PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

Determinación y cuantificación de mercurio total en tejido muscular de Pargo (*Lutjanus colorado*), mediante la técnica de vapor frío acoplado a espectrofotometría de fluorescencia atómica (CV-AFS).

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Químicas con Mención en Química Analítica

LEONARDO ANTONIO BUSTAMANTE GRANDA

Quito, 2020

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas con Mención en Química Analítica, del señor Leonardo Antonio Bustamante Granda ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Mgtr. Gabriela Fernanda Cueva Tirira

Directora de la Disertación

Quito, 04 de agosto del 2020

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, quienes siempre me brindaron su apoyo incondicional y creyeron en mí. Gracias a su esfuerzo y dedicación he podido llegar hasta donde estoy, son mi motivación para seguir adelante y un ejemplo para superarme cada día de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a Dios, porque sin él nada es posible.

A mis padres, Germán y Carmen, que hicieron hasta lo imposible para darme los estudios y que nunca me falte nada. Son el motivo y la razón por la que lucho día a día y trato de superarme.

A mis hermanos Lenin y Anita, por su confianza, respeto, cariño y motivación que siempre me dieron.

A mi hija Ana Paula, un motivo más para seguir adelante, esto también es por ti.

A mi directora de tesis, Mgtr. Gabriela Fernanda Cueva Tirira, por su asesoría en la investigación, y por guiarme a lo largo de este camino.

A Gabriela Yánez y David Romero, quienes formaron parte del proyecto del CESAQ-PUCE, por su apoyo y colaboración en el desarrollo del trabajo de investigación.

A los profesores del jurado, Mtr. Pablo Pozo y Dra. Lennys Fernández.

A mis amigos, que formaron parte de mi vida universitaria y que compartieron conmigo buenos y gratos momentos.

A todos los profesores de la Facultad de Ciencias Químicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por todo el conocimiento impartido en el ámbito personal, académico y profesional.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y al Cesaq, por el financiamiento del proyecto "Determinación de mercurio mediante vapor frío y espectrofotometría de fluorescencia atómica en diferentes matrices biológicas", y por la disponibilidad de la infraestructura, materiales y equipos de análisis.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN 1

ABSTRACT 2

1. INTRODUCCIÓN 3

2. MARCO TEÓRICO 5

2.1 MERCURIO 5

2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL MERCURIO 5

2.3 ESPECIES PRESENTES EN EL MEDIO NATURAL 6

2.4 CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL MERCURIO 7

2.5 PROCESOS DE BIOACUMULACIÓN Y BIOMAGNIFICACIÓN DEL MERCURIO EN LA CADENA TRÓFICA 8

2.6 FUENTES Y EMISIONES DE MERCURIO 8

2.7 TOXICIDAD DEL MERCURIO 9

2.8 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD 10

2.9 PROCESO DE LIOFILIZACIÓN DE LA MUESTRA DE PESCADO 10

2.10 DIGESTIÓN ÁCIDA ASISTIDA POR MICROONDAS 12

2.11 VAPOR FRÍO ACOPLADO A ESPECTROFOTOMETRÍA DE FLUORESCENCIA ATÓMICA (CV-AFS) 13

2.12 TÉCNICAS MÁS UTILIZADAS PARA ANÁLISIS DE MERCURIO 14

3. OBJETIVOS 15

1.1.1 Objetivo general 16

1.1.2 Objetivos específicos 16

4. MATERIALES Y MÉTODOS 17

4.1 TOMA DE MUESTRA 17

4.2 PREPARACIÓN DE MUESTRA 17

4.3 DIGESTIÓN ÁCIDA ASISTIDA POR MICROONDAS 18

4.4 CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO MEDIANTE LA TÉCNICA DE VAPOR FRÍO ACOPLADO A ESPECTROFOTOMETRÍA DE FLUORESCENCIA ATÓMICA CV-AFS 19
4.4.1 OPERACIÓN Y ANÁLISIS EN EL EQUIPO DE CV-AFS 20
4.5 ESQUEMA DE TRATAMIENTO DE LA MUESTRA 21
4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 22
4.6.1 MEDIA 22
4.6.2 DESVIACIÓN ESTÁNDAR 22
4.6.3 COEFICIENTE DE VARIACIÓN 23
4.6.4 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN 24
4.6.5 PRUEBA DE GRUBBS 24
4.6.6 LÍMITE DE DETECCIÓN 25
4.6.7 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN 25
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 26
6. CONCLUSIONES 41
7. RECOMENDACIONES 42
8. FIGURAS 50
9. ANEXOS 57
9.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES (CÁLCULOS) 63
9.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS 65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo medioambiental del mercurio 7
Figura 2. Equipo de espectrofotometría de fluorescencia atómica con vapor frío (CV-AFS) 20
Figura 3. Curva de calibración obtenida en el equipo de CV-AFS 30
Figura 4. Datos finales obtenidos de la concentración de mercurio total en peso húmedo de las muestras de Pargo pequeño 33
Figura 5. Datos finales obtenidos de la concentración de mercurio total en peso húmedo de las muestras de Pargo mediano 35
Figura 6. Datos finales obtenidos de la concentración de mercurio total en peso húmedo de las muestras de Pargo grande 37
Figura 7. Pargo (Lutjanus colorado) 50
Figura 8. Filetes de pescado para la determinación de humedad 50
Figura 9. Balanza infrarroja o determinador de humedad 51
Figura 10. Liofilizador 51
Figura 11. Secado de muestras de pescado 52
Figura 12. Ácidos para la digestión de muestras 52
Figura 13. Carrusel del digestor de muestras 53
Figura 14. Microondas para la digestión de muestras 53
Figura 15. Preparación de las muestras de análisis 54
Figura 16. Llave para el flujo de gases 54
Figura 17. Solución de enjuague y solución de dilución (ácido clorhídrico al 2%) 55
Figura 18. Soluciones de ácido clorhídrico al 2% y cloruro de estaño al 2% en ácido clorhídrico al 4% 55
Figura 19. Carrusel de muestras del equipo de CV-AFS 56
Figura 20. Analizador de mercurio (CV-AFS) 56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones del programa de digestión en microondas 18
Tabla 2. Datos físicos obtenidos de 5 diferentes muestras de Pargo (Lutjanus colorado) (pequeño) 27
Tabla 3. Datos físicos obtenidos de 5 diferentes muestras de Pargo (Lutjanus colorado) (mediano) 28
Tabla 4. Datos físicos obtenidos de 5 diferentes muestras de Pargo (Lutjanus colorado) (grande) 28
Tabla 5. Datos obtenidos de la curva de calibración 31
Tabla 6. Porcentajes de recuperación obtenidos del material de referencia certificado (MRC) 31
Tabla 7. Concentraciones de mercurio total obtenidas en las muestras de Pargo pequeño 32
Tabla 8. Concentraciones de mercurio total obtenidas en las muestras de Pargo mediano 33
Tabla 9. Concentraciones de mercurio total obtenidas en las muestras de Pargo grande 35
Tabla 10. Lectura de blancos 39
Tabla 11. Límites de detección y cuantificación obtenidos en el presente estudio 39
Tabla 12. Límites de detección obtenidos por técnicas de análisis para mercurio total (THg) 40

LISTA DE ANEXOS

Tabla 13. Pesos obtenidos de las muestras de Pargo de pequeño para su posterior análisis 57
Tabla 14. Pesos obtenidos de las muestras de Pargo mediano para su posterior análisis 57
Tabla 15. Pesos obtenidos de las muestras de Pargo grande para su posterior análisis . 58
Tabla 16. Concentraciones de mercurio obtenidas en el equipo de CV-AFS, procedentes de las muestras de Pargo pequeño 59
Tabla 17. Concentraciones de mercurio obtenidas en el equipo de CV-AFS, procedentes de las muestras de Pargo mediano 60
Tabla 18. Concentraciones de mercurio obtenidas en el equipo de CV-AFS, procedentes de las muestras de Pargo grande 61
Tabla 19. Desviación estándar, coeficiente de variación y porcentaje de recuperación obtenidos de las concentraciones de peso seco que resultaron de las muestras de Pargo pequeño 62
Tabla 20. Desviación estándar, coeficiente de variación y porcentaje de recuperación obtenidos de las concentraciones de peso seco que resultaron de las muestras de Pargo mediano 62
Tabla 21. Desviación estándar, coeficiente de variación y porcentaje de recuperación obtenidos de las concentraciones de peso seco que resultaron de las muestras de Pargo grande 62
Tabla 22. Datos obtenidos de la primera muestra de Pargo pequeño 65
Tabla 23. Datos obtenidos del material de referencia de pescado 66
Tabla 24. Concentración de los blancos 67

RESUMEN

En el presente trabajo de disertación se determinó mercurio total en 45 muestras de un total de quince unidades de pescado Pargo (*Lutjanus colorado*), proveniente de las costas ecuatorianas. Esto se realizó con la finalidad de hacer un análisis exploratorio o de diagnóstico del contenido de mercurio en el pez. Por consiguiente, se clasificaron los peces por tamaño: (5) pequeño (25,0-26,5 cm), (5) mediano (35,0-43,0 cm) y (5) grande (43,5-50,5 cm). La determinación se realizó mediante la técnica de vapor frío acoplado a espectrofotometría de fluorescencia atómica. Se recolectaron las muestras de pescado en el mercado "América" en la ciudad de Quito. A continuación, se procesaron para obtener el músculo, y se sometieron a un proceso de liofilización y digestión ácida mediante un sistema cerrado asistido por microondas en presencia de ácido nítrico, peróxido de hidrógeno y ácido perclórico. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de mercurio utilizando el equipo de fluorescencia atómica. Los resultados obtenidos por el instrumento correspondían a peso seco de pescado, por lo que fue necesario realizar una transformación a peso húmedo de pescado en $mg.kg^{-1}$, esto con la finalidad de determinar la cantidad de mercurio que posee el pez en estado fresco. El límite de detección y cuantificación que se obtuvo fue de 0,1 y 0,2 $\mu g.L^{-1}$ respectivamente.

La calidad de los resultados se llevó a cabo mediante el uso de un material de referencia certificado obteniendo porcentajes de recuperación entre el 95-99%. Adicionalmente, se realizó la prueba de Grubbs para detectar los valores atípicos mediante una estadística de la prueba T.

Se determinó que todas las muestras de pescado contienen mercurio total, sin embargo, no exceden los límites permisibles establecidos por el Codex Alimentarius. Además, la técnica de vapor frío acoplado a espectrofotometría de fluorescencia atómica permite analizar correctamente la cantidad de mercurio total en muestras biológicas como el pescado con un alto nivel de precisión y exactitud en los resultados.

Palabras clave: mercurio total, pescado pargo, músculo, vapor frío, liofilización, digestión ácida, espectrofotometría de fluorescencia atómica, análisis exploratorio.

ABSTRACT

In the present dissertation work, total mercury was determined in 45 samples from a total of fifteen units of snapper fish (Lutjanus colorado), originating from the Ecuadorian coasts. This was done in order to make an exploratory or diagnostic analysis of the mercury content in the fish. Therefore, fish were classified by size: (5) small (25,0-26,5 cm), (5) medium (35,0-43,0 cm), and (5) large (43,5-50,5 cm). The determination was made using the cold vapor technique coupled to atomic fluorescence spectrophotometry. Fish samples were collected in the "América" market in the city of Quito. Next, they were processed to obtain the muscle, later they underwent a process of lyophilization and acid digestion by means of a closed system assisted by microwaves in the presence of nitric acid, hydrogen peroxide and perchloric acid. Then, the amount of mercury was quantified using the atomic fluorescence kit. The results obtained by the instrument corresponded to the dry weight of the fish, so it was necessary to perform a transformation to the wet weight of the fish in mg.kg-1, this in order to determine the amount of mercury that the fish has in the fresh state. The detection and quantification limit that was obtained was 0.1 and 0.2 $\mu g.L^{-1}$ respectively.

The quality of the results was carried out by using a certified reference material obtaining recovery percentages of 95-99%. Additionally, the Grubbs test was performed to detect outliers using a T-test statistic.

All fish samples were determined to contain total mercury; however, they do not exceed the permissible limits established by the Codex Alimentarius. In addition, the cold vapor technique coupled to atomic fluorescence spectrophotometry allows to correctly analyze the amount of total mercury in biological samples such as fish with a high level of precision and accuracy in the results.

Key words: total mercury, snapper fish, muscle, cold steam, lyophilization, acid digestion, atomic fluorescence spectrophotometry, exploratory analysis.

1. INTRODUCCIÓN

La pesca es una actividad de mucha importancia en el Ecuador, ya que es una gran fuente de ingresos para la economía del país. Por lo que es importante tener en cuenta, que los ríos y océanos están propensos a la contaminación que es producida por pequeñas o grandes industrias que desechan diferentes metales pesados entre los que se encuentra el mercurio (Reyes, Vergara, Torres, Lagos & Jimenez, 2016). Por ende, es importante llegar a conocer si las especies de peces como el Pargo (*Lutjanus colorado*), está siendo afectada por la contaminación de este metal que es perjudicial para la salud humada.

El mercurio es un contaminante persistente que se encuentra en el medio ambiente y tiene una elevada toxicidad para los seres vivos. Esto genera preocupación, ya que el ingreso de este metal al medio ambiente permite su acumulación en la cadena alimenticia llegando de esta manera a los humanos por medio del consumo del pescado (Moraes et al., 2013).

El pescado es un alimento que tiene un elevado consumo en nuestro país. Proporciona proteínas de alto valor biológico y ácidos grasos esenciales, lo que favorece a mantener una buena salud cardiovascular. Sin embargo, también puede contener elementos tóxicos que ponen en riesgo la salud humana tales como el mercurio, plomo, cadmio y arsénico, contaminantes vinculados al consumo en este producto (Müller, Mesko, Moraes, Korn, & Flores, 2014). Los peces son capaces de absorber elementos contenidos en el agua u otros organismos acuáticos, ya sean esenciales o no esenciales, almacenándolos en el tejido muscular. Son parte del grupo de alimentos que pueden acumular en su estructura grandes cantidades de metales traza como el mercurio y el selenio (Bergés et al., 2015). Por esto, es importante realizar un estudio sobre el contenido de mercurio que se puede llegar a almacenar en el pescado.

En el país, se han realizado estudios sobre el contenido de mercurio en harinas de pescado mediante la técnica de Absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS) (Obando, 2015). También se ha realizado la determinación de mercurio en atún en conserva mediante la técnica de vapor frío acoplado a espectrometría de absorción atómica (CV-AAS) (Vilaña, 2019). Sin embargo, hasta la actualidad, no se ha realizado un estudio sobre el contenido de mercurio total en pescado usando la técnica de vapor frío acoplado a espectrofotometría de fluorescencia atómica (CV-AFS). La mayoría de los

estudios que se han efectuado, han sido mediante la técnica de absorción atómica, sin embargo, esta técnica posee un menor rango lineal de trabajo y una menor sensibilidad en comparación a la técnica de fluorescencia atómica (Chaves, 2016). Por este motivo se ha desarrollado este trabajo de investigación, para obtener un mayor acercamiento acerca del contenido de mercurio que está presente en estos organismos acuáticos, y determinar la presencia de metales pesados como el mercurio que pueden ocasionar efectos nocivos en las personas si no se cumple con los límites máximos permitidos por el Codex Alimentarius.

En este trabajo de investigación, se propone analizar el contenido de mercurio total (THg) en 45 muestras de pescado Pargo (*Lutjanus colorado*), que son comercializados en la ciudad de Quito. Para esto, las muestras pasan por un tratamiento previo en el que se realiza la determinación de humedad por balanza infrarroja, con el secado de muestra por medio de un proceso de liofilización y finalmente una digestión ácida asistida por microondas. Posteriormente, se realiza la cuantificación del mercurio utilizando la técnica de vapor frío acoplado a espectrofotometría de fluorescencia atómica (CV-AFS).

