



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

CAMPUS GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

POSGRADO EN QUÍMICA

**“DESARROLLO DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS Y SU APLICACIÓN EN
ESTUDIO METALÓMICO ENFOCADO AL MEDIO AMBIENTE”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN QUÍMICA

PRESENTA

M.C. MANUEL MÉNDEZ GARCÍA

Guanajuato, Gto.

Agosto de 2018

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación que lleva por título **“DESARROLLO DE PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS Y SU APLICACIÓN EN ESTUDIO METALÓMICO ENFOCADO AL MEDIO AMBIENTE”**. Realizado por el M.C. Manuel Méndez García en los laboratorios del Departamento de Química sede Pueblito de Rocha de la Universidad de Guanajuato, para obtener el grado de Doctor en Química bajo la dirección de la Dra. Katarzyna Wrobel y el Dr. Kazimierz Wrobel.

“La verdad os hará libres”

Dra. Katarzyna Wrobel

Dr. Kazimierz Wrobel

Miembro del Jurado asignados para el examen que para obtener el grado de Doctor en Química que presenta el M.C. Manuel Méndez García.

Dra. Alma Hortencia Serafín Muños

Dr. Juan Manuel Peralta Hernández
Presidente

Dra. Eunice Yañez Barrientos
Secretario

Dra. María Maldonado Santoyo
Vocal

Dr. Armando Gómez Ojeda
Vocal

Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar
Suplente

ÍNDICE

Índice de Figuras.....	5
Índice de Esquemas.....	9
Índice de Tablas	10
Lista de Abreviaturas	12
RESUMEN.....	14
CAPÍTULO I	15
I.1. Introducción.....	15
I.1.1. Metalómica.....	15
I.1.2. Metales contaminantes de interés en este trabajo	16
Mercurio.....	16
Cromo.....	18
Cobre	20
Plomo	21
I.1.3. Herramientas analíticas utilizadas en estudios metalómicos	23
I.1.4. Espectrometrías atómicas	25
I.1.4. Espectrometría de masas con ionización suave	29
CAPÍTULO II.....	37
II.1. Objetivo general	37
II.2. Objetivos particulares	37
CAPÍTULO III. Parte experimental	38
III.1. Material y reactivos	38
III.2. Instrumentación analítica y equipos.	39
III.3. Softwares y programas	39
CAPÍTULO IV. Resultado y Discusión.....	41
IV.1. Mecanismo de reducción de cromo hexavalente(VI) por ácido oxálico en presencia de manganeso(II).	41
IV.1.1. Introducción	41
IV.1.2. Parte experimental	43
IV.1.3. Resultados y discusión.....	44
IV.1.4. Conclusiones	59

IV.2. Especiación analítica de mercurio en atún enlatado y pescado fresco mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por ICP-MS con Bi³⁺ como estándar interno y N-acetilcisteína como agente acomplejante.	61
IV.2.1. Introducción	61
IV.2.2. Parte experimental	62
IV.2.3. Resultados y discusión	65
IV.2.4. Conclusiones	72
IV.3. Aplicación de MALDI-TOFMS en combinación con el método de mínimos cuadrados parciales (PLS2) para la determinación de mercurio y cobre en pescado, utilizando ditizona como agente acomplejante y Ag(I) como estándar interno	73
IV.3.1. Introducción	73
IV.3.2. Parte experimental	74
IV.3.3. Resultados y discusión	78
IV.3.4. Conclusiones	91
IV.4. Determinación de cobre y plomo en tequila por MALDI-TOFMS y regresión por mínimos cuadrados parciales	92
IV.4.1. Introducción	92
IV.4.2. Parte experimental	94
IV.4.3. Resultados y discusión	96
IV.4.4. Conclusiones	114
CAPÍTULO V	116
V.1. Conclusiones generales	116
V.2. REFERENCIAS	120
V.3. ARTICULO PUBLICADO	133

Índice de Figuras

Fig. 1. Diversos campos científicos estudiados en relación con la metalómica [4].....	16
Fig. 2. Procedimientos analíticos empleados en el análisis de especies química [4].....	25
Fig. 3. Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente como fuente de ionización, equipado con filtro de masas tipo cuádrupolo. Se aprecia un acercamiento a la interfase existente entre deionización a presión atmosférica y las condiciones de vacío interior.....	26
Fig. 4. (A) Esquema interno de generación del plasma en el MP-AES Agilent 4100. Líneas azules: campo magnético. Líneas rojas: campo eléctrico. 1: Magnetrón de 2.45 GHz. 2: Orientador de microondas; (B) Esquema interno del sistema óptico del MP-AES Agilent 4100.	28

Fig. 5. Diagrama de dispositivos de electronebulización, utilizando skimmers para la focalización iónica y una cortina de gas nitrógeno calentado para la desolvatación (derecha), o con un capilar calentado para la desolvatación (izquierda).	30
Fig. 6. Esquema del principio de procesos MALDI.	32
Fig. 7. Efecto del aumento de las concentraciones de Mn(II) sobre el grado de reducción de Cr(VI) 0.67 mM en la presencia de ácido oxálico 1 M, medida como absorbancia a 350 nm durante un período de tiempo de 90 min; los gráficos corresponden a lo siguiente: Cr(VI):Mn(II) relaciones molares:(-○-) 16:1; (-△-) 8:1; (-◇-) 4:1; (-■-) 2:1; (-◆-) 1:1; (-□-) 1:2.....	44
Fig. 8. Los resultados obtenidos para la mezcla de reacción: Cr(VI) 0.67 mM, ácido oxálico 13.3 mM y Mn(II) 0.33mM, midiendo absorbancia de las soluciones a diferentes tiempos de contacto. (a) Los espectros de absorción adquiridos durante 1h desde la preparación de la solución. (b); (c); (d); (e) Los valores de absorbancia registrados cada 10 min a 295 nm; 350 nm; 445 nm; 540 nm, respectivamente.	45
Fig. 9. Resultados de HPLC-DAD obtenidos para la mezcla de reacción a diferentes intervalos de tiempo desde su preparación (a) Cr(VI) 0.67 mM (____) y Cr(VI) 0.67 mM + ácido oxálico 13.3 mM (----): cromatogramas adquiridos después de 2-3 min con detección a 350 nm (b) Cr(VI) 0.67 mM, ácido oxálico 13.3 mM y Mn(II) 0.33 mM: cromatogramas adquiridos inmediatamente (.....), después de 15 min (---) y 60 min (—) de su preparación a 350 nm. (c); (d); (e) Espectros de absorción obtenidos en los máximos de los picos cromatográficos (a) con tiempos de elución a 4.09 min; 4.46 min; 5.05 min, respectivamente.....	48
Fig. 10. Resultados de HPLC-DAD obtenidos para la mezcla de reacción: Cr(VI) 0.67 mM, ácido oxálico 13.3 mM y Mn(II) 0.33mM a diferentes intervalos de tiempo desde su preparación. (a) Cromatogramas adquiridos inmediatamente (.....), después de 15 min (---) y 60 min (____); longitud de onda de detección 540 nm. (b); (c) Espectros de absorción obtenidos en los máximos de los picos cromatográficos que eluyen a tiempos de 2.57 min y 4.06 min, respectivamente; tiempo de reacción 60 min.	49
Fig. 11. Resultados de HPLC-MP-AES obtenidos de la mezcla de reacción: Cr(VI) 0.67 mM, ácido oxálico 13.3 mM a la que se le adicionó Mn(II) 0.33mM después de 1 h desde su preparación. (a) Cromatogramas obtenidos para Cr (425.433) inmediatamente después de la adición de Mn(II) (—) y después de 15 min (----), 30 min (-·-), 60 min (.....). (b) Cromatogramas obtenidos para Mn (403.076), inmediatamente después de la adición de Mn(II) (—) y después de 15 min (----), 30 min (-·-), 60 min (.....). (c) Cromatogramas obtenidos después de 1 h de la adición de Mn(II) con detección específica de Cr (----) y Mn (—). (d) concentraciones correspondientes a cada pico cromatográfico en inyecciones sucesivas: (-▲-) – Cr(VI) señal $t_{ret} = 5.68$ min; (-●-) – Cr(III) señal $t_{ret} = 2.50$ min; (-■)	

– Cr(intermediario) señal $t_{ret} = 4.18 \text{ min} + t_{ret} = 4.42 \text{ min}$; (-O-) – Mn(II) señal $t_{ret} = 2.30 \text{ min}$; (- Δ -)	
– Mn(intermediario) señal, $t_{ret} = 4.58 \text{ min}$.	51
Fig. 12. Resultados de la espectrometría de masas moleculares: estructuras moleculares de ocho compuestos de cromo (A-K) y cambios de su abundancia a lo largo del tiempo. (a) A, B, C. (b) D, E. (c) F. (d) G, H, I.	54
Fig. 13. Resultados de la espectrometría de masas moleculares: estructuras moleculares de dos compuestos de manganeso (J, K) y cambios de su abundancia a lo largo del tiempo de reacción...	55
Fig. 14. Cromatograma HPLC-ICP-MS obtenido en el análisis de soluciones blanco con: a) N-acetilcisteína y b) L-cisteína (condiciones de separación y detección se presentan en Tabla 4).	67
Fig. 15. Cromatogramas HPLC-ICP-MS obtenido en el análisis de una solución estándar de las especies de mercurio ($25 \mu\text{gHgHg l}^{-1}$ de cada una) y de EI ($10 \mu\text{gBiHg l}^{-1}$).	68
Fig. 16. Cromatogramas HPLC-ICP-MS obtenidos en el análisis de una muestra de atún enlatado, el blanco, dos adiciones estándar a la muestra de atún enlatado (5 y $10 \mu\text{gHg l}^{-1}$) y el EI ($10 \mu\text{gBi l}^{-1}$).	69
Fig. 17. Cromatograma HPLC-ICP-MS obtenido del análisis del Material de Referencia DORM-2 y un blanco con EI ($10 \mu\text{gBi l}^{-1}$).	69
Fig. 18. Efecto de pH de la solución acuosa sobre la intensidad de las señales de los complejos después de su extracción al ciclohexano (señal relativa se calculó normalizando la absorbancia obtenida en cada una de las soluciones por el valor máximo): cobre (548 nm), mercurio (484 nm) y plata (462 nm).	78
Fig. 19. Patrones isotópicos experimentales obtenidos para los complejos con ditizona por ESI-QTOF-MS y por MALDI-TOF-MS; Los espectros teóricos calculados y la estructura propuesta de los iones se presentan para: (a) cobre, (b) mercurio y (c) plata.	80
Fig. 20. Límites de detección estimados valuados para los tres complejos metálicos usando diferentes diluciones de muestra y matriz, respectivamente.	82
Fig. 21. Espectros MALDI-TOF-MS obtenidos utilizando las condiciones experimentales y de operación instrumental seleccionadas finalmente, para (a) solución estándar conteniendo Cu(II), Hg(II) ($20 \mu\text{g l}^{-1}$ cada uno) y Ag (I) ($25 \mu\text{g l}^{-1}$) y (b) solución de blanco.	83
Fig. 22. Repetibilidad de los espectros MALDI-TOF-MS obtenidos para las soluciones estándar preparadas en cuatro días diferentes ($10 \mu\text{g l}^{-1}$ Cu, $20 \mu\text{g l}^{-1}$ Hg, $25 \mu\text{g l}^{-1}$ Ag): (a) Cu(I)-Dz; (b) Ag(I)-Dz; (c) Hg(II)-Dz; (d); valores promedios de intensidades de señal con sus respectivas desviaciones estándar.	84
Fig. 23. Señales de metal-ditizona obtenidas por el procedimiento MALDI-TOFMS para aleta de mantarraya fresca (azul), esta misma muestra con adición estándar ($20 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu (II) y Hg (II) en	

la muestra digerida con ácido) (negro) y para una solución estándar conteniendo $20 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu(II) y Hg(II) (rojo). Las tres soluciones contenían EI ($25 \mu\text{g l}^{-1}$ de Ag como Ag(I)-Dz): (a) Cu(I)-Dz; (b) Hg(II)-Dz; (c) Ag(I)-Dz. 85

Fig. 24. Captura de pantalla de Unscrambler que muestra el modelo PLS2 con resultados para calibración de Cu y Hg, validación cruzada y predicción en la muestra A, muestra A con adición estándar ($20 \mu\text{g/l}$ Cu y Hg), material de referencia certificado (DORM-2) y cuatro repeticiones independientes del blanco (B1-B4). Se utilizaron espectros de masa completos. 87

Fig. 25. Captura de pantalla de Unscrambler que muestra el modelo PLS2 con resultados para calibración de Cu y Hg, validación cruzada y predicción en la muestra A, muestra A con adición estándar ($20 \mu\text{g/l}$ Cu y Hg), material de referencia certificado (DORM-2) y cuatro repeticiones independientes del blanco (B1-B4) Sin EI: m/z región 610-620 excluida. 88

Fig. 26. Espectros de masas obtenidos para el complejo de Cu con dietilditiocarbamato ($100 \mu\text{g l}^{-1}$ Cu): (superior) Patrones isotópicos experimentales obtenidos por ESI-QTOF-MS y MALDI-TOFMS; espectro calculado in silico y la estructura propuesta del ion con una sola carga formado en la fase gaseosa; (inferior) espectro ESI-QTOF-MS/MS obtenido para el ion precursor con m/z 358.9803 con las estructuras de sus fragmentos de iones asignados.90

Fig. 27. Patrones experimentales obtenidos para el complejo de Cu con dietilditiocarbamato obtenidos mediante ESI-QTOF-MS con concentraciones de iones metálicos de 50 y $100 \mu\text{g l}^{-1}$ (izquierda) y sus respectivos resultados por SmartFormula (derecha).91

Fig. 28. Comparación del patrón isotópico experimental por ESI-QTOFMS del complejo Cu-DDTC obtenido para $100 \mu\text{g l}^{-1}$ Cu con los patrones calculados in silico de dos especies iónicas generadas por el software SmartFormula (arriba a la izquierda), zoom de estos mismos patrones que muestran señales superpuestas (parte inferior izquierda) y sus respectivas estructuras moleculares propuestas (derecha).92

Fig. 29. Espectros de masas obtenidos para el complejo de Pb con dietilditiocarbamato ($1200 \mu\text{g l}^{-1}$ Pb): (superior) Patrones isotópicos experimentales obtenidos por ESI-QTOF-MS y MALDI-TOFMS; espectro calculado in silico y la estructura propuesta del ion con una sola carga formado en la fase gaseosa; (inferior) espectro ESI-QTOF-MS/MS obtenido para el ion precursor con m/z 652.0537 con las estructuras de sus fragmentos de iones asignados.93

Fig. 30. Espectros de masas obtenidos para el complejo Bi (superior) y In (inferior) con dietilditiocarbamato: (a) Patrones isotópicos experimentales obtenidos por ESI-QTOF-MS ($50 \mu\text{g l}^{-1}$ Bi y $100 \mu\text{g l}^{-1}$ In) y MALDI-TOF-MS ($100 \mu\text{g l}^{-1}$ Bi y $200 \mu\text{g l}^{-1}$ In); espectro calculado in silico y la estructura propuesta del ion de una sola carga formado en fase gaseosa.94

Fig. 31. Efecto de dilución de HCCA en la relación señal/ruido evaluada para las mediciones de altura máxima y área de pico. Se adquirieron señales analíticas en cinco repeticiones a m/z 358,96 para Cu ($400 \mu\text{g l}^{-1}$) y m/z 355,95 para Pb ($1200 \mu\text{g l}^{-1}$); el ruido se calculó como la desviación estándar de las intensidades adquiridas fuera del patrón isotópico para cada analito. Para cada dilución de matriz, se muestran fotos de los depósitos co-cristalizados.....95

Fig. 32. Espectros MALDI-TOFMS obtenidos, mediante las condiciones finales experimentación e instrumentación, para la mezcla de estándares que contienen $400 \mu\text{g l}^{-1}$ Cu, $400 \mu\text{g l}^{-1}$ Pb, $150 \mu\text{g l}^{-1}$ Bi y $500 \mu\text{g l}^{-1}$ In (espectro inferior) y para una solución del blanco sin estándares internos (espectro superior).....96

Fig. 33. Calibración univariante realizada mediante las señales del EI normalizadas para los picos monoisotópicos de los complejos de Cu y Pb. Área máxima como señal analítica, EI-Bi-DDTC (superior), en función de la regresión lineal obtenida utilizando todos los resultados individuales; función de regresión lineal calculada para los promedios de todos los datos individuales (inferior).98

Fig. 34. Señales de los complejos metal-dietilditiocarbamato obtenidas mediante el procedimiento por MALDI-TOFMS para la muestra A1 (negro), esta misma muestra A1 con adición estándar ($200 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ y $400 \mu\text{g Pb l}^{-1}$) (azul) y para la solución estándar que contiene $200 \mu\text{g Cu l}^{-1}$ y $400 \mu\text{g Pb l}^{-1}$ (rojo). Las tres soluciones contenían EI ($150 \mu\text{g Bi l}^{-1}$ y $500 \mu\text{g In l}^{-1}$ In en forma de sus con DDTC). (a) Cu(III)-(DDTC)₂, (b) Pb(II)-(DDTC), (c) Bi(III)-(DDTC)₂ y (d) In(III)-(DDTC)₂.....99

Fig. 35. Resultados por Unscrambler que muestran los modelos PLS2 con la calibración de Cu, validación cruzada y predicción en las muestras A2, A1, B2, EA1, R1, R2 y después de la adición estándar ($200 \mu\text{g l}^{-1}$ Cu) a estas muestras. SUPERIOR: Se utilizaron espectros de masas excluyendo el rango m/z correspondiente a los complejos In y Bi (sin EI). INFERIOR: Se utilizaron espectros de masas excluyendo el rango m/z correspondiente al complejo In (con Bi(III)-(DDTC)₂ como EI)... 102

Fig. 36. Resultados por Unscrambler que muestran los modelos PLS2 con la calibración de Pb, validación cruzada y predicción en las muestras A2, A1, B2, EA1, R1, R2 y después de la adición estándar ($400 \mu\text{g l}^{-1}$ Pb) a estas muestras. SUPERIOR: Se utilizaron espectros de masas excluyendo el rango m/z correspondiente a los complejos In y Bi (sin EI). INFERIOR: Se utilizaron espectros de masas excluyendo el rango m/z correspondiente al complejo In (con Bi(III)-(DDTC)₂ como EI)... 103

Índice de Esquemas

Esquema 1. Reacciones que se producen en la mezcla de Cr(VI) y ácido oxálico (pH 3)..... 56

Esquema 2. Mecanismo de reacción propuesto para la reducción de Cr(VI) con ácido oxálico en presencia de Mn(II)..... 57

Índice de Tablas

Tabla 1. Algunos láseres comunes utilizados para MALDI.	34
Tabla 2. Algunas matrices UV-MALDI más comunes.	34
Tabla 3. Asignación de compuestos que contienen cromo y manganeso, basados en las mediciones de masa exactas realizadas en la mezcla de reacción por infusión directa ESI-QTOF-MS.	53
Tabla 4. Condiciones instrumentales del sistema HPLC-ICP-MS para la especiación de mercurio en tejido de pescado fresco y atún enlatado.	63
Tabla 5. Resultados de la determinación de Hg total en diferentes marcas de atún enlatado y pescado fresco comercializado en la ciudad de Guanajuato, México, así como el resultado obtenido para el Material de Referencia DORM-2, obtenidos por ICP-MS. Se presentan los valores promedios con sus respectivas desviaciones estándar, basados en tres repeticiones independientes.	66
Tabla 6. Parámetros analíticos evaluados para las dos especies de mercurio.	68
Tabla 7. Resultados de la determinación de las especies de mercurio en atún enlatado y tejido de pescado fresco (n=3).	70
Tabla 8. Resultados de la determinación de las especies de mercurio en el Material de Referencia DORM-2 y su comparación con el valor certificado.	70
Tabla 9. Porcentajes de recuperación de las especies Hg^{2+} , CH_3Hg^+ con adición en forma separada para cada especie en atún enlatado y tejido de pescado.	71
Tabla 10. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración univariante por el método de regresión lineal utilizando las señales más intensas de Cu y Hg, con y sin normalización por EI (m/z 617).	85
Tabla 11. Resultados de recuperación para Cu y Hg determinados por el procedimiento de MALDI-TOF-MS y calibración univariante en la muestra de atún enlatado A después de la adición estándar y las concentraciones encontradas en esta muestra por ICP-MS.	86
Tabla 12. Parámetros analíticos evaluados para el modelo PLS2 construido para la determinación de Cu y Hg, basado en los espectros MALDI-TOFMS.	88
Tabla 13. Resultados de la determinación de Hg y Cu en diferentes marcas de atún enlatado comercializado en México, obtenido por MALDI-TOFMS con calibración de un componente (1), por el método PLS2 (2) y por ICP-MS (3). Se presentan los valores promedios con sus respectivas desviaciones estándar, basados en tres repeticiones independientes.	89
Tabla 14. Repetibilidad de las señales analíticas adquiridas para cada complejo metálico con dietilditiocarbamato. Se utilizó el área de la señal del pico monoisotópico obtenida para $400 \mu g l^{-1}$ de Cu y Pb, $150 \mu g l^{-1}$ Bi y $500 \mu g l^{-1}$ In.	97

Tabla 15. Parámetros analíticos evaluados para la calibración de regresión lineal univariante utilizando los valores promedios para las señales más intensas de Cu y Pb (seis réplicas), con y sin normalización con EI (Bi(III)-(DDTC) ₂ , <i>m/z</i> 505.02).....	98
Tabla 16. Resultado de los experimentos de recuperación llevados a cabo utilizando la cuantificación univariante (tres repeticiones independientes).....	10
Tabla 17. Parámetros analíticos evaluados mediante el modelo PLS2 utilizado en la determinación de Cu y Pb, a partir de los espectros MALDI-TOFMS.....	104
Tabla 18. Resultados de la determinación de Cu y Pb en diferentes marcas de tequila, obtenidas mediante los siguientes procedimientos: (1) MALDI-TOFMS por calibración univariante con EI; (2) MALDI-TOFMS con PLS2; (3) ICP-MS. Se presentan los valores promedios con sus respectivas desviaciones estándar, basados en tres repeticiones independientes. A fin de que por MALDI-TOFMS no se detectó Pb en ninguna muestra, los resultados se presentan para las muestras con adición estándar (400 µg l ⁻¹ Pb) analizadas por el procedimiento (2) junto con su porcentaje de recuperación (2 (R,%)).....	105

Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
CCD	Detector de tipo dispositivo de acoplamiento de carga.
CH ₃ CH ₂ Hg ⁺	Etilmercurio.
CH ₃ Hg ⁺	Metilmercurio.
CI	Ionización química.
2,5-DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico.
DORM-2	Material de referencia certificado (dogfish muscle)
DTPA	Ácido dietilenetriaminopentacético.
Dz	Ditizona.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
%E	Rendimiento de extracción.
EI	Estándar interno.
EPA	Agencia de Protección Medioambiental de EE. UU.
ESI	Ionización por electronebulización.
ESI-MS	Espectrometría de masas con ionización por electronebulización.
ESI-QTOF-MS	Espectrometría de masas con fuente de ionización por electronebulización y separador de masas de tiempo de vuelo y cuadrupolo.
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU.
HCCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico.
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución.
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección espectrofotométrica de arreglo de diodos.
HPLC-ICP-MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por espectrometría de masas de plasma acoplada inductivamente
HR-MS	Espectrometría de masas de alta resolución.
ICP-MS	Espectrometría de masas de plasma acoplada inductivamente.
LDI	Desorción/ionización por láser.
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz.
MALDI-HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución con ionización/desorción de laser asistida por matriz.

MALDI-TOF-MS	Espectrometría de masas de alta resolución con ionización/desorción de laser asistida por matriz y separador de masas de tiempo de vuelo.
MP-AES	Emisión atómica con excitación en plasma de nitrógeno sostenido por microondas.
MS	Espectrometría de masas.
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
ORC	Celda de colisión/reacción octapolo.
PLS2	Método de regresión de mínimos cuadrados parciales.
SELDI	Ionización por desorción láser mejorada en superficie.
SF-MS	Espectrometría de masas de sector de campo.
SIDMS	Espectrometría de masa de dilución isotópica especiada.
TOF-MS	Espectrometría de masas de tiempo de vuelo.
UE	Unión Europea.
UV	Radiación ultravioleta
UV/Vis	Región ultravioleta-visible del espectro electromagnético
DDTC	Dietilditiocarbamato

RESUMEN

Los metales y metaloides se encuentran en la naturaleza en diferentes estados de oxidación, como compuestos inorgánicos, asociados a materia orgánica. Debido a diferentes propiedades fisicoquímicas de estas formas y especies, su determinación tiene relevancia ambiental y biológica. En este sentido, el objetivo de la reciente área de investigación denominada metalómica, es caracterizar de la manera más completa posible la cantidad y el comportamiento de la totalidad de metales/metaloides en un sistema dado. En estos estudios, se enlaza la información sobre distribución y especiación analítica de los elementos con el impacto que ejercen en los organismos vivos. En cuanto a las herramientas utilizadas en metalómica, se deben mencionar diferentes tipos de técnicas de separación y técnicas de espectrometría de masas atómica y molecular con el fin de obtener la cuantificación de los elementos de interés y la caracterización molecular de sus especies o biomoléculas con las que forman diferentes tipos de unión.

El presente trabajo de tesis ha sido enfocado al desarrollo de procedimientos analíticos y su aplicación en el área de metalómica. En este sentido, se han elegido cuatro elementos de interés en esta área: Hg, Cr, Cu y Pb. En cuanto al tipo de muestras, se planteó analizar tejidos de pescado y tequilas, además de llevar a cabo el estudio mecanístico de la reducción de Cr(VI) en soluciones modelo. Para lograr dicho propósito, se utilizaron diferentes herramientas analíticas, incluyendo: ICP-MS, MP-AES, espectrometría UV/Vis y espectrometría de masas con ionización suave (ESI-QTOF-MS y MALDI-TOFMS).

Se decido trabajar con pescado fresco y atún enlatado debido a que los organismos marinos tienden a acumular contaminantes medioambientales y forman una fuente importante de estos xenobióticos (además de algunos elementos esenciales) en la cadena alimenticia del hombre. Con este enfoque, se determinó mercurio total, las especies de mercurio (Hg^{2+} y MeHg^+) y cobre total. Por otro lado, se realizó la determinación de cobre y plomo en tequila, ya que son dos de los metales regulados por la Norma Oficial Mexicana; esta bebida mexicana tradicional es de amplio consumo tanto en el país como en el extranjero y se requieren procedimientos analíticos que permitan controlar el cumplimiento de la norma. Finalmente, también dentro del tema principal de metalómica, se realizó un estudio de reducción de cromo hexavalente por el ácido oxálico en presencia de Mn(II), para entender el papel de manganeso en este proceso y abrir una posibilidad de desarrollar un método de remediación amigable al medioambiente.

CAPÍTULO I

I.1. Introducción

I.1.1. Metalómica

La metalómica es un área relativamente reciente que apenas se está estableciendo en el campo de interdisciplina adoptando de manera provisional la siguiente definición: “metalómica es un estudio integral de metales/metaloides en un sistema biológico (célula, tejido, órgano, organismo) u de otra índole (sistema geoquímico, ecosistema, medioambiente), incluyendo las posibles interacciones con otros componentes del sistema con el fin de conocer los mecanismos responsables de sus efectos en organismos vivos” [1-3]. Las herramientas utilizadas en los estudios metalómicos abarcan diferentes técnicas de separación y sus acoplamientos principalmente con espectrometría de masas atómica y molecular, ya que estas plataformas permiten la caracterización estructural de diversos compuestos y su cuantificación con base en el contenido de los elementos de interés [2]. En este sentido, los estudios metalómicos abarcan diferentes temas que se relacionan con la evaluación y con un mejor control del impacto que tienen los elementos traza en organismos vivos. Asimismo, es necesario conocer posibles fuentes de elementos para organismos vivos, su captación, distribución, rutas de biotransformación e interacciones con biomoléculas u otros componentes del sistema vivo. Es por ello que las tareas analíticas en el área de metalómica incluyen:

- Determinación de concentraciones totales
- Distribución de elementos entre compartimientos del sistema (órganos, tejidos, fracciones subcelulares, etc.)
- Análisis de especiación
- Identificación/cuantificación de especies químicas que juegan un papel en el impacto del(los) elemento(s) de interés en el sistema estudiado.

Aunque término metalómica se refiere a estudio de metales/metaloides en sistemas vivos, las muestras que son de interés incluyen no solamente tejidos y fluidos biológicos sino también materiales medioambientales y alimentos debido a que estas son principales fuentes de formas y especies de elementos para seres vivos. En este contexto, las biociencias relacionadas con el estudio integral de metales/metaloides se han estudiado de forma independiente en muchos campos científicos, los cuales se muestran en la Fig. 1 en tres grupos: (i) ciencias básicas como física, química, biología, etc; (ii) ciencias aplicadas como toxicología, ciencia en alimentos, ciencia nutricional, higiene pública y otras; (iii) ciencias futuras que consisten en ciencia de la salud y ciencia medioambiental verde. Donde estas últimas son campos muy importantes para la sustentabilidad de

los seres humanos y la naturaleza. En este sentido y como se muestra en la Fig. 1 la metalómica es una ciencia integrada, enfocada a metales y vinculada con todas las ciencias básicas y aplicadas lo cual la convierte en una ciencia multidisciplinaria y con una amplia diversidad [4].

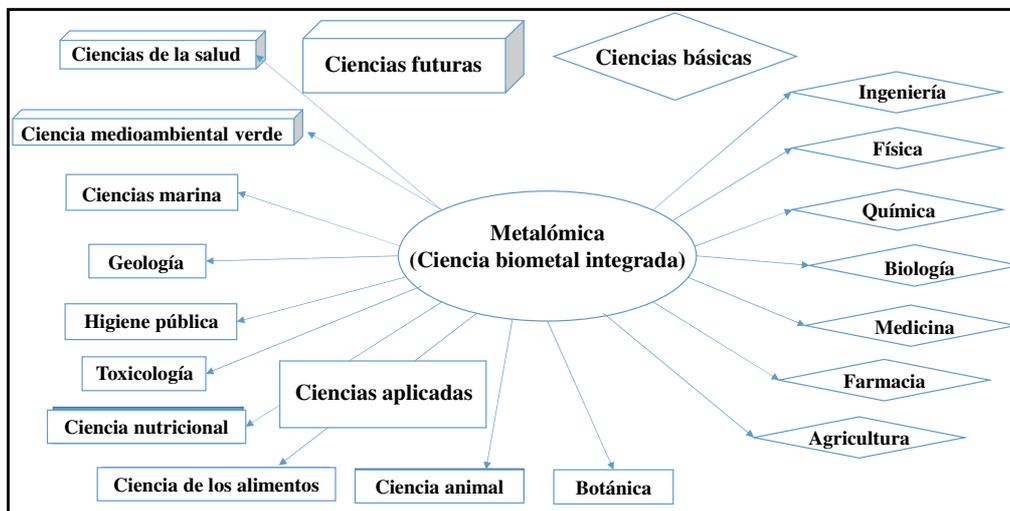


Fig. 1. Diversos campos científicos estudiados en relación con la metalómica [4].

Como ya se mencionó, todos los campos científicos que se muestran en la Fig. 1 están relacionadas con al menos un punto común de interés que es la elucidación del papel de metales/metaloides. Por lo tanto, es deseable que metalómica, se promueva con el trabajo cooperativo de los campos científicos relacionados con el estudio de metales/metaloides en las diversas áreas.

Dentro del dominio de metalómica, el presente trabajo de tesis aborda tres siguientes enfoques:

1. Desarrollo y aplicación de nuevos procedimientos para la determinación total de concentraciones totales de algunos elementos en alimentos y bebidas.
2. Avance en la metodología analítica para la especiación de mercurio con aplicación en el análisis de tejidos de pescado, como resultado de contaminación medioambiental.
3. Desarrollo y aplicación de procedimientos analíticos para estudiar mecanismo de reducción de Cr(VI) por el ácido oxálico, en el contexto de remediación medioambiental.

I.1.2. Metales contaminantes de interés en este trabajo

Mercurio

El mercurio (Hg) es un metal pesado que se encuentra localizado en el grupo 12 de la tabla periódica, su número atómico es 80 y su masa atómica es $200.59 \text{ g mol}^{-1}$. El Hg está clasificado en el 67^{mo} lugar en orden de abundancia de los elementos en la corteza terrestre. Es un metal que es líquido a temperatura ambiente. El Hg tiene siete isótopos naturales estables: $^{196}\text{Hg}(0.15\%)$, $^{198}\text{Hg}(9.97\%)$,

^{199}Hg (16.87%), ^{200}Hg (23.1%), ^{201}Hg (13.18%), ^{202}Hg (29.86%) y ^{204}Hg (6.87%), entre los cuales el más abundante ^{202}Hg corresponde a menos de un tercio del mercurio total [5]. En la naturaleza, el mercurio se presenta en las formas orgánicas e inorgánicas. Como inorgánico, se encuentra principalmente como mercurio elemental y sales de Hg^{2+} , mientras que las especies orgánicas, consideradas las especies más tóxicas de este elemento, son los alquilcompuestos con cadenas cortas y largas de grupos alquilo y arilo [6].

La contaminación con mercurio puede ocurrir por las emisiones naturales geoquímicas y/o antropogénicas [7]. Algunas fuentes antropogénicas de mercurio son la producción del metal, las industrias de producción de pulpas y álcali-clorados, tratamiento de lodos y la quema de composta entre otras. Las entradas naturales a la atmósfera incluyen la desgasificación y encapsulamiento de algunas partículas, principalmente en áreas mercuriales, las erupciones volcánicas, incendios forestales, emisiones biogénicas de compuestos y partículas volátiles y la desgasificación de algunas superficies acuáticas [8]. En la actualidad las principales fuentes de contaminación de mercurio son las industrias de papel, agricultura y farmacéutica [9].

El mercurio elemental (Hg^0) es transportado en forma gaseosa alrededor de la tierra, convirtiéndose en un contaminante global y lo podemos encontrar en el agua y sedimentos en su forma mayoritaria como mercurio iónico o inorgánico (Hg^{2+}) y sus sales (formando enlaces con Cl^- , S^{2-} y ácidos orgánicos) y el mercurio orgánico como metilmercurio (CH_3Hg^+) que se encuentra en pescado y mamíferos marinos [6, 10]. Así mismo, el mercurio está presente como agente blanqueador en productos de cuidado personal, en productos farmacéuticos; las soluciones de limpieza para lentes de contacto pueden contener etilmercurio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$). Los compuestos órgano-mercuriales son de especial importancia debido a su fácil penetración a través de las membranas biológicas, su eficiente acumulación, su alta estabilidad y por consiguiente su permanencia por largo tiempo en tejidos, haciendo difícil su eliminación [7, 8].

Desde el momento en que el Hg^0 es inhalado, es rápidamente oxidado por la corriente sanguínea a Hg^{2+} (el cual exhibe un diferente grado de toxicidad) y subsecuentemente, mediante proceso de biometilación, es convertido a metilmercurio (CH_3Hg^+) la cual es una especie de mercurio más tóxica [11]. Muchos compuestos derivados del mercurio inorgánico son nefrotóxicos, es decir, pueden llegar a deteriorar el funcionamiento de los riñones; comparado con el CH_3Hg^+ (donde la mayoría de los compuestos órgano-mercuriales son neurotóxicos, es decir, actúan a nivel del sistema nervioso) [10]. En este sentido, la toxicidad, el proceso bioquímico y la biodisponibilidad del mercurio dependen significativamente de la forma fisicoquímica del elemento, presente el medio de estudio [12]. Las diferentes especies de mercurio tienen diferentes efectos toxicológicos y por tanto distintas rutas de detoxificación en el cuerpo humano. Así, el Hg^0 puede penetrar dentro de las células

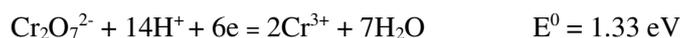
donde posteriormente se oxida produciendo las formas de Hg^{2+} provocando daños en el riñón [7]. Por otro lado, el CH_3Hg^+ se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal y subsecuentemente se distribuye entre varios de los tejidos corporales, incluyendo el cerebro, a través del sistema de transporte de aminoácidos neutrales, induciendo daño a las células neuronales [7, 11]. Las formas más tóxicas y abundantes de mercurio en el medioambiente se encuentran como CH_3Hg^+ .

Asimismo, la toxicidad de metilmercurio está bien documentada y en términos generales se relaciona con el carácter liposoluble de la especie, lo cual facilita su permeación a través de las membranas biológicas y su posterior acumulación en diferentes órganos y tejidos (hígado, riñones, cerebro) [11-13]. El monitoreo de Hg^{2+} y CH_3Hg^+ en el ambiente y en muestras biomédicas es fundamental para poder determinar el grado de contaminación y su impacto para la salud humana. En este contexto, las muestras de interés incluyen aguas naturales, suelos, lodos, diferentes tipos de organismos marinos y también muestras clínicas. En particular, el Hg^{2+} y CH_3Hg^+ se encuentran principalmente en pescado y otros organismos marinos los cuales se convierten en la primera fuente de suministro de metilmercurio para el ser humano al ser consumidos por este. Una vez que se han verificado y reconocido los riesgos tanto toxicológicos como ambientales producidos por las especies naturales, diferentes agencias gubernamentales han establecido concentraciones máximas permisibles de mercurio en productos comestibles marinos y derivados [14]. En particular, la US Food and Drug Administration (FDA) ha regulado el nivel de concentración permitida en pescado a 1 mg kg^{-1} de masa fresca [15]. De acuerdo con esto, existe una fuerte demanda por procedimientos analíticos que puedan proveer de información precisa y confiable concerniente a estas dos especies mercuriales, del mercurio total y de sus especies químicas en los complejos formados en matrices biológicas.

Cromo

El cromo (Cr) es un metal de transición que se encuentra localizado en el grupo 6 de la tabla periódica, su número atómico es 24 y su masa atómica es $51.996 \text{ g mol}^{-1}$. El Cr es el 17^{mo} elemento más abundante en la superficie de la tierra [16]. En estado metálico es color blanco plateado, duro y quebradizo. Es relativamente suave y dúctil cuando no está tensionado o se encuentra muy puro. El cromo posee cuatro isótopos estables: ^{50}Cr (4.35%), ^{52}Cr (83.78%), ^{53}Cr (9.050%) y ^{54}Cr (2.37%) [17]. El cromo elemental no se encuentra en la naturaleza, sus estados de oxidación van desde -2 hasta +6. El cromo divalente (Cr(II)) es inestable, debido a que es fácilmente oxidado a la forma trivalente por el oxígeno atmosférico [18, 19]. Por tanto, las formas trivalente (Cr(III)) y hexavalente (Cr(VI)) son los estados de oxidación más estables del cromo en la naturaleza. Dependiendo de su estado de oxidación, el cromo puede ejercer diferentes efectos en los organismos vivos. Se ha demostrado que, los compuestos de Cr(VI) son de diez hasta cien veces más tóxicos que los de Cr(III), además de que

se tiene reportado que el Cr(VI) es mutagénico y carcinogénico [20, 21]. En este sentido, la contribución relativa de Cr(III) y de Cr(VI) en los diferentes comportamientos del medioambiente depende de la fuente del elemento (minerales naturales o fuentes antropogénicas), y de los parámetros químicos del medio, tales como el potencial redox, el pH, la presencia de agentes acomplejantes, etc. [22]. El equilibrio entre los estados hexavalente y trivalente de cromo está descrita por la siguiente ecuación [18]:



De esta manera, el potencial estándar de reducción de Cr(VI) se ve reflejado en el alto poder oxidante de este ión ($E^0 = 1.33 \text{ eV}$). Es por ello que, en solución las especies de Cr(III) son termodinámicamente más estables que las de Cr(VI), en sistemas biológicos rara vez ocurre la oxidación de Cr(III). En contraste, la reducción de Cr(VI) por efectos biológicos, se encuentra ampliamente documentada en la literatura [16, 23].

En cuanto a la distribución de cromo en ambientes naturales, en el caso de aguas naturales, la variedad de especies de Cr(III) incluye iones libres ($\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$), hidroxicomplejos ($\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$, $\text{Cr}(\text{OH})_{3(\text{S})}$ ó $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$), complejos mono- y poli-nucleares ($\text{Cr}_2(\text{OH})_2^{4+}$, $\text{Cr}_3(\text{OH})_4^{5+}$ ó $\text{Cr}_4(\text{OH})_6^{6+}$, así como especies aniónicas (CrO_2^- , CrO_3^{3-}) [16]. En relación al pH, a $\text{pH} < 3.6$ la especie mayoritaria de Cr(III) es $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$. A medida que incrementa el pH, las moléculas de agua son remplazadas sucesivamente con iones hidróxido, hasta que se produce la precipitación [17, 24]. De esta manera, el Cr(III) tiende a precipitar a $\text{pH} > 4$ como hidróxido ($\text{Cr}(\text{OH})_3$) (pK_{SP} estándar de $\text{Cr}(\text{OH})_3$ es 30) [25], o en forma de hidróxidos mixtos en combinación con otros metales como hierro y aluminio [22, 26, 27]. Sin embargo, se ha demostrado que ciertos compuestos, tales como ácido cítrico, el ácido dietilenetriaminopentacético (DTPA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y el ácido fúlvico, tiene la de formar complejos solubles de Cr(III) a $\text{pH} > 4$ (pH entre 6 y 7) [28].

Por su parte, los compuestos de Cr(VI) son más solubles en agua que los de Cr(III). El Cr(VI) puede existir en el medio ambiente en forma de oxianiones tales como cromato (CrO_4^{2-}), bicromato (HCrO_4^-) y dicromato (Cr_2O_7), entre los cuales pueden haber diferentes especies con diferentes grados de protonación dependiendo de pH del medio [29]. Con respecto al pH , a $\text{pH} < 6.5$ las especies mayoritarias de Cr(VI) son HCrO_4^- y $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$; a $\text{pH} > 6.5$ la especie principal es CrO_4^{2-} [24].

Los valores típicos de cromo total en suelo no contaminado se encuentran en un rango de 30 a $300 \mu\text{g g}^{-1}$ [30]. Sin embargo, los niveles de Cr(III) y Cr(VI) pueden incrementar, principalmente a causa de la inadecuada disposición de los desechos industriales que contienen cromo. En el supuesto de que los compuestos de Cr(III) son termodinámicamente estables, una práctica comúnmente realizada en varios países a los desechos de las tenerías, es su confinado al aire libre [31]. Sin embargo, se han detectado niveles elevados de Cr(VI) en aguas superficiales y subterráneas de este

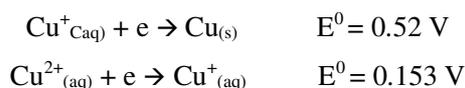
tipo de depósitos en India, china y Australia [16]. Por otra parte, en el aire los niveles normales de cromo, se hallan entre $10 - 50 \text{ g m}^{-3}$ [30] aunque en capas de aire próximas a zonas contaminadas con cromo o industrias que utilizan compuestos de cromo, se han detectado partículas de Cr(VI) y Cr(III) de aproximadamente $0.2 - 10.0 \text{ }\mu\text{m}$ de diámetro. Al estar expuesta la población humana, se tiene el riesgo de que estas partículas al ser inhaladas se pueden acumular en los pulmones de los seres vivos.

En este sentido y debido a que la presencia de Cr(VI) constituye un riesgo para la salud de la población, es necesario contar con estrategias de remediación que sean eficientes en disminuir los niveles de cromo en los diferentes compartimentos del medioambiente. Entre los mecanismos empleados para tratar los compuestos de Cr(VI), los procesos basados en agentes reductores han sido estudiados extensivamente ya que el Cr(VI) puede reaccionar con varias especies químicas, reduciéndose al estado de oxidación Cr(III), el cual se estabiliza fácilmente en fase sólida. Sin embargo, aún muy poco se sabe sobre las especies de cromo intermediarias formadas durante dicha reducción, por lo cual es necesario conocer estos mecanismos de reacción como un punto clave en el desarrollo de un procedimiento de remediación lo cual requiere el uso de herramientas de metalómica.

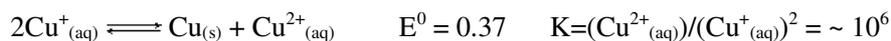
Cobre

El cobre (Cu) es un metal de transición que se encuentra localizado en el grupo 11 de la tabla periódica, su número atómico es 29 y su masa atómica es $63.546 \text{ g mol}^{-1}$. El Cu ocupa el 25^{vo} lugar en abundancia en la corteza terrestre. En estado metálico es maleable y dúctil, se caracteriza por su brillo y color rojizo y después de la plata, es el elemento con mayor conductividad eléctrica y térmica. El cobre se encuentra principalmente en forma de compuestos minerales y posee dos isotopos estables ^{63}Cu (69.1 %) y ^{65}Cu (30.9 %). Los estados de oxidación del cobre varían desde 0 hasta +4. Los compuestos en el estado de oxidación +3 y +4 son muy poco estables reduciéndose con mucha facilidad [32]. En este sentido, en la naturaleza se conocen compuestos en estados de oxidación +2 y +1. El Cu(II) es el más estable, dando lugar a numerosos compuestos simples y de coordinación. El Cu(I) es menos estable oxidándose con facilidad a Cu(II) [33, 34]. En general, los haluros forman una amplia variedad de complejos, predominando los iones Cl^- , Br^- y I^- frente al Cu(I), mientras que en el caso del Cu(II) el ligando Cl^- es el más común. Asimismo, para el Cu(II) son más frecuentes los ligandos con O, N y S, mientras que para el Cu(I) son más frecuentes los ligandos con P y S [32].

La estabilidad relativa de ambos estados de oxidación en disolución acuosa viene determinada, en principio, por los siguientes valores de potencial:



De acuerdo con esto, el proceso de dismutación del Cu(I) en agua y la correspondiente constante de equilibrio son los siguientes:



Por tanto, en disolución acuosa sólo pueden existir bajas concentraciones de $\text{Cu}^+_{(\text{aq})}$ ($< 10^{-2}$ M) debido a su tendencia a dismutarse para dar $\text{Cu}^{2+}_{(\text{aq})}$ y el metal libre [33].

El cobre está ampliamente distribuido en la naturaleza y forma parte de la mayoría de los organismos vivos. Aunque puede encontrarse en forma elemental, comúnmente, está presente en minerales que contienen sulfuros, arsénidos, cloruros y carbonatos [35]. Aparte, el Cu se emplea principalmente en la plomería y en las industrias eléctrica y electrónica. Algunos compuestos de Cu son también usados como componentes de fungicidas e insecticidas, como pigmentos y como catalizadores en diversas industrias. La mayor fuente de contaminación ambiental por Cu es, precisamente, la minería para su extracción. El Cu liberado al ambiente, generalmente se adhiere a la materia orgánica del suelo y en sedimentos. Sin embargo, algunos compuestos de cobre son solubles por lo cual puede encontrarse también en el agua [36]. Además, se puede encontrar en el aire, liberado por procesos naturales (tormentas de polvo o incendios forestales) o por procesos antropogénicos como la actividad industrial o minería.

Por otro lado, el cobre es un elemento esencial del metabolismo humano y es necesario como micronutriente para los seres humanos, animales y plantas, jugando un papel importante en diversas funciones enzimáticas; sin embargo, tanto su exceso como su déficit producen una variedad de efectos tóxicos. Las concentraciones de cobre fuera del intervalo de esencialidad se asocian con el aumento de estrés oxidativo [37]. De manera de ejemplo, la concentración promedio de cobre en aguas naturales de ríos, lagos y océanos, es de 4-10 $\mu\text{g l}^{-1}$ [38]. No obstante, mediante procesos biológicos el cobre puede ser bioacumulado por los organismos vivos aumentando su concentración en varios órdenes de magnitud respecto a nivel fisiológico. Cabe señalar que los organismos marinos han desarrollado varias estrategias adaptativas como lo son la regulación activa de la absorción del metal, la distribución, el metabolismo y su excreción [39]; sin embargo si estas estrategias fallan o hay una ingesta excesiva de Cu, la toxicidad del cobre está directamente relacionada con la actividad de los iones libres del cobre y el ciclo redox Cu(II)/Cu(I). Aunado a esto, se ha observado un efecto sinérgico entre toxicidad de cobre en presencia de otros metales como cadmio, plomo, zinc o mercurio. Es por ello que es importante avanzar el desarrollo de nuevos procedimientos analíticos para la determinación de cobre junto con otros metales pesados en materiales pertenecientes a la cadena alimenticia del hombre.

