

CINCIA Protocolos de Métodos – M-007

Análisis de Mercurio Total en Músculo de Pescado

Procedimiento Operativo Estándar

CINCIA Programa de Mercurio

Nombre Protocolo	:	Análisis de Mercurio Total en Músculo de Pescado
Código Protocolo	:	M-007
Fecha publicación	:	31 de octubre 2020
Autor	:	PhD Claudia M. Vega y Blga. Jessica Pisconte
Contacto autor	:	vegacm@wfu.edu
Revisado por	:	PhD Carol L. Mitchell. Asesora Científica – CINCIA
Aprobado por	:	Blgo. César Ascorra Guanira. Director Nacional – CINCIA

1. Resumen del procedimiento

Describimos el método que permitirá el análisis de mercurio en músculo de pescado, que incluye en la etapa de preparación de muestra el proceso de liofilización y homogenización. Posteriormente para la determinación de mercurio se utiliza un Analizador Directo de Mercurio (DMA-80) que emplea la técnica de Espectrofotometría de Absorción Atómica.

2. Introducción

Los peces conforman un grupo de seres acuáticos que se ve afectado directamente por la presencia de mercurio, que es un insumo usado de la minería artesanal. Este metal ingresa a la cadena alimenticia llegando a cada nivel trófico a través de la bioacumulación y biomagnificación (Bowles et al., 2001).

El Programa de Mercurio del Centro de Innovación Científica Amazónica, a través del Laboratorio de Mercurio y Química Ambiental (LAMQA), realiza procesos para el análisis de mercurio en diferentes tipos

de matriz, en este caso presentamos el “Protocolo de Análisis de Mercurio Total en Músculo de Pescado”, dirigido a analistas, estudiantes e investigadores que requieran realizar análisis de mercurio en esta matriz. Este protocolo tiene como finalidad ser una herramienta para el desarrollo de los análisis considerando controles de calidad para la obtención de resultados confiables.

3. Materiales, equipamiento y labor

- 01 micropipeta (volumen fijo 100 μ L)
- 01 micropipeta (volumen móvil 100 - 1000 μ L)
- Soporte para baquetas
- Baquetas de níquel (1 mL)
- Baquetas de cuarzo (1.5 mL)
- 01 pinza angulada (manipulación de baquetas)
- 01 pinza angulada (manipulación de muestras)
- Guantes de nitrilo
- Analizador Directo de Mercurio (DMA-80 Milestone)
- Balanza analítica (OHAUS)
- Liofilizador (Liotop L-101)
- Compresor de aire

4. Reactivos y estándares

- Solución estándar de mercurio
- Ácido nítrico al 10%

Los materiales de referencia certificados recomendados para el análisis de mercurio en pescado son:

- DORM-4 (0.412 μ g Hg /g): *Fish Protein* - National Research Council Canada (Proteína de pescado)
- IAEA-436 (4.19 μ g Hg /g): *Tuna Fish Flesh Homogenate* – International Atomic Energy Agency (Pulpa de atún homogenizada)

5. Principios del método de análisis

El análisis de mercurio en muestras de pescado se realizará con el método de espectrofotometría de absorción atómica utilizando el equipo Milestone, Direct Mercury Analyzer DMA-80, que es un analizador directo de mercurio, capaz de realizar el análisis sin un pretratamiento (digestión) de muestras, permitiendo optimizar el tiempo de análisis y disminuir recursos necesarios para el mismo.

El proceso inicia pesando la muestra en una baqueta (níquel o cuarzo) que es colocada en el plato de muestra e introducida mecánicamente en un tubo de catálisis donde ocurren 2 procesos: 1) secado 2) descomposición térmica en un ambiente aeróbico. Durante el proceso de descomposición, el vapor de mercurio es liberado y transportado, por oxígeno o aire comprimido, al amalgamador donde el mercurio es atrapado. Después que la muestra ha sido totalmente descompuesta, el mercurio es desorbido del amalgamador a través del calentamiento del mismo. Posteriormente el mercurio pasa a través de 2 células de absorbancia con diferente tamaño de camino óptico. La cantidad es determinada por espectrometría de absorción atómica usando una lámpara de mercurio 254 nm (Fig. 1).

Los valores para los rangos de trabajo de las dos celdas de medición son: 0-20 ng Hg (célula 1) y 20-1000 ng Hg (célula 2).