2. MARCO TEÓRICO

2.1 MERCURIO

El mercurio y sus derivados atraen cada vez más preocupación debido a su naturaleza altamente tóxica, bioacumulativa y no degradable. Varios derivados de mercurio difieren mucho en sus propiedades biológicas y fisicoquímicas como: la toxicidad, la solubilidad y la tasa de bioacumulación por organismos (Camino & Chavez, 2019). Los más tóxicos son los compuestos de monometilmercurio $[CH_3Hg]^+$, que representan un riesgo para la salud, debido a su mayor toxicidad, lipofilia, bioacumulación y volatilidad (Gaioli, 2012). El mercurio orgánico se encuentra en el agua, principalmente como metilmercurio $[CH_3Hg]^+$. La metilación del mercurio inorgánico que se deposita en los ríos o mares se realiza por acción química directa o mediante la acción de bacterias. El metilmercurio es el componente orgánico más común en la cadena alimentaria (Rezende, Silva, Moura, & Windmöller, 2018). El mercurio puede estar presente en los peces en todas sus formas químicas, tanto orgánicas como inorgánicas, por lo que se debe transformar estas especies de mercurio a una forma inorgánica (Hg^{2+}), ya que esta es la única especie capaz de generar el vapor de mercurio atómico (Gonzalez et al., 2015).

El mercurio es el único elemento metálico que exhibe una presión de vapor atómica apreciable a temperatura ambiente. Esta propiedad única da lugar a la posibilidad de medir este metal sin la energía térmica adicional suministrada por una llama o calentamiento electrotérmico (Perez, Ángel, Gomez, & Cartagena, 2014).

2.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL MERCURIO

El mercurio es un metal tóxico de color plateado, se considera pesado ya que posee una densidad de 13,5955 $g.cm^{-3}$ a temperatura ambiente. Su símbolo químico es Hg con un número atómico de 80 y un peso atómico de 200,59 u.m.a. Este compuesto se caracteriza por ser el único metal líquido a temperatura y presión ambiental. Tiene un punto de fusión de (-38,87 °C) que es el más bajo de todos los metales, y su punto de ebullición es de 356,58 °C.

El mercurio está presente en el medio ambiente en tres formas químicas: mercurio elemental (Hg^0), mercurio inorgánico (Hg^{2+}) y mercurio orgánico, principalmente metilmercurio (MeHg) (González et al., 2014). Las propiedades del mercurio son muy

diferentes dependiendo del estado de oxidación en el que se encuentre. Además, posee siete isótopos estables (196, 198, 199, 200, 201, 202, 204) y cuatro isótopos radiactivos inestables (194, 195, 197, 203) (Jiménez, 2009).

2.3 ESPECIES PRESENTES EN EL MEDIO NATURAL

El mercurio es generalmente un metal de origen mineral y se encuentra en la atmósfera, geósfera, hidrósfera y biósfera. En la atmósfera, se encuentra en gran parte en forma de vapor como mercurio elemental (Hg^0), mientras que el resto de este metal aparece en forma de mercurio inorgánico (Hg^{2+}) unido a partículas en suspensión (Aparicio, 2015).

Además, se encuentra en suelos y sedimentos, y en la superficie del suelo, en donde se genera una reacción de transformación de Hg^{2+} a Hg^0, debido a la acción de la luz y diversas sustancias húmicas. En suelos y sedimentos se dan procesos de metilación-demetilación, debido a que el Hg^{2+} que es la especie predominante, puede transformarse en metilmercurio CH_3Hg^+ por diversos mecanismos que se dan por medio de procesos microbianos (Mahbub et al., 2017). En términos químicos, el monometilmercurio, se comporta en el medio acuoso como el mercurio inorgánico y se encuentra unido principalmente a partículas y materia orgánica disuelta (Jiménez, 2009).

En aguas dulces continentales no contaminadas, el Hg^{2+} no se encuentra como ion libre sino formando complejos con OH^- como: hidróxido de mercurio [$Hg(OH)^+$], dihidróxido de mercurio [$Hg(OH)_2$] o el trihidróxido de mercurio [$Hg(OH)_3^-$], mientras que en los estuarios y océanos predominan los clorocomplejos como: cloruro de mercurio ($HgCl^+$), hidroxicloruro de mercurio (HgClOH), dicloruro de mercurio ($HgCl_2$), tricloruro de mercurio ($HgCl_3^-$) y tetracloruro de mercurio $(HgCl_4)_2^-$ (Cuello, 2017).

2.4 CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL MERCURIO

En el ciclo del mercurio se genera un flujo continuo de este elemento entre la atmósfera, tierra y agua, lo cual constituye el conjunto de procesos que se muestran en la siguiente figura:

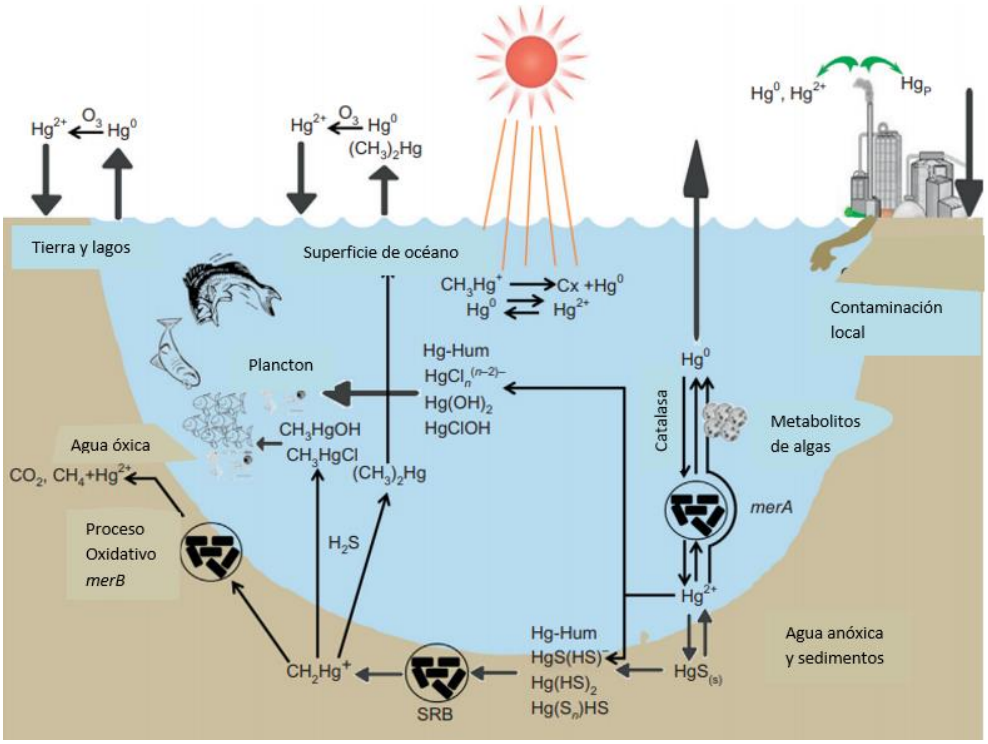


Figura 1. Ciclo medioambiental del mercurio

(De, Dash, & Das, 2014)

El mercurio inicia su ciclo geoquímico después de ser emanado en la corteza terrestre, luego pasa al aire, al agua y a los suelos, desde donde llega a los organismos vivos como plantas, animales y finalmente al hombre por medio de la cadena alimentaria (Ciclo global biogeoquímico del mercurio, 2009).

2.5 PROCESOS DE BIOACUMULACIÓN Y BIOMAGNIFICACIÓN DEL MERCURIO EN LA CADENA TRÓFICA

La bioacumulación de mercurio se produce principalmente a través de las cadenas tróficas acuáticas. La toxicidad del mercurio pasa a ser un problema real para los organismos acuáticos que tienden a acumular mercurio por difusión y por la ingesta de alimentos contaminados. Una vez que los compuestos orgánicos del mercurio han llegado al ambiente acuático, van a acumularse en los seres vivos debido a que el metilmercurio posee una fuerte afinidad a las proteínas del tejido muscular (García, 2014). Este proceso está mediado por las bacterias reductoras de sulfato que están presentes en el agua, por lo que toman mercurio en su forma inorgánica (Hg^{2+}) y lo convierten a su forma orgánica (CH_3Hg^+) a través de procesos metabólicos. Estas bacterias sulforeductoras forman metilmercurio y este compuesto que se encuentra en el agua, es absorbido por el plancton. Por lo tanto, el metilmercurio presente en el agua queda disponible para los organismos del medio y pasa por la cadena trófica acuática. Esto conlleva a un proceso de biomagnificación en la cadena trófica, por lo que los peces de los niveles tróficos más altos tienen concentraciones de mercurio mucho más elevadas (Kehrig et al., 2017).

2.6 FUENTES Y EMISIONES DE MERCURIO

El mercurio puede provenir de fuentes de origen natural y antropogénico. Las principales fuentes naturales de mercurio son: la desgasificación de la corteza terrestre, las emisiones de vapores de mercurio de los volcanes, la erosión de depósitos minerales y las reemisiones de la vegetación por los incendios forestales (Fernandez, 2016). Las principales fuentes antropogénicas de mercurio pueden venir de la actividad humana como los combustibles fósiles (especialmente el carbón y en menor medida el gas y el petróleo), producción de metales no ferrosos (producción primaria de aluminio, cobre, plomo y zinc), producción de mercurio metálico, producción de oro de la minería a gran escala, liberaciones de mercurio de la refinación de petróleo, liberaciones de mercurio de la industria de cloro-álcali (tecnología de células de mercurio), liberaciones de mercurio presente en productos (baterías, dispositivos de medición, lámparas, dispositivos eléctricos y electrónicos, aplicaciones dentales y otros usos), eliminación de desechos, liberaciones de aguas residuales municipales contaminadas con mercurio, también en las centrales eléctricas de carbón rojo y en el lavado del carbón (UNEP, 2018).

2.7 TOXICIDAD DEL MERCURIO

Tanto el mercurio metálico, como sus sales orgánicas e inorgánicas son tóxicos para humanos, animales y plantas. Siendo los compuestos orgánicos los más tóxicos, entre los que destaca el metilmercurio (CH_3Hg^+). Además, de aquí se generan los derivados alquilados. Estudios han demostrado que el metilmercurio (forma más tóxica del mercurio), representa en los peces entre el 80-100% del mercurio total (THg) (Gonzalez et al., 2015). Sin embargo, debido a que la mayor parte del mercurio en el tejido de los peces está presente principalmente como MeHg, la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU. (EPA) recomienda que el THg se pueda determinar como un enfoque para la evaluación de riesgos para la salud humana y como una técnica rentable (EPA, 2000).

Los factores que determinan los efectos tóxicos en los humanos son la velocidad de absorción y la cantidad absorbida, las propiedades fisicoquímicas de los compuestos y la susceptibilidad del individuo. El mercurio y sus compuestos pueden ingresar al cuerpo a través de la piel, del tracto gastrointestinal y del sistema respiratorio (Gaioli, Amoedo, & González, 2012). La ruta más común de exposición al mercurio es comer pescado que contenga metilmercurio ($CH3Hg^+$), ya que es su forma más tóxica (Gonzalez et al., 2015). La toxicidad del mercurio se produce porque precipita las proteínas que son sintetizadas por la célula e inhibe los grupos sulfidrilo de varias enzimas esenciales, lo que causa una alteración en el sistema metabólico y enzimático de la célula, inhibe la síntesis de proteínas y afecta su función energética (Ramírez, 2008).

Se sabe que la alta toxicidad del mercurio causa efectos nocivos en el sistema nervioso central en humanos a bajas concentraciones (OMS, 2017). Por tanto, este metal puede causar daños en el cerebro (Azevedo et al., 2012), el corazón, los riñones, los pulmones y sistema inmune. Además, puede penetrar la placenta y llegar a los fetos en desarrollo que corren el riesgo de ingerir mercurio, causando efectos adversos sobre el desarrollo, comportamiento mental, incluso inducir al parto prematuro (Sommar et al., 2013).

2.8 DETERMINACIÓN DE HUMEDAD

Para este estudio se utilizó un determinador de humedad que se basa en un principio termogravimétrico. Al comienzo de la medida, el equipo determina el peso de la muestra, e inmediatamente la muestra se calienta por medio de luz infrarroja con una lámpara halógena desecadora, por lo que la humedad de la muestra de evapora. Durante la operación de desecación, el equipo determina continuamente el peso de la muestra hasta presentar el resultado final. La pérdida del peso total de la muestra se interpreta como contenido de humedad en porcentaje (%) (Mettler, 2015).

La determinación de humedad por medio de la termobalanza o determinador de humedad, presenta varias ventajas, debido a que es un método automático, el error de pesada es mínimo porque la muestra no es removida, no se utilizan reactivos ni materiales externos, no es un método costoso, el equipo es fácil de usar y hay menos interferencias que puedan afectar a los resultados. Es un método útil para investigación, pero no es práctico debido al número de muestras por análisis y al tiempo empleado (Tirado, Montero, & Acevedo, 2015). La determinación de humedad es importante en este estudio, ya que va a permitir obtener los resultados de mercurio total en peso húmedo, es decir, en peso fresco de pescado.

2.9 PROCESO DE LIOFILIZACIÓN DE LA MUESTRA DE PESCADO

El proceso de liofilización es un proceso de secado que consiste en deshidratar el alimento por congelación. Lo que ocurre es que se congela el producto y posteriormente, se remueve el hielo (agua atrapada) por sublimación. Esto se realiza aplicando calor a condiciones de vacío para lograr que el agua se evapore y evitar que pase a su estado líquido. Lo que se va a obtener es un desecado del alimento que servirá para un mayor tiempo de conservación sin necesidad de una cadena de frío (Parzanese, 2012). El proceso de liofilización permite almacenar la muestra en un ambiente de poca humedad y mantener su conservación durante el análisis a realizar. Adicionalmente se logra un producto seco que mantiene la mayoría de las propiedades organolépticas de su estado original, como el aroma, el sabor, hasta el color del alimento (Cortés, 2017). El tiempo de procesamiento para la liofilización de las muestras fue de 48 horas para las muestras de pescados.

Existen otros métodos para el secado de alimentos como el pescado, como por ejemplo el secado en estufa, en estufa de vacío, destilación azeotrópica, método de Karl Fischer y el método de la balanza infrarroja. El método de secado en estufa previene la descomposición de la muestra por lo que se calienta a baja temperatura, sin embargo, es un método muy extenso y exige actividades que pueden afectar dicho proceso como puede ser la manipulación de la muestra y el medio ambiente, factores que van a influir en la operación de secado. Otra razón por la que no se utilizó el horno o estufa se debe a que el calentamiento no es uniforme, por tanto, no se va a extraer toda el agua contenida en el alimento (Villegas, 2011).

El método de secado en estufa de vacío tiene las mismas ventajas que el secado por la estufa convencional, con la diferencia de que no permite determinar varias muestras simultáneamente y contiene un eficiencia baja para alimentos con alto porcentaje de humedad como el pescado (Martínez & Cortes, 2014). La destilación azeotrópica se basa en la destilación por arrastre con vapor de tolueno, del agua contenida en la muestra de un producto dado bajo condiciones establecidas. El problema es que el tolueno es un disolvente inmiscible e inflamable, cualquier impureza puede ocasionar resultados erróneos y posee una baja precisión para la determinación de humedad (UNAM, 2008). El método de Karl Fischer es un método estándar para ensayos de humedad, es útil para determinar agua en grasas y aceites, por lo que previene que la muestra se oxide. Sin embargo, se usa para alimentos con bajo contenido de humedad, el reactivo Fischer es inestable y se usa piridina que es un compuesto muy reactivo (Mettler, 2011).