Plomo

El plomo (Pb) es un metal pesado, que se encuentra localizado en el grupo 14 de la tabla periódica, su número atómico es 82 y su masa atómica es 207.2 g mol^{-1} . El Pb ocupa el 36^{vo} lugar de abundancia en la corteza terrestre. En estado metálico es de color gris azulado, flexible, inelástico y

se funde con facilidad. El Pb posee cuatro isótopos estables ^{204}Pb (1.48 %), ^{206}Pb (23.6 %), ^{207}Pb (22.6 %) y ^{208}Pb (52.3 %) [40]. El Plomo forma compuestos en los que su estado de oxidación es de +2 y +4, el más común de ellos es de +2. Los compuestos de Pb^{4+} presentan enlaces covalentes, mientras que los de Pb^{2+} , son iónicos principalmente. El Pb se encuentra de forma natural en el medio ambiente, y rara vez se encuentra en su estado elemental, sino formando parte de algunos minerales, el más común es el sulfuro de plomo (PbS , galena), y otros minerales de interés comercial como el carbonato de plomo (PbCO_3 , cerusita) y el cromato de plomo (PbCrO_4 , crocoita) [41]. Además de formas inorgánicas, el plomo también forma compuestos organometálicos y de coordinación. El plomo inorgánico (Pb^{2+}) es, en general, muy tóxico para el metabolismo ya que es un inhibidor de enzimas, sin embargo las especies orgánicas, consideradas las especies más tóxicas de este elemento, son los alquilcompuestos con cadenas cortas como el tetraetilo y el tetrametilo de plomo [42].

Entre las principales fuentes de contaminación medioambiental por plomo, destacan la explotación minera, la metalurgia, las actividades de fabricación y reciclaje de pinturas, y la persistencia de alquil-plomo debido a extensivo uso de gasolinas con plomo en el pasado [43]. Más de tres cuartas partes del consumo mundial de plomo corresponden a la fabricación de baterías de plomo-ácido para vehículos de motor. Además, este metal también se utiliza en muchos otros productos, como pigmentos, pinturas, materiales de soldadura, vidrieras, vajillas de cristal, municiones, esmaltes cerámicos y medicamentos tradicionales [44, 45]. Asimismo, puede contener plomo el agua potable transportada a través de tuberías de plomo o con soldadura a base de este metal. En este sentido, las personas pueden verse expuestas al plomo en su trabajo o en su entorno, principalmente a través de la inhalación de partículas de plomo generadas por la combustión de materiales que contiene este metal o por la ingestión de polvo, agua o alimentos contaminados (por ejemplo, alimentos envasados en recipientes con esmalte de plomo o soldados con este metal) [46].

Cabe destacar que el plomo está considerado como uno de los elementos químicos más tóxicos para el hombre, el cual se acumula en los huesos y en el tejido adiposo y es difícil de eliminar de estos depósitos [47-49]. Los niños son especialmente vulnerables a los efectos tóxicos del plomo, llegando a consecuencias graves y permanentes en su salud, afectando en particular al desarrollo del cerebro y del sistema nervioso [50-53]. El plomo también causa daños duraderos en los adultos, por ejemplo aumentando el riesgo de hipertensión arterial y de lesiones renales [54, 55]. En las mujeres embarazadas, la exposición a concentraciones elevadas de plomo puede ser causa de aborto natural, muerte fetal, parto prematuro, bajo peso del niño al nacer y malformaciones del feto [56]. Es por ello, que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha incluido al plomo dentro de una lista de diez productos químicos causantes de graves problemas de salud pública [57]. Asimismo, existen Organismos Normativos Nacionales e Internacionales encargados de regular los niveles máximos de

plomo, por ejemplo la Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996 ha establecido límites máximos permisibles, como promedio mensual, para descargas directas a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal de 1 mg l^{-1} para Pb [58]. En particular, desde noviembre del 2006, la Agencia de Protección Medioambiental (EPA, por sus siglas en inglés) ha regulado el nivel de concentración permitida en dulces de 0.5 a 0.1 mg l^{-1} [59]. Además, la Unión Europea (UE) ha elaborado una propuesta de reglamento para establecer límites de plomo y cadmio en alimentos [60]. En dicho proyecto se establecen límites máximos para distintos alimentos que oscilan entre 0.02 mg/kg (alimentos infantiles, café, té y bebidas refrescantes) y 1.0 mg/kg (pescados: moluscos bivalvos y crustáceos) [60]. Es por ello que es importante avanzar el desarrollo de nuevos procedimientos analíticos para la determinación de concentraciones totales de plomo en matrices tales como alimentos o bebidas.

I.1.3. Herramientas analíticas utilizadas en estudios metalómicos

Como ya se ha mencionado, las herramientas analíticas utilizadas en los estudios metalómicos abarcan diferentes técnicas de separación y sus acoplamientos principalmente con espectrometría de masas atómica y molecular. En este sentido, la capacidad analítica de un equipo de espectrometría de masas (MS) depende de su configuración y en particular, del tipo de fuente de ionización, y del separador de masas. Cuando se utiliza una fuente de iones muy energética, como es por ejemplo el plasma de argón acoplado inductivamente, se producen principalmente iones positivos con carga +1 de átomos (metales, metaloides y algunos no-metales). Por su parte, las fuentes de ionización suave tales como ionización por electronebulización (ESI) o desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) producen iones de moléculas sin o con muy poca fragmentación y además se pueden formar aductos de estos iones. Existen también dispositivos de ionización de carácter intermedio, donde la fragmentación de moléculas es mayor respecto a ESI o MALDI, tal es el caso de ionización por impacto de electrones (EI) o, con mucho menor fragmentación de iones, ionización química (CI). Entre diferentes tipos de separadores de m/z , cuadrupolo y trampa iónica operan como filtros de iones, mientras que los separadores de tipo sector de campo magnético y/o electrostático y de tiempo de vuelo funcionan como analizadores. Hoy en día, la configuración del sistema de ionización y separación de masas permite repetir el ciclo de ruptura de los iones produciendo sus fragmentos lo que se denomina espectrometría de masas en tándem MS/MS y permite obtener información estructural más completa.

Dependiendo de la configuración del instrumento, MS provee información cualitativa y cuantitativa sobre composición atómica y molecular de la muestra, incluyendo la capacidad de caracterización estructural de los compuestos.

La principal ventaja de espectrometría de masas atómica es su capacidad de cuantificación de metales, metaloides y algunos no-metales con muy alto poder de detección, amplio intervalo de linealidad, prácticamente sin interferencias químicas y con capacidad isotópica. En el caso de espectrometría de masas molecular, además de su posibilidad del análisis cuantitativo, se obtiene la caracterización estructural mediante la medición de la masa exacta de especies moleculares, su padrón isotópico y padrones de fragmentación. Gracias a su excepcional selectividad, se pueden caracterizar/cuantificar varios compuestos presentes en una sola muestra; sin embargo, la importante limitación en este caso es el efecto de la matriz de muestra sobre eficacia de ionización, la necesidad de utilizar equipos de alta resolución para poder distinguir entre iones con muy similares valores m/z y también imposibilidad de distinguir entre isómeros ópticos o geométricos de compuestos. Para eliminar al menos parcialmente estos problemas, se realiza una etapa previa de tratamiento de muestra y separación de compuestos de interés antes de la introducción de la muestra al espectrómetro de masas.

En este contexto, la sensibilidad analítica para los elementos metálicos (incluidos los metaloides) puede llevarse a cabo obteniendo niveles de ppt o sub-ppt si se utiliza la espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Sin embargo, la información directa para los elementos obtenidos por ICP-MS es solo su información de concentración total, ya que la información molecular se pierde porque las especies químicas se descomponen en el plasma de argón a alta temperatura (alrededor de 7000 - 8000 K). Además, en análisis biológicos y ambientales, la información de las especies químicas o moleculares es generalmente más importante que la de las concentraciones totales de los elementos, porque la toxicidad para los sistemas biológicos depende de sus formas químicas. Por ejemplo, es bien sabido, que el arsénico inorgánico (arsenito y arsenato) es tóxico y/o cancerígeno, mientras que los arsenicales metilados son menos tóxicos [61]. En el caso del cromo, bajas concentraciones de Cr(III) favorecen el metabolismo de glucosa y triglicéridos, pero el Cr(VI) es tóxico debido a su fuerte carácter oxidante. También, la sustancia causal de la enfermedad de Minamata era metilmercurio, no mercurio inorgánico. Por lo tanto, la identificación y cuantificación de especies químicas, incluidos los estados de oxidación de los elementos, son realmente necesarios para dilucidar sus funciones y actividades biológicas/fisiológicas en los sistemas biológicos. La tecnología analítica para la identificación y cuantificación de especies químicas se define como especiación química [62-65].

A lo largo de varias décadas, se han desarrollado numerosos procedimientos analíticos para la especiación química y se han aplicado ampliamente para la elucidación de las formas químicas e incluso para biometales [62-66]. En la Fig. 2 se puede observar que los sistemas analíticos para especiación química generalmente consisten de tres partes principales: la separación, la

detección/cuantificación y la identificación de especies químicas. Hoy en día, se puede seleccionar una variedad de métodos de separación, dependiendo de los tipos de especies químicas, desde moléculas pequeñas hasta moléculas grandes (proteínas y otros biopolímeros), así como de sus propiedades químicas. Como método de detección, ICP-MS es el más utilizado. Asimismo, se pueden utilizar espectrómetros de masas de tipo cuadrupolar (Q-MS), con analizador de tiempo de vuelo (TOF-MS) o de sector de campo magnético y/o electrostático (SF-MS).

Como se mencionó anteriormente, ICP-MS proporciona la información del elemento, pero no puede proporcionar la información molecular. Por lo tanto, las especies o moléculas químicas generalmente se identifican haciendo referencia a los tiempos de retención para los compuestos estándar (conocidos) observados en los cromatogramas obtenidos por HPLC-ICP-MS. Por otro lado, MALDI-MS y ESI-MS se utilizan frecuentemente para la identificación directa de especies químicas o moleculares.

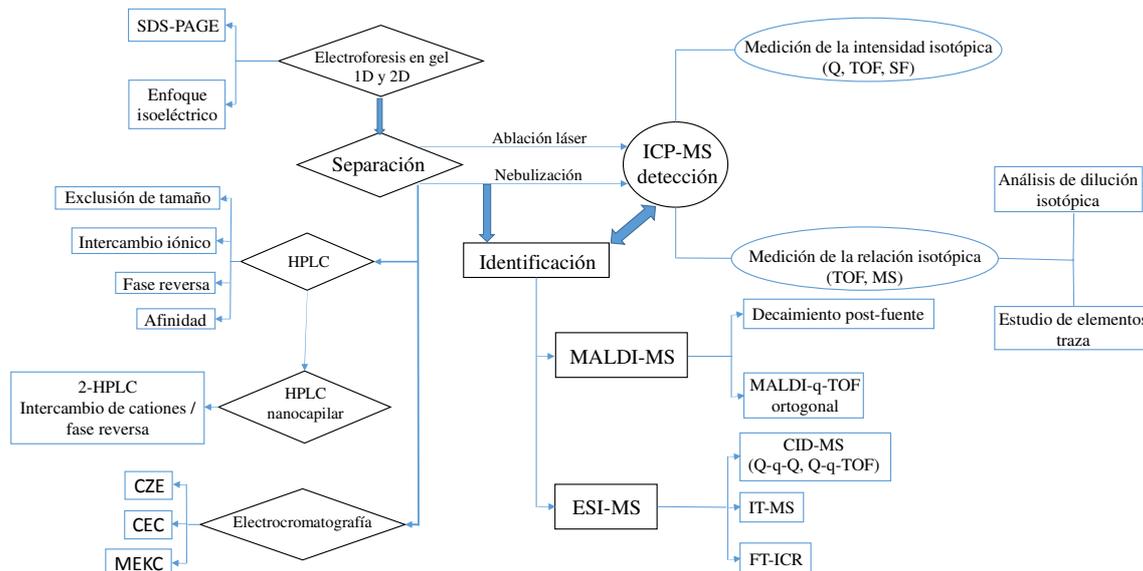


Fig. 2. Procedimientos analíticos empleados en el análisis de especies química [4].

I.1.4. Espectrometrías atómicas

La determinación de metales/metaloides a nivel traza forma una parte importante de los estudios metalómicos y las técnicas de espectrometría atómica son frecuentemente empleadas para este propósito. La espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es la técnica más poderosa y ampliamente aceptada debido a su capacidad para el análisis multielemental, su alta selectividad y sensibilidad tanto como su fácil acoplamiento con diferentes técnicas de separación. Algunas aplicaciones de esta técnica incluyen la determinación de los elementos totales presentes en pequeñas cantidades en alimentos, muestras medioambientales,

biológicas o clínicas, lo que proveen la información necesaria respecto a la ingesta diaria, la acumulación, distribución y la excreción de los elementos en los organismos vivos. Los estudios de especiación realizados mediante esta técnica han sido de gran ayuda para la determinación del proceso de farmacocinética de algunos elementos terapéuticos y también para elucidación del metabolismo de metales/metaloides en organismos vivos y de mecanismos moleculares responsables de sus efectos benéficos y/o tóxicos [67-71].

ICP-MS es una técnica analítica descubierta a principios de 1980 y la cual es aplicada para la determinación de elementos traza y ultra-traza, con límites de detección del orden de partes por trillón, capacidad multielemental e isotópica, amplio intervalo de linealidad y muy pocas interferencias químicas [67, 69, 70]. Por otro lado, además de alto costo de operación, un punto débil de ICP-MS son interferencias espectrales causadas por especies isobáricas, iones poliatómicos, iones de doble carga u óxidos. Utilizando el cuadrupolo como filtro, la resolución es baja (típicamente una unidad de masa atómica) e insuficiente para distinguir iones interferentes de los analitos; típica estrategia para eliminar interferencias poliatómicas se basa en tecnología de celdas de colisión/reacción, por ejemplo la celda de tipo octapolo (ORC). En este dispositivo, un octapolo transmite el haz de iones y de manera perpendicular se hace pasar un flujo de gas; típicamente helio para colisiones o hidrógeno para reacciones. En la modalidad de colisión, los iones poliatómicos de mayor tamaño sufren colisiones con mayor frecuencia que los iones atómicos más pequeños, perdiendo de esta manera parte de su energía cinética. Al aplicar una barrera de potencial a la salida de la celda, los iones con menor energía cinética son eliminados. En el modo de reacción, los iones poliatómicos son disociados, o se modifica su relación m/z al colisionar y reaccionar con gas en la celda (hidrógeno).

Para el análisis de especiación, es necesaria la separación previa de los compuestos antes de su introducción al ICP-MS que debido a sus características analíticas se ha convertido en la herramienta más empleada en estudios de especiación química. Hay que señalar también el fácil acoplamiento de ICP-MS con diferentes tipos de técnicas de separación cromatográficas y electroforéticas.

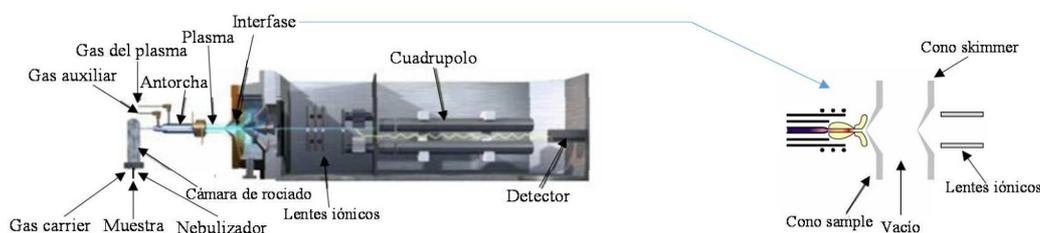


Fig. 3. Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente como fuente de ionización, equipado con filtro de masas tipo cuadrupolo. Se aprecia un acercamiento a la interfase existente entre deionización a presión atmosférica y las condiciones de vacío interior.

En la Fig. 3 se muestra el esquema de un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente como fuente de ionización y equipado con un filtro de masas tipo cuadrupolo, se puede observar que la interface debe permitir la entrada de los iones generados bajo condiciones de presión atmosférica, hacia el alto vacío requerido para la transmisión, separación y detección de los iones formados. Esto se logra a través de 2 conos metálicos con aberturas en la punta, llamados “sampling cone” y “skimmer cone”, la abertura del primero es típicamente de 1 mm de diámetro, mientras que en el segundo es de 0.4 mm. Los iones y moléculas provenientes del plasma que atraviesan los conos, entran con una temperatura muy alta y al enfriarse, se contraen ayudando a sostener el vacío. Una vez dentro del espectrómetro de masas, los iones son conducidos por una serie de lentes iónicas hacia la zona de alto vacío donde se introducen a un filtro o analizador de masas, el cual separa o filtra los iones de acuerdo a su relación m/z . Posteriormente son detectados y registrados por un transductor electrónico [69].

Sin embargo y a pesar de las ventajas de la técnica de ICP-MS en términos de alta selectividad y alto poder de detección, en el área de la metalómica, también hay un interés específico en el desarrollo de herramientas analíticas, menos susceptibles a efectos de memoria (relacionados con el sistema de introducción de muestra), fáciles de realizar, de alto rendimiento y económicas. Una opción más económica y con mayor compatibilidad con altas concentraciones de disolventes orgánicos y altas concentraciones de sales es el uso de la espectrometría de emisión atómica de plasma por microondas (MP-AES).

Un espectrómetro de emisión atómica con plasma de nitrógeno sostenido por microondas, en particular el de Agilent MP-AES 4100, tiene distintas ventajas sobre equipos que emplean ICP (OES y MS) y sobre espectrómetros de absorción atómica. El MP-AES no requiere del uso de gases inflamables, tóxicos, u oxidantes como el oxígeno, utilizado para crear la flama como ocurre en procedimientos basados en espectrometría de absorción atómica por llama (FAAS). Además, el plasma de microondas excitado magnéticamente proporciona mejor sensibilidad, rango dinámico lineal, límites de detección y velocidad de análisis que FAAS y tiene la capacidad de realizar análisis multi-elementales superando en este aspecto todas las técnicas de absorción o fluorescencia atómica. Asimismo, a diferencia de ICP que utiliza Ar para la generación del plasma, el MP-AES utiliza plasma sostenido por nitrógeno, disminuyendo drásticamente los costos de operación. Incluso, se han realizado estudios satisfactorios de esta técnica en aplicaciones para la industria minera, de alimentos, en agricultura, química y petroquímica [72].

Como ya se ha mencionado, el MP-AES funciona mediante un plasma estable que es sustentado por energía de microondas. Esto proporciona la posibilidad de procesar fácilmente matrices complejas, como sustancias con un alto contenido de sólidos, combustibles y compuestos

orgánicos [73]. Para formar el plasma, el equipo cuenta con un alimentador de corriente de alto voltaje con una potencia fija de 1 kW, y de un magnetrón de 2.45 GHz que son utilizados para generar un campo electromagnético. Una guía de microondas concentra este campo magnético axial y el campo eléctrico alrededor de la antorcha (Fig. 4 A), enfocando la energía de microondas en esta zona para la generación del plasma y su sostenimiento. Un generador de nitrógeno alimenta el plasma de microondas evitando el uso de fuentes adicionales de gas. El efecto superficial del campo magnético producido por el magnetrón provoca que el plasma adopte una forma toroidal y se hace posible la introducción de muestras líquidas por el canal central directamente al interior del plasma, facilitando de esta manera los procesos de descomposición, atomización y excitación. Para la ignición del plasma se utiliza un flujo momentáneo de Ar de 1.5 l min^{-1} a 210 kPa, sin embargo, cada ciclo de ignición utiliza únicamente $\sim 75 \text{ ml}$ de argón pues una vez que el plasma está operando, automáticamente el flujo de argón cambia a nitrógeno para el sostenimiento del plasma [74]. El plasma de microondas de nitrógeno alcanza una temperatura promedio cercana a los 5 000 K. A esta temperatura, la emisión atómica es intensa para la mayoría de los elementos dando como resultado buena capacidad de detección [75-78]. El plasma está orientado verticalmente para mejorar el análisis de muestras complejas e incluye un sistema de visualización axial para lograr una alta sensibilidad y mejores límites de detección, mismos que se optimizan para cada longitud de onda.

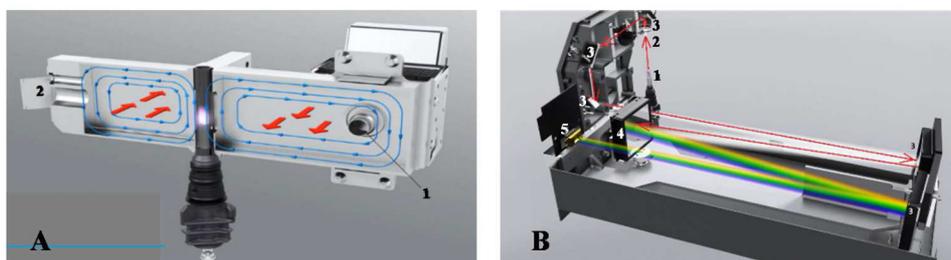


Fig. 4. (A) Esquema interno de generación del plasma en el MP-AES Agilent 4100. Líneas azules: campo magnético. Líneas rojas: campo eléctrico. 1: Magnetron de 2.45 GHz. 2: Orientador de microondas; (B) Esquema interno del sistema óptico del MP-AES Agilent 4100.

Como ya se ha mencionado antes, el MP-AES posee un sistema pre-óptico que enfoca la radiación emitida por los átomos excitados del plasma, para permitir su observación axial como muestran las flechas rojas en la Fig. 4A, donde se muestra el paso óptico. El MP-AES cuenta con un monocromador (diseño Czerny-Turner) (Fig. 4A), con 600 mm de longitud focal y una rendija de difracción holográfica con $2\,400 \text{ líneas mm}^{-1}$. Las longitudes de onda a las que funciona el sistema óptico están en el rango de 178 - 780 nm. Asimismo, MP-AES cuenta con un detector de tipo dispositivo de acoplamiento de carga (por sus siglas del inglés Charge coupled device – CCD) en estado sólido (Fig. 4A) sensible a longitudes en la región UV. Tiene una resolución de 532×128

pixeles, diseñado especialmente para detección de bajas intensidades de radiación con >90 % de eficiencia cuántica de sensibilidad de pico. El arreglo del detector CCD almacena el espectro del (los) analito(s) y el fondo espectral vecino, permitiendo una corrección simultánea del fondo[73].

MP-AES también puede ser acoplada, con facilidad, a diferentes técnicas de separación lo que posibilita la realización de análisis de especiación química conservando las ventajas de poder trabajar con altas concentraciones de disolventes orgánicos y altas concentraciones de sales en comparación de ICP-MS.

I.1.4. Espectrometría de masas con ionización suave

ESI-MS y MALDI-MS son las dos principales técnicas utilizadas en espectrometría de masas con ionización suave, y en las cuales se enfocó el presente trabajo de tesis, utilizándolas en el modo de introducción directa de la muestra. Esto debido a que el trabajo de tesis ha sido enfocado en el desarrollo de procedimientos simples, rápidos, en escala micro, utilizando principios de la química verde y económicamente viables para tener una alternativa a espectrometrías atómicas. A continuación, se describen estas dos técnicas en función de su proceso de ionización el cual representa la parte esencial de estas espectrometrías de masas.

Ionización por electronebulización (ESI). ESI es una técnica de ionización a presión atmosférica, producen la cual se aplica un fuerte campo eléctrico a una solución del analito que pasa a través de un tubo capilar con bajo flujo (normalmente $1 - 10 \mu\text{l min}^{-1}$). El campo eléctrico se obtiene aplicando una diferencia de potenciales de $3 - 6 \text{ kV}$ entre el capilar y el contraelectrodo, separados por $0.3 - 2 \text{ cm}$, produciendo un campo eléctrico del orden de 10^6 V m^{-1} (Fig. 5). Este campo induce una acumulación de carga en la superficie del líquido ubicada en el extremo del capilar, que se romperá para formar gotas altamente cargadas. Un gas inyectado coaxialmente a baja velocidad de flujo permite que la dispersión de la atomización esté limitada en el espacio. Estas gotas pasan por un flujo de gas inerte (frecuentemente nitrógeno, 180°C), o a través de un capilar caliente para eliminar las últimas moléculas de disolvente [79].

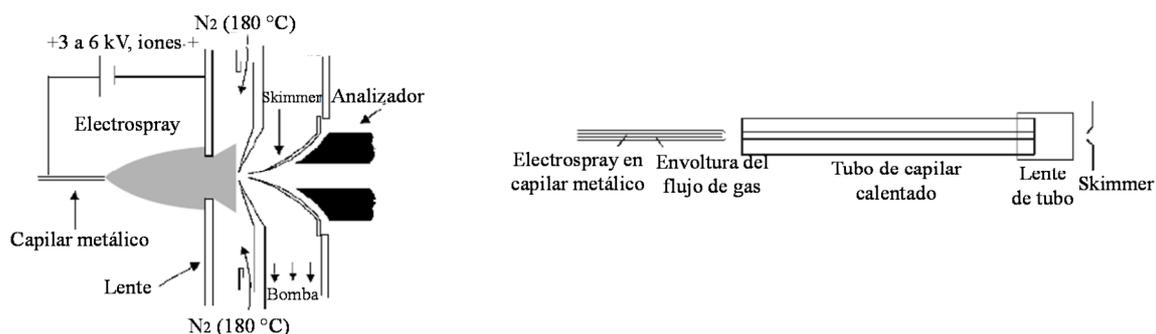


Fig. 5. Diagrama de dispositivos de electronebulización, utilizando skimmers para la focalización iónica y una cortina de gas nitrógeno calentado para la desolvatación (derecha), o con un capilar calentado para la desolvatación (izquierda).

La nebulización comienza mediante un voltaje de inicio, que para una determinada fuente, depende de la tensión superficial del disolvente. De manera de ejemplo, en una fuente en la cual hay un voltaje de inicio de 4 kV para el agua la tensión superficial será 0.073 N m^{-2} , mientras que para un voltaje de 2.2 kV se estima una tensión superficial de 0.023 N m^{-2} para el metanol y con 2.5 kV para el acetonitrilo la tensión superficial es de 0.030 N m^{-2} [80]. Asimismo, si se examina con un microscopio la gota nascente formada en la punta del capilar mientras incrementa el voltaje, se puede observar, que a bajos voltajes, la gota parece esférica, luego se alarga bajo la presión de las cargas acumuladas en la punta del capilar con el campo eléctrico más fuerte; al llegar a cierta tensión superficial, la forma de la gota cambia a una geometría cónica (cono de Taylor) y ocurre su partición [79].

El solvente contenido en las gotas se evapora, lo que hace que las gotas disminuyen su tamaño y que su carga por unidad de volumen aumente. La deformación de las gotas ocurre bajo la influencia de un fuerte campo eléctrico. La gota se alarga bajo la fuerza resultante de la acumulación de carga en la punta del capilar, y finalmente se produce un nuevo cono de Taylor. De este cono de Taylor, son liberadas unas 20 gotas más pequeñas. Normalmente, una gota de primera generación del capilar tendrá un diámetro aproximado de $1.5 \mu\text{m}$ y llevará alrededor de 50 000 cargas elementales o cerca de 10^{-14} C . Las gotas de descendencia tendrán un diámetro de $0.1 \mu\text{m}$ y llevarán de 300 a 400 cargas elementales. El volumen total de las gotas de descendencia es de aproximadamente el 2% de la gota inicial pero contiene el 15% de la carga. La carga por unidad de volumen es así multiplicada por un factor de 7. La gota inicial se reducirá aún más por la evaporación del solvente y producirá otras generaciones de descendencia.

Estas gotas pequeñas y altamente cargadas continuarán perdiendo disolvente, y cuando el campo eléctrico en su superficie se vuelva lo suficientemente grande, ocurrirá la desorción de los

iones de la superficie [80]. Las cargas en exceso se acumulan en la superficie de la gota. En volumen, los analitos y electrolitos cuyas cargas positiva y negativa son iguales en número están presentes a una concentración un poco mayor que en la gota inicial. La desorción de las moléculas cargadas ocurre desde la superficie. Esto significa que la sensibilidad es más alta para compuestos cuya concentración en la superficie es más alta y por lo tanto, más lipófilas. Cuando la gota contiene moléculas muy grandes, como proteínas por ejemplo, las moléculas no se desorberán, sino que se liberarán por evaporación del solvente. Esto parece ocurrir cuando la masa molecular de los compuestos excede de 5000 a 10 000 Da. Los iones obtenidos a partir de moléculas grandes transportan un mayor número de cargas si hay varios sitios ionizables presentes. Normalmente, una proteína tendrá una carga por cada 1000 Da aproximadamente, al menos que existan muy pocos aminoácidos básicos. Las moléculas pequeñas, de menos de mil Dalton, producirán principalmente iones monocargados. ESI también puede usarse en el caso de moléculas sin ningún sitio ionizable a través de la formación de aductos con sodio, potasio, amonio, cloruro, acetato u otros.

ESI tiene características importantes: por ejemplo, es capaz de producir iones con carga múltiple a partir de moléculas grandes. La formación de iones es el resultado del proceso electroquímico y de la acumulación de carga en las gotas. La corriente de ESI está limitada por el proceso electroquímico que se produce en la punta del capilar y es sensible a la concentración más que a la cantidad total de muestra [79].

Además, el análisis por ESI, se puede llevar a cabo en el modo positivo o negativo, dependiendo de las propiedades de los analitos. Aunque en principio, se obtiene el ión de molécula sin fragmentación (protonada o un aducto con catión en el modo positivo), al aumentar el voltaje en la punta del cono del capilar se puede inducir fragmentación de iones (“in-source ionization”) obteniendo espectros MS/MS.

Ionización por desorción con láser asistida por matriz (MALDI). El proceso ocurre en dos pasos; en el primero, el compuesto a analizar se disuelve en un solvente que contiene en solución pequeñas moléculas orgánicas, llamadas matriz. Estas moléculas deben presentar una fuerte absorción de energía emitida por láser. La mezcla muestra-matriz se deposita en una placa y se seca. El resultado es un depósito de matriz-analito co-cristalizados. Las moléculas de analito están integradas en toda la matriz y aisladas entre si.

El segundo paso se lleva a cabo al incidir con intensos pulsos de láser de corta duración sobre el depósito; manteniendo las condiciones del vacío, ocurre ablación del material sólido. El mecanismo exacto del proceso MALDI no está completamente dilucidado [81, 82]; sin embargo se sabe que, la irradiación láser induce un calentamiento rápido de los cristales mediante la acumulación de una gran cantidad de energía en la fase condensada a través de la excitación de las moléculas de la

matriz. El calentamiento rápido provoca la sublimación localizada de los cristales de la matriz, la ablación de una porción de la superficie del cristal y la expansión de la matriz en la fase gaseosa, arrastrando el analito intacto a la fase gaseosa [83]. El proceso de ionización puede ocurrir en condiciones de vacío en cualquier momento durante este proceso, pero el origen de los iones producidos en MALDI todavía no se comprende por completo [84, 85]. La Fig. 6. muestra un diagrama del proceso de ionización por desorción de MALDI.

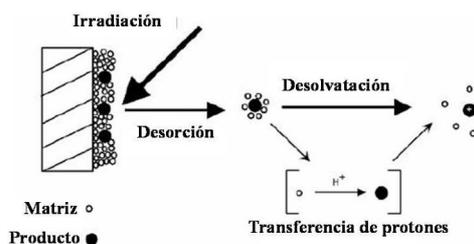


Fig. 6. Esquema del principio de procesos MALDI.

Entre las vías de ionización química y física sugeridas para MALDI se encuentran la fotoionización en fase gaseosa, la transferencia de protones en estado excitado, las reacciones entre ion-molécula, la desorción de iones preformados, etc. El mecanismo de formación de iones más ampliamente aceptado implica la transferencia de protones en la fase sólida antes de la desorción o la transferencia de protones en fase gaseosa en la pluma en expansión a partir de moléculas de matriz fotoionizadas. Los iones en la fase gaseosa son luego acelerados por un campo electrostático hacia el analizador de masas, típicamente del tiempo de vuelo.

MALDI es más sensible que otras técnicas de ionización por láser. Puesto que, el número de moléculas de la matriz excede ampliamente las del analito, las moléculas del analito quedan separadas en la fase sólida evitando la formación de clusters que inhiben la aparición de iones moleculares. La matriz también minimiza el daño de la muestra por los pulsos del láser al absorber la mayor parte de la energía incidente y aumenta la eficiencia de la transferencia de energía del láser al analito. Entonces la sensibilidad (abundancia de iones) también incrementa. MALDI también es más universal que las otras técnicas de ionización por láser; en primer lugar porque la energía de laser es absorbida por la matriz química y no directamente por el/los analitos. Dado que el proceso es independiente de las propiedades de absorción y del tamaño molecular del compuesto a analizar, MALDI permite la desorción e ionización de analitos en un amplio intervalo de masas moleculares hasta cientos de kDa. Por ejemplo, MALDI permite la detección de femtomoles de proteínas con masa molecular de hasta 300 000 Da [86, 87].

La espectrometría de masas MALDI se ha convertido en una poderosa herramienta analítica para polímeros sintéticos y biopolímeros [88]. Los espectros MALDI típicos incluyen principalmente la especie molecular monocargada por protonación en modo de iones positivos. Los compuestos

desprotonados más fácilmente se detectan generalmente en modo de iones negativos. En el espectro pueden observarse también algunos iones con carga múltiple, algunos multímeros y muy pocos fragmentos. Los compuestos que no son fácilmente protonados pueden ser cationizados, frecuentemente añadiendo una pequeña cantidad de cationes alcalinos, de cobre o de plata a la muestra.

El uso de MALDI para obtener imágenes de materiales biológicos es otra aplicación interesante [89, 90]. De hecho, MALDI se ha utilizado para mapear la distribución de biomoléculas específicas en tejidos; permite, por ejemplo, el estudio de péptidos, proteínas y otras biomoléculas directamente en secciones de tejido.

A diferencia de la mayoría de otras fuentes de ionización que producen un haz de iones continuo, MALDI es una técnica de ionización pulsada que produce iones en haces mediante un proceso intermitente. La naturaleza pulsada de la fuente MALDI es muy adecuada para el analizador de tiempo de vuelo (TOF). Además, el analizador TOF tiene la capacidad de analizar iones en un amplio rango de masa y, por lo tanto, puede analizar los iones de gran masa generados por MALDI. En conjunto, esto explica por qué la mayoría de los espectros MALDI se han obtenido con espectrómetros MALDI-TOF. Sin embargo, no existe una razón fundamental para limitar el uso de fuentes MALDI con los analizadores TOF. Las fuentes MALDI también se han acoplado a otros analizadores de masas, como los espectrómetros de masas de trampa de iones o con transformada de Fourier.

Por otro lado, entre los diferentes láseres utilizados en MALDI, los láseres UV son los más comunes debido a su facilidad de operación y su bajo precio. Los láseres de N_2 ($\lambda = 337$ nm) se consideran estándar, aunque también se usan láseres Nd:YAG ($\lambda = 266$ o 355 nm). MALDI también puede usar láseres IR como Er: YAG lasers ($\lambda = 2.94$ μm) o láseres de CO_2 ($\lambda = 10.6$ μm). En la Tabla 1 se presenta un resumen de las longitudes de onda del láser y las amplitudes de pulso utilizados habitualmente para MALDI. No es la densidad de potencia el parámetro más importante para producir una corriente de iones significativa, sino la energía total en el pulso del láser a una longitud de onda dada [91]. En general, la densidad de potencia requerida corresponde a un flujo de energía de 20 mJ cm^{-2} . La duración de pulso de los láseres varían de unas pocas decenas de nanosegundos a unos pocos cientos de microsegundos. El diámetro del haz láser en la superficie de la muestra varía de 5 a 200 μm . Es importante determinar el umbral de irradiación y la potencia del pulso del láser que da como resultado el inicio de la desorción de la matriz. Las especies moleculares del analito generalmente se observan con irradiaciones ligeramente altas, pero una mayor potencia del láser conduce a una fragmentación más extensa e induce una pérdida de resolución de masa.

Tabla 1. Algunos láseres comunes utilizados para MALDI.

Láser	Longitud de onda	Energía (eV)	Duración de pulso
Nitrógeno	337 nm	3.68	< 1 ns a pocos ns
Nd: YAG μ 3	355 nm	3.49	5 ns
Nd: YAG μ 4	266 nm	4.66	5ns
Er: YAG	2.94 μ m	0.42	85 ns
CO ₂	10.6 μ m	0.12	100 nm + 1 μ s

Los espectros MALDI obtenidos con láser UV o IR son esencialmente idénticos para la mayoría de las muestras analizadas, aunque láseres IR ofrecen espectros más simples y con menor intensidad de señales.

La selección de la matriz y la optimización del protocolo de preparación de la muestra son los pasos más importantes en el análisis porque la calidad de los resultados depende de una buena preparación de la muestra. Sin embargo, los procesos de preparación aún son empíricos. La selección de la matriz MALDI se basa en la longitud de onda del láser utilizada. Además, la eficacia de matriz depende del tipo de analito y puede diferir entre los analitos que tienen estructuras aparentemente similares. Las matrices MALDI deben cumplir una serie de requisitos simultáneamente. Estas son: una fuerte absorción del haz de láser, una masa lo suficientemente baja como para ser sublimable, estabilidad al vacío, la capacidad de promover la ionización del analito, la solubilidad en solventes compatibles con el analito y la falta de reactividad química. Sin embargo, estas características generales para la selección de una matriz son difíciles de cumplir y no son suficientes. De hecho, se ha estudiado una gran cantidad de compuestos como posibles matrices y se ha ejemplificado su capacidad para funcionar como una matriz MALDI, pero solo muy pocas han resultado ser buenas matrices para varios grupos de los analitos. Las matrices UV-MALDI más comunes se enumeran en la Tabla 2 con el tipo de compuestos para los que son recomendadas. Las matrices utilizadas con láser IR, tales como urea, ácidos carboxílicos, alcoholes e incluso agua, mientras que las matrices UV-MALDI deben ser altamente aromáticas. [92].

Tabla 2. Algunas matrices UV-MALDI más comunes.

Analito	Matriz	Abreviación
Péptidos/proteínas	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico	HCCA
	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	DHB
	Ácido 3,5-dimetoxi-4 hidroxicinámico	SA
Oligonucleótidos	Trihidroxiacetofenona	THAP
	Ácido 3-hidroxipicolínico	HPA
Carbohidratos	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico	DHB
	Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico	HCCA
	Trihidroxiacetofenona	THAP
Polímeros sintéticos	Ácido trans-3-indoleacrílico	IAA
	Ditranol	DIT

	Ácido 2,5-dihidroxi benzoico	DHB
Moléculas orgánicas	Ácido 2,5-dihidroxi benzoico	DHB
Moléculas inorgánicas	Trans-2-(3-(4-tert-butilfenil)-2-metil-2 propenylidene)malononitrilo	DCTB
Lípidos	Ditranol	DIT

Se han descrito diferentes métodos de preparación de muestra para MALDI [93, 94]. El método más ampliamente utilizado se ha llamado gota seca (dried-droplet), el cual consiste en mezclar una solución de matriz saturada (1-5 μ l) con un volumen muy pequeño (1-2 μ l) de una solución de analito/muestra. Luego, se coloca una gota (0.5-2 μ l) de la mezcla resultante en un pocillo de la placa MALDI. La gota se seca a temperatura ambiente y cuando el líquido se ha evaporado por completo para formar cristales, la muestra está lista para su introducción al espectrómetro de masas.

MALDI presenta algunas desventajas, como una baja reproducibilidad de disparo a disparo y una fuerte dependencia del método de preparación de la muestra. Cada disparo de láser elimina alguna capa del depósito en el lugar donde el láser irradia. Esto puede producir variación en la adquisición de varios espectros de una misma muestra. Además, la posición de impacto en la superficie del depósito puede conducir a variaciones de señales adquiridas. Una mejor homogeneidad del depósito proporciona una mejor reproducibilidad de la señal. Esto es muy importante si se quieren obtener resultados cuantitativos. La mantener la misma posición del impacto de láser, la muestra puede agotarse después de aproximadamente 50 disparos, pero unos pocos disparos de láser suelen ser suficientes para adquirir un espectro razonable. Cuando se necesita una señal intensa y estable, la placa MALDI se mueve durante la adquisición del espectro para exponer continuamente la muestra fresca al punto de irradiación del láser.

MALDI es relativamente menos sensible a la contaminación por sales, tampones, detergentes, etc. en comparación con otras técnicas de ionización y, lo que es importante en el contexto de este trabajo, no se presentan efectos de memoria [93]. El analito debe incorporarse a los cristales de la matriz. Este proceso generalmente puede servir para separar en fase sólida el analito de los contaminantes. Sin embargo, las altas concentraciones de tampones y otros contaminantes comúnmente encontrados en las soluciones de analito pueden interferir con el proceso de desorción e ionización de las muestras. En este sentido, la purificación previa para eliminar los contaminantes conduce a una mejora en la calidad de los espectros de masas. Por ejemplo, la eliminación de iones alcalinos ha demostrado ser muy importante para lograr una alta eficiencia de desorción relativa simplicidad de los espectros.

La modificación en las superficies derivadas de las placas utilizadas en MALDI ha permitido la introducción de nuevas técnicas, como la ionización por desorción láser mejorada en superficie (SELDI, por sus siglas en inglés, Surface-enhanced laser desorption ionization) [95]. La superficie

de la placa MALDI desempeña un papel activo en la unión del analito mediante interacciones hidrofóbicas o electrostáticas, mientras que los contaminantes se eliminan por enjuague.

CAPÍTULO II

II.1. Objetivo general

Avanzar en el conocimiento sobre concentraciones de metales/metaloides y sus especies potencialmente disponibles para organismos vivos a partir de diferentes tipos de muestras, mediante desarrollo y aplicación de procedimientos analíticos.

II.2. Objetivos particulares

1. Afinar procedimiento analítico de determinación de metilmercurio y mercurio inorgánico por cromatografía de líquidos acoplada con ICP-MS, para su aplicación en el análisis de tejido de pescado y atún enlatado.
2. Elucidar mecanismo de reducción de Cr(VI) por el ácido oxálico en presencia de ion manganeso, mediante el desarrollo y aplicación de diferentes procedimientos analíticos.
3. Desarrollar procedimientos analíticos basados en el uso de espectrometría de masas con ionización suave, para la determinación de trazas de metales contaminantes en alimentos y bebidas.

CAPÍTULO III. Parte experimental

A continuación, se presentan los materiales, reactivos, equipos y softwares utilizados durante el desarrollo del presente trabajo de tesis:

III.1. Material y reactivos

Reactivos

- ❖ Metanol grado LC-MS (Sigma, Milwaukee, USA).
- ❖ Acetonitrilo Grado HPLC.
- ❖ Tolueno, Sigma-Aldrich.
- ❖ Acetona, Sigma.
- ❖ Ciclohexano, sigma.
- ❖ Cloroforma, Sigma.
- ❖ Trietilamina, Fluka.
- ❖ Dicromato de potasio, Sigma.
- ❖ Sulfato de manganeso, Sigma.
- ❖ Hidróxido de sodio, Sigma.
- ❖ Hidróxido de potasio, Sigma.
- ❖ Ácido oxálico, Sigma.
- ❖ Ácido fórmico, Sigma.
- ❖ Ácido nítrico, Fluka.
- ❖ Ácido perclórico, Baker.
- ❖ Ácido clorhídrico, Merck.
- ❖ Ácido trifluoroacético (TFA), Sigma.
- ❖ Yoduro de mercurio, Sigma.
- ❖ Cloruro de mercurio, Sigma.
- ❖ Nitrato de bismuto, Sigma.
- ❖ Nitrato de indio, Sigma.
- ❖ Nitrato de plata, Sigma.
- ❖ Nitrato de plomo, Sigma-Aldrich.
- ❖ Sulfato de cobre, Sigma-Aldrich.
- ❖ Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA), Sigma.
- ❖ Ditizona, Sigma.
- ❖ Formiato de amonio, Sigma.
- ❖ Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Sigma.

- ❖ L-cisteína, Sigma-Aldrich.
- ❖ N-acetilcisteína, Sigma-Aldrich.
- ❖ Dietilditiocarbamato de sodio (NaDDTC), Sigma
- ❖ Material de referencia certificado DORM-2 (dogfish muscle), Consejo Nacional de Investigación, Canada.
- ❖ Mezcla de estándares internos de espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), Agilent Technologies.

Material

- ❖ Vasos de precipitado.
- ❖ Tubos de ensayo.
- ❖ Tubos eppendorf de 1.5 y 2.0 ml.
- ❖ Tubos falcon de 15 y 50 ml.
- ❖ Agitadores magnéticos.
- ❖ Agitador de vidrio.
- ❖ Celdas de cuarzo 1 ml UV-Vis.

III.2. Instrumentación analítica y equipos.

- ❖ Espectrofotómetro Spectronic 3000 Diode Array Milton Roy (resolución 0.35 nm, Milton Roy Inst. Co.).
- ❖ Espectrómetro de emisión atómica con excitación en plasma de microondas, modelo 4100 MP-AES, Agilent Technologies.
- ❖ Cromatografo de líquidos de alta resolución espectrofotométrica de arreglo de diodos (HPLC series 1200, Agilent Technologies).
- ❖ Espectrómetro de masas: maxis impact ESI-QTOF-MS equipado con Data Analisis 4.1, Bruker Daltonics.
- ❖ El espectrómetro de masas: ICP-MS modelo 7500ce de Agilent Technologies (Tokio, Japón).
- ❖ Sistema de digestión por microondas, Discover SP-D (CEM).
- ❖ Espectrómetro de masas: MALDI-TOFMS modelo AutoFlex speed de Bruker Daltonics.

III.3. Softwares y programas

- ❖ Microsoft Excel 2010.
- ❖ The Unscrambler (CAMO).

- ❖ FlexControl 3.4 de Bruker Daltonics.
- ❖ FlexAnalysis 3.4 de Bruker Daltonics.
- ❖ Data analysis 4.1 de Bruker Daltonics.
- ❖ Offline Data analysis de Agilent Technologies.
- ❖ Chromatographic Data analysis de Agilent Technologies.
- ❖ GRAMS AI.

CAPÍTULO IV. Resultado y Discusión

IV.1. Mecanismo de reducción de cromo hexavalente(VI) por ácido oxálico en presencia de manganeso(II).

IV.1.1. Introducción

Los procesos de reducción de Cr(VI) han sido estudiados extensivamente; sin embargo, aún muy poco se sabe sobre las especies de cromo intermediarias formadas durante dicha reducción. Como una parte del proyecto de tesis, se propuso estudiar el ácido oxálico como donador de electrones y estudiar el mecanismo de reacción en presencia de ión Mn(II) como un posible catalizador.

Los estudios mecanísticos, centrados en la reducción de cromo hexavalente a cromo trivalente frecuentemente se han llevado a cabo y ahora está bien establecido que la ruta específica por la cual ocurre la transferencia de tres electrones, depende de la identidad y disponibilidad de agentes reductores, condiciones de pH y también de la presencia de especies co-reductoras [96, 97]. Los resultados obtenidos en estos estudios han sido de gran importancia en química orgánica, porque algunos tipos de intermediarios de cromo (Cr(V) o Cr(IV)) actúan como oxidantes o catalizadores de varias reacciones [98, 99]. En particular, el ácido oxálico ha servido como una molécula prototipo para estudiar la oxidación de compuestos orgánicos por ácido crómico, y el rol catalítico de Mn(II) en estas reacciones ha sido reportado [100, 101]. Por otra parte, la reducción de Cr(VI) en condiciones fisiológicas es de alta relevancia biológica, porque las especies intermediarias formadas en el transcurso de este proceso, promueven el estrés oxidativo y el daño al ADN [102, 103]. Uno de los aspectos más estudiados es la remediación del medioambiente contaminado por Cr(VI), y en este campo también es necesario el entendimiento detallado de los mecanismos de reducción de cromo a fin de asegurar eficiente conversión de Cr(VI) a Cr(III) y, subsecuentemente, la estabilización/eliminación de Cr(III) por su sorción sobre fase sólida o como precipitado de Cr(OH)₃ [104, 105]. En este sentido, la factibilidad de los ácidos orgánicos como donadores de electrones durante la reducción de Cr(VI) se ha estudiado en soluciones modelo, en suelos [106-109] y en cultivos microbiológicos [110]. Se ha demostrado que los ácidos cítrico, tartárico, salicílico, ascórbico y oxálico son capaces de reducir Cr(VI) lentamente en condiciones ligeramente ácidas (pH 3-5); sin embargo, los procesos pueden ser acelerados con la presencia de agentes co-reductores adecuados y/o iones de metales de transición que pueden ciclar entre sus dos estados de oxidación (por ejemplo Fe(III)/Fe(II)) [105, 111-113]. Específicamente, la acción catalítica de manganeso divalente (Mn(II)) durante la reducción de Cr(VI) por ácidos cítrico, ascórbico y tartárico se ha reportado en estudios llevados a cabo en modelos abióticos y en suelo a pH < 5 [105, 114].