Para ejemplificar el procedimiento descrito aquí, a continuación, mostramos un esquema gráfico de una versión estándar del equipo DMA – 80 equipado con dos células de medición de flujo de longitud de trayectoria diferente:

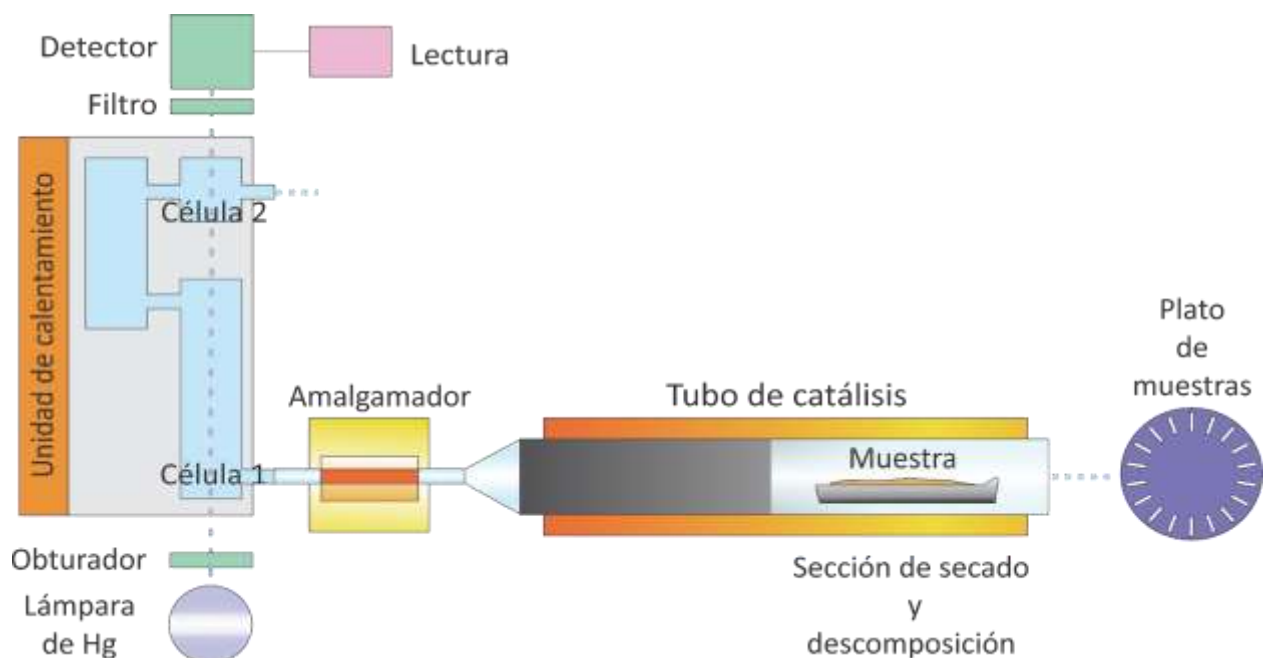


Fig. 1 Sistema de análisis del DMA-80. Adaptado de (Jiménez-Guerrero & Castaño, n.d.)

Finalmente, el método descrito, requiere utilizar los parámetros descritos en las instrucciones del fabricante:

Proceso	T °	Tiempo
Secado	200 °C	60 "
Descomposición	650 °C	120 "
Tiempo de purga	-	60 "

5.1 Calibración

La determinación cuantitativa del mercurio se logra a partir de una curva de calibración obtenida de la lectura de solución estándar de mercurio analizada bajo las mismas condiciones de análisis de la muestra.

La calibración se realizará utilizando una **solución patrón de mercurio** en un rango de 1 a 100 ppb de Hg. Los puntos de la curva van de 1 a 1000 ng y se hace una lectura de 10 puntos para el cálculo de la curva de calibración, donde el coeficiente de correlación (r) debe ser mayor que 0.995.

La calibración debe ser realizada cada fin de mes, sin embargo, puede ser realizada antes de este periodo si se cambia alguna pieza del equipo DMA como por ejemplo el tubo de catálisis.

Puede revisar el **“Protocolo M-003: Calibración del Equipo Milestone DMA-80 Direct Mercury Analyzer”** para ver los detalles de este procedimiento.

5.2 Límite de detección y cuantificación

Para determinar a modo de información el límite de detección y cuantificación se realiza 10 mediciones repetidas de un blanco, luego calcular la desviación estándar (SD) de la respuesta obtenida y la pendiente (m) de la curva de calibración (Lopez, 2016).

