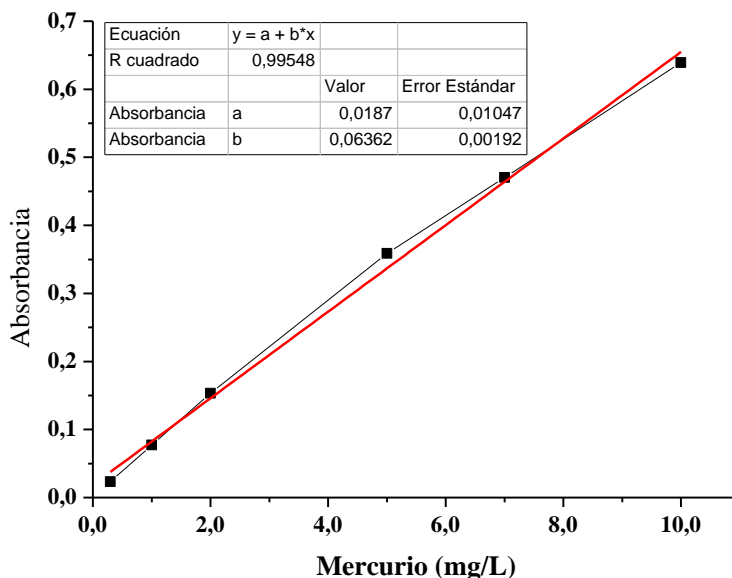


Figura 2. Rango de calibración para la celda 2

### *Límites de Detección y Cuantificación*

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) se determinaron a partir del análisis de 19 blancos de medición de las cubetas de cuarzo. Estos límites fueron establecidos por la concentración media y la desviación estándar (SD) de los resultados obtenidos de los blancos. Los límites se obtienen de las ecuaciones 1 y 2:

$$LC = 3 \cdot SD \quad (1)$$

$$LC = 10 \cdot SD \quad (2)$$

### *Precisión intermedia*

Para el estudio de precisión intermedia del método se tuvieron en cuenta la repetibilidad y reproducibilidad de los resultados. Para la repetibilidad se analizaron 6 réplicas de una muestra de tejido biológico y sedimento preparados en el laboratorio, las mediciones se realizaron por dos analistas. Para el estudio de la reproducibilidad se utilizaron los resultados de las mediciones realizadas por ambos analistas en días diferentes. En ambos casos se determinaron los coeficientes de variación de los resultados (CV).

### *Veracidad*

Para el estudio de veracidad se utilizaron los materiales de referencia (MR) de tejido biológico NIST 2976 (tejido de mejillón); IAEA 140 (alga marina) y el IAEA 407

(tejido de pez). Para los sedimentos se utilizaron los materiales IAEA 158 (sedimento marino); IAEA 433 (sedimento marino) y IAEA 405 (sedimento de estuario).

Para la evaluación de los resultados se utilizó la prueba-t simple para la comparación entre el valor obtenido del MR y el valor certificado [4].

#### *Valores guías de evaluación de la calidad de sedimentos y criterios consumo de alimentos*

En la tabla 1 se pueden encontrar algunos valores establecidos para la evaluación de la calidad de sedimentos establecidos por guías internacionales y los niveles de Hg establecidos en la Norma Cubana NC 493:2008 *Contaminantes metálicos en alimentos como norma de consumo en alimentos* para la regulación del consumo de pescado.

**TABLA 1. VALORES ESTABLECIDOS EN SEDIMENTOS Y ALIMENTOS PARA LA EVALUACIÓN DEL Hg**

<b>Criterios establecidos</b>	<b>Valores Numéricos</b>	<b>Fuente</b>
<b>TEL: (nivel de efectos umbral)</b>	0,13 mg/kg	Guías de calidad de sedimentos (tablas SQUIRTs de la NOAA) [6]
<b>PEL: (nivel probable de efectos)</b>	0,7 mg/kg	
<b>Hg en pescado fresco</b>	0,5 (no depredadores) 1,0 (depredadores)	Norma Cubana NC 493:2008 Contaminantes metálicos en alimentos [7].