La espectrofotometría UV/Vis y espectroscopia de resonancia paramagnética electrónica fueron las primeras herramientas analíticas que se utilizaron para estudiar el mecanismo de reducción de Cr(VI) [105, 111, 113-116]. En estudios más recientes, se han empleado además las técnicas de resonancia magnética nuclear, espectroscopia de absorción de rayos-X y espectrometría de masas debido a su capacidad de la caracterización estructural específicamente de intermediarios de reacción durante la reducción de Cr(VI) [114-119]. En particular, de especies polares y/o cargadas la espectrometría de masas con ionización por electronebulización (ESI-MS) y espectrometría de masas en tándem (MS)ⁿ proporcionan información de masa exacta, padrón isotópico y patrón de fragmentación molecular, requeridas para su identificación inequívoca. A diferencia de otras técnicas con capacidad de caracterización estructural, la espectrometría de masas ofrece un análisis rápido y simultáneo de varios intermediarios reactivos de vida corta presentes en la mezcla de reacción sin requerimiento de su separación/aislamiento. Gracias a la excepcional selectividad de instrumentos de alta resolución, la solución puede ser introducida por infusión directa, y los cambios de intensidad para iones individuales pueden ser monitoreados en tiempo real y simultáneamente para varias especies. Cabe destacar que en fuente de ionización suave (ESI), los iones intactos pasan de la solución a la fase gaseosa, mientras especies polares se convierten en sus iones protonados sin alteración de los enlaces covalentes existentes e interacciones fuertes no covalentes [120, 121].

En el presente trabajo se utilizaron diferentes herramientas analíticas, con el fin de obtener una mayor comprensión del mecanismo de reducción de Cr(VI) por ácido oxálico en presencia de manganeso divalente. Esta reacción ha sido estudiada en diferentes contextos fisicoquímicos; sin embargo, el mecanismo preciso responsable del efecto favorable de manganeso en el curso de reducción de Cr(VI), aun no es claro [100, 122]. Cabe destacar que, para tener consistencia, se utilizaron técnicas instrumentales basadas en diferentes principios físicoquímicos lo que proporcionó buena confiabilidad del modelo propuesto. En particular, se ha utilizado una combinación de espectrofotometría UV/Vis, cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica y espectrometría de emisión atómica, por primera vez en un estudio del mecanismo de reducción de Cr(VI) y se realizó también el estudio por espectrometría de masas de alta resolución. En particular, separación cromatográfica acoplada con espectrometría de emisión atómica con excitación en plasma de nitrógeno sostenido por microondas (MP-AES) se utilizó para la detección de especies de cromo y manganeso y para su cuantificación durante el curso de la reacción; mientras la espectrometría de masas permitió la identificación en tiempo real de los intermediarios y productos de reacción.

IV.1.2. Parte experimental

Reactivos y soluciones. Todos los reactivos químicos fueron de grado reactivo analítico; agua desionizada (18.2 M Ω cm, Labconco, USA) y metanol grado LC-MS (Sigma, Milwaukee, USA). Dicromato de potasio, sulfato de manganeso, ácido oxálico y ácido fórmico fueron de sigma.

Soluciones stock de cromo hexavalente (0.2 M Cr(VI)), manganeso divalente (0.25 M Mn(II)) y ácido oxálico (1 M) fueron preparadas de los reactivos anteriores utilizando agua desionizada. Las mezclas de reacción fueron obtenidas mediante adición de 200 μ l de solución de ácido oxálico a un tubo Falcon conteniendo 10 ml de agua desionizada, vortex, adición de 50 μ l de Cr(VI), vortex y adición de alícuotas apropiadas de Mn(II) (0 μ l – 80 μ l); finalmente el volumen fue llevado a 15 ml con agua desionizada. Las soluciones fueron analizadas inmediatamente y en sucesivas corridas durante un periodo de tiempo hasta 2 h.

Espectrometría UV/Vis. Espectros de absorción (250 nm – 650 nm) de la mezcla de reacción fueron adquiridos usando un espectrofotómetro Spectronic 3000 Diode Array Milton Roy (resolución 0.35 nm, Milton Roy Inst. Co.).

Análisis HPLC-DAD. Las mezclas de reacción fueron analizadas por cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa con detección espectrofotométrica de arreglo de diodos (HPLC series 1200, Agilent Technologies); a partir de la preparación de cada solución, inyecciones sucesivas (20 μ l) fueron repetidas cada 10 minutos durante 1 hora. La columna cromatográfica fue Luna C18 (250 x 4.6 mm, 5 μ m, Phenomenex); elución isocrática fue llevada a cabo con fase móvil con 0.1 % v/v de ácido fórmico en 0.5 % v/v de metanol, con el flujo de la columna de 0.8 ml min⁻¹ y detección en un rango de longitud de onda 250 nm – 700 nm. Basado en múltiples inyecciones, a lo largo del texto para cada señal cromatográfica se reporta su tiempo de retención promedio con respectiva desviación estándar.

Análisis HPLC-MP-AES. El anterior sistema cromatográfico fue acoplado en-línea, a través de un corto tubo PEEK®. Se utilizó el nebulizador de teflón y cámara de rociado ciclónica de un solo paso y el equipo MP-AES 4100, Agilent Technologies, como se describió anteriormente. Las condiciones de funcionamiento del instrumento fueron las siguientes: presión de nebulización 220 kPa, presión de nitrógeno 140 psi, posición de lectura 0, tiempo de integración 1 s, longitud de onda 425.433 nm y 403.076 nm, para la detección específica de cromo y manganeso respectivamente. Basado en múltiples inyecciones, para cada señal cromatográfica se reporta el tiempo medio de retención con su respectiva desviación estándar.

Análisis ESI-QTOFMS y MS/MS. Se utilizó un espectrometro de masas con dispositivo de ionización ESI y analizador de masas de cuádruplo y tiempo de vuelo maxis impact ESI-QTOF-MS, Bruker Daltonics, equipado con Data Analisis 4.1, el cual se utilizó con la introducción de la muestra

por infusión directa ($3\mu\text{l min}^{-1}$). ESI fue operado en modo negativo con voltaje de rociado de 4500 V, flujo de gas de nitrógeno 4 l min^{-1} , nitrógeno como gas de secado ($180\text{ }^\circ\text{C}$) y presión del gas nebulizador de 0.3 bar. Los espectros de la mezcla de reacción se adquirieron en el intervalo de relación m/z 80 - 400, la adquisición se repitió siete veces durante 90 minutos. Para la calibración de masa interna, se usó el ion molecular de $\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, m/z 216.85379.

IV.1.3. Resultados y discusión

Mediciones espectrofotométricas. Una serie de soluciones conteniendo 0.67 mM de Cr(VI) y ácido oxálico en exceso con respecto al cromo hasta en una relación molar de 50:1 fueron preparadas; el pH de estas soluciones fue en un intervalo de 2.9 – 3.1. Los espectros de absorción UV/Vis mostraron dos bandas con máximos en 350 nm y 445 nm, respectivamente; no se observaron cambios de su forma ni intensidad durante al menos cuatro horas, lo que coincide con los reportes anteriores, en donde la reducción de Cr(VI) por ácido oxálico fue favorecida cinéticamente en medio ácido ($\text{pH} < 1.6$) [115]. A continuación, diferentes concentraciones de Mn(II) fueron adicionadas a la solución de dicromato en un rango de relación molar de Cr(VI):Mn(II) de 16:1 a 1:2; estas soluciones presentaron esencialmente el mismo perfil espectral como Cr(VI) sin ningún cambio en los espectros registrados sucesivamente durante dos horas. Finalmente, diferentes alícuotas de Mn(II) fueron adicionadas a la mezcla Cr(VI) + ácido oxálico obteniendo la relación molar de Cr(VI):Mn(II) de 16:1; 8:1; 4:1; 2:1; 1:2 y los espectros UV/Vis fueron registrados. Para cada solución, la absorbancia registrada a 350 nm se representó gráficamente en función del tiempo durante 1.5 h (Fig. 7).

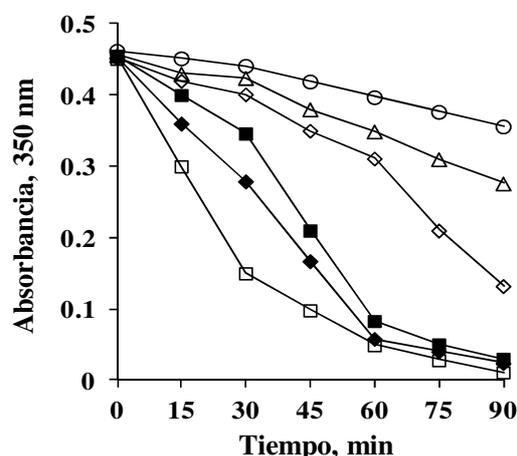


Fig. 7. Efecto del aumento de las concentraciones de Mn(II) sobre el grado de reducción de Cr(VI) 0.67 mM en la presencia de ácido oxálico 1 M, medida como absorbancia a 350 nm durante un período de tiempo de 90 min; los gráficos corresponden a lo siguiente: Cr(VI):Mn(II) relaciones molares:(-○-) 16:1; (-△-) 8:1; (-◇-) 4:1; (-■-) 2:1; (-◆-) 1:1; (-□-) 1:2.

En consistencia con estudios anteriores [100, 122], Mn(II) causó una disminución gradual de la señal de absorción de Cr(VI) conforme aumentaba el tiempo del contacto y la cinética de reducción fue claramente favorecida por el incremento en la concentración de Mn(II). En todos los experimentos posteriores, se utilizó una solución mixta de Cr(VI) 0.67 mM, ácido oxálico 13.3 mM y de Mn(II) 0.33 mM; esta composición (relación molar de ácido oxálico : Cr(VI) : Mn(II) 20:1:2, pH 3.0) fue seleccionada con el fin de promover la cinética de reacción y para facilitar la detección de especies intermediarias por diferentes técnicas instrumentales. Los espectros de absorción UV/Vis de la solución anterior se presentan en la Fig. 8a; estos espectros, se adquirieron repetidamente durante una hora, mostrando cambios graduales en comparación con el perfil espectral inicial. Para cada espectro, la absorbancia se midió a 295 nm, 350 nm, 445 nm, y 540 nm y los valores obtenidos fueron graficados en función del tiempo como se muestra en la Fig. 8b-e. La intensidad de absorbancia de Cr(VI) a 350 nm disminuye rápidamente y después de 60 minutos la reducción prácticamente fue completa (comparar Fig. 8c y Fig. 7).

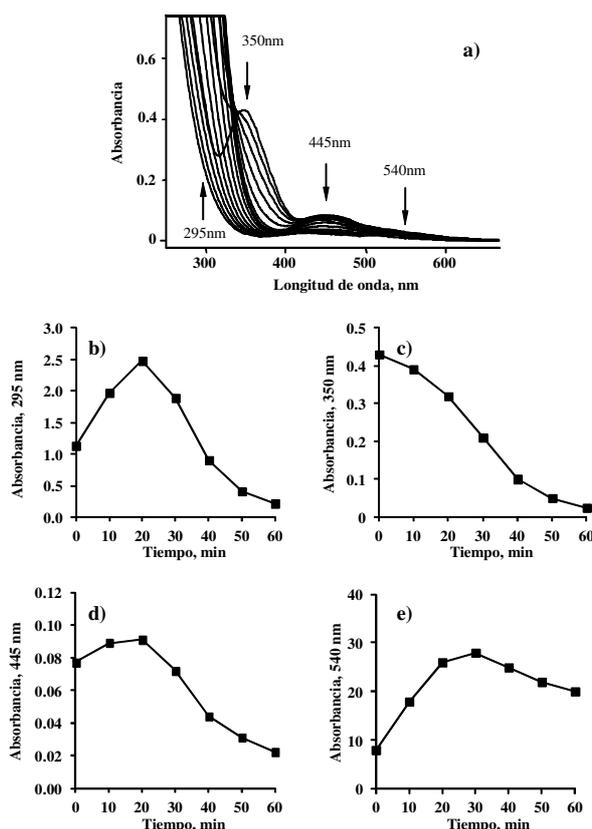


Fig. 8. Los resultados obtenidos para la mezcla de reacción: Cr(VI) 0.67 mM, ácido oxálico 13.3 mM y Mn(II) 0.33mM, midiendo absorbancia de las soluciones a diferentes tiempos de contacto. (a) Los espectros de absorción adquiridos durante 1h desde la preparación de la solución. (b); (c); (d); (e) Los valores de absorbancia registrados cada 10 min a 295 nm; 350 nm; 445 nm; 540 nm, respectivamente.

El incremento inicial y posterior caída de las absorbancias medidas a 295 nm y 445 nm, observado en la Fig. 8b y Fig. 8d, respectivamente, sugiere la formación de al menos dos intermediarios de cromo, que corresponden muy probablemente a Cr(V) o Cr(IV) [103, 117]. Se preveía que la absorbancia a 540 nm se incrementaría conforme pasaba el tiempo, confirmando la formación de Cr(III) como el producto final de reducción; sin embargo, esta señal presentó cambios similares como aquellas que se midieron a 295 nm y 445 nm (comparar Fig. 8e con Fig. 8b, d), el efecto que fue atribuido a la superposición espectral de diferentes especies poco absorbentes de Cr(III), Cr(IV) y Cr(V) [123].

A pesar de evidente utilidad de los resultados anteriores para la confirmación de la reducción de Cr(VI) en presencia de ácido oxálico y Mn(II); estos experimentos no proporcionan suficiente evidencia experimental para una interpretación mecanística debido a las bandas de absorción anchas, así como una baja selectividad y sensibilidad de las mediciones espectrofotométricas llevada a cabo directamente en la mezcla de reacción.

Análisis por HPLC-DAD. Las mezclas de reacción fueron analizadas por cromatografía de líquidos en fase inversa con detector espectrofotométrico de arreglo de diodos. En particular, se utilizaron condiciones de separación suaves con el fin de preservar la identidad de las especies (ver sección experimental). La solución de Cr(VI) + ácido oxálico así como la solución de Cr(VI) fueron analizadas 2-3 minutos después de su preparación y los cromatogramas registrados a 350 nm se presentan en la Fig. 9a. Los espectros de absorción adquiridos en el máximo de cada pico cromatográfico, se presenta en la Fig 9c-e. La mezcla de reacción con adición de Mn(II) fue inyectada al sistema cromatográfico a 2-3 min, 15 min y 60 min después de su preparación y los respectivos cromatogramas se muestran en la Fig. 9b.

En ausencia de Mn(II), el principal pico cromatográfico es eluido a 5.05 ± 0.01 min y el espectro de absorción en el ápice de este pico, es característico para Cr(VI) (Fig. 9a, e). En el análisis de la mezcla de Cr(VI) + ácido oxálico, aparecieron dos señales adicionales con menor intensidad y con tiempos de retención de 4.09 ± 0.03 min y 4.46 ± 0.04 min respectivamente (Fig. 9a). Con base en los espectros de absorción (Fig. 9c, d), estas especies pueden corresponder a los estados de oxidación intermedios generados durante la reducción de Cr(VI) y las cuales también se observaron en las mediciones espectrofotométricas directas (Fig. 8a, b). Las intensidades de estos picos se mantuvieron prácticamente sin cambios durante al menos 2 h, sugiriendo que el proceso de reducción de Cr(VI) se inició de inmediato, pero intermediarios generados en esta etapa no pudieron ser reducidos probablemente debido a una barrera cinética. Efectivamente, hay reportes sobre la formación del intermediario Cr(V) de una vida larga durante la reducción de Cr(VI) por ácido oxálico y además la reducción de Cr(VI) a Cr(V) es considerada como la etapa limitante durante la reducción

de Cr(VI) [99, 124, 125]. Por otra parte, la formación de Cr(IV) durante la reducción de Cr(VI), así como la generación de intermediarios de cromo de valencia mixta también se han considerado [101, 126].

En presencia de Mn(II), el perfil de elución fue similar al descrito anteriormente (el número, posición y forma de las señales cromatográficas), sin embargo en este caso, las intensidades de los picos individuales cambiaron con el tiempo (Fig. 9b). La señal cromatográfica correspondiente a Cr(VI) (tiempo de retención 5.05 ± 0.02 min) fue disminuyendo en inyecciones sucesivas y desapareció totalmente después de 60 min, lo que confirma que el manganeso favorece el proceso de reducción. En la primera inyección, dos picos eluidos con más cortos tiempos de retención en la Fig. 9b, presentan espectros de absorción idénticos a los registrados sin adición de Mn(II) (Fig. 9c, d), sin embargo, sus intensidades fueron menores en presencia de Mn(II) (Fig. 9a, b). A pesar de la falta de la resolución, se puede observar que las dos señales débiles presentan diferentes cambios de intensidad en sucesivas corridas cromatográficas: el primero de los picos (4.09 ± 0.03 min) aumentó lentamente a lo largo del tiempo, mientras que el segundo (4.46 ± 0.04 min) inicialmente aumento para después disminuir (Fig. 9b). Al mismo tiempo, los espectros adquiridos en el ápice de los dos picos cromatográficos presentan cambios graduales. Estos resultados sugieren que el producto final de la reducción (Cr(III)) probablemente co-eluye con los intermediarios de reacción en el primero de los dos picos de baja resolución, mientras que la segunda señal cromatográfica contiene solo una especie intermediaria de cromo. También es claro que el Mn(II) activa la reducción de las formas intermediarias de cromo. Estos resultados son consistentes con varios estudios anteriores que reportan la capacidad del Mn(II) de mejorar la reducción de Cr(IV) y Cr(V) [101, 127, 128].

La formación de Cr(III) como el producto de reacción final se muestra en los cromatogramas de la Fig. 9b obtenidos a 540 nm. Estos, presentan dos señales con un tiempo de retención de 2.57 ± 0.01 min y 4.06 ± 0.03 min, respectivamente, y sus intensidades incrementan gradualmente en inyecciones sucesivas de acuerdo con la generación de dos productos finales de reacción de Cr(III) (Fig. 10a). Los espectros de absorción adquiridos del último cromatograma (60 min de agitación de los reactivos, Fig 10b, 10c) fueron idénticos y mostraron dos máximos de absorbancia en 415 nm y 570 nm, lo que coincide con el espectro reportado previamente de Cr(III) en solución del ácido oxálico [129].

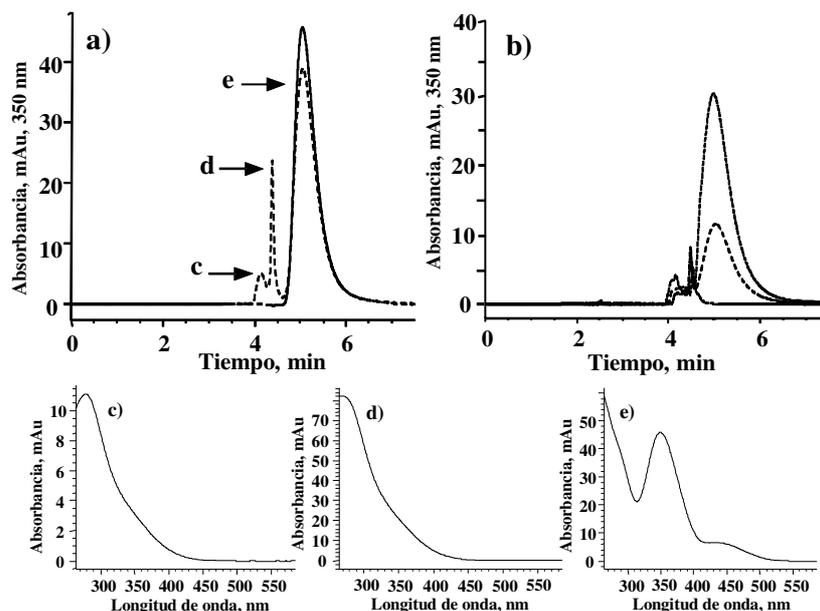


Fig. 9. Resultados de HPLC-DAD obtenidos para la mezcla de reacción a diferentes intervalos de tiempo desde su preparación (a) Cr(VI) 0.67 mM (—) y Cr(VI) 0.67 mM + ácido oxálico 13.3 mM (---): cromatogramas adquiridos después de 2-3 min con detección a 350 nm (b) Cr(VI) 0.67 mM, ácido oxálico 13.3 mM y Mn(II) 0.33 mM: cromatogramas adquiridos inmediatamente (·····), después de 15 min (---) y 60 min (—) de su preparación a 350 nm. (c); (d); (e) Espectros de absorción obtenidos en los máximos de los picos cromatográficos (a) con tiempos de elución a 4.09 min; 4.46 min; 5.05 min, respectivamente.

Cabe destacar que la segunda señal cromatográfica (4.06 ± 0.03 min, Fig. 10a), también está presente en el cromatograma registrado en 350 nm (4.09 ± 0.03 min, Fig. 9b), confirmando una co-elución de un producto minoritario de Cr(III) con algunos intermediarios de la reacción.

Finalmente, los espectros de absorción adquiridos en ápices de las señales cromatográficas, así como los cambios de las intensidades de señales a lo largo del tiempo fueron consistentes con los resultados obtenidos en las mediciones espectrofotométricas directas, lo que indica que el proceso cromatográfico no tuvo efecto alguno sobre el proceso de reducción y no afectó la identidad de las especies; sin embargo, las especies que eluyen entre 4 min y 4,5 min no pudieron ser asignadas de manera inequívoca. Además, las mediciones espectrofotométricas no permiten la detección de los compuestos de manganeso.

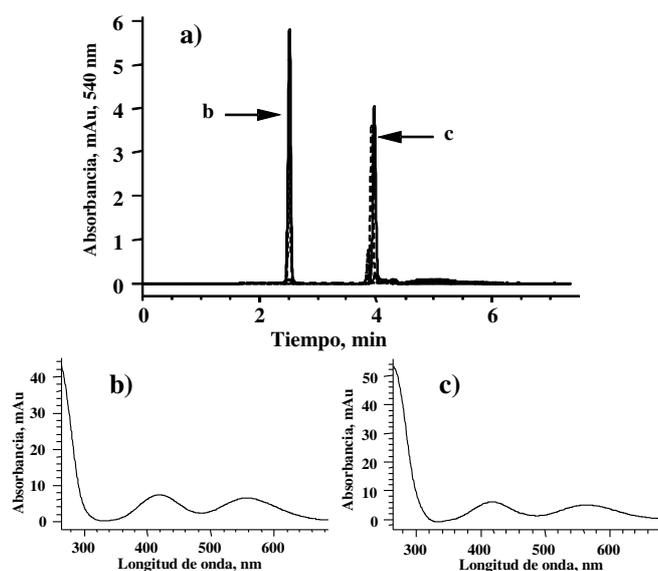


Fig. 10. Resultados de HPLC-DAD obtenidos para la mezcla de reacción: Cr(VI) 0.67 mM, ácido oxálico 13.3 mM y Mn(II) 0.33mM a diferentes intervalos de tiempo desde su preparación. (a) Cromatogramas adquiridos inmediatamente (.....), después de 15 min (---) y 60 min (____); longitud de onda de detección 540 nm. (b); (c) Espectros de absorción obtenidos en los máximos de los picos cromatográficos que eluyen a tiempos de 2.57 min y 4.06 min, respectivamente; tiempo de reacción 60 min.

Análisis por HPLC-MP-AES. Para proporcionar evidencia experimental sobre la presencia de cromo y manganeso en las especies separadas cromatográficamente, la espectrometría de emisión atómica (MP-AES) fue utilizada como detector específico elemental. Los cromatogramas obtenidos para la mezcla de Cr(VI) + ácido oxálico + Mn(II) en seis inyecciones sucesivas se presentan en la Fig. 11; utilizando la línea de emisión de Cr (425.433 nm), se obtuvieron cuatro señales cromatográficas (Fig. 11a) con tiempos de retención de 2.50 ± 0.001 min, 4.18 ± 0.02 min, 4.44 ± 0.02 min y 5.68 ± 0.02 min. Este perfil de elución fue prácticamente idéntico al obtenido para cromo con detección UV/Vis (Fig. 9a, b; Fig. 10a); sin embargo, las señales cromatográficas tuvieron un ligero retraso en relación con HPLC-DAD debido a las diferencias en la configuración instrumental. Para la detección específica de manganeso se utilizó una línea de emisión a 403.076 nm, y se observaron dos picos cromatográficos que se eluyeron con un tiempo de retención de 2.30 ± 0.02 y 4.58 ± 0.03 min, respectivamente (Fig. 10b). Como se muestra en la Fig. 10c, las señales cromatográficas adquiridos para Cr y Mn en este mismo análisis cromatográfico no se superponen, lo que indica que no hay especies que contienen ambos elementos durante la reducción de Cr(VI). Este resultado es relevante, porque el mecanismo responsable del efecto observado del Mn(II) aún no

es claro y algunos autores sugirieron la formación de especies intermediarias que contienen en su estructura átomos de Cr, Mn y oxalato [100, 122].

Las soluciones de iones metálicos individuales (Cr(VI), Cr(III), Mn(II)) en ausencia y en presencia de ácido oxálico fueron también analizadas por HPLC-MP-AES y cada cromatograma mostró un sólo pico cromatográfico, que se mantuvo sin cambios durante varias inyecciones. Con base en los tiempos de retención obtenidos para los estándares anteriores, las señales de cromo, eluidas a 2.5 ± 0.01 min y 5.68 ± 0.02 min fueron asignadas a Cr(III) y Cr(VI), respectivamente; mientras que otras dos señales poco separadas (4.18 ± 0.02 min, 4.42 ± 0.02 min) corresponderían a las especies intermediarias de Cr generadas durante la reducción (Fig. 11 b), como se discutió en la sección anterior. Para el manganeso, el primer pico cromatográfico eluido a 2.30 ± 0.02 min (Fig. 11b) corresponde a Mn(II). De acuerdo con los resultados por HPLC-DAD (Fig. 9, 10), la intensidad de los picos cromatográficos obtenidos con detección MP-AES varía en sucesivas corridas analíticas (Fig. 11 a,b).

Para confirmar la importancia del Mn(II) durante la reducción de Cr(VI) por ácido oxálico (pH 3.0) y también para la evaluación cuantitativa de las especies elementales en diferentes etapas de este proceso, se llevó a cabo el siguiente experimento: una solución de Cr(VI) 0.67 mM y ácido oxálico 13.3 mM fue preparada (15 ml) y se introdujo repetidamente al sistema cromatográfico con detección MP-AES durante una hora (4 inyecciones); luego una pequeña alícuota (20 μ l) de una solución estándar de Mn(II) se añadió produciendo una concentración final de manganeso de 0.33 mM, y esta mezcla se analizó durante 80 min en intervalos de 10 min. En la Fig. 11d, los resultados se presentan como cambio de concentraciones de Mn y Cr correspondientes a cada una de las señales cromatográficas en función del tiempo (escala de tiempo en el eje X). Como se observa en la Fig. 11a, en ausencia de Mn(II) la concentración de Cr(VI) permanece prácticamente sin cambios, con solo trazas detectadas para intermediarios de cromo (dos picos minoritarios poco separados de Cr, Fig. 11a, se integraron juntos).

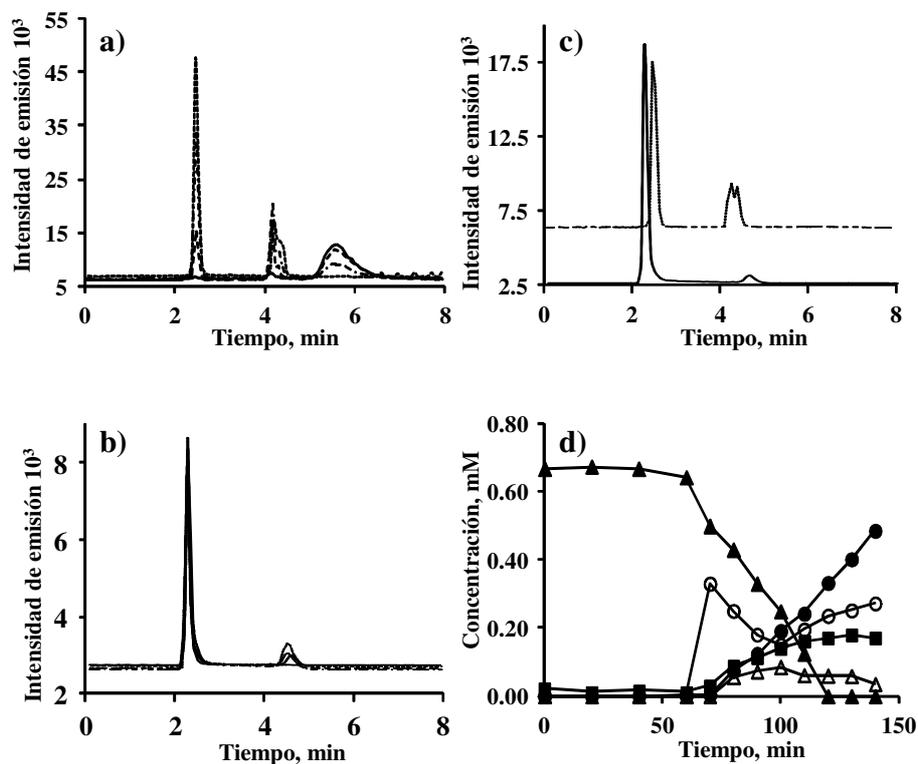


Fig. 11. Resultados de HPLC-MP-AES obtenidos de la mezcla de reacción: Cr(VI) 0.67 mM, ácido oxálico 13.3 mM a la que se le adicionó Mn(II) 0.33mM después de 1 h desde su preparación. (a) Cromatogramas obtenidos para Cr (425.433) inmediatamente después de la adición de Mn(II) (—) y después de 15 min (----), 30 min (-·-), 60 min (····). (b) Cromatogramas obtenidos para Mn (403.076), inmediatamente después de la adición de Mn(II) (—) y después de 15 min (----), 30 min (-·-), 60 min (····). (c) Cromatogramas obtenidos después de 1 h de la adición de Mn(II) con detección específica de Cr (----) y Mn (—). (d) concentraciones correspondientes a cada pico cromatográfico en inyecciones sucesivas: (-▲-) – Cr(VI) señal $t_{ret} = 5.68$ min; (-●-) – Cr(III) señal $t_{ret} = 2.50$ min; (-■-) – Cr(intermediario) señal $t_{ret} = 4.18$ min + $t_{ret} = 4.42$ min; (-○-) – Mn(II) señal $t_{ret} = 2.30$ min; (-△-) – Mn(intermediario) señal, $t_{ret} = 4.58$ min.

Después, de la adición de Mn(II), la reducción de Cr(VI) comenzó inmediatamente y se completó después de una hora. Al mismo tiempo, la concentración de Cr(III) incrementó gradualmente; las concentraciones de cromo obtenidas para las dos señales poco separadas presentaron una tendencia similar, sin embargo el incremento fue mucho menos pronunciado, lo que confirma que las especies intermedias fueron cuantificadas junto con el segundo producto de Cr(III) (Fig. 9b, Fig. 10a). Asimismo, el porcentaje de recuperación de Cr en cada corrida cromatográfica, calculado como la suma de las concentraciones que se encuentran en cada pico con respecto a la concentración

introducida en la columna (0.67 mM), estaba en el rango de 80 – 113 % lo que indica una aceptable confiabilidad de los datos analíticos. Se obtuvieron resultados interesantes para el manganeso; la disminución de la concentración inicial de Mn(II) fue acompañada por la formación de una segunda especie de este elemento, pero después de una hora a partir de la adición de manganeso, hubo una tendencia hacia la recuperación de Mn(II) y la disminución de la segunda especie, lo que es un claro indicativo de un carácter intermediario de éste último. Cuando las dos formas de manganeso están presentes, la intensidad de emisión registrada entre sus respectivas señales cromatográficas fue mayor que la línea de base (Fig. 11b), lo que sugiere que las especies intermedias pueden ser inestables durante el proceso cromatográfico. Con base en la integración de las dos señales de Mn, el porcentaje de recuperación fue de 65 – 102 %; estos valores relativamente más bajos en comparación con la recuperación de Cr deben ser atribuidos a la elución continua del elemento anteriormente mencionado.

En resumen, en los resultados obtenidos en esta parte del estudio se demuestra que el Mn(II) es requerido para una rápida y eficiente reducción de Cr(VI) por ácido oxálico a pH 3. El proceso de reducción involucra la generación de especies intermediarias de Cr y dos compuestos de Cr(III) formados como producto final. Durante el transcurso de la reacción, el Mn(II) activa la reducción de especies intermediaria de cromo; al hacerlo, se convierte a una forma diferente (probablemente Mn(III)) que al parecer vuelve a convertirse en la especie inicial de Mn(II) al final del proceso de reducción. Cabe mencionar, que no se detectó ninguna especie que contenga ambos elementos.

Análisis por ESI-QTOFMS. Para la elucidación final de las estructuras moleculares implicadas en la reducción de Cr(VI), la mezcla de reacción se preparó de la misma forma que para HPLC-MP-AES y se analizó mediante espectrometría de masas de alta resolución con infusión directa. Los cambios de abundancia para cada señal m/z fueron seguidos por mediciones repetidas; los dos primeros se realizaron para la mezcla de Cr(VI) + ácido oxálico (2-3 min después de la preparación y a los 10 min), luego se añadió Mn(II) a la mezcla y se adquirieron los espectros de masas en cinco mediciones sucesivas entre 10 y 90 min. Los espectros obtenidos en ausencia de Mn(II) no presentaron diferencias importantes; sin embargo, después de la adición de Mn(II) se observó un cambio gradual de intensidad durante el tiempo para varios valores m/z y aparecieron nuevas señales que corresponden a especies de manganeso. Once señales fueron seleccionadas para un análisis posterior; en base a los valores m/z experimentales de iones moleculares, se generaron sus respectivas fórmulas moleculares y espectros teóricos (Data Analysis 4.1). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3; se puede observar que el error de masa estuvo en el rango de 0.18 a 2.39 ppm, lo que confirma la asignación precisa de especies. Tres compuestos fueron identificados como cromo hexavalente (A, B, C), dos eran intermedios pentavalentes (D, E), uno era intermediario

tetravalente (F) y tres correspondían a cromo trivalente (G, H, I). Para el manganeso, se identificaron una especie divalente (J) y una especie trivalente (K). Para cada compuesto, la abundancia de su ion molecular se adquirió siete veces durante 90 min y los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 12 y la Fig. 13, junto con las estructuras moleculares respectivas. Se puede observar en la Fig. 12a que antes de la adición de Mn(II), había tres compuestos hexavalentes en equilibrio: cromato (especie principal, A), complejo Cr(VI)-mono-oxalato (B) y dicromato (C). Después de la adición de Mn(II), las cantidades de A, B y C disminuyeron gradualmente hasta desaparecer completamente después de aproximadamente una hora, lo que está de acuerdo con los resultados de las mediciones directas de UV/Vis. (fig. 8c), HPLC-DAD (Fig. 9b) y HPLC-MP-AES (Fig. 11d). Como se indicó desde el principio, no se pretendía la resolución cromatográfica de especies individuales y A, B, C en las Figuras mencionadas anteriormente eluían siempre en forma de un amplio pico cromatográfico. También se ha mencionado anteriormente que solo se observó un pico cromatográfico para la solución de Cr(VI) + ácido oxálico.

Tabla 3. Asignación de compuestos que contienen cromo y manganeso, basados en las mediciones de masa exactas realizadas en la mezcla de reacción por infusión directa ESI-QTOF-MS.

Compuesto	m/z			Formula neutra
	Experimental	teórica	Δ , ppm	
A	116.9283	116.9285	2.39	$\text{H}_2\text{Cr}^{(\text{VI})}\text{O}_4$
B	188.9132	188.9133	0.23	$\text{H}_2\text{C}_2\text{Cr}^{(\text{VI})}\text{O}_7$
C	216.8538	216.8538	0.00	$\text{H}_2\text{Cr}_2^{(\text{VI})}\text{O}_7$
D	243.8950	243.8953	1.22	$\text{C}_4\text{Cr}^{(\text{V})}\text{O}_9$
E	171.9105	171.9105	0.49	$\text{HC}_2\text{Cr}^{(\text{V})}\text{O}_6$
F	172.9187	172.9184	1.91	$\text{H}_2\text{C}_2\text{Cr}^{(\text{IV})}\text{O}_6$
G	227.9002	227.9004	0.76	$\text{HC}_4\text{Cr}^{(\text{III})}\text{O}_8$
H	317.8957	317.8957	0.18	$\text{H}_3\text{C}_6\text{Cr}^{(\text{III})}\text{O}_{12}$
I	155.9156	155.9156	0.19	$\text{HC}_2\text{Cr}^{(\text{III})}\text{O}_6$
J	231.9057	231.9054	1.36	$\text{H}_2\text{C}_4\text{Mn}^{(\text{II})}\text{O}_8$
K	230.8979	230.8977	0.96	$\text{HC}_4\text{Mn}^{(\text{III})}\text{O}_8$

Se detectaron dos compuestos intermedios de cromo pentavalente, complejo de Cr(V)-bis-oxalato (D) y Cr(V)-mono-oxalato (E) en ausencia de Mn(II) pero sus abundancias en los espectros de masas no cambian hasta que se haya agregado manganeso a la solución; luego, la formación de los dos intermedios aumentó y después de aproximadamente 20 minutos, ambas especies comenzaron a desaparecer gradualmente (Fig. 12b). Se obtuvieron resultados similares por HPLC-DAD (Fig. 9a, b) y por HPLC-MP-AES (Fig. 11a, d). En particular, los resultados de ESI-MS confirmaron la presencia

de dos intermedios Cr(V) en picos cromatográficos poco resueltos eluyendo entre 4.0 y 4.5 min. La detección e identificación de cromo tetravalente (compuesto F) fue una contribución importante de este estudio, porque demostró que el proceso de reducción involucraba tres procesos de transferencia de un electrón. Esta tarea fue desafiante por muchas razones; Se ha informado de que Mn(II) es un catalizador de la reducción de Cr(IV) [101, 119] y Cr(IV) generalmente se considera un intermediario de vida corta [97, 130] y por tanto, solo se pueden esperar cantidades mínimas en la mezcla de reacción. Además, los compuestos E y F difieren solo en un átomo de hidrógeno y sus patrones isotópicos parcialmente se superponen; Cabe destacar que dificultades similares en la detección de Cr(IV) por ESI-MS habían sido reportadas antes [97, 130]. En la Fig. 12c, se presenta el cambio de la intensidad del ión molecular a lo largo del tiempo para el complejo F (complejo Cr(IV)-mono-oxalato).

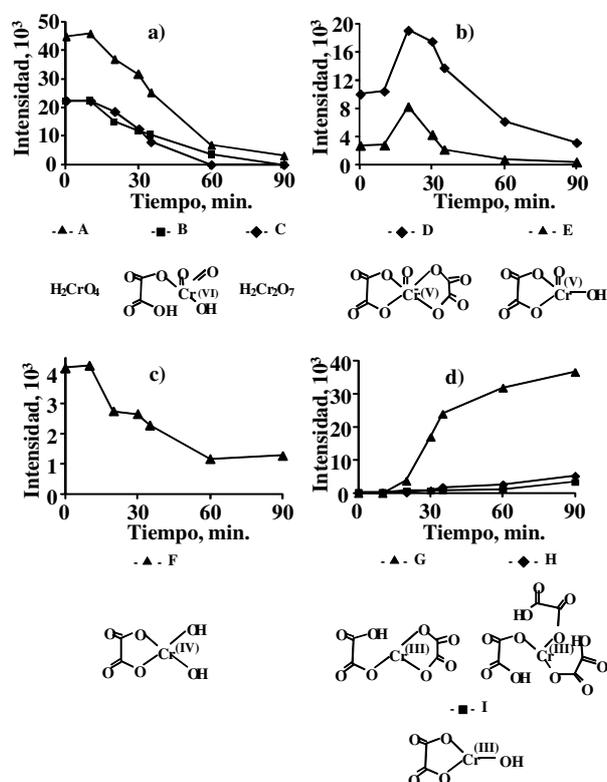


Fig. 12. Resultados de la espectrometría de masas moleculares: estructuras moleculares de ocho compuestos de cromo (A-K) y cambios de su abundancia a lo largo del tiempo. (a) A, B, C. (b) D, E. (c) F. (d) G, H, I.

Como productos finales de la reducción de Cr(VI), se detectaron tres compuestos de Cr(III); en el orden decreciente de abundancia, G, H e I se identificaron como complejos de Cr(III)-bis-oxalato, Cr(III)-tri-oxalato y Cr(III)-mono-oxalato, respectivamente. Los iones moleculares de los

tres compuestos presentaron un aumento gradual de la abundancia después de la adición de Mn(II) a la mezcla de reacción (Fig. 12d). Estos resultados también fueron consistentes con datos de HPLC-DAD (Fig. 10a) y HPLC-MP-AES (Fig. 11a, d); sin embargo, debe notarse que antes solo se observaron dos formas de Cr(III), muy probablemente debido a una selectividad insuficiente de herramientas analíticas y bajas concentraciones de H e I. Dos compuestos de manganeso, J y K, se identificaron como complejo Mn(II)-bis-oxalato y complejo Mn(III)-bis-oxalato, respectivamente (Tabla 3, Fig. 13). De acuerdo con los resultados de HPLC-MP-AES (Fig. 11d), el aumento inicial de la señal J después de la adición de Mn(II) se siguió por su disminución temporal con una tendencia de recuperación al final del proceso de reducción (Fig. 13). El cambio de abundancia para el compuesto K se parecía al observado para la forma intermedia de Mn en el análisis HPLC-MP-AES (Fig. 11d); sin embargo, la intensidad relativa de K en los espectros de masas fue mucho mayor con respecto al intermediario de Mn en los cromatogramas de MP-AES (compárese la Fig. 13 y la Fig. 11d). Esta diferencia no fue sorprendente, porque el intermediario de Mn se degradó parcialmente durante el proceso cromatográfico (elución de Mn continua entre dos picos bien definidos), mientras que la infusión directa y la fuente de ionización suave en el análisis de espectrometría de masas aparentemente tuvieron un efecto insignificante en la integridad de K.

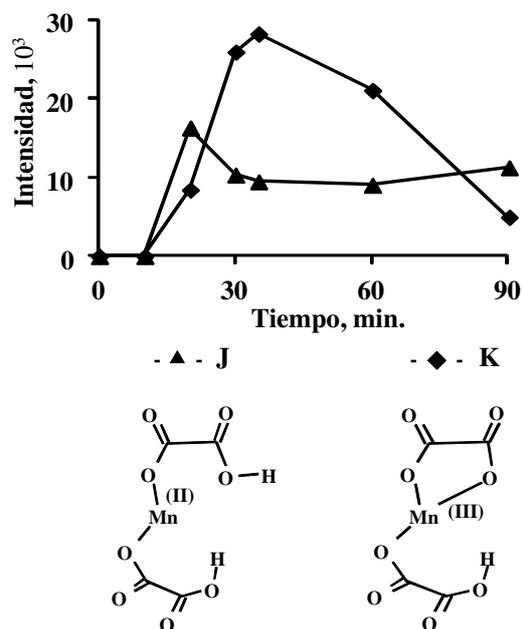
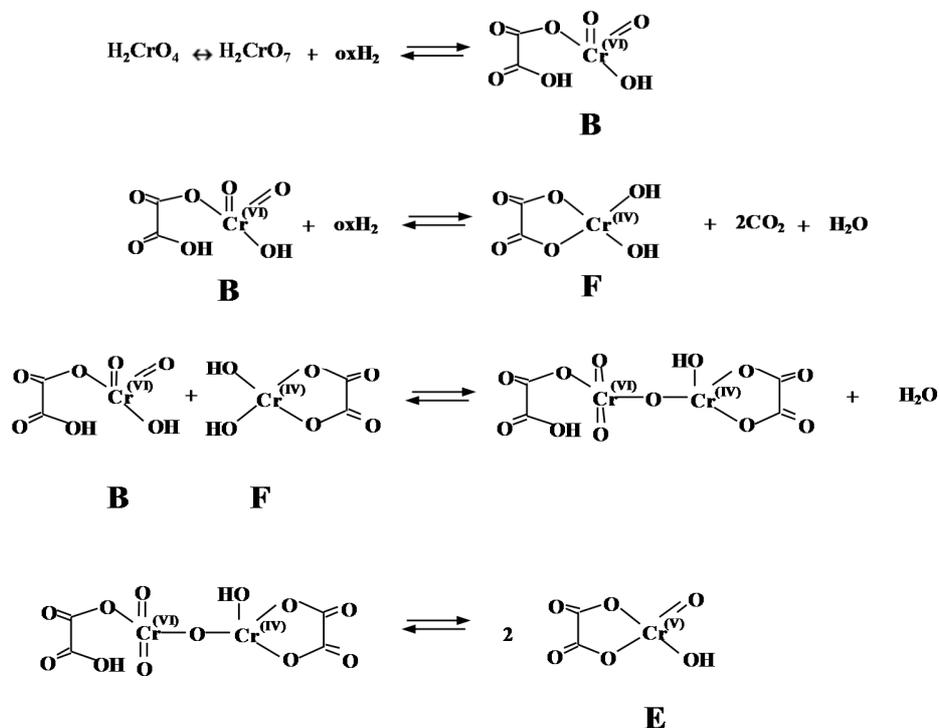


Fig. 13. Resultados de la espectrometría de masas moleculares: estructuras moleculares de dos compuestos de manganeso (J, K) y cambios de su abundancia a lo largo del tiempo de reacción.

