

# UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS  
CAMPUS GUANAJUATO  
POSGRADO EN QUÍMICA



**“DESARROLLO DE NUEVOS PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS DE  
ESPECIACIÓN DE METALES Y METALOIDES EN MUESTRAS DE  
RELEVANCIA MEDIO AMBIENTAL, CON EL USO DE ICP-MS COMO  
DETECTOR ESPECÍFICO DE ELEMENTOS”**

## TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN QUÍMICA

P R E S E N T A

M EN C. MARIA MALDONADO SANTOYO

GUANAJUATO, GTO. MARZO DE 2011

**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**  
Campus Guanajuato  
División de Ciencia Exactas y Naturales  
Departamento de Química

Guanajuato, Gto., marzo de 2011

Por medio de la presente nos responsabilizamos de la autenticidad y originalidad del presente trabajo de investigación titulado “Desarrollo de nuevos procedimientos analíticos de especiación de metales y metaloides en muestras de relevancia medio ambiental, con el uso del IC-MS como detector específico de elementos”, realizado por la M.C. María Maldonado Santoyo, 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 del Comité Tutorial integrado por la Dra. Katarzyna Dorota Wróbel, Dr. Kazimierz Wróbel y el Dr. Félix Gutiérrez Corona.

“La verdad os hará libres”

---

Dra. Katarzyna Dorota Wróbel (Asesor)

---

Dr. Kazimierz Wróbel (Co-asesor)

---

Dr. Félix Gutiérrez Corona (Co-asesor)

**UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**  
Campus Guanajuato  
División de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química

Miembros del Jurado asignados para el examen que para obtener el grado de Doctor en Química presenta la M. C. María Maldonado Santoyo.

---

Dra. Leticia López Martínez (Presidente)

---

Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar (Secretario)

---

Dra. Laura Hinojosa Reyes (Vocal)

---

Dra. Minerva Martínez Alfaro (Vocal)

---

Dr. Francisco Javier Rodríguez Valadez (Vocal)

---

Dra. Teresa Imelda Saucedo Medina (Suplente)

## AGRADECIMIENTOS

- Antes que nada ni nadie, agradezco a Dios por todo lo que me ha dado: mi familia, mis amigos, mi salud, las oportunidades y esperanzas, todo, infinitamente todo le agradezco, lo bueno y también lo no tan bueno, ya que de cada vivencia se aprende algo nuevo y sin él no sería nada en esta vida.
- Gracias a toda mi familia, por su apoyo incondicional y todo su amor y comprensión incondicional, Dios no me pudo dar una familia mejor, los amo.
- Gracias a todos mis amigos de ahora, Tessy, Barby, Panchito, Adriana, Gladys, Diana, Chava, Lucy, Xochitl, Caro, Karina, Dra. Lupita, Bere, Luisa, CP. Javier, Cecy, Don Nacho; y a mis amigos de siempre, Sandra, Karla, Diana Quintero, Memo, Karina, Isabel, Lucy, Lety, César, Gerardo les agradezco todo su apoyo y amistad durante este tiempo y espero conservar su amistad por siempre.
- También agradezco a todos mis exalumnos del Centro Universitario de los Lagos, ya que más que alumnos los considero amigos, gracias por todo su apoyo a Arcelia, Marissa, Raúl Yuniór, Rocio, Angeles, Paty, Paola, Mayra, Laura, Magdalena, Estrella, Ivette, Noemí, y a los tres alegres compadres.
- Gracias a la Dra. Katarzyna Wrobel, al Dr. Kazimierz Wrobel y al Dr. Félix Gutiérrez Corona por permitirme ser parte de su equipo de trabajo.
- Agradezco a la Universidad de Guanajuato, por permitirme ser parte de esta casa de estudios.
- Agradezco a CONACYT por la beca brindada.

## INDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>9</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>11</b>
<b>I) RESUMEN</b>	<b>13</b>
II) OBJETIVO DEL PROYECTO	19
III) OBJETIVOS ESPECIFICOS	20
<b>Capítulo 1. Descripción de Equipos</b>	
1.1 Introducción	22
1.2 Métodos de separación	24
1.3 Herramientas analíticas empleadas en los estudios de especiación	25
1.3.1 Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS)	26
1.3.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)	33
1.3.2.1 Fase Estacionaria: tipos de cromatografía	35
1.3.2.2 Fase Móvil	37
1.3.2.3 Sistema de Introducción de muestra	38
1.3.2.4 Columna Analítica	38
1.3.2.5 Precolumnas	38
1.3.2.6 Termostato de Columna	39
1.3.2.7 Bomba	39
1.3.2.8 Detector	39
<b>Capítulo 2. Uso de Fierro (nanopartículas y polvo) en la remoción de diferentes especies de arsénico en agua naturales</b>	
2.1 Introducción	43
2.1.1 Toxicidad del arsénico	46
2.1.2 El arsénico en sistemas acuáticos	50
2.1.3 Procesos de remoción de arsénico en aguas	53
2.1.4 Procedimiento de especiación analítica de arsénico en muestras acuosas	54
2.2 Objetivo particular	55
2.3 Materiales y métodos	55
2.3.1 Instrumentación	55
2.3.2 Reactivos, disoluciones y muestras	55
2.3.3 Procedimientos analíticos	56
2.3.3.1 Especiación analítica de arsénico	56
2.4 Resultados y discusión	57
2.5 Conclusiones	66

### Capítulo 3.

Especiación analítica de mercurio en tejido de pescado mediante RP-HPLC y detección por ICP-MS con Bi<sup>3+</sup> como estándar interno

2.1	Introducción	68
2.1.1	Toxicidad del mercurio	69
2.1.2	Especiación de mercurio	71
2.2	Objetivo particular	72
2.3	Materiales y métodos	73
2.3.1	Instrumentación	
2.3.2	Reactivos, disoluciones y muestras	73
2.3.3	Procedimientos analíticos	75
2.3.3.1	Determinación de mercurio total	75
2.3.3.2	Especiación analítica de mercurio	76
2.4	Resultados y discusión	77
2.5	Conclusiones	92

### Capítulo 4.

Determinación de metales en tejido de lombrices de tierra y en suelos en sitios caracterizados por diferente grado de contaminación, mediante espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado por inducción (ICP-MS).

4.1	Introducción	91
4.1.1	Características y descripción de la lombriz	93
4.1.2	Clasificación biológica de la lombriz	94
4.1.3	La lombriz en el medio ambiente	95
4.2	Objetivo particular	96
4.3	Materiales y métodos	97
4.3.1	Instrumentación	98
4.3.2	Reactivos, disoluciones y muestras	98
4.3.2.1	Recolección de muestras	99
4.3.3	Procedimientos analíticos	100
4.3.3.1	Secado y determinación de humedad en muestras	100
4.3.3.2	Determinación de elementos totales	100
4.3.3.2.1	Mineralización en suelo y tejido de lombriz	100
4.3.3.2.2	Determinación de elementos totales mediante ICP-MS	101
4.4	Resultados y discusión	103
4.5	Conclusiones	114

## Capítulo 5.

Especiación analítica de  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  en suelo y tejido de lombriz de tierra en mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección por ICP-MS.

5.1 Introducción	116
5.2 Objetivo particular	120
5.3 Materiales y métodos	120
5.3.1 Instrumentación	120
5.3.2 Reactivos, disoluciones y muestras	121
5.3.3 Procedimientos analíticos	122
5.3.3.1 Determinación de mercurio total	122
5.3.3.2 Especiación analítica de mercurio	122
5.4 Resultados y discusión	122
5.5 Conclusiones	131

## Capítulo 6.

Especiación analítica de arsénico en suelo y tejido de lombriz de tierra mediante separación por HPLC y detección específica por ICP-MS con enfoque en sus formas inorgánicas ( $\text{As(III)}$  y  $\text{As(V)}$ ) y orgánicas ( $\text{DMAS(V)}$ ).

6.1 Introducción	133
6.2 Objetivo particular	135
6.3 Materiales y métodos	135
6.3.1 Instrumentación	135
6.3.2 Reactivos, disoluciones y muestras	136
6.3.3 Procedimientos analíticos	136
6.3.3.1 Determinación de arsénico total	136
6.3.3.2 Especiación analítica de arsénico	136
6.4 Resultados y discusión	138
6.5 Conclusiones	143

## Capítulo 7.

Determinación del grado de metilación total de ADN en la lombriz de tierra y su evaluación como posible bioindicador de cambios epigenéticos asociados con metales/metaloides en suelos.

7.1 Introducción	145
7.1.1 Definición de ADN y ARN	147
7.1.2 Biología básica del ADN	149
7.1.3 Epigenética	150
7.2 Objetivo particular	153
7.3 Materiales y métodos	153
7.3.1 Instrumentación	153
7.3.2 Reactivos, disoluciones y muestras	153

7.3.3 Procedimientos analíticos	154
7.3.3.1 Extracción de ADN	154
7.3.3.2 Digestión de ADN para obtención de desoxinucleósidos	156
7.3.3.3 Determinación de la metilación global de ADN mediante HPLC-DAD	157
7.3.3.4 Análisis Estadístico	158
7.4 Resultados y discusión	158
7.4.1 La metilación global de ADN y los niveles de concentración de elementos en lombrices de tierra	160
7.5 Conclusiones	163
 <b>Capítulo 8.</b>	
Determinación de elementos metálicos, algunos metaloides y de flúor en agua de grifo de la ciudad de Lagos de Moreno mediante ICP-MS.	
8.1 Introducción	165
8.1.1 El agua como recurso natural	166
8.1.2 Antecedentes	168
8.2 Objetivo particular	170
8.3 Materiales y métodos	170
8.3.1 Instrumentación	170
8.3.2 Reactivos, disoluciones y muestras	171
8.3.2.1 Recolección de muestra	171
8.3.3 Procedimientos analíticos	172
8.3.3.1 Determinación de elementos totales	172
8.3.3.2 Determinación de Flúor	173
8.4 Resultados y discusión	174
8.5 Conclusiones	183
 <b>Capítulo 9.</b>	
Conclusiones Generales	184
 <b>Capítulo 10.</b>	
Referencias	190

## INDICE DE FIGURAS

Fig.	Leyenda	Pag.
1.1	Diagrama de operación de un filtro de masas tipo cuadrupolo, se observa el diagrama de las conexiones eléctricas a los generadores de corriente directa (dc) y radio frecuencia (rf), así como las trayectorias de iones de diferente relación m/z .	29
1.2	Esquema de un analizador de masas de sector magnético de simple enfoque, se indica en la parte superior de la imagen, la entrada de los iones provenientes de la fuente de ionización (química, por impacto electrónico, electro-rociado, ablación láser o en plasma), así como la trayectoria de iones de diferente relación m/z.	30
1.3	Espectrómetro de masas con plasma acoplado por inducción como fuente de ionización con filtro de masas tipo cuádruplo. Se aprecia un acercamiento a la interfase existente entre las condiciones de presión atmosférica y las condiciones de vacío al interior del instrumento.	31
1.4	Diagrama de la celda de colisión / reacción del ICP-MS Agilent 7500ce.	32
2.1	Estructuras químicas y el grado de toxicidad de algunas de las especies arsenicales	49
2.2	Diagrama de distribución de las especies del (a) ácido de arsénico (III) y (b) ácido arsénico (V) variando los intervalos de pH en el medio.	52
2.3	Ejemplo de cromatograma de estándares de As(III) + DMAs(V) + As(V) (100 µgAs L <sup>-1</sup> cada uno), obtenido por HPLC-ICP-MS.	58
2.4	Cromatogramas de las soluciones de las tres especies de As, después de 0, 15, 30 y 120 min de contacto con nanopartículas de hierro: (a) As(III), (b) As(V) y (c) DMAs(V).	59
2.5	Cromatogramas de las soluciones de las tres especies de As, después de diferentes tiempos de contacto con hierro en polvo: (a) As(III), (b) As(V) y (c) DMAs(V).	61
2.6	Cromatogramas obtenidos en el análisis de la solución mixta de las especies de arsénico (As(III) + As(V) + DMAs(V), cada uno con 100 µgAs l <sup>-1</sup> ) después de contacto (a) con nanopartículas de hierro y (b).con hierro en polvo	64
2.7	Cambios de área de picos cromatográficos de las tres especies en la solución mixta (As(III) + As(V) + DMAs(V)) conforme aumenta el tiempo de contacto (a) con nanopartículas de hierro y (b). con hierro en polvo.	65
3.1	Efecto del porcentaje de (a) tolueno/metanol y (b) de la concentración de cisteína sobre la señal analítica del bismuto (  ), mercurio inorgánico (  ) y metilmercurio (  ) obtenidos por HPLC-ICP-MS.	79
3.2	Ejemplo de cromatograma obtenido en el análisis de una solución estándar: (a) de las dos especies ( cada una 10µgHg L <sup>-1</sup> ) y (b) con EI (10 µgBi L <sup>-1</sup> ).	81
3.3	Ejemplo de cromatograma HPLC-ICP-MS obtenido en el análisis de (a) extracto de tejido de pescado (  ), el blanco (  ) y (b) el EI 10 µgBi <sup>3+</sup> L <sup>-1</sup> (  ).	83
4.1	Fotografía de una lombriz de tierra con la que se trabajo en este estudio.	100

## INDICE DE FIGURAS

Fig.	Leyenda	Pag.
4.2	Resultados de determinación de $^{51}\text{V}$ , $^{52}\text{Cr}$ , $^{55}\text{Mn}$ , $^{59}\text{Co}$ , $^{60}\text{Ni}$ , $^{63}\text{Cu}$ , $^{65}\text{Cu}$ y $^{68}\text{Zn}$ en suelos y tejido de lombrices en 6 sitios de muestreo. (En cada uno de casos se presenta el valor promedio $\pm$ desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).	114
4.3	Resultados de determinación de $^{75}\text{As}$ , $^{78}\text{Se}$ , $^{82}\text{Se}$ , $^{107}\text{Ag}$ , $^{109}\text{Ag}$ , $^{111}\text{Cd}$ , $^{114}\text{Cd}$ , $^{121}\text{Sb}$ en suelos y tejido de lombrices en 6 sitios de muestreo. (En cada uno de casos se presenta el valor promedio $\pm$ desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).	115
4.4	Resultados de determinación de $^{137}\text{Ba}$ , $^{200}\text{Hg}$ , $^{202}\text{Hg}$ , $^{207}\text{Pb}$ , $^{208}\text{Pb}$ en suelos y tejido de lombrices en 4 sitios de muestreo. (En cada uno de casos se presenta el valor promedio $\pm$ desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).	116
5.1	Ejemplo de cromatograma obtenido en el análisis de una solución estándar: (a) de las dos especies (cada una $30 \mu\text{gHg L}^{-1}$ ) y el blanco, (b) el EI ( $50 \mu\text{gBi L}^{-1}$ ).	124
5.2	Ejemplo de cromatograma HPLC-ICP-MS obtenido en el análisis de: (a) extracto de tejido de lombriz sitio 1 (Mineral de Cata $\blacktriangle$ ), suelo de sitio 5 ( Jardín Casa col. Burócrata en Gto. $\blacksquare$ ) y el blanco ( $\bullet$ ) y (b) el EI $50 \mu\text{g Bi L}^{-1}$ .	125
6.1	Ejemplo de cromatograma obtenido por HPLC-ICP-MS en el análisis de (a) tejido de lombriz de tierra y (b) suelo ambas muestras pertenecientes al sitio 5 (jardín de col. Burócratas).	139
7.1	Estructuras de ADN y ARN y sus bases mayoritarias.	149
7.2	Espectros obtenidos por UV a una longitud de onda de 254nm para: (a) estándar de ADN en extracto de tejido de Salmón (—) y (b) ADN obtenido en el análisis de tejido de lombriz de tierra, del sitio 7 proveniente de La Laguna, en Lagos de Moreno)(---).	157
7.3	Cromatograma obtenido por HPLC-UV en el análisis de tejido de lombriz de tierra perteneciente al sitio de muestreo 4: La Laguna, en Lagos de Moreno, Jal..	158
8.1	Ubicación de la ciudad de Lagos de Moreno, Jalisco.	171
8.2	Resultados de determinación de $^{51}\text{V}$ , $^{52}\text{Cr}$ , $^{55}\text{Mn}$ , $^{59}\text{Co}$ , $^{63}\text{Cu}$ y $^{68}\text{Zn}$ en agua de grifo de 16 sitios de muestreo. (En cada caso se presenta el valor promedio $\pm$ desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).	175
8.3	Resultados de determinación de $^{75}\text{As}$ , $^{82}\text{Se}$ , $^{107}\text{Ag}$ , $^{111}\text{Cd}$ , $^{121}\text{Sb}$ y $^{200}\text{Hg}$ en agua de grifo de 16 sitios de muestreo. (En cada caso se presenta el valor promedio $\pm$ desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).	176
8.4	Resultados de determinación de $^{206}\text{Tl}$ , $^{207}\text{Pb}$ , $^{232}\text{Th}$ , $^{238}\text{U}$ en agua de grifo de 16 sitios de muestreo. (En cada caso se presenta el valor promedio $\pm$ desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).	177
8.5	Concentraciones de flúor determinado en agua de grifo para 16 sitios de muestreo en la ciudad de Lagos de Moreno, Jal. (En cada uno de los casos se presenta el valor promedio $\pm$ desviación estándar).	179

## INDICE DE TABLAS

Tab.	Leyenda	Pag.
A	Parámetros evaluados en suelo y tejido de lombriz de tierra provenientes de siete sitios de muestreo	19
1.1	Métodos para eliminar interferencias en un análisis químico	25
1.2	Tipos de detectores y sus límites de detección	40
2.1	Constantes de disociación de $H_3AsO_3$ , $H_3AsO_4$ y ácido de dimetilarsenico (DMA <sub>s</sub> (V))	51
2.2	Condiciones instrumentales del sistema HPLC-ICP-MS en la especiación de arsénico en sistemas acuosos	57
2.3	Eliminación de las especies de arsénico de las soluciones acuosas que contenían una sola especie en contacto con nanopartículas de $Fe^0$ .	60
2.4	Eliminación de las especies de arsénico de las soluciones acuosas que contenían una sola especie en contacto con $Fe^0$ polvo.	62
2.5	Cambios relativos en la distribución de las especies de As en la solución acuosa de las tres especies, con el creciente tiempo de contacto con hierro en polvo y con nanopartículas de hierro.	63
3.1	Condiciones instrumentales del sistema HPLC – ICP-MS para la especiación de mercurio.	74
3.2	Parámetros analíticos evaluados para las dos especies de mercurio sin y con el uso de EI en el procedimiento propuesto.	82
3.3	Rendimiento de extracción del mercurio total ( $Hg^{2+} + CH_3Hg^+$ ) evaluado utilizando diferentes procedimientos.	85
3.4	Resultados de la determinación de las especies de mercurio en tejido de pescado fresco (n = 3).	86
3.5	Factores de recuperación de las especies $Hg^{2+}$ , $CH_3Hg^+$ con adición en forma separada de cada especie en tejido de pescado.	88
3.6	Factor de recuperación para el EI con adición de $250 \mu g Bi L^{-1}$	88
3.7	Comparación de diferentes procedimientos de extracción detección/cuantificación por HPLC – ICP-MS para la especiación de mercurio en tejido de pescado.	90
4.1	Condiciones instrumentales del sistema ICP-MS en la determinación de elementos totales en suelo y tejido de lombriz de tierra.	101
4.2	Isótopos monitoreados, límites de detección (LD), valores certificados y resultados de determinación de elementos en material certificado NIST 1643d. (No se presentan resultados analíticos para Hg ya que este no fue certificado en el material de referencia).	105
4.3	Niveles de concentración de elementos encontrados en suelos en los siete sitios de muestra recolectados (1) Mineral de Cata, Guanajuato, cercanía de la mina de plata; (2) Mezcala, Estado de Guerrero, cercanía de una mina de oro; (3) jardín de una casa en la Zona Industrial del Estado de San Luis Potosí; (4) Col. La Laguna en Lagos de Moreno, Jal.; (5) jardín de una casa en col. Burócrata, Guanajuato; (6) Jardín de una casa en Lagos de Moreno, Jal., y (7) Real Minas, Guanajuato.	108

## INDICE DE TABLAS

Tab.	Leyenda	Pag.
4.4	Niveles de concentración de elementos encontrados en tejido de lombriz en los siete sitios de muestreo recolectados (1) Mineral de Cata, Guanajuato, cercanía de la mina de plata; (2) Mezcala, Estado de Guerrero, cercanía de una mina de oro; (3) jardín de una casa en la Zona Industrial del Estado de San Luis Potosí; (4) Col. La Laguna en Lagos de Moreno, Jal.; (5) jardín de una casa en la col. Burócrata, Guanajuato; (6) Jardín de una casa en Lagos de Moreno, Jal., y (7) Real de Minas, Guanajuato.	109
5.1	Condiciones instrumentales para el sistema HPLC-ICP-MS en la especiación de mercurio en suelo y tejido de lombriz.	121
5.2	Resultados obtenidos en la determinación de las especies de mercurio en tejido de lombriz para los tres sitios de muestreo.	127
5.3	Resultados obtenidos en la determinación de las especies de mercurio en suelo para los tres sitios de muestreo.	126
5.4	Rendimiento de extracción del mercurio total ( $\text{Hg}^{2+} + \text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) en suelo y tejido evaluado utilizando diferentes procedimientos en el sitio 1,2,4, 5 y 7.	128
5.5	Resultados de recuperación obtenidos en el análisis de tejido de lombriz de tierra*.	129
5.6	Parámetros analíticos evaluados para las dos especies de mercurio sin y con el uso de EI.	130
6.1	Condiciones instrumentales de operación para la especiación de arsénico en suelo y tejido de lombriz de tierra.	137
6.2	Niveles de concentración de arsénico total, las especies arsenicales encontradas en extractos de tejido y porcentajes de recuperación en los diferentes sitios de muestreo analizados	140
6.3	Niveles de concentración de arsénico total, las especies arsenicales encontradas en suelos y porcentajes de recuperación en los diferentes sitios de muestreo analizados	141
7.1	Metilación global de ADN en lombrices de tierra y su relación con la biotransformación de elementos vía metilación	161
8.1	Condiciones instrumentales de operación del sistema ICP-MS en la determinación de elementos totales en agua de grifo.	172
8.2	Resultados de determinación de elementos totales en agua de grifo de 16 sitios de muestreo. Concentraciones reportadas en $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{DE}$	180
8.3	Resumen de los resultados obtenidos del análisis de agua de grifo y los niveles establecidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-1994) y por la Agencia de Protección al Medio Ambiente (USEPA, 2006).	181

## D) RESUMEN

El medio ambiente está compuesto por elementos que se encuentran presentes en una gran variedad de especies fisicoquímicas, incluyendo diferentes estados de oxidación, formas orgánicas e inorgánicas, compuestos de diferente masa molecular, etc. Dado que, el papel que juegan los elementos en un sistema determinado depende fuertemente de las propiedades adyacentes a cada una de sus formas y especies, existe un interés particular en evaluar cualitativa y cuantitativamente las formas y las especies de los elementos presentes en diferentes tipos de muestras. Típicamente, el proceso de especiación analítica consiste en una serie de pasos en los cuales destacan, la realización de un pretratamiento de muestra, seguido por la separación, identificación y cuantificación de las diferentes formas químicas o especies [1, 2]. El principal requerimiento en la especiación de un elemento es la determinación selectiva de sus formas, obteniéndose la información confiable correspondiente a la composición de la muestra original [1].

En la práctica, la especiación se lleva a cabo utilizando diferentes combinaciones de técnicas instrumentales tales como cromatografía, técnicas electroforéticas, diferentes tipos de espectrometrías, técnicas de electroanálisis u otras. La mayoría de los procedimientos analíticos se basan en la separación cromatográfica acoplada a un detector de alta sensibilidad. La selección de la técnica más apropiada para obtener una buena separación de las especies depende de factores como son las propiedades fisicoquímicas, así como también, de la volatilidad, la carga o la polaridad que tengan cada una de las diferentes formas del elemento de interés. Algunas veces, es necesario la aplicación de dos o más técnicas de separación, esto con la finalidad de obtener una mejor selectividad [1]. La selección de la técnica de detección más adecuada depende del nivel de concentración de la forma presente a determinar en la muestra. Por otra parte, también son parte importante, el tipo de matriz y su composición.

La movilidad geoquímica, biodisponibilidad, las rutas metabólicas y las funciones específicas de cada elemento dependen fuertemente de la variedad de cada una de sus formas fisicoquímicas presentes en un determinado sistema.

La diversidad de estas formas fisicoquímicas en diferentes compartimientos del medio ambiente y también en los organismos vivos, engloba las formas obtenidas de forma natural, los compuestos emitidos como resultado de actividad humana (fuentes antropogénicas) y aquellas formadas en los procesos de biotransformación y degradación.

De manera general, la biotransformación se refiere al fenómeno de conversión de las formas fisicoquímicas presentes en un sistema dado, a otras formas fisicoquímicas con características y propiedades diferentes, esto debido principalmente a la interacción de los seres vivos en dicho sistema. Tales conversiones dependen estrechamente de una serie de factores como son: el tipo de organismos participantes y su metabolismo, la concentración total del (los) elemento(s) en el sistema, el potencial redox, el pH del medio, la temperatura, la humedad, etc. Los procesos de biotransformación de metales y metaloides se pueden clasificar de acuerdo con los siguientes aspectos [3]:

\*La caracterización cualitativa y cuantitativa de los elementos y de sus formas fisicoquímicas presentes en diferentes compartimientos del medio ambiente y en sistemas biológicos proporciona la información analítica de relevancia medio ambiental y biológica, importante para la salud del hombre. De manera general, los estudios de este tipo se basan en el análisis de especiación, definido por IUPAC como la medición de la cantidad de una o más especies (formas del elemento de una estructura molecular, electrónica y nuclear única y establecida), presentes en la muestra [4, 5].

\*El diseño de los procedimientos del análisis de especiación difiere en muchos aspectos del análisis de los contenidos totales de elementos en las mismas muestras. En primer lugar, es necesario asegurar el carácter no-destructivo de la etapa del pretratamiento con el fin de conservar la distribución nativa de las especies. Las técnicas de pretratamiento utilizadas en el análisis de especiación son, entre otras: diferentes modalidades de extracción, lixiviación, volatilización, hidrólisis enzimática, cada una de estas con o sin la preconcentración de los compuestos de interés [5-7]. En el caso de muestras biológicas, hay que considerar también la separación macroscópica de órganos o tejidos, aislamiento de ciertos tipos de células, su homogeneización, separación de biomoléculas de interés e incluso fragmentación de estas biomoléculas [8]. Una vez teniendo las fracciones de interés (solución o fase gaseosa), se

lleva a cabo la separación de las especies basándose en características como son las diferencias de su polaridad, volatilidad, tamaño molecular, afinidad, etc., empleando diferentes técnicas cromatográficas o electroforéticas.

\*Finalmente, la información cuantitativa se obtiene mediante el análisis del elemento de interés en cada una de las fracciones (especies). En esta última etapa se utilizan las técnicas de espectrometría atómica, debido a su alta selectividad y alto poder de detección [5, 9].

En este contexto, una de las principales aplicaciones de espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es precisamente el análisis de especiación. Las ventajas que brinda la utilidad de ICP-MS en estos estudios incluyen: (i) capacidad del análisis multielemental e isotópico, (ii) muy bajos límites de detección para la mayoría de los elementos (en el intervalo de concentraciones desde pocas partes por trillón hasta partes por billón); (iii) amplio rango dinámico (típicamente del orden de 8 ordenes de magnitud de las concentraciones); (iv) muy pocas interferencias y, en consecuencia (v) alta precisión y exactitud de los resultados analíticos. Además, el acoplamiento en línea de ICP-MS con diferentes sistemas de separación es técnicamente fácil, se obtiene la información cuantitativa referente a concentraciones muy bajas de diferentes elementos en los efluentes de la columna en tiempo real y es posible compensar la incompleta resolución cromatográfica [10-12].

En este proyecto de tesis se propone avanzar en el desarrollo de la metodología analítica para la caracterización y cuantificación de las especies químicas de algunos metales y metaloides de relevancia medio ambiental, utilizando ICP-MS como detector específico de elementos. La selección de elementos y especies se hizo en función de la problemática medioambiental actual en el Estado de Guanajuato y zonas circunvecinas. Con base en la revisión de los datos existentes, el trabajo se enfocó principalmente en arsénico y mercurio, ya que varios reportes demuestran que estos dos elementos causan la contaminación en nuestro estado.

Así pues, en la primera parte de trabajo (Capítulo 2) se examinó la factibilidad del uso de hierro elemental en forma de nanopartículas y en polvo como una alternativa en la remoción de las principales especies de arsénico (As(III), As(V) y DMAs(V)) presentes en agua natural.

Para ello se adaptó el procedimiento de especiación, basado en la separación de las especies antes mencionadas por cromatografía de líquidos acoplada a ICP-MS como detector específico de elementos. En los experimentos llevados a cabo en soluciones de especies individuales y de sus mezclas, se observó que ambas formas de hierro elemental permiten la remoción de las especies inorgánicas de arsénico, que son también de mayor toxicidad, obteniéndose porcentajes de remoción de aproximadamente el 100% en tiempos relativamente cortos (2 h para nanopartículas de hierro y de 22 h para el hierro en polvo).

Dada la importancia de mercurio y, en particular la toxicidad de metilmercurio para organismos vivos, en la siguiente etapa del trabajo se ha puesto a punto novedoso un procedimiento de cuantificación de dos especies de mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) en tejido de pescado. Aquí cabe destacar, que las dos especies presentan muy diferente polaridad por lo que resulta difícil lograr una extracción completa de ambas especies en un solo paso. Por otro lado, la Agencia de Protección Medioambiental (USEPA) regula el nivel máximo permisible de este elemento respecto a masa fresca de la muestra, con el fin de poder aplicar fácilmente este valor en la evaluación de las porciones de alimentos. El procedimiento desarrollado consiste en la extracción de mercurio y el análisis del extracto mediante la separación por cromatografía de líquidos en fase inversa y detección por ICP-MS. La contribución y originalidad de este trabajo ha sido la modificación de las condiciones de extracción respecto a los trabajos publicados anteriormente y el uso del ión bismuto ( $\text{Bi}^{3+}$ ) como estándar interno (EI), lo que permitió obtener buena exactitud y precisión de determinaciones directamente en muestras de pescado frescas (masa húmeda). El desarrollo del procedimiento y su aplicación en el análisis de muestras de pescado se describen en el Capítulo 3.

El siguiente tema de interés fue el emplear los procedimientos del análisis total y de especiación para evaluar la utilidad de las lombrices de tierra como bioindicadores de metales/metaloides presentes en suelo. En primer lugar, se recolectaron las muestras de estos organismos y de suelos en siete diferentes sitios en México procurando que cada uno de ellos se caracterize por diferentes niveles de concentración de metales. En el Capítulo 4 se describen los procedimientos y resultados obtenidos en la determinación de 15 elementos en muestras provenientes de los siguientes lugares: (1) Mineral de Cata, Guanajuato, cercanía de

la mina de plata; (2) Mezcala, Estado de Guerrero, cercanía de una mina de oro; (3) jardín de una casa en la Zona Industrial del Estado de San Luis Potosí; (4) Col. La Laguna en Lagos de Moreno; (5) jardín de una casa en la col. Burócrata, Guanajuato; (6) Jardín de una casa en Lagos de Moreno, Jal. y (7) Real de Minas, Guanajuato. Los resultados obtenidos mostraron correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de Mn, Co, Zn, Se, Ag, Sb, Pb, As y Hg en suelo y en tejido, confirmando que las lombrices pueden ser utilizadas como indicadores de la contaminación existente en ambientes terrestres con estos elementos, en particular.

Por otro lado, ha sido descrito que varios organismos vivos biotransforman elementos inorgánicos como lo son el As, Hg, Se y Sb en especies metiladas, por lo que parecía interesante estudiar si esta biometilación se lleva a cabo también en lombrices de tierra. Para ello se seleccionaron de nuevo As y Hg, ya que estos dos elementos fueron encontrados en mayoría de los sitios de muestreo en concentraciones suficientemente altas tanto en suelo como en biomasa (tejido).

El análisis de especiación fue enfocado en las especies inorgánicas y metiladas. En concreto, se adoptaron dos procedimientos analíticos descritos en los Capítulos 5 y 6 basados en el uso de cromatografía de líquidos en acoplamiento con ICP-MS; uno de ellos permite determinar mercurio inorgánico y metilmercurio y el segundo As(III), As(V) y DMAs(V). Cabe mencionar que fue necesario modificar las condiciones de extracción debido a diferentes propiedades de la matriz de muestras (tierra y tejido de lombrices). En el capítulo 5 se describen los resultados obtenidos en el análisis de especiación de mercurio y en Capítulo 6 los resultados de especiación de arsénico. El análisis de los datos reveló que lombrices de tierra presentan capacidad de biometilación de especies inorgánicas de ambos elementos presentes en suelo.

Existen numerosas evidencias experimentales que ciertos metales actúan como factores epigenéticos, es decir, pueden contribuir en la conformación actual de la cromatina, principalmente mediante cambios de metilación de ADN. Estos efectos son muy importantes, ya que los eventos epigenéticos erróneos, han sido implicados en la patogénesis de diferentes enfermedades, incluyendo cáncer. Puesto que, diferentes procesos de biometilación

comparten enzimas del grupo metiltransferasas y usan S-adenosilmetionina como donador del grupo metilo, ha sido propuesto que la metilación de metales/metaloides puede competir con la metilación de ADN, lo que podría ser uno de los mecanismos en epigenética. Una vez demostrado que las lombrices de tierra tienen la capacidad de biometilar As y Hg, se observó la importancia de examinar la posible asociación entre los niveles de concentración de estos dos elementos (y otros potencialmente biotransformados por el mismo mecanismo: Se y Sb) y la metilación global de ADN en lombrices.

En el Capítulo 7 se presentan los resultados obtenidos en la determinación de la metilación global de ADN en lombrices provenientes de los mismos siete sitios de muestreo, mediante la separación de desoxinucleótidos por cromatografía de líquidos en fase inversa con detección UV.

En el mismo Capítulo 7, se describen los resultados del análisis estadístico de correlación, llevado a cabo en búsqueda de posibles relaciones entre los niveles de concentración de los elementos y el grado de metilación global de ADN. En la Tabla A se indican los parámetros evaluados en cada uno de los sitios que fueron utilizados en este análisis. Como resultado, se observó estadísticamente una correlación significativa inversa entre el porcentaje de citosinas metiladas en el ADN y las concentraciones totales en biomasa para los siguientes elementos: As, As + Hg, Hg + As+ Se + Sb ( $\beta = -0.8456$ ,  $p = 0.071$ ;  $\beta = -0.9406$ ,  $p = 0.017$ ;  $\beta = -0.9526$ ,  $p = 0.012$  respectivamente) así como para la suma de las formas inorgánicas de As + Hg ( $\beta = -0.8807$ ,  $p = 0.049$ ). Estos resultados indican que la biometilación de los elementos en lombrices de tierra podría favorecer la hipometilación de ADN. Se propone que el grado de metilación global de ADN en lombrices podría ser considerado como un bioindicador del riesgo de cambios epigenéticos no deseados en ambientes terrestres, donde los organismos vivos son expuestos diariamente a elementos susceptibles al proceso de biometilación.

**Tabla A.** Parámetros evaluados en suelo y tejido de lombriz de tierra provenientes de siete sitios de muestreo.

Sitio	N°	Parámetros evaluados					
		Elementos en suelo	Elementos en tejido de lombriz	Especiación de mercurio en suelo y en tejido	Especiación de arsénico en suelo y en tejido	Metilación global de ADN	Análisis de correlación
Mineral de Cata	1	si	si	si	si	si	si
Guerrero	2	si	si	no	si	no	no
SLP	3	si	si	no	si	no	no
Laguna	4	si	si	si	si	si	si
Jardín	5	si	si	si	si	si	si
Lagos	6	si	si	no	no	si	no
Real de Minas	7	si	si	si	si	si	si

Por último, con el fin de que el trabajo tenga más estrecha relación con la problemática regional, de manera complementaria se realizó un estudio de la determinación de los perfiles de metales y metaloides en agua de grifo de la ciudad de Lagos de Moreno, Jal., mediante ICP-MS. En las mismas muestras también se realizó la determinación de flúor, mediante el ensayo espectrofotométrico, de acuerdo a la norma NMX-AA-077-SCFI-2001.

Cabe señalar que la finalidad de esta parte complementaria fue obtener datos de distribución de metales y de flúor en diferentes lugares de la ciudad, ya que los datos existentes fueron solamente de carácter general (regionales, estatales), pero no específicos para esta ciudad. Los resultados obtenidos se describen en el Capítulo 8.

Finalmente, en el último Capítulo 9 se presentan una serie de conclusiones de carácter general y las conclusiones específicas de cada una de las partes de trabajo.

## II) OBJETIVO DEL PROYECTO

El objetivo general de este proyecto ha sido desarrollar las metodologías analíticas, basadas en la combinación de diferentes técnicas de fraccionamiento y/o separación y detección específica de elementos por ICP-MS, que permitan obtener la información cualitativa y cuantitativa sobre las especies químicas de metales y metaloides de relevancia medio ambiental y que también podrían ser útiles en el desarrollo de nuevas estrategias de remoción de las especies contaminantes.

### III) OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Evaluar la factibilidad de remoción de las principales especies de arsénico en aguas naturales mediante el uso de nanopartículas de hierro y hierro en polvo.
2. Desarrollar un nuevo procedimiento para la especiación de mercurio inorgánico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) y metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) en tejido de pescado fresco, asegurando un buen rendimiento de extracción de las dos especies y su separación/cuantificación por cromatografía de líquidos en fase inversa, acoplada a ICP-MS como detector específico de elementos y usando el  $\text{Bi}^{3+}$  como estándar interno.
3. Avanzar en el conocimiento sobre uso de lombrices de tierra como potenciales bioindicadores de la contaminación del suelo con metales y metaloides:
  - determinar por ICP-MS los metales y metaloides en tejido de lombrices de tierra y en suelos provenientes de siete sitios caracterizados por diferente grado de contaminación.
  - determinar  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  en suelo y en tejido de lombrices de tierra mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección en línea por ICP-MS
  - llevar a cabo el análisis de especiación de arsénico en suelos y tejido de lombriz de tierra mediante HPLC -ICP-MS con enfoque en sus formas inorgánicas ( $\text{As(III)}$ ,  $\text{As(V)}$ ) y orgánicas ( $\text{DMAs(V)}$ )
  - determinar el grado de metilación total de ADN en tejido de lombriz de tierra y evaluar las asociaciones posibles entre los parámetros medidos.
4. Incidir en la solución de los problemas de la región, mediante la determinación del perfil de la distribución de metales y metaloides en agua de grifo de la ciudad de Lagos de Moreno por ICP-MS, así como también, complementar este estudio con la cuantificación de la cantidad de Fluoruro ( $\text{F}^-$ ) presente en las muestras de agua de grifo mediante análisis por UV de acuerdo a lo establecido según la norma NMX-AA-077-SCFI-2001.

# **CAPITULO 1**

## **DESCRIPCION DE EQUIPOS**

## 1.1 INTRODUCCIÓN

Varios procedimientos para acelerar y simplificar la preparación de muestra y la introducción del analito a espectrofotómetros con fuentes de plasma han sido desarrollados y evaluados para el análisis de especiación de compuestos órgano metálicos usando por ejemplo alquil y arilmetales y análogos a la cianocobalamina[13].

El progreso de la espectrometría con fuente de plasma y en particular, la disponibilidad de técnicas más robustas y sensibles ha alcanzado gran interés dentro de la química analítica de especies metálicas (análisis de especiación). La mayoría de los trabajos incluyen estudios de especies órgano metálicas bien conocidas por ser contaminantes medioambientales (butil- y fenilestaño, alquilplomo), productos obtenidos mediante la biotransformación de formas inorgánicas de elementos a sus formas orgánicas (metilmercurio, organo-arsénicos) y complejos de metales esenciales y tóxicos, así como metaloides con biomoléculas [13].

La aparente factibilidad en la selección y análisis de especies en compuestos órgano metálicos y productos obtenidos por su baja degradación, ha provocado un creciente interés por parte de agencias gubernamentales e industrias para el control en la calidad de los laboratorios, y consecuentemente de la instrumentación analítica utilizada dentro de las manufacturas[13].

La utilización de las llamadas Técnicas Híbridas (Hyphenated Techniques) constituidas por el acoplamiento de una poderosa técnica de separación y/o preconcentración y detectores espectroscópicos atómicos o moleculares, ha permitido espectaculares avances en la caracterización de especies de interés medioambiental y en áreas de la metalomica, toxicología, alimentos, farmacología, nuevos materiales, nanotecnología analítica, etc. Las técnicas de separación mas comúnmente empleadas son FIFFF, Cromatografía de Gases (GC), Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (PAGE), Electroforesis Capilar (CE), Electroforesis Capilar en Zona (CZE), IEF, acopladas a técnicas espectrométricas atómicas como Espectrometría de Masas (MS con analizadores de trampa de iones, cuádruplo (Q), triple cuádruplo, Tiempo de vuelo (TOF), Q-TOF, entre otros), Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-OES), Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS),

Espectrometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (GFAAS) o moleculares como Espectrofotometría de UV-Visible (UV), FM, FCS, incluso electroquímicas como Voltametría de partículas sólidas u otras como TOC, AFM, Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM), Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), están proporcionando la posibilidad de abordar procesos de especiación química, física, de distribución y fraccionamiento e incluso con el condicionante de caracterizar especies en formas solubles e insolubles en la frontera entre la materia disuelta y la sólida [14].