Este proceso de secado de muestra empleado en el presente estudio posee varias ventajas fundamentales con respecto a los métodos anteriormente mencionados. Las ventajas que ofrece el proceso de liofilización es que no utiliza elevadas temperaturas por lo que se previene el daño térmico, permite un mayor tiempo de conservación del producto, su fácil transporte y almacenamiento. Además, brinda una estabilidad microbiológica ya que inhibe el crecimiento microbiano en el alimento, permite obtener la mayor parte de sus propiedades al momento de rehidratarlo y mantiene su valor nutricional luego de haber pasado dicho proceso (Ratti, 2013). Antes de someter las muestras al proceso de liofilización, se ultracongelaron, esto con la finalidad de lograr la estabilización térmica del alimento (Egas, 2019).

2.10 DIGESTIÓN ÁCIDA ASISTIDA POR MICROONDAS

La mineralización de las muestras suele ser un paso necesario antes de determinar las concentraciones de mercurio con las técnicas espectroscópicas. Generalmente implica el calentamiento de la muestra con diferentes combinaciones de ácidos minerales tales como ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido perclórico; y otros agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno y el permanganato de potasio (Arizpe, 2014).

A diferencia de las técnicas de calentamiento convencionales, la digestión ácida asistida por microondas es más rápida porque las ondas electromagnéticas actúan directamente sobre las moléculas polares del medio, calentando la solución desde el interior, en lugar de depender de la transferencia de calor desde una fuente externa. Por lo tanto, se puede lograr un calentamiento homogéneo en muy poco tiempo. La energía de microondas se ha aplicado para acelerar la reducción de dobles enlaces. Además, el calentamiento por microondas permite una rápida descomposición de las muestras debido a un control sobre el tiempo y la potencia de calentamiento (Wu et al., 2012).

La gran ventaja del calentamiento por microondas es que la energía se genera en la mezcla de digestión y no se transfiere por conducción a diferencia del calentamiento convencional en plancha. Además, en la digestión por microondas se puede trabajar con sistemas presurizados abiertos o cerrados, que permiten una reducción considerable en el tiempo total de análisis, así como el riesgo de contaminación de los digestores, y una reducción de reactivos corrosivos para obtener una digestión completa (Korn et al., 2008). Para el presente trabajo de investigación, se realizó un método de digestión húmeda que utiliza recipientes cerrados que han tenido éxito cada vez más por los métodos de digestión asistida por microondas. Este enfoque ofrece una preparación rápida de la muestra, permite el uso de alta temperatura y presión y, en consecuencia, una oxidación más eficiente de los compuestos orgánicos. Es un sistema simple y rápido y su uso reduce el riesgo de contaminación y también minimiza la pérdida de cualquier analito volátil, como el mercurio (Ferreira et al., 2015). Sin embargo, este tipo de dispositivo permite el uso de pequeñas cantidades de muestra, debido a la gran cantidad de gases liberados (Gao et al., 2012).

2.11 VAPOR FRÍO ACOPLADO A ESPECTROFOTOMETRÍA DE FLUORESCENCIA ATÓMICA (CV-AFS)

La espectrofotometría de fluorescencia atómica (AFS), es una técnica de emisión, por lo que requiere de una fotoexcitación previa del vapor atómico. La activación o excitación de los átomos del analito, seguida de la desactivación con la consecuente emisión de la radiación fluorescente, que puede tener lugar a la misma longitud de onda (253,7 nm). Esto se conoce como fluorescencia resonante (Amador, 2010).

En la técnica de espectrofotometría de fluorescencia atómica con vapor frío, se hace reaccionar una muestra acuosa acidificada, que contiene el analito en su forma iónica (Hg^{2+}), con un agente reductor, como cloruro de estaño ($SnCl_2$), para llevarlo a su forma elemental (Hg^0), como se observa en la siguiente reacción (Lima, 2010):

$$Hg^{2+} + Sn^{2+} \rightarrow Sn^{4+} + Hg^0$$

En esta reacción se genera mercurio elemental volátil a temperatura ambiente, que va a ser transportado hasta un separador gas-líquido por medio de un gas portador como el Argón (Ar). Posteriormente, el vapor de mercurio va a pasar a la celda de fluorescencia donde se va a poner en contacto con la fuente de radiación (lámpara de mercurio). Es ahí, donde los átomos del analito se van a excitar y luego van a pasar a un nivel de menor energía, es decir, a su estado basal, para finalmente emitir la radiación absorbida a una longitud de onda de 253,7 nm. Parte de esta radiación emitida, va a llegar hasta el detector (fotomultiplicador) donde se va a generar la señal eléctrica. El contenido del analito de interés presente en la muestra, es determinado en función de la intensidad de fluorescencia atómica (Lima, 2010).

La detección por espectrofotometría de fluorescencia atómica (AFS), especialmente junto con la técnica de vapor frío (CV), se está volviendo popular y está reemplazando a la espectroscopía de absorción atómica (AAS) para el análisis de mercurio debido a su instrumentación simple y límites de detección ultra bajos de hasta ppb o $\mu g.L^{-1}$. Teniendo como principales ventajas: la alta sensibilidad, selectividad, operación fácil, bajo costo relativo y bajo consumo de gas argón (Aranda, Gil, Moyano, De Vito, & Martinez, 2009). La espectrometría de fluorescencia atómica se ha convertido en una de las herramientas analíticas más importantes para el análisis de oligoelementos incluido el mercurio (Krishna et al., 2005).

El mercurio es el único metal que se encuentra en estado líquido a temperatura ambiente y se evapora con facilidad, por lo que su atomización es aún más simple. Su determinación se basa en la reducción de las formas inorgánicas a Hg elemental utilizando cloruro de estaño ($SnCl_2$) (Guzmán et al., 2011) o tetrahidroborato de sodio ($NaBH_4$) (Gao, Jiang, He, Yin, & Shi, 2008). Este método se conoce como vapor frío (CV) y es el más utilizado ya que no hay pérdida para la introducción de la muestra hacia el sistema de detección del equipo. El límite de detección que se puede alcanzar es menor a 1 ppb o 0,001 ppm Las variables que se deben controlar para el sistema de vapor frío son: concentración de cloruro de estaño ($SnCl_2$) y velocidad de flujo de gas portador (Ar) (Shah, Kazi, Baig, Afridi, & Arain, 2012).

La concentración de $SnCl_2$ ha sido reconocida como una de las variables más críticas en la generación de vapor para la detección de AFS (Guzmán et al., 2011). Concentraciones de $SnCl_2$ mayores a 0,5% (p/v) pueden conducir a la precipitación de la solución de cloruro estannoso en la bobina de reducción cuando se mezcla con la fase móvil que fluye. El cloruro estannoso se debe solubilizar en HCl al 4% (v/v) para evitar su descomposición hidrolítica (Serra, Estela, & Cerdà, 2008).

El cloruro de estaño se utiliza generalmente como agente reductor debido a su menor costo en relación con el borohidruro de sodio ($NaBH_4$). El borohidruro de sodio promueve una reducción más rápida y efectiva, por lo que se prefiere antes que al $SnCl_2$. Sin embargo, el uso de $NaBH_4$ promueve la formación de un exceso de H_2 que produce interferencias espectrales. En cambio, el $SnCl_2$ no genera H_2 durante el curso de la reducción de mercurio, lo que podría producir un efecto de enfriamiento en las señales de fluorescencia de mercurio (Ferreira et al., 2015).

Función del gas portador (Ar)

El gas portador desempeña un papel indispensable en el método CV-AFS. Tiene la función de impulsar el vapor de Hg generado al atomizador del tubo de cuarzo en el instrumento AFS. Asimismo, se encarga de llevar el vapor de Hg^0 generado de la fase líquida a la fase gaseosa y luego transportarlo a la celda de detección. El gas portador debe presentar una alta pureza (99.999%), debe ser liviano y libre de interferencias (Guzmán et al., 2011).

El flujo del gas portador es muy importante, ya que, la dilución del vapor de mercurio por el gas portador y una baja densidad del mercurio elemental en la celda de detección, contribuyen a la disminución de la sensibilidad. Por lo tanto, se debe utilizar una velocidad de flujo de argón adecuada para que el gas portador mantenga la señal máxima con buena precisión (Pohl, Jimenéz, Voges, Bings, & Broekaert, 2008).

2.12 TÉCNICAS MÁS UTILIZADAS PARA ANÁLISIS DE MERCURIO

Existen algunas técnicas que se han desarrollado para el análisis de mercurio en matrices ambientales y biológicas, como la técnica de vapor frío acoplado a espectrofotometría de absorción atómica (CV-AAS) (Panichev & Panicheva, 2015), espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (GFAAS) (Moraes et al., 2013), vapor frío acoplado a espectrofotometría de fluorescencia atómica (CV-AFS) (Brombach, Chen, Corns, Feldmann, & Krupp, 2015), analizador directo de mercurio DMA (Vieira, Nascentes, & Windmöller, 2014) y espectrometría de masas de plasma acoplada inductivamente (ICP-MS) (Perez et al., 2014).

De todas ellas, la técnica CV-AAS ha sido y sigue siendo la más utilizada. Algunas de las características que hacen de esta técnica una de las más idóneas para la determinación del contenido en mercurio en muestras ambientales y biológicas es: su aceptable sensibilidad, debido a que ofrece menores límites de detección que AAS, su elevada selectividad, ya que, gracias al sistema de vapor frío, se separa el vapor de mercurio de la matriz y se eliminan la mayoría de los posibles interferentes presentes en la misma. En cambio, en ICP-MS se pueden presentar interferencias de la matriz o interferencias espectrales, especialmente cuando se requiere un análisis para la determinación de las especies de mercurio (Nardi et al., 2009). Adicionalmente, la técnica de CV-AFS, posee un rango lineal de trabajo más amplio que la técnica de absorción atómica (AAS), ofrece un costo de inversión bajo en comparación a la técnica de ICP-MS, y se puede analizar una mayor cantidad de muestra a diferencia de la técnica de análisis directo de mercurio (DMA), que se limita a los 100 mg de muestra (Vieira et al., 2014).

Por último, está su capacidad de acoplamiento automatizado a sistemas híbridos que permiten realizar análisis de especiación de mercurio tales como cromatografía de gases (GC), cromatografía de líquidos (LC) y espectrometría de masas de plasma acoplada inductivamente (ICP-MS) (Ruiz, 2016).

3. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Determinar el contenido de mercurio total en tejido muscular de Pargo (*Lutjanus colorado*) mediante la técnica de vapor frío acoplado a espectrofotometría de fluorescencia atómica CV-AFS, a fin de realizar un análisis exploratorio acerca del contenido de mercurio en el pez.

1.1.2 Objetivos específicos

Determinar las propiedades fisicoquímicas como el porcentaje de humedad en las muestras de Pargo (*Lutjanus colorado*) mediante el uso de una balanza infrarroja, y reportar los resultados en $mg.kg^{-1}$ de peso húmedo de pescado.

Realizar el tratamiento de las muestras de pescado mediante los procesos de liofilización y digestión ácida en microondas para el análisis y determinación de mercurio total (HgT) en el pescado.

Cuantificar el mercurio total presente en muestras de Pargo (*Lutjanus colorado*) pequeño, mediano y grande, mediante la técnica de CV-AFS, y comparar con los límites establecidos por el Codex Alimentarius.

Determinar el límite de detección y cuantificación de la técnica de CV-AFS.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 TOMA DE MUESTRA

La toma de muestras se realizó en el mercado "América" donde hay 60 puestos de venta de mariscos y pescado, de acuerdo con la Agencia de Coordinación Distrital del Comercio, Quito. Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia. Esta técnica de muestreo se basa en seleccionar una muestra de la población por el hecho de ser accesible, es decir, los individuos empleados en la investigación se seleccionan porque están fácilmente disponibles y porque se sabe que pertenecen a la población de interés, más no porque hayan sido seleccionados mediante un criterio estadístico (Ochoa, 2015). Este tipo de muestreo fue realizado, debido a que se trata de una investigación exploratoria (diagnóstico) del contenido de mercurio en los peces, por tanto, no se consideró seleccionar una muestra que represente a toda la población. Idealmente, en la investigación, es bueno analizar muestras que representen a la población. Pero, en algunas investigaciones, la población es demasiado grande para evaluar y considerar a toda la población (Otzen & Manterola, 2017).

Se recolectó la cantidad de 15 pescados, 5 por cada tamaño (pequeño, mediano y grande), cada pescado se analizó por triplicado, lo que da un total de 45 muestras. Las muestras se transportaron al laboratorio mediante cadena de frío manteniendo una temperatura aproximada de 4 °C y la posterior preparación de la muestra (EPA, 2000).

4.2 PREPARACIÓN DE MUESTRA

Para la medición de los pescados, se realizaron dos medidas de longitud por cada muestra. Se determinó la longitud total y la longitud estándar del pez. La longitud total se refiere a la distancia que hay desde la punta del hocico hasta la punta del lóbulo más largo de la aleta caudal del pez. Esta medición se la realiza generalmente con los dos lóbulos comprimidos a lo largo de la línea media; es decir, la medición se la realiza en línea recta y no sobre la curvatura del cuerpo. Mientras que, la longitud estándar se refiere a la distancia que existe entre la punta del hocico hasta el límite posterior de la última vértebra del pez. En otras palabras, esta medición no incluye el largo de la aleta caudal (Segura, Ortega, & Olaya, 2011).

Posteriormente, cada muestra se lavó con agua destilada para luego filetear el pescado entero y obtener sub-muestras del músculo dorsal. Para esto, se utilizó un cuchillo de cerámica con el fin de evitar una contaminación de metales. Posteriormente, se realizó la determinación de humedad de cada muestra de pescado mediante la balanza infrarroja HB43-S, marca Mettler Toledo, Suiza, la cual, utiliza un sistema de análisis termogravimétrico. Para la medición de humedad se colocó la muestra del músculo de pargo en el plato de la balanza en un rango de 2,6-3,5 g, donde se secó a una temperatura de 160 °C por un periodo aproximado de 40 minutos. La muestra de pescado se sometió a un proceso de ultracongelación a -25°C en la ultracongeladora marca Infrico Medcare, España; y luego se liofilizó por un tiempo aproximado de 48 horas en un equipo Cool Safe Touch 55-4, marca Labogene, Dinamarca. Una vez liofilizada la muestra, se pulverizó y se separó en sub-muestras de 1 g en bolsas herméticas dentro de un desecador.

4.3 DIGESTIÓN ÁCIDA ASISTIDA POR MICROONDAS

Las muestras de pescado se digirieron mediante un sistema de control de tiempo, temperatura y potencia de calefacción determinados, en el equipo microondas MARS 6, marca CEM, Estados Unidos. Se trabajó en viales de teflón para digestión de alta presión, MARS EasyPrep.

Para la digestión de muestra de pescado se adecuó el método propuesto por (Shah, Kazi, Baig, Afridi, & Arain, 2012), utilizando 0.3 g de muestra liofilizada. Posteriormente, se añadió en el vial de teflón, 1 mL de ácido nítrico concentrado (HNO_3), 1 mL de peróxido de hidrógeno concentrado (H_2O_2) y 1 mL de ácido perclórico concentrado ($HClO_4$). Se agitaron suavemente los viales y se esperaron 10 minutos antes de cerrarlos para que no haya exceso de gases y presión en los viales. Los viales de digestión ácida se colocaron en el carrusel del microondas, y luego se acondicionó el programa de digestión. En la Tabla 1, se observan las condiciones utilizadas para la digestión:

Tabla 1. Condiciones del programa de digestión en microondas

Paso	Potencia		Rampa de tiempo (min)	Temperatura (°C)	Tiempo de retención (min)
	Max	%			
1	1400 W	80	20	210	15

Posterior a la digestión por microondas, las muestras se dejaron enfriar en los viales para luego filtrar con papel Whatman. Luego de filtrar se añadió 1 mL de ácido clorhídrico concentrado (HCl) y se aforó en balones de 50 mL con agua grado reactivo calidad alta pureza (resistividad 18.2 MΩ·cm a 25 °C) obtenida de un sistema de agua pura directa Genie 5 Direct-Pure Water System marca Rephile, China. A continuación, se trasvasaron las soluciones a los viales de inyección para realizar el análisis en el equipo de CV-AFS.