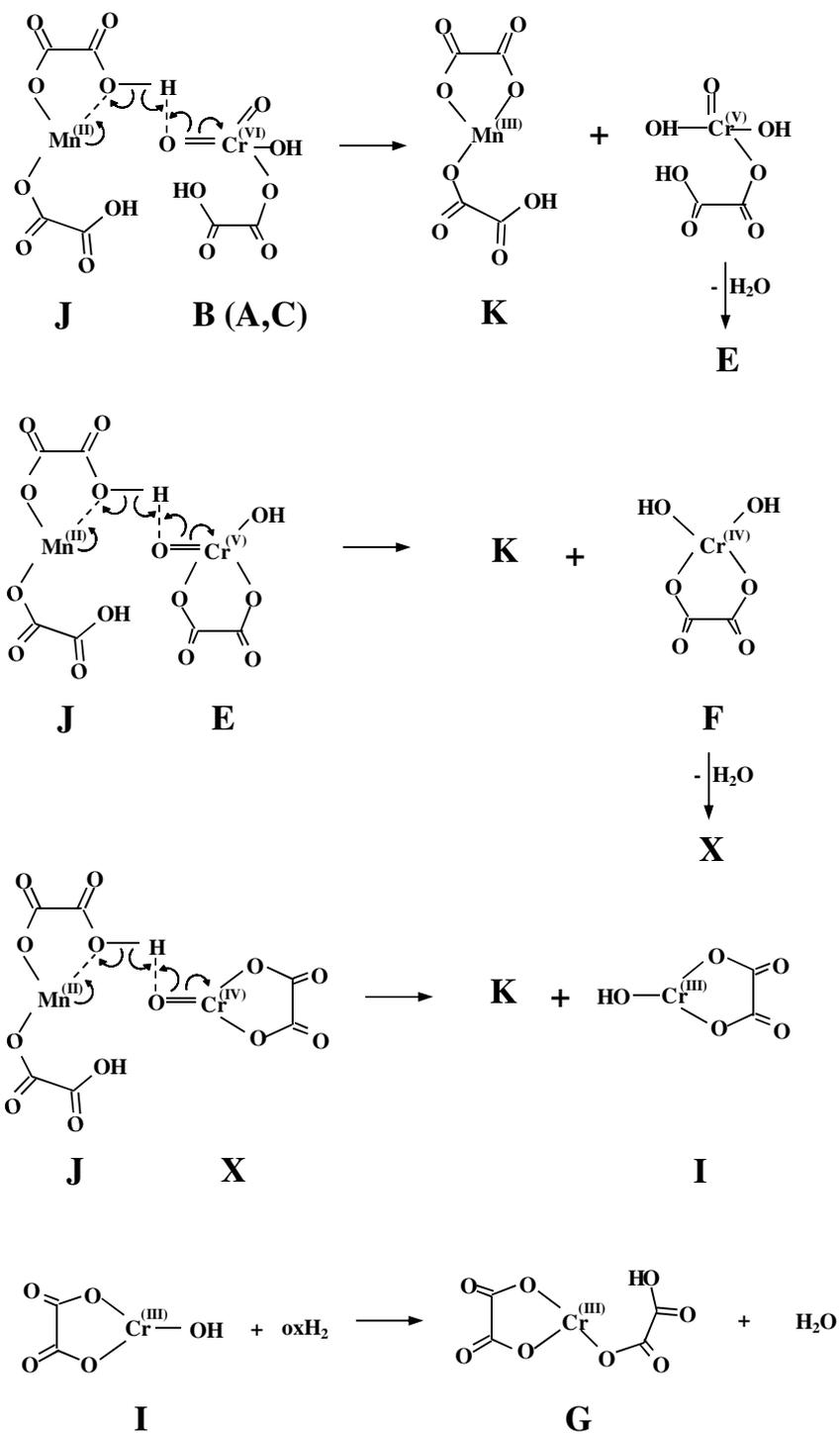
Mecanismo de reducción propuesto. Como se indicó por diferentes análisis llevados a cabo en este trabajo, en ausencia de Mn(II), la reducción de Cr(VI) prácticamente no se produjo y solo

pequeñas cantidades de intermediarios de Cr(V) y Cr(IV) son detectadas. Las reacciones que tienen lugar en la mezcla de Cr(VI) con ácido oxálico (pH 3) se comprendieron como se muestra en el Esquema 1. La identificación de B como uno de los compuestos de Cr(VI) está de acuerdo con el primer paso generalmente aceptado de oxidación de Cr(VI) de sustratos orgánicos [126, 131].



Esquema 1. Reacciones que se producen en la mezcla de Cr(VI) y ácido oxálico (pH 3).

La reducción de Cr(VI) por el ácido oxálico produce dióxido de carbono, lo que sugiere que el compuesto F se puede formar directamente a partir de B mediante transferencia de dos electrones; la liberación de ion hidrógeno en este proceso no se vería obstaculizada (pH 3). En cuanto al cromo pentavalente, el compuesto E podría generarse a partir de compuestos F y B; como ya se mencionó antes, los intermedios de cromo de valencia mixta se han propuesto en otros estudios [126] así como la formación de Cr(V) a partir de Cr(VI) y Cr(IV) [132]. Dicha ruta de generación de Cr(V) está respaldada por una abundancia relativamente alta de compuestos pentavalentes en comparación con el compuesto F tetravalente (Fig. 12). Cuando se añadió Mn(II) a la mezcla de reacción, comenzaron a cambiar las abundancias de compuestos de cromo ya existentes y se observó la generación de nuevos compuestos de Mn(III) y Cr(III), lo que indica que el papel de Mn(II) fue acelerar el proceso de reducción representado en el Esquema 1. En base a los resultados presentados en las secciones previas, el mecanismo de reducción de Cr(VI) en presencia de Mn(II) se ha propuesto como se muestra en el Esquema 2.



Esquema 2. Mecanismo de reacción propuesto para la reducción de Cr(VI) con ácido oxálico en presencia de Mn(II).

La acomplejación de Mn(II) por ligandos orgánicos pequeños tales como citrato u oxalato se había propuesto como un requisito previo para la transferencia de electrones durante la reducción de

Cr(VI) [105, 106, 122] y, de hecho, el compuesto J se identificó como complejo de Mn(II)-bis-oxalato. La formación del complejo Mn(II)-bis-oxalato acompañada de una mayor abundancia de intermediarios de Cr(V) y Cr(IV) sugiere que se transfirió un electrón de J a especies de cromo B, D o E, convirtiendo Cr=O contenido en sus estructuras a Cr-OH. La única especie de Cr(IV) no detectada por ESI-MS corresponde al compuesto F que a diferencia de las estructuras para los intermedios anteriores de Cr(IV), no presentaba un enlace Cr=O. Se esperaba que Mn(II) actuara por igual en todas las reacciones de transferencia de un electrón, por lo que la conversión de F en X por la pérdida de H₂O se propuso como un compuesto no cargado y no polar el cual no pudo ser confirmado por ESI-MS, pero se detectó su producto de reducción (I) (Tabla 3, Fig. 12d). La reacción de esterificación entre el ácido oxálico y el grupo -OH en I produciría el compuesto G que es la principal especie de Cr(III) detectada por ESI-MS; que es consistente con el estudio anterior, donde la evaluación cuantitativa del consumo total de ácido oxálico indicó su requerimiento no solo para la reducción de Cr(VI) sino también para la complejación de Cr(III) [115]. La generación de diferentes complejos de Cr(III) con oxalato durante la reducción de Cr(VI) también ha sido reportada [100].

Al final del proceso de reducción, se observó la recuperación de Mn(II) de Mn(III) por HPLC-MP-AES (Fig 11d) y por ESI-MS (Fig. 13), confirmando que las especies de Mn trivalente es inestable, reactivo y aparece solo en presencia de aceptor de electrones (B, D, E, X). De acuerdo con el mecanismo de reacción propuesto en este trabajo, el ácido oxálico era capaz de reducir Cr(VI) a Cr(IV) mediante transferencia de dos electrones y simultáneamente generar CO₂; pero la progresión de este proceso se vio obstaculizada. Cuando se añadió Mn(II), la especie reductora activa parecía ser el complejo Mn(II)-bis-oxalato (J); la transferencia de un electrón de J a B, D, E o X, produjo la conversión de Cr=O a Cr-OH y la formación de éster de oxalato cíclico de Mn(III) (K). La capacidad de Mn(II) para la reducción de Cr(VI), Cr(V) y Cr(IV) se ha observado en otros estudios [115, 126]. también es relevante que el efecto favorable de Mn(II) durante la reducción de cromo (VI) por ácidos orgánicos se informó que era más pronunciado a acidez más bajas [133], que confirma que se requirió la interrupción del enlace -OH en el complejo Mn(II)-bis-oxalato para la transferencia de electrones (pH 3). La ruta de reacción propuesta (Esquema 2) apunta al papel catalítico del manganeso divalente, a menudo descrito en la literatura [126, 132] sin embargo, la formación de cualquier especie de Cr-Mn mixta en el curso de la reacción no se observó en este trabajo.

IV.1.4. Conclusiones

En ese trabajo, una combinación de diferentes técnicas analíticas fue utilizada con el fin de obtener una mejor comprensión sobre el mecanismo de reacción en el cual el manganeso divalente desempeña una función muy importante durante la reducción de cromo hexavalente por ácido oxálico en solución acuosa (pH 3). En particular, las mediciones espectrofotométricas UV/Vis directas indican que el Mn(II) es necesario para una reducción rápida y eficiente; específicamente, en la solución de Cr(VI) 0.67 mM, ácido oxálico 13.3 mM y Mn(II) 0.33 mM, la reducción se completó en 1 h. Para mejorar la selectividad de las mediciones UV/Vis, se utilizó cromatografía de líquidos con detección DAD. Los resultados obtenidos para la mezcla de reacción en sucesivos análisis cromatográficos demostraron la formación de al menos dos intermediarios de cromo y también al menos dos productos finales de Cr(III). Este mismo sistema de separación fue acoplado a MP-AES para la detección específica de cromo y manganeso; al hacerlo, se logró la cuantificación de dos elementos en compuestos separados cromatográficamente y se confirmó la formación de intermediarios de cromo y dos productos de Cr(III). Además, un intermediario de Mn fue detectado. Lo más importante fue que se descartó la formación de cualquier intermediario conteniendo dos elementos. Por otro lado, MP-AES no proporcionó identidad de especies individuales, y esta información crucial se obtuvo mediante espectrometría de masas de alta resolución. Específicamente, por infusión directa de la mezcla de reacción a ESI-QTOFMS, los espectros de masas se adquirieron en tiempo real, durante el curso de la reacción. Se identificaron once compuestos (A-K) y para cada uno de ellos, se evaluaron los cambios de la intensidad del ión molecular durante el tiempo de reacción. La combinación de técnicas analíticas, basadas en diferentes principios fisicoquímicos, proporcionó resultados consistentes y complementarios que permitieron diseñar un mecanismo confiable de reducción. Se propone que el ácido oxálico en sí sea capaz de transferir dos electrones causando la reducción de B \rightarrow F y la liberación de CO₂. Como se muestra en el Esquema 1, la reacción posterior entre B y F produciría dos moléculas D; sin embargo, solo se detectaron pequeñas e invariables cantidades de intermedios de cromo en el tiempo, lo que indica que el progreso de la reacción se vio obstaculizado. En presencia de Mn(II), se encontró el complejo Mn(II)-bis-oxalato (J) como una especie reductora activa; el mecanismo de reacción propuesto implica la transferencia de un electrón desde J a cualquier compuesto de cromo que contenga un enlace Cr=O, lo que da como resultado su reducción a Cr-OH y la generación de complejo de Mn(III)-bis-oxalato (K). Al final del proceso de reducción, se observó la conversión de K a J, lo que confirma el papel catalítico de Mn(II).

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el ácido oxálico en combinación de Mn(II) podría ser una opción interesante para la remediación de ambientes

contaminados, ya que la reducción de Cr(VI) en este sistema no requiere condiciones ácidas fuertes y el producto de oxidación final (CO₂) es relativamente inofensivo.

IV.2. Especiación analítica de mercurio en atún enlatado y pescado fresco mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por ICP-MS con Bi³⁺ como estándar interno y N-acetilcisteína como agente acomplejante.

IV.2.1. Introducción

El mercurio inorgánico (Hg²⁺) y el metilmercurio (CH₃Hg⁺) son las especies principales de este elemento que se encuentran en los organismos marinos y por lo cual el consumo de pescado es la principal fuente de metilmercurio para los seres humanos. En este sentido y una vez que se han evaluado los riesgos ambientales y toxicológicos relacionados con estas especies, diferentes organismos gubernamentales establecieron máximas concentraciones permisibles de mercurio en los productos relacionados con los alimentos [14]. En particular, la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos ha regulado el nivel de concentración permitida en pescado a 1 mg kg⁻¹ de masa fresca (wm) [15]. Por esa razón, existe una fuerte demanda en el desarrollo de procedimientos analíticos que proporcionen datos confiables tanto de mercurio total como de sus especies químicas en estas complejas matrices biológicas.

En el análisis de especiación, se puede observar una preferencia por el uso de la separación de cromatografía líquida acoplada a un detector de elementos específico [134-136]. En particular, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con espectrometría de masas de plasma acoplada inductivamente (ICP-MS) ofrece las siguientes ventajas: (i) para cromatografía de líquidos no es necesario derivatizar las especies de mercurio, (ii) se pueden utilizar diferentes mecanismos de separación, (iii) el acoplamiento entre HPLC y ICP-MS es fácil, (iv) ICP-MS ofrece bajos límites de detección, sin interferencias y tiene capacidad para el análisis isotópico [135, 137, 138]. Si bien la parte de separación/cuantificación del procedimiento analítico no es problemática, en la actualidad, la extracción cuantitativa de mercurio inorgánico y orgánico sin afectar la distribución natural de las especies sigue siendo un desafío. En este sentido, se han estudiado varios procedimientos en condiciones ácidas o alcalinas y se ha considerado el uso de agentes acomplejantes como por ejemplo: L-cisteína, 2-mercaptoetanol, tiourea, ditiocarbamato de pirrolidina de amonio, dietilditiocarbamato de sodio o ditizona [8, 135, 138-140]. Recientemente, las extracciones asistidas por ultrasonido y microondas se han empleado frecuentemente, ya que ofrecen un mejor rendimiento de la muestra y requieren cantidades más bajas de los reactivos [8, 135, 137, 141]. Sin embargo, a menudo se ha reportado que la precisión de los resultados finales se ve comprometida por posibles pérdidas de especies volátiles durante la digestión a alta temperatura y presión elevada, interconversión de especies o contaminación de las muestras [142, 143]. En este contexto, se han estudiado diferentes estrategias para superar las limitaciones anteriores, incluido el uso de condiciones de extracción suaves [139, 140, 144] y el uso de estándar interno [145-147]. Por otro lado, la espectrometría de

masa con cuantificación por dilución isotópica especiada (SIDMS, por sus siglas en inglés *specific isotope dilution mass spectrometry*) ha sido recomendada como una técnica de cuantificación y una herramienta de diagnóstico, que permite evaluar y corregir las transformaciones de las especies y la recuperación no cuantitativa de las mismas [143, 148-150]. Aunque, SIDMS empleada en la especiación de mercurio ha sido aceptada como un método estandarizado por la EPA de EE. UU. (Método 6800) [7, 151], existen ciertos factores que limitan el uso de la misma como lo son: incertidumbres debidas a las relaciones de cantidad de isótopos medidas y las asociadas con la abundancia de isótopos naturales de Hg [152], así como la disponibilidad de estándares enriquecidos con isótopos estables y el alto costo del análisis. Cabe mencionar, que para facilitar el manejo de la muestra y para fines de confiabilidad analítica, los resultados de la cuantificación generalmente se refieren a la masa de muestra seca o liofilizada [8]. Sin embargo, los niveles regulados, establecidos por organismos gubernamentales, se expresan siempre como los niveles de concentración en masa húmeda para facilitar la evaluación de las porciones comestibles [14].

En este trabajo, se propone un mejoramiento a un procedimiento de especiación de mercurio por HPLC-ICP-MS establecido previamente en el grupo de investigación [153], en el cual se utiliza el ion bismuto como estándar interno, para corregir las imprecisiones cometidas durante todo el procedimiento. Una de las mejoras que se propuso fue el uso de N-acetilcisteína en vez de L-cisteína, como agente acomplejante de las especies de Hg^{2+} y CH_3Hg^+ . Puesto que cisteína utilizada previamente es del origen natural, el problema persistente en los análisis fue la contaminación de este compuesto con mercurio. Es por ello que en este trabajo se propuso utilizar N-acetilcisteína - un compuesto sintético el cual contiene mas bajas concentraciones de mercurio, lo que permitió disminuir la señal del blanco, además de que el uso de N-acetilcisteína mejoró un poco la separación cromatográfica de las especies de mercurio y del EI de bismuto. Otra mejora que se realizó al procedimiento fue el uso de sistema de digestión por microondas reduciendo el riesgo de pérdidas del analito por volatilización y posibles contaminaciones. Además, en contraste al trabajo anterior, para llevar a cabo la especiación de mercurio la calibración fue realizada siguiendo el protocolo de preparación de las muestras [153]. Finalmente, se realizó la especiación de mercurio en muestras de atún enlatado, donde los resultados obtenidos son comparables con otros estudios reportados y con los valores establecidos por diferentes organismos gubernamentales.

IV.2.2. Parte experimental

Reactivos y soluciones. Todos los reactivos fueron grado analítico; agua desionizada (18.2 M Ω cm, Labconco, USA), metanol grado HPLC y tolueno grado analítico (Sigma-Aldrich). Las soluciones estándar de las dos especies de mercurio a una concentración de 1000 mgHg l⁻¹ se

prepararon disolviendo yoduro de metilmercurio (CH_3HgI , Sigma) en metanol y cloruro de mercurio (HgCl_2 , Sigma) en ácido nítrico al 1% v/v y se almacenaron en frascos ámbar a 4°C.

La solución patrón del estándar interno (1000 mgBi l^{-1}) fue preparada por disolución de nitrato de bismuto (Sigma) en 1% v/v de ácido nítrico. Todas las soluciones de trabajo fueron preparadas diariamente mediante dilución apropiada.

Se utilizaron los siguientes reactivos; ácido perclórico (Baker), ácido fosfórico (Aldrich), ácido nítrico (Fluca), ácido clorhídrico (Merck), L-cisteína (Sigma-Aldrich), N-acetilcisteína (Sigma-Aldrich), fosfato de amonio dibásico (Sigma), trietilamina (Fluka), hidróxido de potasio (Sigma), hidróxido de sodio (Fluka) y material de referencia certificado DORM-2 (dogfish muscle, valor certificado para mercurio total: $4.64 \pm 0.26 \text{ mg kg}^{-1}$; y metilmercurio: $4.47 \pm 0.32 \text{ mg kg}^{-1}$) fue del Consejo Nacional de Investigación, Canada.

Análisis HPLC-ICP-MS. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de Agilent serie 1050, el eluyente de la columna fue transportado directamente al sistema de introducción del espectrometro de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) vía tubería de corta longitud. La columna cromatográfica fue Gemini C18 (150 x 3 mm, 5 μm) de Phenomenex. El espectrómetro de masas fue modelo 7500ce de Agilent Technologies (Tokio, Japón) equipado con el nebulizador convencional tipo Meinhard para la determinación de mercurio total y el nebulizador MiraMist Teflón para el análisis de especiación de mercurio. La cámara de niebla tipo Peltier fue operada a 2°C. El procedimiento de tuning fue realizado diariamente usando la solución diluida de Agilent la cual contiene Li, Y, Tl, Ce en una concentración de $1 \mu\text{g l}^{-1}$ cada uno. Las condiciones de operación instrumental para el ICP-MS y el sistema cromatográfico se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones instrumentales del sistema HPLC-ICP-MS para la especiación de mercurio en tejido de pescado fresco y atún enlatado.

ICP-MS. Determinación de mercurio total	
Potencia	1500 W
Gas nebulizador	0.91 ml min^{-1}
Gas make-up	0.17 ml min^{-1}
Introducción de la muestra	Meinhard nebulizer
Conos muestra y skimmer	Platino
Isotopos monitoreados	^{200}Hg , ^{202}Hg , ^{209}Bi
Modo de adquisición	Spectrum analysis
Tiempo de integración	100 ms
HPLC-ICP-MS. Análisis de especiación de mercurio	
Columna cromatográfica	C18 (150 x 3 mm, 5 μm)
Fase móvil	2.5 mmol l^{-1} N-acetilcisteína, 12.5 mmol l^{-1} $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.05% trietilamina, pH 7:metanol (96:4, v/v)
Temperatura	Ambiente

Flujo	0.6 ml min ⁻¹
Volumen inyectado	20 µl
Potencia	1500 W
Gas nebulizador	0.91 ml min ⁻¹
Gas make-up	0.17 ml min ⁻¹
Introducción de la muestra	MiraMist Teflón® nebulizer
Conos muestra skimer	Platino
Isotopos monitoreados	²⁰⁰ Hg, ²⁰² Hg, ²⁰⁹ Bi
Modo de adquisición	Time-resolved anlysis
Tiempo de integración	60 ms

Digestión de muestras y determinación de Hg total por ICP-MS. Se colocó una alícuota (250 mg) de muestra fresca en un tubo de vidrio (10 ml), a la cual se le adicionaron 250 µl de solución estándar interno (2 mg l⁻¹ In, Y, Bi, Rh; 5 mg l⁻¹ de Sc; y 10 mg l⁻¹ de Li), 1 ml de ácido nítrico concentrado y 750 µl de agua desionizada. La digestión asistida por microondas se llevó a cabo utilizando el equipo Discover SP-D (CEM) con el siguiente programa: temperatura 150 °C, rampa de temperatura 3 min, tiempo de reacción 6 min, presión máxima 300 psi y agitación alta. Después, las muestras fueron centrifugadas (13000 g, 10 min), y 200 µl de cada muestra se diluyó 25 veces con agua desionizada para ser introducidas en el sistema de ICP-MS. Los isotopos ²⁰⁰Hg y ²⁰²Hg fueron monitoreados y sus señales fueron normalizados por la del estándar interno (²⁰⁹Bi). La calibración se realizó usando soluciones estándar mixtas que contenían 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 25, 50 µg l⁻¹ de Hg y el estándar interno de Bi 10 µg l⁻¹.

Especiación analítica de mercurio por HPLC-ICP-MS. Se pesaron alícuotas de 250 mg de tejido fresco en tubos de vidrio de 10 ml, 25 µl de estándar interno (1000 µgBi l⁻¹) fueron adicionados y se procedió a su homogenización (politron) en presencia de ácido perclórico (1.3 ml, 0.6 mol l⁻¹), N-acetilcisteína (500 µl, 0.75 mol l⁻¹) y 500 µl de una mezcla tolueno:metanol (1:1, v/v) de 0.5 a 2 minutos, dependiendo de la muestra. Enseguida las muestras fueron colocadas en un baño de ultrasonido por 1 h, centrifugadas durante 10 min a 3 000 x g y se tomaron 1000 µl de la fase acuosa a la cual se le agregaron 70 µl de hidróxido de potasio 9 mol l⁻¹ para neutralizar el exceso de ácido perclórico (precipitación del KClO₄) y 30 µl de ácido acético para ajustar a un pH 5. Nuevamente, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min 10 000 x g. Después de la centrifugación, el sobrenadante se diluyó con la fase móvil (1:2, v/v) y se introdujo al sistema HPLC-ICP-MS.

Las condiciones de separación y detección se resumen en la Tabla 4. La calibración fue realizada de manera similar a la preparación de las muestras mediante soluciones estándar que contenían Hg⁺ y CH₃Hg⁺ en concentraciones de 0, 2.5, 5, 10, 25 y 50 µg l⁻¹ de mercurio cada uno y 10 µg l⁻¹ de Bi³⁺ como estándar interno.

Para los experimentos de recuperación, junto con el EI, al tejido fresco se agregaron las especies mercuriales (Hg^+ y CH_3Hg^+) para obtener concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Hg en soluciones finales. El blanco siempre se corrió en paralelo con las muestras.

IV.2.3. Resultados y discusión

El objetivo de este trabajo fue, afinar el procedimiento desarrollado anteriormente [153], enfocándose en la disminución de la señal del blanco y llevando a cabo la digestión en un sistema de microondas.

En la preparación de la muestra se utilizó una etapa de homogenización/extracción con ácido perclórico, tolueno-metanol y N-acetilcisteína. La N-acetilcisteína fue utilizada en sustitución de cisteína, para acomplejar Hg^{2+} y CH_3Hg^+ formando los compuestos solubles en agua. En cuanto al EI, se optó por el mismo ión bismuto que en trabajo anterior debido a su afinidad al grupo sulfhidrido presente en la N-acetilcisteína (similar a la del mercurio) y debido a su ausencia en la muestra original (se verificó experimentalmente). Cabe resaltar que el tratamiento de muestra se realiza en tres fases: (1) el precipitado de proteínas (ácido perclórico), (2) eliminación de lípidos descartando la (fase orgánica (tolueno) (3) recuperación de la fase agua-metanol que contiene los complejos de las especies de mercurio y del bismuto con N-acetilcisteína extraídos de muestra. La señal analítica se define como la relación entre el área del pico cromatográfico de la especie de mercurio respecto al área del pico cromatográfico de bismuto, lo que permite reducir los errores analíticos relacionados con cambios en rendimientos de extracción, mediciones de volúmenes, imprecisiones en la interface HPLC-ICP-MS, etc.

Se analizaron seis marcas diferentes de atún enlatado y tres tipos diferentes de pescado fresco las cuales fueron adquiridas en mercados locales de la ciudad de Guanajuato, México. Estas muestras fueron dirigidas y analizadas por ICP-MS para obtener el contenido total de mercurio ($c(\text{Hg})$ en μg de Hg por kg del tejido fresco) y así poder evaluar el rendimiento de extracción de las especies de mercurio en las muestras. Aparte, se determinó el porcentaje de humedad en las muestras el cual estuvo en un rango del 77.8 – 82.1 %. En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos, del contenido total de mercurio, para tres réplicas de cada muestra, así como el resultado obtenido para el material de referencia DORM-2. Por otro lado, los resultados obtenidos en las muestras se encuentran en el intervalo de concentraciones de mercurio total reportado por la FDA obtenido en el programa de monitoreo (1999-2004): 230 – 1670 $\mu\text{gHg kg}^{-1}$ masa fresca para músculo en el Golfo de México [154]. Además, los resultados en este estudio estuvieron en el rango de no detectables – 667 $\mu\text{gHg kg}^{-1}$ (referido a masa húmeda) y fueron consistentes con los reportado en Turquía (no detectables – 114 $\mu\text{gHg kg}^{-1}$) [155], Libia (200 – 660 $\mu\text{gHg kg}^{-1}$) [156] y en EE.UU (53 – 740 $\mu\text{gHg kg}^{-1}$) [157].

kg⁻¹) [157]. Finalmente, la concentración encontrada para Hg total en DORM-2 fue 4.51 ± 0.25 mg kg⁻¹, de acuerdo con el valor certificado 4.64 ± 0.26 mg kg⁻¹.

Tabla 5. Resultados de la determinación de Hg total en diferentes marcas de atún enlatado y pescado fresco comercializado en la ciudad de Guanajuato, México, así como el resultado obtenido para el Material de Referencia DORM-2, obtenidos por ICP-MS. Se presentan los valores promedios con sus respectivas desviaciones estándar, basados en tres repeticiones independientes.

Muestra	Hg total, promedio \pm DE, $\mu\text{g kg}^{-1}$
Atún A	25.9 ± 3.1
Atún B	17.8 ± 3.6
Atún C	391 ± 20
Atún D	107 ± 14
Atún E	319 ± 29
Atún F	85.3 ± 29.4
Pescado carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	12.3 ± 2.7
Pescado huachinango (<i>Lutjanus campechanus</i>)	n.d
Aleta de mantarraya	667 ± 9
DORM-2* (4.64 ± 0.26 mg kg ⁻¹)	$4.51 \pm 0.3^*$

*mgHg kg⁻¹

Los resultados obtenidos por ICP-MS confirman que la determinación de Hg en atún enlatado y pescado fresco es necesaria para el control de la calidad de los alimentos, sin embargo es necesario llevar a cabo el estudio de especiación en estas muestras para así conocer el contenido de CH₃Hg⁺, la que es una de las especies más tóxicas de mercurio y la que mayormente se encuentra en productos marinos.

Debido al cambio de cisteína por N-acetilcisteína, fue necesario revisar las condiciones de separación cromatográfica reportadas anteriormente, para lo cual se tomaron en cuenta dos aspectos: (1) la resolución y separación de las especies de mercurio en tiempo relativamente corto y (2) compatibilidad de la composición de la fase móvil con la detección por ICP-MS. Para ello, se decidió utilizar una elución isocrática, baja concentración de sales inorgánicas y del modificador orgánico con el fin de asegurar la estabilidad del plasma, obtener una señal de línea base baja y estable, así como buena sensibilidad en la determinación de mercurio.

Las condiciones de la celda fueron optimizadas variando el flujo de He y midiendo la relación entre la señal del mercurio y señal de blanco.

En una primera instancia fueron estudiados los blancos obtenidos utilizando N-acetilcisteína y L-cisteína con el fin de comparar el efecto de la posible contaminación por Hg²⁺. En la Fig. 14. se presentan los cromatogramas de HPLC-ICP-MS obtenidos para estos dos compuestos complejantes en donde se observa que la intensidad de la señal para Hg²⁺ es 5 veces mayor para L-cisteína en comparación con la N-acetilcisteína por lo cual esta última se utilizó para realizar los estudios de

especiación de mercurio con EI de Bi. Así mismo, se observó que con N-acetilcisteína se obtiene una mejor retención en la columna de Hg^{2+} y de Bi^{3+} .

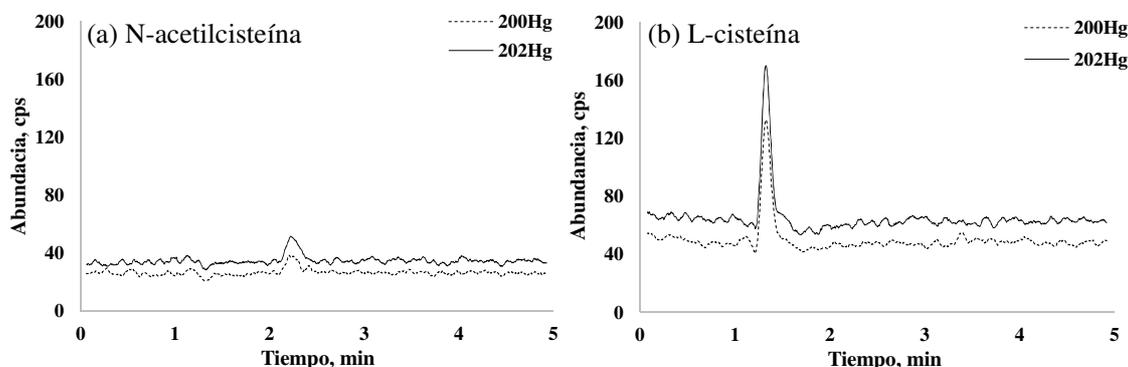


Fig. 14. Cromatograma HPLC-ICP-MS obtenido en el análisis de soluciones blanco con: a) N-acetilcisteína y b) L-cisteína (condiciones de separación y detección se presentan en Tabla 4).

En la Fig. 15. se presenta como ejemplo un cromatograma obtenido en el análisis de una solución estándar de las dos especies de mercurio ($25 \mu\text{gHg l}^{-1}$ de cada una) con EI de Bi ($10 \mu\text{gHg l}^{-1}$). El tiempo total de separación en línea de las especies se obtuvo en 4.0 minutos. Los tiempos de retención obtenidos fueron para mercurio inorgánico de 2.25 ± 0.05 min y metilmercurio de 3.20 ± 0.07 min ($n=5$) respectivamente. La elución de bismuto fue con el tiempo de retención de 2.52 ± 0.09 min. Los tiempo de elución de las especies de mercurio y bismuto indican una mejor separación cromatográfica en comparación con el procedimiento ya establecido, donde se utiliza L-cisteína y en el cual el mercurio inorgánico y el bismuto co-eluyen a un tiempo de 1.31 ± 0.02 [153]. Por otro lado, en la Fig. 15 se confirma la formación de complejos de Bi^{3+} , CH_3Hg^+ y Hg^{2+} con N-acetilcisteína, asegurando la función adecuada del EI en la especiación de mercurio por HPLC-ICP-MS.

El uso de la técnica de ICP-MS permite obtener la información cuantitativa de los elementos (Hg y Bi) debido a su alta selectividad y, por lo tanto, la posibilidad de recompensar por incompleta resolución cromatográfica.

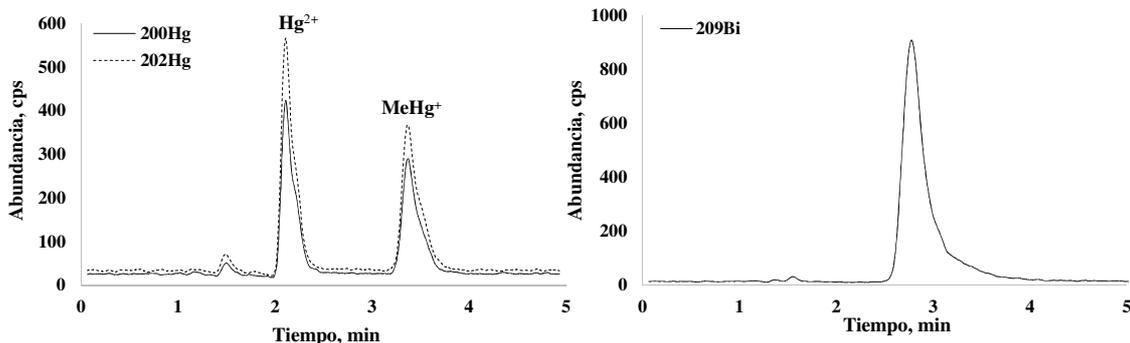


Fig. 15. Cromatogramas HPLC-ICP-MS obtenido en el análisis de una solución estándar de las especies de mercurio ($25 \mu\text{gHgHg l}^{-1}$ de cada una) y de EI ($10 \mu\text{gBiHg l}^{-1}$).

En la tabla 6 se muestran los parámetros analíticos obtenidos en el proceso de calibración. La cuantificación de la señal analítica se definió como la relación entre áreas de los picos cromatográficos de las especies de Hg respecto al EI de Bi.

Tabla 6. Parámetros analíticos evaluados para las dos especies de mercurio.

Parámetros	Hg^{2+}		MeHg^+	
Tiempo de retención \pm DE, min	2.0 ± 0.05		3.2 ± 0.07	
Rango de calibración, $\mu\text{gHg l}^{-1}$	2.5 - 50		2.5 - 50	
Señal	Área de pico			
Isotopo	^{200}Hg		^{202}Hg	
Señal analítica	$^{200}\text{Hg}/^{209}\text{Bi}$	$^{202}\text{Hg}/^{209}\text{Bi}$	$^{200}\text{Hg}/^{209}\text{Bi}$	$^{202}\text{Hg}/^{209}\text{Bi}$
R^2	0.9987	0.9997	0.9945	0.9998
LD, $\mu\text{gHg l}^{-1}$	1.0	0.54	1.0	0.63
LC, $\mu\text{gHg l}^{-1}$	3.3	1.9	3.4	2.1

Asimismo, se observan valores más bajos para los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) de las dos especies utilizando el isotopo ^{202}Hg , por lo cual este isotopo se seleccionó para realizar cuantificación de especies de mercurio en muestras de atún enlatado y pescado fresco. En la Fig. 16. se muestra el cromatograma HPLC-ICP-MS de una de las marcas de atún enlatado, junto con el cromatograma del blanco y dos cromatogramas obtenidos para la misma muestra después de adición de estándar de cada especie de mercurio (5 y $10 \mu\text{gHg l}^{-1}$); en esta Figura se observa la elución de las especies de mercurio con buena concordancia en tiempos de retención con los obtenidos para las soluciones estándar.

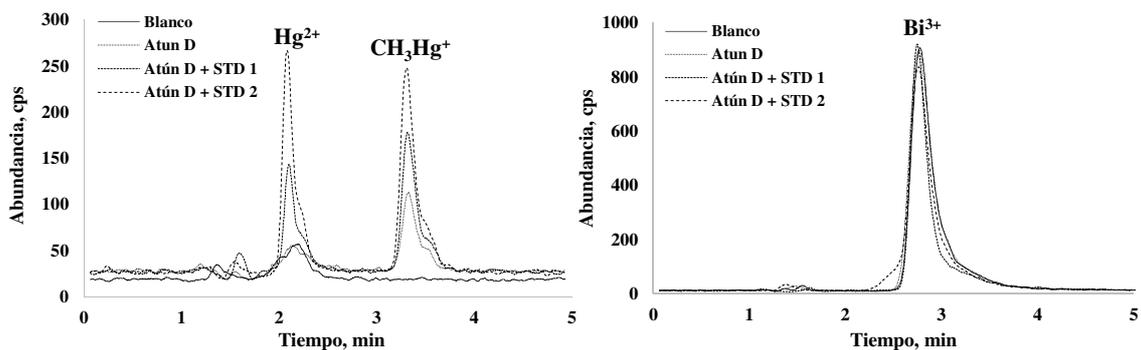


Fig. 16. Cromatogramas HPLC-ICP-MS obtenidos en el análisis de una muestra de atún enlatado, el blanco, dos adiciones estándar a la muestra de atún enlatado (5 y 10 $\mu\text{gHg l}^{-1}$) y el EI (10 $\mu\text{gBi l}^{-1}$).

Se llevó a cabo la cuantificación del mercurio inorgánico y de metilmercurio en $\mu\text{g Hg}$ por kg de masa fresca utilizando el procedimiento propuesto. La recuperación de especies de mercurio en el procedimiento de especiación (%E) se evaluó, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% E = \frac{(c(\text{Hg}^{2+}) + c(\text{CH}_3\text{Hg}^+))}{c(\text{Hg})} \times 100 \%$$

En estos experimentos se obtuvieron valores de %E entre 91.2 – 115. La cuantificación de las dos especies de mercurio (Hg^{2+} y CH_3Hg^+) en muestras de tejido fresco se llevó a cabo considerando las áreas de los picos $^{202}\text{Hg}/^{209}\text{Bi}$. Los resultados obtenidos mediante la calibración se presentan en la Tabla 7. Además, para la validación del procedimiento propuesto se analizó el Material de Referencia DORM-2 con el valor certificado para CH_3Hg^+ de $4.47 \pm 0.32 \text{ mg kg}^{-1}$ y para Hg total de $4.64 \pm 0.26 \text{ mg kg}^{-1}$ cuyos valores fueron en buena concordancia con los resultados obtenidos por HPLC-ICP-MS y los cuales se presentan en la Tabla 8 y en la Fig. 17. se presenta un cromatograma HPLC-ICP-MS del Material de Referencia DORM-2 con EI en el cual se observan similares tiempos de retención para las especies de mercurio y del EI, a los obtenidos en otro tipo de muestras.

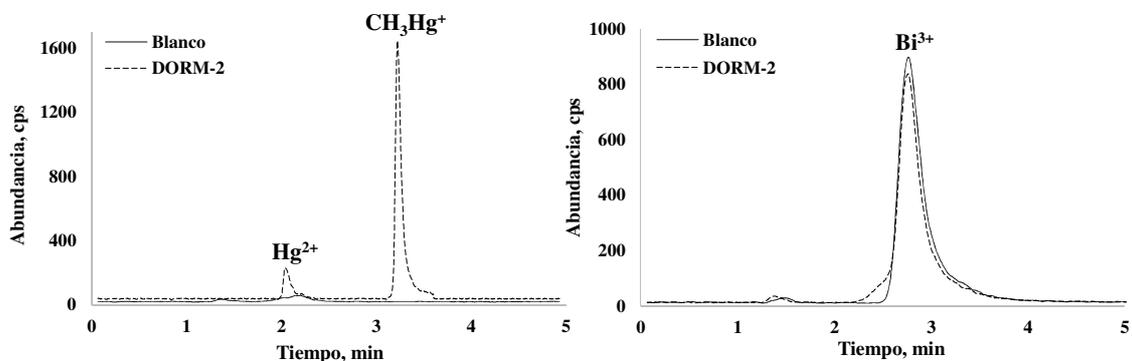


Fig. 17. Cromatograma HPLC-ICP-MS obtenido del análisis del Material de Referencia DORM-2 y un blanco con EI (10 $\mu\text{gBi l}^{-1}$).

Tabla 7. Resultados de la determinación de las especies de mercurio en atún enlatado y tejido de pescado fresco (n=3).

Muestra	Hg total	Especies de Hg, promedio \pm DE, $\mu\text{gHg kg}^{-1}$		% E
	$\mu\text{gHg kg}^{-1}$	Hg ²⁺	CH ₃ Hg ⁺	
Atún A	25.9 \pm 3.1	nd	23.6 \pm 1.9	97.7
Atún B	17.8 \pm 3.6	nd	15.5 \pm 3.8	115
Atún C	391 \pm 20	nd	431 \pm 15	115
Atún D	107 \pm 14	nd	109 \pm 11	90.8
Atún E	319 \pm 29	nd	283 \pm 52	113
Atún F	85.3 \pm 29.4	nd	93.5 \pm 5.9	91.2
Pescado carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	12.3 \pm 2.7	nd	11.5 \pm 1.1	107
Pescado huachinango (<i>Lutjanus campechanus</i>)	n.d	nd	nd	-
Aleta de mantarraya	667 \pm 8	nd	648 \pm 41	103
DORM-2*	4.51 \pm 0.25*	0.170 \pm 0.022*	4.49 \pm 0.18*	103

*mgHg kg⁻¹

Tabla 8. Resultados de la determinación de las especies de mercurio en el Material de Referencia DORM-2 y su comparación con el valor certificado.

Material de referencia	Hg total mgHg kg ⁻¹	Hg ⁺ mgHg kg ⁻¹	CH ₃ Hg ⁺ mgHg kg ⁻¹
DORM-2, valor certificado	4.64 \pm 0.26	-	4.47 \pm 0.32
DORM-2, ICP-MS	4.51 \pm 0.25	-	-
DORM-2, ICP-MS-HPLC	-	0.170 \pm 0.22	4.49 \pm 0.18

La concordancia entre los valores obtenidos entre ICP-MS y HPLC-ICP-MS y la buena relación obtenida por el Material de Referencia DORM-2, es una indicación de que se obtuvo una buena exactitud de los resultados para ambas especies. En conclusión, el procedimiento propuesto en este trabajo que consiste en la adición de Bi³⁺ como EI, el tratamiento de muestra con el ácido perclórico, tolueno:metanol y N-acetilcisteína y la separación/cuantificación por HPLC-ICP-MS puede ser utilizado en la especiación de mercurio en atún enlatado y pescado fresco.

Los factores de recuperación de las especies Hg²⁺ y CH₃Hg⁺ en atún enlatado y pescado fresco fueron evaluados aplicando la ecuación recomendada por la IUPAC [158].

$$\% \text{RA} = \frac{\text{CDA}(\text{Muestra} + \text{Estándar}) - \text{CDA}(\text{Muestra})}{\text{CA}(\text{Estándar})} * 100$$

Donde:

CDA: Concentración detectada de la especie A (Hg²⁺ o CH₃Hg⁺ en $\mu\text{g kg}^{-1}$).

CA: Concentración adicionada de la especie A (Hg²⁺ o CH₃Hg⁺ en $\mu\text{g kg}^{-1}$).

RA: Porcentaje de recuperación de la especie A.

Mediante el empleo de esta ecuación se cumplió el objetivo de evaluar los rendimientos de recuperación de cada especie (Hg^{2+} y CH_3Hg^+) en atún enlatado y tejido fresco de pescado. Los resultados de rendimiento obtenido por HPLC-ICP-MS para estas especies en términos de la concentración de mercurio inorgánico ($c(\text{Hg}^{2+})$, $\mu\text{gHg kg}^{-1}$ masa fresca), de metilmercurio ($c(\text{CH}_3\text{Hg}^+)$, $\mu\text{gHg kg}^{-1}$ masa fresca) se muestran en la Tabla 9. Como se puede observar en esta Tabla, los porcentajes de recuperación obtenidos indican aceptable exactitud de los resultados.

Tabla 9. Porcentajes de recuperación de las especies Hg^{2+} , CH_3Hg^+ con adición en forma separada para cada especie en atún enlatado y tejido de pescado.

Muestra	Hg^{2+} ($\mu\text{gHg kg}^{-1}$ masa fresca) \pm DE		CH_3Hg^+ ($\mu\text{gHg kg}^{-1}$ masa fresca) \pm DE		% RA	
	Adicionada	Detectada	Adicionada	Detectada	Hg^{2+}	CH_3Hg^+
Atún A	0	Nd	0	23.5 ± 1.9		
	50	45.3 ± 0.5	50	87.0 ± 2.8	90.5	127
	100	93.1 ± 4.7	100	112 ± 6	93.1	88.4
Atún B	0	Nd	0	15.5 ± 3.8		
	50	54.3 ± 1.9	50	59.2 ± 1.1	109	87.5
	100	112 ± 12	100	108 ± 6	87.5	92.6
Atún C	0	Nd	0	431 ± 15		
	50	40.4 ± 3.9	50	481 ± 11	80.9	102
	100	76.0 ± 1.8	100	525 ± 2	76.0	94.9
Atún D	0	Nd	0	109 ± 11		
	50	41.8 ± 0.4	50	150 ± 4	83.5	81.0
	100	93.3 ± 9.3	100	202 ± 13	93.3	92.7
Atún E	0	Nd	0	283 ± 52		
	50	42.3 ± 10.3	50	337 ± 36	84.6	109
	100	86.3 ± 17.3	100	406 ± 11	86.3	123
Atún F	0	Nd	0	93.5 ± 5.9		
	50	45.4 ± 4.1	50	152 ± 12	90.8	116
	100	95.4 ± 1.6	100	193 ± 3	95.4	123
Pescado carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	0	Nd	0	11.5 ± 1.1		
	50	45.7 ± 4.3	50	57.5 ± 1.4	91.5	91.0
	100	95.0 ± 6.7	100	105 ± 14	95.0	93.7
Pescado huachinango (<i>Lutjanus campechanus</i>)	0	Nd	0	nd		
	50	43.5 ± 2.9	50	47.7 ± 5.2	87.0	95.4
	100	93.9 ± 1.5	100	94.3 ± 2.3	94.0	94.3
Aleta de mantarraya	0	Nd	0	648 ± 41		
	50	45.7 ± 4.3	50	694 ± 6	91.5	91.0
	100	95.0 ± 6.7	100	775 ± 28	95.0	127

IV.2.4. Conclusiones

Se ha modificado el procedimiento analítico para la especiación de mercurio inorgánico (Hg^{2+}) y metilmercurio (CH_3Hg^+) en atún enlatado y tejido de pescado fresco. La novedad consistió en proponer N-acetilcisteína como un acomplejante de las especies de Hg^{2+} , CH_3Hg^+ y Bi^{3+} (EI). La elección del EI fue con base en las similitudes entre iones Bi y Hg en términos de tamaño y carga, así como la afinidad al grupo $-\text{SH}$ en N-acetilcisteína. Por otro lado, la capacidad de análisis multielemental de la técnica ICP-MS ha permitido registrar las señales de mercurio y del EI simultáneamente. De manera igual como en el procedimiento original, la homogenización y extracción de especies de mercurio y de EI se llevó a cabo en una sola etapa, agregando al tejido fresco el ácido perclórico, la N-acetilcisteína (en lugar de cisteína) y la mezcla tolueno:metanol inmediatamente antes de la homogenización con ayuda de un politrón. Para mejorar el rendimiento de la extracción, se colocó la mezcla obtenida en el baño de ultrasonido.

Se obtuvieron los valores más bajos de límites de detección (LD) para Hg^{2+} y CH_3Hg^+ , 0.54 y 0.63 $\mu\text{gHg l}^{-1}$ respectivamente, utilizando el isótopo ^{202}Hg , así como una mejor linealidad (R^2 0.9997 y 0.9998 para Hg^{2+} y CH_3Hg^+ respectivamente) en comparación con los resultados obtenidos para ^{200}Hg . Asimismo, se ha demostrado que el procedimiento propuesto presenta una buena exactitud debido a la concordancia entre los valores obtenidos entre ICP-MS y HPLC-ICP-MS y los resultados congruentes con valores certificados para Hg el Material de Referencia DORM-2. Además, los resultados obtenidos en el análisis de varios productos de pescado adquiridos en mercados locales para mercurio total estuvieron en el intervalo de no detectable hasta 667 $\mu\text{gHg kg}^{-1}$ (referido a masa fresca) lo que indica que todas las muestras analizadas están por debajo del nivel de acción establecido por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

El procedimiento propuesto ser recomendado para la determinación de dos especies de en muestras de pescado y atún enlatado, proporcionando datos que pueden ser directamente comparados con valores establecidos por diferentes regulaciones gubernamentales (concentración de Hg en masa fresca).

IV.3. Aplicación de MALDI-TOFMS en combinación con el método de mínimos cuadrados parciales (PLS2) para la determinación de mercurio y cobre en pescado, utilizando ditizona como agente acomplejante y Ag(I) como estándar interno

IV.3.1. Introducción

La determinación de trazas de metales/metaloideos en alimentos es muy demandada y existe un gran número de técnicas de espectrometría atómica disponibles para este tipo de análisis [159]. Entre ellas, destaca la espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) debido a su alto poder de detección, amplio rango dinámico, capacidad multi-elemental e isotópica; sin embargo, las interferencias espectrales y el alto costo del análisis a veces se consideran como sus puntos débiles [159-162]. Como alternativa, la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, por sus siglas en inglés) con una fuente de ionización suave puede ser usada con un enfoque cuantitativo con la ventaja adicional de confirmación/identificación de especies químicas en una variedad de matrices [162-165].