Los métodos espectrofotométricos en la determinación de especies metálicas han sido muy populares, pero en años recientes, se han vuelto obsoletos, en particular para el análisis de muestras medioambientales, esto debido al tiempo de consumo y a su baja sensibilidad que no permite obtener bajos límites de detección. Actualmente estos métodos son empleados para la determinación directa de compuestos metálicos inorgánicos [15]. Estas determinaciones se basan principalmente, en la obtención de color debido a la formación de un complejo metálico, que absorbe a una determinada longitud de onda pasando la radiación a través de la solución estudiada. Por otra parte, los altos límites de detección alcanzados por estas técnicas pueden ser reducidos poniendo especial cuidado en la preparación de la muestra, en el proceso de extracción, quelación, sorción o en el orden de concentración del elemento a determinar. El análisis de especiación puede ser posible con el uso de diferentes condiciones de reacción o la combinación de diferentes métodos [15].

En efecto, la biodisponibilidad, movilidad, reaccionabilidad y toxicidad de un elemento en ecosistemas, esta no sólo condicionada, por el estado químico, sino también, por sus estados físico y morfológico, así como por su distribución, asociación o acomplejamiento en fase soluble, coloides orgánicos e inorgánicos, nanopartículas, micropartículas, agregados y biopartículas (bacterias, virus, fitoplancton) [14]

## 1.2 METODOS DE SEPARACIÓN

Para muchos de los métodos analíticos utilizados, es un paso vital la separación del analito de posibles interferencias. Algunos de los métodos clásicos para manejar los problemas de las interferencias químicas incluyen enmascaramiento, precipitación, extracción, destilación e intercambio iónico[16].

Pocas técnicas para mediciones utilizadas en el análisis químico son específicas para una sola especie; como consecuencia, una parte importante de la mayoría de los análisis se relaciona con especies extrañas que pueden atenuar la señal del analito o producir una que se distinga de la que produce el analito. Una sustancia que afecta la señal analítica se dice que es una interferencia o un interferente. Un interferente es una especie química que ocasiona un error sistemático en un análisis reforzando o atenuando la señal analítica[16]. En la tabla 1.1 se presentan algunos de los métodos generales que se utilizan para tratar las interferencias en los analitos, entre ellos destacan: (1) enmascaramiento, (2) precipitación química o electrolítica, (3) destilación, (4) extracción con disolventes, (5) intercambio iónico, (6) cromatografía, (7) electroforesis[16].

En el *enmascaramiento* se adiciona un reactivo a la solución de la muestra para inmovilizar o fijar químicamente el interferente en forma de un complejo que ya no contribuya más ni disminuya la señal del analito. Claramente, un agente enmascarante no debe afectar en forma significativa el comportamiento del analito. En la *precipitación y/o filtración* se elimina selectivamente de la solución el analito o interferente en forma de una especie insoluble, es uno de los métodos más antiguos para el tratamiento de las interferencias en los procedimientos analíticos[16]. La destilación es frecuentemente empleada para separar analitos volátiles de interferencias no volátiles. Un ejemplo común es la separación de analitos de nitrógeno de otras especies al transformar el nitrógeno en amoníaco, que puede destilarse de una solución básica[16]. La *extracción con solvente* es empleada en la separación de analitos debido a la diferencia en la solubilidad en dos líquidos inmiscibles[16]. El *intercambio iónico* se basa en la diferencia de la estabilidad de los reactivos con una resina de intercambio iónico; mientras que, en la *cromatografía* es con base en la diferencia de la

velocidad de movimiento de un soluto a través de una fase estacionaria y la diferencia de la velocidad de migración en un gradiente de campo eléctrico se aplica para la *electroforesis capilar*.

**Tabla 1.1** Métodos para eliminar interferencias en un análisis químico [16].

Método	Bases del método
1. Enmascaramiento	Inmovilización del interferente como un complejo no reactivo
2. Separación mecánica de la fase: a) Precipitación y filtración	Diferencia en la solubilidad de los compuestos formados.
b) Destilación	Diferencia en la volatilidad de los compuestos
c) Extracción	Diferencia en la solubilidad en dos líquidos inmiscibles
d) Intercambio Iónico	Diferencia de la estabilidad de los reactivos con una resina de intercambio iónico.
3. Cromatografía	Diferencia de la velocidad de movimiento de un soluto a través de una fase estacionaria.
4. Electroforesis	Diferencia de la velocidad de migración en un gradiente de campo eléctrico.

### 1.3 HERRAMIENTAS ANALÍTICAS EMPLEADAS EN ESTUDIOS DE ESPECIACIÓN

Un diseño de especiación involucra de manera típica dos etapas, en primer lugar se obtiene la separación de los compuestos de interés y en segundo lugar se lleva a cabo su detección y cuantificación. Las herramientas analíticas que se emplean en este tipo de estudios deben presentar las siguientes características:

- Preservación de las formas fisicoquímicas presentes en la muestra original, ya que de esto depende la utilidad de la información obtenida de todo el procedimiento analítico.
- Alta selectividad en la etapa de separación, para que la determinación de los diferentes compuesto (especies) sea lo más exacta posible.
- Detección específica y multi-elemental de los elementos de interés en las fracciones obtenidas de la etapa de separación, y la posibilidad de cuantificar los analitos con el menor número de interferentes posibles

- Alta sensibilidad y bajos límites de detección, ya que por lo general, las muestras de interés medio ambiental o biológico, presentan concentraciones traza o ultra traza de metales, como contaminantes o como elementos con funciones biológicas.

Con base en estos requisitos que se acaban de mencionar, los procedimientos actuales emplean técnicas cromatográficas y electroforéticas eficaces en la etapa de separación, y técnicas espectrométricas atómicas para la etapa de detección y cuantificación.

### **1.3.1 Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente ( ICP-MS)**

El ICP-MS ha llegado a convertirse en una herramienta analítica importante para los estudios desarrollados en diferentes ámbitos de la ciencia. La versatilidad de esta técnica es su capacidad para el análisis multielemental, su alta selectividad y sensibilidad tanto como su fácil acoplamiento con diferentes técnicas de separación. La determinación de los elementos totales presentes en pequeñas cantidades en muestras medioambientales, biológicas ó clínicas, 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, para su elucidación en las muestras biológicas y así, poder determinar el posible mecanismo celular y poder observar los efectos benéficos y/o dañinos. El progreso metodológico de esta herramienta consiste en su determinación de elementos no metálicos, lo que causa la expansión de la aplicación en sistemas biológicos mediante ICP-MS[7, 13, 17].

La espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) es una técnica analítica descubierta a principios de 1980 y la cual es aplicada para la determinación de elementos traza, menores y mayores. La técnica se basa en las siguientes características[7, 17-19]:

1. *Capacidad de análisis multielemental e isotópico:* puede medir prácticamente todos los elementos, incluyendo álcalis, alcalino térreos, de transición, metaloides, tierras raras, la mayor parte de los halógenos y algunos de los no metales.
2. *Sensibilidad:* cuenta con una alta resolución dando por consiguiente, un bajo límite de detección y de costo para la mayoría de los elementos, incluyendo los metaloides y algunos no metales.
3. *Tiempo de análisis:* la mayoría de los elementos e isótopos de la tabla periódica pueden ser analizados simultáneamente en un par de minutos (alrededor de 4 minutos por muestra).
4. *Orden de determinación de muestra:* La determinación analítica de concentración de las muestras son del orden desde pocas partes por trillón hasta partes por billón.
5. *Información isotópica:* muestra información isotópica de tipo cualitativo y cuantitativo.
6. *Detector cromatográfico:* fácil acoplamiento a la columna cromatográfica.
7. *Interferencias:* Tiene muy pocas interferencias y en consecuencia una alta precisión y exactitud en los resultados analíticos.

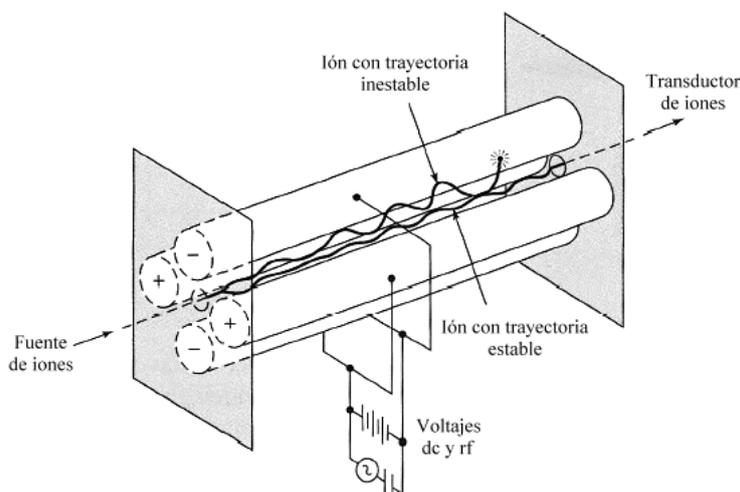
Con el desarrollo de la espectrometría de masas se abrió la posibilidad de identificar y cuantificar las especies químicas en un amplio intervalo de masas. En esta técnica, la muestra debe ser ionizada para obtener iones moleculares, sus fragmentos o átomos ionizados. Los iones son conducidos por una 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 con el valor de su cociente  $m/z$  (masa/carga). Posteriormente son detectados y registrados por un transductor electrónico.

Los analizadores de masas pueden ser de varios tipos, los más frecuentemente utilizados por su bajo costo y versatilidad son los cuádrupolos. En la Figura 1.1 se muestra la manera de operar de un cuádrupolo. Los iones orientados en un haz uniforme, son acelerados por un conjunto de lentes iónicas, e introducidos en el espacio formado por las cuatro barras metálicas colocadas en forma paralela y que funcionan como electrodos. Las barras opuestas

se conectan eléctricamente, un par al polo positivo de una fuente variable de corriente continua y el otro par a la terminal negativa. Adicionalmente se aplica a cada par de barras, potenciales difentes de corriente alterna de radiofrecuencia. La interacción de los iones tanto de los potenciales de corriente continua como los de corriente alterna con los iones, genera diferentes trayectorias. Un par de barras opuestas con carga positiva o negativa de forma alternada, aleja o atrae los iones hacia el centro del espacio entre las barras, los iones de baja masa son movidos con mayor intensidad y en el ciclo negativo de las barras colisionan con las mismas, con lo que pierden su carga y son eliminados, de esta manera este par de barras funcionan como filtro de masas bajas.

El otro par de barras con carga negativa atraen de manera continua a los iones positivos presentes, sin embargo, en los iones ligeros este movimiento puede ser contrarrestado por el ciclo positivo producido por el potencial de corriente alterna, de esta manera los iones pesados son atraídos de manera continua hacia las barras con carga negativa y son eliminados, así este par de barras funciona como filtro de altas masas. Con esto se consigue que solo un intervalo pequeño de relaciones  $m/z$  tengan una trayectoria estable a su paso por el cuádruplo y lleguen al detector. Variando los potenciales de corriente alterna y continua es posible seleccionar una relación  $m/z$  específica y eliminar las demás. Al realizar los ajustes de manera rápida es posible realizar un barrido de relaciones  $m/z$  de valores típicamente entre 3-300, con tiempos de detección en el orden de milisegundos (alrededor de 100 ms) en un amplio intervalo, lo que permite que el análisis multielemental sea realizado prácticamente en forma simultanea.

El analizador de masas de cuádrupolo presenta la desventaja de tener baja resolución, es decir, sólo puede distinguir entre los valores de  $m/z$  que difieren en una unidad. Esto hace que este filtro de masas no pueda distinguir entre iones atómicos  $X^{+1}$ , en los cuales el valor  $m/z$  es igual a la masa atómica, y los iones poliatómicos  $ZY^{+1}$  que pueden presentar valores de  $m/z$  muy similares a  $X^{+1}$ .

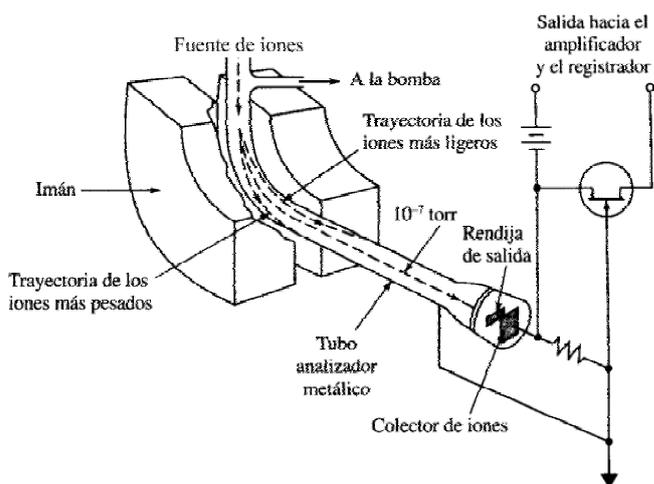


**Figura 1.1.** Diagrama de operación de un filtro de masas tipo cuádrupolo, se observa el diagrama de las conexiones eléctricas a los generadores de corriente directa (dc) y radio frecuencia (rf), así como las trayectorias de iones de diferente relación  $m/z$  [16].

Existen también analizadores de masas de alta resolución, que permiten separar iones que presentan diferencias entre sus valores  $m/z$  inferiores a una unidad de masa atómica. De esta manera es posible eliminar las interferencias poliatómicas e isobáricas. Un analizador de sector magnético se muestra en la Figura 1.2. Los iones son acelerados y luego son introducidos en el centro de un campo magnético generado por un electroimán curvo. El campo magnético genera la deflexión de los iones, de manera que los iones pesados colisionan con las paredes del tubo al vacío que los conduce al no modificar su trayectoria lineal lo suficiente para seguir por el centro, esto es, debido a la fuerza centrífuga generada por la masa del ión en la trayectoria curva.

Por otro lado los iones muy ligeros desvían demasiado su trayectoria lineal al ser atraídos por el imán, y colisionan con el tubo del analizador. Al variar la intensidad del campo magnético o el potencial de aceleración de entrada, se puede igualar la fuerza centrífuga con la centrípeta de un ion de determinada relación  $m/z$ , y permitir que llegue al detector. También existen equipos que antes de separar los iones por interacción con el campo magnético eliminan las diferencias en sus energías cinética y de traslación por medio de un enfoque electrostático.

Este es llevado a cabo, al pasar los iones entre dos láminas metálicas lisas curvadas, a través de las cuales, se aplica un potencial de corriente continua. Estos equipos son llamados de doble enfoque y son costosos y al trabajar con condiciones de alta resolución se disminuye de manera drástica su sensibilidad.



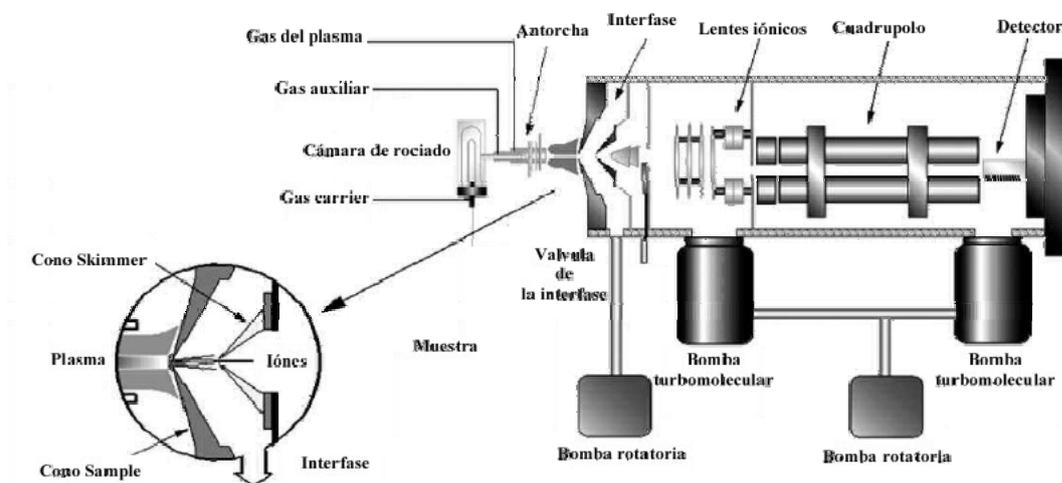
**Figura 1.2.** Esquema de un analizador de masas de sector magnético de simple enfoque, se indica en la parte superior de la imagen, la entrada de los iones provenientes de la fuente de ionización (química, por impacto electrónico, electro-rocido, ablación láser o en plasma), así como la trayectoria de iones de diferente relación  $m/z$ .

Existe también la posibilidad de separar iones por medio de analizadores de masas de tiempo de vuelo (TOF), en el cual los iones formados son impulsados con la misma energía cinética y después son introducidos a un tubo al vacío. La diferencia en las masas se refleja en la velocidad con que se desplazan en el tubo, por lo que los iones más pesados llegan más tarde al detector, situado al final de un tubo al vacío. Midiendo el tiempo que tardan en llegar los iones es posible calcular su masa hasta con 3 cifras decimales significativas.

Los análisis de especiación química elemental pueden ser llevados a cabo a través de la obtención de iones atómicos a partir de las especies de interés presentes en una muestra. Las fuentes de plasma son una herramienta muy útil para este propósito; por lo que, con el surgimiento de la espectrometría de masas con fuente de ionización por plasma acoplado por inducción (ICP-MS) se ha convertido en la herramienta más empleada en estudios de especiación química.

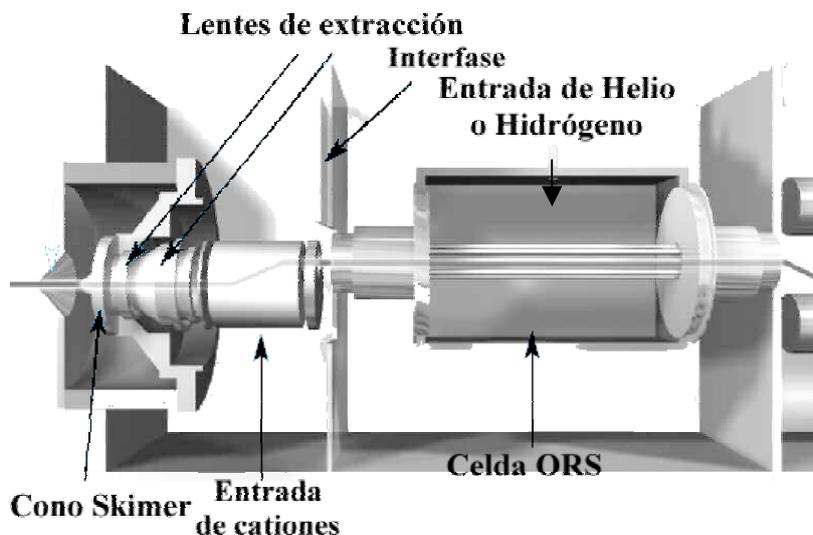
Las capacidades de análisis de la técnica ICP-MS permiten un auténtico análisis multielemental e isotópico, con límites de cuantificación del orden de nano gramos por litro para la mayoría de los elementos y la posibilidad de que el análisis sea continuo, pero sobre todo, permiten el acoplamiento sin mayores problemas con técnicas de separación cromatográficas, electroforéticas, así como la introducción directa de vapores o gases.

En la Figura 1.3 se muestra el esquema de un espectrómetro de masas con plasma acoplado por inducción como fuente de ionización y filtro de masas tipo cuádrupolo, se puede observar que la interfase debe permitir la entrada de los iones bajo condiciones de presión atmosférica, hacia el alto vacío requerido para la conducción, 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, filtrados y detectados.



**Figura 1.3.** Espectrómetro de masas con plasma acoplado por inducción como fuente de ionización con filtro de masas tipo cuádrupolo. Se aprecia un acercamiento a la interfase existente entre las condiciones de presión atmosférica y las condiciones de vacío al interior del instrumento.

Como ya se ha mencionado, los analizadores de masas tipo cuádrupolo son los más empleados, y para eliminar las interferencias causadas por los iones poliatómicos, el modelo 7500ce de Agilent Technologies con el que se realizó este trabajo, cuenta con un sistema de eliminación de interferentes, llamado celda con octapolo de colisión/reacción, (ORC) ilustrado en la Figura 1.4. En este dispositivo, un octapolo concentra 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. Esto permite la eliminación de los iones poliatómicos. En el modo de reacción los iones poliatómicos son disociados, o son modificados en su valor  $m/z$  por adición de un átomo de hidrógeno, al colisionar con este gas en la celda.



**Figura 1.4.** Diagrama de la celda de colisión/reacción del ICP-MS Agilent 7500ce.

### 1.3.2.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC)

La mayoría de las metodologías analíticas antes mencionadas, son técnicas de análisis elemental y por lo tanto proveen solamente de información acerca de la variedad y cantidad de elementos en la muestra. Sin embargo, no permiten identificar la estructura de los compuestos presentes en la muestra. Por esto, el procedimiento de especiación requiere de una etapa de separación de especies previa a la detección y cuantificación. En los estudios de especiación química, la combinación de las etapas de separación y detección en línea recibe el nombre de técnicas híbridas o acopladas (coupled o hyphenated). Con este diseño se suman las ventajas de la alta selectividad de las técnicas cromatográficas o electroforéticas, con la excelente sensibilidad y poder de detección de la espectrometría atómica.

Dentro de las técnicas de separación más poderosas se encuentran la cromatografía, ya sea de gases (GC) o de líquidos (LC). Estas técnicas se definen como métodos físicos de separación, en los cuales los solutos que van a ser separados se distribuyen entre dos fases: fase estacionaria, que permanece inmóvil; y fase móvil, la cual se mueve en una dirección definida. Estas técnicas proporcionan una gama muy completa de posibilidades de separación, basadas en diferentes principios fisicoquímicos.

Más específicamente, la cromatografía de líquidos de alta resolución es la técnica analítica de separación más ampliamente utilizada. Las razones de la popularidad de esta técnica son su versatilidad debido a la variedad de mecanismos de separación utilizados, su fácil acoplamiento con diferentes tipos de detectores, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a sustancias que son de primordial interés en la industria, en muchos campos de la ciencia y para la sociedad en general. Algunos ejemplos de estos materiales incluyen: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, antibióticos, esteroides, especies órgano-metálicas y una variedad de sustancias inorgánicas[20-22].

La configuración específica de un sistema HPLC depende de los tipos de muestra que se vayan a analizar. Sin embargo, la mayoría de los sistemas tienen las siguientes características[22]: bomba para impulsar la fase móvil, un inyector para introducir la muestra que va a analizarse, columna analítica donde se realiza la separación (si es necesario, una precolumna para resguardar la columna analítica), un detector para la detección de los componentes de una muestra a medida que se eluyen de la columna y de un integrador para informar sobre los datos en los picos del cromatograma.

Un aparato moderno de HPLC está equipado con uno o más recipientes de vidrio o de acero inoxidable, cada uno de los cuales contiene de 200 mL a 1000 mL de un disolvente. Los recipientes, a menudo se equipan con un sistema para eliminar el polvo de los líquidos y los gases disueltos – en general oxígeno y nitrógeno- que interfieren formando burbujas en la columna y en los sistemas de detección. Estas burbujas en la columna provocan ensanchamiento de la banda y a menudo interfieren en el funcionamiento del detector. Los degasificadores pueden consistir en un sistema de vacío, un sistema de destilación, un dispositivo para calentamiento y agitación de los disolventes o un sistema de purga que permiten arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad en la fase móvil [16, 20, 21].

En los sistemas de HPLC son comunes dos sistemas para la aplicación de la fase móvil: isocrático y de gradiente. En un sistema isocrático la separación se realiza con un solo disolvente a composición constante. En la elución con gradiente, se emplean dos o más sistemas de disolventes que difieren significativamente en su polaridad. La proporción de los disolventes varía en una forma programada, algunas veces, continuamente, y en otras en una serie de pasos. Con frecuencia, la elución con gradiente mejora la eficiencia de la separación, de la misma manera, como la programación de la temperatura ayuda a la cromatografía de gases[16, 20-22].

A continuación se describen de manera resumida los tipos de cromatografía de líquidos, ya que esta fue una de las técnicas utilizadas en el desarrollo del proyecto.

*1.3.2.1 Fase estacionaria.* Es el medio físico por el cual se hace pasar la muestra, y que interactúa con la misma, reteniéndola o dejándola pasar libremente, de acuerdo a diferentes principios fisicoquímicos explicados a continuación. Puede ser un polvo fino, un gel polimérico o una estructura porosa. Se encuentra normalmente contenida en un cilindro hueco, llamado columna cromatográfica, de diámetro interno reducido y de longitud de entre unos pocos centímetros hasta 30 centímetros. De acuerdo a la naturaleza de la fase estacionaria y las interacciones fisicoquímicas que se llevan a cabo las técnicas de separación por HPLC son:

- A) *Cromatografía de fase normal:* La fase estacionaria es altamente polar, tal como el trietilenglicol o agua (o sílice que lleva unidos grupos amino o ciano); mientras que la fase móvil es un disolvente relativamente no polar como el hexano, cloroformo o el *i*-propil éter. El componente menos polar es eluido primero; incrementando la polaridad de la fase móvil, entonces decrece el tiempo de elución. Los azúcares, esteroides, compuestos nitrogenados, aminoácidos, proteínas y péptidos se han analizado por cromatografía en fase normal.
- B) *Cromatografía en fase inversa (RP):* La fase estacionaria es menos polar que la fase móvil. Con frecuencia la fase estacionaria es un hidrocarburo (octil, C8 (Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH<sub>3</sub>) u octadecil, C18 (Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>-CH<sub>3</sub>) y la fase móvil es un disolvente relativamente polar (por ejemplo agua, metanol o acetonitrilo). Por tanto, el componente más polar sale primero de la columna cromatográfica y si se incrementa la polaridad de la fase móvil, se incrementa el tiempo de elución. La fase estacionaria RP-HPLC requiere un tamaño pequeño de partícula (3-10 μm) y un empacamiento de columna más compacto y homogéneo para obtener un alto número de platos teóricos. Se ha estimado que más de tres cuartas partes de todas las separaciones se llevan a cabo con empaques de fase inversa de siloxanos de octilo u octadecilo combinados. Las aminas, los fenoles, las vitaminas hidrosolubles y los aceites esenciales son algunos de los materiales que se han analizado por cromatografía en fase inversa [16, 22].

- C) Cromatografía de afinidad:* Las separaciones por cromatografía de afinidad se basan en las interacciones reversibles entre dos moléculas con cierta actividad biológica. La fase estacionaria esta formada por un soporte, el cual contiene un ligando que reconoce de manera específica, al compuesto de interés. Una vez retenido en la columna, el compuesto puede ser eluido utilizando una disolución amortiguadora de pH que provoque la descomposición del complejo formado, o una disolución que contenga un sustrato y un ligando competitivo.
- D) Cromatografía de Intercambio Iónico (IE):* Esta técnica se emplea para la separación de mezclas de cationes o aniones, para lo cual se utilizan fases estacionarias que presentan compuestos disociados con cargas puntuales. El proceso de retención depende de las interacciones electrostáticas entre sitios con carga en la fase estacionaria y los iones de la muestra. Tanto para la separación de cationes como aniones, se desarrollaron intercambiadores fuertes ( $pK_a \approx 2$ ;  $pK_a \approx 12$  respectivamente) y débiles ( $pK_a \approx 5$ ;  $pK_a \approx 9$ ) que son inmovilizados en los diferentes tipos de soporte. Las resinas de intercambio catiónico contienen frecuentemente grupos sulfónicos, o grupos carboxílicos. Mientras que para el intercambio de aniones usan aminas primarias o cuaternarias.
- E) Cromatografía de Exclusión por Tamaño Molecular (SEC):* En esta técnica se lleva a cabo la separación de compuestos de diferentes tamaños moleculares. La fase estacionaria para este tipo de cromatografía está constituida por pequeñas partículas poliméricas o de sílice que contienen una red uniforme de poros, en los que pueden penetrar las especies contenidas en la muestra. En los poros, las moléculas son atrapadas por un periodo de tiempo que depende del tamaño molecular, a menor tamaño mayor retención; y posteriormente son eliminadas por el flujo de la fase móvil. El tiempo de residencia medio en los poros depende del tamaño efectivo de las moléculas de los analitos y del tamaño de los poros. Las moléculas más grandes que el tamaño medio de los poros de los rellenos, no pueden entrar en las cavidades y pasan por la columna sin retención, mientras que las moléculas más pequeñas entran en las cavidades de manera repetida, con lo que se retienen durante más tiempo. Es

importante mencionar que en ésta técnica de separación la fase móvil debe ser la misma durante toda la separación para asegurar que el único factor que afecte los tiempos de retención de los compuestos sea el tamaño molecular. También se debe mencionar que el tipo de columna determinará los intervalos de los tamaños moleculares relacionados con las masas moleculares, que pueden ser separados. La calibración de las masas se debe hacer con estándares de masa conocida, y la función de calibración es logarítmica con respecto a la masa molecular de los compuestos.

En general, la cromatografía de partición exitosa requiere un equilibrio adecuado de fuerzas intermoleculares entre los tres participantes en los procesos de separación: el soluto, la fase móvil y la fase estacionaria. Estas fuerzas intermoleculares se describen cualitativamente en términos de la polaridad relativa que tiene cada uno de los tres reactivos. La polaridad en orden creciente para varios grupos funcionales del analito es: hidrocarburos < éteres < ésteres < cetonas < aldehídos < amidas < aminas < alcoholes. El agua es más polar que cualquier compuesto que contenga alguno de los anteriores grupos funcionales.

Como regla, la mayor parte de las separaciones cromatográficas se logran haciendo que se correspondan la polaridad del analito con la de la fase estacionaria; entonces se emplea una fase móvil de polaridad completamente diferente. Este procedimiento es generalmente más exitoso que alguno, en el cual, las polaridades del analito y la fase móvil coinciden, pero son diferentes de la de la fase estacionaria; en este caso, la fase estacionaria no puede competir exitosamente por los componentes de la muestra. Los tiempos de retención se convierten entonces en demasiado cortos para aplicación práctica. En el otro extremo, esta la situación en donde las polaridades del analito y la fase estacionaria son demasiado parecidas: en este caso los tiempos de retención se convierten en desordenadamente largos [16, 20].

*1.3.2.2 Fase móvil.*- Es el líquido que fluye por el interior de la columna cromatográfica a un caudal controlado. Puede llevarse a cabo una partición de los analitos entre la fase estacionaria y la fase móvil, con lo que el proceso de separación se considera una extracción múltiple.

*1.3.2.3 Sistema de introducción de muestra.*- En las técnicas de HPLC la muestra a analizar debe ser líquida. A menudo, el factor limitante en la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos, es la reproducibilidad con que se puede introducir la muestra en la columna. El problema se acentúa por el ensanchamiento de banda que acompaña a la sobrecarga de las columnas. Por eso, los volúmenes que se emplean han de ser muy pequeños de unas pocas décimas de microlitro a tal vez 500  $\mu\text{L}$ . En la actualidad, los equipos de HPLC modernos la muestra se introduce al sistema cromatográfico con ayuda de un inyector que controla el volumen introducido al sistema de manera muy precisa.

*1.3.2.4 Columnas analíticas.* La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos varían en longitud a partir de 10 a 30 cm. Normalmente, las columnas son rectas, y su longitud se aumenta, cuando es necesario, acoplando dos o más columnas. El diámetro interno de las columnas líquidas es de 4 a 10 mm: los tamaños comunes de partículas de empaque son 3, 5 y 10  $\mu\text{m}$ . Posiblemente la columna que más se emplea sea una de 25 cm de longitud, 4.6 mm de diámetro interno, y empacada con partículas de 5  $\mu\text{m}$ . Columnas de este tipo contienen de 40,000 a 60,000 platos/metro[16].

Recientemente los fabricantes han estado produciendo columnas de comportamiento elevado, de alta velocidad, las cuales tienen dimensiones menores que las descritas. Estas columnas pueden tener diámetros internos de 1 a 4.6 mm y estar empacadas con partículas de 3 a 5  $\mu\text{m}$ . Muchas veces sus longitudes son cortas de 3 a 7.5 cm. Este tipo de columnas pueden tener hasta 100,000 platos/metro, con las ventajas de la velocidad y el consumo mínimo de disolvente. Esta última propiedad es muy importante debido a la elevada pureza que se requiere en los disolventes para la cromatografía líquida, que los hace costosos ya que se desechan después de su uso [16, 20].

*1.3.2.5 Precolumnas.* Es común que para incrementar la vida de la columna analítica se introduzca una pequeña guardacolumna o precolumna antes de la columna analítica, que elimina no solo la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes, sino también

componentes de la muestra que se unen irreversiblemente a la fase estacionaria, eliminando cualquier material particulado y contaminantes de los disolventes. Además, en la cromatografía líquido-líquido, la precolumna sirve para saturar la fase móvil con la fase estacionaria de modo que se minimizan las pérdidas de este disolvente en la columna analítica. La composición del empaque de la guarda columna, debe ser similar al de la columna analítica; sin embargo, el tamaño de partícula normalmente es mayor, para minimizar la caída de presión [16, 20, 21].

*1.3.2.6 Termostatos de columna.* En muchas aplicaciones no es necesario un control estricto de la temperatura de la columna y ésta se opera a la temperatura ambiente. Sin embargo, con frecuencia se obtienen mejores cromatogramas manteniendo constante la temperatura a unas décimas de grado. La mayor parte de los instrumentos comerciales modernos, están equipados con calentadores de columna, que controlan la temperatura en unas décimas de grado, desde la cercana al ambiente hasta 150°C. También se puede adaptar a las columnas chaquetas de agua alimentadas con un baño a temperatura constante para dar un control preciso a la temperatura [16, 20].

*1.3.2.7 Bomba.*- El paso de la fase móvil por el espacio reducido que hay libre en el interior de las columnas cromatográficas, genera presiones altas, por lo que el sistema de bombeo de la fase móvil debe ser capaz de mantener un flujo constante contra presiones de hasta 400 bar o más.

*1.3.2.8 Detector.*- Una vez separados los compuestos de interés pueden ser detectados al salir de la columna cromatográfica por detectores en flujo no destructivos como los detectores UV-Visible, con arreglo de diodos o fluorescencia. Luego el caudal es dirigido hacia uno de los detectores específicos antes mencionados, para llevar a cabo los estudios de especiación química.

Para la cromatografía de líquidos de alta resolución, no se dispone de detectores universales sensibles como los hay para la cromatografía de gases. Así, el sistema empleado

depende de la naturaleza de la muestra. En la tabla 1.2 se enlistan algunos de los detectores comunes y sus propiedades[16]. Los detectores usados más ampliamente en cromatografía de líquidos se basan en la absorción de radiación ultravioleta o visible. Se dispone comercialmente de ambos, fotómetros y espectrofotómetros, diseñados específicamente para usarlos con columnas cromatográficas.

Los primeros emplean con frecuencia líneas de 254-280 nm de una fuente de mercurio debido a que muchos de los grupos funcionales orgánicos absorben en esa región.

**Tabla 1.2.** Tipos de detectores y sus límites de detección

Fundamento fisicoquímico	Disponible comercialmente	Límite de detección de masas (detectores comerciales)*	Límite de detección de masas (estado del arte)+
Espectrofotometría	Si	100 pg-1 g	1 pg
Fluorometría	Si	1-10 pg	10 fg
Electroquímica	Si	10 pg- 1 ng	100fg
Índice de refracción	Si	100 ng-1 ug	10 ng
Conductividad	Si	500 pg-1ng	500 ng
Espectro de masas	Si	100 pg-1ng	1 pg
FTIR	Si	1 ug	100 ng
Dispersión de luz	Si	10 ug	500 ng
Actividad óptica	No	-----	1 ng
Ion selectivo	No	-----	10 ng
Fotoionización	No	-----	1 pg-1 ng

\* El Límite de detección de masas se calcula a partir de la masa inyectada que produce una señal igual a cinco veces el ruido, utilizando un peso molecular de 200 g mol<sup>-1</sup>, de 1 µL a 10µL son inyectados para HPLC convencional.

+ La misma definición que en \*, pero el volumen inyectado es menor.

Otro detector, que tiene numerosas aplicaciones, se basa en los cambios de índice de refracción del disolvente causados por las moléculas de analitos presentes. En contraste con la mayor parte de los otros detectores que se enlistan en la tabla anterior, el indicador por el índice de refracción es más general que selectivo y responde a la presencia de todos los solutos.

La importancia de las técnicas cromatográficas en estudios de especiación química, radica en la detección elemental específica que se obtiene al conectar el flujo de salida de la columna cromatográfica, con el sistema de introducción de muestra de técnicas de detección específicas como ICP-MS.

Las separaciones llevadas a cabo por HPLC, en cualquiera de sus modalidades pueden ser acopladas a un ICP-MS como detector específico, siempre que cumplan los siguientes requisitos:

- El flujo de salida de la columna cromatográfica debe ser compatible con el flujo de operación del nebulizador utilizado.
- La fase móvil debe presentar bajo contenido de sólidos disueltos y deben evitarse las altas concentraciones de ácidos o bases que puedan dañar la antorcha.
- Se debe evitar el uso de gradientes en las separaciones cromatográficas, para evitar que el plasma se apague por la dificultad de ajustar los parámetros del plasma ante el cambio de las propiedades químicas de la muestra. Esto asegura que las condiciones de ionización en el plasma sean las mismas durante la separación.
- Se debe evitar un alto contenido de solventes orgánicos en la fase móvil, y cuando se empleen modificadores orgánicos se procurará adicionar oxígeno al plasma para quemar completamente los solventes.

Se debe asegurar la retención de precipitados o partículas que puedan tapan el nebulizador, esto se puede lograr con conexiones de bajo diámetro entre la columna y el nebulizador; esto al mismo tiempo que impide el paso de partículas, evita la difusión de los compuestos, lo que ayuda a obtener señales cromatográficas angostas y de mayor altura.

## CAPITULO 2

# USO DE Fe<sup>0</sup> (NANOPARTÍCULAS Y POLVO) EN LA REMOCIÓN DE DIFERENTES ESPECIES DE ARSÉNICO DE AGUAS NATURALES

## 2.1. INTRODUCCIÓN

El arsénico, cuyo símbolo químico es As, tiene como número atómico el 33 y una masa molar de  $74.9216 \text{ g mol}^{-1}$ ; es un metaloide localizado en el grupo 5A en la tabla periódica de los elementos [23, 24]. El nombre arsénico proviene del griego “arsenikon” que significa potente[24].

El arsénico está presente en la tierra, agua y aire como un tóxico frecuente del entorno[24]. Los estados de oxidación estables de este elemento son +5 (As(V):  $\text{H}_3\text{AsO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_4^-$ ,  $\text{HAsO}_4^{2-}$ ,  $\text{AsO}_4^{3-}$ , dependiendo del pH), +3 (As(III):  $\text{H}_3\text{AsO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$ ,  $\text{HAsO}_3^{2-}$ ,  $\text{AsO}_3^{3-}$ , dependiendo del pH), arsénico elemental ( $\text{As}^0$ ) y -3 (arsina,  $\text{AsH}_3$ )[23-28]. En ambientes acuáticos, las formas mayoritarias del arsénico son las inorgánicas: arsenito (As(III)) y arsenato (As(V)). El arsénico es conocido por ser “bioactivo” es decir, que los compuestos de arsénico inorgánico pueden ser transformados a formas orgánicas tales como el ácido monometilarsénico (MMAs(V)), ácido dimetilarsénico (DMAs(V)) y derivados gaseosos de arsina, mediante procesos biológicos en los que intervienen bacterias, hongos y/o microorganismos eucarióticos o unicelulares[23-25].

El arsénico es un constituyente minoritario de más de 245 minerales. Se encuentra en la naturaleza debido a fuentes de tipo geológico, como pueden ser las erupciones volcánicas y plantas geotérmicas[23, 24, 29, 30] y a fuentes antropogénicas, las cuales provocan la contaminación con arsénico en agua, aire, suelos y comida como resultado de las actividades humanas entre las que se destacan las siguientes: los desechos industriales de productos químicos, la minería, el refinamiento de metales, la quema de aceites (hidrocarburos) -es decir, la combustión de carbono- la producción de acero, la incineración de basura y la aplicación de derivados de arsénico en una gran cantidad de productos utilizados en la agricultura como son los pesticidas y herbicidas [23, 24, 27, 29, 31, 32], que se utilizaban en el pasado y algunos de los cuales siguen utilizándose en la actualidad.

La movilidad del arsénico en el medio ambiente depende de la variabilidad de las condiciones químicas del medio como el valor de pH, potencial redox y la actividad microbiana. En compartimientos sólidos o suelos, debe considerarse también el tipo y la cantidad de constituyentes sólidos adsorbidos.

Entre otros factores importantes que intervienen en la formación y distribución de los suelos, destaca la presencia de elementos tales como el Fe, Mn, Al, Ca y Mg, el contenido de la materia orgánica e inorgánica, así como también la cantidad de partículas finas (arena), además de otros aniones que compiten con los aniones de arsénico por los sitios de adsorción en los constituyentes [23, 27, 33].

El arsénico es el vigésimo elemento en orden de abundancia de los elementos presentes en la Tierra. Es menos abundante que el Cu y Sn y más abundante que el Hg, Cd, Au, Ag, Sb y Se. La cantidad total de arsénico en la superficie terrestre es de aproximadamente  $4.01 \cdot 10^{16}$  kg con un promedio de  $6 \text{ mg kg}^{-1}$ . En el ciclo global del arsénico se encuentra que existe en promedio  $3.7 \cdot 10^6$  kt en océanos,  $9.97 \cdot 10^5$  kt en tierra,  $25 \cdot 10^9$  kt en sedimentos y 8.12 kt en la atmósfera[23].

Problemas de altas concentraciones de arsénico y, por tanto, su toxicidad en aguas se pueden encontrar en países como India, Vietnam, Taiwán, Argentina, Chile, Hungría, Rumania, y partes de Estados Unidos[23, 24], entre otros. Por su parte, en México, se han encontrado pozos contaminados en algunas regiones del Bajío, dentro del estado de Guanajuato, contribuyendo a que una gran cantidad de personas beban agua en forma permanente, con niveles de arsénico que ponen en riesgo su salud[24, 34].