Para el cálculo del **límite de detección**, usar la siguiente fórmula:

$$LD = \frac{3SD}{m}$$

Donde:

SD: Desviación estándar

m: Pendiente de la curva de calibración

Para el cálculo del **límite de cuantificación**, usar la siguiente fórmula:

$$LC = \frac{10SD}{m}$$

El límite de cuantificación corresponderá al valor más bajo de la curva de calibración 1ng Hg.

Si se considera un peso máximo de muestra de 100 mg, el límite de cuantificación en términos de concentración será: 0.05 ng Hg / mg.

6. Procedimiento Operativo

Los análisis de mercurio en músculo de pescado se realizarán siguiendo el orden que se muestra en el diagrama de flujo (Fig.2):

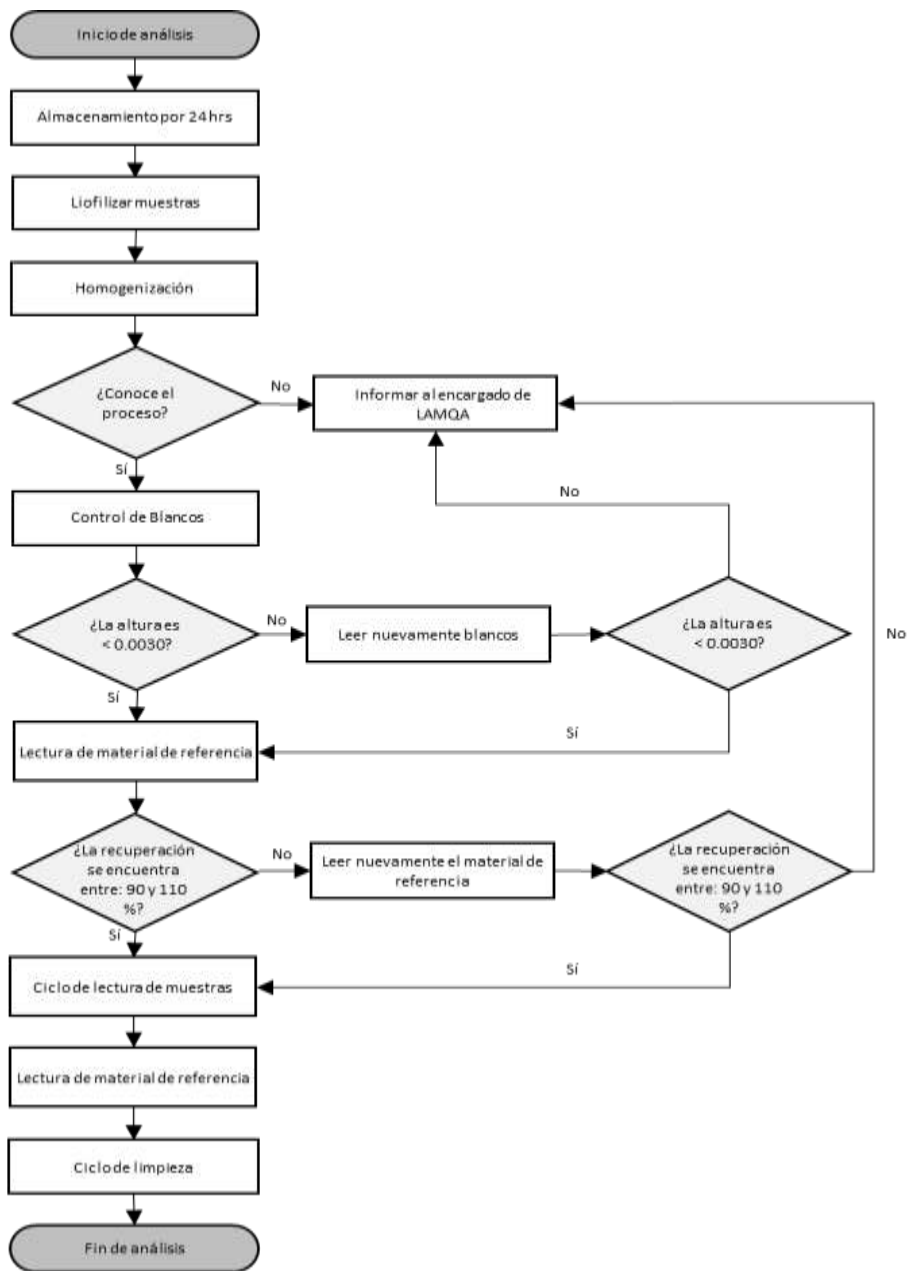


Fig. 2 Diagrama de Flujo del Proceso de Análisis de Hg en músculo de pescado

6.1 Procesamiento de la muestra

Las muestras son recibidas en LAMQA con un registro en una planilla digital y deben ser revisadas por el encargado.