Las principales características de la espectrometría de masas de alta resolución con ionización/desorción láser asistida por matriz (MALDI-HRMS, por sus siglas en inglés) incluyen una gran rapidez en la adquisición de los datos, capacidad de análisis de especies polares y no-polares en un amplio rango de valores de m/z , simplicidad de procedimientos a microescala y alta sensibilidad. Esta técnica ha demostrado su potencial para el análisis de moléculas grandes que contienen metales, como las metaloproteínas, biomoléculas que contienen metales en su estructura y otro tipo de compuestos a los que se introduce ion metálico intencionalmente como un marcador, logrando una mejor selectividad y detectabilidad de ciertas moléculas [166-170]. Además, MALDI-HRMS también se ha utilizado para estudiar los mecanismos de reacción y para la elucidación estructural de complejos metálicos [171-174]. Por otra parte, las aplicaciones para la cuantificación de pequeñas moléculas que contienen metales (por debajo de m/z 800) han sido pocas [175, 176] principalmente debido al ruido de fondo causado por los iones relacionados con la matriz y la incierta homogeneidad de la muestra co-cristalizada con la matriz [163, 177].

En los últimos años, la investigación se ha centrado en mejorar el rendimiento analítico de la desorción/ionización por láser (LDI) para moléculas pequeñas. Se han probado diferentes mezclas de matrices comerciales y se han propuesto nuevos compuestos químicos [177-180]; en paralelo, varias técnicas de LDI asistidas por cierto tipo de superficie fueron desarrolladas y algunas de ellas se usaron para la determinación de metales [181]. Estas técnicas están libres de matrices volátiles y proporcionan una buena tolerancia a las sales u otros contaminantes; sin embargo, la eficacia de la desorción/ionización del analito depende en gran medida de la naturaleza química y del tamaño del nanomaterial aplicado en la superficie; además, a menudo se ha reportado que LDI es menos eficiente

con respecto a la matriz química convencional [182-185]. A pesar de los avances recientes, MALDI-HRMS continúa siendo una técnica conveniente y fácil de utilizar para el análisis de rutina de moléculas pequeñas en muestras reales [186].

Esta parte de trabajo ha sido enfocada en el análisis de Hg y Cu en pescado fresco y diferentes marcas de atún enlatado utilizando MALDI-TOFMS con matriz química comercial. El mercurio fue seleccionado como un típico metal tóxico que se acumula en organismos acuáticos y entra en la cadena alimenticia [187]. El papel esencial del segundo elemento, el cobre, está bien documentado, pero su homeostasis puede verse afectada debido a la ingesta dietética insuficiente o excesiva que conduce al aumento del estrés oxidativo y al aumento del riesgo de varias patologías relacionadas [188, 189]. La determinación de estos dos elementos se realizó utilizando la técnica convencional de MALDI combinada con la espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOFMS). La estrategia aplicada para lograr un rendimiento analítico comparable al de ICP-MS incluye los siguientes pasos: (i) extracción de los analitos en forma de sus complejos con ditizona y la eliminación del exceso de ditizona; (ii) el uso de plata (Ag(I)) como estándar interno (EI); (iii) selección de una matriz química adecuada; (iv) ajuste de la relación entre cantidades de muestra y matriz y de los parámetros instrumentales para lograr la mayor relación señal/ruido posible; (v) aplicación del método de mínimos cuadrados parciales (PLS2) para la predicción multivariable de Hg y Cu. Una vez que se establecieron las condiciones finales, los resultados obtenidos en el análisis de varias muestras de pescado fresco fueron similares a los obtenidos por ICP-MS. El procedimiento propuesto utilizando MALDI-TOFMS con cuantificación PLS2 parece ser una alternativa atractiva para la determinación de metales traza en alimentos debido a la dimensión a microescala, la simplicidad, una rápida adquisición/procesamiento de datos, y un menor costo del análisis en comparación con cualquier técnica de espectrometría atómica.

IV.3.2. Parte experimental

Material y métodos

Reactivos y muestras. Todos los reactivos fueron de grado analítico de pureza. Agua desionizada (18.2 M Ω cm, Labconco); metanol grado HPLC, acetona, acetonitrilo, ciclohexano y cloroformo (Sigma) fueron utilizados.

Soluciones estándar de cobre, mercurio y plata (1000 mg l⁻¹ cada una) fueron de Sigma y la mezcla de estándares internos para espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) fue de Agilent Technologies. Se usaron los siguientes reactivos Sigma: ditizona (Dz), ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA), ácido nítrico, ácido clorhídrico, hidróxido

de amonio, hidróxido de sodio, peróxido de hidrogeno, formiato de amonio, sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Material de referencia certificado DORM-2 (dogfish muscle, valor certificado para mercurio total: $4.64 \pm 0.26 \mu\text{g g}^{-1}$) fue del Consejo Nacional de Investigación, Canada; también se usaron hojas de cítricos NIST1572 con valores de referencia para Cu $16.5 \pm 1.0 \mu\text{g g}^{-1}$ y para Hg $80 \pm 20 \mu\text{g g}^{-1}$.

Seis productos de atún enlatado (A-F) fueron comprados en un mercado local en la ciudad de Guanajuato, México, y fueron liofilizados antes del análisis. El tejido de pargo rojo liofilizado se usó para la evaluación de los límites de cuantificación de MALDI-TOFMS; el análisis por ICP-MS de esta muestra mostró una concentración de Cu $183 \pm 5 \mu\text{g kg}^{-1}$ y no se detectó mercurio en esta muestra.

Procedimientos de limpieza

El reactivo de ditizona se oxida fácilmente y generalmente contiene trazas de iones metálicos [190]. En este trabajo, se utilizó siempre solución recién purificada de ditizona 0.01 % m/v en metanol. Para ello, se extrajeron 250 mg de Dz con 50 ml de cloroformo (vortex, 5 min); enseguida, se tomó la fase orgánica y se agregaron 25 ml de hidróxido de amonio (1% m/v). La Dz re-extraída en la fase acuosa, se precipito mediante la adición gota a gota de ácido clorhídrico 6 mol l^{-1} y el sedimento fue recuperado. El procedimiento se repitió tres veces y la solución se preparó disolviendo 50 mg de polvo seco en 50 ml de metanol (0.1% m/v).

Los tubos de vidrio para la digestión en microondas (10 ml) y los tubos falcón de polipropileno BlueCap (15 ml) se limpiaron llenándolos con ácido nítrico al 10 % v/v (24 h) y luego enjuagando con agua desionizada. Las impurezas residuales de metales traza se acomplejaron con ditizona (0.01% m/v en metanol) y se extrajeron en cloroformo. Finalmente, los tubos se enjuagaron tres veces con agua desionizada.

Digestión de muestras y determinación de Hg y Cu por ICP-MS. Se colocó una alícuota (200 mg) del material liofilizado en un tubo de vidrio, a la cual se le adicionaron 250 μl de solución estándar interno (2 mg l^{-1} de In, Y, Bi, Rh; 5 mg l^{-1} de Sc; y 10 mg l^{-1} de Li), 1 ml de ácido nítrico concentrado y 750 μl de agua desionizada. La digestión asistida por microondas se llevó a cabo utilizando el equipo Discover SP-D (CEM) con el siguiente programa: temperatura 150 °C, rampa de temperatura 3 min, tiempo de reacción 6 min, presión máxima 300 psi y agitación alta. Después, las muestras fueron centrifugadas (13000 g, 10 min), y 200 μl de cada muestra se diluyó 25 veces con agua desionizada para ser introducidas en el sistema de ICP-MS. Se utilizó un espectrómetro de masas de plasma acoplado inductivamente (Modelo 7500ce; Agilent Technologies) con un nebulizador Meinhard y cámara de niebla tipo Peltier (2°C), con las condiciones instrumentales de funcionamiento descritas anteriormente [191, 192]. Los isótopos ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{200}Hg , ^{202}Hg , ^{107}Ag , ^{109}Ag fueron

monitoreados y estandarizados por las señales de ^{89}Y y ^{209}Bi respectivamente. La calibración se realizó utilizando soluciones estándar mixtas que contenían 0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 25, 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Hg y Cu y los estándares internos, Y y Bi (10 $\mu\text{g l}^{-1}$ cada uno). Los límites de detección fueron de 51 ng l^{-1} para Cu y 150 ng l^{-1} para Hg; los límites de detección del método se evaluaron usando el tejido digerido de pargo rojo diluido 20 veces obteniéndose los valores de 11 ng g^{-1} y 32 ng g^{-1} , respectivamente [193]. Para verificar la exactitud, se usó el material de referencia Citrus Leaves NIST 1572; las concentraciones de cobre y mercurio encontradas en análisis por triplicado de este material, fueron de $16.3 \pm 0.5 \mu\text{gCu g}^{-1}$ y $76 \pm 2.4 \mu\text{gHg g}^{-1}$ y concordaron con los valores certificados $16.5 \pm 1.0 \mu\text{gCu g}^{-1}$ y $80 \pm 20 \mu\text{gHg g}^{-1}$ respectivamente. Para el mercurio total en el material de referencia DORM-2, se encontraron $4.62 \pm 0.09 \mu\text{g g}^{-1}$ en análisis por triplicado, y también estuvieron en consistencia con el valor certificado ($4.64 \pm 0.26 \mu\text{g g}^{-1}$).

Mediciones espectrofotométricas UV/Vis. Una serie de soluciones de estándares individuales (5 ml, 5 mg l^{-1} de Cu(II), Hg(II) y Ag(I)) fueron preparadas el pH de 1 a pH 7 y cada una de ella fue mezclada con 1 ml de ditizona (0.01 % m/v en metanol); enseguida se llevó a cabo su extracción con 1 ml de ciclohexano y los espectros de absorción UV/Vis se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro de microplacas Multiscam GO (Thermo Scientific). Para cada solución, se registró su máximo de absorbancia; complejo de cobre (548 nm), mercurio (484 nm) y plata (462 nm).

Análisis de los complejos de ditizona por ESI-QTOF y MS/MS. Soluciones estándar de los iones metálicos individuales (500 μl , 5 mg l^{-1} de Cu, Hg y Ag) se prepararon ajustando el pH 3 con formiato de amonio 1 mol l^{-1} , enseguida se añadieron 100 μl de ditizona (0.01 % m/v en metanol) a cada tubo y la extracción se llevó a cabo con 500 μl de ciclohexano. Se recuperó la fase orgánica y se eliminó el exceso de ditizona con 200 μl de hidróxido de amonio 5 % v/v (vórtex, 1 min). La fase orgánica se evaporó (SpeedVac, 30 °C) y se reconstituyó en 500 μL de acetonitrilo. Las soluciones obtenidas se diluyeron con acetonitrilo:HCOOH 0.1 % v/v para obtener una concentración final del metal de 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ y se introdujeron directamente por infusión (3 $\mu\text{l min}^{-1}$) a la fuente ESI de un espectrómetro de masas con separador de cuadrupolo y tiempo de vuelo (maxis impact ESI-QTOF-MS equipado con Data Analysis 4.1, Bruker Daltonics). ESI fue operado en modo positivo con voltaje de rociado de 4500 V, flujo de gas nitrógeno 4 l min^{-1} , nitrógeno como gas de secado (180 °C) y presión del gas nebulizador de 0.4 bar. La calibración de masa externa se realizó en base a aductos de formiato de sodio.

Procedimiento MALDI-TOFMS. Para la digestión asistida por microondas, se colocaron 200 mg de material liofilizado en un tubo de vidrio junto con 1 ml de agua y 1 ml de ácido nítrico concentrado; y el programa de digestión se aplicó como se describió anteriormente. Enseguida, los tubos se transfirieron a una placa de calentamiento, dos porciones de 500 μl de peróxido de hidrógeno

se añadieron sucesivamente y las muestras se mantuvieron a 90 °C durante 1 h para completar la mineralización. Finalmente, las muestras se pasaron a tubos falcón de 15 ml, donde se ajustó el pH 3 mediante la adición de formiato de amonio 1 mol l⁻¹ e hidróxido de sodio 10 mol l⁻¹, y el volumen se llevó a 5 ml. Las soluciones de calibración se prepararon manteniendo el mismo volumen de 5 ml y pH 3 (ácido nítrico, formiato de amonio, hidróxido de sodio). Para la calibración univariante, las soluciones estándar mixtas contenían cobre y mercurio a 0, 10, 20, 40, 60 µg l⁻¹ cada una. Para el método de mínimos cuadrados parciales (PLS2), una serie de 21 soluciones se preparó conteniendo las concentraciones 0; 10; 20; 40; 60 µg l⁻¹ de cada analito y de acuerdo con un diseño factorial medio. Para la formación de complejos, se añadió 1 ml de una solución de ditizona 0.01% m/v en metanol la cual contenía estándar interno (Ag (I)) para garantizar la concentración de 25 µg l⁻¹ de plata en todas las soluciones analizadas. La extracción se llevó a cabo con 1.5 ml de ciclohexano y 1 minuto de vortex; después se recuperó la fase orgánica y se eliminó el exceso de ditizona por re-extracción con 500 µl de hidróxido de amonio (pH>11). Finalmente, el solvente orgánico se evaporó (30 ° C, SpeedVac) y el residuo se reconstituyó en 100 µl de acetona.

Se utilizó un equipo MALDI-TOF-MS modelo AutoFlex speed de Bruker Daltonics con el software flexControl 3.4 y flexAnalysis 3.4. Este instrumento está equipado con un láser smartbeamTM-IINd:YAG (335 nm, 532 nm, 1064 nm). Para la cristalización se utilizó el método de gota seca (dried droplet); se depositaron 0.6 µl de las soluciones de calibración o del extracto de la muestra en una placa de MALDI (MTP 384 target plate ground steel BC), de acero inoxidable, seguido de 1 µl de matriz HCCA (2 mg ml⁻¹ en acetona:agua 98:2), y se secó a temperatura ambiente. Los espectros de MS fueron adquiridos en el rango de *m/z* 560 – 725 en modo reflector positivo, utilizando una intensidad de laser del 20 % y una frecuencia de 1000 Hz.

Para cada muestra depositada en la placa de MALDI, se adquirió la suma de espectros a partir de diez réplicas de 50 disparos de láser. Para la calibración de masa interna, se utilizó el valor monoisotópico de *m/z* 615.044 correspondiente a Ag(I)-Dz.

Análisis estadístico. A los espectros MALDI-TOFMS obtenidos, se les realizó la corrección de la línea base, los datos espectrales se guardaron en Excel 2007 y fueron exportados al programa The Unscrambler (CAMO). Este software fue utilizado para realizar la regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS2).

Para la calibración de un componente, las funciones de regresión lineal se obtuvieron utilizando Microsoft Excel 2007.

Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado; se realizó una estadística descriptiva para obtener los valores promedio y las desviaciones estándar respectivas. Los resultados obtenidos por

MALDI-TOF-MS y por ICP-MS se compararon estadísticamente usando la prueba t-test (Statistica for Windows, Statsoft Inc.) con un nivel de significancia $p < 0.05$.

IV.3.3. Resultados y discusión

Selección del estándar interno, formación de complejos y condiciones de extracción.

La ditizona forma complejos 2:1 sin carga con cobre a pH 1-8 [194] y con mercurio a pH 1-4 [194-197]. Asimismo, se seleccionó plata (Ag(I)) como EI porque reacciona con la ditizona bajo condiciones similares (pH 1-5) [190] y difícilmente se encuentra en los tejidos de pescado enlatado o fresco. En efecto, plata no fue detectada por ICP-MS en ninguna de las muestras digeridas con ácido. Además, los únicos otros dos iones metálicos que forman complejos con ditizona sin carga en condiciones ligeramente ácidas son paladio y oro [190, 196, 197], los cuales tampoco fueron detectados en las muestras. Los tres complejos metálicos con ditizona (Cu(II), Hg(II) y Ag(I)) se extrajeron en fase orgánica; este paso del procedimiento ayuda a eliminar interferencias de especies polares o cargadas y permite la preconcentración. Cabe mencionar también, que es importante que la la formación de complejos cambie las señales del analito en el espectro de masas hacia valores más altos de m/z . Las condiciones experimentales para la complejación y la extracción se adoptaron a partir de estudios previos [190] y también fueron estudiados por espectrofotometría UV/Vis. Para los tres iones metálicos, se prepararon soluciones estándar de sus complejos en un rango de pH de 1-8 y se midió la absorbancia en máximo de las bandas respectivas para cada complejo: cobre (548 nm), mercurio (484 nm) y plata (462 nm). Los resultados se muestran en Figura 18, observándose que las intensidades relativamente altas de cada uno de los complejos correspondieron a las condiciones de pH de la fase acuosa cerca pH 3.

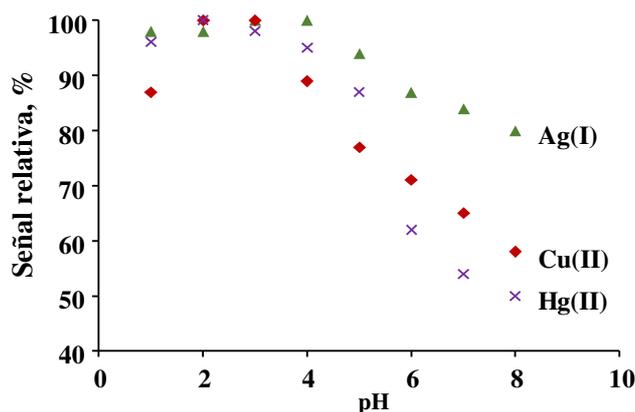


Fig. 18. Efecto de pH de la solución acuosa sobre la intensidad de las señales de los complejos después de su extracción al ciclohexano (señal relativa se calculó normalizando la absorbancia obtenida en cada una de las soluciones por el valor máximo): cobre (548 nm), mercurio (484 nm) y plata (462 nm).

Para el análisis de muestras de alimentos digeridos con ácido, se ajustó el pH a 3 mediante la adición de formiato de amonio e hidróxido de sodio, obteniéndose un volumen final de 5 ml, como se describió anteriormente. Cabe resaltar que se necesitó una digestión más eficiente de las muestras para el procedimiento con MALDI en comparación con el procedimiento por ICP-MS, porque el estándar interno (Ag (I)) presenta una alta afinidad por las especies orgánicas que interfieren con la formación de su complejo con ditizona. De hecho, después del tratamiento con agua oxigenada, las señales Ag(I)-Dz en los espectros de masas presentaron una buena repetibilidad e intensidad, lo que permitió establecer la concentración de $25 \mu\text{g l}^{-1}$ de Ag referida a 5 ml en las soluciones de calibración y de la muestra. Entre varios disolventes adecuados para la extracción de complejos metal-ditizona, se seleccionó ciclohexano debido a la baja solubilidad del ligando en este disolvente (0.14 g l^{-1}) [190]. El volumen del disolvente de 1 ml se utilizó para facilitar su evaporación en un tiempo razonable y la fluctuación de la señal debida a cambios en la eficiencia de la extracción se ajustó usando el IS. Finalmente, cabe resaltar que incluso una baja concentración de ditizona en la fase orgánica causa ruido de fondo en un intervalo de masas m/z bajo, por lo que era necesaria su eliminación por re-extracción con hidróxido de amonio.

Espectros de masas de los complejos de Cu, Hg y Ag con ditizona. Para ESI-QTOF-MS se obtuvieron los complejos individuales (como se describe en la sección V.1.2). La formación de iones con una sola carga se confirmó mediante medición de su masa exacta; los errores de masa fueron: 0.2 ppm para Cu ($\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{CuN}_8\text{S}_2$), 2.7 ppm para Hg ($\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{HgN}_8\text{S}_2$) y 1.6 ppm para Ag ($\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{AgN}_8\text{S}_2$). En la Fig. 19, se comparan los patrones isotópicos experimentales con los obtenidos teóricamente y se presentan las estructuras moleculares respectivas. Nuestros resultados indican que las especies iónicas con una sola carga en la fase gaseosa presentan una estequiometría ligando-metal 2:1 y no se produce ninguna fragmentación en la fuente de ESI, lo que coincide con un estudio previo [198]. Durante el proceso ESI, el reordenamiento de la carga dentro de las moléculas es usual y en este trabajo, se observó la reducción de Cu(II) a Cu(I) como ya se ha reportado anteriormente no solo para los complejos de ditizona [198] sino también para Cu(II) unido a aminoácidos [199], péptidos [200], 1,2,4 triazoles [201] u otros ligandos orgánicos [202, 203].

Los resultados de ESI-QTOFMS y MALDI-QTOFMS sugieren que la estructura de los complejos metálicos también se conservaría la misma en ambos procesos de ionización. De hecho, para cada uno de los tres complejos metálicos, las señales más intensas que contienen estos complejos en los espectros MALDI-TOFMS coinciden con los valores de m/z y con los patrones isotópicos obtenidos usando la ionización por electronebulización. Los patrones isotópicos experimentales se muestran en la Fig. 19. Cabe mencionar que, para una mayor claridad en la presentación de los resultados, los espectros para soluciones estándar individuales ($20 \mu\text{g l}^{-1}$ Cu (II), $20 \mu\text{g l}^{-1}$ Hg (II), 25

$\mu\text{g l}^{-1}$ Ag (I) se adquirieron utilizando las condiciones finales seleccionadas para el procedimiento MALDI-TOFMS (sección V.1.2).

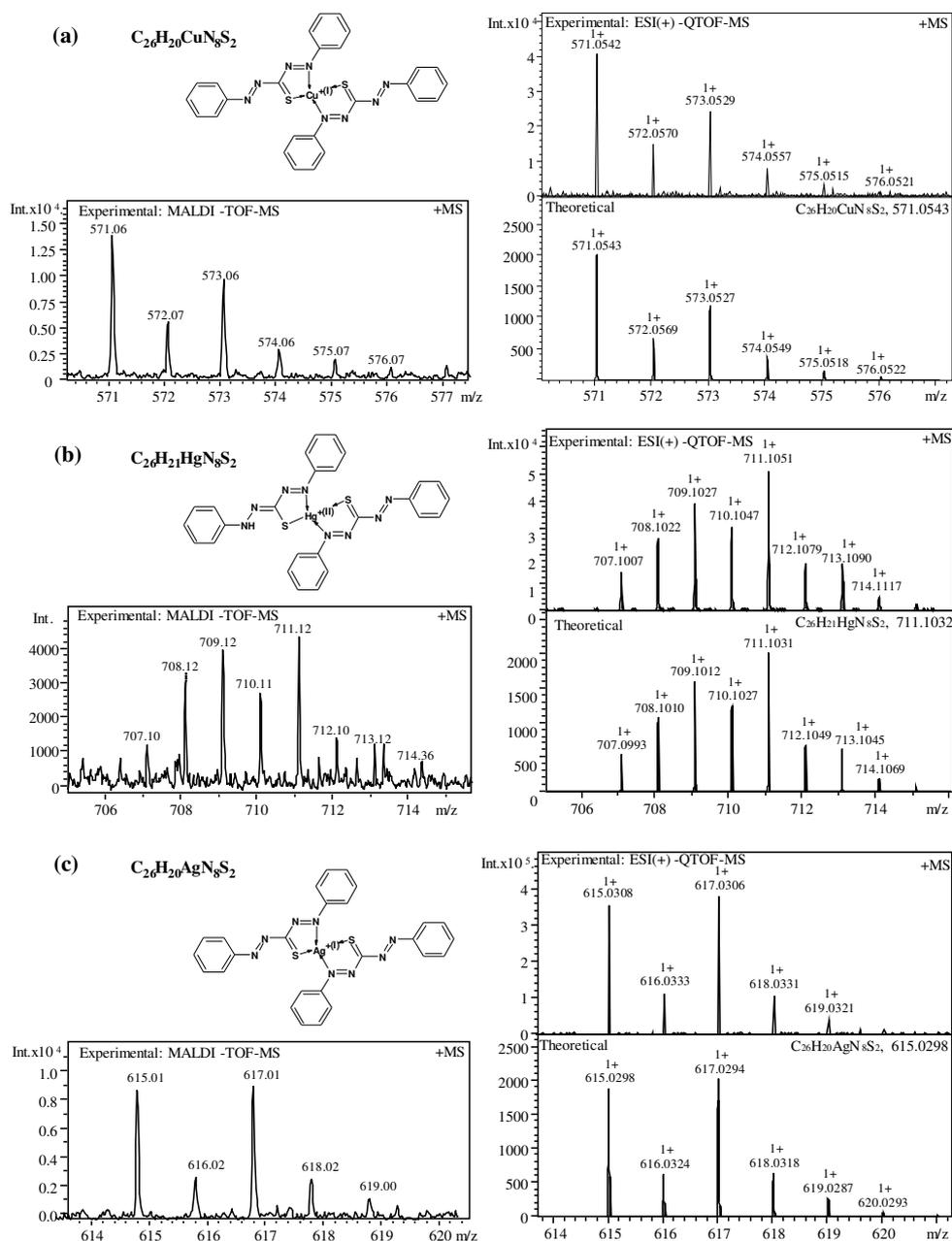


Fig. 19. Patrones isotópicos experimentales obtenidos para los complejos con ditizona por ESI-QTOF-MS y por MALDI-TOF-MS; Los espectros teóricos calculados y la estructura propuesta de los iones se presentan para: (a) cobre, (b) mercurio y (c) plata.

En vista de que los procesos redox que ocurren durante la ionización suave no son completamente comprendidos, es particularmente interesante que este mismo ion Cu(I)-Dz en fase

gaseosa se formó en la fuente ESI y en MALDI. Para los complejos de Cu(II) analizados por ESI, se han considerado dos mecanismos: la transferencia interna de electrones del ligando y transferencia de electrones de la molécula del disolvente [202, 203]. Debido a las condiciones libres de solventes en MALDI, nuestros resultados apuntan a la transferencia interna de electrones de ligando a metal. Por otro lado, no hemos encontrado ninguna referencia o trabajo previo sobre la reducción de Hg(II) o Ag(I) durante la ionización suave de sus complejos orgánicos y en este trabajo tampoco se ha observado tal reducción.

Aunque se pudieron utilizar dos técnicas de ionización para determinar Cu y Hg en forma de complejos con ditizona, se seleccionó MALDI debido a su alto rendimiento y rapidez, mejor eficiencia de ionización, ausencia de efectos de memoria, mayor tolerancia a la matriz de la muestra y menor costo de análisis [178]. También debe mencionarse el aspecto de la química verde de MALDI en términos de uso reducido de solventes orgánicos [204].

Configuración de las condiciones MALDI-TOFMS. La ditizona y sus complejos con tres iones metálicos presentan bandas de absorción en las proximidades de la longitud de onda de excitación del láser Smartbeam™-II Nd:YAG 532 nm, por lo tanto, se exploró primero la posibilidad de la desorción/ionización sin matriz. Puesto que no se observaron señales con padrón isotópico de ninguno de los metales para la concentración de 1 mg l⁻¹ de cada uno de ellos se optó por probar el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (2,5-DHB), ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) y matriz universal (mezcla 1:1 de 2,5-DHB y HCCA) como matrices típicas recomendadas para moléculas de baja masa molecular en un modo de ionización positiva [205]. En la aplicación de HCCA y 2,5-DHB en el análisis de péptidos, se reporta la longitud de onda de excitación óptima de 340 - 355 nm y 320 - 335 nm, respectivamente [206], las cuales coinciden con la longitud de onda del láser Smartbeam™-II Nd:YAG 355 nm. Además, estas dos matrices y sus mezclas también se han utilizado con éxito en el análisis de compuestos que contienen metales [174, 205]. Inicialmente, las matrices fueron preparadas de acuerdo con los protocolos establecidos por Bruker para la preparación de las muestras para MALDI (Bruker, #702557) y se mezclaron en relación 1:1 (v/v), con la solución de complejos metálicos en acetona, para su co-cristalización por el método de gota seca. Para soluciones estándar de cada uno de los iones, se observó la mejor intensidad de pico, la formación de iones de con una sola carga y la ausencia de fragmentación de complejos utilizando HCCA, por lo cual se seleccionó esta matriz para el posterior desarrollo del procedimiento analítico. Cabe destacar que nuestra elección coincide con las recientes recomendaciones para el análisis cuantitativo de moléculas de baja masa molecular por MALDI [186].

El siguiente objetivo fue garantizar una co-cristalización homogénea y obtener una relación señal-ruido lo más alta posible. Manteniendo la concentración de HCCA a 10 mg ml⁻¹ y la

concentración de los iones metálicos en la solución estándar a $100 \mu\text{g l}^{-1}$, se probaron diferentes técnicas de preparación y depósito de la muestra en la placa de MALDI, de acerró inoxidable, así como diferentes solventes [190, 207]. Con base en estos experimentos, se decidió depositar sucesivamente soluciones de muestra y matriz y además usar acetona como solvente volátil en ambos casos, para que la matriz y los complejos metálicos sean solubles. También se observó que sin la acidificación de la solución de HCCA con ácido trifluoroacético o ácido fórmico, las intensidades de las señales para los complejos metálicos eran mayores. La adición de nitrocelulosa [208] mejoró la homogeneidad pero también causó la supresión de la señal por lo que este aditivo para la co-cristalización no se consideró más. Por su parte, se estudió el efecto de la relación de muestra con matriz sobre la intensidad de senales y sobre el ruido [207]: después de la evaporación de ciclohexano, los complejos metálicos ($100 \mu\text{g l}^{-1}$ cada uno) fueron reconstituidos en 20, 40, 100, 200 y 400 μl de acetona y 0.6 μl de la solución obtenida se mezcló con 1 μl de HCCA 10 mg ml^{-1} sin diluir y diluida 2, 3, 5, 10 y 20 veces con acetona. Los espectros de masas se obtuvieron utilizando un solo ciclo de 50 disparos de láser y los límites de detección (DLs) fueron estimados para cada preparación; los más bajos DLs fueron de $0.4 \mu\text{g l}^{-1}$ para Cu y $0.8 \mu\text{g l}^{-1}$ para Hg los cuales corresponden a una muestra diluida cinco veces y una matriz diluida cinco veces.

Los límites de detección se estimaron en base a la relación señal/ruido realizando tres replicas en cada uno de los casos; los resultados se muestran en la Fig. 20. Cabe mencionar que los valores en Fig. 20 no pueden considerarse como límites de detección del método porque se obtuvieron utilizando series individuales de disparos de láser para diferentes diluciones de concentraciones relativamente altas de iones metálicos ($100 \mu\text{g l}^{-1}$).

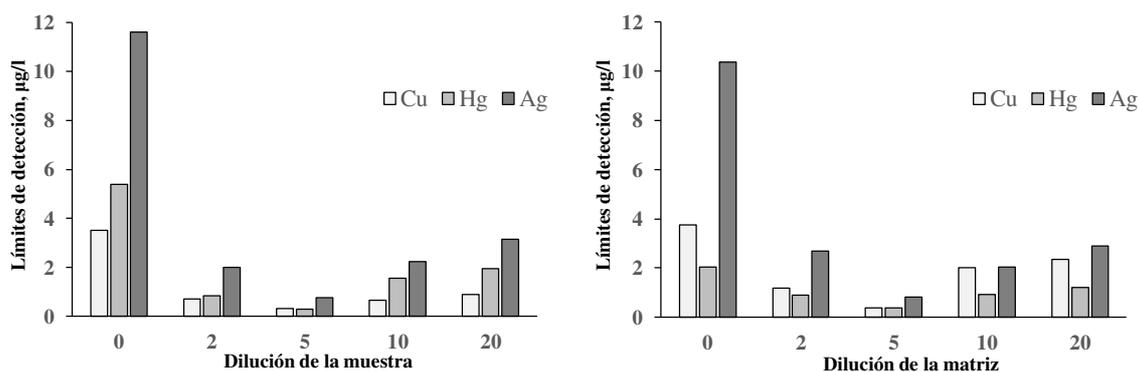


Fig. 20. Límites de detección estimados valuados para los tres complejos metálicos usando diferentes diluciones de muestra y matriz, respectivamente.

Finalmente, la intensidad del láser, el número de disparos y el modo de adquisición de los espectros se ajustaron bajo el criterio de la obtención de una relación señal-ruido lo más alta posible y una buena repetibilidad (las condiciones finales seleccionadas se muestran en la sección V.1.2).

Como se mencionó anteriormente, la baja intensidad del láser con relativamente pocos disparos por serie fue favorable para mantener el ruido espectral bajo y para obtener una buena repetibilidad, mientras que la suma de las señales obtenidas en sucesivas series proporcionó una mejor sensibilidad. La mejor repetibilidad de la señal se obtuvo seleccionando el modo “small spiral measuring raster” de las opciones instrumentales disponibles.

Los espectros de masas obtenidos para un blanco y una mezcla de estándar ($20 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu y Hg, $25 \mu\text{g l}^{-1}$ Ag) utilizando las condiciones finales de adquisición se presentan en la Fig. 21; se puede observar que los iones de las moléculas protonadas de Cu, Hg e Ag aparecen en regiones de m/z libres de señales de fondo altas.

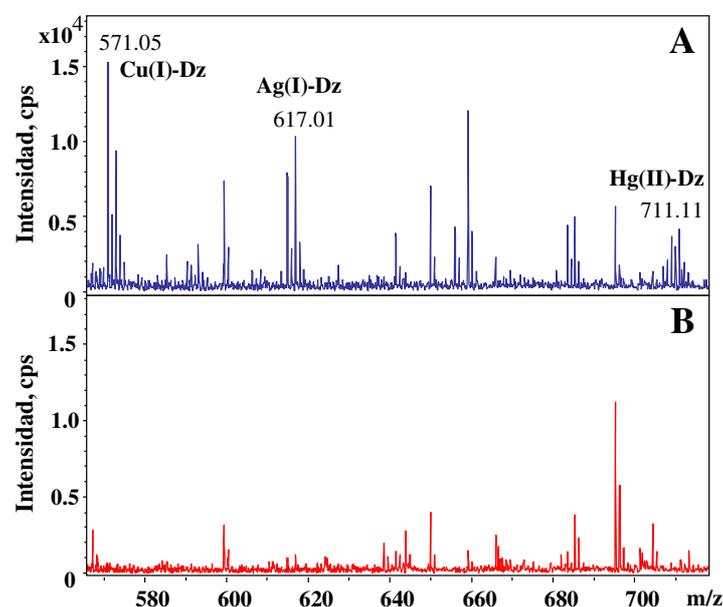


Fig. 21. Espectros MALDI-TOF-MS obtenidos utilizando las condiciones experimentales y de operación instrumental seleccionadas finalmente, para (a) solución estándar conteniendo Cu(II), Hg(II) ($20 \mu\text{g l}^{-1}$ cada uno) y Ag (I) ($25 \mu\text{g l}^{-1}$) y (b) solución de blanco.

En las Fig. 22a, 22b y 22c se muestran espectros de los complejos metálicos en soluciones estándar ($10 \mu\text{g l}^{-1}$ Cu, $20 \mu\text{g l}^{-1}$ Hg y $25 \mu\text{g l}^{-1}$ Ag) preparadas independientemente en 4 diferentes días, mientras que en la Fig. 22d se proporcionan los valores promedio para las señales más intensas junto con sus respectivas desviaciones estándar. Las desviaciones estándar relativas fueron las siguientes: 3.7% para Cu (m/z 571.06), 6.2% para Hg (m/z 711.12) y 6.5% para Ag (m/z 617.01). Tomando las señales de Cu y Hg normalizadas por Ag, las desviaciones estándar relativas disminuyeron (3.1% para Cu y 2.2% para Hg), lo que indica que la aplicación de Ag(I)-Dz como estándar interno mejora la precisión del procedimiento.

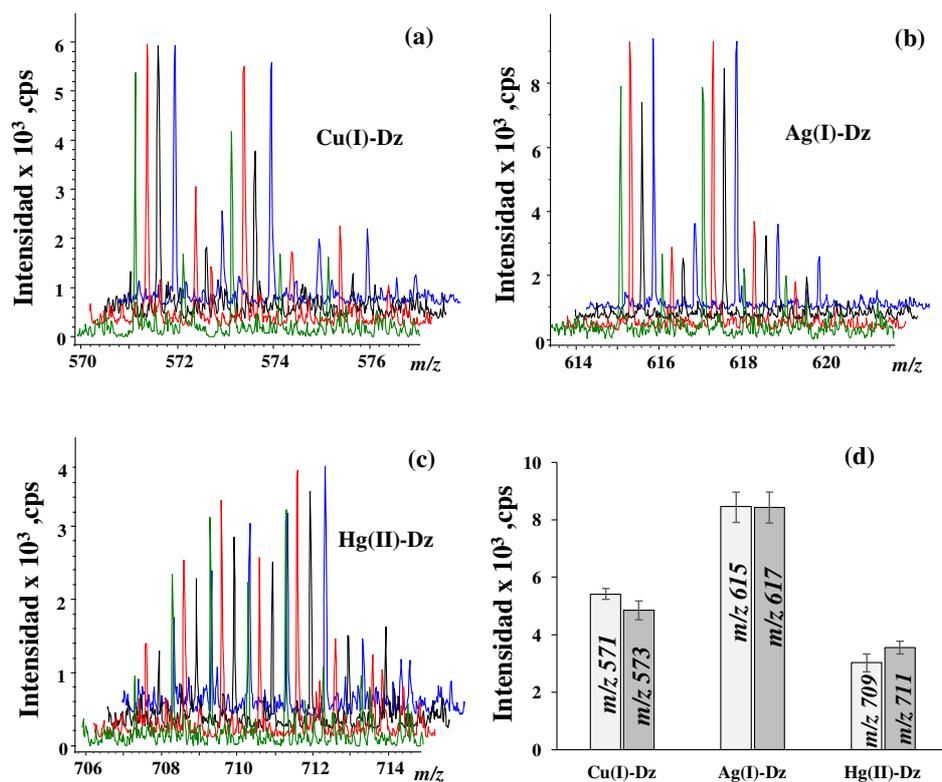


Fig. 22. Repetibilidad de los espectros MALDI-TOF-MS obtenidos para las soluciones estándar preparadas en cuatro días diferentes ($10 \mu\text{g l}^{-1}$ Cu, $20 \mu\text{g l}^{-1}$ Hg, $25 \mu\text{g l}^{-1}$ Ag): (a) Cu(I)-Dz; (b) Ag(I)-Dz; (c) Hg(II)-Dz; (d); valores promedios de intensidades de señal con sus respectivas desviaciones estándar.

Calibración de un componente. Se preparó una serie de soluciones estándar mixtas que cubren el rango de concentración $0 - 60 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu y Hg ($25 \mu\text{g l}^{-1}$ de Ag como EI) y cada una de ellas fue depositada por triplicado en tres pozos de la placa MALDI. Luego se adquirieron espectros de cada pozo con tres repeticiones sucesivas y se usaron todas las intensidades individuales de la señal más abundante para obtener la función de regresión lineal para cada metal. En la Tabla 10, se presentan los parámetros analíticos que se evaluaron empleando la señal del analito directamente y después de la normalización con EI ($m/z 617.01$). Como se puede observar, los límites de detección de calibración fueron de alrededor de una parte por billón, lo que hace que el procedimiento sea atractivo para la determinación de elementos traza. Cabe destacar que la aplicación del complejo de ditizona-Ag(I) como EI dio como resultado una mejor linealidad de la función de calibración, límites de detección y cuantificación ligeramente mejores y una mejor repetibilidad (Tabla 10). Los límites de detección y cuantificación del método se evaluaron en base a la calibración realizada en presencia de matriz de la muestra (muestra de pargo rojo diluida 10 veces) [193]. Para la comprobación de la

exactitud, se aplicó el método de adición estándar. Específicamente, se añadieron alícuotas de soluciones estándar de Cu y Hg (100 ng de cada metal) a 200 mg de muestra liofilizada de atún enlatado A, obteniendo así $20 \mu\text{g l}^{-1}$ de cada metal en la solución a la que se le añadió ditizona con EI o $500 \mu\text{g kg}^{-1}$ en la muestra liofilizada.

Tabla 10. Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración univariante por el método de regresión lineal utilizando las señales más intensas de Cu y Hg, con y sin normalización por EI (m/z 617).

Parámetro	Cu (m/z 571)		Hg (m/z 711)	
	Sin EI	Con EI	Sin EI	Con EI
R^2	0.9854	0.9958	0.9856	0.9955
DL, $\mu\text{g l}^{-1}$	0.96	0.71	1.4	1.1
QL, $\mu\text{g l}^{-1}$	3.2	2.4	4.7	3.6
CV, % ($20 \mu\text{g l}^{-1}$)	7.4	3.8	8.4	5.7
Method DL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	24	18	35	28
Method QL, $\mu\text{g kg}^{-1}$	80	59	117	91

En la Fig. 23, se presentan los espectros de complejos metálicos obtenidos en la muestra sin y con adición estándar; También se incluyen espectros de una solución estándar que contienen $20 \mu\text{g l}^{-1}$ Cu, $20 \mu\text{g l}^{-1}$ de Hg y $25 \mu\text{g l}^{-1}$ de Ag. Dado que la abundancia natural de ^{202}Hg es 29.74% en comparación con 69.15% para ^{63}Cu , se tomaron estos dos isótopos para la cuantificación de un componente, en la cual se obtuvieron dos veces más intensidades de la señal para el complejo de cobre a m/z 571 con respecto al complejo de mercurio a m/z 711. Tomando las señales normalizadas con EI, los porcentajes de recuperación fueron del 101% y 91% obtenidos para Cu y Hg, respectivamente, lo que indica una precisión aceptable.

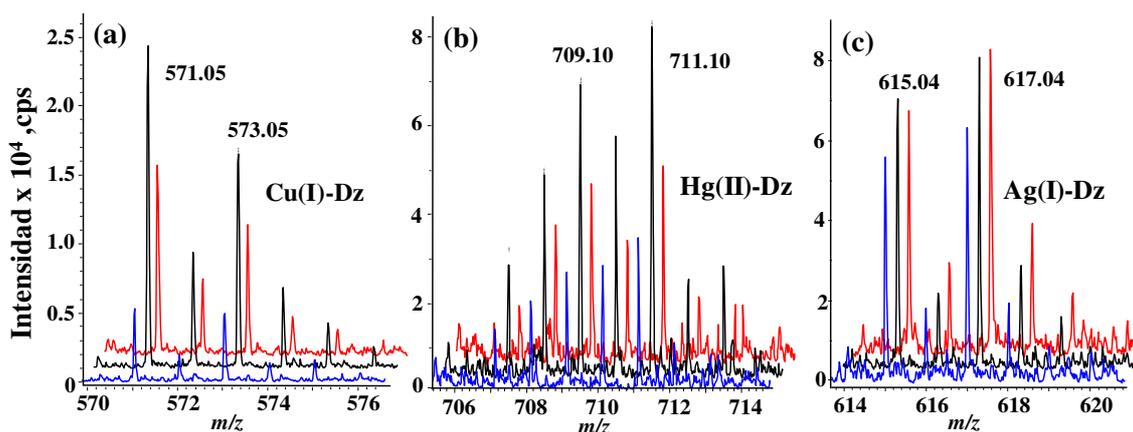


Fig. 23. Señales de metal-ditizona obtenidas por el procedimiento MALDI-TOFMS para aleta de mantarraya fresca (azul), esta misma muestra con adición estándar ($20 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu (II) y Hg (II) en la muestra digerida con ácido) (negro) y para una solución estándar conteniendo $20 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu(II) y

Hg(II) (rojo). Las tres soluciones contenían EI ($25 \mu\text{g l}^{-1}$ de Ag como Ag(I)-Dz): (a) Cu(I)-Dz; (b) Hg (II)-Dz; (c) Ag (I)-Dz.

Los resultados cuantitativos por el método de adición estándar se presentan en la Tabla 11 junto con las concentraciones de Cu y Hg determinadas en esta misma muestra por ICP-MS; Se observa una buena concordancia entre los resultados obtenidos por los dos métodos; sin embargo, la precisión de los resultados de MALDI-TOFMS no fue muy buena. Finalmente, la concentración encontrada para Hg en DORM-2 fue $4.89 \pm 0.47 \mu\text{g g}^{-1}$, de acuerdo con el valor certificado $4.64 \pm 0.26 \mu\text{g g}^{-1}$ (t-test, $p < 0.05$).

Tabla 11. Resultados de recuperación para Cu y Hg determinados por el procedimiento de MALDI-TOF-MS y calibración univariante en la muestra de atún enlatado A después de la adición estándar y las concentraciones encontradas en esta muestra por ICP-MS.

Elemento	Concentración del elemento, $\mu\text{g kg}^{-1}$		Recuperación, %	Resultados de ICP-MS, $\mu\text{g kg}^{-1}$
	Muestra	(Muestra + 100ng)*		
Cobre	188	693	101	242.3
	236	801	113	244.6
	263	768	101	251.9
	290	680	78	248.4
	201	761	112	255.1
<i>promedio \pm SD</i>	<i>236 \pm 38</i>	<i>741 \pm 46</i>	<i>101 \pm 13</i>	<i>248.5 \pm 4.7</i>
Mercurio	720	782	62	667.2
	605	709	104	679.1
	655	727	72	673.5
	694	765	71	669.3
	668	744	76	665.8
<i>promedio \pm SD</i>	<i>668 \pm 39</i>	<i>1053 \pm 94</i>	<i>91 \pm 14</i>	<i>671.0 \pm 4.8</i>

Aunque se obtuvo un rendimiento analítico aceptable, la cuantificación univariante presenta inconvenientes importantes ya que se basa en las intensidades de señal medidas para un solo ion, ignorando la información analítica existente en todo el espectro y potencialmente correlacionada con la concentración del analito; además, requiere la integración manual de señales del analito y las funciones de calibración deben calcularse independientemente para Hg y Cu. Para evitar estas limitaciones, la calibración multivariante es una buena alternativa, y se realizó utilizando el método de mínimos cuadrados parciales (PLS2).

Calibración multivariante (método de mínimos cuadrados parciales). El algoritmo PLS2 utiliza espectros de masas de las soluciones de calibración que contienen concentraciones y proporciones variables de los analitos, para generar variables latentes (componentes) que permiten recopilar datos espectrales de alta relevancia para predecir las concentraciones de dos analitos y reducir la dimensionalidad de los datos [209]. Este particular método multivariante fue seleccionado,

debido a su capacidad para manejar las multicolinealidades inevitables cuando se generan datos continuos tales como los espectros de masas [210, 211]. En la construcción del modelo PLS2 (Unscrambler 7.0), la matriz X consiste en los espectros de masas adquiridos para el conjunto de soluciones de calibración, mientras que la matriz Y contiene concentraciones de Cu y Hg en cada una de estas soluciones. Se observó que la eliminación de señales que aparecen fuera de los patrones isotópicos de los compuestos de interés no tuvo un efecto importante sobre los coeficientes de regresión, por lo tanto, los espectros completos (m/z 560 - 725) se usaron para la construcción del modelo PLS2. En el siguiente paso, el número de componentes fue variado, cada modelo fue validado utilizando la validación cruzada dejando una muestra a la vez; de acuerdo con los resultados, se seleccionaron cinco componentes para cada analito. En la Fig. 24. se muestra el modelo PLS2 para la calibración de Cu y Hg, así como los resultados de predicción en la muestra A, muestra A con adición estándar (20 $\mu\text{g/l}$ Cu y Hg), material de referencia certificado (DORM-2) y cuatro repeticiones independientes del blanco.