4.4 CUANTIFICACIÓN DE MERCURIO MEDIANTE LA TÉCNICA DE VAPOR FRÍO ACOPLADO A ESPECTROFOTOMETRÍA DE FLUORESCENCIA ATÓMICA CV-AFS

Para la cuantificación de mercurio total mediante CV-AFS, se utilizó el equipo Mercur-Plus, marca Analytik Jena, Alemania. El equipo utiliza las siguientes soluciones para su operación:

a) Ácido clorhídrico al 2 % para blancos, solución ácida de reacción, soluciones de dilución y de enjuague.
b) Cloruro de estaño al 2 % preparado en ácido clorhídrico al 4 %, para la reacción de reducción.

Se preparó una solución madre de mercurio de 50 $\mu g.L^{-1}$ a partir del estándar de mercurio (9.995 ± 0.056 $mg.L^{-1}$), Inorganic Ventures, Estados Unidos. El equipo está programado para diluir la solución madre de mercurio de 50 $\mu g.L^{-1}$ e inyectar automáticamente la curva de calibración de 1, 2, 3, 4 y 5 $\mu g.L^{-1}$. Todas las soluciones fueron preparadas en agua grado reactivo calidad alta pureza.

La reacción de generación de vapor se dio empleando $SnCl_2$ en medio ácido como agente reductor (Pohl, Zapata, Voges, Bings, & Broekaert, 2008).

4.4.1 OPERACIÓN Y ANÁLISIS EN EL EQUIPO DE CV-AFS

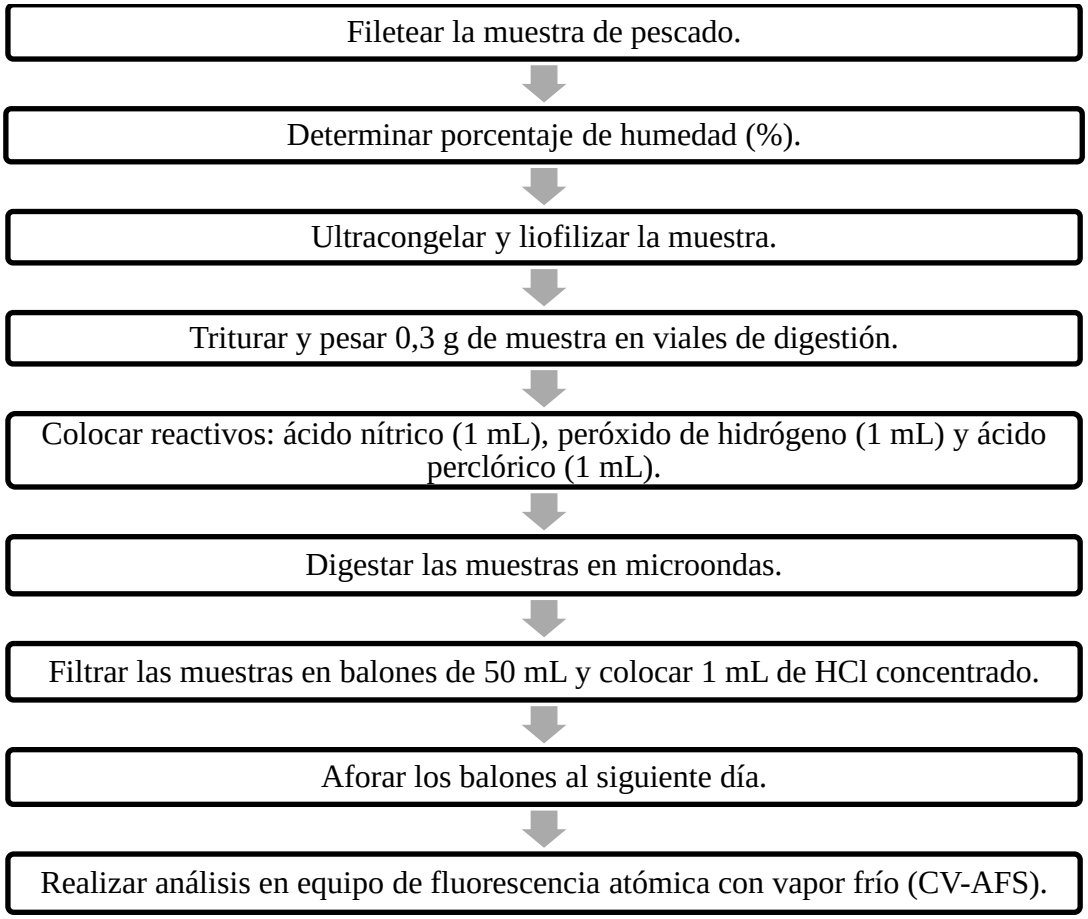


Figura 2. Equipo de espectrofotometría de fluorescencia atómica con vapor frío (CV-AFS)

- Abrir las llaves de flujo del gas argón.
- Encender el equipo de Fluorescencia atómica y luego el computador.
- Ajustar las mangueras de inyección y de reactivos (bombas peristálticas).
- Rellenar el contenedor de solución de Cloruro de estaño al 2 %, preparado en HCl al 4 %.
- Rellenar los contenedores para el blanco, solución ácida, solución de dilución y de enjuague con HCl 2 %.
- Colocar el estándar de 50 µg L^{-1} de mercurio en la posición 131, y el blanco en la posición 130, del carrusel.
- Abrir el programa WinAAS Ver: 4.7.9.0 – Methods Mercur Tech: Hg fluorescence.
- Elegir método de análisis (Method).
- Cargar método (Load method).
- Elegir la opción Mercur, y activar las bombas peristálticas para que las mangueras se llenen con las respectivas soluciones.
- Chequear lámpara (Lamp Check).
- Programar la curva de calibración en el equipo en la opción Calibration.
- Iniciar la curva de calibración, Start/Ints.
- Colocar secuencia de muestras en la opción Samples.
- Guardar la secuencia de muestras e iniciar la secuencia.
- El equipo iniciará con el análisis de las muestras en el equipo de CV-AFS.

Las muestras se analizaron por triplicado, las lecturas por duplicado. Además, por cada lote de 11 muestras se leyó un material de referencia certificado (MRC) DORM-4 fish protein, National Research Council Canada y un blanco. Finalmente, se programó el software para la inyección automática de las muestras previamente digestadas en microondas.

4.5 ESQUEMA DE TRATAMIENTO DE LA MUESTRA



4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico que se realizó en el presente trabajo de investigación, tuvo el objetivo de asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos del contenido de mercurio en las muestras de Pargo (*Lutjanus colorado*). Para este análisis estadístico se empleó la herramienta de Excel. En donde, se calculó la media, desviación estándar, desviación estándar relativa y el porcentaje de recuperación. Además, se realizó la prueba de Grubbs para los outliers o medidas "atípicos".

4.6.1 MEDIA

La media o promedio es el valor resultante de la suma de todos los datos o conjunto de valores divididos entre el número total de los datos. Se define por la siguiente fórmula matemática:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

Donde:

$\bar{x}$ = media aritmética.

Xi = Dato o valor experimental.

n = Número total de valores que integran el conjunto.

Las repeticiones de la lectura de una muestra, permite estimar el error experimental del método. Mientras mayor sea el número de repeticiones para cada experimento, mayor será la precisión del resultado final (Polo, 2012). En el presente trabajo se registró por triplicado el resultado de la muestra y se realizó dos medidas de análisis por cada una.

4.6.2 DESVIACIÓN ESTÁNDAR

La desviación estándar es un parámetro estadístico que mide la variabilidad de un conjunto de datos. Identifica la dispersión promedio alrededor de la media, es decir, se refiere a la separación que existe entre los resultados de un experimento (Polo, 2012). La desviación estándar está dada por la siguiente ecuación:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Donde:

S = Desviación estándar.

Xi = Dato o valor experimental.

$\bar{x}$ = media aritmética.

n = Número total de valores que integran el conjunto.

De igual manera, la desviación estándar se calculó con la finalidad de evaluar la precisión del método utilizado para el análisis de las muestras de pescado.

4.6.3 COEFICIENTE DE VARIACIÓN

El coeficiente de variación (CV) o desviación estándar absoluta (sd), sirve para determinar la precisión de un método y se la puede definir como el grado de concordancia entre los resultados que se obtienen cuando un método se aplica repetidamente sobre distintas porciones representativas de una misma muestra, midiendo así, el error aleatorio de un método. El coeficiente de variación se expresa por la siguiente ecuación que se detalla a continuación (Evans, 2015):

$$\%\, CV = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

Donde:

CV = Desviación estándar relativa.

S = Desviación estándar.

$\bar{x}$ = media aritmética.

Esta medida se puede estimar de 2 formas: Repetibilidad y reproducibilidad del método.

4.6.4 PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN

Se lo define como el acercamiento de los resultados experimentales obtenidos al valor verdadero. Los estudios de exactitud se expresan en 3 grados, de 80, 100 y 120% de la concentración esperada del analito en la muestra, siguiendo la siguiente expresión matemática (Obando, 2015):

$$\% R = \frac{Cm}{Cr} * 100$$

Donde:

Cm = Concentración medida.

Cr = Concentración real.

Para estimar la exactitud del método, el porcentaje de recuperación debe estar entre el 80 – 120 % de aceptabilidad (Suarez, Arévalo, Linares, & Ustáriz, 2009).

4.6.5 PRUEBA DE GRUBBS

El Test de Grubbs es un test estadístico para outliers, es decir, para los valores atípicos. Los datos son clasificados en orden ascendente y se calcula la media y la desviación típica. Aquellos puntos más altos o más bajos pueden ser declarados estadísticamente como un outlier. Esto se expresa mediante las siguientes fórmulas:

El estadístico Z para el valor más pequeño es:

$$z = \frac{\bar{x} - x_1}{s}$$

El estadístico Z para el valor más grande es:

$$z = \frac{x_n - \bar{x}}{s}$$

Donde *s* es la desviación típica. El estadístico *z*, También denominado *G* es comparado con un valor crítico de *z* o $G_{\text{crítico}}$ según el tamaño de la muestra y el nivel de significación α seleccionado. Si el estadístico *z* es más grande que el *z* crítico, la hipótesis nula es rechazada y la conclusión es que el dato bajo consideración es un outlier (Fernández, 2015).

4.6.6 LÍMITE DE DETECCIÓN

Es la concentración mínima del analito a identificar que genera una señal analítica en el instrumento que es significativamente de la señal del blanco o ruido de fondo (Mongay, 2011). Para determinar este parámetro a un nivel de confianza del 95%, se debe calcular la señal media del blanco analítico, más 3 veces la desviación estándar del blanco (sd2), mediante la siguiente ecuación matemática:

$$LD = Sb + (3 * sd2)$$

Dónde:

LD = Límite de detección.
Sb = Promedio de la señal del blanco analítico.
sd2 = Desviación estándar del blanco.

4.6.7 LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

Es la concentración mínima del analito que puede cuantificarse por el instrumento con cierta precisión y exactitud, bajo condiciones experimentales bien definidas. El límite de cuantificación puede ser mayor o igual a la concentración del límite de detección, pero no puede ser inferior al mismo (Gómez, 2017). Para calcular este parámetro, se realiza mediciones repetidas del blanco (Sb), calculando el promedio y su desviación estándar (sd2). A continuación, al promedio del blanco se le suma 10 veces su desviación estándar como se puede observar en la siguiente ecuación:

$$LC = Sb + (10 * sd2)$$

Dónde:

LC = Límite de cuantificación.
Sb = Promedio de la señal del blanco analítico.
sd2 = Desviación estándar del blanco.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La toma de muestras se realizó en un solo mercado comercial con 60 sitios de venta de pescado, donde las muestras tomadas son provenientes de Esmeraldas. Se realizó un muestreo no probabilístico aleatorio por conveniencia, debido a que se hizo una investigación exploratoria del contenido de mercurio en los peces. El tamaño de los pescados se determinó en función a las medidas realizadas a cada individuo, información que se detallará posteriormente.

De acuerdo con el Codex Alimentarius, se aclara que el metilmercurio constituye la mayor parte del mercurio total en la mayoría de las especies marinas. El metilmercurio es una de las formas más tóxicas que presenta el mercurio y puede llegar a conformar entre el 80-100% del mercurio total que está presente en los peces (González et al., 2015).

Clasificación de los pescados

Una vez que las muestras de pescado han sido trasladadas hacia el laboratorio se deben mantener en refrigeración a 4°C, con la finalidad de evitar que se descompongan y mantener sus propiedades fisicoquímicas hasta el análisis. En las Tablas 2, 3 y 4 se presentan algunos parámetros físicos de las muestras de Pargo, tales como el peso (g), longitud total (cm), longitud estándar (cm) y ancho (cm) de cada muestra. Las 15 muestras de Pargo (*Lutjanus colorado*) se clasificaron por tamaño: pequeño (5), mediano (5) y grande (5), de acuerdo a los tamaños disponibles de venta en el mercado América de la ciudad de Quito.

Por lo tanto, se clasificaron de la siguiente manera: pequeños (25,0-26,5 cm), medianos (35,0-43,0 cm) y grandes (43,5-50,5 cm). Estos rangos de medición se basaron conforme a los datos obtenidos de la longitud estándar de cada pez. Ya que la longitud total, incluye el largo de la aleta caudal (parte que no se va a analizar). Sin embargo, se decidió determinar la longitud total para dar un mayor énfasis a las características físicas de cada pescado.

Tabla 2. Datos físicos obtenidos de 5 diferentes muestras de Pargo (*Lutjanus colorado*) (pequeño)

Código asignado	Peso (g)	Longitud Total (cm)	Longitud Estándar (cm)	Ancho (cm)	Humedad (%)
PG001p	273,6	28,00	26,00	7,50	79,32
PG002p	262,6	27,50	26,00	8,50	79,53
PG003p	282,0	28,50	26,50	8,00	77,05
PG004p	231,8	26,50	25,00	8,00	77,79
PG005p	259,9	27,80	26,50	8,00	76,83
Promedio	261,9	27,66	26,00	8,00	78,10

Como se puede observar en la primera columna de la Tabla 2, a cada pescado se le asignó un código respectivo para su identificación, donde se indica el nombre de la especie (PG), el número de muestra (001) y el tamaño del pescado (p). Cada individuo se pesó, se midió el ancho y el largo, y finalmente se determinó el porcentaje de humedad. En la Tabla 2 se observa los valores obtenidos del peso, longitud, ancho y humedad. Además, se determinó que el peso de las muestras de pargo pequeño tiene un valor promedio aproximado de 261,9 g, una longitud total de 27,66 cm, longitud estándar de 26 cm, el ancho es de 8 cm y el porcentaje de humedad es de 78,10 %.