\*Los valores de concentración de Hg en el pescado están expresados en peso fresco

## **Resultados y discusión**

En las figuras 1 y 2 se muestran las rectas de regresión para cada uno de los rangos de medición (celda 1 y celda 2). Los coeficientes de correlación lineal son mayores que 0,990, indicando una linealidad adecuada para el desempeño del método en las condiciones de medición actuales.

Según el criterio utilizado para el cálculo, el LD del método es de 0,003 9 mg/kg con un LC de 0,012 8 mg/kg. El rango de trabajo para el método oscila entre el límite de cuantificación y 25 mg/kg. Estos límites permiten cuantificar niveles normados en sedimentos (TEL y PEL [6], y aquellos establecidos para el consumo de alimentos en Cuba [7] (tabla 1).

En la tabla 2 se muestran los parámetros del estudio de reproducibilidad intermedia. El CV para la repetibilidad en ambas matrices oscila entre 1,45 y 4,91 %, mientras que

para la reproducibilidad se encuentra entre 1,99 y 4,17 %, encontrándose por debajo de los valores establecidos para estos indicadores de 3 y 5 % respectivamente, indicando que para las condiciones de este estudio el método de determinación de mercurio para ambas matrices es repetible y reproducible.

**TABLA 2. RESULTADOS DE LA REPRODUCIBILIDAD INTERMEDIA EN LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE MERCURIO EN SEDIMENTOS Y TEJIDO BIOLÓGICO**

Muestras	Repetibilidad CV (%)	Reproducibilidad CV (%)
Sedimento (Día 1; Analista 1)	4,91	4,17
Sedimento (Día 2; Analista 2)	2,83	
Tejido Biológico (Día 1; Analista 1)	1,45	1,99
Tejido Biológico (Día 2; Analista 2)	1,98	

En la tabla 3 se observan los resultados del estudio de veracidad para el sedimento y el tejido biológico. Los parámetros encontrados en la tabla de la Prueba-t simple nos indican que no existe diferencia significativa entre el valor observado de Hg y el material de referencia utilizado para este estudio.

**TABLA 3: RESULTADOS DE VERACIDAD EN LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE MERCURIO EN SEDIMENTOS Y TEJIDO BIOLÓGICO**

Materiales de Referencia	N (obs)	Hg Obs. (mg/kg)	SD	Hg Cert. (mg/kg)	Inc. (mg/kg)	t-calc.	t-tab
<b>Sedimentos</b>							2,92
IAEA 158	3	0,148	0,007	0,14	± 0,014	1,98	
IAEA 405	3	0,838	0,030 4	0,81	± 0,040	1,59	
IAEA 433	3	0,165	0,008 5	0,168	± 0,004	0,61	
<b>Tejido biológico</b>							
NIST 2976	6	0,068	0,003 2	0,064	± 0,003 6	1,95	
IAEA 140	3	0,043	0,004 6	0,038	± 0,006 0	1,89	
IAEA 407	3	0,215	0,010 2	0,222	± 0,006 0	1,19	

En la figura 3 se observa la dispersión del recobrado. Para el sedimento estos valores oscilan entre 98,2 y 105,7 %, mientras que para el tejido biológico los resultados se observan entre 96,8 y 113,2 %, siendo el IAEA 140 el de mayor dispersión de los resultados, siendo a su vez el material que presenta menores valores de concentración de mercurio.