Debido al evidente incremento en las actividades humanas e industriales, se ha ido modificando el ciclo global de los metales pesados y metaloides, incluyendo a elementos no esenciales como el As, Hg, Cd y Pb. A partir de la segunda mitad del siglo XIX, la contaminación del aire, agua, suelos y comida, especialmente con estos cuatro elementos, se ha ido incrementando en organismos de plantas, animales y el mismo ser humano. De éstos

elementos, el arsénico presenta un mecanismo complejo y es uno de los contaminantes ambientales más abundantes y con un alto potencial cancerígeno para el ser humano[32]. Las concentraciones de arsénico en el ambiente pueden estar incrementándose continuamente debido a las actividades antropogénicas, produciendo un aumento en el nivel de exposición humana al arsénico[32]. Las actividades de la industria metalúrgica de Cu, Ni, Pb y Zn, así como la combustión de hidrocarburos (aceites, gasolinas y crudos) y plantas de refinamiento de petróleo son las principales fuentes de emisión de arsénico al ambiente[23].

Otra importante fuente antropogénica de contaminación de arsénico en el medio ambiente es el uso de fungicidas arsenicales, herbicidas e insecticidas en la agricultura y en la industria. Hasta la introducción de DDT en 1947 y otros pesticidas orgánicos que contenían altas cantidades de compuestos inorgánicos de arsénico como el arsenito, arsenato de sodio, arsenato de calcio, arsenato y arsenito de zinc los cuales fueron utilizados para el crecimiento de frutas y en la producción de vino, mientras que el metilarsenato monosódico y disódico fueron también utilizados en la producción de algodón [23, 31, 35]. Por otro lado, es importante mencionar que el arsénico fue un constituyente esencial en algunos agentes colorimétricos tales como el verde Scheele ( $\text{CuHAsO}_3$ ) o el verde Paris ( $\text{Cu}(\text{AsO}_2)_2\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$ )(K-acetoarsenite); además de ser un precursor en la producción del ácido sulfúrico[23, 32].

Algunos compuestos de arsénico, debido a su poder antibiótico, se usaron en medicina para el tratamiento de una gran variedad de padecimientos. Por ejemplo, una solución de arsenito de potasio al 1% (solución Fowler) se utilizó en el tratamiento de la leucemia, psoriasis o como reconstituyente y tónico. El yoduro de arsénico (solución Donovan) y el tricloruro de arsénico (solución Valagin) se recomendaron para el tratamiento del reumatismo, malaria, tripanosomiasis, tuberculosis y diabetes[23, 24, 32]. El arsenato de sodio para padecimientos crónicos de la piel, desparasitar y en la anemia. Por otro lado, algunos compuestos orgánicos que contenían 32 % de As se utilizaron en el tratamiento de la sífilis. En la actualidad el arsénico es usado comercial e industrialmente como agente en la

manufactura de transistores, láser y semiconductores, así como también, en la fabricación de vidrio, pigmentos, textiles, papel, adhesivos de metal, preservantes de alimentos y madera, municiones, procesos de bronceado, plaguicidas, herbicidas, insecticidas y productos farmacéuticos[23, 24].

### 2.1.1. TOXICIDAD DEL ARSÉNICO

Los compuestos arsenicales en grandes cantidades pueden llegar a ser tóxicos; el gas arsena (AsH<sub>3</sub>) es el compuesto de arsénico de mayor toxicidad, la dosis fatal es de 250 mg/m<sup>3</sup> en una exposición de 30 minutos. Mientras que, para otros compuestos de arsénico la dosis letal son las siguientes: trióxido de arsénico es 34.5 mg kg<sup>-1</sup> ( dosis fatal para adultos: de 120 a 300mg); arsenito de sodio es 4.5 mg kg<sup>-1</sup>, arsenato de sodio es 14 a 18 mg kg<sup>-1</sup>, el monometilarsónico ácido es 1800 mg/kg, el ácido dimetilarsénico es 1200 mg kg<sup>-1</sup> y la trimetilarsina es 8000 mg kg<sup>-1</sup>[23]. La Organización Mundial de la Salud estableció como el límite máximo permisible de contenido de arsénico en agua de consumo humano de 50 µg L<sup>-1</sup> mientras que, la Unión Europea en 2003 y la EPA en 2006 redujeron el límite máximo permisible de 50 µg L<sup>-1</sup> a 10 µg L<sup>-1</sup> [31, 36]. La Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-1994 Salud Ambiental, agua para uso y consumo humano - límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización) especifica que el contenido de arsénico en agua no debe exceder los 50 µg L<sup>-1</sup> y en el proyecto de la Norma Oficial Mexicana PRY-NOM-SSA1-250-2007 13865.59.59.1.NOM calidad de agua se propone bajar este valor hasta 10 µg L<sup>-1</sup>.

La toxicidad de arsénico depende de la forma física en que el elemento se encuentre en un sistema dado[23, 27, 31, 32, 36, 37]. De manera general, los compuestos orgánicos de arsénico son menos tóxicos que sus formas inorgánicas[23, 32, 38] (Ver fig. 2.1). Los efectos clínicos dañinos del arsénico al ser ingerido afectan los sistemas respiratorio, gastrointestinal, cardiovascular, nervioso y hepático. La toxicidad del arsénico en el organismo humano puede variar según el tipo de exposición ya sea aguda o crónica, la vía de absorción y el tiempo total de exposición[23, 27, 36]. El arsénico es cancerígeno y puede llegar a causar cáncer de

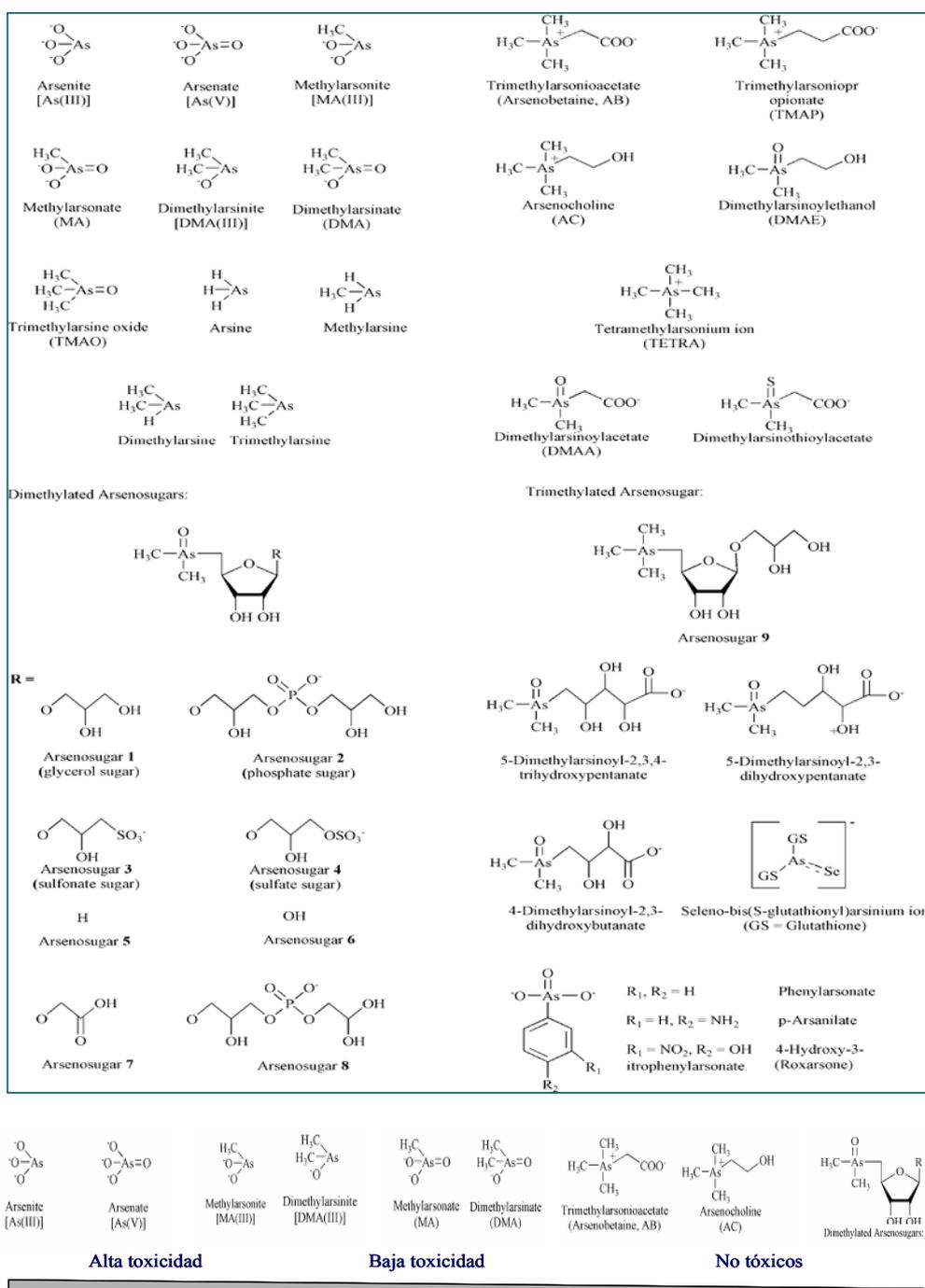
pulmón (al ser inhalado), o si es oral, produce cáncer de hígado, de riñón, de piel o en las vías urinarias[23, 27, 32, 36, 39]. Los efectos tóxicos del arsénico pueden provocar daños crónicos o agudos. La sintomatología causada por intoxicación aguda con arsénico deriva en vómito, resequedad de boca y garganta, calambres, cólicos abdominales, desordenes circulatorios y nerviosos, fiebre, alucinaciones, delirio y diarrea [23], mientras que, en padecimientos crónicos se observan síntomas no específicos como lo son el insomnio, disminución de los reflejos, gastritis, colitis, anorexia, pérdida de peso y pérdida de pelo. Las exposiciones en largos periodos de tiempo a través del aire o de la comida pueden producir hiperqueratosis, hiperpigmentación, muerte cardiovascular, disturbio en la periferia vascular y en el sistema nervioso, problemas circulatorios, descamación en uñas, eczema, problemas de hígado y rodillas. El arsénico comúnmente se acumula en el cabello, piel, uñas y huesos[23, 39]. Es genéticamente peligroso, ya que inhibe la reparación de daños producidos en el ADN, además de ser cancerígeno.

Por otro lado, hablando de sistemas biológicos, cabe destacar que la especie de arsénico trivalente (As (III)) se absorbe más rápidamente que el arsénico pentavalente (As (V)) en estos sistemas. Mientras que a nivel intracelular, el As (III) presenta una alta afinidad por los grupos sulfhidrilos (-SH) en las proteínas, causando la desactivación de enzimas y por su parte, el As(V) compite con el fosfato en reacciones celulares, inhibiendo la fosforilación oxidativa [23, 38]. La biometilación de arsénico inorgánico ha sido considerada como un mecanismo de detoxificación, debido a que las especies inorgánicas del arsénico son potencialmente más tóxicas que las especies orgánicas (ver fig. 2.1). La transformación de As inorgánico a especies orgánicas se ha observado en un gran número de diferentes especies de hongos, bacterias, algas, organismos marinos, plantas y animales terrestres. A nivel molecular, el proceso de biometilación de As ha sido descrito como el proceso enzimático, en el que participan diferentes tipos de metiltransferasas, siendo un donador del grupo metil la adenosilmetionina y la glutatona el agente reductor [40]. Se ha reportado también metilación no-enzimática de As en presencia de vitamina B12 y glutatona [41]. De manera general, ha sido aceptado que la ruta de metilación de As en mamíferos involucra las siguientes etapas [42, 43]:

- 1 – Reducción de As(V) a As(III), con participación de glutatona
- 2 - Adición oxidativa del grupo metil, formando MMAs(V)
- 3 – Reducción de MMAs(V) a MMAs(III)
- 4 – Metilación oxidativa de MMAs(III) a DMAs(V)
- 5 – Reducción de DMAs(V) a DMAs(III)
- 6 – Metilación oxidativa de DMAs(III) trimetil óxido de As(V) (TMAsO)
- 7 – Reducción de TMAsO al trimetil-arsénico(III) (TMAs(III)).

Es importante mencionar que las dos formas intermedias de arsénico orgánico en estado de oxidación +3 (MMAs(III) y DMAs(III)) fueron identificadas en muestras de orina humana[44, 45], proporcionando de esta manera una directa evidencia experimental que confirma la ruta de metilación propuesta. Debido a que las especies orgánicas de As(III) son inestables, reactivas y por lo tanto presentan una considerable toxicidad, los resultados que se acaban de mencionar ponen en duda el carácter destoxicante de la ruta de metilación de As [46, 47].

Además de las especies orgánicas formadas durante el procesamiento metabólico de arsénico en mamíferos, se han reportado más de 60 diferentes compuestos órgano-arsenicales, presentes en otros tipos de organismos vivos. Entre estos, hay que mencionar los arsenoazúcares, arsenobetaina, arsenocolina y arsenolípidos [32, 48, 49]. Las especies metiladas de arsénico pueden ser nuevamente transformadas por procesos biológicos a las formas volátiles de arsénico. La arsina, monometilarsina, dimetilarsina y la trimetilarsina son formadas bajo condiciones anaerobias, pero estos procesos también pueden ocurrir en condiciones aerobias, por ejemplo las especies orgánicas volátiles de arsénico que se encuentran en la atmósfera pueden ser rápidamente oxidadas a las especies inorgánicas. Algunas investigaciones demuestran que las pérdidas de arsénico en suelos pueden ser despreciables[23]. Las estructuras de algunas de estas especies se muestran en la Figura 2.1 junto con el grado de su toxicidad [44].



**Figura 2.1** Estructuras químicas y el grado de toxicidad de algunas de las especies arsenicales [44, 50].

A nivel mundial, existe preocupación que en algunos países como Bangladesh, Vietnam, India, Nepal, Mongolia, China, Tailandia, Pakistán, Taiwán, México, Chile, Argentina, Australia, Canadá, Estados Unidos, Finlandia, Hungría, Alemania, Rumania, Italia, España y Grecia se han incrementado paulatinamente las concentraciones de arsénico presente en agua natural [29]. En nuestra región geográfica se han reportado varios sitios caracterizados por altos niveles de arsénico, además del flúor, disueltos en el agua, producidos por la meteorización de rocas volcánicas y la presencia de aguas termales[51-53].

### 2.1.2. EL ARSÉNICO EN SISTEMAS ACUÁTICOS

En el agua de mar, la concentración de arsénico varía entre  $0.09 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $24 \mu\text{g L}^{-1}$  (en promedio  $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ ), en aguas dulces es entre  $0.15 \mu\text{g L}^{-1}$  y  $0.45 \mu\text{g L}^{-1}$  (máximo  $1 \text{mg L}^{-1}$ ). En aguas termales y minerales se encontró que el arsénico sobrepasa con un factor de 300 la concentración encontrada en el agua subterránea [23]. La toxicidad del arsénico depende del estado de oxidación, estructura química y solubilidad en el medio biológico en que se encuentre.

El arsénico está presente en los sistemas acuáticos debido a la disolución de minerales naturales, por la descarga de los efluentes industriales y la sedimentación atmosférica. En cuanto a los minerales, los de mayor distribución, son los que contienen el sulfuro de arsénico y arsenopirita. Las especies mayoritarias en aguas naturales son As (V) y As (III). Como ya fue descrito antes, en presencia de la actividad microbiana, los grupos hidroxilo en las especies inorgánicas pueden ser reemplazados por grupos metilo, formando las especies orgánicas DMAs (V) y MMAs (V). En algunos estudios se encontró que la biometilación ocurre de un pH 6.5 a pH 8.0, mientras que a  $\text{pH} < 5$  se reportó un decremento significativo en la biometilación [23].

Las tres especies reportadas en aguas naturales (As(III), As(V) y DMAs(V)) presentan los valores de  $\text{pK}_{a1}$  de 9.2, 2.2 y 6.3 respectivamente[23, 30]. La distribución de especies va a depender entonces del potencial redox y del pH del medio.

En la tabla 2.1 se presentan las constantes de disociación del ácido arsenioso ( $H_3AsO_3$ ), ácido arsénico ( $H_3AsO_4$ ) y ácido de dimetilarsénico (DMAs(V)) [23], mientras que en la figura 2.2 se muestra el diagrama de predominio de especies de  $H_3AsO_3$  y  $H_3AsO_4$  variando el pH del medio.

En concreto, en ausencia de los reductores fuertes en un sistema acuático, predomina el As(V), que se presenta como el ácido arsénico no disociado ( $H_3AsO_4$ ) a  $pH < 2$  y a pH menos ácidos se presenta en formas aniónicas [54].

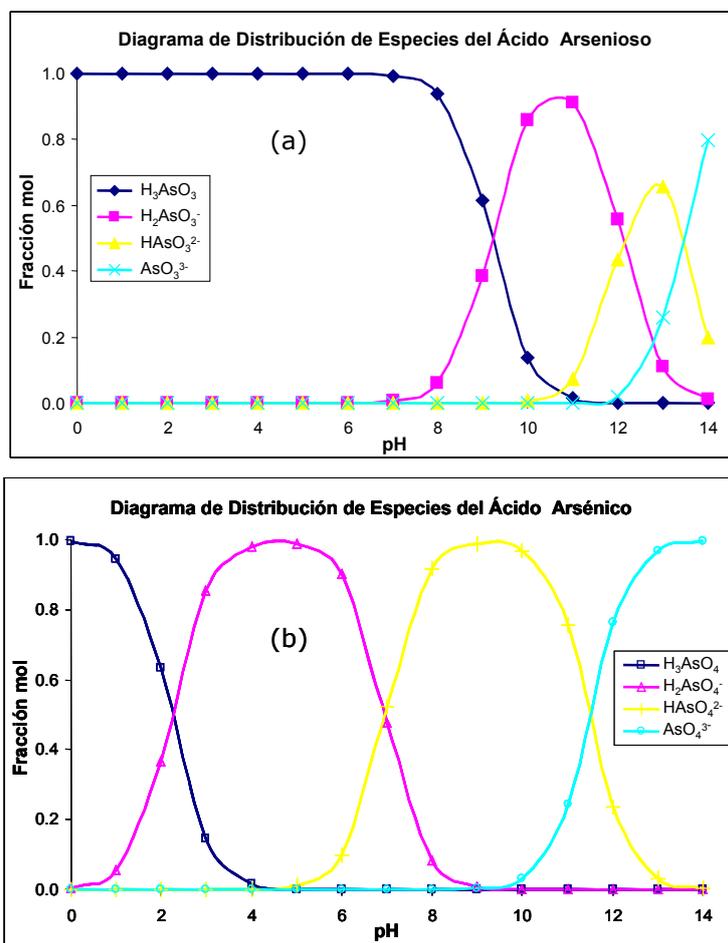
	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
$H_3AsO_3$	9.2	12.1	13.4
$H_3AsO_4$	2.2	7.0	11.5
DMAs(V)	6.3	-	-

**Tabla 2.1** Constantes de disociación de  $H_3AsO_3$ ,  $H_3AsO_4$  y ácido de dimetilarsénico (DMAs(V)) [23, 30].

Por otro lado, la contribución del ácido arsenioso aumenta en las condiciones anaerobias y en presencia de reductores. En este caso, a  $pH < 9$  predomina la especie no disociada y a pH más alcalinos se forman las especies aniónicas (figura 2.2). En el caso de DMAs(V), a pH neutro predomina la forma no-disociada ( $(CH_3)_2HAsO_2$ ) y, en altos valores de pH el ácido se disocia formando la especie aniónica ( $(CH_3)_2AsO_2^-$ ). Por otro lado, a pH bajos y en presencia de reductores fuertes, se pueden formar compuestos con azufre (por ejemplo  $HAsS_2$ ), la arsina y sus derivados, así como el arsénico elemental [48].

Debido a la potencial toxicidad de arsénico en sistemas acuáticos, es necesario llevar a cabo el control de sus niveles de concentración, enfocándose en la determinación total, así como en los análisis de especiación. Para ello, es necesario extremar precauciones en cada uno de las etapas del análisis para prevenir la contaminación de muestra y la conversión de las especies. La preservación de las especies es necesaria, ya que el As(III) se oxida rápidamente a As(V) [48].

Finalmente, varios organismos acuáticos tienen la capacidad de acumular arsénico y convertirlo en especies orgánicas, tal como se discutió en la sección anterior [48]. Cabe mencionar que, en los organismos vivos además de procesos de biometilación, el As (III) reacciona con el azufre y grupos sulfhidrilo, cisteína, ditioles orgánicos, proteínas y enzimas, pero no reacciona con grupos aminos u orgánicos o con constituyentes de nitrógeno reducidos. Por otra parte, el As (V) reacciona con grupos de nitrógeno reducido como las aminos pero no con los grupos sulfhidrilo[48].



**Figura 2.2** Diagrama de distribución de las especies del (a) ácido arsenioso y (b) ácido arsénico, variando los intervalos de pH en el medio.

### 2.1.3. PROCESOS DE REMOCIÓN DE ARSÉNICO EN AGUAS

En los casos de no-cumplimiento de aguas con la normatividad vigente para As, se requieren las acciones correctivas, es decir, la implementación de un sistema de tratamiento de la misma con el fin de eliminar el contaminante.

Para la remoción de As se han propuesto varios procedimientos, de los cuales el más común es el de coagulación/precipitación utilizando sales de aluminio o hierro. También están en uso los procedimientos basados en la ósmosis inversa, nanofiltración o biorremediación [55]. Para eliminar el arsénico, se han sugerido diferentes tipos de materiales adsorbentes tales como la alúmina activada, carbón activado, o hidróxido férrico. Además, como una alternativa interesante, se ha propuesto el uso de hierro elemental en forma de nanopartículas o polvo [29, 56, 57].

En la búsqueda bibliográfica se ha encontrado que las nanopartículas de hierro fueron empleadas satisfactoriamente en la remoción de contaminantes orgánicos e inorgánicos de soluciones acuosas entre los que destacan los organoclorados, pesticidas, metales pesados y aniones inorgánicos como el dicromato, arsénico, percloratos y nitratos[58] . En diversos estudios efectuados se ha encontrado que el Fe en polvo y nanopartículas tiene una alta capacidad de remoción para el arsénico, la cual depende de factores tales como: el tipo de material, la composición del agua a tratar, las concentraciones del arsénico iniciales y la especiación del arsénico[29, 37, 39, 58-60].

El enfoque original de este trabajo ha sido evaluar la remoción de las tres principales especies de As en soluciones acuosas estándar en presencia de: *i*) nanopartículas y *ii*) polvo de hierro. Para conocer la cinética de la remoción, se llevó a cabo el análisis de especiación acoplando la separación de especies por cromatografía de intercambio aniónico con ICP-MS como detector específico de elementos.

#### 2.1.4. PROCEDIMIENTOS DE ESPECIACIÓN ANALÍTICA DE ARSÉNICO EN MUESTRAS ACUOSAS

Debido a que la toxicidad del arsénico depende de su forma fisicoquímica actual, se han realizado un sin número de estudios enfocados en la separación/cuantificación de las especies de arsénico [50, 61]. En la mayoría de estos estudios, la separación se llevó a cabo mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)[48], utilizando como detector una de las técnicas de espectrometría atómica tales como la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), la absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS), la espectrometría de fluorescencia atómica (HG-AFS), espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) [29, 31, 48, 62-64] entre otros.

A pesar de la gran variedad de especies de As identificadas en la naturaleza, en aplicaciones enfocadas en el análisis de muestras provenientes de sistemas acuáticos, se reportan procedimientos capaces de separar/cuantificar un limitado número de especies; en particular As(III), As(V), MMAs(V), DMAs(V) y AsB (arsenobetaina). En muestras de aguas naturales, estas especies se reducen a As(III), As(V) y DMAs(V). Con base en la discusión presentada en secciones anteriores, dependiendo de las condiciones de pH, estas especies pueden ser sin carga, aniónicas o catiónicas, lo que hace posible la separación por intercambio aniónico, en fase inversa formando pares iónicos y, con menos aplicaciones, por cromatografía de intercambio catiónico[62]. En el caso de las columnas de intercambio aniónico, la separación se obtiene en la región de pH 5 hasta pH 11, típicamente con el orden de elución As(III), DMAs(V), As(V). Para formación de pares iónicos se ha utilizado preferentemente el ión tetrabutilamonio (pH 6 – 11), o a más bajos valores de pH (pH 2.7 – 4.5) los iones alquilsulfonados [12].

La información analítica obtenida en los procedimientos de especiación permite evaluar el grado de contaminación, con una mayor relevancia a los posibles riesgos relacionados con la presencia del As en el medio. En este estudio, se utilizó el procedimiento basado en la separación en la columna de intercambio aniónico con detección en línea por

ICP-MS para evaluar la remoción de tres especies de As de la solución acuosa en presencia de nanopartículas de hierro y hierro en polvo.

## **2.2. OBJETIVO PARTICULAR**

Evaluar la factibilidad de remoción de las principales especies de arsénico en aguas naturales mediante el uso de nanopartículas de hierro y hierro en polvo, empleando el procedimiento de especiación basado en la separación de As(III), As(V) y DMAs(V) por HPLC de intercambio aniónico y detección específica de As por ICP-MS.

## **2.3 MATERIALES Y METODOS**

### **2.3.1 Instrumentación**

Se utilizó el cromatógrafo líquido Hewlett-Packard (Waldrom, Germany) modelo 1050 con la columna para especiación de arsénico por intercambio aniónico, serie: BA02004, Agilent 63154-65001. Para obtener los perfiles de elución de arsénico en la separación cromatográfica, se utilizó el espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) modelo Agilent 7500ce, equipado con el nebulizador convencional tipo Meinhard, la cámara de niebla con enfriamiento (tipo Peltier, -2°C) y la celda de colisión / reacción con helio (pureza 99.999%).

### **2.3.2 Reactivos, disoluciones y muestras**

Los reactivos fueron del grado analítico y se utilizó el agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco). Las soluciones estándar de las tres especies de arsénico a una concentración de 1000 mgAs L<sup>-1</sup> se prepararon de la siguiente manera: la solución de As(III) se obtuvo por disolución de trióxido de arsénico (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Merck) en hidróxido de sodio 30 mM, las soluciones de As(V) y DMAs(V) a partir del arsenato monobásico de potasio (KH<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub>, Sigma) y del ácido dimetilarsénico (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>AsO<sub>2</sub>Na, Sigma) respectivamente, por disolución de

los compuestos en agua desionizada. Finalmente, todas las soluciones se ajustaron a pH 7.0 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 3mM.

Se utilizaron los siguientes reactivos: hidróxido de sodio (Fluka), ácido fosfórico (Aldrich), fosfato monobásico de sodio (Sigma), sal disódica de EDTA (Sigma), borohidruro de sodio (NaBH<sub>4</sub>, Sigma), cloruro ferroso (FeCl<sub>3</sub> x 6H<sub>2</sub>O, Sigma), etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, Fishes Scientific). El polvo de hierro (< 150 μm) fue de Riedel de Haen.

Las nanopartículas de hierro fueron obtenidas tal como se describe en la bibliografía [37, 65, 66]. En breve, a una solución de cloruro de hierro (III) 0.05 M se agrega gota por gota una solución de borohidruro de sodio (0.2 M) hasta lograr la relación de volúmenes 1:1. El Fe(III) es reducido por el borohidruro de acuerdo a la siguiente reacción:



*Nota:* Es necesario un exceso de borohidruro para acelerar la síntesis de reacción y el crecimiento uniforme de las nanopartículas de Fe<sup>0</sup> [58]

Posteriormente, se retira el sobrenadante, el residuo se lava dos veces con etanol y se seca en atmósfera de nitrógeno.

### 2.3.3 Procedimientos analíticos

#### 2.3.3.1 Especiación analítica de arsénico

Se llevaron a cabo los experimentos en un sistema de tipo batch cerrado, utilizando tubos de plástico falcón de 50 mL; para cada una de las tres especies, se prepararon tres soluciones (40 mL), cada una de 100 μgAs L<sup>-1</sup>. Una solución se dejó como el blanco, a la segunda se agregaron 30 mg de fierro en polvo y a la tercera 30 mg de nanopartículas de fierro. El mismo experimento se repitió con las soluciones conteniendo la mezcla de tres especies. Cada 15 min se tomó una muestra de 300 μL y se le agregó 50 μL de EDTA 0.05 mM para eliminar el exceso de iones de hierro.

Después, la alícuota fue centrifugada (10 min, 13000 x g) y el sobrenadante introducido al sistema HPLC-ICP-MS para el análisis de especiación de As. Las condiciones instrumentales y experimentales del procedimiento por HPLC - ICP-MS se presentan en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Condiciones instrumentales del sistema HPLC – ICP-MS en la especiación de arsénico en sistemas acuosos.

**HPLC-ICP-MS—Análisis de Especiación de Arsénico**

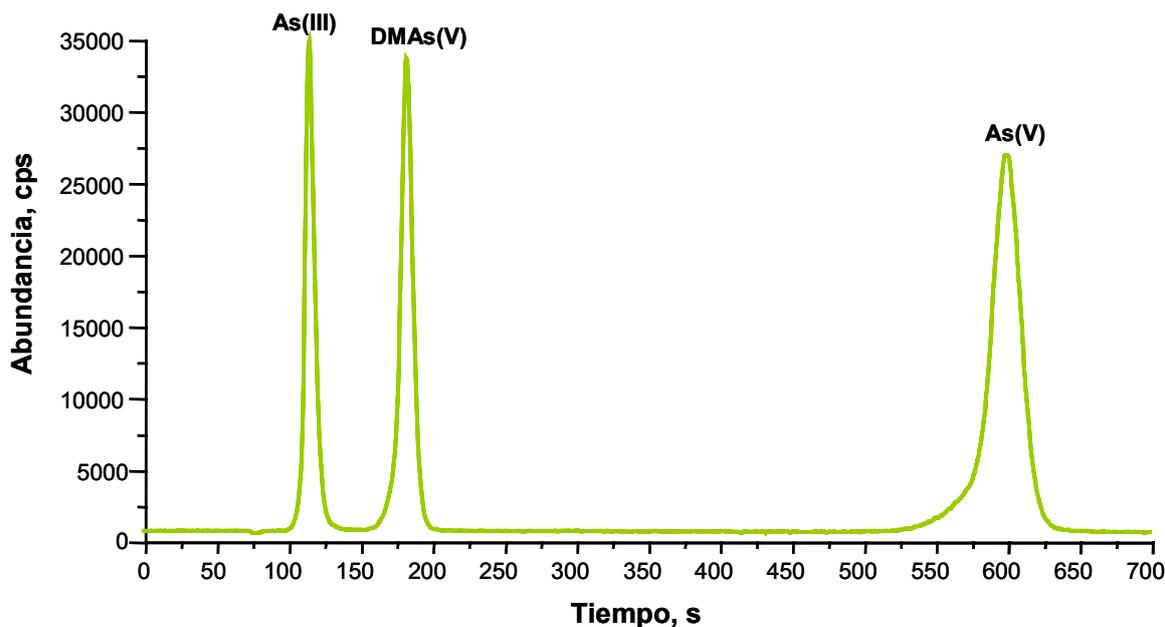
Columna	Intercambio aniónico, Agilent G3154-65001, Serial: BA02004
Fase móvil	0.2 mmol L <sup>-1</sup> EDTA, 2.0 mmol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 6.0.
Muestras estándar	100 µg L <sup>-1</sup> As(III), As(V) y DMAs(V).
Temperatura	Ambiente
Flujo	1.0 mL min <sup>-1</sup>
Volúmen inyectado	20 µL
Potencia	1500W
Gas nebulizador	0.65 mL min <sup>-1</sup>
Gas Make-up	0.12 mL min <sup>-1</sup>
Introducción de muestra	MiraMist Teflón® nebulizer
Conos muestra y skimmer	Níquel
Profundidad muestra	10mm
Isótopos monitoreados	<sup>75</sup> As
Modo de adquisición	Time-resolved analysis
Tiempo de integración	100ms

## 2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo del trabajo ha sido evaluar la eliminación de arsénico desde la solución acuosa en presencia de hierro elemental, dependiendo de la especiación del elemento. Por ello, en primer lugar se establecieron las condiciones de separación / detección por HPLC - ICP-MS. En la Figura 2.3 se muestra un cromatograma de una solución mixta de estándares de As(III) + DMAs(V) + As(V) con una concentración de 100 µgAs L<sup>-1</sup> cada uno. En este cromatograma se puede observar la separación de las tres especies hasta línea base, con los

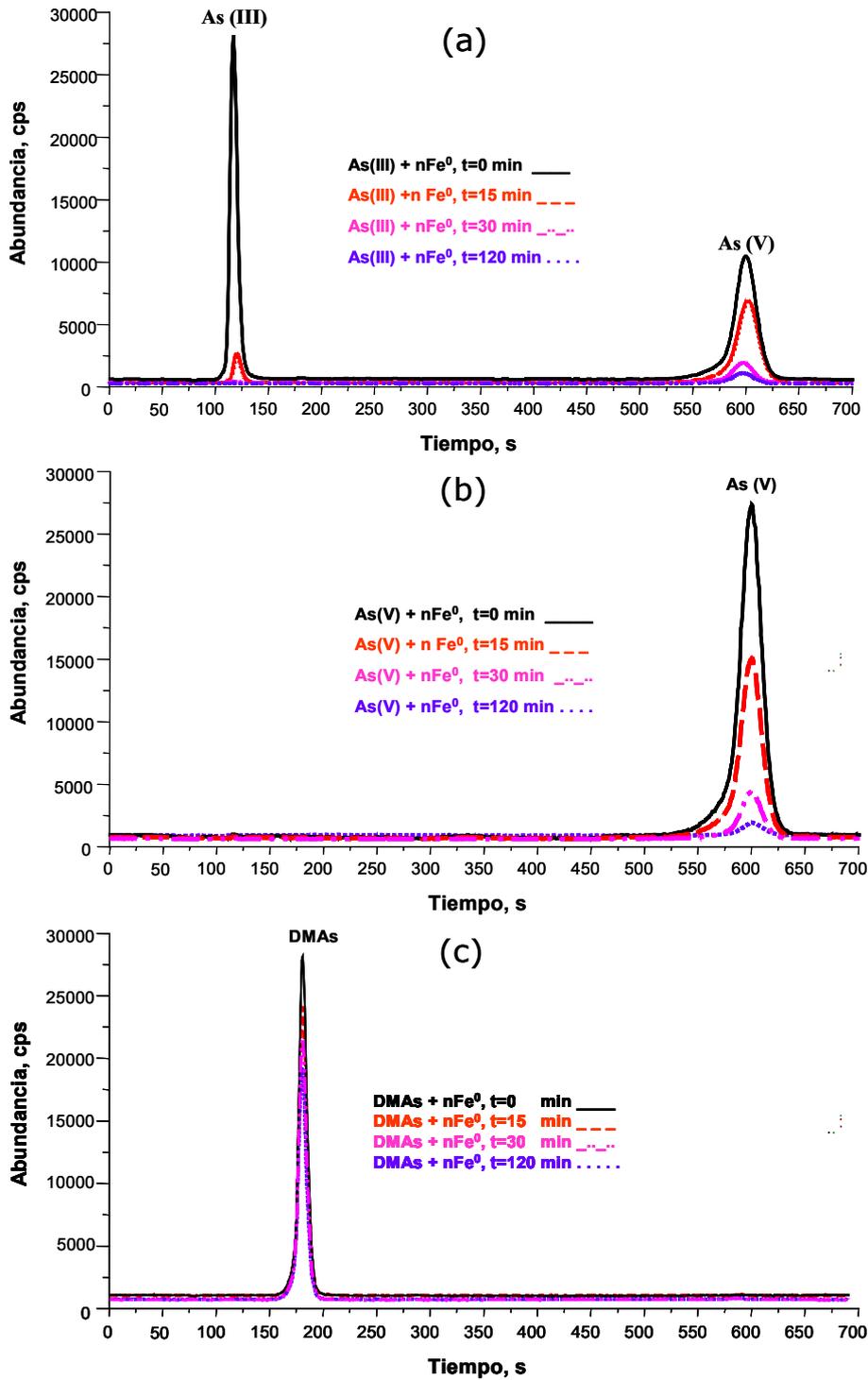
tiempos de retención de 2.0, 3.2 y 10.1 minutos para el As(III), DMAs(V) y As(V) respectivamente.

Por otro lado, se observa cierto ensanchamiento del pico cromatográfico de As(V), pero tomando en cuenta el área de los picos, se obtuvo la respuesta prácticamente idéntica para las tres especies de As.



**Figura 2.3** Ejemplo de cromatograma de estándares de As(III) + DMAs(V) + As(V) ( $100 \mu\text{gAs L}^{-1}$  cada uno), obtenido por HPLC-ICP-MS.

Una vez establecidas las condiciones analíticas, se llevaron a cabo los experimentos, donde cada una de las tres especies (As(III), As(V) y DMAs(V)) estaba en contacto con hierro en forma de polvo, o en forma de nanopartículas por un determinado intervalo de tiempo. Para evaluar posibles cambios en la concentración y en la especiación de As, se llevó a cabo el análisis por HPLC- ICP-MS. En la Figura 2.4 se presentan los cromatogramas obtenidos en el análisis de las soluciones de cada una de las especies, después de tiempo controlado de contacto con nanopartículas de hierro ( $n\text{Fe}^0$ ). Se puede observar que el As(III) y el As(V) prácticamente desaparecieron del medio después de 30 minutos de contacto, para el DMAs(V) también ocurrió la disminución de su concentración, pero menos notoria.



**Figura 2.4** Cromatogramas de las soluciones de las tres especies de As, después de 0, 15, 30 y 120 min de contacto con nanopartículas de hierro: (a) As(III), (b) As(V) y (c) DMAs(V).

En la Tabla 2.3 se presenta el porcentaje de eliminación de As en las soluciones que estaban en contacto con nanopartículas de  $Fe^0$ , donde se observa claramente la mejor cinética de eliminación para As(III).

**Tabla 2.3.** Eliminación de las especies de arsénico de las soluciones acuosas que contenían una sola especie en contacto con nanopartículas de  $Fe^0$ .

Tiempo (min) (min)	% de la concentración inicial ( $100 \mu\text{g As L}^{-1}$ )			
	<i>Estándar As(III)</i>		<i>Estándar As(V)</i>	<i>Estándar DMAs(V)</i>
	<i>As(III)</i>	<i>As(V)</i>		
0	$73 \pm 2.1$	$27 \pm 1.4$	$100 \pm 3.1$	$100 \pm 2.7$
15	$8 \pm 0.4$	$18 \pm 0.9$	$49 \pm 2.6$	$85 \pm 3.0$
30	No detectable	$6 \pm 0.3$	$8 \pm 0.7$	$76 \pm 3.4$
120	No detectable	$2 \pm 0.1$	$3 \pm 0.2$	$67 \pm 3.2$

En la Figura 2.5 se presentan los cromatogramas de las mismas soluciones, pero después del contacto con hierro en polvo (polvo  $Fe^0$ ). De manera general, en las dos figuras se observan similares cambios. Sin embargo, para el hierro en polvo, se observó una cinética menos favorable. Además, en el caso de As(III), a tiempos de contacto entre 0 y 60 min, se observó la conversión de As(III) a As(V) (comportamiento que también se presenta con las nanopartículas), seguida por la disminución paulatina de la concentración de As(V) y su desaparición del medio después de 22 hrs de contacto. Para el As(V) en contacto con  $Fe^0$  en polvo no se perciben cambios significativos durante la primera hora, empezando el decremento de su concentración a tiempos mayores, apreciándose un decrecimiento significativo en la magnitud del pico cromatográfico transcurridas las 22 horas. Por último, para el DMAs(V) +  $Fe^0$  en polvo, a diferencia de las otras dos especies, no se apreció cambio alguno, aún después de transcurridas las 22 hrs de contacto por lo que hace suponer que este requiere de mayor tiempo de contacto con el  $Fe^0$  en polvo para comenzar su remoción.