Tabla 3. Datos físicos obtenidos de 5 diferentes muestras de Pargo (*Lutjanus colorado*) (mediano)

Código asignado	Peso (g)	Longitud Total (cm)	Longitud Estándar (cm)	Ancho (cm)	Humedad (%)
PG001m	726,1	39,00	36,00	11,00	75,75
PG002m	641,5	37,00	35,00	10,50	75,80
PG003m	1095	44,50	42,00	11,50	76,95
PG004m	1116	45,50	43,00	12,50	77,22
PG005m	876,7	42,00	40,00	11,00	77,68
Promedio	891,2	41,6	39,3	11,30	76,68

En la Tabla 3 se observa que las muestras de pez mediano presentaron un peso con un valor promedio aproximado de 891,2 g, una longitud total de 41,6 cm, longitud estándar de 39,3 cm, el ancho es de 11,3 cm y el porcentaje de humedad es de aproximadamente 76,68 %. Cabe recalcar que no se realizó una réplica estadística debido a que no se decidió hacer un muestreo probabilístico. Sin embargo, es muy importante tomar en cuenta la variación de humedad cuando se quiere realizar un análisis de su composición proximal.

Por otro lado, cabe informar, que el contenido de humedad de los peces puede estar relacionado a ciertos factores como: el contenido de grasa, debido a que se ha demostrado que el porcentaje de humedad es mayor en los peces magros como el bacalao, con un porcentaje mayor el 80 %, los peces semigrasos como el pez espada pueden presentar un porcentaje mayor al 75 %, mientras que los peces grasos el atún, pueden llegar a tener un porcentaje de agua menor al 70 % (Rodríguez, 2017). Esto es importante, ya que el pez Pargo, al ser un pez semigraso, es decir, con un bajo porcentaje de grasa, va a almacenar una mayor cantidad de agua en su organismo, lo que se puede evidenciar en los resultados obtenidos cuyo porcentaje de humedad supera el 75 % en todas las muestras.

Tabla 4. Datos físicos obtenidos de 5 diferentes muestras de Pargo (*Lutjanus colorado*) (grande)

Código asignado	Peso (g)	Longitud Total (cm)	Longitud Estándar (cm)	Ancho (cm)	Humedad (%)
PG001g	1070	45,00	43,50	12,00	77,78
PG002g	1619	53,00	50,00	15,00	76,00
PG003g	1356	49,00	46,00	13,00	76,66
PG004g	1726	54,00	50,50	14,00	74,58
PG005g	1352	49,00	46,00	13,00	76,87
Promedio	1424,6	50	47,1	13,4	76,38

En la Tabla 4 se detallan los datos obtenidos del espécimen con mayor tamaño. El porcentaje promedio obtenido de las muestras de Pargo grande dio un valor de 76,38 %, siendo el valor en porcentaje más bajo obtenido en el análisis. Por otro lado, las muestras que tuvieron un mayor porcentaje de humedad fueron las de Pargo pequeño con un valor aproximado de 78,10 %.

En la Tabla 2, se observa un rango de porcentaje de humedad entre el 77-80 %. En la Tabla 3 se presentó un rango de entre 76-78 % de humedad. Y en la Tabla 4, se tiene entre el 75-78 % de humedad aproximadamente. (Ramírez et al., 2012) indica que el contenido de agua en el músculo de pescado puede estar entre el 66 % y el 81 %. Lo cual, demuestra que los valores obtenidos están dentro del rango establecido en la literatura.

Adicionalmente, se dice que el contenido de humedad en los peces, puede tener relación con dos factores principales. El primero, se denomina el desove, proceso por el cual, se produce un incremento de la cantidad de agua en la carne de pescado. Esto se genera como consecuencia del agotamiento de la reserva de energía (Araneda, 2015). Los peces

pequeños poseen una menor reserva de energía, por tanto, van a presentar una mayor cantidad de agua en su organismo. El segundo factor que se puede considerar es la edad del pez, ya que, al tener una mayor edad, el contenido de agua va a disminuir, como sucede en el caso de la muestra 4 de Pargo grande, que contiene 74,58 % de humedad (Rodríguez, 2017). En general, las muestras de Pargo pequeño presentan mayores valores de humedad, lo que corrobora a la información encontrada en la literatura.

Por otro lado, (Calderón, Pesquera, Condemarin & Valdivia, 2014) mencionan que la variabilidad que puede darse en el porcentaje de agua en tejidos animales, como es el caso del pescado, se debe a que el agua existe en dos formas generales: "agua libre" y "agua ligada". El agua libre es la forma predominante y se libera con gran facilidad por medio de evaporación o secado. Esto se debe a que se encuentra en la superficie del alimento en forma de cristales pequeños (agua congelada). Mientras que el agua ligada, se encuentra combinada o absorbida dentro de las moléculas del alimento. El agua ligada no se congela a -20°C, por lo que es la porción de agua más difícil de extraer.

Curva de calibración obtenida en el equipo CV-AFS

Para determinar la concentración de mercurio total en cada una de las muestras, se elaboró una curva de calibración multipunto a 1, 2, 3, 4 y 5 $\mu g.dm^{-3}$, que fueron diluidas por el inyector automático utilizando la solución estándar de 50 $\mu g.dm^{-3}$ de mercurio.

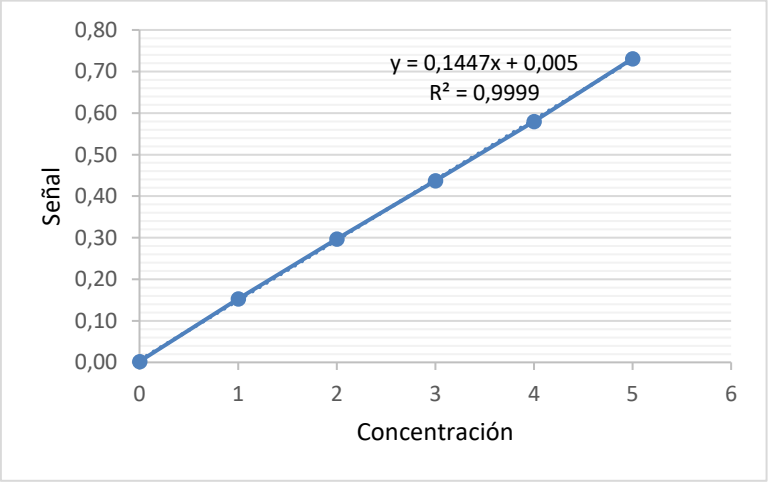


Figura 3. Curva de calibración obtenida en el equipo de CV-AFS

Como se puede observar en la Figura 3, la relación señal-concentración es proporcional, es decir, la señal que se genera de un determinado analito en la muestra se va a determinar en función de su concentración, dando una mayor señal si hay una mayor concentración

de analitos en la muestra. Cabe recalcar, que la intensidad de emisión de energía (fluorescencia), se va a dar en función de la cantidad de átomos del analito que se encuentren en estado excitado.

Tabla 5. Datos obtenidos de la curva de calibración

Coeficiente de correlación	Pendiente	Intercepto
0,9999	0,1447	0,005

Como se puede evidenciar en la Tabla 5, los resultados obtenidos en la curva de calibración, garantizan un ajuste lineal positivo, considerando el coeficiente de regresión lineal ($R^2 > 0,99$). Esto demuestra que los valores obtenidos son aceptables.

Recuperación del método

Tabla 6. Porcentajes de recuperación obtenidos del material de referencia certificado (MRC)

Muestra	Peso (g)	Lectura 1 ($\mu g.L^{-1}$)	Recuperación (%R)
MRC DORM 4	0,296	2,421	95
	0,293	2,350	95
	0,297	2,500	99
	0,306	2,567	99

La precisión de la metodología se estableció analizando CRM DORM-4, con la recuperación de mercurio total (THg) calculada de acuerdo con el valor certificado (MRC) que es de 412 ± 36 $\mu g.kg^{-1}$. El porcentaje de recuperación obtenido fue del 95-99%. De acuerdo con los resultados obtenidos descritos en la Tabla 6, se puede considerar que las recuperaciones son adecuadas, ya que están dentro del rango de aceptación determinado por el Codex Alimentarius (80-120%). Por tanto, el método propuesto muestra la exactitud necesaria para poder analizar mercurio en el pescado.

Concentraciones de mercurio

A continuación, se detallan las concentraciones de mercurio total obtenidas en las muestras de Pargo (*Lutjanus colorado*) que se expenden en el mercado América de la ciudad de Quito.

Tabla 7. Concentraciones de mercurio total obtenidas en las muestras de Pargo pequeño

	Promedio Lecturas ($\mu g.L^{-1}$)	**Concentración (THg) peso seco ($\mu g.kg^{-1}$)**	**Promedio peso seco ($\mu g.kg^{-1}$)**	**%CV**	**Concentración (THg) peso húmedo ($\mu g.kg^{-1}$)**	**Concentración (THg) peso húmedo ($mg.kg^{-1}$)**
Pg001 músculo	2,282	372,8	373,5	1,03	77,24	0,077
Pg001 músculo	2,369	370,1				
Pg001 músculo	2,338	377,7				
Pg002 músculo	2,323	389,9	386,6	0,80	79,13	0,079
Pg002 músculo	2,269	386,0				
Pg002 músculo	2,337	383,8				
Pg003 músculo	1,211	200,2	199,4	0,70	45,76	0,046
Pg003 músculo	1,177	197,8				
Pg003 músculo	1,211	200,2				
Pg004 músculo	2,52	413,6	419,2	3,58	93,10	0,093
Pg004 músculo	2,632	407,8				
Pg004 músculo	2,564	436,2				
Pg005 músculo	2,894	474,5	486,4	3,37	112,7	0,113
Pg005 músculo	2,836	479,5				
Pg005 músculo	2,994	505,1				

En la Tabla 7 se aprecia las concentraciones finales de mercurio total tanto en peso seco como en húmedo de pescado. Los valores de concentración de mercurio total en peso seco fueron entre 199,4 $\mu g.kg^{-1}$ ± 0,70 hasta 486,4 $\mu g.kg^{-1}$ ± 3,37, mientras que la concentración en peso húmedo fue entre 45,76 $\mu g.kg^{-1}$ ± 3,03 hasta 112,7 $\mu g.kg^{-1}$ ± 14,6 Finalmente, se obtuvieron valores entre 0,046 $mg.kg^{-1}$ ± 3,01 hasta 0,113 $mg.kg^{-1}$ ± 14,5 de mercurio total en peso húmedo o peso fresco de pescado pequeño.

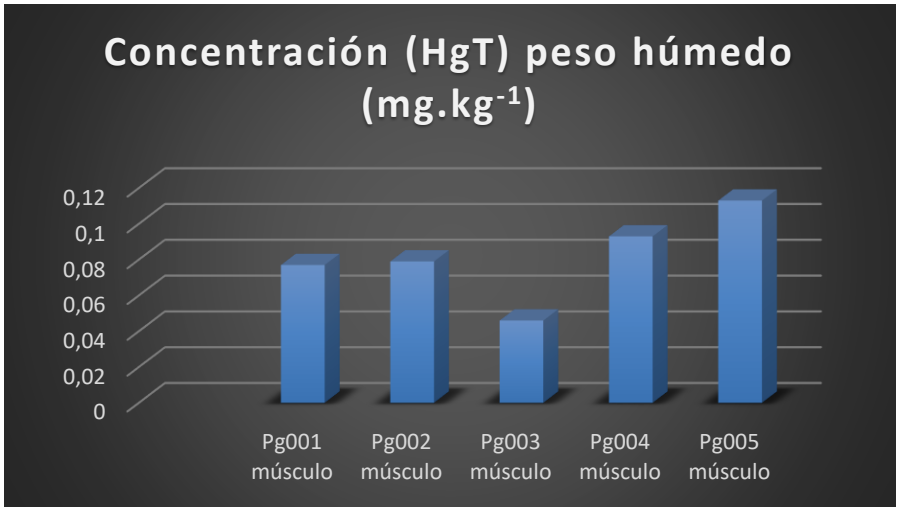


Figura 4. Datos finales obtenidos de la concentración de mercurio total en peso húmedo de las muestras de Pargo pequeño

La figura 4 indica los valores de las concentraciones de mercurio total para las muestras 1, 2, 3, 4 y 5. Los cuales fueron: 0,077; 0,079; 0,046; 0,093 y 0,113 $mg.kg^{-1}$ respectivamente, mientras que los coeficientes de variación fueron 5,00; 3,91; 3,01; 16,1 y 14,5 %. La mayor concentración de mercurio se encuentra en la muestra 5 de Pargo pequeño tal como se puede observar en la gráfica 4.

Para el análisis de mercurio en las muestras de pescado, se realizó dos lecturas por cada muestra y tres repeticiones de medición por muestra en el equipo, ya que esto va a garantizar una mayor precisión y exactitud en los resultados. En base a los datos de concentración de mercurio total en peso húmedo de pescado, se obtuvo el coeficiente de variación (%CV) de cada muestra, obteniendo como resultado, un porcentaje entre el 3,01-16,1%. Siendo la muestra 4 de pargo pequeño (Pg004), la que presenta el mayor coeficiente de variación, lo que significa que las medidas se encuentran dispersas respecto a la media. Del conjunto de valores, la muestra 4 (Pg004) y 5 (Pg005), presentan

coeficientes de variación mayores al 10%, por tanto, esto explica a variabilidad en los resultados.

Tabla 8. Concentraciones de mercurio total obtenidas en las muestras de Pargo mediano

	Promedio Lecturas ($\mu g.L^{-1}$)	**Concentración (THg) peso seco ($\mu g.kg^{-1}$)**	**Promedio peso seco ($\mu g.kg^{-1}$)**	**%CV**	**Concentración (THg) peso húmedo ($\mu g.kg^{-1}$)**	**Concentración (THg) peso húmedo ($mg.kg^{-1}$)**
Pg006 músculo	4,055	653,6	672,8	3,23	162,9	0,163
Pg006 músculo	4,018	658,3				
Pg006 músculo	4,213	701,2				
Pg006 músculo	4,022	678,2				
Pg007 músculo	2,647	445,4	460,2	4,24	111,4	0,111
Pg007 músculo	2,672	452,8				
Pg007 músculo	3,024	482,3				
Pg008 músculo	4,367	745,5	762,1	1,88	175,7	0,176
Pg008 músculo	4,583	769,6				
Pg008 músculo	4,577	771,2				
Pg009 músculo	5,118	866,8	881,2	2,19	200,7	0,201
Pg009 músculo	5,052	873,5				
Pg009 músculo	5,42	903,2				
Pg010 músculo	4,809	816,6	828,9	3,24	185	0,185
Pg010 músculo	5,114	810,5				
Pg010 músculo	5,403	859,7				

En la Tabla 8 se observa que los valores de mercurio obtenidos son mayores con respecto a los valores obtenidos en la tabla 7. Los valores de concentración de mercurio total en peso seco fueron entre 460,2 µg.kg^{-1} ± 4,24 hasta 881,2 µg.kg^{-1} ± 2,19, mientras que la concentración en peso húmedo fue entre 111,4 µg.kg^{-1} ± 17,5 hasta 200,7 ± 9,65. Finalmente, se obtuvieron valores entre 0,111 mg.kg^{-1} ± 17,6 hasta 0,201 mg.kg^{-1} ± 9,64 de mercurio total en peso húmedo o peso fresco de pescado mediano.