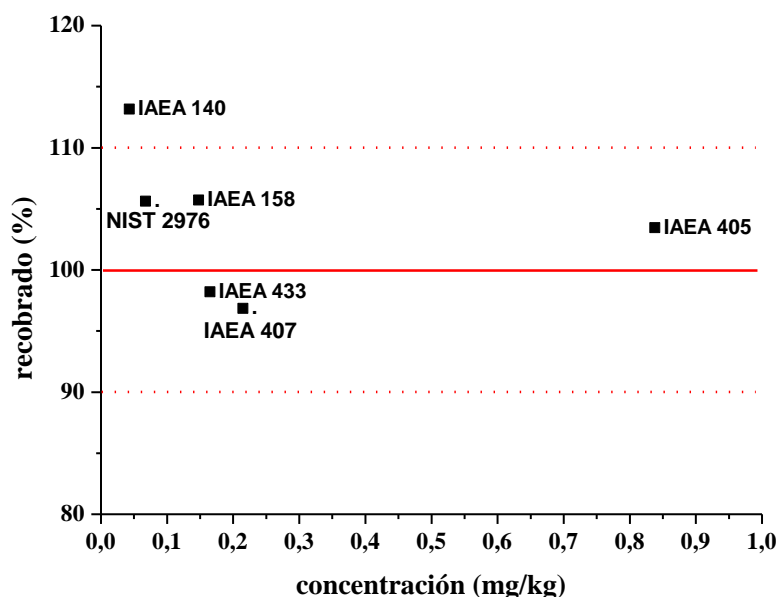


Figura 3. Resultados de la recuperación de los MR en el estudio de veracidad

En la tabla 4 se observan los diferentes parámetros utilizados para realizar el cálculo de la incertidumbre expandida de los resultados obtenidos en los sedimentos y el tejido biológico en cada una de las celdas de medición. También fueron calculados los diferentes factores de cobertura (K) para un intervalo de confianza del 95 %.

**TABLA 4. DATOS DE LOS PARÁMETROS UTILIZADOS PARA EL CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE**

Matriz (celda óptica)	Linealidad %	Reprod. %	Veracidad %	Incert. Combinada	Incert. Expandida
Tejido Biológico (celda 1)	12,12	1,99	7,1	0,141 9	0,328 K= 2,31
Tejido Biológico (celda 2)	7,91		4,56	0,934	0,211 K= 2,26
Sedimentos (celda 1)	12,12	4,17	6,8	0,145 1	0,328 K= 2,26
Sedimentos (celda 2)	7,91		3,6	0,964	0,215 K= 2,23

Los estudios de selectividad del método no fueron determinados debido a la ausencia de los efectos de matriz que son intrínsecos a las características de esta técnica, lo cual se encuentra bien explicado en la literatura [3]. Los resultados obtenidos del estudio de



precisión y exactitud sobre curvas de calibración con matrices acuosas confirman que no existe presencia de efectos de matriz, lo cual permite el uso de estándares líquidos en el proceso de calibración.

Las características de desempeño del método presentado en este trabajo demuestran la fortaleza para su utilización en programas de monitoreo y análisis de mercurio en muestras de sedimentos y tejidos biológicos que pueden ser objeto de estudio en diferentes áreas de investigación como el medio ambiente, la agricultura, inocuidad alimentaria [8].

## Conclusiones

*El proceso de validación del método de determinación de mercurio mediante el analizador directo DMA-80 cumplió con los parámetros establecidos en la Norma Cubana (NC TS 368:2010 Guía para la validación de métodos de ensayo químicos) y permite la cuantificación del mercurio en muestras de sedimentos y tejido biológico a concentraciones que satisfacen los diferentes criterios de calidad de y normativas de consumo respectivamente. El método queda validado para las condiciones de medición estudiadas.*

## Referencias bibliográficas

1. VILLAREJO, A.L.D. "Ecotoxicología y acción toxicológica del mercurio", Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia. 2004, **70** 933-959.
2. MCCAULEY, D.J; DEGRAEVE, G.M; LINTON, T.K. "Sediment quality guidelines and assessment: overview and research needs", *Environmental Science and Policy*. 2000, **3** 133-144.
3. UNITED STATE ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 7473 (SW-846). "Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and Atomic Absorption Spectrophotometry". Revision 0. Washington DC: 1998.
4. EURACHEM/CITAC. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Guide CG4. Second Edition. UK: 2000.
5. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. Norma Cubana (NC) TS 368:2010 Guía para la validación de métodos de ensayos químicos para alimentos. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Mayo 2010.
6. BUCHMAN, M.F. Screening Quick Reference Tables. National Oceanic and Atmospheric Administration. Coastal Protection and Restoration Division. 1999.
7. OFICINA NACIONAL DE NORMALIZACIÓN. Norma Cubana (NC) 493:2008 Contaminantes metálicos en alimentos, Regulaciones Sanitarias. 1<sup>ra</sup> Edición. La Habana: Mayo 2008.
8. RIBEIRO, R.F.L; GERMANO, A. "Development and validation of a method for the determination of Hg in animal tissues by direct mercury analysis (DMA-80)", *Microchemical Journal*. 2015, **121** 237-243.