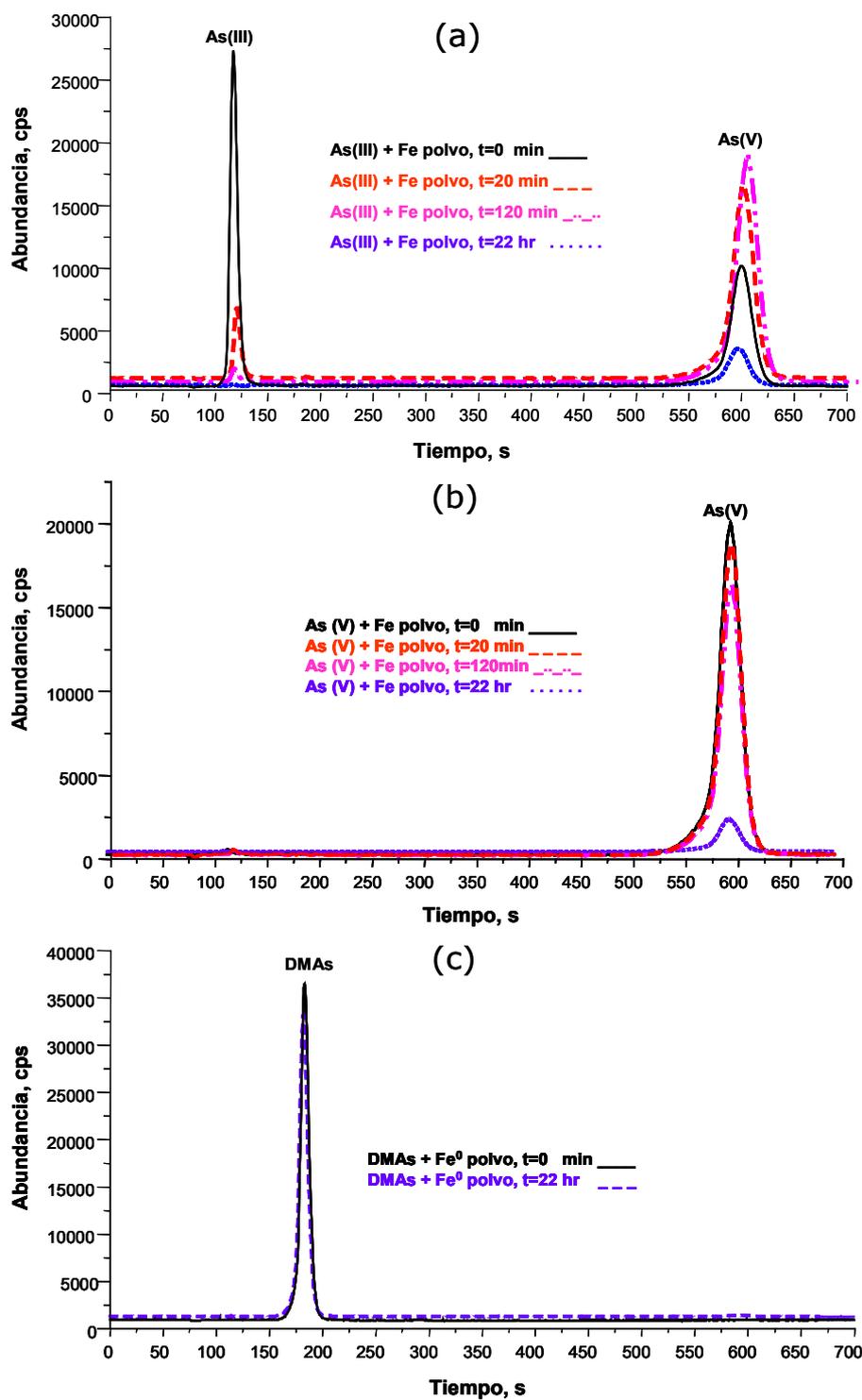


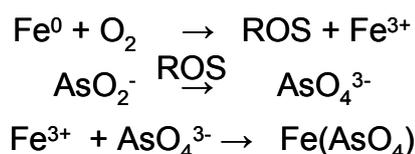
Figura 2.5. Cromatogramas de las soluciones de las tres especies de As, después de diferentes tiempos de contacto con hierro en polvo: (a) As(III), (b) As(V) y (c) DMAs(V).

Los resultados obtenidos indican la utilidad de hierro elemental para eliminación de las formas mayoritarias del As desde las soluciones acuosas, sin embargo la cinética y eficacia del proceso aparentemente depende de la especie actual del elemento.

**Tabla 2.4.** Eliminación de las especies de arsénico de las soluciones acuosas que contenían una sola especie en contacto con Fe<sup>0</sup> polvo.

Tiempo de contacto (min)	% de la concentración inicial (100 µg As L <sup>-1</sup> )			
	<i>Estándar As(III)</i>		<i>Estándar As(V)</i>	<i>Estándar DMAs(V)</i>
	<i>As(III)</i>	<i>As(V)</i>		
0	75 ± 2.1	25 ± 1.4	100 ± 3.2	100 ± 2.9
20	16 ± 0.4	41 ± 1.9	95 ± 2.6	100 ± 2.4
120	2 ± 0.1	48 ± 2.3	81 ± 3.7	99 ± 2.1
22 hr	No detectable	7 ± 0.3	9 ± 0.2	93 ± 2.2

Los resultados obtenidos en presencia de polvo de hierro parecen confirmar los reportes anteriores, donde se propone el siguiente mecanismo de eliminación de As(III)[58] :



(ROS se refiere a especies oxígeno reactivas (reactive oxygen species)).

A continuación, se llevó a cabo un experimento similar, poniendo en contacto la mezcla de las tres especies de As con hierro en polvo o nanopartículas de hierro. En la Figura 2.5 se presentan los cromatogramas obtenidos y en la Tabla 2.5 se resumen las áreas de los picos cromatográficos de las tres especies, obtenidos a diferentes tiempos de contacto de As con hierro.

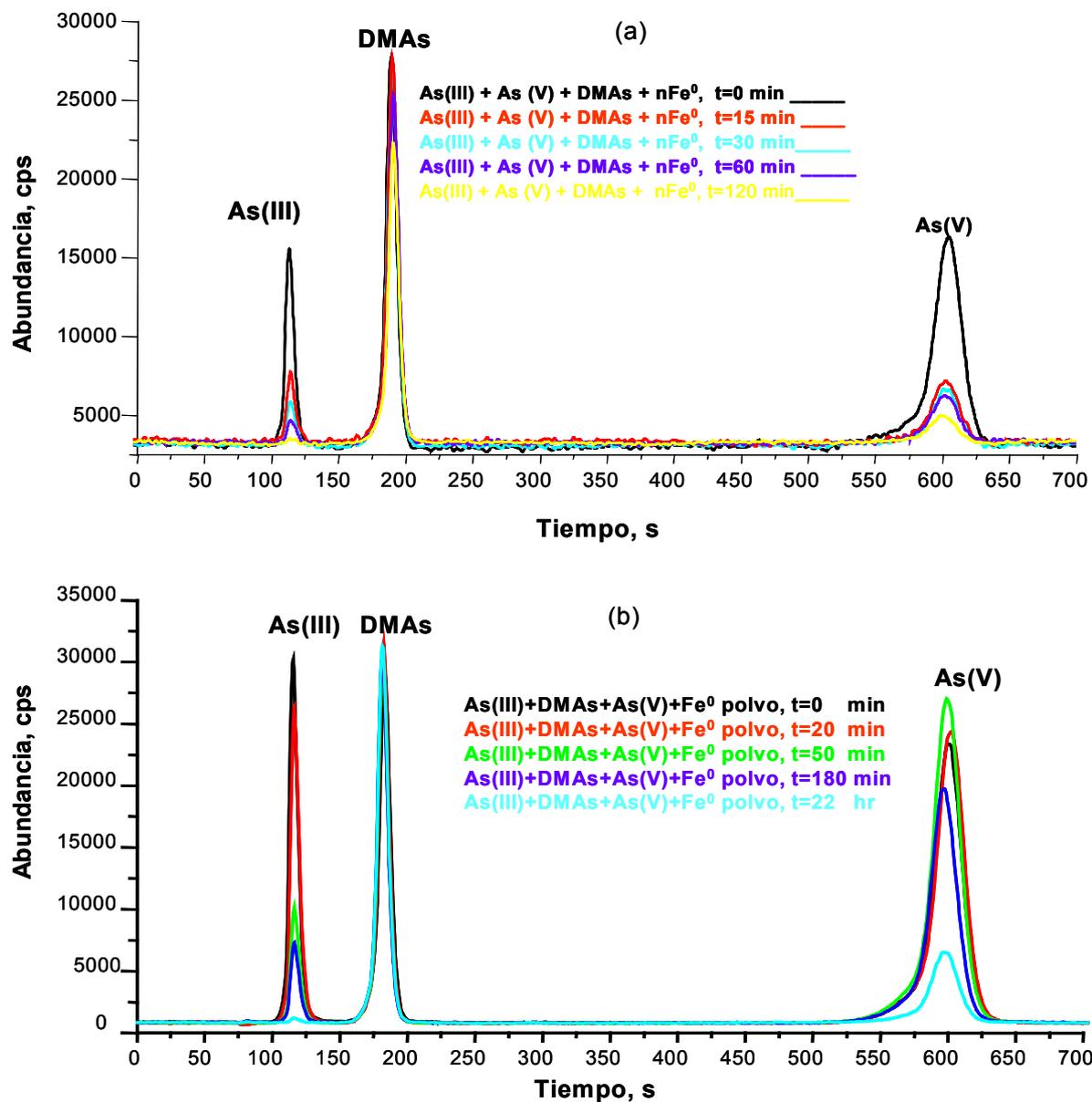
**Tabla 2.5** Cambios relativos en la distribución de las especies de As en la solución acuosa de las tres especies, con el creciente tiempo de contacto con hierro en polvo y con nanopartículas de hierro.

Sistema: As(III) + As(V) + DMAs + nFe <sup>0</sup>				Sistema: As(III) + As(V) + DMAs + Fe <sup>0</sup> polvo			
Tiempo de contacto (min)	% Areas			Tiempo de contacto (min)	% Areas		
	As (III)	DMAs(V)	As(V)		As (III)	DMAs(V)	As(V)
0	100	100	100	0	100	100	100
15	40	99	35	20	85	99	105
30	25	96	30	50	39	98	108
60	15	93	23	180	25	99	86
120	2	81	15	1320	nd	99	30

\*nd: no detectable

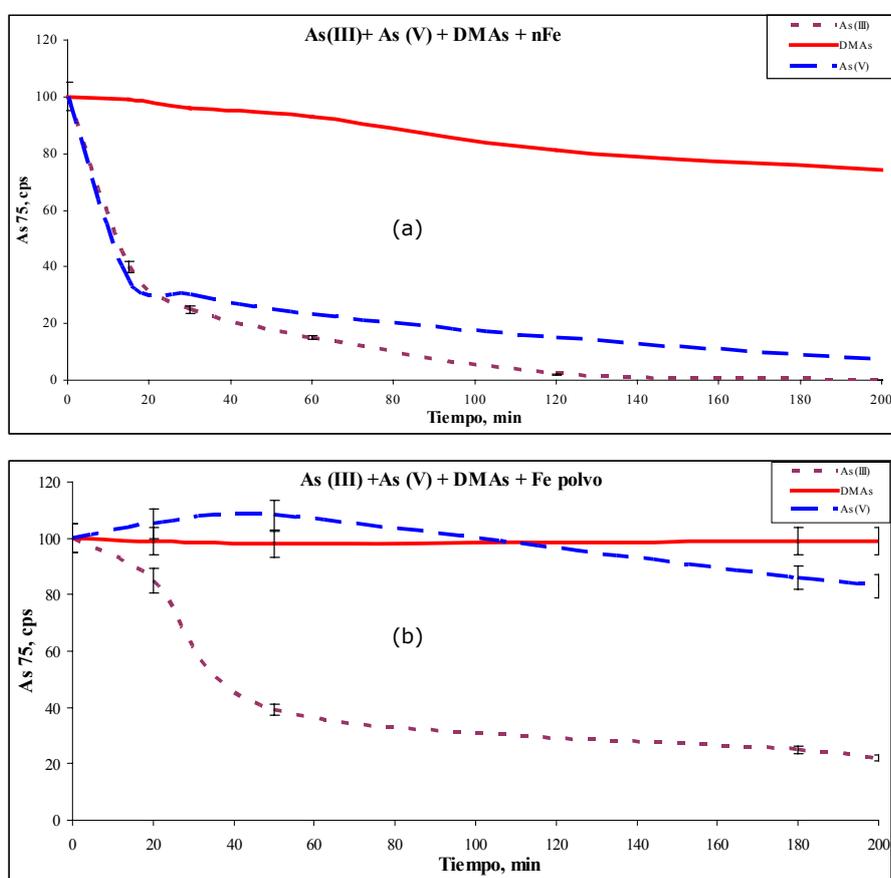
En la Tabla 2.5 y en la Figura 2.6 se observa claramente que, las dos formas de hierro elemental provocan una disminución de la concentración inicial de As(III) y de As(V) conforme aumenta el tiempo de contacto, obteniéndose mayores cambios en presencia de nFe<sup>0</sup> respecto a Fe<sup>0</sup> en polvo. Para mayor claridad, en la Figura 2.6 se presentan estos cambios gráficamente. En el caso de DMAs(V), no hubo cambios significativos en su concentración, lo que indica que el proceso de remoción depende de la forma del elemento y podría ser viable para las especies de As(III) y As(V).

Por otro lado, en primeras dos horas de contacto con Fe<sup>0</sup> en polvo se observó un decremento del As(III) y un incremento de As(V). A mayores tiempos de contacto, ocurrió la disminución paulatina de los picos cromatográficos correspondientes.



**Figura 2.6.** Cromatogramas obtenidos en el análisis de la solución mixta de las especies de arsénico (As(III) + As(V) + DMAs(V), cada uno con 100  $\mu\text{gAs L}^{-1}$ ) después de contacto con nanopartículas de hierro (a) y con hierro en polvo (b).

Similares resultados se obtuvieron en el análisis de las soluciones de los estándares individuales y en la mezcla de los estándares de las tres especies de As. Estos resultados parecen confirmar el mecanismo de remoción propuesto anteriormente y basado en la oxidación de As(III) a As(V) y su posterior precipitación en forma de arsenato de hierro ( $\text{Fe}(\text{AsO}_4)$ ) [23, 58]. Debido a la mayor toxicidad de las formas inorgánicas de arsénico respecto a sus formas orgánicas (DMAs(V)), los resultados preliminares sugieren que el uso de nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  podría ser una interesante alternativa para remoción de arsénico inorgánico de los sistemas acuáticos.



**Figura 2.7.** Cambios de área de picos cromatográficos de las tres especies en la solución mixta (As(III) + As(V) + DMAs(V)) conforme aumenta el tiempo de contacto con nanopartículas de hierro (a) y con hierro en polvo (b).

## 2.5. CONCLUSIONES

- 1) Se adaptó un procedimiento de especiación de As(III), As(V) y DMAs(V) por HPLC de intercambio aniónico con la detección por ICP-MS.
- 2) Con base en los resultados de especiación de As, se examinó la posibilidad del uso de  $\text{Fe}^0$  en polvo y  $n\text{Fe}^0$  para remoción de cada una de estas especies de las soluciones acuosas.
- 3) Los resultados indican que las dos formas de  $\text{Fe}^0$  provocan una disminución de la concentración inicial de las formas del arsénico conforme aumenta el tiempo de contacto, sin embargo se observaron mayores cambios en presencia de  $n\text{Fe}^0$  respecto a  $\text{Fe}^0$  en polvo.
- 4) Los resultados obtenidos en las soluciones de una sola especie demuestran que el proceso de remoción depende de la forma del elemento: la disminución de los niveles de As(III) y As(V) es relativamente rápida con ambas formas del  $\text{Fe}^0$ , mientras que para el DMAs(V) el  $\text{Fe}^0$  en polvo no tiene efecto significativo en las concentraciones.
- 5) Por otro lado, en el análisis de la solución de As(III), en las primeras dos horas de contacto con  $\text{Fe}^0$  en polvo y con nanopartículas, se observó un decremento del As(III) y un incremento de As(V). A mayores tiempos de contacto con  $\text{Fe}^0$ , se observó una disminución paulatina de los picos cromatográficos correspondientes. Resultados similares se obtuvieron en el análisis de la mezcla de estándares de tres especies de As. Estos resultados parecen confirmar el mecanismo de remoción propuesto anteriormente y basado en la oxidación de As(III) a As(V) y su posterior precipitación en forma de arsenato de hierro ( $\text{Fe}(\text{AsO}_4)$ )[23, 58]
- 6) Debido a la mayor toxicidad de las formas inorgánicas de arsénico respecto a sus formas orgánicas (DMAs(V)), los resultados preliminares sugieren que el uso de nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  podría ser una interesante alternativa para la remoción de arsénico inorgánico de los sistemas acuáticos.

## CAPITULO 3

# ESPECIACIÓN ANALÍTICA DE MERCURIO EN TEJIDO DE PESCADO MEDIANTE RP-HPLC Y DETECCIÓN POR ICP-MS CON $\text{Bi}^{3+}$ COMO ESTÁNDAR INTERNO

### 3.1. INTRODUCCIÓN

El mercurio es uno de los contaminantes medio ambientales con alto impacto en diferentes formas de vida. Es un metal que es líquido a temperatura ambiente. Su símbolo es Hg y su nombre deriva de la palabra griega “*hydrargyros*” que significa agua plateada. En la naturaleza, el mercurio se presenta en las formas orgánicas e inorgánicas. Como inorgánico, se encuentra principalmente como mercurio elemental y sales de  $\text{Hg}^{2+}$ , mientras que las especies orgánicas son los alquilcompuestos con cadenas cortas y largas de grupos alquilo y compuestos arilo [67].

Durante siglos, el mercurio ha sido utilizado por el hombre, causando las emisiones de diferentes formas del elemento al medio ambiente. La contaminación con mercurio puede ocurrir por las emisiones naturales, geoquímicas y/o antropogénicas[68]. 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[69]. En la actualidad las principales fuentes de contaminación de mercurio son las industrias de papel, agricultura y farmacéutica[70].

El mercurio elemental ( $\text{Hg}^0$ ) es transportado en forma gaseosa alrededor de la tierra, convirtiéndose en un contaminante global y lo podemos encontrar en el agua en su forma mayoritaria como mercurio iónico o inorgánico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) y sus sales (formando enlaces con  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{S}^{2-}$  y ácidos orgánicos) y el mercurio orgánico como metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) que se encuentran en pescado y mamíferos marinos [68, 71] y el uso de productos de cuidado personal y productos farmacéuticos y soluciones de limpieza para lentes de contacto que pueden contener etilmercurio ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$ )[68]. 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 de estos[68, 69].

Desde el momento en que el  $\text{Hg}^0$  es inhalado, este es rápidamente oxidado por la corriente sanguínea a  $\text{Hg}^{2+}$  (el cual exhibe un diferente grado de toxicidad) y subsecuentemente debido a la actividad microbiana en procesos de alquilación pueden producir el metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) la cual es una de las especies de mercurio más tóxicas [72]. Muchos compuestos derivados del mercurio inorgánico son nefrotóxicos, es decir, pueden llegar a ser venenosos o alterar el buen funcionamiento de los riñones; comparado con el metil mercurio (donde la mayoría de los compuestos órgano-mercuriales son neurotóxicos, es decir, que pueden alterar el sistema nervioso)[71]

### 3.1.1. TOXICIDAD DEL MERCURIO

La toxicidad, el proceso bioquímico y la biodisponibilidad del mercurio dependen significativamente de la forma fisicoquímica del elemento, presente en el medio de estudio[73]. Las diferentes especies de mercurio tienen diferentes efectos toxicológicos y por tanto distintas rutas de detoxificación en el cuerpo humano. Así, el  $\text{Hg}^0$  puede penetrar dentro de las células donde posteriormente se oxida produciendo las formas de  $\text{Hg}^{2+}$ , provocando daños en el riñón [68]. Por otro lado, el monometilmercurio se absorbe fácilmente en el tracto gastrointestinal y subsiguientemente ser distribuido entre varios de los tejidos corporales, incluyendo el cerebro, a través del sistema de transporte de aminoácidos neutrales, induciendo daño a las células neuronales[68, 72]. Las formas más tóxicas y abundantes de mercurio en el medio ambiente se encuentran como metilmercurio. Este compuesto afecta potencialmente a la salud humana, observándose su toxicidad por vez primera en los años 50's en la Bahía de Minamata en Japón, donde los habitantes consumían pescado contaminado con metilmercurio[74].

A través de las emisiones antropogénicas la mayoría de las especies alquil-mercurio son generalmente pequeñas, mientras que el metilmercurio, a diferencia de los otros alquil-mercurio, puede ser formado naturalmente por el proceso de biometilación como resultado de la actividad microbiana al interactuar con el mercurio inorgánico en sistemas acuáticos y que posteriormente se bioacumula en la cadena alimenticia[74].

Es relevante que, mediante los procesos de biometilación, propios de la actividad microbiana, las formas de mercurio elemental e inorgánico se convierten en especies metiladas, que presentan una mayor toxicidad [7, 72]. Actualmente es aceptado que el grado de metilación de  $\text{Hg}^{2+}$  en agua y sedimentos depende en gran medida de factores como: tipo de compuesto de  $\text{Hg}^{2+}$  (el acetato de mercurio es más fácil de metilar que el cloruro de mercurio), el agente metilante, la composición química del sedimento, la concentración de oxígeno y la variación de pH [70].

En particular, la toxicidad de metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) esta 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, riñón, cerebro) [72, 73, 75]. El monitoreo de  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  en el ambiente y en muestras biomédicas es fundamental para poder determinar el grado de contaminación y su impacto para la salud humana [72].

Consecuentemente, cuando se pretende evaluar el riesgo para la salud relacionado con la presencia de mercurio en medio ambiente, es necesario caracterizar cuantitativamente la distribución del elemento entre sus diferentes especies, es decir, llevar a cabo el análisis de especiación [76]. Las muestras de interés incluyen aguas naturales, suelos, lodos, diferentes tipos de organismos marinos y también muestras clínicas. En el caso de muestras biológicas, típicamente se determinan dos especies:  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ . La parte importante del procedimiento analítico es lograr un alto rendimiento en la extracción de mercurio sin afectar su especiación nativa. Una vez, teniendo las especies de mercurio en la solución, es necesario llevar a cabo su separación y cuantificación, típicamente por una de las técnicas híbridas.

El mercurio inorgánico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) y el metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) son las especies primarias de este elemento y se encuentran principalmente en pescado y otros organismos marinos los cuales se convierten en la principal 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 mercuriales; diferentes agencias gubernamentales han establecido concentraciones aceptables de mercurio en productos de

comestibles marinos y derivados [77]. En particular, la US Food and Drug Administration (FDA) ha regulado el nivel de concentración permitida en pescado a  $1\text{ mg kg}^{-1}$  de masa fresca [78].

De acuerdo con esto, existe una fuerte demanda por metodologías analíticas completas 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.

### **3.1.2. ESPECIACIÓN DE MERCURIO**

Cuando se pretende evaluar el riesgo para la salud relacionado con la presencia de mercurio en medio ambiente, es necesario caracterizar cuantitativamente la distribución del elemento entre sus diferentes especies, es decir, llevar a cabo el análisis de especiación. Debido a diferente polaridad de mercurio inorgánico y metilmercurio, resulta difícil encontrar las condiciones de extracción adecuadas para ambas especies. Varios estudios han sido enfocados en la optimización del proceso de pre-tratamiento de muestra [69, 79].

En el caso de la extracción líquido – líquido del tejido de pescado, se han utilizado como extractantes diferentes mezclas de metanol – hidróxido de tetrametilamonio, metanol - hidróxido de potasio, ácido acético, ácido nítrico, ácido clorhídrico, adicionando en algunos casos la cisteína o el mercaptoetanol [80-84]. En varios estudios, la extracción fue asistida por la energía de microondas o por el proceso de sonificación [85, 86]. Los problemas reportados frecuentemente han sido, incompleta extracción o inter-conversión de las especies [79, 87].

En la actualidad el desarrollo del análisis de especiación tiene una preferencia hacia el uso de la separación mediante cromatografía de líquidos acoplado a un detector específico de elementos [76, 81, 88]. En cuanto a la etapa de separación y cuantificación de las especies, se han reportado diferentes procedimientos basados en el acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la detección específica de mercurio por ICP-MS [80, 82, 84, 86, 89].

Se han utilizado las columnas de fase inversa con las fases móviles con un agente acomplejante o de carácter de un par iónico (pirolidinoditiocarbamato de sodio, cisteína, 2-mercaptoetanol, pentasulfonato de amonio, acetato de amonio, etc.) [80-83].

Finalmente, existe una clara preferencia de utilizar ICP-MS como detector específico de elementos, debido a su fácil acoplamiento con diferentes tipos de cromatografía y las siguientes características: (i) capacidad del análisis multielemental e isotópico, (ii) excepcionalmente bajos límites de detección para la mayoría de los elementos incluyendo los metaloides y algunos no-metales (en el intervalo de concentraciones desde pocas partes por trillón hasta partes por billón); (iii) amplio rango dinámico (típicamente del orden de 8 órdenes de magnitud de las concentraciones); (iv) muy pocas interferencias y, en consecuencia (v) alta precisión y exactitud de los resultados analíticos [30].

En el presente trabajo se desarrolla un nuevo procedimiento de especiación de mercurio en tejido de pescado. La novedad consiste en el diseño de pre-tratamiento de muestra y en el empleo de  $\text{Bi}^{3+}$  como estándar interno (EI). En concreto, después de agregar el estándar interno (nitrato de bismuto), la extracción de especies de mercurio se lleva a cabo mediante la homogenización del tejido en presencia de ácido perclórico, la mezcla tolueno/metanol y cisteína. Posteriormente, se elimina el exceso de ácido (precipitación de perclorato de potasio) con hidróxido de potasio y la separación / cuantificación de las especies se obtiene por la cromatografía de líquidos en fase inversa y detección por ICP-MS. Los resultados obtenidos demuestran un mejor rendimiento de extracción de mercurio respecto a extracción con el ácido clorhídrico [74, 81, 84]. Por otra parte, el uso de ión bismuto como EI permite reducir diferentes fuentes de errores analíticos, aumentando de esta manera la precisión y exactitud de los resultados.

### **3.2. OBJETIVO PARTICULAR**

Desarrollar un nuevo procedimiento para la especiación de mercurio inorgánico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) y metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) en tejido de pescado fresco, asegurando un buen rendimiento de extracción de las dos especies y su separación/cuantificación por cromatografía de líquidos en fase inversa, acoplada a ICP-MS como detector específico de elementos y usando el  $\text{Bi}^{3+}$  como estándar interno.

### **3.3. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.3.1 Instrumentación**

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de Agilent serie 1200 y la columna efluente fue introducida al sistema de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) vía tubería de Teflón de corta longitud.

La columna analítica fue Gemini C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm) de Phenomenex. Para obtener los perfiles de elución de mercurio en la separación cromatográfica, se utilizó el espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) 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 con enfriamiento 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 µg L<sup>-1</sup> cada uno. Un homogenizador de alta velocidad tipo Ultra-Turrax T25 y un baño de ultrasonido modelo 8892 de Cole Palmer fueron usados para la homogenización de las muestras.

Las condiciones de operación instrumental para el ICP-MS y el sistema cromatográfico se presentan en la Tabla 3.1.

#### **3.3.2 Reactivos, disoluciones y muestras**

Los reactivos fueron del grado analítico, se utilizó el agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco, USA) metanol de grado HPLC y tolueno de grado analítico (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA). Las soluciones estándar de las dos especies de mercurio a una concentración de 1000 mgHg L<sup>-1</sup> se prepararon disolviendo yoduro de metilmercurio (CH<sub>3</sub>HgI, Sigma) en metanol y cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>, Sigma) en ácido nítrico al 1 % y se almacenaron en frascos ámbar a 4°C.

La solución patrón del estándar interno ( $1000 \text{ mgBi L}^{-1}$ ) fue preparada por disolución de nitrato de bismuto (Sigma) en 1% de ácido nítrico. Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas diariamente a la dilución apropiada.

Se utilizaron los siguientes reactivos: ácido perclórico (Baker), ácido fosfórico (Aldrich), ácido nítrico (Fluka), ácido clorhídrico (Merck), L-cisteína (Sigma), fosfato de amonio dibásico (Sigma), trietilamina (Fluka), hidróxido de potasio (Sigma) y hidróxido de sodio (Fluka), peróxido de hidrógeno (Sigma).

Se analizaron dos tipos de tejidos de pescado: hígado de sierra y músculo de huachinango provenientes, del estado de Tabasco, ubicado en el Golfo de México.

**Tabla 3.1** Condiciones instrumentales del sistema HPLC-ICP-MS para la especiación de mercurio en tejido fresco de pescado.

***ICP-MS — Determinación de mercurio total***

Potencia	1500W
Gas nebulizador	$0.9 \text{ mL min}^{-1}$
Gas make-up	$0.12 \text{ mL min}^{-1}$
Introducción de muestra	Meinhard nebulizer
Conos muestra y skimmer	Nickel
Profundidad muestra	10mm
Isótopos monitoreados	$^{202}\text{Hg}$ , $^{200}\text{Hg}$ , $^{209}\text{Bi}$
Modo de adquisición	Spectrum analysis
Tiempo de integración	100ms

***HPLC-ICP-MS—Análisis de especiación de mercurio***

Columna	Gemini C18 (150mm×3mm, 5 $\mu\text{m}$ )
Fase móvil	$2.5 \text{ mmol L}^{-1}$ L-cisteína, $12.5 \text{ mmol L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 0.05% trietilamina, pH 7.0:metanol (96:4)
Temperatura	Ambiente
Flujo	$0.6 \text{ mL min}^{-1}$
Volúmen inyectado	20 $\mu\text{L}$
Potencia	1500W
Gas nebulizador	$0.9 \text{ mL min}^{-1}$
Gas Make-up	$0.12 \text{ mL min}^{-1}$
Introducción de muestra	MiraMist Teflón® nebulizer
Conos muestra y skimmer	Níquel
Profundidad muestra	10mm
Isótopos monitoreados	$^{202}\text{Hg}$ , $^{200}\text{Hg}$ , $^{209}\text{Bi}$
Modo de adquisición	Time-resolved analysis
Tiempo de integración	60ms

### 3.3.3 Procedimientos analíticos

Cada análisis se llevó a cabo por triplicado y en paralelo se corrió el blanco. Para asegurar la representatividad de las submuestras, el tejido de pescado fue cortado en pedazos pequeños y congelado / descongelado varias veces [84].

#### 3.3.3.1 Determinación de mercurio total

El procedimiento de digestión reportado en la literatura fue cambiado ligeramente [69]. En breve, se pesaron cinco alícuotas de 0.4 a 0.5g de tejido fresco, estas se colocaron en viales de digestión de 8 ml; 100  $\mu\text{L}$  de la solución de estándar interno ( $1000 \mu\text{gBi L}^{-1}$ ) y 3 mL de ácido nítrico 1:1 v/v fueron añadidos y los viales fueron entonces cerrados. Las muestras fueron calentadas en un bloque de calentamiento a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 12 h, se dejaron enfriar y posteriormente se añadió 1 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a todas las muestras y se calentaron nuevamente a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 1 h. Una vez transcurrido este tiempo de calentamiento, las muestras se dejaron enfriar nuevamente y finalmente fueron diluidas a 20 mL con agua desionizada, centrifugadas ( $10,000 \times g$ , 10 min) y los sobrenadantes introducidos a ICP-MS para la determinación de Hg.

Alternativamente, una porción de tejido fresco (10g) fue secado durante 48 hr a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  [69, 90] y posteriormente homogenizado. Cinco alícuotas de 0.2 g fueron pesadas para la determinación de mercurio total como fue descrito arriba. El contenido de humedad fue determinado por la diferencia entre las masas de las muestras de los tejidos en fresco y seco (5 replicas de 1g de tejido fresco, estas muestras no fueron empleadas para el análisis de mercurio). Para la calibración externa las soluciones contenían 0; 0.2; 1.0; 5.0; 10; 25  $\mu\text{gHg L}^{-1}$  de los estándar de mercurio inorgánico y  $5.0 \mu\text{gBi L}^{-1}$  como IS.

### 3.3.3.2 Especiación analítica de mercurio

Para el procedimiento analítico de especiación del mercurio se pesaron cinco alícuotas de 0.4 a 0.5 g de tejido fresco en tubos de plástico (Falcón de 15mL), 125  $\mu\text{L}$  de estándar interno ( $1000 \mu\text{gBi}^{3+} \text{L}^{-1}$ ) fueron adicionados y se procedió a su homogenización (politrón), en presencia de ácido perclórico ( $1.5\text{mL}$ ,  $0.6\text{mol L}^{-1}$ ), L-cisteína ( $500 \mu\text{L}$   $0.75 \text{mol L}^{-1}$ ) y  $500 \mu\text{L}$  de la mezcla tolueno:metanol (1:1) de 0.5 a 2 minutos, dependiendo de la muestra. Las mezclas fueron colocadas en el baño de ultrasonido por 1 h, centrifugadas durante 10 min a  $10000 \times g$  y se tomaron  $1000 \mu\text{L}$  de la fase acuosa a la cual se le agregaron  $70 \mu\text{L}$  de hidróxido de potasio  $9 \text{mol L}^{-1}$  para neutralizar el exceso ácido perclórico y  $10 \mu\text{L}$  de ácido acético para ajustar a un pH 5. Nuevamente, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min  $10000 \times g$ . Después de la centrifugación, el sobrenadante se diluyó con la fase móvil (1:1) y se introdujeron al sistema HPLC – ICP-MS.

Las condiciones de separación y detección se resumen en la Tabla 3.1. Los tejidos secos (0.2g) fueron analizados utilizando el mismo procedimiento. La calibración externa fue desarrollada mediante una serie de soluciones estándares que contenían  $\text{Hg}^+$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  en concentraciones de 0, 5, 10, 25 y  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de mercurio cada uno y  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Bi}^{3+}$  como estándar interno.

Para los experimentos de recuperación, una de las especies mercuriales ( $\text{Hg}^+$  o  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) fue añadida al tejido fresco en concentraciones de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  y  $200 \mu\text{g kg}^{-1}$  de Hg, conjuntamente con el EI. Estas mismas concentraciones fueron usadas para el método de adición de estándar, sin embargo, para este caso las dos especies de mercurio ( $\text{Hg}^+$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) fueron añadidas a la muestra en forma simultánea. El blanco siempre se corrió paralelamente con las muestras.

Para fines comparativos, se llevó a cabo la extracción de especies de mercurio con  $\text{HCl}$   $5 \text{mol L}^{-1}$  [74, 84, 86, 89]. El procedimiento de extracción de mercurio con  $\text{HCl}$  fue desarrollado de la siguiente manera: a una alícuota de tejido (0.4 a 0.5 g) se agregaron 2.5 mL de ácido, se llevó a cabo la homogenización (politrón) y la mezcla fue colocada en el baño de ultrasonido durante 1 h.

Después de la centrifugación (10000 x g, 10 min), a 1000 µL de sobrenadante se agregaron 250 µL de NaOH 10 M, se centrifugó otra vez y, después de una dilución 1:1 con la fase móvil, la muestra fue introducida al sistema HPLC- ICP-MS.

### 3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue, en primer lugar obtener un buen rendimiento de extracción de las dos especies de mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) de tejido de pescado, cabe mencionar que los niveles de concentración de  $\text{Hg}^{2+}$  en organismos marinos son significativamente mas bajos que los detectados para  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  y la mayoría de los materiales de referencia disponibles están certificados para mercurio total y/o  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , pero no para  $\text{Hg}^{2+}$ . En segundo lugar utilizar el método de estándar interno (EI) con el fin de controlar diferentes fuentes de errores analíticos cometidos durante el procedimiento analítico. En este trabajo se utilizo el  $\text{Bi}^{3+}$  como EI para mejorar relativamente la poca fiabilidad en los resultados obtenidos para  $\text{Hg}^{2+}$  que ha sido observada en diferentes estudios y que se ha atribuido a bajas concentraciones, valores no certificados y alto grado de incertidumbre en los resultados analíticos[81, 91, 92]. Además, el  $^{209}\text{Bi}$  es uno de los EI con alta masa isotópica, que es recomendado por la USEPA en el método 6020A y en otras aplicaciones. Considerando los requerimientos generales, el  $^{209}\text{Bi}$  y el  $\text{Hg}^{2+}$  tienen masas isotópicas muy cercanas, sin embargo su potencial de ionización (7.3 eV) es mas bajo que el de mercurio (10.4eV).

Otro elemento que se ha propuesto como buen par para el mercurio es el platino, pero en este trabajo no se utilizo este debido a su baja afinidad por los grupos tioles. Finalmente, en este experimento se verifico que los niveles de concentración natural de Bi en tejido de pescado están por debajo del limite de detección ( $<0.05\mu\text{g L}^{-1}$  en las muestras mineralizadas).

Por otro lado, la idea original consistió en utilizar en la etapa de homogenización/ extracción el ácido perclórico, tolueno y L-cisteína. En presencia de ácido perclórico (en una concentración final de  $0.4\text{ mol L}^{-1}$ ) para obtener la desnaturalización y precipitación de

proteínas [30], mientras que la adición de tolueno ayuda a destruir las estructuras lipídicas (micelas, vesículas, etc.) [93] cuya presencia puede afectar el rendimiento de la extracción de metilmercurio. La L-cisteína es necesaria para acomplejar  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  formando los compuestos solubles en agua [71, 81, 88, 94].

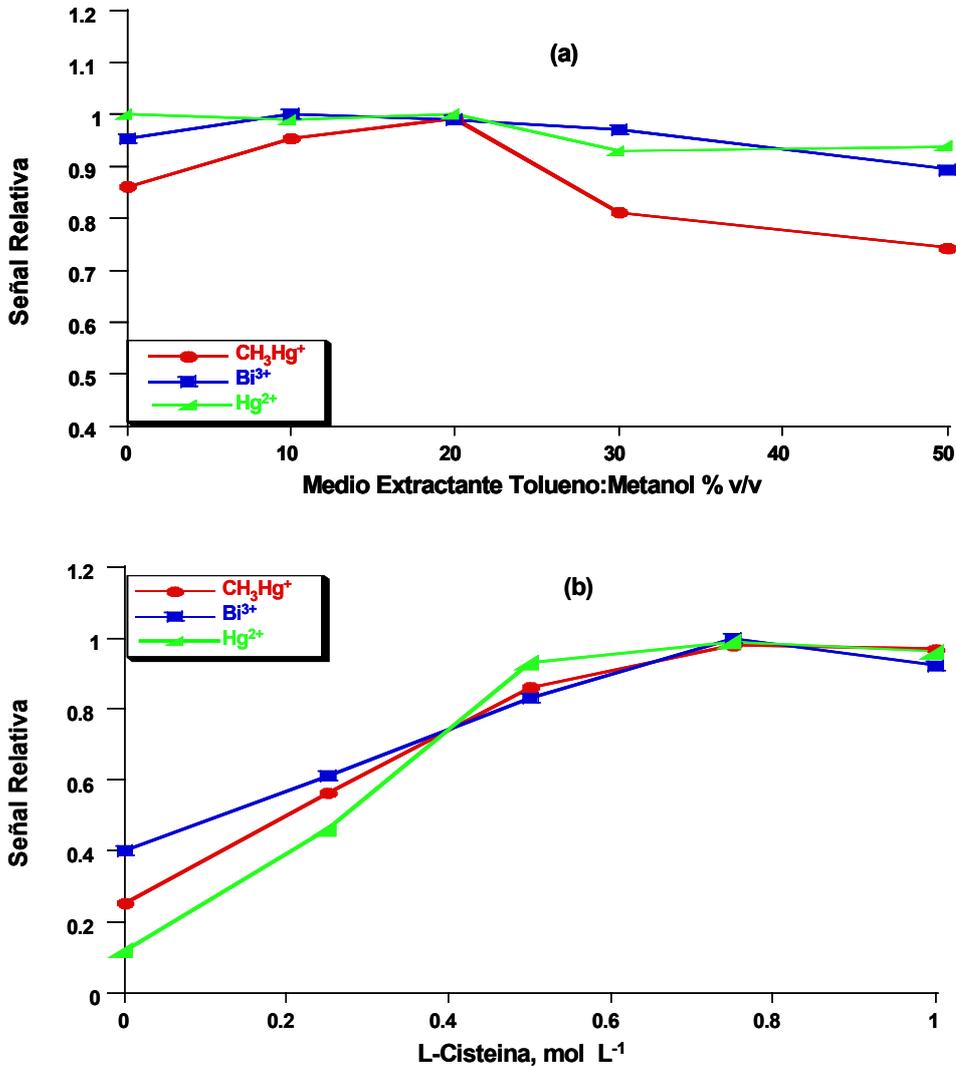
En cuanto al EI, se optó por el ión bismuto debido a su afinidad a los grupos sulfhídrido de la cisteína (similar a la del mercurio) y debido a su ausencia en la muestra original (se verificó experimentalmente).

Con el diseño propuesto, en el tratamiento de muestra se obtienen tres fases: (1) el precipitado de proteínas, (2) la fase orgánica (principalmente tolueno) que contiene lípidos y (3) la fase acuosa (con metanol) en la que se encuentran disueltos los complejos de las especies de mercurio y del bismuto con L-cisteína. 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 rendimiento de extracción, medición de volúmenes, imprecisiones en la interfase HPLC-ICP-MS, etc.

En la primera etapa del estudio, se examinó el efecto de la L-cisteína y del tolueno en la extracción de las dos especies de mercurio en tejido fresco. En estos experimentos se utilizó el mismo tejido de pescado y el procedimiento descrito en la sección anterior, variando sin embargo, la concentración de L-cisteína, o el porcentaje de la mezcla de tolueno:metanol. Los resultados obtenidos se presentan en la Fig. 3.1. Como se puede observar, el mayor porcentaje de extracción de las dos especies (con base al área de los picos cromatográficos) se obtuvo en presencia de 20 % (v/v) de la mezcla tolueno/metanol (1:1) como medio extractante (Fig. 3.1a) y en presencia de  $0.75 \text{ mol L}^{-1}$  de L-cisteína (Fig. 3.1b).

En la selección de las condiciones de separación cromatográfica se tomaron en cuenta dos aspectos: (1) la resolución 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 la 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 bajo 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.



**Figura 3.1.** Efecto del porcentaje de (a) tolueno/metanol y (b) de la concentración de cisteína sobre la señal analítica del bismuto (  $\blacksquare$  ), mercurio inorgánico (  $\blacktriangle$  ) y metilmercurio (  $\bullet$  ) obtenidos por HPLC-ICP-MS.

En la Figura 3.2 se presenta como ejemplo un cromatograma obtenido en el análisis de la solución estándar de las dos especies ( $10 \mu\text{gHg L}^{-1}$  de cada una) con EI. El tiempo total de separación en línea de las especies se obtuvo en 3.0 minutos, el cual se comparó con los resultados obtenidos por otros autores [71, 81]. Los tiempos de retención obtenidos fueron mercurio inorgánico  $1.31 \pm 0.02$  y metilmercurio  $2.06 \pm 0.03$  min ( $n=5$ ) respectivamente. La elución de bismuto fue con el tiempo de retención  $1.31 \pm 0.02$  min. La co-elución de bismuto y de mercurio inorgánico indica muy similar comportamiento en la columna, lo cual confirma la formación de complejos de  $\text{Bi}^{3+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  con L-cisteína, asegurando la función adecuada del EI en la especiación de mercurio por HPLC-ICP-MS.