La muestra será almacenada en la congeladora a una temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un periodo de por lo menos 24 horas antes de la liofilización.

Nota: Si la muestra se encuentra en un preservante (Ej. Alcohol isopropílico), debe dejar que este se evapore por lo menos 24 horas antes de la etapa de congelamiento.

6.1.1 Liofilización

Se recomienda la lectura del “**Protocolo de Uso de Equipos**” para la operación del liofilizador.

Para realizar este proceso, las bolsas de colecta conteniendo las muestras ligeramente abiertas deben colocarse en el liofilizador. Las muestras de pescado son liofilizadas por lo menos durante 48 horas, hasta obtener las muestras totalmente deshidratadas (peso seco).

6.1.2 Homogenización

Luego de concluir el proceso de liofilización se deberá homogenizar la muestra en su bolsa triturándola con las manos (frotando la muestra dentro de la bolsa cerrada), hasta pulverizarla dejando la muestra lo más homogénea posible.

Nota: Tener cuidado de no rasgar la bolsa durante este proceso y evitar la pérdida de muestras.

En el caso de que las muestras deban ser analizadas en peso fresco, no es necesario realizar la liofilización y la homogenización debe realizarse en la muestra fresca, en este caso el proceso puede realizarse por medio de un triturador de alimento o de forma manual con mortero y pistilo.

6.2 Inicio del proceso de análisis

6.2.1 Control de blancos

Como parte del control de calidad se realizará la lectura de 03 blancos en la carpeta **Blancos** verificando que el valor obtenido en la columna de altura de la señal (height) sea menor a 0.003.

En caso de obtener una altura de blancos superior a 0.003, debe verificar el sistema, ya que puede deberse a una posible contaminación o por el desgaste del tubo de catálisis. Si se confirma que puede haber una contaminación del sistema, deberá realizar el ciclo de limpieza hasta obtener una lectura aceptable o reemplazar el tubo de catálisis.

La lectura de 01 blanco (nombrado con la fecha en la que es desarrollado el análisis) se realizará en la carpeta de análisis.

6.2.2 Lectura de material de referencia:

- Lectura de material de referencia (DORM-4 (0.412 µg/g))
- Lectura material de referencia (IAEA-436 (4.19 µg/g))
- Revisar los valores obtenidos en los materiales de referencia y determinar el porcentaje de recuperación que debe encontrarse dentro el rango aceptable (90 -110%).
- Lectura de 2 blancos (ver punto 6.2.1 Control de blancos).

6.2.3 Ciclo de lectura de muestra:

- Se efectúan 10 lecturas que corresponden a 5 muestras liofilizadas (0.02-0.05 g). Es decir, cada muestra es leída 2 veces colocando para cada una el “CÓDIGO” seguido de “_” y el número de lectura. (Ej. “PE0025_1” y “PE0025_2”).

Después del resultado de las 10 lecturas, debe cargar:

- Estándar líquido 1 (valor fijo): Cargar 10 ng (100 µl) de un estándar líquido de mercurio de 100 ppb: STD-10 (100 ppb).
- Estándar líquido 2 (valor variable): Cargar “x” ng de un estándar líquido de mercurio de 1 ppm. La cantidad de ng dependerá del valor más alto observado de las muestras analizadas ya que debe ser similar al mismo y debe ser mayor a 20 ng.
- Lectura de 2 blancos.

Nota: Este ciclo de lectura puede realizarse las veces que sea necesario durante el día, ya que depende del número de muestras que van a ser leídas

6.2.4 Lectura de material de referencia

Se realiza la lectura del material de referencia tal como fue explicado en el punto 6.2.2

6.2.5 Ciclo de limpieza:

- Cargar 100 µl de Ácido Nítrico al 10%
- Cargar 0.3 g harina + 50 µl agua destilada

- Lectura de 3 blancos

Nota: Este ciclo de limpieza es programado para ser realizado al final de los análisis de cada día. Sin embargo, puede ser necesario realizarlo, después de analizar una muestra con alto contenido de mercurio que puede haber contaminado el sistema o saturado el detector.