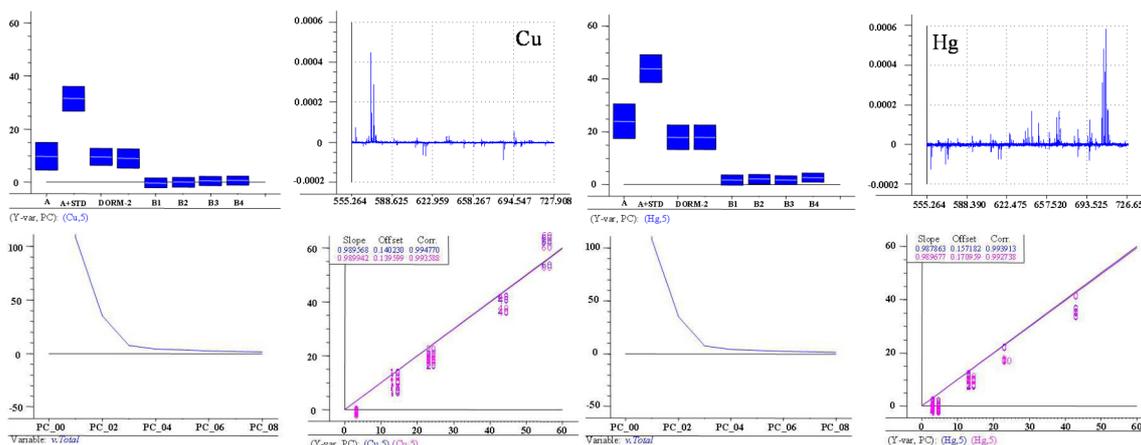


Fig. 24. Captura de pantalla de Unscrambler que muestra el modelo PLS2 con resultados para calibración de Cu y Hg, validación cruzada y predicción en la muestra A, muestra A con adición estándar (20 $\mu\text{g/l}$ Cu y Hg), material de referencia certificado (DORM-2) y cuatro repeticiones independientes del blanco (B1-B4). Se utilizaron espectros de masa completos.

En la Tabla 12, se resumen los parámetros analíticos obtenidos para este modelo; buena linealidad ($R^2 > 0,99$) y pendientes similares se obtuvieron para la calibración en comparación con la validación cruzada; sin embargo, los errores cuadráticos medios de predicción (RMSEP 1.667 para Cu y 2.088 para Hg) fueron mayores que los errores de calibración (RMSEC 1.261 para Cu y 1.555 para Hg).

Tabla 12. Parámetros analíticos evaluados para el modelo PLS2 construido para la determinación de Cu y Hg, basado en los espectros MALDI-TOFMS.

Etapa de análisis	Parámetro	Cu	Hg
Calibración	Pendiente	0.9896	0.9879
	R ²	0.9948	0.9939
	RMSEC, %	1.261	1.555
Validación cruzada	Pendiente	0.9899	0.9897
	R ²	0.9936	0.9923
	RMSEP, %	1.667	2.088
Predicción	SD para 5 predicciones de muestra de blanco, µg l ⁻¹	0.240	0.297
	Método QL, µg kg ⁻¹	63	75
	Predicción de muestra A	259 ± 23	643 ± 21
	Predicción de muestra A + 500 µg kg ⁻¹	779 ± 25	1123 ± 35
	Recuperación, %	104	96
	DORM-2 (4.64 ± 0.26 µgHg g ⁻¹)	2.41 ± 0.18	4.38 ± 0.31

Los límites de cuantificación del método se calcularon con diez desviaciones estándar obtenidas para cinco repeticiones de predicción realizadas en solución del blanco (digestión ácida diluida 10 veces de tejido de pargo rojo) [212]; obteniéndose los valores de 63 µg kg⁻¹ para Cu y 75 µg kg⁻¹ para Hg, los cuales fueron similares a los obtenidos para la calibración de un solo componente (59 µg kg⁻¹ para Cu y 91 µg kg⁻¹ para Hg). Del mismo modo que se describió anteriormente, la muestra A se utilizó para realizar experimentos de recuperación, obteniendo valores aceptables del 104% para Cu y del 96.0% para Hg. La exactitud también se demostró mediante la predicción de Hg en el material de referencia certificado DORM-2, como se indica en la Tabla 12 (las gráficas de predicción se muestran en la Fig. 24)

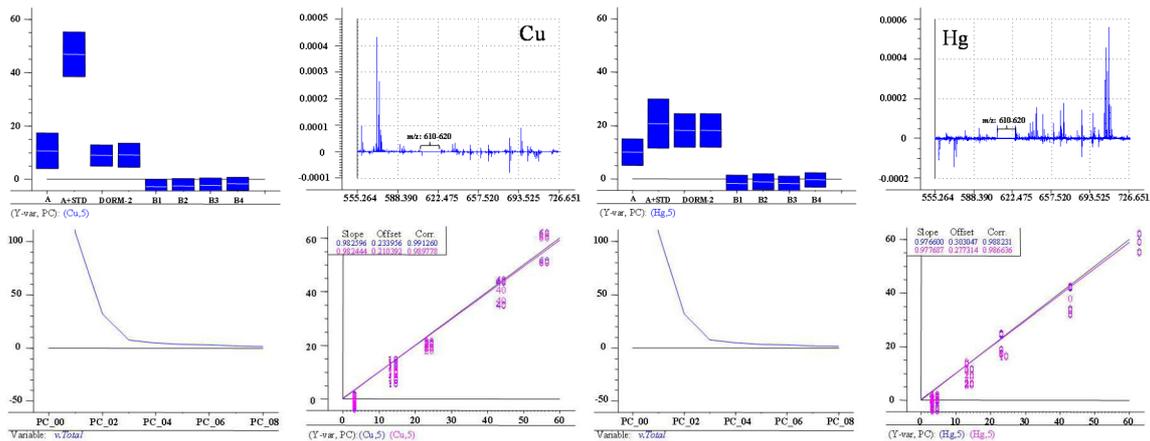


Fig. 25. Captura de pantalla de Unscrambler que muestra el modelo PLS2 con resultados para calibración de Cu y Hg, validación cruzada y predicción en la muestra A, muestra A con adición

estándar (20 µg/l Cu y Hg), material de referencia certificado (DORM-2) y cuatro repeticiones independientes del blanco (B1-B4) Sin EI: m/z región 610-620 excluida.

Finalmente, se observó que la eliminación de las señales del EI de los espectros de masas (*m/z* rango 610 - 620) deterioran los resultados de PLS2 (Fig. 25.) lo que indica que el algoritmo utilizó la fluctuación de las señales de IS entre espectros individuales durante la construcción de funciones de regresión para los dos analitos.

Análisis de atún enlatado comercializado en México. Se analizaron seis marcas diferentes, de atún enlatado, mediante el procedimiento MALDI-TOF/MS utilizando la calibración de un componente y el método PLS2. En la Tabla 13, se presentan los resultados junto con los obtenidos por ICP-MS. Para cada método, se reporta el valor promedio con su respectiva desviación estándar en base a tres repeticiones independientes. Se observa una buena congruencia entre los promedios y no se encontraron diferencias estadísticas entre el procedimiento propuesto y por ICP-MS (prueba t, $p < 0,05$), excepto para los resultados de Hg en la muestra A (PLS2) y la muestra F (calibración de un componente). Además, se debe destacar que la mejor precisión correspondió a ICP-MS y al método PLS2 que proporcionó una mejor precisión con respecto a la calibración de un componente.

Tabla 13. Resultados de la determinación de Hg y Cu en diferentes marcas de atún enlatado comercializado en México, obtenido por MALDI-TOFMS con calibración de un componente (1), por el método PLS2 (2) y por ICP-MS (3). Se presentan los valores promedios con sus respectivas desviaciones estándar, basados en tres repeticiones independientes.

Marca	Cu, promedio \pm SD, $\mu\text{g kg}^{-1}$			Hg, promedio \pm SD, $\mu\text{g kg}^{-1}$		
	1	2	3	1	2	3
A	236 \pm 38	259 \pm 23	249 \pm 5	668 \pm 39	643 \pm 21	671 \pm 5
B	364 \pm 38	358 \pm 20	355 \pm 9	385 \pm 47	383 \pm 21	391 \pm 11
C	386 \pm 19	390 \pm 14	378 \pm 11	651 \pm 56	668 \pm 14	673 \pm 9
D	730 \pm 22	722 \pm 11	716 \pm 13	636 \pm 58	671 \pm 23	657 \pm 12
E	778 \pm 45	746 \pm 16	754 \pm 13	198 \pm 18	197 \pm 10	184 \pm 10
F	654 \pm 31	659 \pm 14	680 \pm 12	134 \pm 11	103 \pm 5	106 \pm 7
DORM-2*	2.48 \pm 0.42	2.41 \pm 0.18	2.45 \pm 0.11	4.89 \pm 0.47	4.55 \pm 0.32	4.62 \pm 0.09

*mg kg⁻¹

Algunos estudios previos reportan las concentraciones de Hg y Cu en atún enlatado comercializado en diferentes países, según lo revisado brevemente por Mol [155]. Nuestros resultados de ICP-MS obtenidos para Cu (249 - 754 µg kg⁻¹) estuvieron dentro de los rangos reportados en Turquía (0.08 - 11.9 mg kg⁻¹) [155, 156] y en Arabia Saudita (0.13 - 1.87 mg kg⁻¹) [157], sin embargo, tienden a exceder las concentraciones reportadas en EE. UU (0.01 - 0.51 mg kg⁻¹) [213]. Cabe señalar

que los mariscos se consideran una buena fuente de este elemento esencial y algunos autores citan una concentración de 30 mg kg^{-1} según lo aprobado internacionalmente en productos pesqueros [155]. En cuanto a la alta toxicidad del mercurio, la FDA tiene un nivel de acción reguladora de metilmercurio en pescado de 1 mg kg^{-1} en masa húmeda [15]; los resultados de ICP-MS obtenidos para Hg total en este estudio estuvieron en el rango de $106 - 673 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ (referido a la masa liofilizada), lo que indica que algunos productos estaban al menos cerca del nivel de acción anterior. Por otro lado, las concentraciones de Hg encontradas en este trabajo fueron consistentes con las reportadas en Turquía (no detectables - $1.14 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) [155], Libia ($200 - 660 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) [156] y en EE. UU. ($53 - 740 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) [213] pero un poco más alto que en Irán ($43 - 253 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) [214]. Se detectaron diferencias importantes en las concentraciones de Hg entre las marcas de atún enlatado analizadas; hubo una concentración 6 veces menor en la marca E en comparación con la marca B, que a su vez correspondía a la concentración más alta de Hg. Nuestros resultados confirman que la determinación de metales pesados en pescado enlatado es necesaria para el control de la calidad de estos alimentos y se ha demostrado la viabilidad de MALDI-TOFMS para tal fin.

IV.3.4. Conclusiones

Se han propuesto muchas aplicaciones para las técnicas de desorción/ionización por láser en el análisis de moléculas pequeñas mediante espectrometría de masas de alta resolución en la última década. Sin embargo, este es el primer estudio, del cual se tiene conocimiento, que utiliza MALDI-TOFMS convencional para la cuantificación de metales en forma de sus complejos con un ligando orgánico y también es el primer intento de utilizar regresión por el método de mínimos cuadrados parciales (PLS2) para este propósito. Para los dos metales pesados de interés, se utilizó ditizona debido a su selectividad hacia Hg(II) y Cu(II) en condiciones ligeramente ácidas (pH 3) permitiendo la formación de sus complejos sin carga; asimismo, entre otros iones metálicos que reaccionan con ditizona en condiciones similares (Ag (I), Pd (II), Au (III)), se utilizó plata como estándar interno. La formación de iones de los complejos metálicos de una sola carga en fase gaseosa, con estequiometría 2:1, fue confirmada con el análisis por ESI-QTOFMS y MALDI-TOFMS. Se abordaron los problemas típicos relacionados con la falta de homogeneidad en la co-cristalización de la muestra con la matriz, alto ruido de fondo en una región de m/z relativamente baja y una mala repetibilidad.

En primer lugar, las especies polares e iónicas presentes en la muestra se eliminaron mediante la extracción de los complejos metálicos a ciclohexano, mientras que la aplicación de Ag(I) como estándar interno permitió un mejor rendimiento analítico, especialmente mediante el aumento de la precisión. Variables, tales como la cantidad relativa entre muestra y la matriz HCCA en la placa de MALDI, y las condiciones de funcionamiento del instrumento se establecieron en el transcurso mediante experimentos sistemáticos.

La cuantificación se llevó a cabo mediante la calibración de un componente tomando el ion de mayor abundancia para cada analito y para EI, y además los datos espectrales se utilizaron para construir el modelo PLS2. En este último caso, la normalización tradicional por EI no fue necesaria; aparentemente, el algoritmo PLS2 considera la fluctuación de las señales del EI presente en todos los espectros de masas mejorando el modelo. En el análisis de seis marcas de atún enlatado, se obtuvo una buena concordancia entre el procedimiento de MALDI-TOF-MS con cualquiera de los dos métodos de cuantificación y los datos de ICP-MS. El procedimiento propuesto, especialmente basado en la determinación mediante el modelo PLS2 de dos metales puede recomendarse como una alternativa de análisis rápido, simple y en micro-escala, con un costo de operación del equipo más bajo respecto al ICP-MS.

IV.4. Determinación de cobre y plomo en tequila por MALDI-TOFMS y regresión por mínimos cuadrados parciales

IV.4.1. Introducción

En este documento ya se ha mencionado varias veces que la espectrometría de masas de alta resolución con ionización/desorción de laser asistida por matriz (MALDI-HRMS) es una herramienta versátil en diferentes ramas de la investigación "ómica". MALDI permite la ionización de compuestos polares y no polares en un amplio rango de sus masas moleculares, generando iones cargados de sus moléculas prácticamente sin su fragmentación. Las características más importantes de esta técnica incluyen mediciones rápidas y totalmente automatizadas, una buena tolerancia a las sales y otros componentes de la muestra, así como inexistencia de efectos de memoria. Cabe destacar, que los datos espectrales pueden ser adquiridos sucesivamente, para un amplio rango de diferentes muestras depositadas en una misma placa de MALDI, sin la necesidad de limpieza entre muestra y muestra, y sin el riesgo de contaminación cruzada. Por otro lado, MALDI-HRMS convencional no proporciona un buen rendimiento analítico en la identificación/cuantificación de moléculas de baja masa molecular ($m/z < 800$) en comparación con las moléculas con valores más altos de m/z , debido al ruido de fondo relacionado con la matriz y la homogeneidad incierta de co-cristalización de la muestra con matriz [163, 177]. Para contrarrestar estas limitaciones, se han desarrollado una gran cantidad de técnicas de desorción/ionización láser que no emplean matriz química [163, 215-217]; sin embargo, la eficacia de la desorción/ionización del analito depende en gran medida de la naturaleza química y el tamaño del nanomaterial aplicado para ayudar a este proceso, y frecuentemente se ha reportado una menor sensibilidad en estas nuevas técnicas en comparación con MALDI convencional donde se utilizan matrices orgánicas [182-185, 218]. Además, para mejorar la determinación de moléculas de baja masa molecular, se ha estudiado ampliamente la preparación de las muestras y la selección de las condiciones instrumentales en MALDI convencional, evitando así los posibles efectos de matriz [186, 219, 220].

Sin duda, la espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es la técnica de primera elección y la más adecuada para la determinación de trazas de metales/metaloides en cualquier tipo de muestra real; sin embargo, también se han reportado varias aplicaciones de MALDI-HRMS convencional [175, 176, 179, 180], que representan una alternativa, ofreciendo ventajas como: técnica de alto rendimiento, alta resolución, sin efectos de memoria y con un costo de operación instrumental mucho más bajo en comparación con ICP-MS. En el capítulo anterior, se ha demostrado la viabilidad del uso de MALDI convencional acoplado a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (TOFMS) para la determinación de mercurio y cobre en

tejido de pescado. La estrategia utilizada para mejorar la calidad del análisis cuantitativo se basó en: (i) formación de los complejos metálicos con ditizona, (ii) extracción/preconcentración de los complejos metálicos, (iii) ajuste de la relación adecuada matriz-muestra, (iv) uso del complejo plata-ditizona como estándar interno y (v) cuantificación por regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS2) [221].

Bajo el mismo razonamiento, en esta parte de trabajo, el objetivo ha sido lograr la determinación de cobre y plomo en tequila. En este caso, se seleccionó el dietilditiocarbamato de sodio (NaDDTC) como un agente acomplejante versátil que forma complejos 2:1 con una gran cantidad de iones metálicos divalentes, incluidos cobre, plomo, cadmio, níquel, zinc, hierro, mercurio y con menor preferencia, también con iones metálicos trivalentes como bismuto, indio, arsénico y cobalto [198, 222-225]. Con un pH cercano al neutro, la mayoría de estos complejos (excluido el arsénico) pueden extraerse fácilmente con cloroformo [223, 225, 226] permitiendo la evaporación y reconstitución en un micro-volumen de disolvente para la deposición de las muestras en una placa de MALDI. Cabe mencionar que la coordinación de iones metálicos con ditiocarbamatos ya se ha investigado dentro del dominio del análisis MALDI-MS [175, 176]. A pesar de la baja selectividad del dietilditiocarbamato, se puede esperar una determinación sin interferencias de metales individuales utilizando un espectrómetro de masas de alta resolución. Asimismo, la versatilidad de NaDDTC permite la selección de estándares internos adecuados (iones metálicos) los cuales están ausentes en tequilas.

El tequila es un licor regional elaborado a partir del Agave tequilana Weber ("agave azul") y su producción está regulada por la Norma Oficial Mexicana NOM-006-SCFI-2012 [227]. Entre varias especificaciones del producto, los niveles máximos permisibles de cuatro elementos fueron adoptados de la Norma Oficial Mexicana NOM-142-SSA1 de la siguiente manera: $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}$, $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Pb}$, $1.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ Zn}$ y $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ As}$ [228]. Como ya se mencionó anteriormente, tres de estos elementos pueden ser extraídos de una solución acuosa neutra con cloroformo en forma de sus complejos con DDTC; sin embargo, en función de la relevancia para la salud y de los datos previos obtenidos por ICP-MS para diferentes tequilas [229] este trabajo se ha centrado en la determinación de cobre y de plomo. Como los posibles estándares internos se han examinado los iones de bismuto e indio. Los resultados obtenidos en el desarrollo del procedimiento y en el análisis de varias muestras de tequila se presentan a continuación.

IV.4.2. Parte experimental

Reactivos y muestras. Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico; agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco), metanol grado HPLC, etanol, acetonitrilo y cloroformo (Sigma) fueron utilizados.

Las soluciones estándar de cobre, plomo, indio y bismuto (1000 mg l⁻¹ cada una) fueron de Sigma y la mezcla de estándares internos de espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) fue de Agilent Technologies. Se utilizaron los siguientes reactivos Sigma: dietilditiocarbamato de sodio (NaDDTC), ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (HCCA), ácido 2-[4-(2-hidroxietil) piperazin-1-il] etanosulfónico (HEPES), ácido trifluoroacético (TFA), ácido nítrico y sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y formiato de amonio grado LC-MS.

Diez marcas diferentes tipos de tequila comercial fueron compradas al azar en tiendas locales de la ciudad de Guanajuato; estas incluyen: tres "blancos" (A1, A2, A3 - no envejecido), tres "reposados" (R1, R2, R3 - añejado en barricas de roble durante dos meses), dos "añejos" (A1, A2, añejado por al menos un año) y dos "extra-añejos" (EA1, EA2, con un añejamiento de al menos tres años).

Protocolo de limpieza. Para evitar posible contaminación por cobre en los tubos de plástico, se utilizaron siempre tubos Eppendorf nuevos, los cuales se llenaron con EDTA 10 mM y se dejaron durante la noche. Al día siguiente, se enjuagaron tres veces con agua desionizada y se usaron el mismo día.

Procedimiento MALDI-TOFMS. Una alícuota de tequila o solución estándar (200 µl) se colocó en un tubo Eppendorf de 2 ml, agregando los estándares internos (50 µl In y 15 µl Bi, 2.0 mg l⁻¹ cada uno) seguidos de 350 µl de HEPES 0.1 M, pH 7.4, 100 µl de NaDDTC 30 mM y el volumen se llevó a 1 ml con agua desionizada. Las soluciones de calibración se prepararon con adición de etanol para igualar su concentración con respecto al tequila (8% v/v después de diluir a 1 ml). La extracción se llevó a cabo con 500 µl de cloroformo (vortex, 30 s), se recuperó la fase orgánica y las muestras se dejaron a temperatura ambiente para la evaporación del disolvente. Al día siguiente, el residuo se reconstituyó con 100 µl de acetonitrilo y 0.6 µl de este se depositó sobre la placa de MALDI (MTP 384 target plate ground steel BC) de acero inoxidable, para la cristalización por el método de gota seca con 1 µl de matriz de HCCA (1.25 mg ml⁻¹ en acetonitrilo: metanol: TFA preparado mezclando 700 µl de acetonitrilo, 300 µl de metanol y 1 µl de TFA 10% v/v). Para la calibración univariante, las soluciones estándar mixtas contenían cobre a 0; 25; 50; 100; 200; 400; 800 µg l⁻¹ y plomo a 0; 100; 200; 400; 800, 1200 µg l⁻¹. Para el método de mínimos cuadrados parciales (PLS2), una serie de 42 soluciones se preparó de acuerdo con un diseño factorial completo, utilizando este mismo rango de concentración para ambos elementos, excepto 25 µgCu l⁻¹.

Se utilizó un equipo MALDI-TOFMS modelo AutoFlex speed de Bruker Daltonics con un láser smartbeamTM-IINd:YAG y equipado con el software flexControl 3.4 y flexAnalysis 3.4. Los espectros de masas se adquirieron en el rango m/z 338 - 516 en modo reflector positivo, utilizando una intensidad de laser de 40% y una frecuencia de 1000 Hz. Cada solución de calibración se depositó por triplicado, sobre 3 pozos de la placa de MALDI y para cada muestra se adquirió la suma de un espectro a partir de 4 réplicas de 25 disparos de láser, con una trama de medición en espiral. Para la cuantificación, se tomó el promedio de seis replicas para cada muestra (dos pozos por muestra). La calibración de masa interna fue realizada con los valores monoisotópicos de m/z para Bi(III)-(DDTC)₂ (505.0308) y In(III)-(DDTC)₂ (410.9542).

Asignación de las estructuras de los iones en fase gaseosa de los complejos de dietilditiocarbamato formados en una fuente de ionización suave. Mediante el procedimiento descrito en apartado anterior, se prepararon por separado soluciones de los complejos de dietilditiocarbamato para Cu, Pb, In, Bi y después de la extracción y evaporación del disolvente, se re-disolvieron en 100 μ l de acetonitrilo. Para MALDI-TOFMS no se utilizó ningún tratamiento adicional y los espectros de masas fueron adquiridos para las siguientes concentraciones: 100 μ g l⁻¹ Cu, 1200 μ g l⁻¹ Pb, 100 μ g l⁻¹ Bi y 250 μ g l⁻¹ In. Para la ionización por electronebulización, la solución en acetonitrilo (20 μ l) se diluyó con formiato de amonio (0.1 % m/v) : acetonitrilo (1:1 (v/v)) obteniendo 50 y 100 μ g l⁻¹ Cu, 100 μ g l⁻¹ Pb, 50 μ g l⁻¹ Bi y 100 μ g l⁻¹ In. Estas soluciones se inyectaron directamente por infusión (3 μ l min⁻¹) a la fuente ESI del espectrómetro de masas con separador de masas de cuadrupolo y tiempo de vuelo (maxis impact ESI-QTOF-MS equipado con Data Analysis 4.1, Bruker Daltonics). ESI fue operado en modo positivo con voltaje de 4500 V, flujo de gas nitrógeno 4 l min⁻¹, nitrógeno como gas de secado (180 °C) y presión del gas nebulizador 0.4 bar. La calibración de masa externa se realizó en base a aductos de formiato de sodio. Los espectros de fragmentación para cada ion precursor seleccionado se obtuvieron en el modo auto MS/MS.

Determinación de Cu y Pb por ICP-MS. Se utilizó un espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente (Modelo 7500ce; Agilent Technologies) con un nebulizador Meinhard y cámara de niebla tipo Peltier (2 °C), con las condiciones instrumentales de funcionamiento descritas anteriormente; la celda de colisión/reacción fue presurizada con He (3.5 ml min⁻¹) [229]. La calibración se realizó utilizando soluciones, con un volumen final de 5 ml, contenido etanol al 4% (v/v), ácido nítrico al 1% (v/v), concentraciones de Cu y Pb: 0, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 5.0 y 10 μ g l⁻¹ y 1 μ g l⁻¹ In como estándar interno. Para el análisis de las muestras, una alícuota de tequila (500 μ l) se mezcló con un volumen igual de ácido nítrico (10 % v/v), 100 μ l de In (50 μ g l⁻¹) y se llevó a un volumen final de 5 ml. Los límites de detección instrumental fueron 51 ng l⁻¹ para Cu y 62 ng l⁻¹ para Pb. La precisión fue evaluada por el método de adición estándar y se obtuvieron porcentajes de

recuperación después de la adición de Cu y Pb ($50 \mu\text{g l}^{-1}$ de cada uno en tequila) de 110.2 % y 99.2 % respectivamente.

Análisis estadístico. A los espectros obtenidos se les realizó la corrección de la línea base, los datos espectrales se guardaron en Excel 2010 y fueron exportados al programa The Unscrambler (CAMO). Este software fue utilizado para realizar la regresión por el método de mínimos cuadrados parciales (PLS2).

Para la calibración de un componente, las funciones de regresión lineal se obtuvieron utilizando Microsoft Excel 2010.

Todos los análisis se llevaron a cabo por triplicado (tres pozos) adquiriendo una suma de seis espectros por muestra; se realizó una estadística descriptiva para obtener los valores promedio y las desviaciones estándar respectivas. Los resultados obtenidos por MALDI-TOFMS y por ICP-MS se compararon estadísticamente evaluando diferencia entre dos promedios (Statistica for Windows, Statsoft Inc.) con un nivel de significancia $p < 0.05$.

IV.4.3. Resultados y discusión

Para dar un enfoque cuantitativo al análisis de moléculas de baja masa molecular mediante MALDI-HRMS, es altamente recomendable normalizar la señal analítica con la de un estándar interno adecuado [186, 221]. En este trabajo el indio y el bismuto fueron elegidos para este propósito con la intención de compensar los errores cometidos durante la preparación de la muestra y durante la adquisición de la señal. Estos iones metálicos fueron seleccionados debido a que ambos forman complejos con dietilditiocarbamato que pueden extraerse con cloroformo a pH neutro [230] y además, ninguno de ellos fue detectado por ICP-MS en las muestras de tequila analizadas [229].

Ionización de los complejos metálicos por ESI y MALDI. Las estructuras moleculares de los complejos metálicos con dietilditiocarbamato se estudiaron previamente mediante cristalografía de rayos X, revelando un sitio de quelación de cuatro miembros en el que el ion metálico es coordinado a través de dos átomos de azufre [230]. Además, para algunos iones metálicos seleccionados, la ionización de sus complejos con DDTC también ha sido estudiada mediante ESI [198]. En este trabajo, se adquirieron los espectros de masas de alta resolución para los cuatro complejos metálicos (Cu, Pb Bi, In) utilizando ESI y MALDI. En los espectros de MALDI-TOFMS, se observó un ion con una carga que contenía un átomo de metal como la señal predominante. Los espectros de ESI(+)-QTOF-MS fueron un poco más complejos; sin embargo, siempre el ion más abundante fue el mismo que se observó para MALDI-TOFMS. Para el complejo de Cu, la masa exacta obtenida por ESI(+)-QTOF-MS sugirió la formación del ion $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{CuN}_2\text{S}_4^+$ (m/z monoisotópica experimental de 358.9808, error de masa de 2.2 ppm). La Fig. 26 muestra el patrón isotópico teórico junto con los

patrones isotópicos experimentales obtenido para el complejo de cobre por ESI(+)-QTOF-MS ($50 \mu\text{g l}^{-1} \text{ Cu}$) y por MALDI-TOFMS ($100 \mu\text{g l}^{-1} \text{ Cu}$). La estructura del ion $\text{Cu}(\text{DDTC})_2^+$ formado en cualquiera de las dos fuentes de ionización se asignó en base al espectro de MS/MS obtenido por ESI-QTOF-MS/MS (Fig. 26).

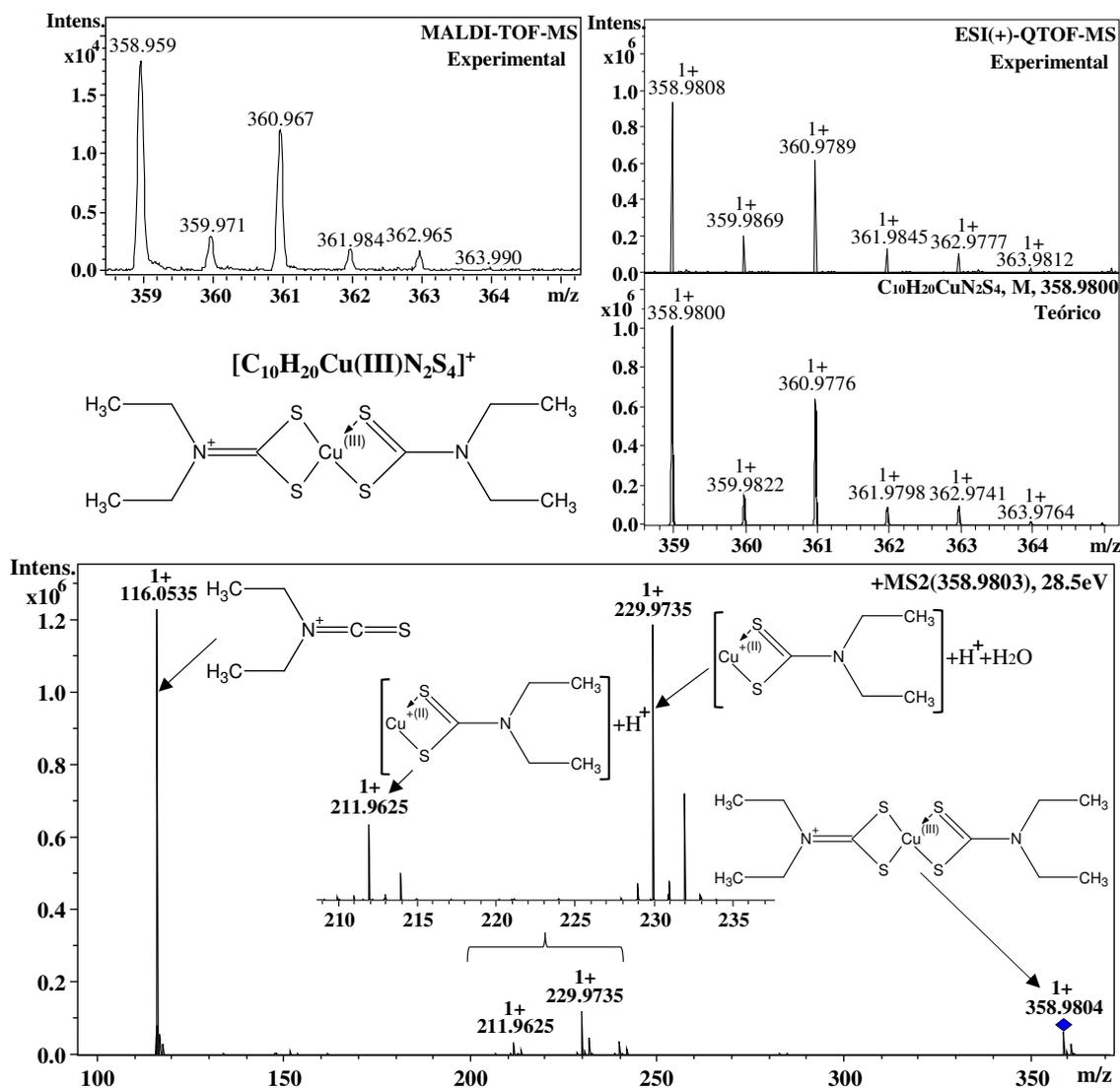


Fig. 26. Espectros de masas obtenidos para el complejo de Cu con dietilditiocarbamato ($100 \mu\text{g l}^{-1} \text{ Cu}$): (superior) Patrones isotópicos experimentales obtenidos por ESI-QTOF-MS y MALDI-TOFMS; espectro calculado in silico y la estructura propuesta del ion con una sola carga formado en la fase gaseosa; (inferior) espectro ESI-QTOF-MS/MS obtenido para el ion precursor con m/z 358.9803 con las estructuras de sus fragmentos de iones asignados.

Cabe resaltar que a menudo se han observado cambios en el estado de oxidación de Cu durante su ionización en fase gaseosa [221, 222, 231] y específicamente, se ha reportado la estabilización de Cu(III) por ditiocarbamatos [231-233]. Por otro lado, la m/z 358.9800 teórica había sido asignada previamente como un ion radical $C_{10}H_{20}CuN_2S_4^+$ [198] y en otro estudio, se reporta una molécula protonada del complejo de Cu(II) con m/z teórica de 359.9878 [234]. Para resolver esta controversia sobre la ionización del complejo de Cu con dietilditiocarbamato, se adquirió un espectro ESI(+)-QTOF-MS para una mayor concentración de cobre ($100 \mu\text{g l}^{-1}$) lo que permitió la identificación de dos especies: Cu(III) que contiene $C_{10}H_{20}CuN_2S_4^+$ con una m/z monoisotópica teórica de 358.9800 y Cu(II) con la molécula protonada $C_{10}H_{21}CuN_2S_4^+$ y su respectiva m/z monoisotópica teórica de 359.9878.



Fig. 27. Patrones experimentales obtenidos para el complejo de Cu con dietilditiocarbamato obtenidos mediante ESI-QTOF-MS con concentraciones de iones metálicos de 50 y $100 \mu\text{g l}^{-1}$ (izquierda) y sus respectivos resultados por SmartFormula (derecha).

La comparación de los patrones experimentales obtenidos para el complejo de Cu usando concentraciones del ion metálico de 50 y $100 \mu\text{g l}^{-1}$ se muestra en la Fig. 27. mientras que los patrones

isotópicos calculados in silico de los dos iones coexistentes junto con sus estructuras se presentan en la Fig. 28. Como ya se mencionó, en MALDI solo se detectó Cu(III) que contiene $C_{10}H_{20}CuN_2S_4^+$.

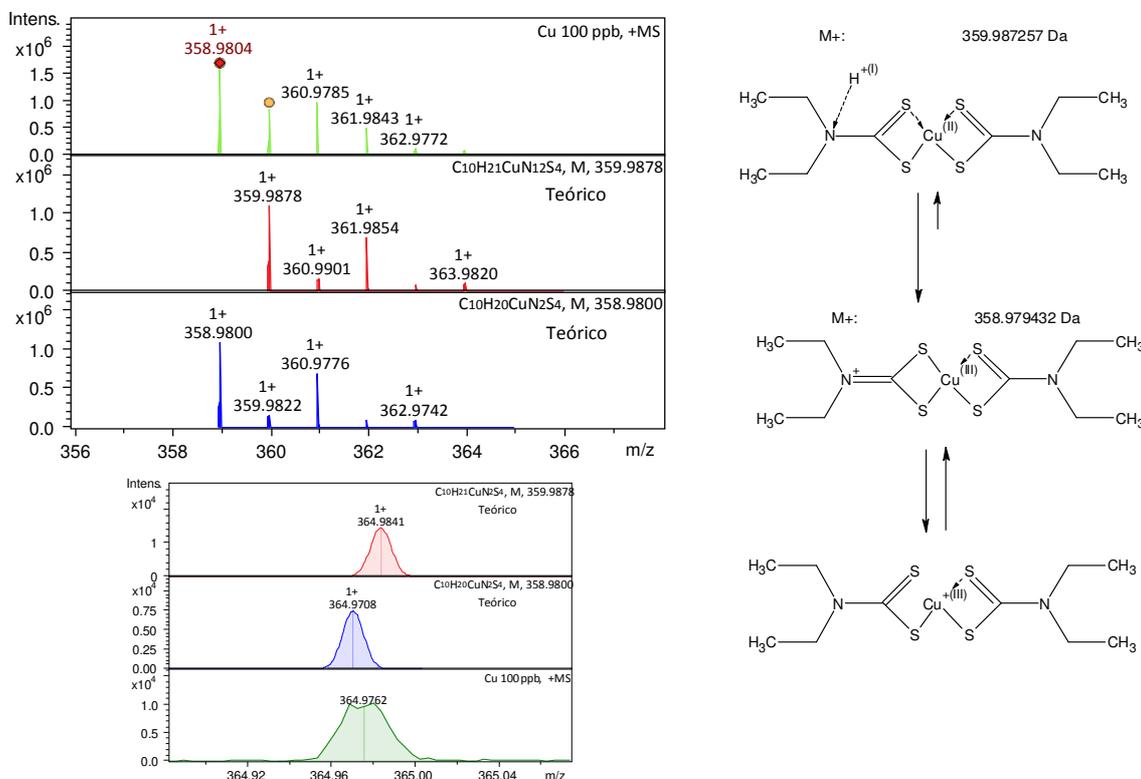


Fig. 28. Comparación del patrón isotópico experimental por ESI-QTOFMS del complejo Cu-DDTC obtenido para $100 \mu\text{g l}^{-1}$ Cu con los patrones calculados in silico de dos especies iónicas generadas por el software SmartFormula (arriba a la izquierda), zoom de estos mismos patrones que muestran señales superpuestas (parte inferior izquierda) y sus respectivas estructuras moleculares propuestas (derecha).

Para el plomo, los espectros de ESI-QTOF-MS mostraron dos iones con patrones isotópicos característicos de Pb: (1) m/z (monoisotópica) de 652.0537 que corresponde al complejo 3:1 ($C_{15}H_{30}N_3PbS_6^+$ con un error de masas de 2.6 ppm) y (2) m/z (monoisotópica) de 356.0027 perteneciente al fragmento 1:1 ($C_5H_{10}NPbS_2^+$ con un error de masas de 3.6 ppm). En MALDI-TOFMS, solo se formó el segundo ion. En este sentido, en la Fig. 29. se presenta la estructura molecular correspondiente a este segundo ion, así como su patrón isotópico teórico junto con los patrones isotópicos experimentales obtenidos para este complejo de plomo, por ESI(+)-QTOF-MS y por MALDI-TOFMS y además en esta misma figura se muestra la fragmentación de $C_{15}H_{30}N_3PbS_6^+$ por ESI-QTOF-MS/MS.

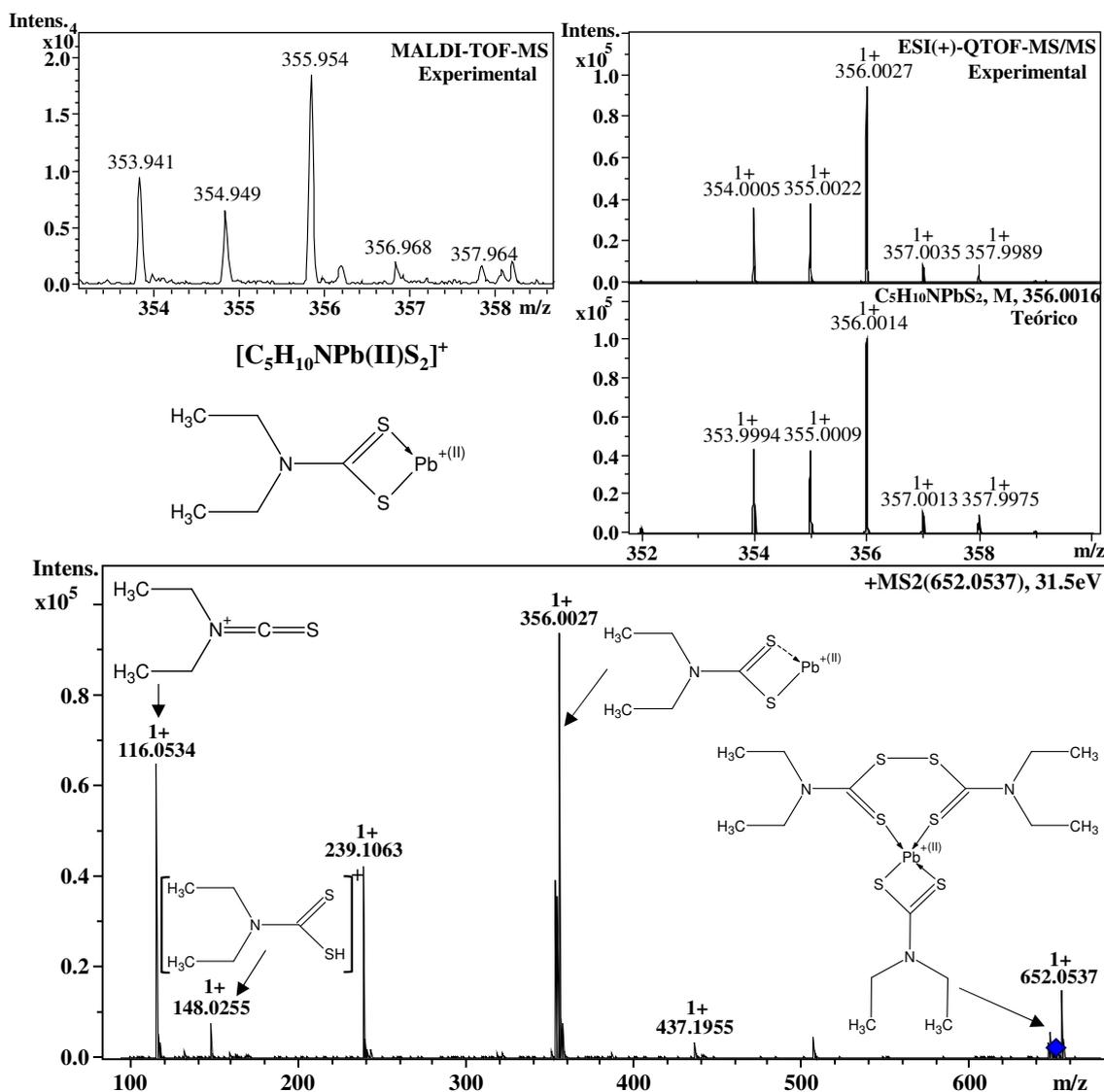


Fig. 29. Espectros de masas obtenidos para el complejo de Pb con dietilditiocarbamato ($1200 \mu\text{g l}^{-1}$ Pb): (superior) Patrones isotópicos experimentales obtenidos por ESI-QTOF-MS y MALDI-TOFMS; espectro calculado in silico y la estructura propuesta del ion con una sola carga formado en la fase gaseosa; (inferior) espectro ESI-QTOF-MS/MS obtenido para el ion precursor con m/z 652.0537 con las estructuras de sus fragmentos de iones asignados.

Los espectros de masas obtenidos para los complejos de In y Bi utilizando las dos fuentes de ionización contenían un único ion con una masa monoisotópica y un patrón isotópico consistente con la fórmula $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{BiS}_4^+$ (error de masa: 0.8 ppm) y $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{InS}_4^+$ (error de masa: 0.5 ppm),

respectivamente. Las estructuras moleculares y los espectros de masas que confirman la identidad de los complejos 2:1, con una sola carga, de In y Bi, se presentan en la Fig. 30.

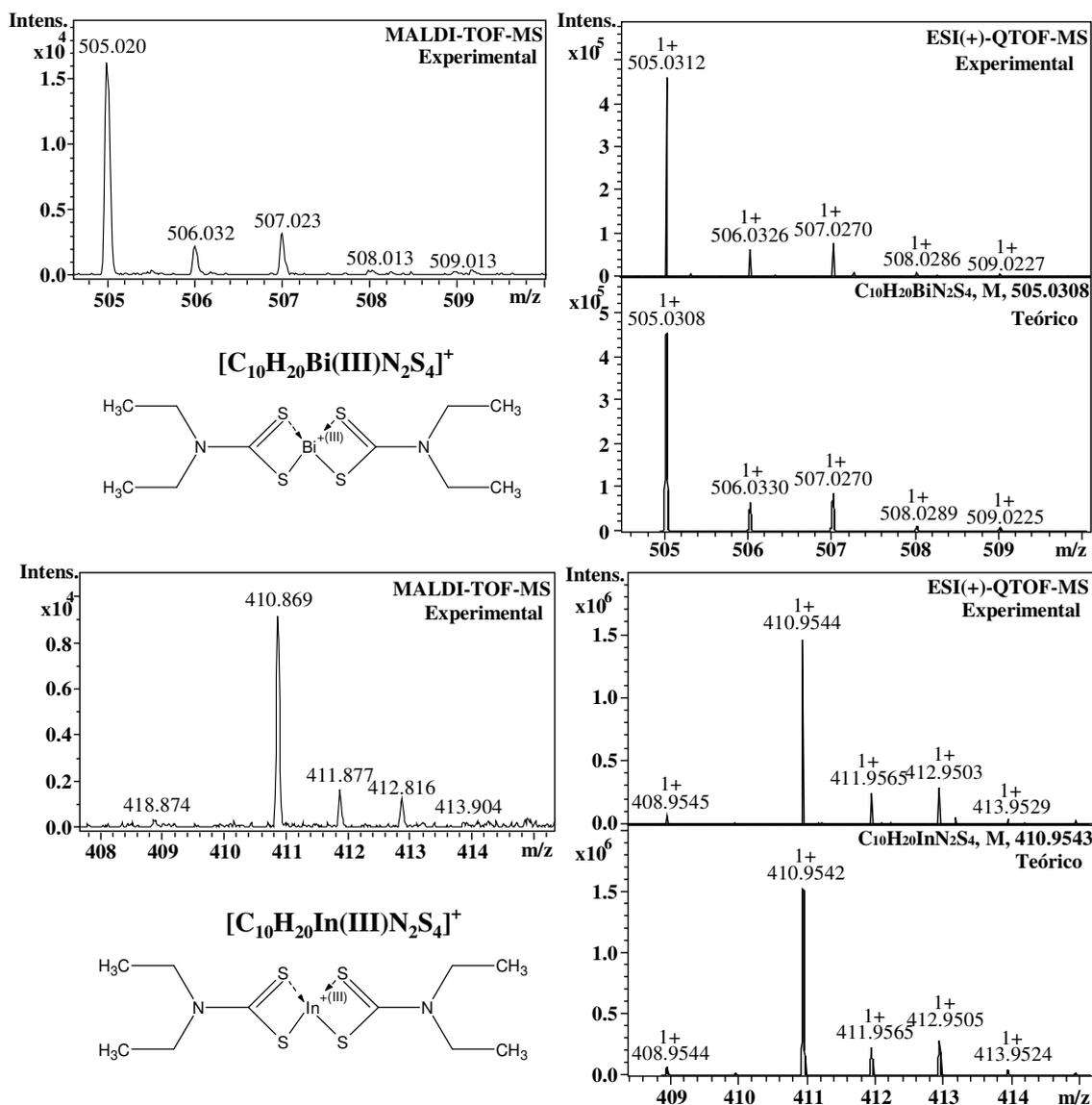


Fig. 30. Espectros de masas obtenidos para el complejo Bi (superior) y In (inferior) con dietilditiocarbamato: (a) Patrones isotópicos experimentales obtenidos por ESI-QTOF-MS ($50 \mu\text{g l}^{-1}$ Bi y $100 \mu\text{g l}^{-1}$ In) y MALDI-TOF-MS ($100 \mu\text{g l}^{-1}$ Bi y $200 \mu\text{g l}^{-1}$ In); espectro calculado in silico y la estructura propuesta del ion de una sola carga formado en fase gaseosa.

Cabe destacar que MALDI-TOFMS ha demostrado ser una técnica más práctica para los fines de este trabajo en comparación con ESI-QTOF-MS, ya que solo se formó una especie iónica de los

complejos metálicos en la fuente de ionización y también debido a la excepcionalmente rápida adquisición de datos, libre de efectos de memoria y que representa bajo costo.

Selección de los parámetros para MALDI-TOFMS. Se emplearon dos criterios para establecer las condiciones experimentales e instrumentales en MALDI-TOFMS: (i) una buena homogeneidad en la co-cristalización de la muestra con la matriz y (ii) la obtención de una relación señal/ruido (S/R) lo más altamente posible. De acuerdo con las recomendaciones generales [186] y con base en nuestro estudio previo [221] el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico fue seleccionado como matriz química. Se preparó una serie de soluciones de HCCA usando mezclas de metanol, acetonitrilo y acetona en diferentes proporciones, sin y con adición del ácido trifluoroacético al 0,01% (TFA). Como resultado, se observó una adecuada solubilización de la muestra y la matriz, un secado relativamente rápido y la formación de depósitos homogéneos utilizando una relación de metanol:acetonitrilo 70:30 v/v con TFA. Con la finalidad de minimizar el ruido relacionado con la matriz, se probaron diferentes concentraciones de HCCA ($0.3 - 5 \text{ mg ml}^{-1}$); en cada caso, las señales analíticas se midieron a partir de cinco réplicas de m/z 358.96 para Cu ($400 \mu\text{g l}^{-1}$) y m/z 355.95 para Pb ($1200 \mu\text{g l}^{-1}$) y el ruido se calculó como la desviación estándar de las intensidades adquiridas fuera del patrón isotópico para cada analito.