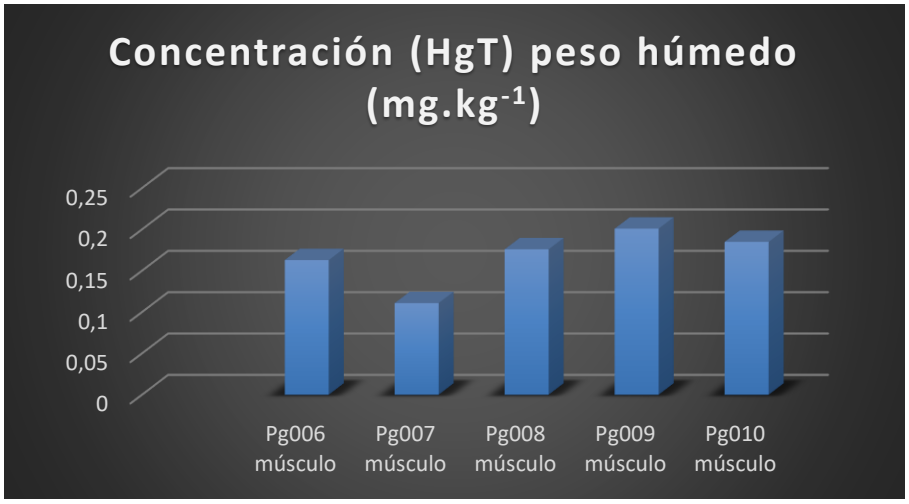


Figura 5. Datos finales obtenidos de la concentración de mercurio total en peso húmedo de las muestras de Pargo mediano

La Figura 5 muestra las concentraciones de mercurio total que se obtuvieron dando valores de 0,163; 0,111; 0,176; 0,201 y 0,185 mg.kg^{-1} para la muestra 6, 7, 8, 9 y 10 respectivamente, mientras que los coeficientes de variación fueron 13,3; 17,6; 8,18; 9,64 y 14,5 %. Se puede apreciar que la muestra 2 y 5 de pargo mediano, presentan un coeficiente de variación mayor al 10%, cuyas mediciones son las que poseen una mayor dispersión respecto a la media.

Tabla 9. Concentraciones de mercurio total obtenidas en las muestras de Pargo grande

	Promedio Lecturas ($\mu g.L^{-1}$)	Concentración (THg) peso seco ($\mu g.kg^{-1}$)	Promedio peso seco ($\mu g.kg^{-1}$)	%CV	Concentración (THg) peso húmedo ($\mu g.kg^{-1}$)	Concentración (THg) peso húmedo ($mg.kg^{-1}$)
Pg011 músculo	4,532	705,5	719,6	2,35	159,9	0,16
Pg011 músculo	4,434	714,9				
Pg011 músculo	4,4	738,4				
Pg012 músculo	4,521	748,8	756,5	2,12	181,6	0,182
Pg012 músculo	4,384	745,8				
Pg012 músculo	4,614	774,9				
Pg013 músculo	4,21	736,1	753	3,92	175,8	0,176
Pg013 músculo	4,311	735,8				
Pg013 músculo	4,717	787,1				
Pg014 músculo	8,403	1402	1419	1,16	360,7	0,361
Pg014 músculo	8,217	1419				
Pg014 músculo	8,481	1435				
Pg015 músculo	4,227	721,2	735,3	2,18	170,1	0,17
Pg015 músculo	4,231	732				
Pg015 músculo	4,68	752,8				

En la Tabla 9 se puede notar que los valores de concentración de mercurio total en peso seco fueron entre 719,6 $\mu g.kg^{-1}$ ± 2,35 hasta 1419 $\mu g.kg^{-1}$ ± 1,16, mientras que la concentración en peso húmedo fue entre 159,9 $\mu g.kg^{-1}$ ± 10,6 hasta 360,7 ± 4,6. Finalmente, se obtuvieron valores entre 0,160 $mg.kg^{-1}$ ± 10,6 hasta 0,361 $mg.kg^{-1}$ ± 4,57

de mercurio total en peso húmedo o peso fresco de pescado grande. Las muestras de pescado Pargo grande presentaron un mayor contenido de mercurio en su organismo según los datos expuestos anteriormente.

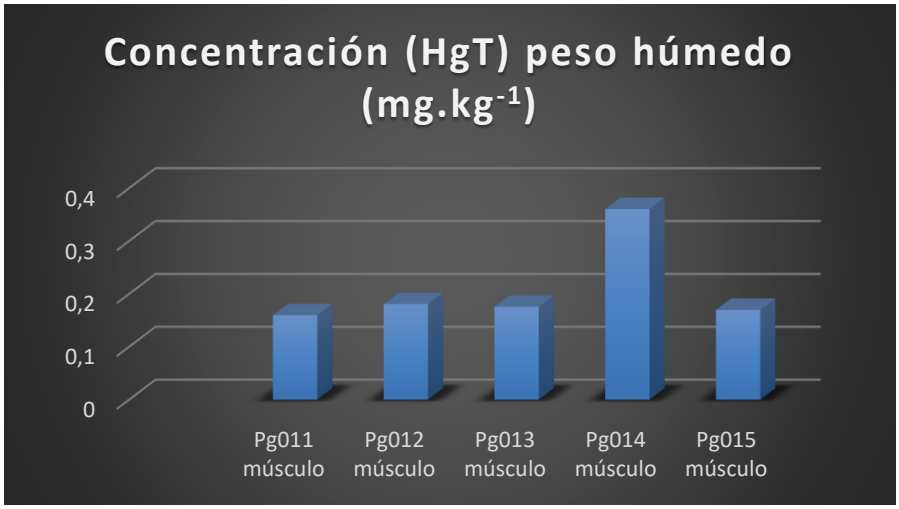


Figura 6. Datos finales obtenidos de la concentración de mercurio total en peso húmedo de las muestras de Pargo grande

La Figura 6 muestra las concentraciones de mercurio total que se obtuvieron dando valores de 0,160; 0,182; 0,176; 0,361 y 0,170 $mg.kg^{-1}$ para la muestra 11, 12, 13, 14 y 15 respectivamente, mientras que los coeficientes de variación fueron 10,6; 8,79; 16,8; 4,57 y 9,45 %. La concentración de mercurio es casi constante en las muestras a excepción de la muestra 4 cuya concentración supera el doble de veces al resto de concentraciones obtenidas. La muestra 4 presentó un coeficiente de variación mayor al 10%, por tanto, es la que presenta una mayor dispersión respecto a la media.

En las Figuras 4, 5 y 6 se detallan las concentraciones finales de mercurio total. En donde, se observa que la concentración de mercurio varía en todas las muestras. Esta variabilidad del contenido de mercurio en los peces no está relacionada directamente con el tamaño, sino con la afinidad entre el mercurio y el músculo de pescado. La acumulación de mercurio se debe precisamente al metilmercurio, el cual, se adsorbe y acumula más que otras formas en el músculo de pescado (González et al., 2014). Lo que sucede es que los peces fijan con fuerza al metilmercurio y equivale casi el 100% del mercurio que se bioacumula, por lo que la mayor parte del metilmercurio en tejidos de peces forma enlaces covalentes con grupos sulfidrilo proteínico, con lo que la vida media de eliminación resulta larga. Como consecuencia, se genera un enriquecimiento selectivo de

metilmercurio cuando pasa de un nivel trófico al siguiente (de Carvalho, Feres, Ferreira, & Kennedy, 2010).

Además, la cantidad de mercurio que está contenida en un pez va a depender también de otros factores como la localidad, ya que las concentraciones de metales pesados como el mercurio van a ser mayores en ciertos lugares geográficos que están expuestos a una mayor contaminación ya sea por industrias (eliminación de desechos), o por procesos biológicos naturales (metilación). Otro factor, se debe a los tejidos del cuerpo del pez (músculo), ya que no todos los peces poseen la misma cantidad de músculo. También está la disponibilidad de alimentos (otros organismos acuáticos) y el contenido de mercurio que presenten (biomagnificación), ya que las especies más proclives a la acumulación de mercurio son las especies depredadoras que se encuentran en el nivel más alto de la cadena trófica como albacora, atún, pez espada, tiburón, entre otros. Por tanto, van a tener una mayor cantidad de mercurio (metilmercurio) en su organismo. Además, hay otros factores que también podrían influir en la acumulación de este metal como el género, el tamaño, la edad, etc (González et al., 2014).

En la literatura no existen los límites máximos permisibles con relación a la cantidad de mercurio total que existe en el pez Pargo (*Lutjanus colorado*). Sin embargo, de acuerdo con el Codex Alimentarius, se ha establecido que el contenido máximo de metilmercurio en la carne de pescado debe ser de 0,5 $mg.kg^{-1}$ en peso fresco para los productos de pesca incluidos los mariscos, excepto para algunas especies depredadoras que incluyen un alto contenido de mercurio tales como el atún con un límite máximo de 1,2 $mg.kg^{-1}$ y el tiburón con un límite máximo de 1,6 $mg.kg^{-1}$ de metilmercurio (Comisión del Codex Alimentarius, 2018). En conclusión, se puede decir, que ninguna de las muestras de pargo excede los límites máximos permisibles establecidos sobre el mercurio en el pescado.

Si bien es cierto, el músculo de pescado es donde generalmente se acumula el mercurio, sin embargo, se ha especulado que pueden existir otras partes como el hígado de pescado que podrían llegar a presentar concentraciones de este metal debido a que es donde se acumulan todas las toxinas. Esta parte del pez no es consumida por las personas, pero existe el aceite de bacalao proveniente del hígado de pescado, o las llamadas harinas de pescado donde se procesa este órgano del animal. Mediante varios análisis se ha demostrado que los niveles de mercurio son indetectables en los aceites de pescado, por la razón de que el mercurio interactúa únicamente con la parte proteica. Y con respecto a

las harinas de pescado, se han realizado estudios donde si han encontrado concentraciones de hasta 0,1 $mg.kg^{-1}$ de mercurio (Obando, 2015).

Por otro lado, existe una ingesta semanal tolerable provisional (PTWI) establecida por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, en relación al mercurio inorgánico que presenta un valor de 4 $\mu g.kg^{-1}$ (Comisión del Codex Alimentarius, 2010), mientras que para el metilmercurio (MeHg) el PTWI está actualmente establecido con un valor de 3,2 $\mu g.kg^{-1}$ de metilmercurio de peso corporal (OMS, 2010).

Límites de análisis del método

Tabla 10. Lectura de blancos

Resultado Blancos ($\mu g.L^{-1}$)							
0,030	0,030	0,034	0,030	0,030	0,034	0,030	0,030
0,034	0,055	0,055	0,034	0,055	0,055	0,034	0,055
0,055	0,034	0,034	0,055	0,055	0,034	0,073	0,073
0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073
0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073
0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	

Tanto el límite de detección (LOD) como el límite de cuantificación (LOQ) se determinaron mediante la medición del blanco como se puede observar en la Tabla 10. El blanco contiene todos los reactivos utilizados para la digestión menos el analito de interés. En base a esto, se prepararon 47 muestras blanco, con ácido clorhídrico al 2% y se realizaron las respectivas lecturas aplicando el método de estudio. El límite de detección, se determinó conociendo el promedio de la señal del blanco más tres veces su desviación estándar (y + 3S); por otro lado, el límite de cuantificación se calculó conociendo el promedio de la señal del blanco más 10 veces su desviación estándar (y + 10S). Dichos valores en concentración se muestran en la Tabla 11 y representan las figuras de mérito de la técnica empleada.

Tabla 11. Límites de detección y cuantificación obtenidos en el presente estudio

Límite de detección ($\mu g.L^{-1}$)	**Límite de cuantificación ($\mu g.L^{-1}$)**
0,111	0,237

A continuación, la Tabla 12 revela y compara los límites de detección para varias técnicas de detección de mercurio total reportadas en la literatura, tomando la instrumentalidad de AFS como el medio de detección final.

Tabla 12. Límites de detección obtenidos por técnicas de análisis para mercurio total (THg)

(Ruiz Chaves, 2016)

Método	**Límite de detección reportado (Mercurio total)**
Espectrometría de absorción atómica - horno de grafito (GF AAS)	1 $ng.g^{-1}$
Plasma acoplado inductivamente-espectrometría masas (ICP MS)	0,01 $ng.mL^{-1}$; 0,01 $ng.g^{-1}$
Espectrometría de emisión atómica (ICP- AES)	2 $ng.mL^{-1}$
Análisis por descomposición térmica (TD-AAS)	0,1-1 $mg.g^{-1}$
CV-AAS	0,1-1 $ng.g^{-1}$; 0,5 $ng.mL^{-1}$
CV-AFS	0,001-0,01 $ng.g^{-1}$; 0,08 $ng.mL^{-1}$
Estudio realizado (CV-AFS)	0,1 $\mu g.L^{-1}$ o 0,1 $ng.mL^{-1}$

Según los valores que se presentan en la Tabla 12, se demuestra que la técnica de CV-AFS posee una alta sensibilidad ya que presenta niveles de detección muy bajos a nivel de ppb, lo que hace que esta técnica analítica sea ventajosa en comparación a las técnicas de absorción atómica como GF-AAS, CV-AAS y TD-AAS. Si bien es cierto, por medio de la técnica de plasma acoplado inductivamente con espectrometría masas (ICP MS), se pueden obtener límites de detección muy bajos pero esta técnica puede generar un mayor número de interferencias espectrales y es una técnica mucho más costosa a diferencia de CV-AFS. Además, la instrumentación que se requiere en CV-AFS, es mucho más simple que la utilizada en las técnicas de espectrometría de masas (Fernández et al., 2015). La técnica de CV-AFS es una técnica selectiva y posee un amplio rango lineal de concentraciones en comparación con cualquier técnica de absorción atómica (Ruiz, 2016). Por tanto, se puede decir que la técnica de CV-AFS, es una buena alternativa para la determinación de mercurio en matrices complejas, como el pescado.

6. CONCLUSIONES

El porcentaje de humedad obtenido en las muestras de Pargo pequeño dio un valor promedio de 78,10 %, para las muestras de Pargo mediano se obtuvo un valor aproximado de 76,68 % y para las muestras de Pargo grande dio un resultado de 76,38 %.

El proceso de liofilización es indispensable para este tipo de análisis ya que no altera la estructura fisicoquímica del pescado y permite su conservación sin necesidad de cadena de frío, además de que permite obtener una elevada estabilidad microbiológica del pescado, permitiendo un mayor tiempo de conservación.

Mediante la técnica de vapor frío acoplado a espectrofotometría de fluorescencia atómica, se determinó que todas las muestras de Pargo (*Lutjanus colorado*) si presentan contenido de mercurio total en su organismo.

Para las muestras de pargo pequeño se obtuvieron valores de concentración de mercurio total, los cuales fueron: 0,077; 0,079; 0,046; 0,093 y 0,113 $mg.kg^{-1}$ respectivamente, mientras que los coeficientes de variación fueron 5,00; 3,91; 3,01; 16,1 y 14,5 %. Para las muestras de pargo mediano, se obtuvieron concentraciones de 0,163; 0,111; 0,176; 0,201 y 0,185 $mg.kg^{-1}$ respectivamente, mientras que los coeficientes de variación fueron 13,3; 17,6; 8,18; 9,64 y 14,5 %. Y, para las muestras de pargo grande, se obtuvieron concentraciones de 0,160; 0,182; 0,176; 0,361 y 0,170 $mg.kg^{-1}$ respectivamente, mientras que los coeficientes de variación fueron 10,6; 8,79; 16,8; 4,57 y 9,45 %.

La técnica de CV-AFS cuenta con el sistema de vapor frío, único para el análisis de mercurio, ya que es el único metal que es líquido a temperatura ambiente y posee una alta presión de vapor que facilita su atomización. Además, este sistema de vapor frío ayuda a minimizar las interferencias espectrales que se producen debido a la fuente de dispersión y la emisión del atomizador.

Todas las muestras analizadas cumplen con los límites permitidos por el Codex Alimentarius que es de 0,5 $mg.kg^{-1}$ de mercurio.

En el presente estudio se obtuvo un límite de detección de 0,111 $\mu g.L^{-1}$, mientras que el límite de cuantificación fue de 0,237 $\mu g.L^{-1}$. Esto hace que la técnica CV-AFS sea más sensible en comparación a las técnicas de AAS, debido a sus bajos límites de detección y

cuantificación. Además, de que es una técnica selectiva para el análisis de mercurio total en el pescado.