7. Control de calidad/Garantía de calidad

Los resultados obtenidos deben ser revisados y evaluados para verificar que se encuentran en rangos óptimos de los controles de calidad. El control de calidad es realizado antes, durante y después del análisis de muestras, sin embargo, es recomendable dar seguimiento continuo a los resultados utilizando los indicadores de control de la planilla digital que contiene los resultados (Planilla3-Resultados DMA).

Lectura de blancos:

Consiste en una lectura sin muestra, es decir una lectura sin el analito de interés. La lectura de blancos permite verificar que el sistema no tenga ninguna contaminación que pueda interferir con los análisis (de no estar familiarizado con el proceso revisar el “**Protocolo M-002: Guía Operacional del Equipo Milestone Direct Mercury Analyzer DMA-80**”).

Lectura de material de referencia:

Utilizaremos material de referencia como control que permitirá medir la exactitud del método de análisis y será utilizado al inicio y al final del proceso.

Material de referencia: Sustancia suficientemente homogénea y estable con respecto a una o más de sus propiedades específicas siendo adecuadas para el uso en procesos de medición (ISO 35, 2017) El tipo de material de referencia dependerá del tipo de matriz que desee analizar, recomendamos la lectura del protocolo de procesamiento y análisis de la matriz de interés.

Nota: Los materiales de referencia seleccionados deberán presentar diferentes rangos de concentración, para poder evaluar los diferentes rangos de la curva, idealmente deberán ser leídos por lo menos 2 materiales de referencia con el objetivo de evaluar las 2 células cuyos rangos son: **Célula 1:** <20ng de Hg, y la **Célula 2:** >20 ng de Hg.

Lectura de estándar líquido:

Utilizaremos estándar líquido de mercurio como control para medir la exactitud y precisión del método de análisis.

Estándar líquido: Es una solución previamente preparada a partir de una solución matriz de 1000 ppm (Mayta & Supo, 2017).

Para los análisis en el equipo DMA-80 se realizará la lectura de dos estándares, el estándar líquido 1 (valor fijo) de 10 ng y el estándar líquido 2 (valor variable) que dependerá del rango observado de las muestras analizadas. Los estándares serán leídos cada 10 lecturas que corresponde a 5 muestras con duplicados cada una. En caso no contar con soluciones de estándar líquidos, revise el “**Protocolo M-003: Calibración del Equipo Milestone DMA-80 Direct Mercury Analyzer**” para realizar las diluciones.

NOTAS:

- **La exactitud** corresponde a la proximidad entre el resultado de una medición (valor verdadero) y el valor verdadero del analito (valor esperado). La exactitud de un método es una expresión de cuan cerca está la media de un conjunto de resultados del valor verdadero (ISO 35, 2017).
- **La precisión** mide cuán cerca están los resultados unos de otros por mediciones replicadas en condiciones específicas y generalmente se expresa por medidas como la desviación estándar. (ISO 35, 2017).
- Al finalizar los controles de precisión y exactitud deberá evaluar el porcentaje de recuperación.

8. Bibliografía

- Bowles, K. C., Apte, S. C., Maher, W. A., & Kawei, M. (2001). Bioaccumulation and biomagnification of mercury in Lake Murray , Papua New Guinea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 58(7), 888–897. <https://doi.org/10.1139/cjfas-58-5-888>
- Jiménez-Guerrero, J., & Castaño, A. (n.d.). *Analytical method for total mercury un hair determination* (Issue 223). Consortium to Perform Human Biomonitoring on a European Scale. http://www.eu-hbm.info/cophes/copy_of_Annex4.1SOPMercuryinhair.pdf
- ISO. (2017). *GUIDE 35: Reference materials—Guidance for characterisation and assessment of homogeneity and stability*. International Organisation for Standardisation (ISO), Geneva, Switzerland.
- Lopez, C. (2016). *Desarrollo de un método analítico para la determinación de mercurio atmosférico* [Universidad Nacional de Colombia]. <http://www.bdigital.unal.edu.co/53743/>
- Mayta, A., & Supo, K. L. (2017). *Optimización del tiempo de digestión de soluciones cianuradas para determinar elementos pesados por el método de arrastre de vapor frío*. Universidad Nacional de San Agustín.