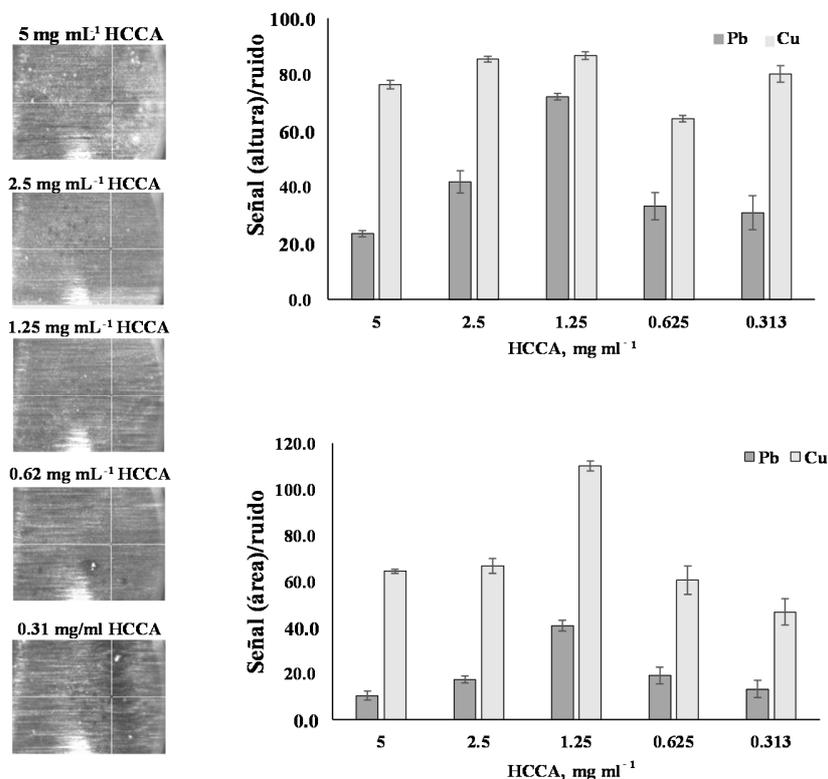


Fig. 31. Efecto de dilución de HCCA en la relación señal/ruido evaluada para las mediciones de altura máxima y área de pico. Se adquirieron señales analíticas en cinco repeticiones a m/z 358,96 para Cu

($400 \mu\text{g l}^{-1}$) y m/z 355,95 para Pb ($1200 \mu\text{g l}^{-1}$); el ruido se calculó como la desviación estándar de las intensidades adquiridas fuera del patrón isotópico para cada analito. Para cada dilución de matriz, se muestran fotos de los depósitos co-cristalizados.

Los resultados de este experimento se presentan en la Fig. 31. mostrando el efecto de la concentración de HCCA sobre S/R evaluado midiendo alturas o áreas de las respectivas señales. Aplicando el criterio de la más alta posible relación S/R, se seleccionó la concentración de HCCA 1.25 mg ml^{-1} y se decidió utilizar el área de pico como la modalidad de la señal analítica.

En cuanto a las condiciones instrumentales, y en función con la experiencia previa [186, 221], se usó una intensidad de láser relativamente baja (40%), pocos disparos por serie (100) para mantener el ruido espectral bajo y obtener una buena repetibilidad. Además, para mejorar la sensibilidad, se utilizó la suma de las señales obtenidas en sucesivas series (25x100).

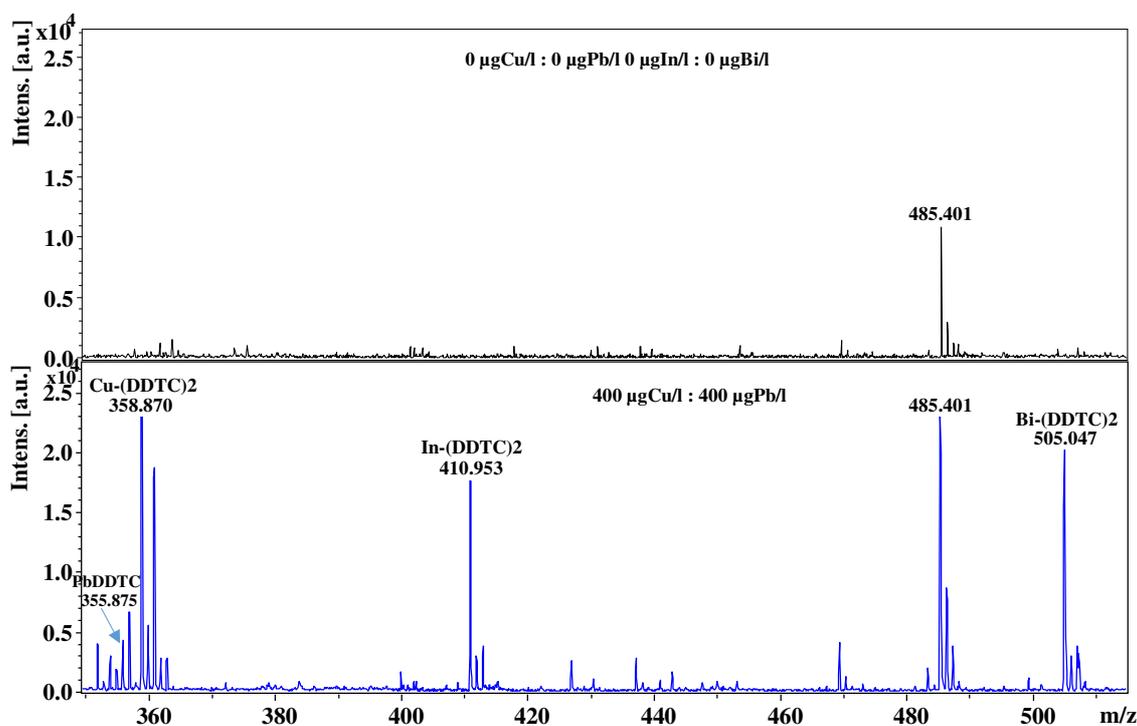


Fig. 32. Espectros MALDI-TOFMS obtenidos, mediante las condiciones finales experimentación e instrumentación, para la mezcla de estándares que contienen $400 \mu\text{g l}^{-1}$ Cu, $400 \mu\text{g l}^{-1}$ Pb, $150 \mu\text{g l}^{-1}$ Bi y $500 \mu\text{g l}^{-1}$ In (espectro inferior) y para una solución del blanco sin estándares internos (espectro superior).

Aplicando las condiciones finales, se obtuvieron los espectros de masas para el blanco y para la mezcla de estándares que contenía $400 \mu\text{g l}^{-1}$ de Cu y Pb, $150 \mu\text{g l}^{-1}$ Bi y $500 \mu\text{g l}^{-1}$ In. Estos espectros

se presentan en la Fig. 32. y se puede observar que los iones correspondientes a los complejos de dietilditiocarbamato con los cuatro metales aparecen en regiones m/z libres de señales de fondo altas. Cabe mencionar que la m/z 485.40 está presente en todos los espectros y se atribuyó a la contaminación por hierro (complejo Fe(III)-DDTC₂). En la Tabla 14, se muestran los resultados de repetibilidad basados en cinco réplicas no sucesivas. Las desviaciones estándar relativas para los iones monoisotópicos de cada complejo metálico fueron las siguientes: 4.88% para Cu (m/z 358.96), 6.29% para Pb (m/z 355.95), 6.52% para Bi (m/z 505.02) y 10.8% para In (m/z 410.87). La normalización de las señales de Cu y Pb por Bi resultó en una disminución notable de las desviaciones estándar relativas (3,33% para Cu y 2,78% para Pb) en comparación con In, por lo cual el complejo de Bi se utilizó como estándar interno en la calibración y cuantificación univariante.

Tabla 14. Repetibilidad de las señales analíticas adquiridas para cada complejo metálico con dietilditiocarbamato. Se utilizó el área de la señal del pico monoisotópico obtenida para 400 $\mu\text{g l}^{-1}$ de Cu y Pb, 150 $\mu\text{g l}^{-1}$ Bi y 500 $\mu\text{g l}^{-1}$ In.

Replica	Señales analíticas sin estándar interno (EI), cps				Señales normalizadas con EI	
	Pb	Cu	In	Bi	Pb/Bi	Cu/Bi
1	5063	25056	18334	22519	0.225	1.113
2	5349	26367	20146	23288	0.230	1.132
3	5303	24154	18866	22256	0.238	1.085
4	4755	22773	24303	19755	0.241	1.153
5	4534	24017	22474	20061	0.226	1.197
Promedio	5001	24473	20825	21576	0.232	1.136
SD	315	1194	2250	1407	0.006	0.038
RSD, %	6.29	4.88	10.8	6.52	2.78	3.33

Calibración univariante. En primera instancia, se examinó la viabilidad de la determinación de Pb y Cu utilizando las señales correspondientes a sus iones monoisotópicos. Los espectros de masas se adquirieron para soluciones de calibración y las áreas de los picos de Cu, Pb y Bi se integraron para las m/z 358.96, 355.95 y 505.02, respectivamente. Las funciones de regresión lineal se calcularon tomando todas las repeticiones individuales y los valores promedios obtenidos para cada punto de calibración (Fig. 33.). En la Tabla 15, se presentan los parámetros analíticos que se obtuvieron tomando promedios de las señales de los analitos con y sin la normalización por el EI de Bi(III)-(DDTC)₂ (m/z 505.02). Como se esperaba, el análisis cuantitativo de Cu y Pb no pudo realizarse utilizando sus señales sin normalización por EI debido a la falta de linealidad; sin embargo, tomando los valores promedios de las señales individuales normalizadas por el estándar interno, se obtuvo una linealidad aceptable ($r^2 > 0.99$).

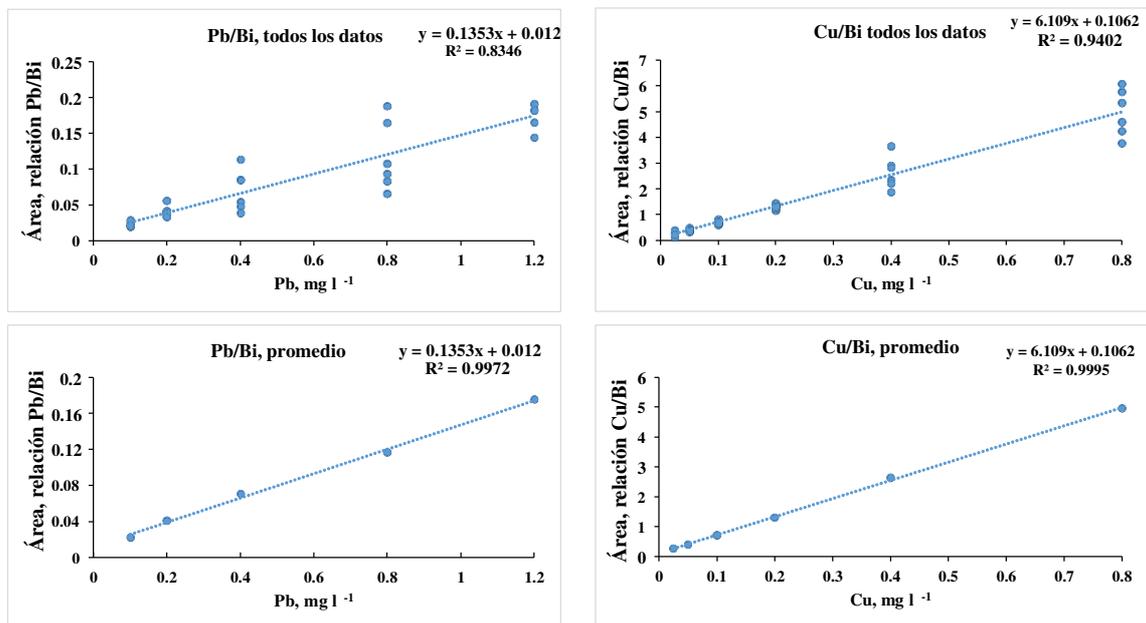


Fig. 33. Calibración univariante realizada mediante las señales del EI normalizadas para los picos monoisotópicos de los complejos de Cu y Pb. Área máxima como señal analítica, EI-Bi-DDTC (superior), en función de la regresión lineal obtenida utilizando todos los resultados individuales; función de regresión lineal calculada para los promedios de todos los datos individuales (inferior).

Los límites de detección y cuantificación de la calibración se incluyen en esta misma Tabla 15 y los límites de detección y cuantificación del método se evaluaron mediante el proceso de calibración realizado en presencia de la matriz de la muestra (se utilizó la muestra Al diluida 20 veces para Cu y sin dilución para Pb, respectivamente).

Tabla 15. Parámetros analíticos evaluados para la calibración de regresión lineal univariante utilizando los valores promedios para las señales más intensas de Cu y Pb (seis réplicas), con y sin normalización con EI (Bi(III)-(DDTC)₂, *m/z* 505.02).

Parámetro	Cu (<i>m/z</i> 358.96)		Pb (<i>m/z</i> 355.95)	
	Sin EI	Con EI	Sin EI	Con EI
R ²	0.8377	0.9995	0.7392	0.9972
LD, µg l ⁻¹	-	3.10	-	25.3
LC, µg l ⁻¹	-	10.3	-	83.4
CV, % (100 µg l ⁻¹)	16.5	10.3	19.7	13.6
Método LD, µg l ⁻¹	-	3.36	-	27.2
Método LC, µg l ⁻¹	-	11.1	-	89.8

Se obtuvieron valores muy similares en presencia y en ausencia de muestra, lo que indica que la composición química de tequila tuvo un efecto mínimo sobre el ruido de fondo, debido a una limpieza eficiente de la muestra durante la extracción. A esta misma muestra A1, se le adicionó una solución estándar (200 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cu y 400 $\mu\text{g l}^{-1}$ Pb) y los espectros de masas para esta muestra, fueron adquiridos antes y después de la adición estándar. Estos espectros se presentan en la Fig. 34. junto con un espectro obtenido para mezcla de estándares que contenía estas mismas concentraciones de los analitos. Para una mayor claridad, en la Fig. 34 se muestran solamente las regiones m/z correspondientes a cada una de las señales de Cu, Pb, Bi e In.

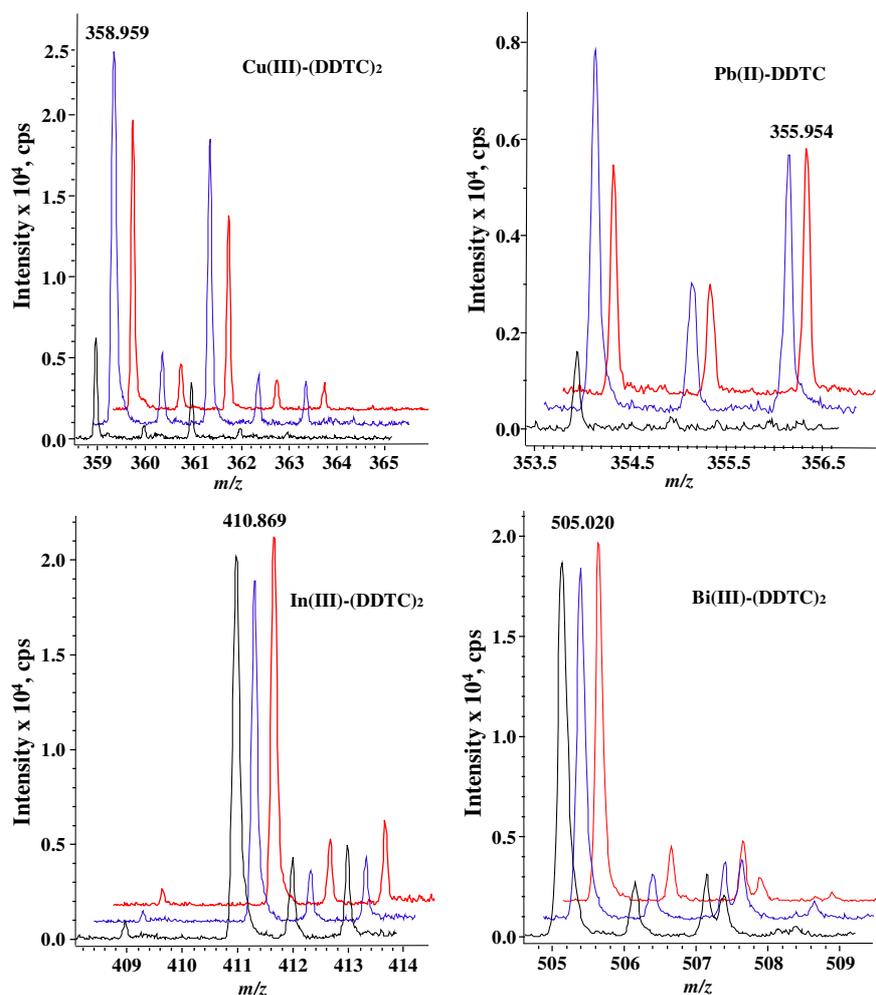


Fig. 34. Señales de los complejos metal-dietilditiocarbamato obtenidas mediante el procedimiento por MALDI-TOFMS para la muestra A1 (negro), esta misma muestra A1 con adición estándar (200 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ y 400 $\mu\text{g Pb l}^{-1}$) (azul) y para la solución estándar que contiene 200 $\mu\text{g Cu l}^{-1}$ y 400 $\mu\text{g Pb l}^{-1}$ (rojo). Las tres soluciones contenían EI (150 $\mu\text{g Bi l}^{-1}$ y 500 $\mu\text{g In l}^{-1}$ In en forma de sus con DDTC). (a) Cu(III)-(DDTC)₂, (b) Pb(II)-(DDTC), (c) Bi(III)-(DDTC)₂ y (d) In(III)-(DDTC)₂.

Como ya se describió en la Tabla 14, las señales de indio presentaron una peor repetibilidad en comparación con el bismuto, lo que respalda la selección de este último como EI. Los porcentajes de recuperación obtenidos para la muestra A1 y para otras dos muestras (B1, EA1) se muestran en la Tabla 16 indicando una aceptable exactitud del procedimiento.

Tabla 16. Resultado de los experimentos de recuperación llevados a cabo utilizando la cuantificación univariante (tres repeticiones independientes).

Muestra	Elemento	promedio \pm DE, $\mu\text{g l}^{-1}$		Recuperación, %
		Adicionada	Encontrada	
A1	Cu	0	70.8 \pm 8.2	
		200	257 \pm 10	93.1
	Pb	0	nd	
		400	430 \pm 15	108
B1	Cu	0	171 \pm 17	
		200	367 \pm 24	98.0
	Pb	0	nd	
		400	367 \pm 27	91.2
EA1	Cu	0	198 \pm 10	
		200	387 \pm 21	94.5
	Pb	0	nd	
		400	433 \pm 19	108

La cuantificación univariante presentada en esta sección se realizó con base en las áreas de las señales medidas para el ion monoisotópico de cada analito. Esto puede ser considerado como un punto débil del procedimiento ya que la información analítica contenida en todo el espectro podría ser de mayor relevancia en comparación con la que proporciona solo un pico de una señal analítica.

De acuerdo con nuestra experiencia, era de esperarse que la calibración multivariante proporcionaría una determinación más confiable y con un tratamiento de datos mucho más simple. De hecho, al usar el método de mínimos cuadrados parciales (PLS2), se evitan la integración de señales individuales, así como la normalización por EI [221].

Regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS2). Como ya se ha descrito en el capítulo anterior de la tesis, PLS2 es una herramienta típica utilizada para el análisis multivariante y especialmente útil cuando se deben procesar relativamente pocas muestras con una gran cantidad de variables. En este método, la determinación de variables latentes (factores o componentes) se lleva a cabo bajo el criterio de la mayor covarianza posible entre las variables de respuesta y las variables explicativas, originando un modelo de regresión. En tal enfoque, se pueden manejar conjuntos de datos grandes y continuos que contienen abundantes multicolinealidades como los espectros de masas [210, 211]. La reducción

de la dimensionalidad de los datos se realiza eliminando las variables explicativas (valores m/z) de baja covarianza y seleccionando el número adecuado de componentes. Así mismo, la validación cruzada se aplica para establecer un modelo de regresión lineal que minimice el error de la predicción de la concentración del analito.

En este trabajo, el algoritmo PLS2 se obtuvo utilizando el software Unscrambler 7.0. Los espectros de masas adquiridos para las soluciones de calibración (preparados como se describe en la parte experimental) en un rango m/z 350 - 513 se usaron para generar la matriz X de variables explicativas, mientras que la matriz Y contenía concentraciones de Cu y Pb en cada una de estas soluciones [235]. Como se indicó anteriormente, se eliminaron las señales de baja covarianza y se varió el número de componentes, obteniéndose una serie de modelos PLS2 [235]. Cada modelo fue validado de forma cruzada dejando una muestra a la vez y el error de predicción más bajo se obtuvo utilizando cuatro componentes para cada analito. Para evaluar el efecto del estándar interno durante el análisis de PLS2, se generaron modelos para todo el intervalo de m/z y se compararon con los calculados después de excluir las señales correspondientes de In (m/z 405 - 420), Bi (m/z 500 - 512), o a ambos. Todos los modelos obtenidos con las señales de “In” incluidas, presentaron un peor rendimiento, lo que está de acuerdo con los resultados de la calibración univariante y confirma que el complejo In(III)-DDTC)₂ no fue útil como estándar interno. Las Figuras 35 y 36 muestran los modelos PLS2 obtenidos para Cu y Pb, respectivamente. En estas figuras, los resultados obtenidos sin señales de Bi (cinco componentes) se comparan con los calculados al incluir las señales de Bi (cuatro componentes). Los parámetros analíticos obtenidos se muestran en la Tabla 17, en la que se puede apreciar una linealidad aceptable con $R^2 > 0.99$, y con pendientes similares para la calibración en comparación con la validación cruzada. Cabe mencionar, que estos parámetros fueron ligeramente mejores cuando se consideraron las señales del complejo de Bi (con EI) respecto al modelo que no incluía EI. En general, los errores cuadráticos medios de calibración (RMSEC) y predicción (RMSEP) fueron menores para el cobre en comparación con el plomo; para ambos elementos, estos errores disminuyeron cuando las señales del EI se incluyeron en el modelo PLS2 con respecto a los modelos calculados sin EI. Por otro lado, los errores de predicción siempre fueron más altos en comparación con los errores de calibración, sin embargo, la diferencia entre RMSEP y RMSEC para ambos analitos fue menor al usar EI (Tabla 17). Los límites de cuantificación del método se calcularon a partir de diez desviaciones estándar obtenidas para cinco repeticiones de predicción realizadas de una solución del blanco (se utilizó la muestra A1 diluida 20 veces para Cu y sin dilución para Pb, respectivamente) (18, 38). En este sentido, se obtuvieron valores de $23.4 \mu\text{g l}^{-1}$ para Cu y $97.1 \mu\text{g l}^{-1}$ para Pb, los cuales, fueron peores que los obtenidos en la calibración univariante ($11.1 \mu\text{g l}^{-1}$ para Cu y $89.8 \mu\text{g l}^{-1}$ para

Pb, Tabla 15) sin embargo, resultaron adecuados para evaluar el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana [227, 228].

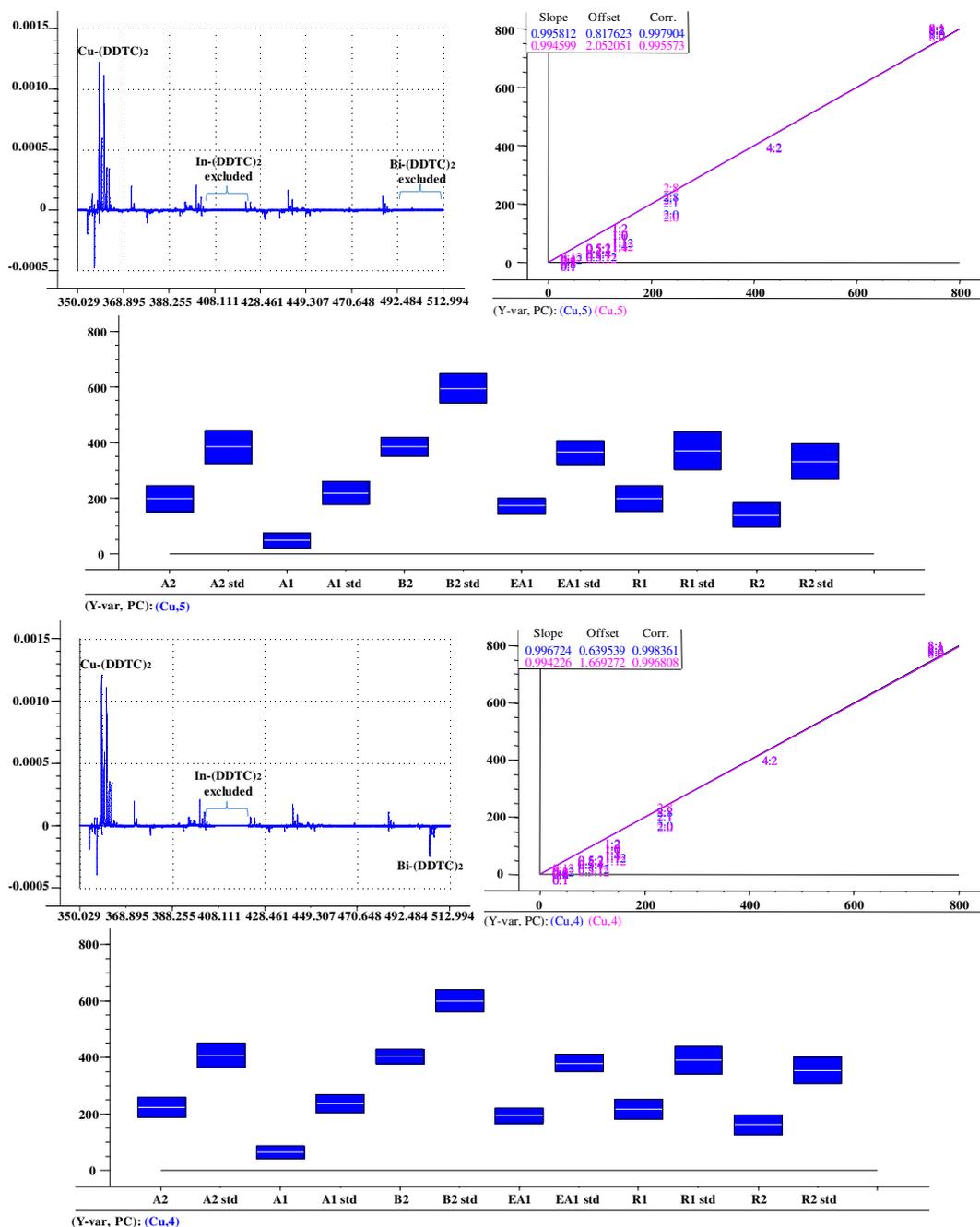


Fig. 35. Resultados por Unscrambler que muestran los modelos PLS2 con la calibración de Cu, validación cruzada y predicción en las muestras A2, A1, B2, EA1, R1, R2 y después de la adición estándar ($200 \mu\text{g l}^{-1} \text{Cu}$) a estas muestras. SUPERIOR: Se utilizaron espectros de masas excluyendo el rango m/z correspondiente a los complejos In y Bi (sin EI). INFERIOR: Se utilizaron espectros de masas excluyendo el rango m/z correspondiente al complejo In (con Bi(III)-(DDTC)₂ como EI).

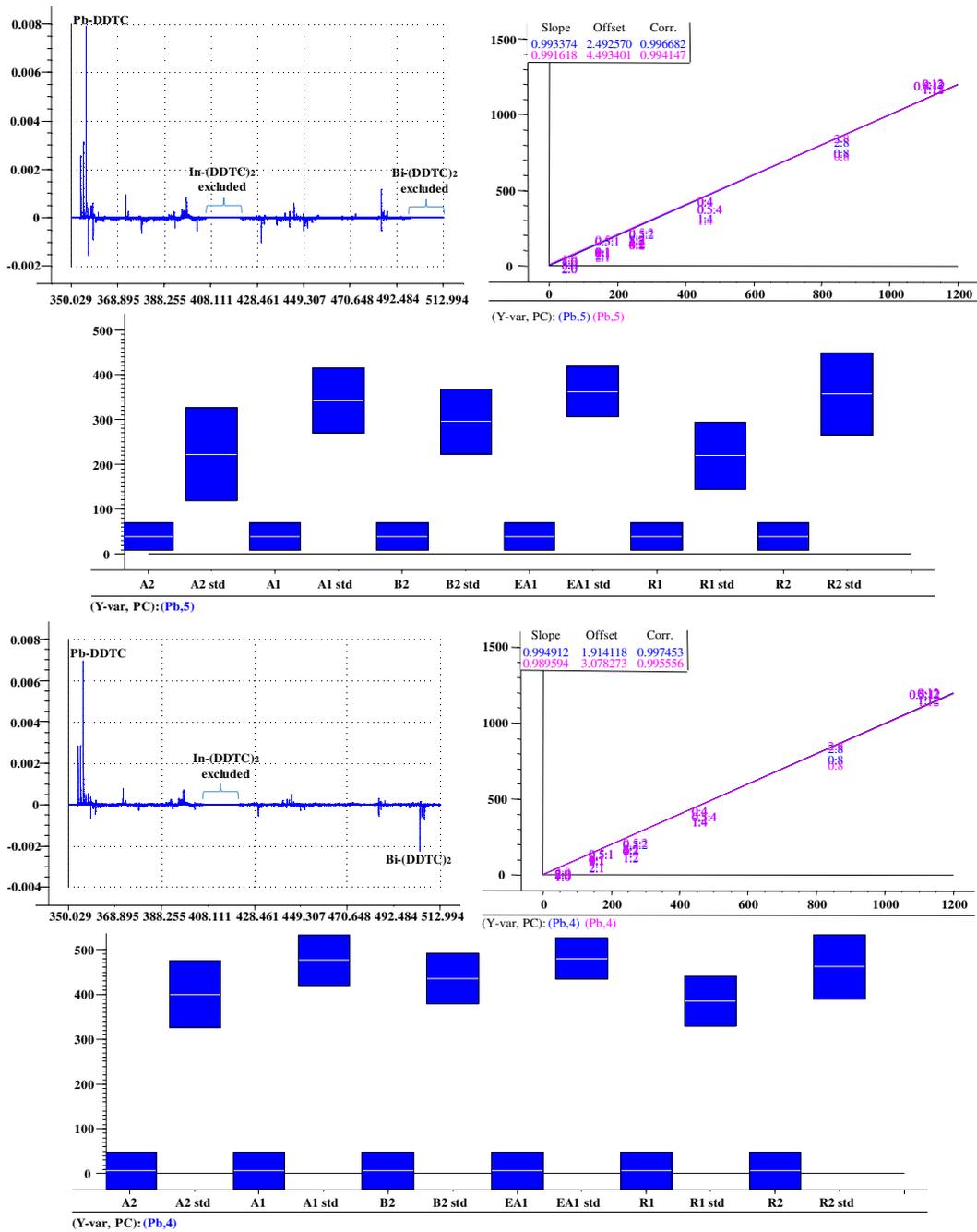


Fig. 36. Resultados por Unscrambler que muestran los modelos PLS2 con la calibración de Pb, validación cruzada y predicción en las muestras A2, A1, B2, EA1, R1, R2 y después de la adición estándar ($400 \mu\text{g l}^{-1}$ Pb) a estas muestras. SUPERIOR: Se utilizaron espectros de masas excluyendo el rango m/z correspondiente a los complejos In y Bi (sin EI). INFERIOR: Se utilizaron espectros de masas excluyendo el rango m/z correspondiente al complejo In (con Bi(III)-(DDTC)₂ como EI).

Tabla 17. Parámetros analíticos evaluados mediante el modelo PLS2 utilizado en la determinación de Cu y Pb, a partir de los espectros MALDI-TOFMS.

Etapa de análisis	Parámetro	Cu		Pb	
		Con EI	Sin EI	Con EI	Sin EI
Calibración	Pendiente	0.9967	0.9958	0.9949	0.9933
	R ²	0.9984	0.9979	0.9974	0.9967
	RMSEC, %	12.719	14.419	22.291	27.510
Validación cruzada	Pendiente	0.9942	0.9945	0.9896	0.9916
	R ²	0.9968	0.9956	0.9956	0.9941
	RMSEP, %	21.741	24.817	36.851	43.244
Predicción	SD*	2.34	3.12	9.71	12.6
	LC**, µg l ⁻¹	23.4	31.2	97.1	126

*Desviación estándar para 5 predicciones de muestra en blanco, µg l⁻¹, ** límite de cuantificación del método.

Cabe destacar que los resultados presentados anteriormente indican claramente la importancia del uso de un estándar interno, para mejorar el rendimiento analítico en la aplicación de PLS2 para la determinación de Cu y Pb por el procedimiento propuesto. Como ya se observó antes [221], el algoritmo PLS2 es capaz de modelar la fluctuación de las señales del EI entre diferentes muestras durante la construcción de funciones de regresión para los dos analitos.

Para las pruebas de exactitud, las muestras A1, A2, B2, EA1, R1 y R2 fueron adicionadas con 200 µg l⁻¹ Cu y 400 µg l⁻¹ Pb y sus espectros de masas adquiridos fueron sometidos al modelo de PLS2 para obtener los resultados de predicción, los cuales se muestran gráficamente en las Fig. 35 y Fig.36. Los porcentajes de recuperaciones evaluados para Cu fueron los siguientes: 92.4%, 97.5%, 98.5%, 96.5%, 94.5%, y 103%, respectivamente. El plomo no fue detectado en ninguna muestra, pero sus recuperaciones en las muestras enriquecidas estuvieron en un rango de 98.8 - 120% (resultados individuales proporcionados en la Tabla 18). Como se puede observar en las Figuras 35 y 36, se obtuvo una mejor predicción al incluir señales del EI para la construcción de modelos PLS2.

Análisis de tequilas por MALDI-TOFMS y ICP-MS. De acuerdo con lo descrito en la parte experimental, se analizaron diez muestras aleatorias de tequila mediante el procedimiento propuesto utilizando la calibración univariante y el método PLS2, ambos con el complejo Bi-dietilditiocarbamato como EI. Estas mismas muestras también fueron analizadas por ICP-MS, siguiendo un procedimiento establecido con anterioridad [229]. En la Tabla 18, los resultados obtenidos se presentan mostrando los valores promedios con sus respectivas desviaciones estándar basadas en tres réplicas independientes. Para cobre, los resultados obtenidos por los tres procedimientos estuvieron en una buena concordancia, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre resultados MALDI-TOFMS y ICP-MS (diferencia entre dos promedios, p<0.05).

Evidentemente, la mejor precisión correspondió a los resultados de ICP-MS (intervalo RSD 0.5 - 1.9%) mientras que MALDI-TOFMS proporcionó una precisión similar utilizando la calibración univariante (RSD 1.6 - 11.6%) o por regresión PLS2 (RSD 1.5 - 12.7%) [229]. Las concentraciones de Cu encontradas en este estudio (intervalo encontrado por ICP-MS: 169 - 2618 $\mu\text{g l}^{-1}$) fueron consistentes con datos previamente reportados (0.011-11.6 mg l^{-1}) [229] y de los diez tequilas analizados, solo dos excedieron la concentración máxima permisible para Cu marcada en la NOM como 2 mg l^{-1} [227, 228]. Cabe mencionar, que los niveles relativamente altos de este elemento en tequila se deben al uso de alambiques y tuberías de cobre durante su proceso de destilación, y esta practica es empleada para asegurar agradables propiedades sensoriales al tequila [236].

Tabla 18. Resultados de la determinación de Cu y Pb en diferentes marcas de tequila, obtenidas mediante los siguientes procedimientos: (1) MALDI-TOFMS por calibración univariante con EI; (2) MALDI-TOFMS con PLS2; (3) ICP-MS. Se presentan los valores promedios con sus respectivas desviaciones estándar, basados en tres repeticiones independientes. A fin de que por MALDI-TOFMS no se detectó Pb en ninguna muestra, los resultados se presentan para las muestras con adición estándar (400 $\mu\text{g l}^{-1}$ Pb) analizadas por el procedimiento (2) junto con su porcentaje de recuperación (2 (R,%)).

Muestra	Cobre: promedio \pm DE, $\mu\text{g l}^{-1}$			Plomo: promedio \pm DE, $\mu\text{g l}^{-1}$		
	1	2	3	2	2 (R,%)	3
B1	171 \pm 17	169 \pm 9	165 \pm 1	419 \pm 31	105	0.62 \pm 0.04
B2	404 \pm 28	407 \pm 11	399 \pm 6	427 \pm 38	107	1.09 \pm 0.05
B3*	2186 \pm 34	2098 \pm 46	2129 \pm 19	409 \pm 37	102	2.48 \pm 0.04
R1	211 \pm 15	212 \pm 14	214 \pm 3	395 \pm 37	98.8	0.58 \pm 0.05
R2	197 \pm 14	187 \pm 11	191 \pm 1	450 \pm 47	113	13.5 \pm 0.7
R3	274 \pm 17	281 \pm 9	279 \pm 2	432 \pm 43	108	1.83 \pm 0.09
A1	70.8 \pm 8.2	68.2 \pm 8.6	65.4 \pm 0.9	478 \pm 48	120	1.91 \pm 0.04
A2	224 \pm 15	208 \pm 13	211 \pm 4	401 \pm 41	100	0.45 \pm 0.03
EA1	198 \pm 10	201 \pm 10	192 \pm 2	481 \pm 46	120	2.19 \pm 0.08
EA2*	2605 \pm 42	2618 \pm 30	2599 \pm 18	412 \pm 32	103	1.16 \pm 0.04

* Las muestras B3 y EA2 se diluyeron 4 veces antes de su análisis por MALDI-TOFMS.

Debido a su alta toxicidad, la presencia de plomo en productos relacionados con los alimentos es ciertamente no deseada. En este sentido, resultados del contenido de Pb en tequilas, por ICP-MS obtenidos en este trabajo mostraron un intervalo de concentraciones 0.45 - 13.5 $\mu\text{g l}^{-1}$, lo que está de acuerdo con otros reportes 0.38 - 18.3 $\mu\text{g l}^{-1}$ [229, 236] y está muy por debajo del nivel máximo permisible de 0.5 mg l^{-1} Pb [227, 228]. Asimismo, con los límites de detección y cuantificación del método evaluados para el procedimiento MALDI-TOFMS (Tabla 15, Tabla 17), no se detectó plomo

en ninguna de las diez muestras analizadas. Por otro lado, los porcentajes de recuperación obtenidos después de la adición estándar ($400 \mu\text{g l}^{-1}$ Pb) estuvieron en el intervalo de 91.2 - 108 % para la calibración univariante y 98.8 - 120 % para la regresión PLS2. De acuerdo con esto, ambos métodos de cuantificación podrían ser útiles para el control de calidad en cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana que regula los niveles de Pb en tequila [227, 228]. Sin embargo, la calibración univariante proporcionó una mejor precisión (RSD 3.5 - 6.5 %, Tabla 3) en comparación con PLS2 (7.4 - 10.9 %).

IV.4.4. Conclusiones

La determinación de trazas de metales/metaloideos en alimentos y bebidas es muy demandada. Hoy en día, ICP-MS es la técnica más poderosa y ampliamente aceptada para este propósito; sin embargo, también hay un interés creciente en el desarrollo de procedimientos en escala micro caracterizados por la simplicidad del procedimiento, rapidez de adquisición y manejo de los datos, baja susceptibilidad a interferencias y no afectados por los efectos de memoria en. En este contexto, la desorción/ionización láser asistida por matriz con espectrometría de masas de alta resolución ha demostrado ser una alternativa factible, no obstante, las deficiencias típicas de esta técnica que dificultan el análisis cuantitativo en un rango de m/z bajo deben controlarse adecuadamente. En este trabajo, se ha empleado MALDI-TOFMS convencional para la determinación de cobre y plomo en tequilas. El procedimiento propuesto consiste en los siguientes pasos: (i) adición de Bi(III) como estándar interno; (ii) formación de complejos de dietilditiocarbamato y su extracción en cloroformo a pH neutro; (iii) evaporación y reconstitución del disolvente en un micro-volumen de acetonitrilo para la co-cristalización con HCCA en la placa de MALDI; (iv) adquisición de espectros de masas de alta resolución; (v) cuantificación mediante la calibración univariante utilizando señales m/z monoisotópicos de los iones de cada analito o por regresión PLS2, normalizadas con EI. Las condiciones experimentales e instrumentales se seleccionaron bajo criterios de la homogeneidad de la co-cristalización de matriz-muestra y la obtención de una relación señal/ruido (S/R) lo más alta posible. Los límites de cuantificación del método para cobre obtenidos por el método univariante y para PLS2 ($11.1 \mu\text{g l}^{-1}$, $23.4 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente) fueron adecuados para la determinación de este elemento en productos comerciales como el tequila, arrojando resultados consistentes con los obtenidos por ICP-MS y dentro del intervalo reportado anteriormente. Para el plomo, los límites de cuantificación logrados a partir de los métodos univariante y PLS2 ($89.8 \mu\text{g l}^{-1}$, $97.1 \mu\text{g l}^{-1}$, respectivamente) fueron mucho peores que para ICP-MS, por lo tanto, el procedimiento propuesto solo puede ser útil para verificar si el tequila cumple con las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana.

Para ambos elementos, el uso de Bi(III) como EI proporcionó un mejor rendimiento analítico en términos de límites de detección/cuantificación, precisión y porcentajes de recuperaciones, utilizando tanto la calibración univariante como la regresión PLS2. Por otro lado, los parámetros anteriores fueron ligeramente mejores para la calibración univariante en comparación con PLS2; sin embargo, la última opción es especialmente atractiva porque el algoritmo usa espectros enteros y no hay necesidad de integración de señal ni de su normalización por EI. Ciertamente, no tiene sentido adquirir un sistema MALDI solamente para la cuantificación de metales/metaloideos; sin embargo, el procedimiento aquí propuesto puede recomendarse como una aplicación complementaria de esta

instrumentación con beneficios específicos de análisis sin interferencias y sin efectos de memoria, llevados a cabo con una velocidad excepcional y al costo de operación del instrumento más bajo en comparación con cualquier técnica de espectrometría atómica.

CAPÍTULO V

V.1. Conclusiones generales

El trabajo de tesis ha sido encaminado en el desarrollo de procedimientos analíticos y su aplicación en el área de metalómica. Como se describió en la Introducción, metalómica es una de las ciencias ómicas dedicada al estudio integral de metales/metaloides en un sistema dado el cual puede tener carácter biótico o abiótico. El enfoque principal es en los organismos vivos, pero debido a la exposición de estos a las condiciones del medio ambiente y al contenido de metales/metaloides y sus especies en alimentos, el dominio de metalómica abarca el análisis de muestras muy variadas buscando elucidar el impacto de metales/metaloides en los seres vivos.

Los cuatro elementos de interés en el trabajo realizado han sido: Hg, Cr, Cu y Pb. En cuanto al tipo de muestras, se analizaron los tejidos del pescado y tequila, además de llevar a cabo el estudio mecanístico de la reducción de Cr(VI) en las soluciones modelo. Se utilizaron diferentes técnicas de análisis instrumental, incluyendo: ICP-MS, MP-AES, espectrofotometría UV/Vis y espectrometría de masas con ionización suave (ESI-QTOF-MS y MALDI-TOFMS).

Se optó por trabajar con tejido del pescado debido a que los organismos marinos tienden a acumular contaminantes medioambientales y forman una fuente importante de estos xenobióticos (además de algunos elementos esenciales) en cadena alimenticia del hombre. En tejidos del pescado se determinó el mercurio total, las especies de mercurio (Hg^{2+} y MeHg^+) y cobre total. Por su parte, se llevó a cabo la determinación de cobre y plomo en tequila, ya que son dos metales regulados por la Norma Oficial Mexicana; esta bebida mexicana tradicional es de amplio consumo tanto en país como en el extranjero y se requieren procedimientos analíticos que permitan controlar el cumplimiento de la norma. Finalmente, también dentro del tema principal de metalómica, se realizó un estudio de reducción de cromo hexavalente por el ácido oxálico en presencia de Mn(II), para entender el papel de manganeso en este proceso y abrir una posibilidad de desarrollar un método de remediación amigable al medio ambiente.

Desde el punto de vista de química analítica, la principal aportación de este trabajo ha sido demostrar la utilidad de la técnica MALDI-TOFMS para la determinación de metales en alimentos mediante calibración univariante basada en un solo valor m/z para cada uno de los elementos y también por el método multivariante. Hay que resaltar la importancia del uso de estándar interno y también el hecho que el método de mínimos cuadrados parciales (PLS2) ha sido empleado en esta tesis por primera vez para la cuantificación de pequeñas moléculas por MALDI-TOFMS. Las conclusiones de esta parte del trabajo son las siguientes:

- En condiciones ligeramente ácidas (pH 3), ditizona forma complejos con Cu(II), Hg(II), Ag(I), Pd(II), Au(III), los cuales se extraen a solvente orgánico de manera selectiva y

eficiente. De ahí, Ag(I) ha sido seleccionado como EI para la determinación de cobre y mercurio.

- En condiciones neutrales, dietilditiocarbamato forma complejos con diferentes iones metálicos que son fácilmente extraídos con solventes orgánicos apolares; dicha versatilidad permite emplear este reactivo para determinación de Cu y Pb, como metales incluidos en la Norma Oficial Mexicana dedicada a la producción y las especificaciones de tequila, y también elegir Bi(III) e In(III) como potenciales estándares internos.
- Formación de complejos permitió purificar la muestra eliminando compuestos polares o con carga iónica en la etapa de extracción. Al mismo tiempo, en MALDI, los complejos generaron iones con m/z relativamente alta (respecto a iones metálicos) y por ello no afectados por las señales de matriz química.
- El análisis de los complejos formados por ESI-QTOFMS y por MALDI-TOFMS resultó en la identificación de iones generados en fase gaseosa, mismos que fueron utilizados posteriormente para fines cuantitativos; además, dicho análisis proporcionó evidencias experimentales que confirman las reacciones redox en los que participa cobre y que ocurren durante la ionización suave.
- Los puntos clave para lograr una buena homogeneidad de co-cristalización muestra-matriz y la más alta posible relación señal-ruido, han sido: (i) selección de HCCA como matriz; (ii) ajuste de la composición de la solución de HCCA y del solvente para re-constitución de la muestra; (iii) ajuste de las cantidades relativas muestra - matriz; (iv) depósito en la placa en el modo de gota seca (“dried droplet”); (v) apropiada selección de las condiciones instrumentales; (vi) uso de estándar interno.
- Se ha demostrado que la cuantificación de metales totales puede llevarse a cabo mediante calibración externa, utilizando para cada uno de ellos la señal del ion de complejo formado en MALDI (m/z monoisotópica) normalizado por EI.
- Aplicación de regresión PLS2 demostró ser una alternativa viable para la determinación simultánea de dos iones metálicos con importante ventaja de muy simple manejo de datos; específicamente, el modelo PLS2 se construye con base en espectros enteros, sin necesidad de integración de señales individuales y sin normalización manual por EI.
- En la determinación de Hg y Cu con ditizona, el método PLS2 resultó ser más confiable que la calibración univariante, proporcionando una mejor precisión y los límites de cuantificación del método $63 \mu\text{gCu kg}^{-1}$ y $75\mu\text{gHg kg}^{-1}$ respecto tejido de pescado liofilizado. Los resultados obtenidos en el análisis de muestras reales fueron congruentes con los obtenidos por ICP-MS.

- En la determinación de Cu y Pb en tequila, ligeramente mejores parámetros analíticos se obtuvieron para la calibración univariante en comparación con PLS2; sin embargo, en ambos casos los resultados en muestras reales fueron en concordancia con los del ICP-MS. Los límites de cuantificación en tequila obtenidos por calibración univariante y por PLS fueron $11.1 \mu\text{g L}^{-1}$, $23.4 \mu\text{g L}^{-1}$ para cobre y $89.8 \mu\text{g L}^{-1}$, $97.1 \mu\text{g L}^{-1}$ para plomo, respectivamente. De ahí, el procedimiento propuesto permite la determinación de Cu en tequilas, mientras que para plomo solamente permite verificar el cumplimiento de la Norma Oficial Mexicana.
- Es muy importante resaltar que, la determinación de metales/metaloides por MALDI-TOFMS no justifica la compra del instrumento; sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo abren una nueva área de sus aplicaciones especialmente atractiva debido a simplicidad, rapidez, fácil manejo de datos, micro-escala, bajo costo de operación del equipo y, lo que es especialmente relevante, falta de efectos de memoria y de interferencias espectrales que a menudo se presentan en técnicas de espectrometría atómica.