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

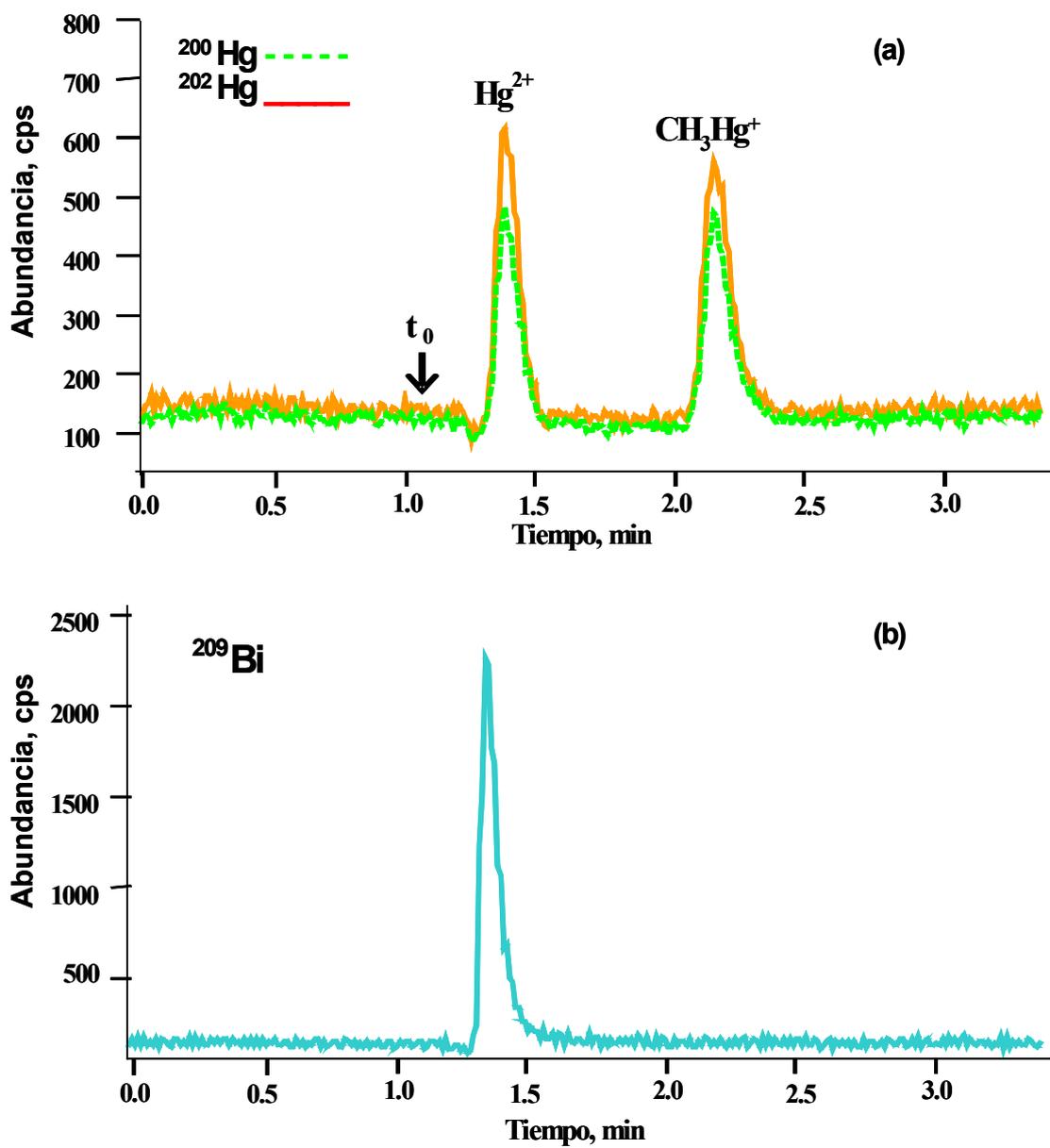


Figura 3.2 Ejemplo de cromatograma obtenido en el análisis de una solución estándar: (a) de las dos especies ( cada una  $10\mu\text{gHg L}^{-1}$ ) y (b) con EI ( $10\mu\text{gBi L}^{-1}$ ).

En Tabla 3.2 se comparan los parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración con y sin EI. En la cuantificación sin EI, la señal analítica fue el área del pico cromatográfico de la especie de Hg; y en el método con EI la señal analítica se definió como relación entre áreas de los picos cromatográficos de las especies de Hg respecto al Bi. Se puede observar, que el uso de EI permite mejorar todos los parámetros relacionados con la precisión de la determinación (ES - error estándar del intercepto y de la pendiente, CV - coeficientes de variación evaluados con cinco inyecciones repetitivas de las soluciones estándar conteniendo  $10 \mu\text{gHg L}^{-1}$  de cada una de las especies).

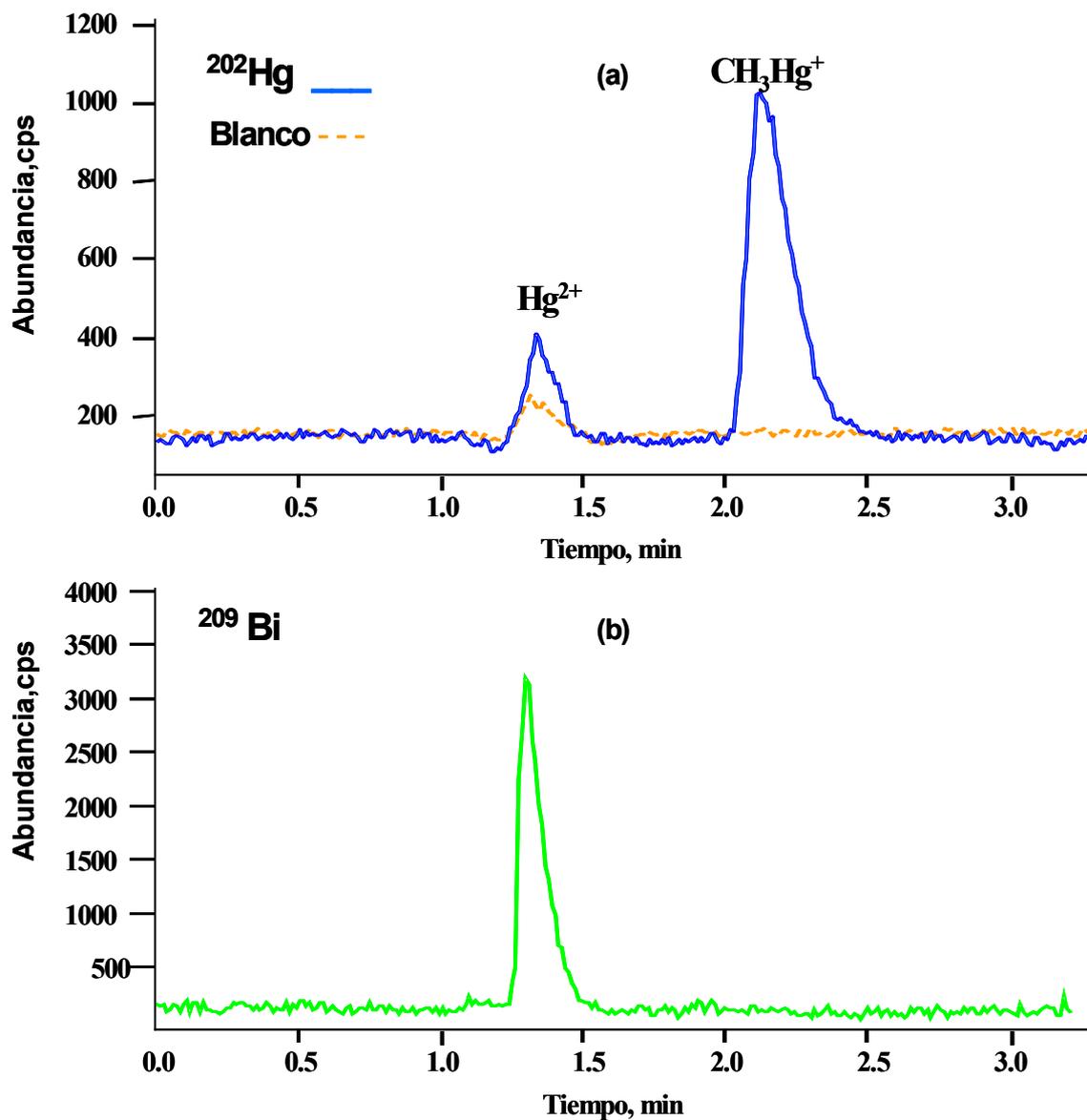
**Tabla 3.2** Parámetros analíticos evaluados para las dos especies de mercurio sin y con el uso de EI en el procedimiento propuesto.

Parámetro	Hg <sup>2+</sup>		CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup>	
	Con IS	Sin IS	Con IS	Sin IS
Tiempo de Retención ± DE, min		1.31 ± 0.02		2.06 ± 0.03
Factor de Retención		0.25		0.96
Intervalo Calibración, $\mu\text{gHg L}^{-1}$		0 – 50		0 – 50
Señal	Área de pico		Área de pico	
Señal Analítica	<sup>202</sup> Hg/ <sup>209</sup> Bi	<sup>202</sup> Hg	<sup>202</sup> Hg/ <sup>209</sup> Bi	<sup>202</sup> Hg
R <sup>2</sup>	0.9986	0.9896	0.9999	0.9998
Error Std de la pendiente, %	5.1	5.5	3.4	4.2
Error Std. para Intercepto, %	7.0	7.8	5.8	7.7
LD, $\mu\text{gHg L}^{-1}$	0.8	0.9	0.7	0.9
LC, $\mu\text{gHg L}^{-1}$	2.4	2.7	2.1	2.7
CV, % (10 $\mu\text{gHg L}^{-1}$ n=5)	3.6	5.4	3.3	5.1
CV, % (50 $\mu\text{gHg L}^{-1}$ n=5)	2.8	5.9	3.0	4.8

LD– Limite de detección calculado con las tres desviaciones estándar de la base línea con respecto a la pendiente de la curva de calibración.

Así mismo, se observan valores más bajos para los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) de las dos especies en el método con EI. En la Figura 3.3 se muestra el cromatograma de un extracto de tejido junto con el cromatograma del blanco, donde se

observa la elución de las dos especies de mercurio con buena concordancia en tiempos de retención con los obtenidos en las soluciones estándar (ver Fig. 3.2a).



**Figura 3.3.** Ejemplo de cromatograma HPLC-ICP-MS obtenido en el análisis de (a) extracto de tejido de pescado ( — ), el blanco ( - - - ) y (b) el EI  $10 \mu\text{gBi}^{3+} \text{L}^{-1}$  ( — ).

Para evaluar el rendimiento de extracción de las especies del tejido de pescado, se determinó el contenido total de mercurio ( $c(\text{Hg})$ ) en  $\mu\text{g Hg}$  por  $\text{kg}$  del tejido fresco y tejido seco en hígado de sierra y en músculo de huachinango por ICP-MS (ver procedimiento), obteniéndose los resultados de  $126.2 \pm 10.8 \mu\text{gHg kg}^{-1}$  masa fresca y  $450.3 \pm 30.9 \mu\text{gHg kg}^{-1}$  masa seca en hígado; y  $227.1 \pm 9.3 \mu\text{gHg kg}^{-1}$  masa fresca y  $958.4 \pm 35.4 \mu\text{gHg kg}^{-1}$  masa seca en músculo respectivamente para tres réplicas de cada tejido. El contenido de humedad determinado en los tejidos fue de  $76.8 \pm 0.4\%$  en músculo y de  $73.1 \pm 0.5\%$  en hígado. De acuerdo con estos valores, no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos para el material seco y el material húmedo. Por otro lado estos resultados se encuentran en el intervalo de concentraciones de mercurio total reportado por la FDA obtenido en el programa de monitoreo (1999-2004): 230-1670 masa fresca para músculo en el Golfo de México y  $1366 \mu\text{g kg}^{-1}$  masa fresca para el hígado que fue la cantidad mas baja cuantificada por encima del limite de detección[95].

En las mismas muestras se llevó a cabo la cuantificación del mercurio inorgánico ( $c(\text{Hg}^{2+})$ ) en  $\mu\text{g Hg}$  por  $\text{kg}$  del tejido fresco y de metilmercurio ( $c(\text{MeHg}^+)$ ) en  $\mu\text{g Hg}$  por  $\text{kg}$  del tejido fresco utilizando el procedimiento propuesto. El rendimiento de extracción se evaluó, utilizando la siguiente fórmula:

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

Para el hígado y para el músculo se obtuvieron los valores de  $R$  de  $89.5 \pm 5.1 \%$  y de  $91.9 \pm 8.3 \%$  respectivamente. Es importante que, los valores de  $R$  evaluados utilizando los resultados de cuantificación de las especies sin utilizar EI fue significativamente inferior ( $89.6 \pm 7.4\%$ ) para el músculo, mientras que, para el hígado prácticamente no hubo cambio significativo ( $89.6 \pm 8.2\%$ ). Para fines comparativos, se evaluó también el rendimiento de extracción utilizando el ácido clorhídrico como extractante, obteniéndose los valores de  $R$  de  $30.3 \pm 6.3 \%$  y  $50.8 \pm 6.1 \%$  para el hígado y músculo respectivamente.

De la Tabla 3.3, donde se comparan los valores de rendimiento de extracción obtenidos utilizando diferentes procedimientos, se deduce que, la extracción de las especies de mercurio por el procedimiento propuesto en este trabajo permite mejorar el rendimiento de la extracción respecto a la extracción con el ácido clorhídrico. Además, el uso de EI permite reducir los errores relacionados con un incompleto rendimiento de las especies de mercurio.

Como resultado, se obtiene muy buen rendimiento de extracción de mercurio, respecto a los reportes anteriores. Cabe señalar que los resultados obtenidos en este trabajo, en la extracción con ácido clorhídrico fueron similares a reportes anteriores [89].

**Tabla 3.3.** Rendimiento de extracción del mercurio total ( $\text{Hg}^{2+} + \text{MeHg}^+$ ) evaluado utilizando diferentes procedimientos.

Procedimiento	Rendimiento: $R = (c(\text{Hg}^{2+}) + c(\text{MeHg}^+)) / c(\text{Hg}) \times 100 \%$	
	<i>Hígado de sierra</i> $c(\text{Hg}) = 126.2 \pm 10.8 \mu\text{gHg kg}^{-1} \text{ fresco}$	<i>Músculo de huachinango</i> $c(\text{Hg}) = 227.1 \pm 9.3 \mu\text{gHg kg}^{-1} \text{ fresco}$
Procedimiento propuesto cuantificación con EI	$89.5 \pm 5.1 \%$	$91.9 \pm 8.3 \%$
Procedimiento propuesto cuantificación sin EI	$89.6 \pm 8.2 \%$	$89.6 \pm 7.4 \%$
Extracción con HCl, cuantificación sin EI	$30.3 \pm 6.3 \%$	$50.8 \pm 6.1 \%$

Nota: El porcentaje de rendimiento se obtuvo de acuerdo a los valores determinados mediante el procedimiento de adición de estándar.

La cuantificación de las dos especies de mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{MeHg}^+$ ) en muestras de tejido fresco se llevó a cabo considerando el área de pico  $^{202}\text{Hg}$  (sin EI) o la relación entre las áreas de los picos  $^{202}\text{Hg}/^{209}\text{Bi}$  (con EI). Los resultados obtenidos mediante calibración externa y por el método de adición de estándar se presentan en la Tabla 3.4. Para fines comparativos, en la misma Tabla 3.4 se muestran los resultados obtenidos empleando la extracción con el ácido clorhídrico, reportada por varios autores [74, 84, 86, 89].

En primer lugar, sin utilizar EI se observan diferencias significativas entre los resultados de cuantificación por calibración externa y por adición de estándar, lo que indica que el procedimiento propuesto no asegura la extracción completa de las especies de mercurio.

Por otro lado, utilizando el método de estándar interno, los resultados obtenidos por calibración externa y por el método de adición de estándar son mayores respecto a otros procedimientos de cuantificación y no presentan diferencias significativas.

**Tabla 3.4.** Resultados de la determinación de las especies de mercurio en tejido de pescado fresco (n = 3).

Estándar Interno	CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup> µg CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup> kg <sup>-1</sup> (peso fresco) ± DE		Hg <sup>2+</sup> µgHg kg <sup>-1</sup> (peso fresco) ± DE	
	Calibración externa	Adición de estándar	Calibración externa	Adición de estándar
<b>Músculo de huachinango (Hg total 227.1 ± 9.3 µg kg<sup>-1</sup>)</b>				
Procedimiento propuesto, sin EI	113.8 ± 4.3	176.6 ± 5.6	13.1 ± 2.5	26.8 ± 3.6
Procedimiento propuesto, con EI	178.9 ± 3.5	181.2 ± 4.7	28.4 ± 1.3	27.5 ± 2.2
Extracción con HCl, sin EI	80.1 ± 2.7	90.8 ± 3.6	23.0 ± 0.8	24.5 ± 1.5
<b>Hígado de sierra (Hg total 126.2 ± 10.8 µg kg<sup>-1</sup>)</b>				
Procedimiento propuesto, sin EI	54.8 ± 6.2	77.2 ± 7.2	30.8 ± 2.6	35.9 ± 4.1
Procedimiento propuesto, con EI	75.7 ± 5.0	76.5 ± 5.5	35.7 ± 1.4	36.3 ± 2.6
Extracción con HCl, sin EI	23.5 ± 0.7	28.1 ± 1.2	9.3 ± 2.0	10.2 ± 2.4

La concordancia entre los valores obtenidos es una indicación de que se obtuvo una exactitud de los resultados para ambas especies. En conclusión, el procedimiento propuesto en este trabajo que consiste en la adición de Bi<sup>3+</sup> como EI, el tratamiento de muestra con el ácido perclórico, tolueno:metanol y L-cisteína y la separación/cuantificación por HPLC-ICP-MS puede ser utilizado en la especiación de mercurio en tejido de pescado. El uso del método de estándar interno permite el proceso de cuantificación mediante la calibración externa.

Los factores de recuperación de las especies  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  y  $\text{Bi}^{3+}$  en tejido de pescado (hígado de sierra y músculo de huachinango) fueron evaluados aplicando la ecuación recomendada por la IUPAC[96].

$$(a) \quad RA = \frac{CDA(\text{Muestra} + \text{Adicionada}) - CDA(\text{Muestra})}{CA(\text{Adicionada})}$$

Donde:

(a) para evaluar la recuperación de la especie A ( $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  o  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ )

$C_{DA}$ : Concentración detectada de la especie A ( $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  o  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  en  $\mu\text{g kg}^{-1}$ )

$C_A$ : Concentración adicionada de la especie A ( $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  o  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  en  $\mu\text{g kg}^{-1}$ )

$R_A$ : Factor de recuperación de la especie A

Mediante el empleo de esta ecuación se cumplieron dos objetivos: (i) evaluar los factores de recuperación de cada especie ( $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  y  $\text{Bi}^{3+}$ ) en tejido fresco y (ii) examinar si existe interconversión del mercurio inorgánico a orgánico o viceversa. Los resultados de R obtenidos 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) y del ion bismuto ( $c(\text{Bi}^{3+})$ ,  $\mu\text{gBi L}^{-1}$ ) se muestran en la tabla 3.5 y tabla 3.6, en donde se puede observar que la recuperación para el  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  fue mejor que la alcanzada para el  $\text{Hg}^{2+}$  en ambos tejidos, los valores de recuperación de las especies de  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  y  $\text{Hg}^{2+}$  obtenidos fueron de  $55.4 \pm 7$  y  $49.8 \pm 8$  en hígado y de  $81.0 \pm 6$  y  $73.8 \pm 6$  en músculo con el método sin EI; por otra parte, los valores de R mejoran notablemente con el uso del EI alcanzándose valores de  $78.0 \pm 5$  y  $75.9 \pm 4$  en hígado y de  $100.6 \pm 6$  y  $98.9 \pm 4$  en músculo para  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  y  $\text{Hg}^{2+}$  respectivamente.

Los valores de recuperación obtenidos indican que no existe conversión de las especies durante el procedimiento empleado.

**Tabla 3.5** Porcentajes de recuperación de las especies  $Hg^{2+}$ ,  $CH_3Hg^+$  con adición en forma separada de cada especie en tejido de pescado.

Tejido	$Hg^{2+}$ ( $\mu g Hg kg^{-1}$ masa fresca) $\pm DE$		$CH_3Hg^+$ ( $\mu g Hg kg^{-1}$ masa fresca) $\pm DE$		% Recuperación $\pm DE$	
	Adicionada	Detectada	Adicionada	Detectada	$Hg^{2+}$	$CH_3Hg^+$
Músculo con EI	0	27.5 $\pm$ 2.2	0	181.2 $\pm$ 4.7	98.9 $\pm$ 4.9	100.6 $\pm$ 5.3
	100	126.4 $\pm$ 6.7	200	382.4 $\pm$ 28.2		
Músculo sin EI	0	26.8 $\pm$ 3.6	0	176.6 $\pm$ 5.6	73.8 $\pm$ 3.8	81.0 $\pm$ 4.9
	100	100.6 $\pm$ 7.1	200	338.6 $\pm$ 33.1		
Hígado con EI	0	35.3 $\pm$ 3.2	0	94.4 $\pm$ 6.8	75.9 $\pm$ 3.9	78.0 $\pm$ 4.7
	100	111.2 $\pm$ 5.6	200	250.4 $\pm$ 13.3		
Hígado sin EI	0	28.8 $\pm$ 2.9	0	49.3 $\pm$ 2.9	49.8 $\pm$ 3.1	55.4 $\pm$ 3.3
	100	78.6 $\pm$ 6.3	200	160.1 $\pm$ 7.8		

**Tabla 3.6** Porcentaje de recuperación para el EI con adición de 250  $\mu g Bi L^{-1}$

Especie	Concentración $\mu g L^{-1} \pm DE$		% Recuperación $\pm DE$
	Adicionada	Detectada	
$Bi^{3+}$ sin EI	250	188.7 $\pm$ 12.1	75.5 $\pm$ 7.6

El análisis de especiación fue repetido usando tejido de pescado seco y la cuantificación de las especies de mercurio fue determinada por el método de adición de estándar con EI. Las concentraciones de  $CH_3Hg^+$  y  $Hg^{2+}$  encontradas en músculo fueron  $133.9 \pm 8.7 \mu g Hg kg^{-1}$  y  $703.7 \pm 45.1 \mu g Hg kg^{-1}$  y en hígado  $154.2 \pm 11.2 \mu g Hg kg^{-1}$  y  $231.3 \pm 16.0 \mu g Hg kg^{-1}$  masa seca respectivamente. Usando material seco, el procedimiento tuvo una recuperación de 87.4 % para el músculo y de 85.6 % para el hígado.

Estos resultados indican que la extracción realizada al tejido fresco fue más eficiente en comparación con el material seco. La distribución relativa de  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  en el tejido seco de músculo fue ligeramente más bajo comparado con el tejido fresco; 83.0% contra 86.8% (el mercurio total eludido de la columna se considera que es el 100%). Una tendencia similar fue observada en los resultados obtenidos en el tejido de hígado: la cantidad de metilmercurio encontrado en el material seco fue de 60%, mientras que, la cantidad en el tejido fresco eludido de la columna fue de 67.8% de mercurio.

La concentración y la distribución relativa de las especies mercuriales en diferentes órganos pueden depender de las condiciones ambientales, régimen alimenticio, edad y tamaño del pescado. Es por esto, que existen importantes discrepancias entre diferentes estudios realizados sobre esta temática. Nuestros resultados muestran ser consistentes con resultados de trabajos previos los cuales reportan una cuantificación de aproximadamente el 80% de  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  con respecto al Hg total en tejido de músculo [97] y relativamente un porcentaje menor de estas especies en hígado que en músculo [98, 99].

La recuperación obtenida para las especies en forma individual fueron determinadas en tejido fresco enriquecido mediante la adición de una cantidad apropiada de los estándares de  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  o  $\text{Hg}^{2+}$ . La recuperación del bismuto fue también examinada. Los resultados obtenidos están presentes en la Tabla 3.5. Para la cuantificación sin EI la recuperación de las especies de mercurio fueron  $73.8 \pm 6 \%$  para  $\text{Hg}^{2+}$  y  $81.0 \pm 6 \%$  para  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ , valores similares de recuperación se obtuvieron evaluándose el EI ( $75.5 \pm 3\%$ ). Sin embargo, tomando la señal analítica como la relación  $^{202}\text{Hg}/^{209}\text{Bi}$ , la recuperación para las dos especies mercuriales estuvieron muy cercanas al 100 %.

Estos resultados, confirman la factibilidad del uso del  $\text{Bi}^{3+}$  como EI en la extracción y determinación por HPLC-ICP-MS de las especies de mercurio en tejido de pescado.

**Tabla 3.7** Comparación de diferentes procedimientos de extracción y cuantificación por HPLC – ICP-MS para la especiación de mercurio en tejido de pescado.

Procedimiento Analítico de Extracción	HPLC	LD, $\mu\text{g L}^{-1}(\text{Hg})$		Recuperación $\pm$ DE, %		Ref
		$\text{CH}_3\text{Hg}^+$	$\text{Hg}^{2+}$	$\text{CH}_3\text{Hg}^+$	$\text{Hg}^{2+}$	
2-mercaptoetanol en MeOH al 2%, MW: 65 °C, 5 min	C18, 150 x 1 mm, 5 $\mu\text{m}$ ; 2-mercaptoetanol 0.2 %, MeOH 2%, EDTA 1 mg/L, pH 2.8; Tiempo de separación: 17 min	0.2	0.2	95 $\pm$ 5	96 $\pm$ 8	[100]
2-mercaptoetanol 0.1 %, KCl 0.15 %, HCl 0.1 %, Agitación 12 h	C18, 150 x 3.9mm, 5 $\mu\text{m}$ ; 2-mercaptoetanol 0.1 %, MeOH 5 %, $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 60 mM, pH 2.8; Tiempo de separación: 13 min	0.2	0.2	Completa recuperación de Hg total en materiales de referencia		[101]
25 % TMAH; MW: 40 W, 4 min; neutralización con $\text{CH}_3\text{COOH}$	C18, 150 x 3.2 mm, 3 $\mu\text{m}$ ; 2-mercaptoetanol 0.01 %, MeOH:H <sub>2</sub> O (1:1); Tiempo de separación: 4 min	0.5 *	-	83 – 100	-	[91]
25% KOH o TMAH en MeOH, Baño María 70 °C, 30 min, sonicación 30 min, ajustado a pH 4	C18, 150mm x 4.6 mm, 2 $\mu\text{m}$ ; piridina 50 mM, L-cisteína 0.5 %, MeOH 5 %, pH 3;Tiempo de separación: 4 min	0.78	0.46	99 $\pm$ 4	-	[81]
HCl 5M, NaCl 0.25M, MW: 60 °C, 10 min	C18, 150mm x 4.6 mm, 2 $\mu\text{m}$ ; piridina 50 mM, L-cisteína 0.5 %, MeOH 5 %, pH 3; tiempo de separación: 4 min	0.78	0.46	100 %	-	[102]
HCl 5M; sonicación:30 min; extracción gaseosa de quelantes mercuriales DDTc	C18, 150mm x 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ; MeOH:acetonitrilo:H <sub>2</sub> O (35:40:25) Tiempo de Separación: 14 min	0.013	0.006	82 % - 115 % en muestras de agua, en pescado no esta reportado		[103]
<b>Procedimiento propuesto en este trabajo</b>	C18, 150m x 3 mm, 5 $\mu\text{m}$ ; L-cisteína 2.5 mmol L <sup>-1</sup> ; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 12.5 mmol L <sup>-1</sup> ; trietilamina 0.05%, pH 7.0: metanol(96:4) Tiempo de separación: 3 minutos	0.7	0.8	100.6	98.9	[104]

<sup>a</sup> Limite de detección  $\mu\text{g g}^{-1}(\text{Hg})$ .,  
MW: extracción asistida por microondas

Finalmente, en la tabla 3.7 el procedimiento propuesto es comparado con respecto a varias metodologías reportadas previamente. Como se puede observar, el tiempo de separación cromatográfica, límites de detección y recuperación de las especies obtenidas en este trabajo son similares a aquellos obtenidos bajo condiciones diferentes de extracción/separación. La gran ventaja de este procedimiento se encuentra en el estudio del protocolo no riguroso y que puede ser aplicado directamente en tejido de pescado fresco. En este protocolo, solamente la cantidad de muestra y el EI adicionado pueden ser medidos con exactitud y precisión.

### 3.5. CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado un nuevo procedimiento analítico para la especiación de mercurio inorgánico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) y metilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) en tejido del pescado. La novedad consiste en proponer nuevas condiciones de extracción, en utilizar ión bismuto como el EI y realizar el procedimiento en tejido fresco.
2. La selección 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 -SH en cisteína. Por otro lado, la capacidad de análisis multielemental de la técnica ICP-MS ha permitido registrar las señales de mercurio y de EI simultáneamente.
3. 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 cisteína y la mezcla tolueno:metanol inmediatamente antes de la homogeneización con ayuda de un politrón. Para mejorar el rendimiento de la extracción, se colocó la mezcla obtenida en el baño de ultrasonido.
4. Se ha demostrado que el procedimiento propuesto permite mejorar la precisión y exactitud de los resultados respecto al mismo procedimiento sin utilizar el método de EI y también respecto a los resultados obtenidos cuando la extracción de las especies se llevó a cabo con el ácido clorhídrico. Sin restar importancia, el procedimiento de recuperación fue mejor usando tejido fresco que en materia seca.
5. El procedimiento propuesto puede ser un interesante y rápido protocolo para la evaluación de especies mercuriales en muestras de pescado, proporcionando datos que pueden ser directamente comparados con valores establecidos por diferentes regulaciones gubernamentales (concentración de Hg en masa fresca).

## CAPITULO 4

**“DETERMINACIÓN DE METALES EN  
TEJIDO DE LOMBRICES DE TIERRA Y EN  
SUELOS PROVENIENTES DE SIETE  
SITIOS CARACTERIZADOS POR  
DIFERENTE GRADO DE  
CONTAMINACIÓN, MEDIANTE  
ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON  
IONIZACIÓN EN PLASMA ACOPLADO  
POR INDUCCIÓN (ICP-MS)”**

## 4.1 INTRODUCCIÓN

Las lombrices de tierra (familia Lumbricidae, genus *Lumbricus*) son componentes importantes de ecosistemas, ya que su hábito de socavar la tierra mejora la aeración de los suelos e incrementa la infiltración de agua de lluvia o de riego, ayudando de esta manera a mejorar el desarrollo de las raíces de las plantas. Existen más de 3000 especies de lombrices, siendo tal vez una de las más comunes la *Lumbricus terrestris*. Estos organismos se alimentan de la materia orgánica presente en el suelo, contribuyendo en su degradación y, en este sentido, su presencia beneficia la biodisponibilidad de nutrientes para plantas. De hecho, algunas especies se utilizan en la producción de composta y en el proceso de fertilización de suelos[105, 106].

Relacionado muy de cerca con el tema de micronutrientes inorgánicos, existe la preocupación por el acceso a las plantas de los llamados metales pesados, tanto en ambientes con altos niveles de estos metales contenidos en forma natural, así como en regiones contaminadas con sus especies, principalmente por fuentes antropogénicas. La cuantificación de las concentraciones totales de metales/metaloides en diferentes compartimientos medio ambientales no es suficiente para evaluar sus efectos tóxicos en organismos vivos y tampoco permite conocer sus posibles rutas en la cadena alimenticia. Es por esto que, algunas organizaciones, como la USEPA (United States Environmental Protection Agency) y el Gobierno de Canadá entre otros, han propuesto el uso de bioindicadores dentro del programa para la detección y remediación de sitios contaminados[107].

En el contexto de la contaminación del medio ambiente, el término biomarcador o bioindicador se refiere a una especie vegetal, un hongo o un organismo animal (puede ser también un grupo de especies), cuya presencia en el medio y la caracterización mediante diversas técnicas analíticas proporciona información sobre el estado actual de la contaminación (presencia o ausencia de compuestos o elementos) y su impacto en los organismos que habitan dicha región[106, 108].

Debido a los hábitos y relativamente baja movilidad de las lombrices en el suelo, en numerosos estudios se ha investigado su potencial como posible bioindicador de la contaminación para evaluar la biodisponibilidad y los riesgos para organismos vivos, asociados con su presencia. Se ha propuesto que las lombrices son un modelo útil en estudios de transferencia de contaminantes orgánicos (bifenilos policlorados, algunos pesticidas) e inorgánicos (metales pesados) del suelo hacia la biota [109]. Por otro lado, los estudios del crecimiento y reproducción de las lombrices proveen información adicional sobre los efectos tóxicos en los organismos vivos que habitan en un ambiente contaminado [107, 109]. Cabe mencionar también el papel que desempeñan las lombrices dentro de la cadena alimenticia, ya que una gran variedad de depredadores se alimentan principalmente de estos organismos[110].

Los metales pesados provenientes de descargas urbanas e industriales son depositados en diferentes compartimentos del sistema acuático: agua, sedimentos, suelos y biota. Todos estos metales son potencialmente peligrosos para la mayoría de los organismos vivos en un determinado nivel de exposición y adsorción. Bajo ciertas condiciones ambientales, los metales pesados tienden a acumularse hasta llegar a una concentración tóxica y por ende, causar daños ecológicos[111].

En particular, se han encontrado varios reportes acerca de niveles de metales pesados en lombrices [112]. Algunos de ellos han sido centrados en los efectos tóxicos debido a la ingesta de metales tales como Ni, As, Pb, Cd, Hg, Al, Cr y Zn [105, 108-111, 113-116]. En otros estudios, se ha buscado la correlación entre niveles de metales en suelos y en biomasa [108, 117, 118]. De aquí, deriva el interés particular de estudiar más a fondo, la capacidad de las lombrices para acumular ciertos metales.

Recientemente se ha reportado la presencia de mercurio inorgánico y metilmercurio en lombrices [90] y de algunas especies arsenicales: As(III), As(V), MMAs(V), DMAs(V), AB (arsenobetaína) y arsenoazúcares[119], por lo que también es interesante estudiar la especiación de metales en tejido de lombrices con el fin de elucidar su posible papel en la biotransformación de metales formando las especies organometálicas.

#### 4.1.1 CARACTERÍSTICAS Y DESCRIPCIÓN DE LAS LOMBRICES

Las lombrices o gusanos de tierra (familia Lumbricidae, genus *Lumbricus Terrestris*) son fuente importante para la agricultura ya que ayuda a mejorar la calidad y fertilidad de los suelos [108, 110, 120]. Son los organismos más importantes en términos de su influencia en la degradación de materia orgánica, cambios estructurales en los suelos y sobre todo en el ciclo de nutrición, especialmente en ecosistemas productivos. Aristóteles llamó a estos organismos como los “intestinos de la tierra” y el eminente biólogo del siglo XIX, Carlos Darwin, realizó observaciones de su influencia en la formación de humus (*sustancia compuesta por productos orgánicos, de naturaleza coloidal, que proviene de la descomposición de los restos orgánicos producido por hongos y bacterias*) [121] y el transporte de sólidos [120, 122]. En los últimos años se ha incrementado considerablemente en la literatura la información sobre el comportamiento, desarrollo y forma de vida de las lombrices de tierra, así como también de su influencia dentro de los sistemas ecológicos [120].

Hasta el momento, las lombrices de tierra, son los organismos más apropiados para evaluar el impacto que tienen las actividades humanas dentro de la formación, distribución y caracterización de los suelos. Entre las especies de lombrices de tierra más estudiadas destacan la *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei*, *Lumbricus terrestris* y *Lumbricus rubellus*[106]. La *Eisenia fetida* es representativa de la fauna terrestre y de las lombrices de tierra en general, representando a los organismos de prueba usados como bioindicadores en la determinación del impacto medioambiental en diferentes territorios ecotoxicológicos dentro de la Unión Europea. Por su parte las especies *E. andrei* y *Lumbricus terrestris* suelen emplearse para el estudio general de contaminación de suelos, en especial bajo condiciones experimentales; mientras que, la *E. fetida* mostró tener menor sensibilidad a la detección de los pesticidas[106].

Las pruebas desarrolladas con lombrices de tierra en suelos contaminados, plantea, entre otros, la evaluación de su respuesta a nivel individual y de comunidad, sobre los efectos que éstas tendrían en su reproducción, funciones celular y subcelular, evaluación de

la actividad enzimática o la función del sistema inmunológico, alteraciones del ADN o de los genes específicos de expresión[106].

#### 4.1.2 Clasificación biológica de la lombriz

Las lombrices de tierra son anélidos que viven en la tierra, poseen el cuerpo cilíndrico ahusado y dividido en segmentos internos y externos con simetría bilateral. Contienen una delgada cutícula pigmentada en todos los segmentos a excepción de los dos primeros. Presentan diminutas cerdas llamadas sedas. Aunque existen diferencias de tono entre las partes superior e inferior del cuerpo, y entre diferentes partes de éste, las lombrices de tierra son en general de color uniforme, casi siempre rojo pálido, pero que puede variar del rosa mate al castaño. Muchas especies alcanzan una longitud de unos pocos centímetros, pero ciertas especies tropicales llegan a medir hasta 3.3 m de longitud. Todas las lombrices de tierra son hemafroditas, es decir, tienen tanto el sexo masculino como el femenino. Las lombrices de tierra están clasificadas como la *Phylum annelida* y la clase *Oligoqueta*, la cual consiste en al menos 36 familias alrededor del mundo[120].

Las lombrices de tierra necesitan habitar en suelo húmedo que contenga materia orgánica para poder subsistir. Suelen vivir en las capas superiores, pero en invierno se entierran más para escapar de las heladas. Cuando el clima es muy caluroso, hacen lo mismo para evitar la deshidratación. Las lombrices de tierra rehuyen la luz del día, pero con frecuencia salen a la superficie durante la noche para alimentarse y expulsar su detritus.

Las diversas especies de lombriz de tierra pueden ser agrupadas de acuerdo a las adaptaciones de conducta, morfología y/o fisiología que estas adquieren con base al tipo de suelo en donde habitan. El árbol genealógico de estos organismos, hace mención en términos de las especies *epigeic*, *anecic* y *endogeic*. La lombriz *epigeic* se alimenta de plantas contaminadas y de material muerto que se encuentra en la superficie de suelos; tienden a tener buena pigmentación y su tamaño va desde pequeño a mediano.

Por su parte, la lombriz *anecic* se alimenta tanto de plantas como de sólidos, vive cerca de madrigueras verticales permanentes, su pigmentación tiende a ser dorsal y por lo general es más larga que la *epigeic*. Por otro lado, las especies *endogeic* son consumidores de sólidos solamente y tienden a tener poca pigmentación; se encuentran principalmente en madrigueras grandes y de tipo horizontal y el intervalo del tamaño de éstas va desde el pequeño hasta grande[120].

#### 4.1.3 La lombriz de tierra en el medio ambiente

La influencia que proporcionan las diferentes especies de lombrices respecto a las propiedades fisicoquímicas y estructurales de los suelos y de los ecosistemas en general, depende fuertemente del modo de vida de cada una de las especies (*Eisenia fetida*, *Eisenia andrei*, *Lumbricus terrestris*, *Lumbricus rubellus*, *Dendrodrilus rubidus* etc.). Por ejemplo, las madrigueras en que habita la especie de lombriz *anecic* y que es también común para la *lumbricus terrestris* son de forma vertical, lo cual facilita el flujo de agua a través de los suelos, incrementando de esta manera, el transporte de agua, nutrientes y de químicos necesarios en la agricultura para el buen desarrollo de las raíces como de las plantas en sí.

Por otro lado, la especie *epigeic* interviene en el rompimiento estructural de la materia existente en los suelos (plantas o animales muertos, material contaminante, etc.) colaborando en la degradación de esta y facilitando, a su vez, la mineralización de las superficies contaminadas. Por su parte, la especie *anecic* hace que el material superficial se entremezcle con el suelo, lo cual, les puede llevar largos periodos de tiempo hasta que logren cambiar la mineralogía superficial de los suelos[120]. En forma general, las lombrices de tierra desempeñan un importante papel dentro de la ecología del suelo; el cual, al ser removido y aireado, por la acción de las lombrices de tierra, se vuelve más fértil. Las lombrices de tierra son también una fuente importante de alimento para muchos animales y constituyen el principal alimento de los topos, pájaros y otros depredadores.

La actividad desarrollada por las lombrices de tierra dentro de los suelos, acelera la descomposición de plantas muertas o debilitadas debido a la infección por organismos patógenos o por la contaminación del suelo, incrementa las velocidades de transformación de nutrientes y la ingesta de nutrientes en la planta, mejora la porosidad y agregación de sólidos e intensifica la infiltración y el transporte de solutos, airando y mejorando la calidad de los suelos[120].

Las lombrices ejercen una fuerte influencia dentro del ciclo de nutrición en muchos ecosistemas; generalmente, incrementando el nivel de mineralización de carbón en los suelos, aunque en algunos casos, puede disminuir el grado mineralización, al contribuir a la formación de agregados estables de sólidos en los cuales el carbono está fuertemente protegido para evitar su rompimiento[120].

El efecto que producen las lombrices en la estructura de los suelos es el resultado de la salida de su dentritus (residuos fecales) y de las actividades propias de sus madrigueras. Por otra parte, las lombrices ingieren partículas sólidas y materia orgánica, la mezcla de estas dos fracciones, además de la basura que se encuentra en la superficie y subsuperficie. Se estima que las velocidades anuales de producción de desecho de lombriz se encuentra en el intervalo de 5 a 250 Mg ha<sup>-1</sup> en varios ecosistemas. Una vez depositada esta materia fecal, los suelos pueden ser cubiertos por esta y tener un gran impacto por la lluvia o puede formar suelos más estables a través de una variedad de mecanismos estabilizadores[105].