7. RECOMENDACIONES

Se debe mantener las muestras de pescado en refrigeración a una temperatura de 4 °C hasta el proceso de liofilización. Posteriormente, se deben colocar en un desecador hasta realizar el análisis de cada muestra, a fin de eliminar y evitar la presencia de humedad en las muestras.

Sería necesario realizar un muestreo probabilístico, ya que, al obtener una muestra representativa, esto nos va a garantizar obtener los resultados con una alta precisión.

Se recomienda realizar una optimización del método de digestión para poder estimar la mayor exactitud del método en función de los porcentajes de recuperación de la muestra.

Para el análisis de mercurio total en pescado mediante la técnica de CV-AFS, se recomienda preparar los reactivos a utilizar el mismo día, debido a que se pueden degradar fácilmente.

Analizar una mayor cantidad de especies de pescado en investigaciones posteriores, esto con la finalidad de determinar si hay especies que puedan exceder los límites permisibles de mercurio en su organismo y así poder reducir su consumo.

Se recomienda realizar una investigación más amplia en especies de pescado respecto a diferentes metales tóxicos presentes en el agua además del mercurio tales como el plomo, níquel, cromo, entre otros. Metales que pueden llegar a afectar la salud debido al consumo de estos alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

Alimentos, D. E. (2019). *Universitat politècnica de valència*.

Amador, J. (2010). Espectrometría óptica atómica. *Temas de Ciencia y Tecnología*, *14*, 3–10.

Ambientales, C., Fern, I. N., & Miranda, N. (2016). *Environmental and Technological Impact of Mercury on Coal*.

Aparicio, L. M. (2015). *El Mercurio en la Cuenca del Tambopata. Repercusiones en la Salud Humana y del Ecosistema*. 279. Retrieved from http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1164/T007356.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Aranda, P. R., Gil, R. A., Moyano, S., De Vito, I., & Martinez, L. D. (2009). Slurry sampling in serum blood for mercury determination by CV-AFS. *Journal of Hazardous Materials*, *161*(2–3), 1399–1403. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.04.129

Arizpe, R. A. (2014). *Maestria En Ciencias En Salud Pública Mayo*. 67.

Bergés, T. M. E., Fernando, M. F, J., Torres, R, Y., Galván, M, F., & Páez, O, F. (2015). Mercury and selenium in tissues and stomach contents of the migratory sailfish, Istiophorus platypterus, from the Eastern Pacific: Concentration, biomagnification, and dietary intake. *Marine Pollution Bulletin*, *101*(1), 349–358. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.10.021

Brombach, C. C., Chen, B., Corns, W. T., Feldmann, J., & Krupp, E. M. (2015). Methylmercury in water samples at the pg/L level by online preconcentration liquid chromatography cold vapor-atomic fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, *105*, 103–108. https://doi.org/10.1016/j.sab.2014.09.014

Camino, M., & Chavez, K. (2019). Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa Facultad De Ciencias Biológicas Escuela Profesional De Ciencias De La Nutrición. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 121.

https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004

Comisión del Codex Alimentarius. (2018). *Informe de la 12a. reunión del Comité del Codex sobre Contaminantes de los Alimentos*. 88. Retrieved from http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-735-12%252FREPORT%252520%2528FINAL%2529%252FREP18_CFs.pdf

Cortés, C. C. E. (2017). *Determinación de mercurio orgánico e inorgánico en muestras ambientales*. 97. Retrieved from http://bdigital.unal.edu.co/59820/1/52352227.2017.pdf

Cuello, N. S. (2017). Biocumulación, toxicidad e interacción de metilmercurio y especies de selenio. *Universidad Computense de Madrid*, 275. Retrieved from http://eprints.ucm.es/42588/1/T38771.pdf

de Carvalho, G. G. A., Feres, M. A., Ferreira, J. R., & Kennedy, V. H. (2010). Total and inorganic mercury determination in fish tissue by flow injection cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, *90*(9), 686–696. https://doi.org/10.1080/03067310902871729

De, J., Dash, H. R., & Das, S. (2014). Mercury Pollution and Bioremediation-A Case Study on Biosorption by a Mercury-Resistant Marine Bacterium. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation*. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800021-2.00006-6

F. A. O & O.M.S. (2010). *REUNIÓN DEL COMITÉ MIXTO FAO/OMS DE EXPERTOS EN ADITIVOS ALIMENTARIOS (JECFA) 1. Este documento ofrece información sobre las actividades de la FAO y la OMS relativas a la provisión de asesoramiento científico al Codex y los países miembros, así como otras*.

EPA. (1995). Fish Sampling and Analysis. *Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories*, *1*(4305), 485.

Fernández, M. R., Rucandio, I., Gómez, P, I., Borlaf, F., García, F., & Larrea, M. T. (2015). Evaluation of different digestion systems for determination of trace mercury in seaweeds by cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Food*

Composition and Analysis, *38*, 7–12. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.10.003

Ferreira, S. L. C., Lemos, V. A., Silva, L. O. B., Queiroz, A. F. S., Souza, A. S., da Silva, E. G. P., das Virgens, C. F. (2015). Analytical strategies of sample preparation for the determination of mercury in food matrices - A review. *Microchemical Journal*, *121*, 227–236. https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.02.012

Gaioli, M., Amoedo, D., & Gonz, D. (2012). V110N3a17 (1). *Todo Sobre El Mercurio*, *110*(3), 259–264.

Gao, E., Jiang, G., He, B., Yin, Y., & Shi, J. (2008). Speciation of mercury in coal using HPLC-CV-AFS system: Comparison of different extraction methods. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *23*(10), 1397–1400. https://doi.org/10.1039/b801613e

Gao, Y., Shi, Z., Long, Z., Wu, P., Zheng, C., & Hou, X. (2012). Determination and speciation of mercury in environmental and biological samples by analytical atomic spectrometry. *Microchemical Journal*, *103*, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.02.001

Global Biogeochemical Cycling of Mercury: A Review Noelle Eckley Selin. (2009). *1*(January), 1–30.

Gonzalez, E. M., Bodas, P, A., Guillen, P, J. J., Rubio, H, M. A., Martinez, A, J. R., Herraiz, M, M. A., Calle, P, A. (2015). Documento de consenso sobre la prevención de la exposición al metilmercurio en España. *Nutricion Hospitalaria*, *31*(1), 16–31. https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.8392

González, E. M., Bodas, P, A., Guillén, P, J. J., Rubio, H, M. Á., Ordóñez, I, J. M., Trasobares, I, E. M., Calle, P, A. (2014). Exposición al metilmercurio en la población general; toxicocinética; diferencias según el sexo, Factores nutricionales y genéticos. *Nutricion Hospitalaria*, *30*(5), 969–988. https://doi.org/10.3305/nh.2014.30.5.7727

Gonzalez, E. M., Bodas, P, A., Martinez, G, M. J., Trasobares, I, E. Bermejo, B. M. P., Ordonez, I, J. M., Calle, P, A. (2015). Metilmercurio: Recomendaciones existentes; métodos de análisis e interpretación de resultados; evaluación económica. *Nutricion Hospitalaria*, *31*(1), 1–15. https://doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.8316

Guzmán, M. J. L., Hinojosa, R, L., Serra, A. M., Hernández, R, A., & Cerdà, V. (2011). Applicability of multisyringe chromatography coupled to cold-vapor atomic fluorescence spectrometry for mercury speciation analysis. *Analytica Chimica Acta*, *708*(1–2), 11–18. https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.09.037

García, I. A. (2014). *BIOACUMULACIÓN Y BIOMAGNIFICACIÓN DE MERCURIO EN TIBURÓN AZUL Prionace glauca (LINNAEUS , 1758) DE LAS COSTAS ADYACENTES AL PUERTO DE SANTA ROSA DE SALINAS- ECUADOR INGENIERA EN GESTIÓN AMBIENTAL Autora : Isabel García Arévalo Tutor : Rubén Darío Castro*.

Jiménez, M. M. (2009). *Desarrollo de métodos analíticos para especiación de mercurio y su aplicación a la comarca de almadén*. Retrieved from https://ruidera.uclm.es/xmlui/handle/10578/997%5Cnhttps://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/997/264 Desarrollo de métodos analíticos.pdf?sequence=1

Kehrig, H. A., Di Beneditto, A. P. M., Almeida, M. G., Rezende, C. E., Baptista, G., Moreira, I., De Moura, J. F. (2017). Mercury biomagnification in the Atlantic spotted dolphin (Stenella frontalis) food chain, using nitrogen stable isotope as an ecological tracer. *Revista de Biologia Marina y Oceanografia*, *52*(2), 233–244. https://doi.org/10.4067/S0718-19572017000200004

Korn, M. das G. A., Morte, E. S. da B., dos Santos, D. C. M. B., Castro, J. T., Barbosa, J. T. P., Teixeira, A. P., Korn, M. (2008). Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods - A review. *Applied Spectroscopy Reviews*, *43*(2), 67–92. https://doi.org/10.1080/05704920701723980

Krishna, M. V. B., Ranjit, M., Karunasagar, D., & Arunachalam, J. (2005). A rapid ultrasound-assisted thiourea extraction method for the determination of inorganic and methyl mercury in biological and environmental samples by CVAAS. *Talanta*, *67*(1), 70–80. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.02.007

La Molina Los L-Momentos En La Cuenca Hidrográfica Del. (2015).

Lima, K. (2010). *“ Evaluación de los niveles de mercurio total y mercurio orgánico en muestras de suelos procedentes de Instituciones Educativas del pueblo ‘ El Callao ’, Estado Bolívar , Venezuela .”*

Mahbub, K. R., Bahar, M. M., Labbate, M., Krishnan, K., Andrews, S., Naidu, R., & Megharaj, M. (2017). Bioremediation of mercury: not properly exploited in contaminated soils! *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(3), 963–976. https://doi.org/10.1007/s00253-016-8079-2

Martínez, L. E., & Cortes, L. (2014). Desarrollo de un sistema de secado al vacío para medición de contenido de humedad. *Simposio de Metrología 6 - 10 de Octubre, 2014*, (October 2014).

Mettler, T. (2015). *Guía práctica las ciencias naturales, experiencia "en vivo" – aprender sin esfuerzo Guía práctica. Determinación de la humedad mediante el analizador halógeno de humedad*. Retrieved from https://www.mt.com/dam/P5/labtec/05_Moisture_Analyzer/01_Professional_Line/03_Documents/01_Brochures/Guide_To_Moisture_Analysis_ES.pdf

Mettler Toledo. (2011). *Valoración de Karl Fischer*. 16.

Moraes, P. M., Santos, F. A., Cavecci, B., Padilha, C. C. F., Vieira, J. C. S., Roldan, P. S., & Padilha, P. D. M. (2013). GFAAS determination of mercury in muscle samples of fish from Amazon, Brazil. *Food Chemistry*, *141*(3), 2614–2617. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.008

Müller, E. I., Mesko, M. F., Moraes, D. P., Korn, M. das G. A., & Flores, É. M. M. (2014). Wet Digestion Using Microwave Heating. In *Microwave-Assisted Sample Preparation for Trace Element Determination*. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59420-4.00004-0

Nardi, E. P., Evangelista, F. S., Tormen, L., SaintPierre, T. D., Curtius, A. J., Souza, S. S. d., & Barbosa, F. (2009). The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry*, *112*(3), 727–732. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.010

Panichev, N. A., & Panicheva, S. E. (2015). Determination of total mercury in fish and sea products by direct thermal decomposition atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, *166*, 432–441. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.032

PARA, U., & ACERO, G. DE. (2011). Universidad De San Carlos De Guatemala

Facultad De Ingeniería. *Emecanica.Ingenieria.Usac.Edu.Gt*, 1–75. Retrieved from http://emecanica.ingenieria.usac.edu.gt/sitio/wp-content/subidas/6ARTÍCULO-III-INDESA-SIE.pdf

Parzanese, M. (2012). Tecnologías para la Industria Alimentaria Liofilización de alimentos. *Alimentos Argentinos*, 1–12. Retrieved from www.alimentosargentinos.gob.ar

Perez, D. E. L., Ángel, M. L. H., Gomez, M. A. S., & Cartagena, C. J. (2014). Validation of an analytical method for the determination of mercury in shrimp and fish. *Revista Lasallista de Investigacion*, *11*(2), 11–17.

Pohl, P., Jimenéz, Z, I., Voges, E., Bings, N. H., & Broekaert, J. A. C. (2008). Comparison of the cold vapor generation using NaBH4 and SnCl2 as reducing agents and atomic emission spectrometry for the determination of Hg with a microstrip microwave induced argon plasma exiting from the wafer. *Microchimica Acta*, *161*(1–2), 175–184. https://doi.org/10.1007/s00604-007-0887-8

Polo, A. (2012). Pontificia Universidad Católica Del Ecuador Facultad De Ciencias Exactas Y Naturales Escuela De Ciencias Químicas. *I*, 126. Retrieved from http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/7111/4.7.001037.pdf;sequence=4

Ratti, C. (2013). Freeze drying for food powder production. In *Handbook of Food Powders: Processes and Properties*. https://doi.org/10.1533/9780857098672.1.57

Rezende, P. S., Silva, N. C., Moura, W. D., & Windmöller, C. C. (2018). Quantification and speciation of mercury in streams and rivers sediment samples from Paracatu, MG, Brazil, using a direct mercury analyzer®. *Microchemical Journal*, *140*(April), 199–206. https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.006

Ruiz Chaves, I. (2016). Metodologías analíticas utilizadas actualmente para la determinación de mercurio en músculo de pescado. *Pensamiento Actual*, *16*(26), 113. https://doi.org/10.15517/pa.v16i26.25187

Segura, G. F. F., Ortega, M. L. C., & Olaya, N, C. W. (2011). Relación longitud-peso de la Cachana (Cynopotamus atratoensis) en la ciénaga Grande de Lorica, Colombia. *Acta Biologica Colombiana*, *16*(1), 77–86.

Serra, A. M., Estela, J. M., & Cerdà, V. (2008). MSFIA system for mercury determination by cold vapour technique with atomic fluorescence detection. *Talanta*, *77*(2), 556–560. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.04.033

Shah, A. Q., Kazi, T. G., Baig, J. A., Afridi, H. I., & Arain, M. B. (2012). Simultaneously determination of methyl and inorganic mercury in fish species by cold vapour generation atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, *134*(4), 2345–2349. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.109

Suarez, R., Arévalo, E., Linares, L., & Ustáriz, F. (2009). Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario. *Avances En Química*, *4*(2), 53–62.

Tirado, D. F., Montero, P. M., & Acevedo, D. (2015). *Estudio Comparativo de Métodos Empleados para la Determinación de Humedad de Varias Matrices Alimentarias Comparative Study of Methods for Moisture Determination of Several Food Matrices*. *26*(2), 3–10. https://doi.org/10.4067/S0718-07642015000200002

Unam. (2008). *Fundamentos Y Tecnicas Analisis De Alimentos*. 58.