Segundo tema del trabajo de tesis ha sido afinar el procedimiento de especiación de mercurio desarrollado anteriormente, enfocándose en la disminución de las señales del blanco y mejorar la retención de mercurio inorgánico y metilmercurio en la columna de fase inversa. En el desarrollo experimental, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

- N-acetilcisteína, como un compuesto sintético resultó ser menos contaminada con mercurio respecto a cisteína, la cual es de origen natural. Ambos compuestos contienen en su estructura grupo -SH lo que asegura formación de enlaces con las especies de mercurio y con Bi(III) como EI.
- El punto anterior es la clave para lograr una eficiente extracción de mercurio del tejido de pescado y también importante en la separación de especies por HPLC en fase inversa. La sustitución de cisteína por N-acetilcisteína mejoró la retención de ambas especies en la columna sin extender demasiado el tiempo de corrida cromatográfica (4 min respecto a 3 min en el procedimiento anterior). Asimismo, con N-acetilcisteína el blanco para mercurio inorgánico disminuyó aprox. cinco veces.
- Los límites de detección fueron $0.54 \mu\text{gHg l}^{-1}$ y $0.63 \mu\text{gHg l}^{-1}$ para Hg^{2+} y CH_3Hg^+ respectivamente. La exactitud ha sido demostrada evaluando porcentajes de recuperación en experimentos de adición de estándar (76.0 - 109% para Hg^{2+} y 88.4 - 127% CH_3Hg^+).
- En aplicación al análisis de seis diferentes muestras de atún en lata y tres de pescado fresco, se observó un amplio intervalo de concentraciones totales de mercurio, con metilmercurio como especie predominante. Entre diferentes muestras de atún, el metilmercurio varía desde

$15.5 \pm 3.8 \mu\text{gHg kg}^{-1}$ hasta $525 \pm 2 \mu\text{gHg kg}^{-1}$ (masa fresca). La más alta concentración de especie orgánica fue encontrada en aleta de mantarraya ($648 \pm 41 \mu\text{gHg kg}^{-1}$).

La participación en el proyecto centrado en el mecanismo de reducción de Cr(VI) por el ácido oxálico en presencia de Mn(II), ayudó a formular las siguientes conclusiones:

- La elucidación del mecanismo de reacción ha sido posible gracias al uso combinado de diferentes técnicas analíticas, entre las cuales espectrofotometría UV/Vis con mediciones directas y con previa separación cromatográfica, confirmó que Mn(II) favorece la reducción de Cr(VI) y que en este proceso se forman especies intermediarias de Cr hasta llegar a Cr(III).
- El análisis por MP-AES permitió descartar la formación de una especie intermediaria mixta de Cr y Mn durante la reducción.
- Con base en los datos ESI-QTOFMS, se identificaron las especies existentes en la mezcla de reacción conformada por Cr(VI), ácido oxálico y Mn(II), pH 3, y se siguieron cambios de los contenidos de cada una de las especies en el tiempo real de la reacción.
- En cuanto al mecanismo de reducción propuesto, se encontró que el complejo Mn(II)-bis-oxalato es una especie reductora activa que proporciona un electrón a cualquier compuesto de cromo que contenga un enlace Cr=O, lo que da como resultado su reducción a Cr-OH y la generación de complejo de Mn(III)-bis-oxalato. De esta manera, en pasos de transferencia de un electrón, ocurre la reducción de Cr(VI) a Cr(III), generando CO₂ como producto de oxidación del ácido oxálico y recuperando al final de proceso Mn(II)-bis-oxalato (efecto catalítico de Mn(II)).
- Desde el punto de vista de metalómica medioambiental, los resultados obtenidos sugieren que el ácido oxálico en combinación de Mn(II) podría ser una opción interesante para la remediación de ambientes contaminados, ya que la reducción de Cr(VI) en este sistema no requiere condiciones ácidas fuertes y el producto de oxidación final (CO₂) es relativamente inofensivo.

V.2. REFERENCIAS

Referencias

1. Haraguchi, H., *Metallomics as integrated biometal science*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2004. **19**(1): p. 5-14.
2. Haferburg, G. and E. Kothe, *Metallomics: lessons for metalliferous soil remediation*. Applied microbiology and biotechnology, 2010. **87**(4): p. 1271-1280.
3. Author, A., *The scope of Metallomics*. 2016, Royal Society of Chemistry.
4. Haraguchi, H., *Metallomics: Integrated Biometal Science*, in *Metallomics*. 2017, Springer. p. 3-39.
5. Ridley, W.I. and S.J. Stetson, *A review of isotopic composition as an indicator of the natural and anthropogenic behavior of mercury*. Applied Geochemistry, 2006. **21**(11): p. 1889-1899.
6. Trasande, L., P.J. Landrigan, and C. Schechter, *Public health and economic consequences of methyl mercury toxicity to the developing brain*. Environmental health perspectives, 2005. **113**(5): p. 590.
7. Rahman, G.M. and T. Fahrenholz, *Application of speciated isotope dilution mass spectrometry to evaluate methods for efficiencies, recoveries, and quantification of mercury species transformations in human hair*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2009. **24**(1): p. 83-92.
8. Ortiz, A.I.C., Y.M. Albarrán, and C.C. Rica, *Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2002. **17**(12): p. 1595-1601.
9. Uria, J.S. and A. Sanz-Medel, *Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples*. Talanta, 1998. **47**(3): p. 509-524.
10. Percy, A.J., et al., *Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of inorganic mercury and methylmercury driven by their different coordination chemistry towards thiols*. Journal of Chromatography A, 2007. **1156**(1-2): p. 331-339.
11. McSheehy, S., A. Polatajko, and T. Lindemann, *Speciation of Mercury in Environmental and Biomedical Samples Using HPLC Coupled to the XSERIES 2 ICP-MS*. LC GC Magazine-North America-Solutions for Separation Scientists, 2008. **41**: p. 23-23.
12. Lindemann, T., et al., *Simultaneous Mercury and Tin Speciation Using GC-HR-ICP-MS*. LC GC Magazine-North America-Solutions for Separation Scientists, 2008. **41**: p. 22-22.
13. Valko, M., H. Morris, and M. Cronin, *Metals, toxicity and oxidative stress*. Current medicinal chemistry, 2005. **12**(10): p. 1161-1208.
14. Burger, J., A.H. Stern, and M. Gochfeld, *Mercury in commercial fish: optimizing individual choices to reduce risk*. Environmental health perspectives, 2005. **113**(3): p. 266.
15. Food, U., *Fish and Fisheries Products: Hazards and Controls Guidance*. 2001: US Food and Drug Administration.
16. Avudainayagam, S., et al., *Chemistry of chromium in soils with emphasis on tannery waste sites*, in *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 2003, Springer. p. 53-91.
17. Vonderheide, A.P., et al., *Retention of Cr (III) by high-performance chelation ion chromatography interfaced to inductively-coupled plasma mass spectrometric detection with collision cell*. Journal of Chromatography A, 2004. **1024**(1-2): p. 129-137.
18. Dayan, A. and A. Paine, *Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000*. Human & experimental toxicology, 2001. **20**(9): p. 439-451.

19. Mueller-Spitz, S.R., et al., *Use of SEC–ICP–MS with a collision cell for determining the interaction of chromium with DNA extracted from metal-contaminated soils*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2006. **386**(1): p. 142-151.
20. Katz, S.A. and H. Salem, *The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review*. Journal of Applied Toxicology, 1993. **13**(3): p. 217-224.
21. Wong, P. and J. Trevors, *Chromium toxicity to algae and bacteria*. Chromium in the natural and human environments, 1988: p. 305-315.
22. Richard, F.C. and A.C. Bourg, *Aqueous geochemistry of chromium: a review*. Water research, 1991. **25**(7): p. 807-816.
23. O'Brien, T.J., S. Ceryak, and S.R. Patierno, *Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms*. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2003. **533**(1): p. 3-36.
24. Quilntana, M., G. Curutchet, and E. Donati, *Factors affecting chromium (VI) reduction by Thiobacillus ferrooxidans*. Biochemical Engineering Journal, 2001. **9**(1): p. 11-15.
25. Onishi, H., *Photometric determination of traces of metals*. 1986.
26. Eary, L. and D. Rai, *Chromate removal from aqueous wastes by reduction with ferrous ion*. Environmental Science & Technology, 1988. **22**(8): p. 972-977.
27. Dubbin, W.E., *Influence of organic ligands on Cr desorption from hydroxy-Cr intercalated montmorillonite*. Chemosphere, 2004. **54**(8): p. 1071-1077.
28. James, B.R. and R.J. Bartlett, *Behavior of Chromium in Soils: V. Fate of Organically Complexed Cr (III) Added to Soil 1*. Journal of Environmental Quality, 1983. **12**(2): p. 169-172.
29. Schlautman, M.A. and I. Han, *Effects of pH and dissolved oxygen on the reduction of hexavalent chromium by dissolved ferrous iron in poorly buffered aqueous systems*. Water Research, 2001. **35**(6): p. 1534-1546.
30. Kornhauser, C., et al., *Possible adverse effect of chromium in occupational exposure of tannery workers*. Industrial Health, 2002. **40**(2): p. 207-213.
31. Kamaludeen, S.P., et al., *Microbial activity and phospholipid fatty acid pattern in long-term tannery waste-contaminated soil*. Ecotoxicology and environmental safety, 2003. **56**(2): p. 302-310.
32. Wilkinson, G., R. Gillard, and J. McCleverty, *Comprehensive coordination chemistry. The synthesis, reactions, properties and applications of coordination compounds. V. 3. Main group and early transition elements*. 1987.
33. Balboa Benavente, S., *Química de coordinación de iones metálicos en estado de oxidación II derivados de alfa-hidroxicarboxilatos*. 2007: Univ Santiago de Compostela.
34. Kaim, W. and J. Rall, *Copper—a "modern" bioelement*. Angewandte Chemie International Edition, 1996. **35**(1): p. 43-60.
35. Evanko, C.R. and D.A. Dzombak, *Remediation of metals-contaminated soils and groundwater*. 1997: Ground-water remediation technologies analysis center Pittsburg,, USA.
36. Lide, D.R., *CRC handbook of chemistry and physics*. 12J204, 2012.
37. Theophanides, T. and J. Anastassopoulou, *Copper and carcinogenesis*. Critical reviews in oncology/hematology, 2002. **42**(1): p. 57-64.
38. Dorsey, A. and L. Ingerman, *Toxicological profile for copper*. 2004.
39. Environment, W.C.o., *El desarrollo sostenible, una guía sobre nuestro futuro común: El informe de la Comisión Mundial sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo*. 1987: Peterson's.
40. Komárek, M., et al., *Lead isotopes in environmental sciences: a review*. Environment International, 2008. **34**(4): p. 562-577.

41. Nordberg, G. and G. Nordberg, *Metales: Propiedades químicas y toxicidad productos químicos*. línea: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/63.pdf> Última revisión mayo, 2017.
42. Cremer, J.E., *Biochemical studies on the toxicity of tetraethyl lead and other organo-lead compounds*. Occupational and Environmental Medicine, 1959. **16**(3): p. 191-199.
43. Von Storch, H., et al., *Four decades of gasoline lead emissions and control policies in Europe: a retrospective assessment*. Science of the Total Environment, 2003. **311**(1-3): p. 151-176.
44. Viarengo, A., *Biochemical effects of trace metals*. Marine Pollution Bulletin, 1985. **16**(4): p. 153-158.
45. García Arino, C., *Síntesis diagnóstica de las enfermedades profesionales por metales, productos químicos y agentes vivos*. Madrid: Editorial Mapfre, 1996.
46. Soria, M., G. Repetto, and M. Repetto, *Revisión general de la toxicología de los metales*. Toxicología Avanzada. Díaz de Santos, Madrid, 1995: p. 293-358.
47. Aufderheide, A. and J.L. Wittmers, *Selected aspects of the spatial distribution of lead in bone*. Neurotoxicology, 1992. **13**(4): p. 809-819.
48. Berkowitz, G.S., J.M. Moline, and A.C. Todd, *Methodological issues related to studies of lead mobilization during menopause*. salud pública de méxico, 1999. **41**: p. S88-S92.
49. Sanín, L.H., et al., *Acumulación de plomo en hueso y sus efectos en la salud*. Salud pública de México, 1998. **40**: p. 359-368.
50. Concon, J.M., *Food toxicology. Part A: Principles and concepts; Part B: Contaminants and additives*. 1988: Marcel Dekker Inc.
51. Gottlieb, S., *Sustained fall in UK blood lead levels reported*. BMJ: British Medical Journal, 1998. **317**(7151): p. 99.
52. Rosen, J. and M. Markowitz, *Trends in the management of childhood lead poisonings*. Neurotoxicology, 1993. **14**(2-3): p. 211-217.
53. Sanz-Gallén, P. and F. Marqués, *Riesgo y patología por compuestos de plomo*. Manual de Salud laboral. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona, 1995: p. 99-106.
54. Maddaloni, M., et al., *Bioavailability of soilborne lead in adults, by stable isotope dilution*. Environmental Health Perspectives, 1998. **106**(Suppl 6): p. 1589.
55. Hu, H., et al., *The epidemiology of lead toxicity in adults: measuring dose and consideration of other methodologic issues*. Environmental health perspectives, 2007. **115**(3): p. 455.
56. Silbergeld, E.K., *Lead in bone: implications for toxicology during pregnancy and lactation*. Environmental health perspectives, 1991. **91**: p. 63.
57. Organization, W.H., *Manual of the international statistical classification of diseases, injuries, and causes of death*. Vol. 2. 1975: World Health Organization.
58. Mexicana, N.O., *Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal*. Diario Oficial de la Federación (DOF). NOM-002-SEMARNAT-1996.
59. Levin, R., et al., *Lead exposures in US children, 2008: implications for prevention*. Environmental Health Perspectives, 2008. **116**(10): p. 1285.
60. Europea, U., *Reglamento (CE) No 466/2001 de la Comisión de 8 de marzo de 2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios*. Bruselas, sp, 2001.
61. Haraguchi, H., *Metallomics research related to arsenic*. Biological Chemistry of Arsenic, Antimony and Bismuth, ed. H. Sun, John Wiley, London, 2010: p. 83-112.

62. Templeton, D.M., et al., *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000)*. Pure and applied chemistry, 2000. **72**(8): p. 1453-1470.
63. Szpunar, J., *Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques*. Analyst, 2000. **125**(5): p. 963-988.
64. Szpunar, J., R. Lobinski, and A. Prange, *Hyphenated techniques for elemental speciation in biological systems*. Applied spectroscopy, 2003. **57**(3): p. 102A-112A.
65. Szpunar, J., *Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics*. Analyst, 2005. **130**(4): p. 442-465.
66. Mounicou, S. and R. Lobinski, *Challenges to metallomics and analytical chemistry solutions*. Pure and Applied Chemistry, 2008. **80**(12): p. 2565-2575.
67. Wrobel, K., et al. *ICP-MS: metals and much more*. in *Advances in Mass Spectrometry: Plenary and Keynote Lectures of the 16th International Mass Spectrometry Conference*. 2004. Elsevier.
68. Łobiński, R., et al., *Elemental speciation and coupled techniques—towards faster and reliable analyses*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1998. **13**(9): p. 859-867.
69. Koppelaar, D.W., G.C. Eiden, and C.J. Barinaga, *Collision and reaction cells in atomic mass spectrometry: development, status, and applications*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2004. **19**(5): p. 561-570.
70. Waddell, R., et al., *Inductively coupled plasma mass spectrometry for elemental speciation: Applications in the new millennium*. Applied Spectroscopy Reviews, 2005. **40**(1): p. 33-69.
71. Bednar, A., *Determination of vanadium by reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry*. Talanta, 2009. **78**(2): p. 453-457.
72. Karlsson, S., V. Sjöberg, and A. Ogar, *Comparison of MP AES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of sunflower (Helianthus annuus)*. Talanta, 2015. **135**: p. 124-132.
73. Kamala, C., et al., *Application of Microwave Plasma Atomic Emission Spectrometry (MP-AES) for environmental monitoring of industrially contaminated sites in Hyderabad City*. Environmental monitoring and assessment, 2014. **186**(11): p. 7097-7113.
74. Yoshida, Y., *Analysis of aluminum in beverages using the Agilent 4100 Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer (MP-AES)*.
75. Teodoro, M.S., D. Schiavo, and M. Ferreira Abreu, *Determination of metals in soil by microwave plasma-atomic emission spectrometry (MP-AES) using DTPA extraction*. Agilent Application Note, 2013.
76. Guerin, A., et al., *Determination of exchangeable cations in soil extracts using the Agilent 4100 Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometer*. PN.
77. Amais, R.S., et al., *Determination of silicon in diesel and biodiesel by Microwave Plasma-Atomic Emission Spectrometry*. Agilent Application Note, 2012.
78. Wu, C., et al., *Analysis of Chinese herbal medicines by microwave plasma-atomic emission spectrometry (MP-AES)*. Agilent Technol., 2012.
79. De Hoffmann, E. and V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*. 2007: John Wiley & Sons.
80. Kebarle, P. and L. Tang, *From ions in solution to ions in the gas phase-the mechanism of electrospray mass spectrometry*. Analytical chemistry, 1993. **65**(22): p. 972A-986A.
81. Knochenmuss, R., *A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization including analyte ion generation*. Analytical chemistry, 2003. **75**(10): p. 2199-2207.

82. Karas, M. and R. Krüger, *Ion formation in MALDI: the cluster ionization mechanism*. Chemical Reviews, 2003. **103**(2): p. 427-440.
83. Dreisewerd, K., *The desorption process in MALDI*. Chemical reviews, 2003. **103**(2): p. 395-426.
84. Zenobi, R. and R. Knochenmuss, *Ion formation in MALDI mass spectrometry*. Mass spectrometry reviews, 1998. **17**(5): p. 337-366.
85. Knochenmuss, R. and R. Zenobi, *MALDI ionization: the role of in-plume processes*. Chemical reviews, 2003. **103**(2): p. 441-452.
86. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Ion Formation from Organic Solids IV*. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1988. **103**.
87. Spengler, B. and R.J. Cotter, *Ultraviolet laser desorption/ionization mass spectrometry of proteins above 100,000 daltons by pulsed ion extraction time-of-flight analysis*. Analytical chemistry, 1990. **62**(8): p. 793-796.
88. Schrepp, W. and H. Pasch, *MALDI-TOF Mass Spectrometry of Synthetic Polymers*. 2003, Berlin: Springer-Verlag.
89. Stoeckli, M., et al., *Imaging mass spectrometry: a new technology for the analysis of protein expression in mammalian tissues*. Nature medicine, 2001. **7**(4): p. 493.
90. Pierson, J., et al., *Molecular profiling of experimental Parkinson's disease: direct analysis of peptides and proteins on brain tissue sections by MALDI mass spectrometry*. Journal of proteome research, 2004. **3**(2): p. 289-295.
91. Demirev, P., et al., *Matrix-assisted laser desorption with ultra-short laser pulses*. Rapid communications in mass spectrometry, 1992. **6**(3): p. 187-191.
92. Talrose, V.L., et al., *Insight into absorption of radiation/energy transfer in infrared matrix-assisted laser desorption/ionization: the roles of matrices, water and metal substrates*. Rapid communications in mass spectrometry, 1999. **13**(21): p. 2191-2198.
93. Vorm, O., P. Roepstorff, and M. Mann, *Improved resolution and very high sensitivity in MALDI TOF of matrix surfaces made by fast evaporation*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(19): p. 3281-3287.
94. Xiang, F., R.C. Beavis, and W. Ens, *A method to increase contaminant tolerance in protein matrix-assisted laser desorption/ionization by the fabrication of thin protein-doped polycrystalline films*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 1994. **8**(2): p. 199-204.
95. Merchant, M. and S.R. Weinberger, *Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry*. Electrophoresis, 2000. **21**(6): p. 1164-1177.
96. Levina, A. and P.A. Lay, *Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium*. Coordination Chemistry Reviews, 2005. **249**(3-4): p. 281-298.
97. Das, A.K., *Micellar effect on the kinetics and mechanism of chromium (VI) oxidation of organic substrates*. Coordination chemistry reviews, 2004. **248**(1-2): p. 81-99.
98. Krumpolc, M. and J. Rocek, *Chromium (V) oxidations of organic compounds*. Inorganic Chemistry, 1985. **24**(4): p. 617-621.
99. Muzart, J., *Chromium-catalyzed oxidations in organic synthesis*. Chemical reviews, 1992. **92**(1): p. 113-140.
100. Huber, C.F. and G. Haight Jr, *The oxidation of manganese (II) by chromium (VI) in the presence of oxalate ion*. Journal of the American Chemical Society, 1976. **98**(14): p. 4128-4131.
101. Ghosh, M., E. Gelerinter, and E. Gould, *Electron transfer. 111. Disproportionation of carboxylato-bound chromium (IV). Catalysis by manganese (II)*. Inorganic Chemistry, 1992. **31**(4): p. 702-705.

102. McCarroll, N., et al., *An evaluation of the mode of action framework for mutagenic carcinogens case study II: chromium (VI)*. Environmental and molecular mutagenesis, 2010. **51**(2): p. 89-111.
103. Ramdon, D.C., D.A. Dixon, and T.P. Dasgupta, *Mechanism of reduction of chromium (VI) ion by 2-mercaptosuccinic acid in aqueous solution*. Inorganica chimica acta, 2002. **331**(1): p. 178-187.
104. Dhal, B., et al., *Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review*. Journal of hazardous materials, 2013. **250**: p. 272-291.
105. Barrera-Díaz, C.E., V. Lugo-Lugo, and B. Bilyeu, *A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr (VI) reduction*. Journal of hazardous materials, 2012. **223**: p. 1-12.
106. Brose, D.A. and B.R. James, *Hexavalent chromium reduction by tartaric acid and isopropyl alcohol in Mid-Atlantic soils and the role of Mn (III, IV)(hydr) oxides*. Environmental science & technology, 2013. **47**(22): p. 12985-12991.
107. Zhong, L. and J. Yang, *Reduction of Cr (VI) by malic acid in aqueous Fe-rich soil suspensions*. Chemosphere, 2012. **86**(10): p. 973-978.
108. Jiang, D., et al., *Photocatalytic reduction of Cr (VI) by small molecular weight organic acids over schwertmannite*. Chemosphere, 2012. **89**(7): p. 832-837.
109. Tian, X., et al., *Catalytic role of soils in the transformation of Cr (VI) to Cr (III) in the presence of organic acids containing α -OH groups*. Geoderma, 2010. **159**(3-4): p. 270-275.
110. Coreño-Alonso, A., et al., *Cr (VI) reduction by an Aspergillus tubingensis strain: role of carboxylic acids and implications for natural attenuation and biotreatment of Cr (VI) contamination*. Chemosphere, 2009. **76**(1): p. 43-47.
111. Lan, Y., et al., *Influence of clay minerals on the reduction of Cr⁶⁺ by citric acid*. Chemosphere, 2008. **71**(4): p. 781-787.
112. Yang, J.W., et al., *Interaction between Cr (VI) and a Fe-rich soil in the presence of oxalic and tartaric acids*. Environmental geology, 2008. **53**(7): p. 1529-1533.
113. Sarkar, B., et al., *Manganese (II)-catalyzed and clay-minerals-mediated reduction of chromium (VI) by citrate*. Environmental science & technology, 2013. **47**(23): p. 13629-13636.
114. Brose, D.A. and B.R. James, *Hexavalent chromium reduction in solution and in chromite ore processing residue-enriched soil by tartaric acid with isopropyl alcohol and divalent manganese as co-reductants*. Journal of environmental quality, 2013. **42**(3): p. 766-773.
115. Khan, Z., M. Akram, and Kabir-Ud-Din, *A kinetic study of the one-step three-electron oxidation of citric acid by chromium (VI)*. OXIDATION COMMUNICATIONS, 2001. **24**(2): p. 257-267.
116. Chen, L., L. Ye-Qing, and D. Bao-Lin, *Catalysis of Manganese (II) on Chromium (VI) Reduction by Citrate¹*. Pedosphere, 2007. **17**(3): p. 318-323.
117. Srinivasan, V. and J. Rocek, *Formation of a long-lived chromium (V) intermediate in the chromic acid oxidation of oxalic acid*. Journal of the American Chemical Society, 1974. **96**(1): p. 127-133.
118. Gould, E.S., *Reductions of carboxylate-bound chromium (V)*. Accounts of Chemical Research, 1986. **19**(3): p. 66-72.
119. Stearns, D.M. and K.E. Wetterhahn, *Reaction of chromium (VI) with ascorbate produces chromium (V), chromium (IV), and carbon-based radicals*. Chemical research in toxicology, 1994. **7**(2): p. 219-230.

120. Eberlin, M.N., *Electrospray ionization mass spectrometry: a major tool to investigate reaction mechanisms in both solution and the gas phase*. European Journal of Mass Spectrometry, 2007. **13**(1): p. 19-28.
121. Santos, L.S., *Online mechanistic investigations of catalyzed reactions by electrospray ionization mass spectrometry: a tool to intercept transient species in solution*. European Journal of Organic Chemistry, 2008. **2008**(2): p. 235-253.
122. Hartani, K. and Z. Khan, *Effect of micelles on the oxidation of oxalic acid by chromium (VI) in the presence and absence of manganese (II)*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **193**(1-3): p. 1-13.
123. Levina, A., et al., *X-ray Absorption Spectroscopic Studies of Chromium (V/IV/III)- 2-Ethyl-2-hydroxybutanoato (2-/1-) Complexes*. Inorganic chemistry, 2004. **43**(3): p. 1046-1055.
124. Farrell, R.P., et al., *An EPR spectroscopic study of chromium (V) oxalato complexes in aqueous solutions. Mechanism of the chromium (VI) oxidation of oxalic acid*. Inorganic Chemistry, 1998. **37**(13): p. 3159-3166.
125. Khan, Z., et al., *Kinetics and mechanism of chromic acid oxidation of oxalic acid in absence and presence of different acid media. A kinetic study*. International journal of chemical kinetics, 1998. **30**(5): p. 335-340.
126. Codd, R., et al., *Studies on the genotoxicity of chromium: from the test tube to the cell*. Coordination Chemistry Reviews, 2001. **216**: p. 537-582.
127. Perez-Benito, J.F. and C. Arias, *A kinetic study on the reactivity of chromium (IV)*. Canadian journal of chemistry, 1993. **71**(5): p. 649-655.
128. Zhang, L. and P.A. Lay, *EPR spectroscopic studies of the reactions of chromium (VI) with L-ascorbic acid in buffer solutions: implications for understanding the roles of chromium (V) and chromium (IV) species and the buffer dependences of in vitro DNA damage*. Australian Journal of Chemistry, 2000. **53**(1): p. 7-13.
129. Hamm, R.E., *Complex Ions of Chromium. II. trans-cis Isomerization of Potassium Dioxalatoaquochromate (III)*. Journal of the American Chemical Society, 1953. **75**(3): p. 609-611.
130. Levina, A., P.A. Lay, and N.E. Dixon, *Disproportionation and Nuclease Activity of Bis [2-ethyl-2-hydroxybutanoato (2-)] oxochromate (V) in Neutral Aqueous Solutions*. Inorganic chemistry, 2000. **39**(3): p. 385-395.
131. Levina, A. and P.A. Lay, *Solution structures of chromium (VI) complexes with glutathione and model thiols*. Inorganic chemistry, 2004. **43**(1): p. 324-335.
132. Westheimer, F., *The Mechanisms of Chromic Acid Oxidations*. Chemical reviews, 1949. **45**(3): p. 419-451.
133. Bakore, G. and C. Jain, *Chromic acid oxidation of oxalic acid—II: Kinetic investigation of the manganese (II) catalysed oxidation of oxalic acid by chromium (VI)*. Journal of Inorganic and Nuclear Chemistry, 1969. **31**(8): p. 2527-2531.
134. Hasegawa, T., et al., *Speciation of mercury in salmon egg cell cytoplasm in relation with metallomics research*. Talanta, 2005. **68**(2): p. 465-469.
135. Reyes, L.H., et al., *Comparison of methods with respect to efficiencies, recoveries, and quantitation of mercury species interconversions in food demonstrated using tuna fish*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2008. **390**(8): p. 2123-2132.
136. Houserova, P., et al., *Total mercury and mercury species in birds and fish in an aquatic ecosystem in the Czech Republic*. Environmental Pollution, 2007. **145**(1): p. 185-194.
137. Chang, L.-F., S.-J. Jiang, and A. Sahayam, *Speciation analysis of mercury and lead in fish samples using liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of chromatography A, 2007. **1176**(1-2): p. 143-148.

138. Vidler, D.S., et al., *The determination of methylmercury in biological samples by HPLC coupled to ICP-MS detection*. Applied Organometallic Chemistry, 2007. **21**(5): p. 303-310.
139. Carro, A. and M. Mejuto, *Application of chromatographic and electrophoretic methodology to the speciation of organomercury compounds in food analysis*. Journal of Chromatography A, 2000. **882**(1-2): p. 283-307.
140. Chen, J., et al., *Determination of ultra-trace amount methyl-, phenyl-and inorganic mercury in environmental and biological samples by liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction preconcentration*. Talanta, 2009. **77**(4): p. 1381-1387.
141. Krishna, M.B., et al., *A rapid ultrasound-assisted thiourea extraction method for the determination of inorganic and methyl mercury in biological and environmental samples by CVAAS*. Talanta, 2005. **67**(1): p. 70-80.
142. Hirner, A.V., *Speciation of alkylated metals and metalloids in the environment*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2006. **385**(3): p. 555-567.
143. Leermakers, M., et al., *Mercury in environmental samples: speciation, artifacts and validation*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2005. **24**(5): p. 383-393.
144. Wang, M., et al., *Development of a mild mercaptoethanol extraction method for determination of mercury species in biological samples by HPLC-ICP-MS*. Talanta, 2007. **71**(5): p. 2034-2039.
145. Yan, D., L. Yang, and Q. Wang, *Alternative thermodiffusion interface for simultaneous speciation of organic and inorganic lead and mercury species by capillary GC-ICPMS using tri-n-propyl-lead chloride as an internal standard*. Analytical chemistry, 2008. **80**(15): p. 6104-6109.
146. Prieto, A., et al., *Simultaneous speciation of methylmercury and butyltin species in environmental samples by headspace-stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2008. **1185**(1): p. 130-138.
147. García Fernández, R., et al., *Comparison of different derivatization approaches for mercury speciation in biological tissues by gas chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Mass Spectrometry, 2000. **35**(5): p. 639-646.
148. Monperrus, M., et al., *Simultaneous speciation of mercury and butyltin compounds in natural waters and snow by propylation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005. **381**(4): p. 854-862.
149. Björn, E., et al., *Recent advances in mercury speciation analysis with focus on spectrometric methods and enriched stable isotope applications*. AMBIO: A Journal of the Human Environment, 2007. **36**(6): p. 443-451.
150. Inagaki, K., et al., *Certification of methylmercury in cod fish tissue certified reference material by species-specific isotope dilution mass spectrometric analysis*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2008. **391**(6): p. 2047-2054.
151. Reyes, L.H., G.M. Rahman, and H.S. Kingston, *Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues*. Analytica Chimica Acta, 2009. **631**(2): p. 121-128.
152. Clough, R., et al., *Uncertainty contributions to species specific isotope dilution analysis. Part 2. Determination of methylmercury by HPLC coupled with quadrupole and multicollector ICP-MS*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2003. **18**(9): p. 1039-1046.

153. Santoyo, M.M., et al., *Analytical speciation of mercury in fish tissues by reversed phase liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry with Bi³⁺ as internal standard*. *Talanta*, 2009. **79**(3): p. 706-711.
154. www.cfsan.fda.gov/~frf/seamehg2.html, c.
155. Mol, S., *Levels of selected trace metals in canned tuna fish produced in Turkey*. *Journal of food composition and analysis*, 2011. **24**(1): p. 66-69.
156. Tuzen, M. and M. Soylak, *Determination of trace metals in canned fish marketed in Turkey*. *Food Chemistry*, 2007. **101**(4): p. 1378-1382.
157. Ashraf, W., et al., *Levels of selected metals in canned fish consumed in Kingdom of Saudi Arabia*. *Environmental monitoring and assessment*, 2006. **117**(1-3): p. 271-279.
158. Burns, D.T., K. Danzer, and A. Townshend, *Use of the term "recovery" and "apparent recovery" in analytical procedures (IUPAC Recommendations 2002)*. *Pure and Applied Chemistry*, 2002. **74**(11): p. 2201-2205.
159. Vassileva, E., et al., *Inorganic Trace Analytics: Trace Element Analysis and Speciation*. 2017: Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
160. Agatemor, C. and D. Beauchemin, *Matrix effects in inductively coupled plasma mass spectrometry: a review*. *Analytica chimica acta*, 2011. **706**(1): p. 66-83.
161. Engelhard, C., *Inductively coupled plasma mass spectrometry: recent trends and developments*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2011. **399**(1): p. 213-219.
162. Lum, T.-S. and K.S.-Y. Leung, *Strategies to overcome spectral interference in ICP-MS detection*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2016. **31**(5): p. 1078-1088.
163. Maki, T., *Quantitative approach for small molecules using laser desorption/ionization mass spectrometry*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2012. **35**(9): p. 1413-1416.
164. Tsednee, M., et al., *Identification of metal species by ESI-MS/MS through release of free metals from the corresponding metal-ligand complexes*. *Scientific reports*, 2016. **6**: p. 26785.
165. Schaumlöffel, D. and A. Tholey, *Recent directions of electrospray mass spectrometry for elemental speciation analysis*. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2011. **400**(6): p. 1645-1652.
166. Schwarz, G., et al., *DOTA based metal labels for protein quantification: a review*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2014. **29**(2): p. 221-233.
167. Arruda, M. and R. Azevedo, *Metallomics and chemical speciation: towards a better understanding of metal-induced stress in plants*. *Annals of Applied Biology*, 2009. **155**(3): p. 301-307.
168. Rigueira, L.M., et al., *Identification of metal-binding to proteins in seed samples using RF-HPLC-UV, GFAAS and MALDI-TOF-MS*. *Food chemistry*, 2016. **211**: p. 910-915.
169. Abdelhamid, H.N. and H.-F. Wu, *Monitoring metallofulfenamic–bovine serum albumin interactions: a novel method for metallodrug analysis*. *RSC Advances*, 2014. **4**(96): p. 53768-53776.
170. Yang, L., et al., *Metallic Element Chelated Tag Labeling (MeCTL) for Quantitation of N-Glycans in MALDI-MS*. *Analytical chemistry*, 2017. **89**(14): p. 7470-7476.
171. Furia, E., et al., *Mass spectrometry and potentiometry studies of Pb (II)–, Cd (II)–and Zn (II)–cystine complexes*. *Dalton Transactions*, 2014. **43**(3): p. 1055-1062.
172. Santos, C.I., et al., *Untangling interactions of a zinc (II) complex containing a coumarin–porphyrin unit with alkaloids in water solutions: A photophysical study*. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2015. **14**(4): p. 757-764.

173. Wei, W., et al., *Quantifying non-covalent binding affinity using mass spectrometry: A systematic study on complexes of cyclodextrins with alkali metal cations*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2015. **29**(10): p. 927-936.
174. Wyatt, M.F., *MALDI-TOFMS analysis of coordination and organometallic complexes: a niche area to work in*. Journal of Mass Spectrometry, 2011. **46**(7): p. 712-719.
175. Ivanova, B. and M. Spiteller, *Solid-state UV-MALDI-MS assay of transition metal dithiocarbamate fungicides*. Environmental Science and Pollution Research, 2014. **21**(2): p. 1163-1177.
176. Minakata, K., et al., *MALDI-Q-TOF mass spectrometric determination of gold and platinum in tissues using their diethyldithiocarbamate chelate complexes*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2014. **406**(5): p. 1331-1338.
177. Dreisewerd, K., *Recent methodological advances in MALDI mass spectrometry*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2014. **406**(9-10): p. 2261-2278.
178. van Kampen, J.J., et al., *Biomedical application of MALDI mass spectrometry for small-molecule analysis*. Mass spectrometry reviews, 2011. **30**(1): p. 101-120.
179. Petković, M., et al., *Application of flavonoids—quercetin and rutin—as new matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of Pt (II) and Pd (II) complexes*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009. **23**(10): p. 1467-1475.
180. Hou, J., et al., *Organic salt NEDC (N-naphthylethylenediamine dihydrochloride) assisted laser desorption ionization mass spectrometry for identification of metal ions in real samples*. Analyst, 2014. **139**(13): p. 3469-3475.
181. !!! INVALID CITATION !!!
182. Arakawa, R. and H. Kawasaki, *Functionalized nanoparticles and nanostructured surfaces for surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry*. Analytical Sciences, 2010. **26**(12): p. 1229-1240.
183. Picca, R.A., et al., *Mechanisms of nanophase-induced desorption in LDI-MS. A short review*. Nanomaterials, 2017. **7**(4): p. 75.
184. Silina, Y.E., M. Koch, and D.A. Volmer, *Influence of surface melting effects and availability of reagent ions on LDI-MS efficiency after UV laser irradiation of Pd nanostructures*. Journal of Mass Spectrometry, 2015. **50**(3): p. 578-585.
185. Tang, H.-W., et al., *Ion desorption efficiency and internal energy transfer in carbon-based surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry: Desorption mechanism (s) and the design of SALDI substrates*. Analytical chemistry, 2009. **81**(12): p. 4720-4729.
186. Wang, P. and R.W. Giese, *Recommendations for quantitative analysis of small molecules by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2017. **1486**: p. 35-41.
187. Kim, K.-H., E. Kabir, and S.A. Jahan, *A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts*. Journal of hazardous materials, 2016. **306**: p. 376-385.
188. Bhattacharjee, A., K. Chakraborty, and A. Shukla, *Cellular copper homeostasis: current concepts on its interplay with glutathione homeostasis and its implication in physiology and human diseases*. Metallomics, 2017. **9**(10): p. 1376-1388.
189. Jomova, K. and M. Valko, *Advances in metal-induced oxidative stress and human disease*. Toxicology, 2011. **283**(2-3): p. 65-87.
190. Irving, H. and G. Iwantscheff, *The analytical applications of dithizone*. 1980.
191. Ojeda, A.G., et al., *Molybdenum and copper in four varieties of common bean (Phaseolus vulgaris): New data of potential utility in designing healthy diet for diabetic patients*. Biological trace element research, 2015. **163**(1-2): p. 244-254.

192. Santoyo, M.M., et al., *Global DNA methylation in earthworms: A candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments*. Environmental pollution, 2011. **159**(10): p. 2387-2392.
193. Guideline, I.H.T. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. in *International Conference on Harmonization, Geneva, Switzerland*. 2005.
194. Cheng, Q. and H. Dong, *Solvent sublation using dithizone as a ligand for determination of trace elements in water samples*. Microchimica Acta, 2005. **150**(1): p. 59-65.
195. Yang, F., et al., *Sensitive determination of mercury by a miniaturized spectrophotometer after in situ single-drop microextraction*. Journal of hazardous materials, 2010. **183**(1-3): p. 549-553.
196. Burger, K., *Organic reagents in metal analysis*. 1973.
197. Paradkar, R.P. and R.R. Williams, *Micellar colorimetric determination of dithizone metal chelates*. Analytical Chemistry, 1994. **66**(17): p. 2752-2756.
198. Ross, A.R., et al., *Determination of dissolved metal species by electrospray ionization mass spectrometry*. Analytical chemistry, 1998. **70**(11): p. 2225-2235.
199. Xu, Y., X. Zhang, and A.L. Yergeycor, *Electrospray ionization of copper—Glycine solutions*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1996. **7**(1): p. 25-29.
200. Lavanant, H., H. Virelizier, and Y. Hoppilliard, *Reduction of copper (II) complexes by electron capture in an electrospray ionization source*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 1998. **9**(11): p. 1217-1221.
201. Dyrtrtová, J.J., et al., *Complexation between the fungicide tebuconazole and copper (II) probed by electrospray ionization mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011. **25**(8): p. 1037-1042.
202. Tureček, F., *Copper-biomolecule complexes in the gas phase. The ternary way*. Mass spectrometry reviews, 2007. **26**(4): p. 563-582.
203. Gianelli, L., et al., *Investigation of reduction of Cu (II) complexes in positive-ion mode electrospray mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2001. **15**(23): p. 2347-2353.
204. Gałuszka, A., Z. Migaszewski, and J. Namieśnik, *The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2013. **50**: p. 78-84.
205. Cohen, L.H. and A.I. Gusev, *Small molecule analysis by MALDI mass spectrometry*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2002. **373**(7): p. 571-586.
206. Soltwisch, J., et al., *Ion yields in UV-MALDI mass spectrometry as a function of excitation laser wavelength and optical and physico-chemical properties of classical and halogen-substituted MALDI matrixes*. Analytical chemistry, 2012. **84**(15): p. 6567-6576.
207. Padliya, N.D. and T.D. Wood, *A strategy to improve peptide mass fingerprinting matches through the optimization of matrix-assisted laser desorption/ionization matrix selection and formulation*. Proteomics, 2004. **4**(2): p. 466-473.
208. Donegan, M., et al., *Controlling matrix suppression for matrix-assisted laser desorption/ionization analysis of small molecules*. Rapid communications in mass spectrometry, 2004. **18**(17): p. 1885-1888.
209. Mehmood, T., et al., *A review of variable selection methods in partial least squares regression*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, 2012. **118**: p. 62-69.
210. Alves, J., M. Sena, and R. Augusti, *Multivariate calibration applied to ESI mass spectrometry data: a tool to quantify adulteration in extra virgin olive oil with inexpensive edible oils*. Analytical Methods, 2014. **6**(18): p. 7502-7509.

211. Nicolaou, N., Y. Xu, and R. Goodacre, *MALDI-MS and multivariate analysis for the detection and quantification of different milk species*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2011. **399**(10): p. 3491-3502.
212. Zhang, M. and P.d.B. Harrington, *Simultaneous quantification of Aroclor mixtures in soil samples by gas chromatography/mass spectrometry with solid phase microextraction using partial least-squares regression*. Chemosphere, 2015. **118**: p. 187-193.
213. Ikem, A. and N.O. Egiebor, *Assessment of trace elements in canned fishes (mackerel, tuna, salmon, sardines and herrings) marketed in Georgia and Alabama (United States of America)*. Journal of food composition and analysis, 2005. **18**(8): p. 771-787.
214. Khansari, F.E., M. Ghazi-Khansari, and M. Abdollahi, *Heavy metals content of canned tuna fish*. Food chemistry, 2005. **93**(2): p. 293-296.
215. Grechnikov, A., et al., *Determination of rhenium and osmium complexes by surface-assisted laser desorption/ionization coupled to Orbitrap mass analyzer*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2014. **406**(13): p. 3019-3023.
216. Bergman, N., D. Shevchenko, and J. Bergquist, *Approaches for the analysis of low molecular weight compounds with laser desorption/ionization techniques and mass spectrometry*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2014. **406**(1): p. 49-61.
217. Guinan, T., et al., *Surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry techniques for application in forensics*. Mass spectrometry reviews, 2015. **34**(6): p. 627-640.
218. Radisavljević, M., et al., *Colloidal TiO₂ nanoparticles as substrates for M (S) ALDI mass spectrometry of transition metal complexes*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2012. **26**(17): p. 2041-2050.
219. Persike, M. and M. Karas, *Rapid simultaneous quantitative determination of different small pharmaceutical drugs using a conventional matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry system*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2009. **23**(22): p. 3555-3562.
220. Arnold, A., et al., *Fast quantitative determination of melamine and its derivatives by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 2011. **25**(19): p. 2844-2850.
221. Garcia, M.M., et al., *Application of MALDI-TOFMS Combined with Partial Least Square Regression for the Determination of Mercury and Copper in Canned Tuna, Using Dithizone as the Complexing Agent and Ag (I) as Internal Standard*. Food Analytical Methods, 2018: p. 1-12.
222. Fujinaga, K., Y. Seike, and M. Okumura, *Solvent extraction of transition metal ions by an in situ extractant formation method. Diethyldithiocarbamate-forming system*. Analytical sciences, 1997. **13**(2): p. 225-230.
223. Hiraide, M., H. Hommi, and H. Kawaguchi, *Diethyldithiocarbamate (DDTC) extraction of copper (II) and iron (III) associated with humic substances in water*. Fresenius' journal of analytical chemistry, 1992. **342**(4-5): p. 387-390.
224. Bajo, S. and A. Wyttenbach, *Lead, cadmium, and zinc bis (diethyldithiocarbamate) and diethyldithiocarbamic acid as reagents for liquid-liquid extraction*. Analytical Chemistry, 1979. **51**(3): p. 376-378.
225. Sastri, V.S., K.I. Aspila, and C.L. Chakrabarti, *Studies on the solvent extraction of metal dithiocarbamates*. Canadian Journal of Chemistry, 1969. **47**(12): p. 2320-2323.
226. Stary, J., *Critical Evaluation of Equilibrium Constants Involving 8-Hydroxyquinoline and Its Metal Chelates: Critical Evaluation of Equilibrium Constants in Solution: Part B: Equilibrium Constants of Liquid-Liquid Distribution Systems*. 2013: Elsevier.

227. Roldán, C.T., *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-006-SCFI-2012, BEBIDAS ALCOHOLICAS-TEQUILA-ESPECIFICACIONES PREFACIO*.
228. Mexicana, N.O. and B. *ALCOHOLICAS-CHARANDA-ESPECIFICACIONES, NOM-144-SCFI-2000*.
229. Flores, C.R., et al., *ICP-MS multi-element profiles and HPLC determination of furanic compounds in commercial tequila*. *European Food Research and Technology*, 2009. **228**(6): p. 951-958.
230. Hogarth, G., *Transition metal dithiocarbamates: 1978–2003*. *Progress in Inorganic Chemistry*, Volume 53, 2005: p. 71-561.
231. Moore, C. and P. McKeown, *LCMS/MS and TOF-SIMS identification of the color bodies on the surface of a polymer*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2005. **16**(3): p. 295-301.
232. Bond, A. and R. Martin, *Electrochemistry and redox behaviour of transition metal dithiocarbamates*. *Coordination chemistry reviews*, 1984. **54**: p. 23-98.
233. Bond, A.M., et al., *Electrospray mass spectrometric study of the nature and lability of cationic complexes generated by the reaction of solutions of neutral iron (III), cobalt (III), nickel (II) and copper (II) dithiocarbamates with nitrosonium tetrafluoroborate*. *Inorganic Chemistry*, 1993. **32**(18): p. 3952-3956.
234. Lewis, D.J., et al., *On the interaction of copper (II) with disulfiram*. *Chemical communications*, 2014. **50**(87): p. 13334-13337.
235. Vinje, H., et al., *A systematic search for discriminating sites in the 16S ribosomal RNA gene*. *Microbial Informatics and Experimentation*, 2014. **4**(1): p. 2.
236. Ibanez, J.G., et al., *Metals in alcoholic beverages: A review of sources, effects, concentrations, removal, speciation, and analysis*. *Journal of food composition and analysis*, 2008. **21**(8): p. 672-683.

V.3. ARTICULO PUBLICADO

Garcia, M.M., et al., *Application of MALDI-TOFMS Combined with Partial Least Square Regression for the Determination of Mercury and Copper in Canned Tuna, Using Dithizone as the Complexing Agent and Ag (I) as Internal Standard*. Food Analytical Methods, 2018: p. 1-12.

Wrobel, K., Escobosa, A. R. C., Ibarra, A. A. G., Garcia, M. M., Barrientos, E. Y., & Wrobel. *Mechanistic insight into chromium (VI) reduction by oxalic acid in the presence of manganese (II)*. Journal of hazardous materials, (2015). 300, 144-152.