#### **4.2 OBJETIVO PARTICULAR**

El objetivo del presente trabajo ha sido evaluar el potencial de las lombrices de tierra como posibles bioindicadores de los metales / metaloides y examinar su capacidad para biotransformar metales / metaloides presentes en el suelo, mediante su cuantificación en suelos y tejidos de lombrices provenientes de siete regiones con diferentes características.



**Figura 4.1** Fotografía de una lombriz de tierra con la que se trabajó en este estudio.

### 4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de cubrir diferentes intervalos de concentración de metales / metaloides en suelos, se escogieron los siguientes sitios de muestreo: (1) Mineral de Cata, Guanajuato, cercanía de la mina de plata; (2) Mezcala, Estado de Guerrero, cercanía de una mina de oro; (3) jardín de una casa en la Zona Industrial del Estado de San Luis Potosí; (4) Col. La Laguna en Lagos de Moreno, Jal. (5) jardín de una casa en la col. Burócrata, Guanajuato; (6) Jardín de una casa en Lagos de Moreno, Jal. y (7) Real de Minas, Guanajuato. En cada uno de los casos, las muestras fueron tomadas en época de lluvia, en agosto – septiembre del 2009.

Las determinaciones de los metales y metaloides se llevaron a cabo en muestras de suelos y de lombrices, representativos para cada uno de los sitios (“pooled samples”). Para ello, se utilizó la digestión con ácido nítrico y agua oxigenada y la determinación de elementos se realizó mediante espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). A continuación se describen detalladamente las condiciones del procedimiento empleado.

### 4.3.1 Instrumentación

Se utilizó el espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) modelo 7500ce de Agilent Technologies (Tokio, Japón) equipado con el nebulizador convencional tipo Meinhard para la determinación de los elementos totales. La cámara de niebla con enfriamiento tipo Peltier fue operada a 2°C. El procedimiento de tuning se realizó diariamente usando la solución diluida de Agilent (Li, Y, Tl, Ce, 1 µg L<sup>-1</sup> cada uno). Las condiciones instrumentales empleadas en este trabajo se presentan en la tabla 4.1.

**Tabla 4.1** Condiciones instrumentales del sistema ICP-MS en la determinación de elementos totales en suelo y tejido de lombriz de tierra.

***ICP-MS — Determinación de elementos totales***

Potencia	1500W
Gas nebulizador	0.90 mL min <sup>-1</sup>
Gas make-up	0.15 mL min <sup>-1</sup>
Introducción de muestra	Meinhard nebulizer
Conos muestra y skimmer	Nickel
Profundidad muestra	10mm
Isótopos monitoreados	<sup>51</sup> V, <sup>52</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>59</sup> Co, <sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>65</sup> Cu, <sup>68</sup> Zn, <sup>75</sup> As, <sup>78</sup> Se, <sup>82</sup> Se, <sup>107</sup> Ag, <sup>109</sup> Ag, <sup>111</sup> Cd, <sup>114</sup> Cd, <sup>121</sup> Sb, <sup>137</sup> Ba, <sup>200</sup> Hg, <sup>202</sup> Hg, <sup>207</sup> Pb, <sup>208</sup> Pb
Modo de adquisición	Spectrum analysis
Tiempo de integración	300 ms
Celda colisión/reacción	He, 4.0 mL min <sup>-1</sup>

### 4.3.2 Reactivos, disoluciones y muestras

Los reactivos fueron del grado analítico y se utilizó el agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco, USA) para la preparación de las soluciones. El ácido nítrico para análisis de trazas fue de Fluka (trace-select), el material de referencia certificado fue NIST 1643d (Trace Elements in Water) y el peróxido de hidrógeno (Sigma).

Se utilizaron las siguientes soluciones comerciales de Agilent a la solución adecuada: (i) estandar de calibración conteniendo Ag, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, V, Zn, Th, U en una concentración de 10 mg L<sup>-1</sup>, (ii) estandar interno (In, 10 mg L<sup>-1</sup>) y (iii) solución tuning multielemental (Li, Y, Tl, Ce ,10 mg L<sup>-1</sup> cada uno).

#### 4.3.2.1 Recolección de Muestras

Las muestras de tierra y las lombrices fueron recolectadas en septiembre de 2009, de suelos provenientes de siete regiones con diferentes características: (1) Mineral de Cata, Guanajuato, cercanía de la mina de plata; (2) Mezcala, Estado de Guerrero, cercanía de una mina de oro; (3) jardín de una casa en la Zona Industrial del Estado de San Luis Potosí; (4) Col. La Laguna en Lagos de Moreno, Jal.; (5) jardín de una casa en la col. Burócrata, Guanajuato; (6) Jardín de una casa en Lagos de Moreno, Jal. y (7) Real de Minas, Guanajuato. Para cada sitio el área de muestreo no excedía los 4 m<sup>2</sup> (0-20 cm de superficie de suelo); Todas las lombrices recolectadas fueron de similar tamaño (aproximadamente 10 cm de longitud) y color, obteniéndose cerca de 30-40 g de biomasa. Junto con cada lombriz se tomó una pequeña muestra de suelo que posteriormente fuera mezclada con el resto de muestras de este sitio, obteniendo aproximadamente 500 g. Posteriormente, las lombrices (vivas) fueron separadas completamente de la tierra. Con el fin de eliminar la tierra, se aplicó el siguiente tratamiento [107, 116]:

- a) Las lombrices se lavaron completamente hasta quitar cualquier partícula sólida adherida al tejido.
- b) Se dejaron en un recipiente sin tierra por un lapso de 24 h para su depuración (que arrojen todo su dentritus o materia fecal).
- c) Se lavaron con agua desionizada y se dejaron depurar por espacio de 24 h más.
- d) Se lavaron nuevamente con agua desionizada hasta quitar cualquier residuo de defecación (dentritus) y se colocaron en papel filtro, para que éste adsorbiera la mayor cantidad de agua residual contenida en el tejido debido al lavado[119].

Cada porción fue dividida en dos; cerca de 20 lombrices fueron congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para el análisis de las especies de Hg y para la determinación de la metilación global de ADN y el resto de la biomasa obtenida se cortó en pequeñas piezas y fue liofilizada para la determinación de las concentraciones de elementos totales y para la especiación de arsénico. Por su parte las muestras de suelos fueron secadas a temperatura ambiente, homogenizadas y filtradas a un tamaño de partícula menor a  $250\mu\text{m}$ . Todos los análisis se realizaron por triplicado y el blanco se corrió paralelamente con las muestras.

### **4.3.3 Procedimientos analíticos**

#### **4.3.3.1 Secado y determinación de humedad de muestras.**

El secado de las muestras y la determinación del contenido de humedad en tejido de lombriz se llevó a cabo de forma similar a lo realizado en para tejido de pescado en el capítulo 3[69].

En breve, una porción de tejido de las lombrices recolectadas (20 g) se calentaron a  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 48 h hasta lograr su masa constante, para la determinación de humedad. Posteriormente, se pulverizaron en mortero de porcelana, para su homogenización. El contenido de la humedad se evaluó como la diferencia entre la masa inicial y la masa del material seco respecto a la masa inicial (masa del material húmedo).

#### **4.3.3.2 Determinación de elementos totales**

##### **4.3.3.2.1 Mineralización en suelo y tejido de lombriz**

Las condiciones de ataque con el ácido se cambiaron ligeramente respecto a las utilizadas en el análisis de suelos [69, 119, 123] con el fin de evitar posibles pérdidas de elementos tales como Hg, Cd, Se, Pb, Zn y Sb. Para ello, se utilizó la temperatura del ataque de  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Para el análisis de otros elementos como son el V, Cr, Ag Mn, Co, Ni, Cu, Ba y As la máxima temperatura empleada fue de  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A continuación se describen las condiciones de ataque para los elementos determinados en este capítulo.

Se pesaron tres sub-muestras de tejido liofilizado (0.2 g) y de suelo seco (0.5 g) y se colocaron en viales de digestión de 8 mL. Entonces, 2 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado fueron adicionados a todas las muestras y los viales fueron cerrados. Las muestras fueron calentadas en un bloque de calentamiento a 65 °C durante 120 min y a 120°C, 180 minutos. Las muestras se dejaron enfriar y se adicionó peróxido de hidrógeno 30% v/v a cada tubo (2 mL en suelos y 5 mL para tejido ). Una vez que la reacción fue completada (30 min), se llevo a un volumen de 25 mL. Para la determinación de Hg, Cd, Se, Pb, Zn y Sb las condiciones de digestión fueron ligeramente cambiadas (70° C por 12 h con HNO<sub>3</sub> y 70°C pro 1 h con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Todas las muestras fueron enfriadas a temperatura ambiente y filtradas en papel whatman #5.

#### **4.3.3.2.2 Determinación de elementos por ICP-MS**

Se utilizaron las condiciones instrumentales presentadas en la tabla 4.1. Estas condiciones fueron seleccionadas con base en el procedimiento de tuning, realizado diariamente con el uso de la solución diluida de Agilent, la cual contiene Li, Y, Tl, Ce en una concentración de 1 µg L<sup>-1</sup> cada uno. Para eliminar potenciales interferencias isobáricas, se utilizó la celda de colisión/reacción con el flujo de helio 4.0 mL min<sup>-1</sup> en el modo de análisis cuantitativo; se monitorearon los isótopos <sup>51</sup>V, <sup>52</sup>Cr, <sup>55</sup>Mn, <sup>59</sup>Co, <sup>60</sup>Ni, <sup>63</sup>Cu, <sup>65</sup>Cu, <sup>68</sup>Zn, <sup>75</sup>As, <sup>78</sup>Se, <sup>82</sup>Se, <sup>107</sup>Ag, <sup>109</sup>Ag, <sup>111</sup>Cd, <sup>114</sup>Cd, <sup>121</sup>Sb, <sup>137</sup>Ba, <sup>200</sup>Hg, <sup>202</sup>Hg, <sup>207</sup>Pb, <sup>208</sup>Pb con el tiempo de integración de 300 ms por isótopo.

Con las condiciones instrumentales establecidas, se llevo a cabo el proceso de calibración. Las soluciones de calibración conteniendo ocho niveles de concentración para cada uno de los elementos (0, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 5.0, 10 y 50 µg L<sup>-1</sup> con adición del estándar interno, In 5.0 µg L<sup>-1</sup>.) fueron obtenidas diluyendo el estándar medio ambiental de Agilent Technologies en ácido nítrico al 1% v/v. En la calibración multielemental, se obtuvieron los valores de coeficientes de regresión lineal  $r^2 > 0.9997$  para cada uno de los elementos.

El análisis de suelos y tejido de lombrices se realizó por triplicado; las muestras fueron diluidas con agua desionizada, acidificadas, centrifugadas e introducidas al sistema ICP-MS. En paralelo se obtuvieron lecturas del blanco y del material de referencia. Los valores del blanco, medidos en unidades de concentración (BEC-blank equivalent concentration) fueron en el intervalo de 0 ng L<sup>-1</sup> a 380 ng L<sup>-1</sup>.

Los resultados obtenidos están expresados como mg del elemento por kg de masa seca. La exactitud y precisión analítica fue demostrado por el análisis de dos materiales de referencia (NIST 1643d y NIST 1572), los resultados obtenidos para NIST 1643d se presentan en la tabla 4.2.

**Tabla 4.2.** Isótopos monitoreados, límites de detección (LD), valores certificados y resultados de determinación de elementos en material certificado NIST 1643d. (No se presentan resultados analíticos para Hg ya que este no fue certificado en el material de referencia).

Isótopo Monitoreado	LD ng L <sup>-1</sup>	Análisis de Material de Referencia	
		Valor Certificado µg L <sup>-1</sup>	Valor Encontrado µg L <sup>-1</sup>
<sup>51</sup> V	12.6	35.1 ± 1.4	35.3 ± 1.2
<sup>52</sup> Cr	7.38	18.5 ± 0.2	18.4 ± 0.3
<sup>55</sup> Mn	31.2	37.7 ± 0.8	37.6 ± 0.9
<sup>59</sup> Co	2.85	25.0 ± 0.6	24.8 ± 0.7
<sup>60</sup> Ni	20.1	58.1 ± 2.7	58.6 ± 2.1
<sup>63</sup> Cu	781	20.5 ± 3.8	17.2 ± 3.2
<sup>65</sup> Cu	897	20.5 ± 3.8	17.6 ± 2.7
<sup>68</sup> Zn	117	72.5 ± 0.7	72.7 ± 0.8
<sup>75</sup> As	22.9	56.0 ± 0.7	56.3 ± 0.5
<sup>78</sup> Se	51.5	11.4 ± 0.2	7.38 ± 2.5
<sup>82</sup> Se	42.9	11.4 ± 0.2	6.86 ± 2.8
<sup>107</sup> Ag	0.98	1.27 ± 0.06	1.39 ± 0.08
<sup>109</sup> Ag	1.30	1.27 ± 0.06	1.51 ± 0.09
<sup>111</sup> Cd	13.5	6.47 ± 0.4	6.27 ± 0.2
<sup>114</sup> Cd	8.05	6.47 ± 0.4	6.71 ± 0.2
<sup>121</sup> Sb	4.81	54.1 ± 1.1	53.9 ± 1.9
<sup>137</sup> Ba	7.94	507 ± 9	509 ± 3
<sup>200</sup> Hg	30.9	-	-
<sup>202</sup> Hg	20.8	-	-
<sup>207</sup> Pb	130	18.2 ± 0.6	17.7 ± 0.4
<sup>208</sup> Pb	131	18.2 ± 0.6	17.7 ± 0.5

En la misma tabla 4.2 se muestran los Límites de Detección (LD) evaluados para cada uno de los elementos (tiempo de integración 300 ms, 3 lecturas), cuyos valores fueron suficientemente bajos para llevar a cabo la cuantificación de elementos en suelo y tejido de lombrices. Como prueba de exactitud se llevó a cabo la determinación de elementos en el material de referencia certificado 1643d (Trace Elements in Water) y 1572 (Citrus Leave). En la misma tabla se presentan los resultados obtenidos (promedios  $\pm$  DE para 3 replicas) junto con los valores certificados. Se obtuvo muy buena concordancia para todos los elementos, lo que confirma la exactitud del procedimiento en la parte de la cuantificación de elementos por ICP-MS.

Se tomaron alícuotas de todas las muestras (después de la digestión y dilución), estas fueron centrifugadas a 10,000 x g durante 10 min. Posteriormente fueron diluidas según convenia para determinación por ICP-MS. La cuantificación de elementos en muestras se realizó con base en el área de los picos, utilizando el método de calibración externa y tomando la señal de  $^{115}\text{In}$  como la del estándar interno.

#### 4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo con la información presentada en la parte experimental, se utilizaron diferentes condiciones en la etapa de digestión para elementos considerados “volátiles” y para el resto de elementos de interés. Específicamente Hg, Zn, Se, Cd, Pb y Sb fueron determinados en las soluciones obtenidas en el ataque a 70 °C durante 13 h, mientras que, para los iones restantes se conservaron las condiciones de ataque de 65 -120 °C durante 5h, utilizadas previamente [123]. También la cantidad de humedad en tejido de lombriz fue determinada obteniéndose en promedio un  $85\pm 3.53$  % de humedad para los tejidos analizados.

El objetivo del presente estudio fue la selección de siete sitios de muestreo que contenían diferentes niveles de concentración de metales y metaloides en suelos. Tres muestras independientes de suelos fueron tamizadas, homogenizadas y secadas para cada sitio de muestreo, posteriormente se realizó la digestión con ácido nítrico y se determinaron 15 elementos por ICP-MS.

Los resultados se presentan como mg del analito por cada kilogramo de masa seca de la muestra. En la tabla 4.3 y 4.4 se presentan los valores obtenidos en los análisis de muestras de suelos y tejido de lombrices provenientes de los 7 sitios de muestreo analizados: (1) Mineral de Cata, Guanajuato, cercanía de la mina de plata; (2) Mezcala, Estado de Guerrero, cercanía de una mina de oro; (3) jardín de una casa en la Zona Industrial del Estado de San Luis Potosí; (4) Col. La Laguna en Lagos de Moreno, Jal.; (5) jardín de una casa en la col. Burócrata, Guanajuato; (6) Jardín de una casa en Lagos de Moreno, Jal., y (7) Real de Minas, Guanajuato; todos ellos con diferentes características físico-geográficas y grado de contaminación.

Los intervalos de concentración encontrados fueron los siguientes: 11.8 – 69.9 mg kg<sup>-1</sup> V; 6.10 – 37.4 mg kg<sup>-1</sup> Cr; 142 – 866 mg kg<sup>-1</sup> Mn; 2.90 – 20.5 mg kg<sup>-1</sup> Co; 1.00 – 26.9 mg kg<sup>-1</sup> Ni; 7.77 – 184 mg kg<sup>-1</sup> Cu; 70.5 – 328 mg kg<sup>-1</sup> Zn; 1.50 – 69.6 mg kg<sup>-1</sup> As; 0.40 – 5.51 mg kg<sup>-1</sup> Se; 0.20 – 16.7 mg kg<sup>-1</sup> Ag; 0.30 – 3.80 mg kg<sup>-1</sup> Cd; 0.10 – 3.81 mg kg<sup>-1</sup> Sb; 63.4-214 mg kg<sup>-1</sup> Ba; 1.80 – 29.0 mg kg<sup>-1</sup> Hg; 40.9 – 154 mg kg<sup>-1</sup> Pb (ver tabla 4.3).

De las siete muestras de suelo analizadas, el sitio 5, contenía las concentraciones más bajas de Cr, Co, As, Se, Cd, Sb, Hg y relativamente bajas concentraciones de otros metales. Para V, Cr, Co, Ni, Cu y Pb las concentraciones más altas fueron para el sitio 1, Mineral de Cata, cercanía a una mina de plata; para Ag, Hg y Mn se encontraron en jardín de casa Col. Burócrata (sitio 5), y para As fue el sitio 2 localizado en Mezcala, Gro., cercanía a una mina de oro.

La determinación de los mismos elementos en muestras homogenizadas y liofilizadas de tejido de lombriz revelaron los siguientes intervalos de concentraciones: 0.60 – 14.2 mg kg<sup>-1</sup> V; 0.54 – 8.77 mg kg<sup>-1</sup> Cr; 58.4 – 394 mg kg<sup>-1</sup> Mn; 1.57 – 20.6 mg kg<sup>-1</sup> Co; 0.51 – 16.7 mg kg<sup>-1</sup> Ni; 3.02 – 68.9 mg kg<sup>-1</sup> Cu; 63.2 – 224 mg kg<sup>-1</sup> Zn; 1.40 – 43.5 mg kg<sup>-1</sup> As; 0.26 – 5.44 mg kg<sup>-1</sup> Se; 0.42 – 7.00 mg kg<sup>-1</sup> Ag; 0.82 – 3.50 mg kg<sup>-1</sup> Cd; 0.06 – 3.45 mg kg<sup>-1</sup> Sb; 32.5-207 mg kg<sup>-1</sup> Ba; 0.25 – 22.6 mg kg<sup>-1</sup> Hg; 5.47 – 85.9 mg kg<sup>-1</sup> Pb (ver tabla 4.4).

**Tabla 4.3** Niveles de concentración de elementos encontrados en suelos en los siete sitios de muestreo recolectados (1) Mineral de Cata, Guanajuato, cercanía de la mina de plata; (2) Mezcala, Estado de Guerrero, cercanía de una mina de oro; (3) jardín de una casa en la Zona Industrial del Estado de San Luis Potosí; (4) Col. La Laguna en Lagos de Moreno, Jal.; (5) jardín de una casa en la col. Burócrata, Guanajuato; (6) Jardín de una casa en Lagos de Moreno, Jal., y (7) Real de Minas, Guanajuato.

Elemento	Valor promedio $\pm$ DS ( $\text{mg kg}^{-1}$ masa seca) para los sitios 1 - 7, basados en tres determinaciones independientes						
	1	2	3	4	5	6	7
$^{51}\text{V}$	$69.9 \pm 3.3$	$11.8 \pm 0.6$	$19.7 \pm 1.4$	$14.7 \pm 0.7$	$52.9 \pm 3.1$	$18.0 \pm 0.9$	$16.0 \pm 0.81$
$^{52}\text{Cr}$	$37.4 \pm 1.8$	$8.75 \pm 0.50$	$7.32 \pm 0.41$	$6.69 \pm 0.24$	$31.7 \pm 1.9$	$6.10 \pm 0.21$	$11.1 \pm 0.43$
$^{55}\text{Mn}$	$677 \pm 37$	$580 \pm 32$	$459 \pm 28$	$295 \pm 14$	$866 \pm 46$	$269 \pm 13$	$142 \pm 7$
$^{59}\text{Co}$	$20.5 \pm 1.4$	$3.48 \pm 0.11$	$9.11 \pm 0.22$	$3.19 \pm 0.14$	$11.1 \pm 0.2$	$2.90 \pm 0.12$	$6.70 \pm 0.33$
$^{60}\text{Ni}$	$26.9 \pm 1.4$	$10.7 \pm 0.6$	$5.01 \pm 0.10$	$4.73 \pm 0.18$	$21.4 \pm 0.3$	$4.30 \pm 0.10$	$1.00 \pm 0.04$
$^{63}\text{Cu}$	$184 \pm 9.5$	$19.9 \pm 0.6$	$16.3 \pm 0.4$	$11.9 \pm 0.52$	$140 \pm 6$	$11.0 \pm 0.53$	$7.77 \pm 0.36$
$^{68}\text{Zn}$	$234 \pm 12$	$116 \pm 6$	$70.5 \pm 2.8$	$328 \pm 16$	$122 \pm 5$	$299 \pm 14$	$242 \pm 13$
$^{75}\text{As}$	$28.9 \pm 1.6$	$69.6 \pm 3.1$	$2.81 \pm 0.16$	$1.66 \pm 0.09$	$18.7 \pm 1.3$	$1.50 \pm 0.04$	$6.32 \pm 0.34$
$^{82}\text{Se}$	$2.87 \pm 0.13$	$1.38 \pm 0.04$	$1.59 \pm 0.11$	$0.49 \pm 0.01$	$5.05 \pm 0.18$	$0.40 \pm 0.01$	$5.51 \pm 0.26$
$^{107}\text{Ag}$	$14.6 \pm 0.9$	$0.86 \pm 0.02$	$0.62 \pm 0.05$	$0.20 \pm 0.01$	$16.7 \pm 0.28$	$0.44 \pm 0.02$	$5.11 \pm 0.22$
$^{111}\text{Cd}$	$1.21 \pm 0.06$	$0.92 \pm 0.02$	$0.72 \pm 0.02$	$0.35 \pm 0.01$	$0.64 \pm 0.01$	$0.30 \pm 0.01$	$3.80 \pm 0.14$
$^{121}\text{Sb}$	$1.20 \pm 0.15$	$2.52 \pm 0.03$	$0.44 \pm 0.02$	$3.06 \pm 0.09$	$0.79 \pm 0.01$	$0.10 \pm 0.01$	$3.81 \pm 0.17$
$^{137}\text{Ba}$	$95.2 \pm 4.9$	$113 \pm 2.3$	$214 \pm 4.3$	$150 \pm 7.48$	$99.5 \pm 8.2$	$137 \pm 6.80$	$63.4 \pm 13.21$
$^{202}\text{Hg}$	$9.06 \pm 0.05$	$1.83 \pm 0.04$	$2.36 \pm 0.18$	$4.92 \pm 0.21$	$29.0 \pm 1.5$	$1.80 \pm 0.06$	$5.61 \pm 0.22$
$^{208}\text{Pb}$	$154 \pm 8.2$	$44.4 \pm 2.1$	$40.9 \pm 2.1$	$43.7 \pm 2.2$	$98.7 \pm 5.2$	$42.0 \pm 2.0$	$100 \pm 5$

**Tabla 4.4** Niveles de concentración de elementos encontrados en tejido de lombriz de tierra en los siete sitios de muestreo recolectados (1) Mineral de Cata, Guanajuato, cercanía de la mina de plata; (2) Mezcala, Estado de Guerrero, cercanía de una mina de oro; (3) jardín de una casa en la Zona Industrial del Estado de San Luis Potosí; (4) Col. La Laguna en Lagos de Moreno, Jal.; (5) jardín de una casa en la col. Burócrata, Guanajuato; (6) Jardín de una casa en Lagos de Moreno, Jal., y (7) Real de Minas, Guanajuato.

Elemento	Valor promedio $\pm$ DS ( $\text{mg kg}^{-1}$ masa seca) para los sitios 1 - 7, basados en tres determinaciones independientes						
	1	2	3	4	5	6	7
$^{51}\text{V}$	$4.24 \pm 0.21$	$14.2 \pm 0.7$	$5.57 \pm 0.31$	$2.94 \pm 0.13$	$14.2 \pm 0.7$	$0.60 \pm 0.02$	$4.14 \pm 0.11$
$^{52}\text{Cr}$	$2.67 \pm 0.13$	$8.77 \pm 0.40$	$2.61 \pm 0.09$	$2.96 \pm 0.09$	$8.62 \pm 0.41$	$0.54 \pm 0.02$	$3.91 \pm 0.09$
$^{55}\text{Mn}$	$58.4 \pm 2.9$	$394 \pm 20$	$220 \pm 12$	$167 \pm 8$	$348 \pm 18$	$166 \pm 8$	$111 \pm 6$
$^{59}\text{Co}$	$9.84 \pm 0.52$	$20.6 \pm 1.5$	$5.23 \pm 0.21$	$3.15 \pm 0.15$	$6.24 \pm 0.32$	$1.57 \pm 0.06$	$3.65 \pm 0.13$
$^{60}\text{Ni}$	$16.7 \pm 0.9$	$11.8 \pm 0.6$	$4.05 \pm 0.30$	$3.34 \pm 0.14$	$10.5 \pm 0.51$	$0.51 \pm 0.02$	$3.29 \pm 0.12$
$^{63}\text{Cu}$	$17.5 \pm 0.9$	$16.0 \pm 0.8$	$28.3 \pm 1.5$	$3.11 \pm 0.10$	$68.9 \pm 3.4$	$3.02 \pm 0.11$	$4.17 \pm 0.13$
$^{68}\text{Zn}$	$224 \pm 11$	$130 \pm 7$	$222 \pm 11$	$64.5 \pm 3.2$	$84.1 \pm 4.3$	$63.2 \pm 3.1$	$67.1 \pm 3.5$
$^{75}\text{As}$	$3.78 \pm 0.21$	$43.5 \pm 2.2$	$4.72 \pm 0.23$	$1.43 \pm 0.03$	$15.8 \pm 0.6$	$1.40 \pm 0.07$	$6.48 \pm 0.21$
$^{82}\text{Se}$	$3.10 \pm 0.56$	$2.22 \pm 0.10$	$2.17 \pm 0.18$	$0.76 \pm 0.07$	$5.44 \pm 0.31$	$0.26 \pm 0.10$	$3.54 \pm 0.11$
$^{107}\text{Ag}$	$0.42 \pm 0.03$	$0.63 \pm 0.06$	$0.48 \pm 0.06$	$3.14 \pm 0.11$	$7.00 \pm 0.42$	$0.53 \pm 0.02$	$3.64 \pm 0.10$
$^{111}\text{Cd}$	$2.46 \pm 0.02$	$0.82 \pm 0.08$	$3.14 \pm 0.16$	$1.78 \pm 0.06$	$1.02 \pm 0.18$	$1.73 \pm 0.06$	$3.50 \pm 0.13$
$^{121}\text{Sb}$	$0.65 \pm 0.06$	$2.48 \pm 0.18$	$0.06 \pm 0.01$	$2.69 \pm 0.07$	$0.57 \pm 0.02$	$0.45 \pm 0.02$	$3.45 \pm 0.10$
$^{137}\text{Ba}$	$83.0 \pm 4.2$	$142 \pm 7$	$207 \pm 10$	$124 \pm 6$	$85.3 \pm 5.2$	$126 \pm 6$	$32.5 \pm 1.1$
$^{202}\text{Hg}$	$6.74 \pm 0.32$	$0.25 \pm 0.01$	$0.44 \pm 0.02$	$4.59 \pm 0.17$	$22.6 \pm 1.7$	$0.78 \pm 0.04$	$4.87 \pm 0.14$
$^{208}\text{Pb}$	$85.9 \pm 5.2$	$47.0 \pm 1.90$	$5.47 \pm 0.18$	$6.00 \pm 0.24$	$59.2 \pm 3.0$	$5.77 \pm 0.29$	$41.0 \pm 1.2$

En estas tablas se puede observar que la variación en las concentraciones de elementos de interés de estudio en este trabajo, como lo es el arsénico, oscilan de 1.40 a 43.5 mgAs kg<sup>-1</sup> masa seca en tejido y de 1.5 a 69.6 mgAs kg<sup>-1</sup> masa seca en suelos, encontrándose el valor más alto en el sitio 2; estos valores coinciden con los ya reportados por Vijver y col. en 2007, quienes encontraron en tejido de lombriz de la especie *Rubellus* concentraciones de 4.71 a 58.4 mg As kg<sup>-1</sup> masa seca[124]; por otro lado, Langdon y col. en 2003 encontraron concentraciones de 2 a 5 mg As kg<sup>-1</sup> masa seca en tejido de lombriz perteneciente a la especie *Rubellus* en sitios no contaminados y de 97 a 321 mg As kg<sup>-1</sup> masa seca en sitios contaminados; mientras que, para la especie denominada *Dendrodriilus rubidus* se encontraron concentraciones de 7 a 17 mg As kg<sup>-1</sup> y de 162 a 566 mg As kg<sup>-1</sup> masa seca en sitios no contaminados y sitios contaminados respectivamente [125]. Valores muy similares fueron los reportados por Watt y col. en 2008, reportándose para *L. rubellus* valores de 11 a 595 mgAs kg<sup>-1</sup> masa seca y para la *D. rubidus* de 17 a 317 mgAs kg<sup>-1</sup> masa seca en sitios contaminados y de 7 mgAs kg<sup>-1</sup> masa seca en sitios no contaminados (sitios control), para cada una de las especies [119]. Por su parte, Button y colaboradores en 2009 reportaron concentraciones en tejido de lombriz en el intervalo de 11 a 877 mg kg<sup>-1</sup> masa seca[126].

En forma general para suelos, la concentración de arsénico es reportada en el intervalo de 0.1 a 40 mg As kg<sup>-1</sup> en sitios no contaminados, pero es importante señalar que las concentraciones de arsénico en suelos pueden variar de acuerdo a la región geográfica procedente. Tal es el caso, que en suelos expuestos a efluentes industriales y en áreas cercanas a minas, se han encontrado altos niveles de concentración de arsénico, con frecuencia concentraciones mayores a 100 mg As kg<sup>-1</sup> [127]. Ejemplo de esto, es el caso de Watt y colaboradores, quienes encontraron concentraciones demasiado altas en suelos contaminados ( 255 a 12, 466 mgAs kg<sup>-1</sup>), en comparación con sitios no contaminados (16 mgAs kg<sup>-1</sup>)[119]. Valores muy similares son los reportados por Button y col. quienes encontraron concentraciones que van desde 255 a 13, 080 mgAs kg<sup>-1</sup> en suelos[126], mientras que autores como Geiszinger en 1998 reportaron valores mucho menores ubicados en el intervalo de 5 a 79.7 mgAs kg<sup>-1</sup>[128].

Es relevante mencionar, que algunas fundaciones como por ejemplo, el Instituto de Control Ambiental de Finlandia ya ha tomado medidas preventivas al respecto y pretende regular los niveles de concentración de As en su país estableciendo como límite máximo permisible de arsénico en suelos de  $5 \text{ mg As kg}^{-1}$  [127].

Por otro lado y no menos importante, los resultados obtenidos en este trabajo han suministrado valores de concentraciones de otro metal bastante tóxico, el mercurio, y que es muy común encontrar en el medio ambiente. El intervalo de concentraciones de Hg encontrado oscilaba de  $0.25$  a  $22.6 \text{ mg Hg kg}^{-1}$  masa seca en tejido y de  $1.8$  a  $29 \text{ mg Hg kg}^{-1}$  masa seca en suelos, hallándose la concentración más alta en el sitio 5. Aquí, es importante mencionar que para este sitio de muestreo (jardín de una casa en la colonia Burócrata, Guanajuato), ya se han reportado con anterioridad altos índices de concentración de mercurio en agua de grifo que sobrepasaba el nivel máximo permisible por la NOM-127 SSA1-1994 de  $1 \text{ } \mu\text{gHg L}^{-1}$  [34]. Este valor, es solo un parámetro para poder visualizar el grado de contaminación de este sitio, en el cual, si el agua de consumo humano ya esta contaminada, los suelos y por tanto las lombrices que en ellos habitan, no están exentas de alcanzar esta contaminación. Por su parte, la fundación US Food and Drug Administration ha establecido como nivel máximo permisible de  $1 \text{ mgHg kg}^{-1}$  [95] en productos marinos como el pescado, el cual es uno de los alimentos mayormente consumidos dentro de la población en general.

Recientemente investigaciones, como la realizada por Zhang y col. en 2009 en la ciudad industrial de Huludao, provincia de Liaoning ubicada al noreste de China encontraron concentraciones de mercurio total  $< 5.46 \text{ mg Hg kg}^{-1}$  masa seca en tejido de lombriz y de  $2.04$  a  $15.23 \text{ mg Hg kg}^{-1}$  en suelos[90]. Estos valores parecen corroborar los resultados obtenidos en este trabajo, variando de acuerdo al lugar geográfico y tipo de suelo (industrial, minero, jardín, etc.)

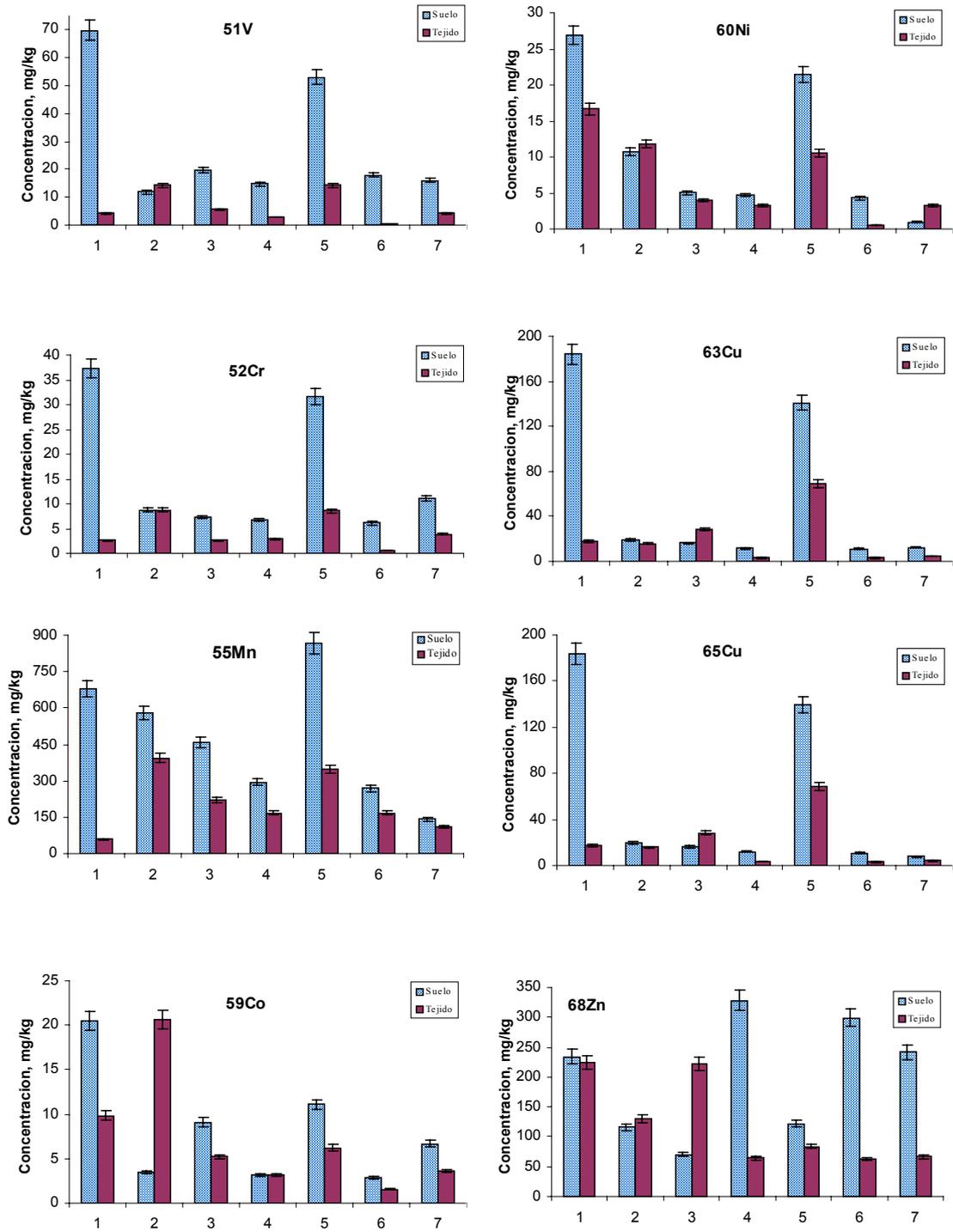
Con el fin de observar claramente las diferencias entre el contenido de elementos en los diferentes sitios de muestreo, los mismos resultados se presentan en forma de gráficas en las figuras 4.2, 4.3 y 4.4. Así, en la figura 4.2 se presentan los resultados obtenidos para  $^{51}\text{V}$ ,  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$  y  $^{68}\text{Zn}$ , en la figura 4.3 aquellos correspondientes a  $^{75}\text{As}$ ,  $^{78}\text{Se}$ ,  $^{82}\text{Se}$ ,  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{109}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{114}\text{Cd}$ ,  $^{121}\text{Sb}$  y en la figura 4.4 los resultados para  $^{137}\text{Ba}$ ,  $^{200}\text{Hg}$ ,  $^{202}\text{Hg}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$ . Para algunos elementos (Cu, Cd, Se, Ag, Hg, Pb) se presentan los resultados de determinación obtenidos para dos diferentes isótopos, mismos que demuestran que no se presentaron importantes interferencias espectrales en la etapa de determinación.

En estas figuras se puede observar que los suelos de siete sitios de muestreo contienen diferentes niveles de concentración de la mayoría de los elementos. De manera general se han encontrado concentraciones:  $< 5\text{ mg kg}^{-1}$  para el Cd y Sb; de 5 a  $70\text{ mg kg}^{-1}$  para V, Cr, Co, Ni, As, Se, Ag y Hg;  $> 70\text{ mg kg}^{-1}$  para el Mn, Cu, Zn, Ba, Pb. Los resultados obtenidos indican la adecuada selección de los sitios del estudio, puesto que se ha cubierto relativamente un amplio intervalo de las concentraciones de metales/metaloides a los que estuvieron expuestas las lombrices. Por otro lado, es importante hacer notar que, los niveles de elementos en masa seca de lombrices no fueron elevados comparando con los respectivos niveles en suelos, por lo que se deduce que no ocurre la acumulación o bioconcentración de elementos en estos organismos. Tal vez se podría mencionar el cadmio y selenio, como dos elementos que aparentemente presentan tendencia hacia mayores concentraciones en tejido respecto a suelo.

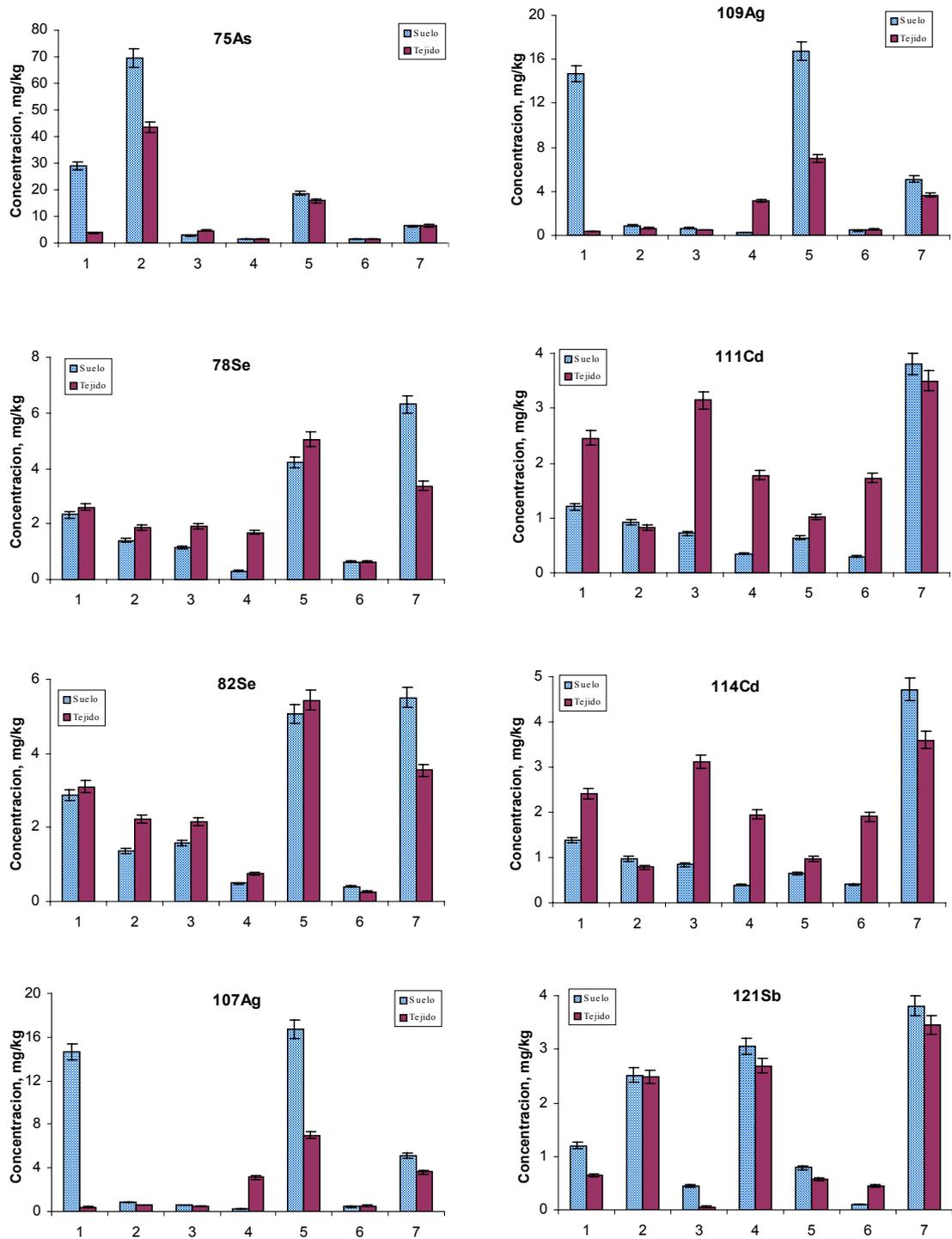
El factor de bioconcentración (BCF) fue calculado como la relación de la concentración del metal en masa seca con respecto a la concentración en suelos [129], lo cual confirma los datos reportados para As [119, 126, 130], Hg [90, 131] y otros elementos [132-134]. Por otra parte, también es importante mencionar, sin menospreciar los altos valores de BCF observados para el sitio 2 (área de una mina de oro), lo cual confirma que las condiciones particulares del suelo en cuestión pueden provocar la ingesta de metales [124, 135]. Para el Se, los valores del BCF para todos los sitios de muestreo fueron relativamente más altos con respecto a otros elementos (en el intervalo de 1.1 - 5.6), aún en estos tejidos no se encontraron bajas concentraciones de este elemento.