UNEP. (2002). *Global Mercury assessment*. 270. Retrieved from http://www.unep.org/gc/gc22/Document/UNEP-GC22-INF3.pdf

Vieira, H. P., Nascentes, C. C., & Windmöller, C. C. (2014). Development and comparison of two analytical methods to quantify the mercury content in honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, *34*(1), 1–6. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.02.001

Wu, L., Long, Z., Liu, L., Zhou, Q., Lee, Y. I., & Zheng, C. (2012). Microwave-enhanced cold vapor generation for speciation analysis of mercury by atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*, *94*, 146–151. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.03.009

8. FIGURAS

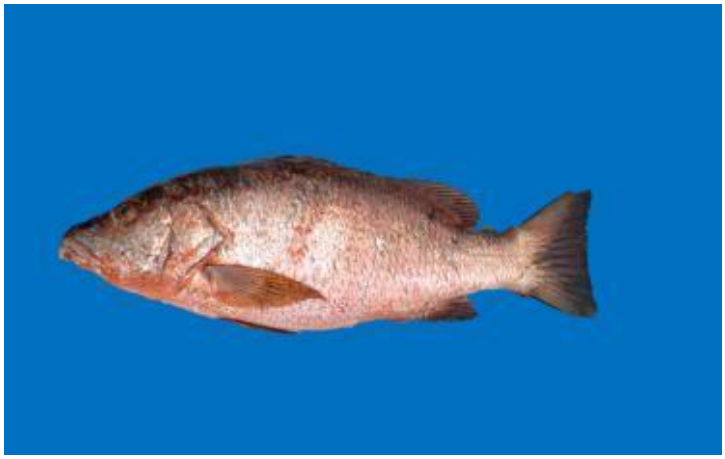


Figura 7. Pargo (Lutjanus colorado)

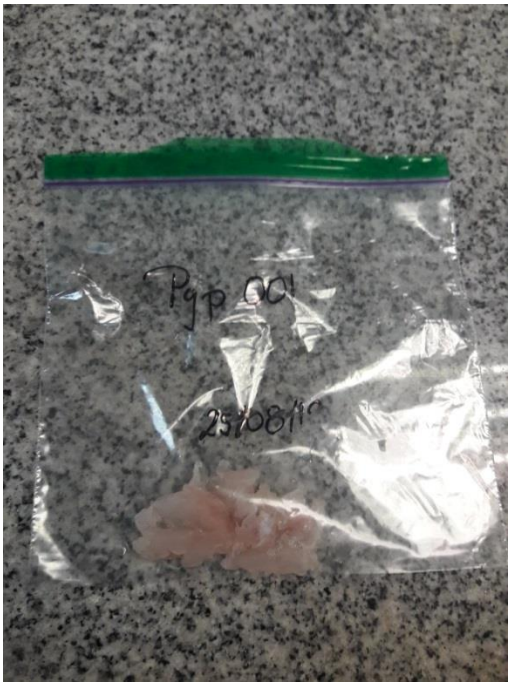


Figura 8. Filetes de pescado para la determinación de humedad



Figura 9. Balanza infrarroja o determinador de humedad



Figura 10. Liofilizador



Figura 11. Secado de muestras de pescado



Figura 12. Ácidos para la digestión de muestras



Figura 13. Carrusel del digestor de muestras



Figura 14. Microondas para la digestión de muestras



Figura 15. Preparación de las muestras de análisis



Figura 16. Llave para el flujo de gases



Figura 17. Solución de enjuague y solución de dilución (ácido clorhídrico al 2%)



Figura 18. Soluciones de ácido clorhídrico al 2% y cloruro de estaño al 2% en ácido clorhídrico al 4%



Figura 19. Carrusel de muestras del equipo de CV-AFS



Figura 20. Analizador de mercurio (CV-AFS)

9. ANEXOS

Tabla 13. Pesos obtenidos de las muestras de Pargo de pequeño para su posterior análisis

Muestra	Peso de la muestra (g)
Pg001 músculo	0,302
Pg001 músculo	0,316
Pg001 músculo	0,305
Pg002 músculo	0,294
Pg002 músculo	0,290
Pg002 músculo	0,300
Pg003 músculo	0,295
Pg003 músculo	0,290
Pg003 músculo	0,294
Pg004 músculo	0,298
Pg004 músculo	0,316
Pg004 músculo	0,290
Pg005 músculo	0,296
Pg005 músculo	0,290
Pg005 músculo	0,293

Tabla 14. Pesos obtenidos de las muestras de Pargo mediano para su posterior análisis

Muestra	Peso de la muestra (g)
Pg006 músculo	0,306
Pg006 músculo	0,301
Pg006 músculo	0,298
Pg007 músculo	0,291
Pg007 músculo	0,289
Pg007 músculo	0,310
Pg008 músculo	0,288
Pg008 músculo	0,293
Pg008 músculo	0,292
Pg009 músculo	0,291
Pg009 músculo	0,285
Pg009 músculo	0,296
Pg010 músculo	0,290
Pg010 músculo	0,311
Pg010 músculo	0,310

Tabla 15. Pesos obtenidos de las muestras de Pargo grande para su posterior análisis

Muestra	Peso de la muestra (g)
Pg011 músculo	0,316
Pg011 músculo	0,305
Pg011 músculo	0,293
Pg012 músculo	0,297
Pg012 músculo	0,289
Pg012 músculo	0,293
Pg013 músculo	0,281
Pg013 músculo	0,288
Pg013 músculo	0,295
Pg014 músculo	0,297
Pg014 músculo	0,287
Pg014 músculo	0,293
Pg015 músculo	0,288
Pg015 músculo	0,284
Pg015 músculo	0,306

Tabla 16. Concentraciones de mercurio obtenidas en el equipo de CV-AFS, procedentes de las muestras de Pargo pequeño

Muestra	Concentración de mercurio Lectura 1 ($\mu g.L^{-1}$)	Concentración de mercurio Lectura 2 ($\mu g.L^{-1}$)
MRC DORM 4	2,421	2,421
Pg001 músculo	2,271	2,293
Pg001 músculo	2,360	2,378
Pg001 músculo	2,341	2,334
Pg002 músculo	2,312	2,334
Pg002 músculo	2,272	2,265
Pg002 músculo	2,341	2,332
Pg003 músculo	1,219	1,202
Pg003 músculo	1,175	1,179
Pg003 músculo	1,215	1,207
Pg004 músculo	2,521	2,518
Pg004 músculo	2,633	2,631
Pg004 músculo	2,556	2,572
Pg005 músculo	2,887	2,900
Pg005 músculo	2,841	2,830
Pg005 músculo	2,980	3,007

Tabla 17. Concentraciones de mercurio obtenidas en el equipo de CV-AFS, procedentes de las muestras de Pargo mediano

Muestra	Concentración de mercurio Lectura 1 ($\mu g.L^{-1}$)	Concentración de mercurio Lectura 2 ($\mu g.L^{-1}$)
Pg006 músculo	4,059	4,051
Pg006 músculo	3,998	4,038
Pg006 músculo	4,208	4,218
Pg007 músculo	2,660	2,634
Pg007 músculo	2,701	2,642
Pg007 músculo	3,026	3,021
Pg008 músculo	4,429	4,305
Pg008 músculo	4,587	4,579
Pg008 músculo	4,539	4,614
Pg009 músculo	5,112	5,124
Pg009 músculo	5,047	5,056
Pg009 músculo	5,403	5,437
Pg010 músculo	4,797	4,820
Pg010 músculo	5,133	5,094
Pg010 músculo	5,371	5,434

Tabla 18. Concentraciones de mercurio obtenidas en el equipo de CV-AFS, procedentes de las muestras de Pargo grande

Muestra	Concentración de mercurio Lectura 1 ($\mu g.L^{-1}$)	Concentración de mercurio Lectura 2 ($\mu g.L^{-1}$)
Pg011 músculo	4,637	4,427
Pg011 músculo	4,472	4,396
Pg011 músculo	4,450	4,350
Pg012 músculo	4,508	4,533
Pg012 músculo	4,380	4,387
Pg012 músculo	4,607	4,621
Pg013 músculo	4,208	4,211
Pg013 músculo	4,294	4,328
Pg013 músculo	4,728	4,706
Pg014 músculo	8,415	8,390
Pg014 músculo	8,177	8,256
Pg014 músculo	8,478	8,484
Pg015 músculo	4,578	3,876
Pg015 músculo	4,372	4,089
Pg015 músculo	4,690	4,670

Tabla 19. Desviación estándar y coeficiente de variación obtenidos de las concentraciones de peso seco que resultaron de las muestras de Pargo pequeño

	Desvest	**% CV**
Pg001	5,37	1
Pg002	3,09	1
Pg003	1,39	1
Pg004	15,0	4
Pg005	16,4	3

Tabla 20. Desviación estándar y coeficiente de variación obtenidos de las concentraciones de peso seco que resultaron de las muestras de Pargo mediano

	Desvest	**% CV**
Pg006	21,7	3
Pg007	19,5	4
Pg008	14,4	2
Pg009	19,4	2
Pg010	26,8	3

Tabla 21. Desviación estándar y coeficiente de variación obtenidos de las concentraciones de peso seco que resultaron de las muestras de Pargo grande

	Desvest	**% CV**
Pg011	16,9	2
Pg012	16,0	2
Pg013	29,5	4
Pg014	16,5	1
Pg015	16,1	2

9.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES (CÁLCULOS)

Preparación del HCl al 2% (Blanco) (v/v)

$$C1\,V1 = C2\,V2$$

$$V1 = \frac{C2\,V2}{C1}$$

$$V1 = \frac{2\,\% * \ 250\,mL}{37\,\%}$$

$V1 = 13{,}5$ mL de HCl concentrado (aforar hasta 250 mL con agua destilada)

Preparación del HCl al 4% (v/v)

$$C1\,V1 = C2\,V2$$

$$V1 = \frac{C2\,V2}{C1}$$

$$V1 = \frac{4\,\% * \ 500\,mL}{37\,\%}$$

$V1 = 54{,}1$ mL de HCl concentrado (aforar hasta 500 mL con agua destilada)

Preparación del cloruro de estaño ($SnCl_2$) al 2% en HCl al 4% (p/v)

2% = 2 g / 100 mL

2g ($SnCl_2$) -------- 100 mL (sol)

X -------- 500 mL (sol)

X = 10 g de $SnCl_2$

Para preparar una solución de cloruro de estaño (2%) en ácido clorhídrico (4%), se debe pesar 10 g de cloruro de estaño II y aforar en un balón de 500 mL con el ácido clorhídrico al 4%.

Preparación del estándar de mercurio de 50 µg.L^{-1}

1 mg L^{-1} ----- 1000 µg.L^{-1}

X ----- 50 µg.L^{-1}

X = 0,05 mg.L^{-1}

$$C1\,V1 = C2\,V2$$

$$V1 = \frac{C2\,V2}{C1}$$

$$V1 = \frac{0{,}05 \text{ mg } L^{-1} * 50\ mL}{10 \text{ mg } L^{-1}}$$

$$V1 = 0{,}25\ mL$$

$V1 = 0{,}25\ mL * 1000 \simeq 250\ \mu L$ de la solución stock de 10 mg.L^{-1}

Para preparar el estándar de mercurio de 50 µg.L^{-1}, se tomó 250 µL de una solución stock de 10 mg.L^{-1} de mercurio y se aforó hasta 50 mL con ácido clorhídrico al 2%.

9.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Muestra: Pargo (*Lutjanus colorado*)
Tamaño de individuo: Pequeño
Código asignado: PG001p
Peso del individuo (g): 273,64
Longitud total del individuo (cm): 28
% Humedad: 79,32

Tabla 22. Datos obtenidos de la primera muestra de Pargo pequeño

Muestra	Peso (g)	Lectura 1 ($\mu g.L^{-1}$)	Lectura 2 ($\mu g.L^{-1}$)	Promedio Lecturas ($\mu g.L^{-1}$)	Resultado Blanco ($\mu g.L^{-1}$)
Pg001 músculo	0,302	2,271	2,293	2,282	0,030
Pg001 músculo	0,316	2,360	2,378	2,369	0,030
Pg001 músculo	0,305	2,341	2,334	2,338	0,034

Resultado de las muestras en peso seco ($\mu g.kg^{-1}$)

$$Peso\ seco = \frac{(Promedio\ de\ lecturas - Resultado\ Blanco) * Volumen\ de\ aforo}{Peso\ de\ la\ muestra}$$

$$Peso\ seco = \frac{\left(2{,}282\,\frac{\mu g}{L} - 0{,}030\ \frac{\mu g}{L}\right) * 50\ mL}{0{,}302\ g}$$

$$Peso\ seco = \frac{\left(2{,}252\,\frac{\mu g}{\cancel{L}}\right) * 0{,}05\ \cancel{L}}{3{,}02\ x\ 10^{-4}\ kg}$$

$$Peso\ seco\ (muestra\ 1) = 372{,}8\ \mu g.kg^{-1}$$

$$Peso\ seco\ (muestra\ 2) = 370{,}1\ \mu g.kg^{-1}$$

$$Peso\ seco\ (muestra\ 3) = 377{,}7\ \mu g.kg^{-1}$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

$$S = \sqrt{\frac{(372{,}8 - 373{,}5)^2 + (370{,}1 - 373{,}5)^2 + (377{,}7 - 373{,}5)^2}{3 - 1}}$$

$$S = 3{,}853$$

Coeficiente de variación (CV)

$$\% \, CV = \frac{S}{Promedio \, (peso \, seco)} * 100$$

$$\% \, CV = \frac{3{,}853}{373{,}5} * 100$$

$$\% \, CV = 1{,}032$$

Porcentaje de recuperación (MRC)

Tabla 23. Datos obtenidos del material de referencia de pescado

Muestra	**Peso**	**Lectura 1 (µg.L^{-1})**	**Lectura 2 (µg.L^{-1})**	**Promedio Lecturas (µg.L^{-1})**	**Resultado Blanco (µg.L^{-1})**	**Resultado 1 peso seco (µg.kg^{-1})**
MRC DORM 4	0,296	2,421	2,421	2,421	0,109	390,1

Concentración MRC DORM 4: 0,412 mg.kg^{-1}

$$\% \, R = \frac{Resultado \, 1 \, (peso \, seco)/1000}{Concentración \, MRC} * 100$$

$$\% \, R = \frac{390{,}1/1000}{0{,}412} * 100$$

$$\% \, R = 94{,}68 \, \%$$

Resultado de las muestras en peso húmedo (µg.kg^{-1})

$$Peso \, húmedo = \frac{Promedio \, de \, peso \, seco * (100 - \% \, Humedad)}{100}$$

$$Peso \, húmedo = \frac{373{,}5 * (100 - 79{,}32)}{100}$$

$$Peso \, húmedo = 77{,}24 \, \mu g. \, kg^{-1}$$

Resultado de las muestras en peso húmedo (mg.kg^{-1})

$$Peso \, húmedo = \frac{Peso \, húmedo \, (\mu g. \, kg^{-1})}{1000}$$

$$Peso \, húmedo = \frac{77{,}24 \, \mu g. \, kg^{-1}}{1000}$$

$$Peso \, húmedo = 0{,}077 \, mg. \, kg^{-1}$$

Límite de detección y límite de cuantificación obtenidos (µg.L^{-1})

Tabla 24. Concentración de los blancos

Resultado Blancos (µg.L^{-1})							
0,030	0,030	0,034	0,030	0,030	0,034	0,030	0,030
0,034	0,055	0,055	0,034	0,055	0,055	0,034	0,055
0,055	0,034	0,034	0,055	0,055	0,034	0,073	0,073
0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073
0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073
0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	

Media del blanco analítico

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

$$\bar{x} = \frac{0{,}030 + 0{,}030 + 0{,}034 + \cdots}{46}$$

$$\bar{x} = 0{,}057$$

Desviación estándar

$$S = \sqrt{\frac{\sum(x - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

$$S = \sqrt{\frac{(0{,}030 - 0{,}057)^2 + (0{,}030 - 0{,}057)^2 + (0{,}034 - 0{,}057)^2 \ldots}{3 - 1}}$$

$$S = 0{,}018$$

Límite de detección

$$LD = Sb + 3(S)$$

$$LD = 0{,}057 + (3*0{,}018)$$

$$LD = 0{,}111 \text{ µg.L}^{-1}$$

Límite de cuantificación

$$LC = Sb + 10(S)$$

$$LC = 0{,}057 + (10*0{,}018)$$

$$LC = 0{,}237 \text{ µg.L}^{-1}$$