En el análisis estadístico de las concentraciones de elementos totales en suelo y tejido, se observó una correlación estadísticamente significativa para Mn ( $\beta = 0.8948$ ,  $p = 0.007$ ), Co ( $\beta = 0.9797$ ,  $p = 0.000$ ), Zn ( $\beta = 0.8188$ ,  $p = 0.024$ ), As ( $\beta = 0.9921$ ,  $p = 0.003$ ), Se ( $\beta = 0.8048$ ,  $p = 0.029$ ), Ag ( $\beta = 0.8897$ ,  $p = 0.007$ ), Sb ( $\beta = 0.9784$ ,  $p = 0.000$ ), Hg ( $\beta = 0.9930$ ,  $p = 0.000$ ) and Pb ( $\beta = 0.9429$ ,  $p = 0.001$ ), y menor para otros elementos (V, Cr, Ni, Cu, Cd) para los cuales se observó una relación estadística poco significativa ( $p > 0.1$ ). De forma similar la asociación directa entre los niveles de concentración en suelo y tejido con respecto a diferentes elementos ha sido previamente reportada[136-139], aún así, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que las lombrices de tierra pueden ser usados satisfactoriamente como bioindicadores de la biotransformación de los elementos de sus formas inorgánicas a sus formas alquiladas. Por otro lado los procesos de metilación para el As, Hg, Sb y Se asistida por microorganismos tienen bien establecidos los procesos que ocurren en diferentes compartimientos del medio ambiente[87, 140].

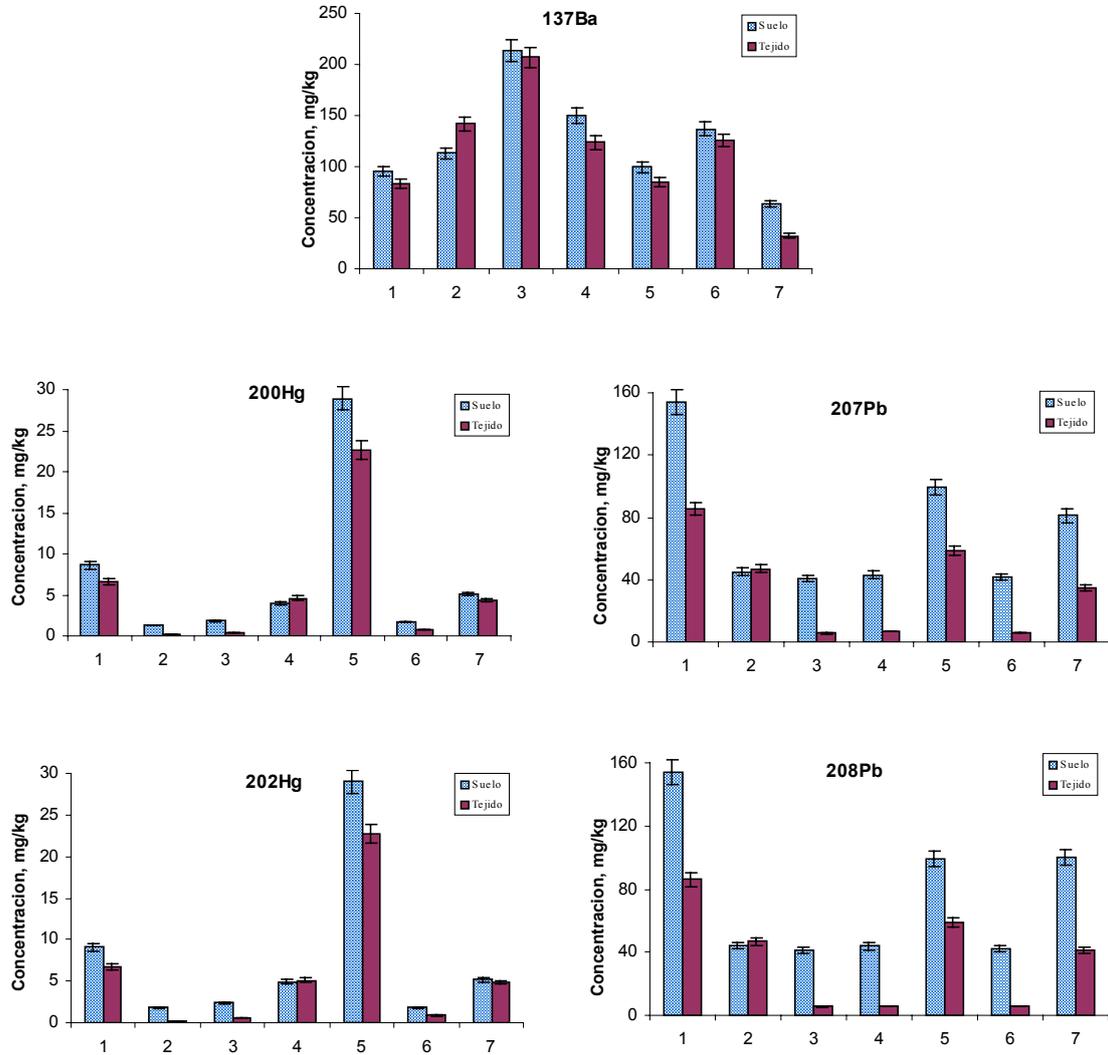
Dentro del contexto de este trabajo, surge una interrogación, si al observar una correlación directa entre el contenido de elementos en suelo y tejido podría ser adscrito a una mejor biodisponibilidad de las especies alquiladas versus las especies inorgánicas presentes en suelos, o podría ser relacionado con la metilación que está ocurriendo metabólicamente en los organismos de la lombriz de tierra. Se propuso realizar el análisis de especiación en muestras de suelo y de extracto de tejido. Basándose en estudios recientes[90, 119, 126] tanto como en las determinaciones de elementos totales, el As y el Hg fueron propuestos para su análisis de especiación en las muestras provenientes de los sitios 1, 2, 4, 5 y 7.



**Figura 4.2** Resultados de determinación de  $^{51}\text{V}$ ,  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{65}\text{Cu}$  y  $^{68}\text{Zn}$  en suelos y tejido de lombrices en 7 sitios de muestreo. (En cada uno de casos se presenta el valor promedio  $\pm$  desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).



**Figura 4.3** Resultados de determinación de  $^{75}\text{As}$ ,  $^{78}\text{Se}$ ,  $^{82}\text{Se}$ ,  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{109}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{114}\text{Cd}$ ,  $^{121}\text{Sb}$  en suelos y tejido de lombrices en 7 sitios de muestreo. (En cada uno de los casos se presenta el valor promedio  $\pm$  desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).



**Figura 4.4** Resultados de determinación de  $^{137}\text{Ba}$ ,  $^{200}\text{Hg}$ ,  $^{202}\text{Hg}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{208}\text{Pb}$  en suelos y tejido de lombrices en 7 sitios de muestreo. (En cada uno de los casos se presenta el valor promedio  $\pm$  desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).

## 4.5 CONCLUSIONES

- 1) Se seleccionaron siete sitios de muestreo, en donde se encontraron relativamente amplios rangos de concentración de elementos metálicos y metaloides en suelo.
- 2) La determinación de las concentraciones totales de los elementos en suelos y en tejidos de lombrices provenientes de los mismos sitios de muestreo demostraron que no ocurre la acumulación de elementos en tejido de estos organismos, posiblemente excepto Se y Cd.
- 3) Se ha encontrado la correlación estadísticamente significativa entre los niveles de algunos elementos en suelo y tejido: Mn ( $\beta = 0.8948$ ,  $p = 0.007$ ), Co ( $\beta = 0.9797$ ,  $p = 0.000$ ), Zn ( $\beta = 0.8188$ ,  $p = 0.024$ ), As ( $\beta = 0.9921$ ,  $p = 0.003$ ), Se ( $\beta = 0.8048$ ,  $p = 0.029$ ), Ag ( $\beta = 0.8897$ ,  $p = 0.007$ ), Sb ( $\beta = 0.9784$ ,  $p = 0.000$ ), Hg ( $\beta = 0.9930$ ,  $p = 0.000$ ) and Pb ( $\beta = 0.9429$ ,  $p = 0.001$ ).
- 4) Los resultados obtenidos sugieren que, para estos elementos las lombrices podrían servir como bioindicadores de sus niveles actuales en suelos.
- 5) Para entender mejor el proceso de captación de mercurio y arsénico por las lombrices, se han seleccionado cinco sitios de muestreo para realizar los estudios de especiación.

## CAPITULO 5

# **“DETERMINACIÓN DE $\text{Hg}^{2+}$ y $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ EN SUELO Y EN TEJIDO DE LOMBRICES DE TIERRA MEDIANTE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN EN LÍNEA POR ICP-MS”**

## 5.1. INTRODUCCIÓN

Como ya se menciona en el capítulo 3, el mercurio es uno de los elementos más tóxicos en sus diferentes formas fisicoquímicas (especies) y con alto impacto dentro del medio ambiente (agua, suelo, organismos vivos), haciendo que muchas de las investigaciones realizadas en todo el mundo centren su atención en él.

Continuando con el estudio de las lombrices de tierra y su habilidad para ingerir diferentes elementos metálicos y metaloides (en especial para este trabajo Hg y As), es importante tener en cuenta, que estos organismos son componentes esenciales dentro de la cadena alimenticia y ocupan un alto nivel nutritivo, lo cual podría ocasionar que la salud de algunos animales que se alimentan con estas lombrices se viera alterada, ya que el mercurio podría transferirse de unos a otros a través de la cadena alimenticia e incrementar su nivel de toxicidad debido a su poder de biomagnificación, convirtiéndose así en una seria amenaza para la estabilidad de los seres vivos[90].

Por tal motivo y con base en los resultados obtenidos en un estudio previo (ver capítulo 4), se encontró una correlación estadísticamente significativa entre niveles de Mn, Co, Zn, Hg, As, Se, Sb, Pb, en suelos y en tejido de lombrices provenientes de diferentes regiones en México. Se analizaron siete sitios de muestreo: (1) Mineral de Cata, Guanajuato, cercanía de la mina de plata; (2) Mezcala, Estado de Guerrero, cercanía de una mina de oro; (3) jardín de una casa en la Zona Industrial del Estado de San Luis Potosí; (4) Col. La Laguna en Lagos de Moreno, Jal; (5) jardín de una casa en la col. Burócrata, Guanajuato; (6) Jardín de una casa en Lagos de Moreno, Jal y (7) Real de Minas, Guanajuato.

Para profundizar en este tema, se optó por realizar la especiación de Hg para obtener datos cuantitativos de las dos principales especies de mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) en las mismas muestras (suelo y tejido), para esto se seleccionaron cinco sitios de muestreo: 1, 2, 4, 5 y 7, para los cuales las concentraciones encontradas en suelo y tejido fueron  $9.06 \pm 0.05$  mgHg kg<sup>-1</sup> y  $6.74 \pm 0.32$  mgHg kg<sup>-1</sup> para el sitio 1;  $1.83 \pm 0.04$  mgHg kg<sup>-1</sup> y  $0.25 \pm 0.01$  mgHg kg<sup>-1</sup> para el sitio 2;  $4.92 \pm 0.21$  mgHg kg<sup>-1</sup> y  $4.59 \pm 0.17$  mgHg kg<sup>-1</sup> para el sitio 4,  $29.0 \pm 1.5$  mgHg kg<sup>-1</sup> y  $22.6 \pm 1.7$  mgHg kg<sup>-1</sup> para el sitio 5,  $5.61 \pm 0.22$  mgHg kg<sup>-1</sup> y  $4.87 \pm 0.14$  mgHg kg<sup>-1</sup> para el sitio 7. Todas ellas en masa seca.

El presente trabajo tiene la finalidad de realizar la separación / cuantificación de las principales especies de mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) presentes en suelos y tejido de lombriz de tierra, empleando la metodología desarrollada previamente para el análisis de estas especies en tejido de pescado fresco y utilizando el  $\text{Bi}^{3+}$  como EI (*trabajo publicado*)[104] (ver capítulo 3). Esta metodología fue cambiada ligeramente para adaptarla al análisis de tejido de lombriz de tierra, el cual contiene menor cantidad de lípidos que el pescado.

## 5.2. OBJETIVO PARTICULAR

Determinar y cuantificar  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  en suelo y en tejido de lombriz mediante separación por cromatografía de líquidos con detección específica de Hg por ICP-MS, para una mejor comprensión del rol de las lombrices como posibles bioindicadores del grado de contaminación con mercurio en suelos.

## 5.3. MATERIALES Y METODOS

### 5.3.1 Instrumentación

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de Agilent serie 1200 y la columna efluente fue introducida al sistema de espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) vía tubería de Teflón de corta longitud. La columna analítica fue Gemini C18 (150 x 3 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) de Phenomenex. Para obtener los perfiles de elución de mercurio en la separación cromatográfica, se utilizó el espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) 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 con enfriamiento 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 5.1.

**Tabla 5.1** Condiciones instrumentales para el sistema HPLC-ICP-MS en la especiación de mercurio en suelo y tejido de lombriz.

***HPLC-ICP-MS—Análisis de especiación de mercurio***

Columna	Gemini C18 (150mm×3mm, 5µm)
Fase móvil	2.5 mmol L <sup>-1</sup> L-cisteína, 12.5 mmol L <sup>-1</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0.05% trietilamina, pH 7.0:metanol (96:4)
Temperatura	Ambiente
Flujo	0.6 mL min <sup>-1</sup>
Volúmen inyectado	20 µL
Potencia	1500W
Gas nebulizador	0.85 mL min <sup>-1</sup>
Gas Make-up	0.15mL min <sup>-1</sup>
Introducción de muestra	MiraMist Teflón® nebulizer
Conos muestra y skimmer	Níquel
Profundidad muestra	10mm
Isótopos monitoreados	<sup>202</sup> Hg, <sup>200</sup> Hg, <sup>209</sup> Bi
Modo de adquisición	Time-resolved analysis
Tiempo de integración	60ms

**5.3.2 Reactivos, disoluciones y muestras**

Los reactivos fueron del grado analítico, se utilizó el agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco, USA), metanol de grado HPLC y cloroformo de grado analítico (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA). Las soluciones estándar de las dos especies de mercurio a una concentración de 1000 mgHg L<sup>-1</sup> se prepararon disolviendo yoduro de metilmercurio (CH<sub>3</sub>HgI, Sigma) en metanol y cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>, Sigma) en ácido nítrico al 1 % y se almacenaron en frascos ámbar a 4° C. La solución patrón del estándar interno (1000 mgBi L<sup>-1</sup>) fue preparada por disolución de nitrato de bismuto (Sigma) en 1% de ácido nítrico. Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas diariamente a la dilución apropiada.

Se utilizaron los siguientes reactivos: ácido perclórico (Baker), ácido fosfórico (Aldrich), ácido nítrico (Fluka), L-cisteína (Sigma), fosfato de amonio dibásico (Sigma), trietilamina (Fluka), hidróxido de potasio (Sigma) y peróxido de hidrógeno (Sigma).

Dado que la metodología que se empleó fue la desarrollada en el capítulo 3 en el análisis de tejido fresco de pescado, el procedimiento analítico fue adaptado al análisis de los dos tipos de muestra (suelo y tejido), con base en el procedimiento desarrollado previamente[104].

### 5.3.3 Procedimientos analíticos

Cada análisis se llevó a cabo por triplicado y en paralelo se corrió el blanco. Para asegurar la representatividad de las sub-muestras, el tejido de lombriz de tierra fue cortado en pedazos pequeños y congelado / descongelado varias veces [84].

#### 5.3.3.1 Determinación de mercurio total

El protocolo de determinación de mercurio total en las muestras de suelo y tejido de lombriz y del contenido de humedad se desarrollo en el capítulo anterior (ver capítulo 4).

#### 5.3.3.2 Especiación analítica de mercurio

El procedimiento reportado previamente para tejido de pescado fue ligeramente modificado[104]. En breve, tres alícuotas (0.4 a 0.5 g) de tejido fresco o tierra seca se colocaron en tubos Falcón de 15mL, 125  $\mu\text{L}$  de EI ( $1000 \mu\text{gBi}^{3+} \text{L}^{-1}$ ) fueron adicionados y se procedió a su homogenización (politrón), en presencia de ácido perclórico (1.5mL,  $0.6 \text{mol L}^{-1}$ ), L-cisteína ( $500 \mu\text{L } 0.75 \text{mol L}^{-1}$ ) y 500  $\mu\text{L}$  de la mezcla metanol:cloroformo (1:1) de 0.5 a 2 minutos, dependiendo de la muestra. Las mezclas fueron colocadas en el baño de ultrasonido por 1 h, centrifugadas (10000 g, 10 min) y se tomaron 1000  $\mu\text{L}$  de la fase acuosa a la cual se le agregaron 70  $\mu\text{L}$  de hidróxido de potasio  $9 \text{mol L}^{-1}$  para neutralizar el exceso ácido perclórico a un pH 5. Nuevamente, las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 10000g. Después de la centrifugación, el sobrenadante se diluyó apropiadamente con la fase móvil y se introdujeron al sistema HPLC-ICP-MS. Las condiciones de separación y detección se resumen en la tabla 5.1. La calibración externa se llevo a cabo mediante una serie de de soluciones estándar que contenían  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  en concentraciones de 0, 5, 10, 25 y 50  $\mu\text{gHg L}^{-1}$  cada uno y el EI ( $10 \mu\text{gBi L}^{-1}$ ).

Para los experimentos de recuperación, una de las especies mercuriales ( $\text{Hg}^+$  o  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) fue añadida al tejido fresco en concentraciones de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  conjuntamente con el EI. Estas mismas concentraciones fueron usadas para el método de adición de estándar, sin

embargo, para este caso las dos especies de mercurio ( $\mu\text{gHg L}^{-1}$  fueron añadidas a la muestra en forma simultánea). El blanco siempre se corrió paralelamente con las muestras.

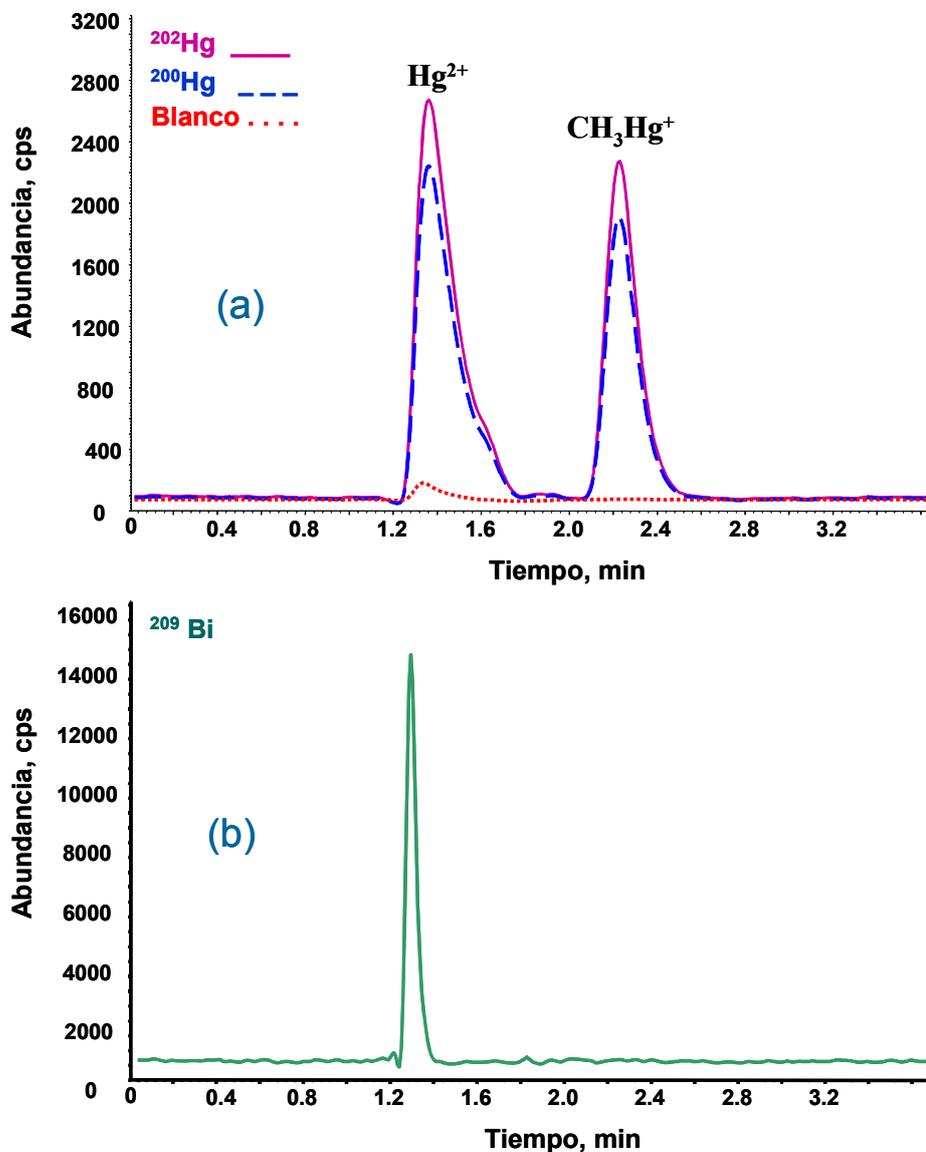
Los resultados obtenidos están expresados como mg de Hg por kg de masa seca (después de corrección para el contenido de humedad).

## 5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación de mercurio inorgánico ( $\text{Hg}^+$ ) y metil mercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) se llevó a cabo en las muestras de suelo y de tejido, usando el procedimiento de especiación reportado previamente[104]. En orden al mejoramiento del procedimiento analítico, el bismuto (como nitrato de bismuto) fue usado como estándar interno.

En la figura 5.1 se presenta el cromatograma obtenido en el análisis de la solución estándar de las dos especies ( $30 \mu\text{gHg L}^{-1}$  de cada una para los isótopos de mercurio  $^{200}\text{Hg}$  y  $^{202}\text{Hg}$ ), el blanco y el estándar interno ( $10 \mu\text{gBi L}^{-1}$ ). Aquí se observa que el isótopo más abundante es el  $^{202}\text{Hg}$ , el cual se utilizó para el análisis cuantitativo. Por otro lado, los picos cromatográficos para ambas especies son bastante similares (sustrayendo el área del blanco al área del mercurio inorgánico). El tiempo total de separación en línea de las especies se obtuvo en 3.0 minutos y se comparó con el obtenido por otros autores [71, 81, 104].

Los tiempos de retención obtenidos fueron mercurio inorgánico  $1.31 \pm 0.02$ , metilmercurio  $2.09 \pm 0.03$  y bismuto  $1.31 \pm 0.02$  minutos ( $n=5$ ) respectivamente. La co-elución del mercurio inorgánico y el bismuto se obtuvieron en tiempos iguales, demostrando de esta manera, un comportamiento muy similar en la columna cromatográfica asegurando el buen funcionamiento del EI en la especiación de Hg mediante HPLC-ICP-MS.



**Figura 5.1** Ejemplo de cromatograma obtenido en el análisis de una solución estándar: (a) de las dos especies (cada una  $30 \mu\text{gHg L}^{-1}$ ) y el blanco, (b) el EI ( $10 \mu\text{gBi}$ ).

Por otra parte, en la figura 5.2 se presentan los cromatogramas obtenidos en el análisis de las muestras (suelo y tejido) con EI, para suelo y extracto de tejido proveniente del sitio 1 (Mineral de Cata). Se puede apreciar una concordancia en los tiempos de retención de las especies en las muestras con respecto a los estándares.

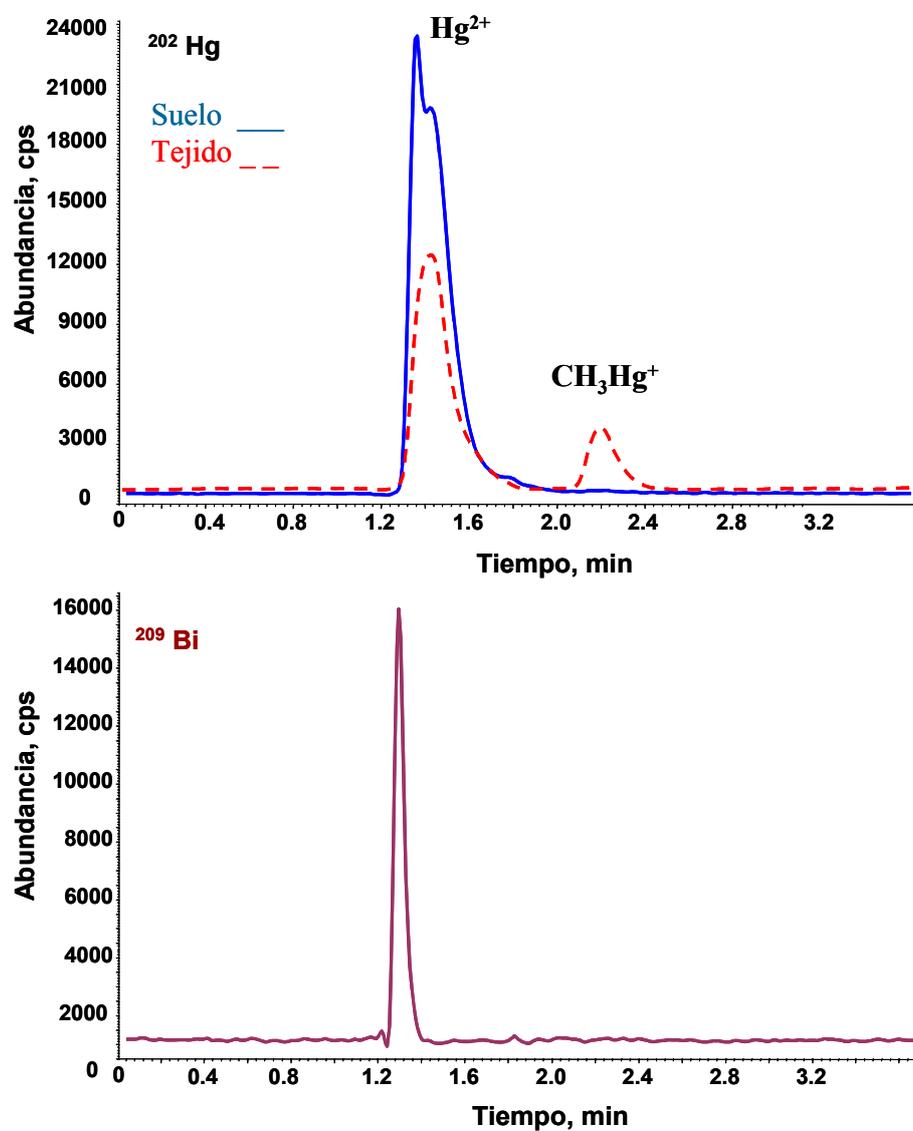


Figura 5.2 Ejemplo de cromatograma HPLC-ICP-MS obtenido en el análisis de: a) suelo y extracto de tejido de lombriz del sitio 1 (Mineral de Cata) y (b) el EI  $10 \mu\text{g Bi L}^{-1}$ .

Estos cromatogramas muestran la presencia de mercurio inorgánico como especie predominante en las muestras de suelos analizadas, mientras que en el tejido aparecen tanto el  $\text{Hg}^{2+}$  como  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ . La importancia de la especiación de mercurio en las muestras de suelo y tejido es muy importante, si es que queremos comprender mejor el papel que juegan las lombrices de tierra en el ciclo biogeoquímico del mercurio en los suelos y la eficiencia de metilación en tejido.

La recuperación obtenida en el procedimiento de entrada, evaluada como la razón entre la suma de las concentraciones de las especies de  $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$  obtenidas en el análisis de especiación y el Hg total determinado por ICP-MS, se encontraron en el intervalo de 52-96% y 37-71% para las muestras de tejido y suelo respectivamente con calibración externa y de 56-84% y 41-73% con adición de estándar, sin el EI. Por otro lado, al utilizar el EI los porcentaje sde recuperación mejoraron notablemente obteniéndose 88-96% y 46-75% para las muestras de tejido y suelo respectivamente con calibración externa y de 91-98% y 46-76% con adición de estándar.

En la tabla 5.2, se presentan los resultados obtenidos para las dos especies de mercurio y para el Hg total para los cinco sitios de muestreo seleccionados (1,2,4,5, 7) para su análisis de especiación. Como se puede observar, el mercurio inorgánico fue la especie predominante en las muestras de suelos mientras que el metilmercurio fue encontrado solo en el sitio 5 ( $1.95 \pm 0.09 \text{ mg kg}^{-1}$  masa seca) caracterizado por concentraciones relativamente elevadas de mercurio ( $29.0 \pm 1.5 \text{ mg kg}^{-1}$  masa seca). Por otro lado, las dos especies fueron observadas en el tejido de lombriz, excepto para el sitio 2 que tiene bajos niveles de mercurio en tejido ( $0.25 \pm 0.01 \text{ mg kg}^{-1}$  masa seca). Estos resultados indican que las lombrices no solo son, una buena alternativa para la ingesta de estas dos especies comunes del elemento en el suelo [90, 131], sino que también presentan la capacidad para la conversión del Hg inorgánico a la forma metilada.

**Tabla 5.2** Resultados obtenidos en la determinación de las especies de mercurio en tejido de lombriz para los tres sitios de muestreo.

Resultados Obtenidos en la Determinación de Hg <sup>2+</sup> y CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup> en tejido de lombriz de tierra en cinco sitios de muestreo				
Metodo	CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup> mgHg kg <sup>-1</sup> (masa seca) ± DE		Hg <sup>2+</sup> mgHg kg <sup>-1</sup> (masa seca) ± DE	
	Calibración externa	Adición de estándar	Calibración externa	Adición de estándar
<b>Sitio 1: Tejido de Lombriz de Mineral de Cata ( Hg total 6.74 ± 0.32 mg kg<sup>-1</sup>)</b>				
Procedimiento propuesto sin EI	0.87 ± 0.04	0.90 ± 0.05	4.06 ± 0.20	4.25 ± 0.21
Procedimiento propuesto con EI	1.61 ± 0.07	1.67 ± 0.08	4.79 ± 0.32	4.82 ± 0.23
<b>Sitio 2: Tejido de Lombriz de Mezcala, Guerrero ( Hg total 0.25 ± 0.01 mg kg<sup>-1</sup>)</b>				
Procedimiento propuesto sin EI	No detectado	No detectado	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01
Procedimiento propuesto con EI	No detectado	No detectado	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.02
<b>Sitio 4: Tejido de Lombriz de la Laguna, Jalisco ( Hg total 4.59 ± 0.17 mg kg<sup>-1</sup>)</b>				
Procedimiento propuesto sin EI	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.01	3.29 ± 0.16	3.51 ± 0.17
Procedimiento propuesto con EI	0.37 ± 0.03	0.38 ± 0.01	4.05 ± 0.25	4.13 ± 0.21
<b>Sitio 5: Tejido de Lombriz de Jardín de casa col. Burocrata Gto., ( Hg total 22.6 ± 1.7 mg kg<sup>-1</sup>)</b>				
Procedimiento propuesto sin EI	3.51 ± 0.069	3.86 ± 0.18	14.4 ± 0.76	15.1 ± 0.76
Procedimiento propuesto con EI	4.81 ± 0.24	4.90 ± 0.25	16.7 ± 1.02	16.8 ± 1.05
<b>Sitio 7: Tejido de Lombriz de Real de Minas ( Hg total 4.87 ± 0.14 mg kg<sup>-1</sup> peso seco)</b>				
Procedimiento propuesto sin EI	0.36 ± 0.02	0.38 ± 0.02	3.31 ± 0.17	3.47 ± 0.16
Procedimiento propuesto con EI	0.44 ± 0.03	0.44 ± 0.02	4.08 ± 0.23	3.99 ± 0.19

Como se puede observar para la mayoría de las muestras analizadas los valores obtenidos mediante cuantificación por calibración externa y adición de estándar son muy similares. Sin embargo en algunas de ellas y dependiendo de la especie en cuestión se presentaron algunas diferencias; éstas podrían deberse a errores acaecidos en el proceso de extracción o debido a la instrumentación, para ello se utilizó el Bi<sup>3+</sup> como EI. Con el uso del EI se aprecia una mejora notablemente los resultados obtenidos, siendo mayor la similitud entre los valores determinados para tejido y suelo mediante su cuantificación por calibración externa y adición de estándar para Hg<sup>2+</sup> y CH<sub>3</sub>Hg<sup>+</sup>.

**Tabla 5.3** Resultados obtenidos en la determinación de las especies de mercurio en suelo para los cinco sitios de muestreo seleccionados.

Resultados obtenidos en la deteminacion de Hg y CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup> en suelo de cinco sitios de muestreo.				
Metodo	CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup> mgHg kg <sup>-1</sup> (masa seca) ± DE		Hg <sup>2+</sup> mgHg kg <sup>-1</sup> (masa seca) ± DE	
	Calibración externa	Adición de estándar	Calibración externa	Adición de estándar
Sitio 1: Suelo de Lombriz de tierra de Mineral de Cata (Hg total 9.06 ± 0.05 mg kg <sup>-1</sup> )				
Procedimiento propuesto sin EI	No detectado	No detectado	4.34 ± 0.27	3.99 ± 0.19
Procedimiento propuesto con EI	No detectado	No detectado	4.46 ± 0.20	4.47 ± 0.21
Sitio 2: Suelo de Mezcala, Guerrero (Hg total 1.83 ± 0.04 mg kg <sup>-1</sup> )				
Procedimiento propuesto sin EI	No detectado	No detectado	0.76 ± 0.04	0.79 ± 0.04
Procedimiento propuesto con EI	No detectado	No detectado	0.84 ± 0.06	0.85 ± 0.06
Sitio 4: Suelo de La Laguna, Jalisco (Hg total 4.92 ± 0.21 mg kg <sup>-1</sup> )				
Procedimiento propuesto sin EI	No detectado	No detectado	2.14 ± 0.10	2.19 ± 0.11
Procedimiento propuesto con EI	No detectado	No detectado	2.98 ± 0.18	2.99 ± 0.17
Sitio 5: Suelo de Lombriz de tierra de jardín de casa col. Burocrata Gto., (Hg total 29.0 ± 1.5 mg kg <sup>-1</sup> )				
Procedimiento propuesto sin EI	1.92 ± 0.09	1.92 ± 0.09	18.8 ± 0.91	19.2 ± 0.98
Procedimiento propuesto con EI	1.95 ± 0.09	1.96 ± 0.09	19.8 ± 1.2	20.0 ± 1.02
Sitio 7: Suelo de Lombriz de tierra de Real de Minas, Gto., (Hg total 5.61 ± 0.30 mg kg <sup>-1</sup> )				
Procedimiento propuesto sin EI	No detectado	No detectado	2.17 ± 0.09	2.28 ± 0.10
Procedimiento propuesto con EI	No detectado	No detectado	2.85 ± 0.12	2.88 ± 0.13

Por otro lado, en la tabla 5.4 se presentan los resultados del rendimiento de extracción obtenidos para el mercurio total en suelo y tejido, para los tres sitios de muestreo analizados. En ella se puede observar, que los porcentajes de rendimiento fueron mucho mejores en los tejidos que en los suelos para los sitios 1 y 7, mientras que para el sitio 5, los rendimientos son muy similares. Por otra parte, también se puede apreciar la ventaja de utilizar el EI ya que con su uso se mejora el rendimiento de extracción de mercurio total, corrigiendo de esta manera, la posible falta de una completa extracción de las especies de mercurio en el pretratamiento, errores instrumentales y/o analíticos.

**Tabla 5.4** Rendimiento de extracción del mercurio total ( $\text{Hg}^{2+} + \text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) en suelo y tejido evaluado utilizando diferentes procedimientos en el sitio 1,2,4, 5 y 7.

Procedimiento	Rendimiento: $R = [c(\text{Hg}^{2+}) + c(\text{CH}_3\text{Hg}^+)] / c(\text{Hg})_{\text{tot}} \times 100 \%$									
	Sitio 1: Mineral de Cata		Sitio 2: Mineral de Cata		Sitio 4: La Laguna		Sitio 5: Jardín col.Burocrata		Sitio 7: Real de Minas	
	Tejido	Suelo	Tejido	Suelo	Tejido	Suelo	Tejido	Suelo	Tejido	Suelo
Sin EI	73±3.8%	48± 2.6%	52±2.1%	41±2.0	96± 4.9%	43± 2.5%	76± 3.7%	71± 3.6%	75± 3.6%	37± 1.8%
Con EI	95±4.6%	49± 2.2%	88±4.5%	46±2.2%	96± 4.8%	61± 2.9%	95± 4.3%	75± 3.9%	93± 4.7%	51± 2.7%

Como ya se menciona en el capítulo 3, podría existir inter-conversión de las especies mercuriales en alguna etapa de la extracción, para verificar tal acción, se comprobó adicionando en forma separada una cantidad conocida de cada una de las especies mercuriales ( $\text{Hg}^{2+}/\text{MeHg}^+$ ) con y sin EI. En la tabla 5.5 se presentan los resultados obtenidos en análisis de inter-conversión de las especies. En ella se puede observar claramente que la recuperación para cada especie es prácticamente del 100% , confirmando de esta manera que no existe inter conversión entre las especies de mercurio analizadas.

**Tabla 5.5** Resultados de recuperación obtenidos en el análisis de tejido de lombriz de tierra con y sin EI para las dos especies de mercurio\*

Especies determinadas	Concentración de especies ± DE $\mu\text{g L}^{-1}$				Recuperación %	
	Especies adicionadas		Concentración detectada		Con EI	Sin EI
	$\text{Hg}^{2+}$	$\text{CH}_3\text{Hg}^+$	Con EI	Sin EI		
$\text{Hg}^{2+}$	50	0	50.3 ± 2.5	47.6 ± 2.2	100.6	95.0
$\text{CH}_3\text{Hg}^+$	0	50	49.5 ± 1.7	49.4 ± 1.9	99.0	98.8

\*este estudio se realizó utilizando tejido del sitio (1) Mineral de Cata,Gto.

Por otra parte, en la tabla 5.6 se comparan algunos parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración con y sin el uso de EI. Se puede observar que el uso del EI, permite mejorar algunos de los parámetros determinados.

**Tabla 5.6** Parámetros analíticos evaluados para las dos especies de mercurio sin y con el uso de EI.

Parámetro	Hg <sup>2+</sup>		CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup>	
	Con IS	Sin IS	Con IS	Sin IS
Tiempo de Retención, min	1.31 ± 0.02		2.26 ± 0.03	
Intervalo Calibración, µg L <sup>-1</sup> Hg	0 – 50		0 – 50	
Modo-Señal	Área de pico		Área de pico	
Señal Analítica	<sup>202</sup> Hg/ <sup>209</sup> Bi	<sup>202</sup> Hg	<sup>202</sup> Hg/ <sup>209</sup> Bi	<sup>202</sup> Hg
R <sup>2</sup>	0.9833	0.9660	0.9981	0.9980
LD, µg L <sup>-1</sup>	0.43	0.59	0.42	0.61
LC, µg L <sup>-1</sup>	1.3	1.8	1.3	1.8

LD: Límite de detección calculado como tres veces la desviación estándar de la línea base dividido entre la pendiente de la curva de calibración.

## 5.5 CONCLUSIONES

- 1) Se propuso una modificación del procedimiento reportado para el análisis de mercurio en tejido de pescado, para su adaptación al análisis de tejido de lombriz (menor contenido de lípidos respecto al pescado).
- 2) Se demostró la validez del procedimiento, mediante evaluación de su rendimiento y los experimentos de recuperación.
- 3) Los resultados muestran la presencia de las dos especies de mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$  y  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) en tejido de lombriz y mercurio inorgánico  $\text{Hg}^{2+}$  como especie predominante en suelos.
- 4) Los resultados obtenidos indican que las lombrices tienen capacidad de captar las dos formas de mercurio, por lo que podrían ser utilizadas como bio-indicadores de las especies de mercurio. Por otro lado, los resultados demuestran la biotransformación de mercurio inorgánico a metilmercurio por estos organismos.

## CAPITULO 6

# **ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO EN SUELOS Y TEJIDO DE LOMBRIZ DE TIERRA MEDIANTE HPLC-ICP-MS CON ENFOQUE EN SUS FORMAS INORGÁNICAS (As(III) , As(III)) y ORGÁNICAS (DMA<sub>s</sub>(V))**

## 6.1 INTRODUCCIÓN

El arsénico ha llegado a convertirse en un serio problema para la salud en diferentes países alrededor del mundo. Esto es atribuido a nuevos descubrimientos acerca de la toxicidad del arsénico, especialmente en largos periodos de exposición a altas concentraciones de este metaloide en el agua para beber y en la comida, esto debido especialmente, a cambios ocurridos en los suelos y en las fuentes de abastecimiento de agua (principalmente aguas subterráneas) [141].

Por otro lado, organismos como lo son las lombrices de tierra son frecuentemente empleadas como una alternativa para monitorear el grado de contaminación de uno o varios contaminantes presentes en el medio ambiente y de esta manera, evaluar el riesgo para la salud de los seres vivos provocados principalmente por fuentes antropogénicas y geogénicas, particularmente, el arsénico que se encuentra de forma natural en el ambiente [119, 141]. Dado que las lombrices de tierra pueden bioacumular elementos presentes en el suelo y estos a su vez ser transferidos a otros depredadores (pájaros, anfibios, pescados etc.) [128]; el estudio detallado de los procesos de acumulación y especiación de arsénico en el organismo de la lombriz puede ayudar a proveer de mejores herramientas que nos permitan obtener la información necesaria para determinar el riesgo de exposición en ambos contextos: el de la salud humana como el ecológico [119].

Existen muchos estudios enfocados a la bioacumulación de metales por parte de las lombrices de tierra, pero solo unos pocas han centrado su atención en estudiar a fondo el arsénico. Hasta el momento existe poca información concerniente a la especiación y determinación de diferentes compuestos arsenicales en lombrices de tierra. Como ya se dijo anteriormente, la biodisponibilidad y toxicidad del arsénico depende fuertemente de la forma fisicoquímica presente en la muestra de estudio.

En general (como ya se menciona en el capítulo 2), las formas inorgánicas del arsénico son mucho más tóxicas que las formas orgánicas arsenicales. Estas últimas especies, son muy comunes dentro de las especies marinas, donde ellas pueden presentar metabolitos y productos del proceso de detoxificación del arsénico inorgánico y que han sido encontrados en sedimentos y en agua marina. La mayor parte de los compuestos arsenicales en animales marinos es la arsenobetaina, mientras que, el ión tetrametilarsenium y la arsenocolina se encuentran en forma minoritaria. Por otro lado, para las algas marinas la especie predominante son los arsenoazúcares [128].

Para el buen desarrollo de la especiación de compuestos arsenicales (As) en muestras medioambientales, en general, se requiere de procedimientos analíticos rigurosos en cada una de las etapas de experimentación: recolección, tratamiento y medición. Existe un alto número de especies arsenicales presentes en el medioambiente y para cada una de ellas ha de considerarse su grado de toxicidad e impacto dentro del mismo [142]. Con excepción del ión tetrametilarsénico, el grado de toxicidad decrece conforme se incrementa el grado de metilación. Los compuestos arsenicales menos tóxicos son principalmente los compuestos fenilarsenicales [142]. Es importante que en la etapa del pretratamiento de extracción de especies arsenicales, considerar posibles eventos que pueden sobrevenir (cambios ocurridos en los estados de oxidación de las especies, la actividad microbiana, pérdidas ocasionadas por la volatilización o adsorción) provocando una incompleta extracción de las especies [142]. Por otra parte, también es importante considerar que, la extracción realizada a muestras de sedimentos y sólidos (suelos) se encuentra en un período crítico que hasta el momento está muy poco controlada y evaluada, produciendo una información muy poca al respecto; a diferencia de éstos, en animales marinos por lo general, se reportan recuperaciones mayores al 90% [142], esto debido principalmente al alto contenido de arsenobetaina (AB) ya que esta molécula es soluble en agua, metanol o mezclas de ambos (solventes comúnmente empleados en la extracción de arsénico); mientras que, para organismos terrestres (como son las lombrices de tierra analizadas en este trabajo) y las plantas, las eficiencias de extracción sean más bajas o varíen de acuerdo con las condiciones de extracción [142].

En otro contexto y desde el punto de vista de que la mayoría de las especies de arsénico están presentes generalmente en forma soluble, la técnica de separación de líquidos más comúnmente utilizada es la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) que, junto con la Electroforesis Capilar (CE), son las técnicas más frecuentemente empleadas en la separación de especies de arsénico[142], mientras que, los detectores más empleados son la Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) y Espectrometrías de Fluorescencia Atómica (AFS) para la separación por HPLC y formación de hidruros, incrementando el reemplazamiento de la Espectrometría de Absorción Atómica (AAS)[142].

## **6.2 OBJETIVO PARTICULAR**

Determinar las especies del arsénico en suelo y tejido de lombriz de tierra mediante su separación por HPLC y detección del As por ICP-MS, con enfoque en sus formas inorgánicas (arsenito, As(III) y arsenato, As(V)) y orgánicas (dimetilarsénico DMAs(V)).

## **6.3 MATERIALES Y METODOS**

### **6.3.1 Instrumentación**

Se utilizó el Cromatógrafo de Líquidos (HPLC), Hewlett-Packard (Waldrom, Germany) modelo 1050 con la columna para especiación de arsénico por intercambio aniónico LC-SAX (250 x 4.6mm, 5µm). Para obtener los perfiles de elución de arsénico en la separación cromatográfica, se utilizó el espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) modelo Agilent 7500ce, equipado con el nebulizador convencional tipo Meinhard, la cámara de niebla con enfriamiento (tipo Peltier, 2°C) y la celda de colisión / reacción con helio (pureza 99.999%).

### 6.3.2 Reactivos, disoluciones y muestras

Los reactivos fueron del grado analítico y se utilizó el agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco) . Las soluciones estándar de las tres especies de arsénico a una concentración de 1000 mgAs L<sup>-1</sup> se prepararon de la siguiente manera: la solución de As(III) se obtuvo por disolución de trióxido de arsénico (Merck) en hidróxido de sodio 30 mM, el arsenato monobásico de potasio (Sigma), ácido dimetilarsénico de sodio (Sigma) y el metil arsenato de sodio (Sigma) fueron disueltos en agua desionizada para la obtención de las soluciones estandar correspondientes As(V) y DMAs(V). Finalmente, todas las soluciones se ajustaron a pH 7.0 con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 3mM.

Se utilizaron los siguientes reactivos: hidróxido de sodio (Fluka), ácido fosfórico (Fluka), fosfato dibásico de amonio (Sigma), metanol (CH<sub>3</sub>OH, Fishes Scientific), ácido ascórbico (Karal), ácido oxálico (Reactivos analíticos Monterrey).

Todas las soluciones fueron preparadas diariamente a la dilución apropiada.

### 6.3.3 PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

#### 6.3.3.1 Determinación de arsénico total

El procedimiento de digestión para la extracción de arsénico total en suelo y tejido de lombriz de tierra y el contenido de humedad fue el desarrollado anteriormente y es reportado en el capítulo 4.

#### 6.3.3.2 Especiación analítica de arsénico

El protocolo de extracción de las especies de arsénico se cambió ligeramente al ya reportado en la literatura. Se utilizó una metodología diferente para las muestras de tejido y de suelo, con la finalidad de obtener el mayor rendimiento posible en ambas muestras y poder lograr una mejor correlación entre ambos. En forma general el proceso de extracción se describe a continuación: se pesaron tres muestras de aproximadamente 0.2 g de tejido

liofilizado y 0.5g de tierra para cada uno de los sirios analizados. Se adicionaron 10 ml de la solución extractante: MeOH:H<sub>2</sub>O 1:1 para tejido y una mezcla de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1mol L<sup>-1</sup>, Ácido Ascórbico 0.5 mol L<sup>-1</sup>, Ácido Oxálico 0.2 mol L<sup>-1</sup> para suelos[8, 119]. Todas la submuestras fueron mezcladas en un vórtex a la máxima velocidad por 1 minuto y se colocaron en baño de ultrasonido por espacio de 60 minutos a 40°C, se centrifugaron a 13000g, 10 minutos. Transcurrido este tiempo, los sobrenadantes se dejaron evaporar en atmosfera de nitrógeno y los residuos fueron reconstituidos en 10 mL agua desionizada.

Se tomaron alícuotas de 1.5 ml de muestra y fueron ajustadas a pH 6.0 con NaOH 9 mol L<sup>-1</sup>. las muestras fueron centrifugadas nuevamente( 13000g, 10 min) y finalmente diluidas a una dilución apropiada con la fase móvil y 100 µL fueron introducidos al sistema HPLC-ICP-MS para su detección / separación[143, 144]. Se utilizó una columna de intercambio aniónico SAX (250mm×4.6mm, 5µm) con precolumna C18. las condiciones de operación instrumentales se presentan en la tabla 6.1. La calibración externa fue desarrollada con base a una serie de soluciones estándar conteniendo las tres especies de arsénico As(III), As(V), y DMA(V) en concentraciones de 0, 5, 10, 25 y 50 µg L<sup>-1</sup>. Los resultados obtenidos estan expresados como mg de As por kg de tejido liofilizado de lombriz.

**Tabla 6.1** Condiciones instrumentales de operación para la especiación de arsénico en suelos y tejido de lombriz de tierra.

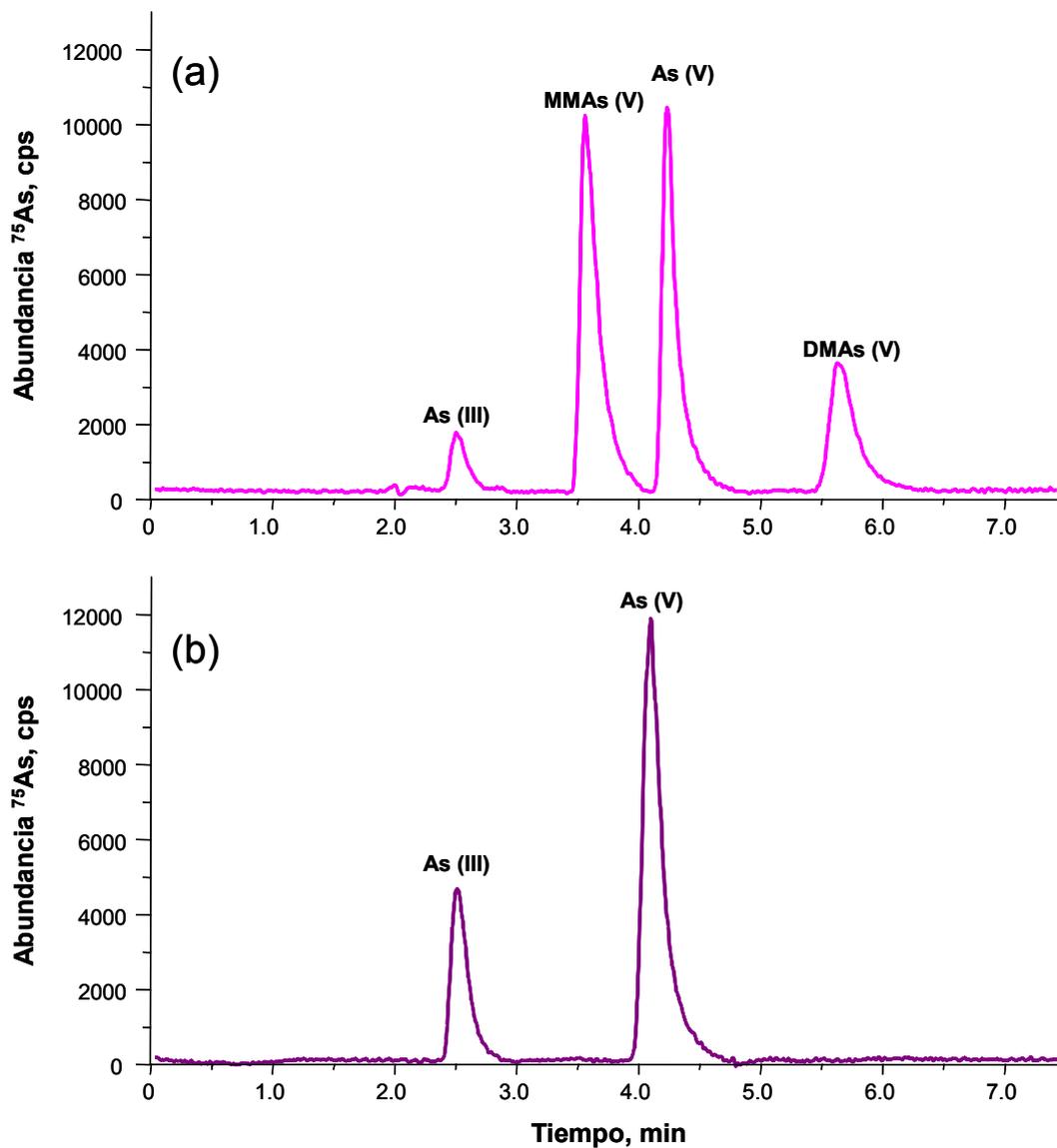
**HPLC-ICP-MS—Análisis de especiación de arsénico**

Columna	Phenomenex SAX (250mm×4.6mm, 5µm), precolumna C18
Fase móvil	Fosfato de amonio dibásico 25mM, pH 6.0.
Temperatura	40° C
Flujo	1.4 mL min <sup>-1</sup>
Volumen inyectado	100 µL
Potencia	1500W
Gas nebulizador	0.85 mL min <sup>-1</sup>
Gas Make-up	0.15 mL min <sup>-1</sup>
Introducción de muestra	MiraMist Teflón® nebulizer
Conos muestra y skimmer	Níquel
Profundidad muestra	9 mm
Isótopos monitoreados	<sup>75</sup> As
Modo de adquisición	Time-resolved analysis
Tiempo de integración	100 ms
Celda colisión/reacción	He, 3.5 mL min <sup>-1</sup>

## 6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo ha sido la evaluación, determinación y cuantificación de las especies arsenicales presentes en suelo y tejido de lombriz de tierra mediante separación por HPLC y detección por ICP-MS, con enfoque en las formas inorgánicas (arsenito, As(III) y arsenato, As(V)) y orgánicas (dimetilarsénico DMAs(V)). Para ello se establecieron las condiciones óptimas para una mejor separación / detección de las especies, así como también, una mejor extracción de las mismas en los dos tipos de muestras analizadas. En el desarrollo del procedimiento analítico, se modificaron las condiciones de extracción de las especies de arsénico respecto al protocolo reportado en la literatura. Además, se utilizaron diferentes condiciones para el análisis de tejido y del suelo, lo que permitió obtener buenas recuperaciones del arsénico. El análisis de especiación de arsénico se llevó a cabo usando la cromatografía de líquidos con intercambio aniónico acoplado al ICP-MS, de acuerdo con Heitkemper y col.[143]. Tres estándares fueron utilizados con el fin de identificar y cuantificar As(III), As(V) y DMAs(V), usualmente reportadas como las especies primarias presentes en muestras medioambientales.

En la figura 6.1 se presenta un ejemplo de cromatograma obtenido por HPLC-ICP-MS en el análisis de (a) tejido de lombriz de tierra y (b) suelo proveniente del sitio 5 (jardín de col. Burócratas).



**Figura 6.1** Ejemplo de cromatograma obtenido por HPLC-ICP-MS en el análisis de (a) tejido de lombriz de tierra y (b) suelo, ambas muestras pertenecientes al sitio 5 (jardín de col. Burócratas). El cuarto pico cromatográfico ha sido tentativamente asignado a monometilarsenico(V) (MMAs(V)), con base en los estudios realizados anteriormente y reportados en la literatura.

En la tabla 6.2 y 6.3 se presentan los valores para las concentraciones en mg de arsénico por kg de muestra analizada (tejido y suelo) para los cinco sitios seleccionados. La cuantificación de las especies se determinó mediante calibración externa y con el método de adición de estándar tomándose como señal analítica el área del pico cromatográfico  $^{75}\text{As}$  y logrando valores de  $R^2 > 0.9992$ . De forma general, se obtuvieron valores muy similares por ambas metodologías de cuantificación, para todas las especies presentes en las muestras analizadas. Las especies predominantes en suelo fueron las especies inorgánicas (As(III) y As(V)), mientras que en tejido se determinaron las especies inorgánicas As(III) y As(V) y orgánicas ((MMAs V y DMAs(V)).

**Tabla 6.2** Niveles de concentración de arsénico total, las especies arsenicales encontradas en extracto de tejido y porcentajes de recuperación en los diferentes sitios analizados

Método	Especies de arsénico en tejido mgAs kg <sup>-1</sup> masa seca				As total extraído mgAs kg <sup>-1</sup> masa seca	As total determinado mgAs kg <sup>-1</sup> masa seca	% Recuperación de As
	As(III)	MMAs(V)*	As(V)	DMAs(V)			
<i>Tejido sitio 1: Mineral de Cata = 3.78 ± 0.21 mgAs kg<sup>-1</sup> seco</i>							
Calibración externa	1.12 ± 0.04	0.45 ± 0.04	1.44 ± 0.01	0.40 ± 0.05	3.41 ± 1.02	3.78 ± 0.21	90 ± 3.6
Adición de estándar	1.11 ± 0.07	0.43 ± 0.05	1.44 ± 0.61	0.38 ± 0.18	3.36 ± 1.04		89 ± 3.7
<i>Tejido sitio 2: Guerrero = 43.5 ± 2.2 mgAs kg<sup>-1</sup> seco</i>							
Calibración externa	28.2 ± 0.16	0.61 ± 0.06	9.53 ± 0.08	0.76 ± 0.04	39.1 ± 2.28	43.5 ± 2.2	90 ± 3.1
Adición de estándar	27.8 ± 0.52	0.57 ± 0.05	9.32 ± 1.73	0.74 ± 0.21	38.4 ± 2.31		88 ± 3.2
<i>Tejido sitio 4: La Laguna = 1.43 ± 0.03 mgAs kg<sup>-1</sup> masa seca</i>							
Calibración externa	0.39 ± 0.04	nd	0.59 ± 0.03	0.21 ± 0.02	1.19 ± 0.06	1.43 ± 0.03	83 ± 2.0
Adición de estándar	0.37 ± 0.04	nd	0.58 ± 0.03	0.19 ± 0.02	1.14 ± 0.04		80 ± 1.8
<i>Tejido sitio 5: Jardín col. Burocratas = 15.8 ± 0.6 mgAs kg<sup>-1</sup> seco</i>							
Calibración externa	1.31 ± 0.05	4.21 ± 0.24	3.80 ± 0.11	4.92 ± 0.24	14.2 ± 0.76	15.8 ± 0.6	90 ± 4.0
Adición de estándar	1.27 ± 0.19	4.12 ± 0.05	3.69 ± 0.61	4.89 ± 0.21	14.0 ± 0.81		88 ± 3.8
<i>Tejido sitio 7: Real de Minas = 6.48 ± 0.21 mgAs kg<sup>-1</sup> seco</i>							
Calibración externa	2.08 ± 0.10	0.49 ± 0.06	2.72 ± 0.10	0.41 ± 0.06	5.70 ± 0.76	6.48 ± 0.21	88 ± 3.8
Adición de estándar	2.04 ± 0.14	0.47 ± 0.05	2.57 ± 0.12	0.38 ± 0.05	5.46 ± 0.71		84 ± 3.3

nd: no detectado

En las mismas tablas 6.2 y 6.3 se muestra la recuperación de arsénico total obtenida en cada muestra mediante cuantificación con calibración externa y adición de estándar.

**Tabla 6.3** Niveles de concentración de arsénico total y las especies arsenicales encontradas en suelo en los diferentes sitios analizados

Método	Especies de arsénico en suelo mgAs kg <sup>-1</sup> masa seca				As total extraído mgAs kg <sup>-1</sup> masa seca	As total determinado mgAs kg <sup>-1</sup> masa seca	% Recuperación de As
	As(III)	MMAs(V)*	As(V)	DMAs(V)			
<i>Suelo sitio 1: Mineral de Cata = 28.9 ± 1.6 mgAs kg<sup>-1</sup> masa seca</i>							
Calibración externa	6.37 ± 0.18	nd	13.0 ± 0.61	1.96 ± 0.36	21.3 ± 1.02	28.9 ± 1.6	74 ± 3.6
Adición de estándar	6.29 ± 0.07	nd	13.0 ± 0.61	1.95 ± 0.18	21.2 ± 1.04		73 ± 3.7
<i>Suelo sitio 2: Guerrero = 69.6 ± 3.1 mgAs kg<sup>-1</sup> masa seca</i>							
Calibración externa	11.7 ± 0.49	nd	36.0 ± 1.77	nd	47.7 ± 2.28	69.6 ± 3.1	69 ± 3.1
Adición de estándar	10.8 ± 0.52	nd	34.8 ± 1.73	nd	45.6 ± 2.31		66 ± 3.2
<i>Suelo sitio 4: La Laguna = 1.66 ± 0.09 µgAs kg<sup>-1</sup> masa seca</i>							
Calibración externa	0.43 ± 0.04	nd	0.65 ± 0.08	nd	1.08 ± 0.06	1.66 ± 0.03	65 ± 2.0
Adición de estándar	0.39 ± 0.02	nd	0.62 ± 0.02	nd	1.01 ± 0.81		61 ± 1.8
<i>Suelo sitio 5: Jardín col. Burocratas = 18.7 ± 1.3 mgAs kg<sup>-1</sup> masa seca</i>							
Calibración externa	5.87 ± 0.19	nd	10.0 ± 0.56	nd	15.9 ± 0.76	18.7 ± 1.3	85 ± 4.0
Adición de estándar	5.79 ± 0.19	nd	9.71 ± 0.61	nd	15.5 ± 0.81		83 ± 3.8
<i>Suelo sitio 7: Real de Minas = 6.32 ± 0.34 mgAs kg<sup>-1</sup> seco</i>							
Calibración externa	2.71 ± 0.16	nd	1.59 ± 0.16	nd	4.30 ± 0.76	6.32 ± 0.34	68 ± 2.0
Adición de estándar	2.64 ± 0.14	nd	1.47 ± 0.13	nd	4.11 ± 0.81		65 ± 2.1

nd: no detectado

Las recuperaciones del arsénico en el procedimiento y evaluadas como la suma de las especies arsenicales encontradas en la muestra respecto al contenido total del As determinado mediante calibración externa y adición de estándar, fueron del 90 ± 3.6% y 89 ± 3.7% para sitio 1; 90 ± 3.1% y 88 ± 3.2% para el sitio 2; 83 ± 2.0% y 80 ± 1.8% para el sitio 4; 90 ± 4.0% y 88 ± 3.8% para el sitio 5; 88.0 ± 3.8% y 84 ± 3.3% para el sitio 7 en muestras de tejido;

mientras que en las muestras de suelo se obtuvieron recuperaciones de  $74 \pm 3.6\%$  y  $73 \pm 3.7\%$ ;  $69 \pm 3.1\%$  y  $66 \pm 3.2\%$ ;  $65.0 \pm 2.0\%$  y  $61 \pm 1.8\%$ ;  $85 \pm 4.0\%$  y  $83 \pm 3.8\%$ ;  $68 \pm 2.0\%$  y  $65 \pm 2.1\%$  para el sitio 1, 2, 4, 5 y 7 respectivamente.

Estos resultados son valores muy similares a los ya reportados en la literatura [119]. Por ejemplo Watts y colaboradores en el 2008, reportaron porcentajes de recuperación de arsénico total en tejido de lombriz de 27 a 81% para la *L. Rubellus* y de 31 a 82% para la *D. Rubidus* realizando la extracción con agua: metanol (1:1 v/v) [119].

En general, el análisis de las muestras provenientes de los tres sitios seleccionados revelaron la presencia de As(III), As(V) en suelo y As(III), As(V) y DMAs(V) en tejido, lo que indica que en el organismo de las lombrices ocurre la metilación del arsénico inorgánico. Asimismo, en algunas muestras de tejido se ha detectado y cuantificado una especie de As no identificada, la que fue tentativamente considerada como monometilarsénico(V), MMAs(V) con base en los estudios anteriores.

## 6.5 CONCLUSIONES

1. En este trabajo se adoptaron las condiciones experimentales de la etapa de tratamiento de la muestra y las condiciones cromatográficas que permiten llevar a cabo el análisis de separación/cuantificación de las principales especies del arsénico presentes en tejido de lombriz de tierra con enfoque en sus formas inorgánicas (arsenito, As(III) y arsenato, As(V)) y orgánicas (dimetilarsénico DMAs(V)) utilizando la técnica híbrida HPLC - ICP-MS.
2. Los resultados obtenidos en el análisis de muestras reales (tejido y suelos) demostraron la utilidad del procedimiento para las muestras que contienen los niveles de As total mayores de  $15 \text{ mg kg}^{-1}$  en suelo y tejido (excepto sitio 1 que contiene  $3.78 \pm 0.2 \text{ mg kg}^{-1}$  en tejido).
3. El análisis de especiación de las muestras provenientes de los tres sitios seleccionados revelaron la presencia de As(III), As(V) en suelo, de As(III), As(V), DMAs(V) y la especie no identificada, tentativamente asignada como MMAs(V) en tejido como especies predominantes, lo que indica que en el organismo de las lombrices ocurre la metilación del arsénico inorgánico.
4. Se observó una correlación estadísticamente significativa entre los niveles totales de As en suelo y en tejido de lombriz y, además, se ha demostrado que las lombrices de tierra son capaces de biotransformar el As inorgánico sus formas metiladas.

## **CAPITULO 7**

**DETERMINACIÓN DEL GRADO DE  
METILACIÓN TOTAL DE ADN EN LA  
LOMBRIZ DE TIERRA Y SU EVALUACIÓN  
COMO POSIBLE BIOINDICADOR DE  
CAMBIOS EPIGENÉTICOS ASOCIADOS  
CON METALES/METALOIDES EN  
SUELOS.**

## 7.1 INTRODUCCIÓN

En la larga lista de los materiales peligrosos para el medio ambiente y para la salud del hombre se encuentran diversos metales, metaloides y sus formas fisicoquímicas. Organismos vivos en diferentes regiones geográficas, están diariamente expuestos a altas concentraciones de estos elementos, debido a las emisiones asociadas con las actividades humanas, además de la distribución natural no homogénea de elementos en la corteza terrestre. Está bien establecido, que los efectos toxicológicos observados en la biota dependen no solo de los niveles de las concentraciones de elementos totales, sino también, de las formas fisicoquímicas actualmente presentes en un determinado sector ambiental. Diferentes estrategias han sido desarrolladas para el control, prevención y eventualmente la eliminación de elementos relacionados intrínsecamente con la contaminación ambiental; entre éstas, destaca el uso de las lombrices de tierra como bioindicadores en la determinación del nivel de la contaminación en el suelo [145, 146]. En particular, se ha reportado frecuentemente una asociación directa entre los niveles de concentración de elementos presentes en el suelo y en el tejido, principalmente para el Cd, Zn y Pb [136-139]. En los últimos años se han estudiado los aspectos tales como la ingesta de elementos, su posible bioacumulación y la factibilidad de las lombrices de tierra para la remediación de suelos [124, 130-133, 147, 148]. Para un mejor entendimiento del rol que juegan las lombrices de tierra en el ciclo de los elementos, se llevó a cabo el análisis de especiación [119, 125, 126, 131]. Por otro lado, también es importante considerar los tiempos de exposición directa de estos organismos ubicuos para poder determinar los mecanismos de resistencia o en su defecto el ser víctimas de los contaminantes presentes en el suelo. [130, 146, 149, 150].

En algunos estudios ecotoxicológicos realizados, se han utilizado diversos tipos de respuesta biológica por parte de las lombrices hacia un determinado contaminante [136, 146, 151-154]; los parámetros utilizados como biomarcadores han sido la letalidad, nivel de reproductividad [153], parámetros neurológicos [152], alteración de la actividad enzimática, inducción a los enlaces metal-proteína [145], respuesta a la reserva energética, cambios histopatológicos y daño en el ADN [149, 151, 155, 156].

La genotoxicidad de los metales pesados ha sido demostrada en diferentes estudios [155-158], el perfil genético obtenido por la tecnología de microarreglo[159] y como medición para el marcaje del daño oxidativo en el ADN, el 8-hidroxideoxiguanosina[160, 161]. Sin embargo la mayoría de las herramientas empleadas hasta el momento, no proveen la información sobre los posibles eventos epigenéticos, lo cual, está establecido como un componente importante en la regulación de los genes y la activación de una amplia variedad de los parámetros ambientales[159, 162].

El término epigenética se refiere a los cambios hereditables en la expresión y actividad de los genes que puede ocurrir sin la alteración en la secuencia del ADN; éstos cambios dependen principalmente, de la conformación actual de la cromatina de tal manera que la forma condensada favorece el silenciamiento de los genes, mientras que en la forma relajada los genes se activan. Las dos conformaciones de cromatina son reversibles y están controlados por un patrón de la metilación de ADN y de las modificaciones ocurridas en la histona.[163]. Los eventos epigenéticos están involucrados de forma natural en la diferenciación celular y en el desarrollo fenotípico; sin embargo, estos pueden ser dirigidos erróneamente y por tanto contribuir al desarrollo de diferentes patologías, las cuales tal vez la más estudiada es la oncogénesis[164]. En particular, los cambios ocurridos en la metilación del ADN han sido asociados con la exposición a metales pesados como Ni, Cr, Cd y metaloides (As)[165].

El objetivo principal de este estudio, fue explorar la factibilidad de la medición de la metilación global ocurrida en las lombrices de tierra como un potencial biomarcador de posibles cambios epigenéticos en organismos vivos expuestos a metales. Para ello, se llevó a cabo la determinación de la metilación global de ADN en lombrices recolectadas en los siete sitios de muestreo y se realizaron los análisis estadísticos con el fin de investigar la posible relación la metilación de ADN y los niveles de elementos y sus especies en tejidos. Los resultados obtenidos indican que las lombrices de tierra no solo pueden ser usados como bioindicadores para los metales pesados presentes en suelos sino que también, pueden ser una buena herramienta para determinar el riesgo potencial de los cambios epigenéticos producidos por diferentes perfiles de metilación en el ADN.

## 7.2 Definición de ADN y RNA

El ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (RNA) son polímeros de grandes cadenas lineales, llamados ácidos nucleicos, formados por las base nitrogenadas unidas a un esqueleto de pentosa-fosfato. Estas macromoléculas están constituidas por un gran número de nucleótidos, los cuales están constituidos por un azúcar, un fosfato y una base, cada uno de ellos [166]. Estos nucleótidos (o unidades repetitivas) están conformados por azúcares al inicio de la desoxirribosa y las unidades básicas son la Adenina (A), Timina (T), Guanina (G) y Citosina(C) para el ADN, mientras que para el ARN el azúcar es una ribosa y la unidades básicas son Adenina (A), Uracilo (U), Guanina (G) y Citosina(C). Las bases nitrogenadas están unidas mediante el enlace glucosídico con desoxirribosa en la cadena de ADN y con la ribosa en la cadena de ARN, formando desoxinucleosidos y nucleósidos respectivamente. Finalmente al formarse la unión de tipo fosfodiéster entre pentosa y fosfato se obtienen monómeros de los dos ácidos nucleicos, denominados desoxinucleótidos y nucleótidos respectivamente. El número de las unidades monoméricas en los ácidos nucleicos puede alcanzar hasta los 10 billones. Las macromoléculas formadas se caracterizan por la secuencia única de nucleótidos, lo que decide sobre la información guardada.

La principal función biológica de los ácidos nucleicos es almacenar y transferir la información genética. En el caso particular del ADN, su molécula almacena la información necesaria para el correcto desarrollo de las características biológicas de un individuo en particular, conteniendo los mensajes e instrucciones para que las células realicen dichas funciones adecuadamente. Por otro lado, el ARN tiene la función de expresar la información contenida en el ADN, pasando de una secuencia lineal de nucleótidos (genes), a una secuencia lineal de aminoácidos que forman la proteína. Dependiendo de la etapa de expresión de genes en la que actual la molécula de ARN, se distinguen tres grupos diferentes de estos compuestos: ARN mensajero (mARN), de transferencia(tARN) y ribosómico (rARN). El ADN es una molécula heredada de células madre a células hijas en todos los organismos procarióticos y eucarióticos y que se encarga de llevar la información de manera que pueda ser transferida de generación a generación. En virus, el material genético también es ADN y ARN[166-168].

La naturaleza hereditaria de todo organismo vivo es definida por el genoma de ADN, el cual provee de la información necesaria del cual esta constituido un organismo. En este caso, se utiliza el termino “información” porque el genoma no puede desarrollar por sí mismo un rol activo en la construcción del organismo; una vez que se tiene la secuencia de las subunidades individuales (bases) del ácido nucleico que determinan las características hereditarias. Posteriormente, mediante una serie de interacciones complejas, esta secuencia es empleada para elaborar todas las proteínas que el organismo requiere en el tiempo y lugar apropiado. Las proteínas también forman parte en la conformación del organismo, o bien, tiene la capacidad de construir las estructuras y/o de participar en las reacciones metabólicas que son necesarias para vida. El genoma contiene un set completo de la información hereditaria para cada organismo particular. Físicamente, el genoma puede dividir las moléculas de los diferentes ácidos nucleicos y éstas a su vez según su funcionalidad, ser divididos en genes[169]. El ADN es una de las moléculas fundamentales para todo tipo de vida que se conozca. La estructura química del ADN esta bien establecida. En la figura 7.1 se muestra una estructura de ADN y ARN así como las cuatro bases mayoritarias de ambos ácidos[166, 170].

El ARN difiere del ADN ya que este tiene un grupo hidroxilo adicional en el posición 2 del azúcar. Estas dos implicaciones mayoritarias hacen posible diferenciar las propiedades físicas y químicas del ARN y ADN. El OH en la posición 2, hace que el RNA sea inestable con respecto a la hidrólisis alcalina[170]. La molécula de RNA es intrínsecamente designada para cambiar el pH alcalino, que normalmente tienen las células y en el cual la molécula del DNA es mucho más estable. Por otro lado el grupo hidróxilo en la posición 2 también restringe el intervalo para las conformaciones favorables energéticamente del anillo en el azúcar y de la estructura de fosfodiéster. Los limites del intervalo de conformaciones de la cadena de RNA, comparados con el DNA, en ultima restricción es que el RNA es mucho más selecto que las estructuras helicoidales. Finalmente 2'-OH puede participar en interacciones con fosfatos o bases que estabilizan las estructuras de la cadena. Como resultado se obtiene un RNA que puede casualmente atacar a estructuras terciarias estables (de orden, tridimensional, estructuras relativamente compactadas) con mayor facilidad que la secuencia similar a la del DNA[166, 167, 170].

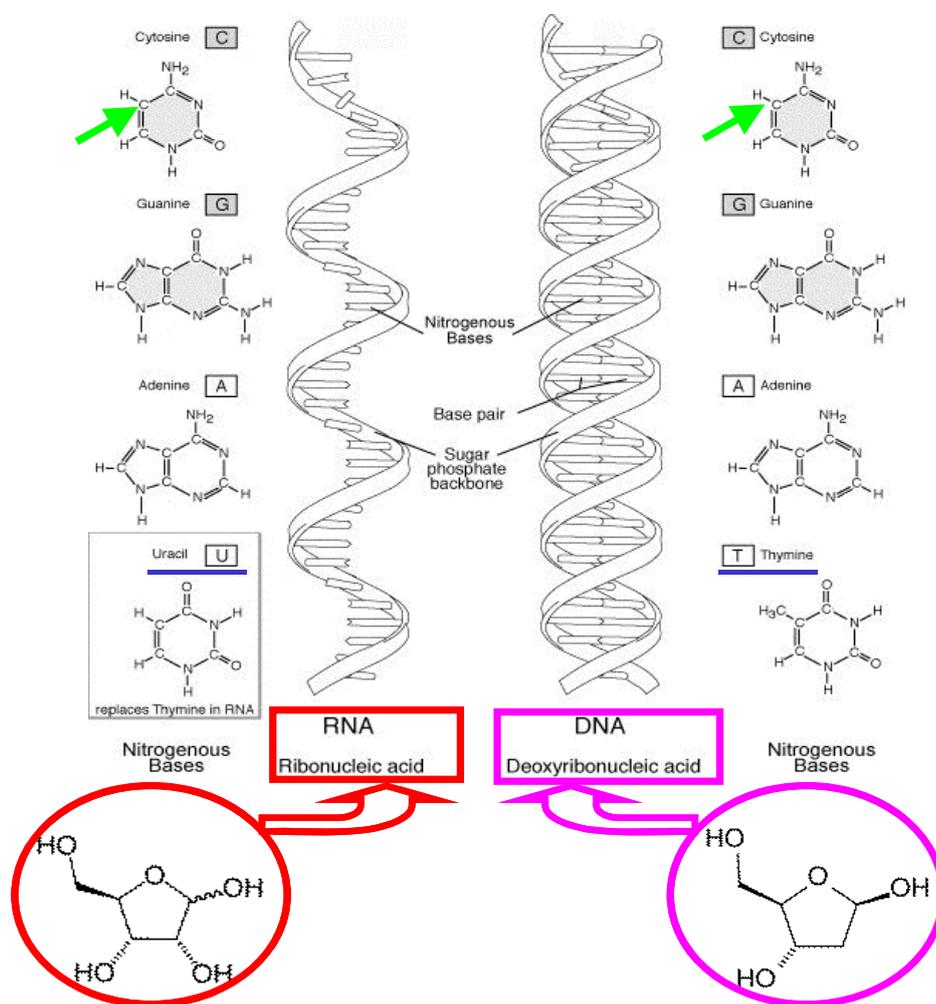


Figura 7.1 Estructuras de ADN y ARN y sus bases mayoritarias.

### 7.1.1 Biología básica del ADN

El ADN es la historia esencial de la información genética en la célula. La información puede ser duplicada al pasar de las células madre a las células hijas mediante el proceso de replicación. Podría ser leído como una copia del ARN obtenido por el proceso de transcripción, así como esta copia a su vez puede ser obtenida directamente por la síntesis de las proteínas[166, 170].

La replicación del ADN es limitada por el hecho de que todas las enzimas conocidas colaboraran en la descodificación del ADN tienen propiedades altamente restrictivas. Así pues, estas enzimas, son conocidas como ADN polimerasas. Todas ellas requieren de 3'-ácidos nucleicos finales ( o un sustituto proteínico en estos 3'-final)[166]

Para el estudio del sistema molecular de algún organismo, es necesario obtener una alta calidad y pureza en el ADN extraído. En la actualidad no existe un procedimiento sencillo y común para la extracción del genoma de ADN que pueda ser utilizado a gran escala y para diferentes organismos eucarióticos. Usualmente diferentes tejidos requieren de diferentes protocolos de extracción, además de distintos pasos para la preparación del tejido[171]. La necesidad de encontrar una metodología universal se ha vuelto una tarea importante, sobre todo cuando se tiene la necesidad de analizar cientos de muestras diferentes entre sí[171].

### **7.1.2 Epigenética**

Actualmente se conoce que la regulación de la expresión génica depende de dos factores: uno es de carácter genético y el otro epigenético[163, 172-174]. El componente genético está relacionado con la secuencia de la cadena de ADN, misma que decide sobre la estabilidad de las moléculas de mRNA (ARN mensajero) y tARN[163, 174]. Los cambios ocurridos en la secuencia de los desoxinucleótidos en el ADN, conocidos como mutaciones, son los que conducen a los cambios estructurales dentro de las proteínas sintetizadas en el organismo. Tales mutaciones o cambios pueden afectar las células somáticas del mismo individuo, haciendo que se hereden en una línea germinal.

Por otra parte, el componente epigenético de la expresión génica se enfoca en los cambios estructurales de la cromatina [175, 176]. La epigenética se refiere a los diferentes estados fenotípicos que no se basan en las diferencias de genotipo. Estos estados son potencialmente reversibles, relativamente estables durante la división celular y pueden ser hereditarios, pasando la información epigenética de célula a célula en las generaciones subsiguientes[176-178].

La metilación es la adición de un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>) a una molécula. Aquí la metilación consiste en la transferencia de grupos metilos a algunas de las bases citosina (C) del ADN situadas previa y contiguamente a una guanina (G). Puesto que la metilación es fundamental en la regulación del silenciamiento de los genes, puede provocar alteraciones en la transcripción genética sin necesidad de que se produzca una alteración en la secuencia del ADN, siendo uno de los mecanismos responsables de la plasticidad fenotípica. También pueden ser metilados los productos de los genes, es decir, las proteínas, regulándose así también su función. En este proceso intervienen las enzimas ADN-metiltransferasas[121, 166] consulted 30 sep 2010. La metilación del ADN es un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión génica de dos maneras, directamente al impedir la unión de factores de transcripción, e indirectamente propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina. El ADN presenta regiones de 1000-1500 pb ricas en dinucleótidos CpG ("islas CpG"), que son reconocidas por las enzimas ADN-metiltransferasas, las cuales, durante la replicación del ADN metilan el carbono 5 de las citosinas de la cadena recién sintetizada, manteniéndose así la memoria del estado metilado en la molécula hija de ADN. En este proceso, la S-adenosilmetionina (SAM) participa como donador del grupo metil y la reacción es catalizada por la enzima del grupo ADN-5 metiltransferasas[176, 179].

En general, se considera que la metilación, es un proceso unidireccional, de ésta manera, cuando una secuencia CpG adquiere metilación de *novo*, esta modificación se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal. Por otra parte, la pérdida de metilación genómica (hipometilación), como evento primario, se asocia frecuentemente con el proceso neoplásico y es proporcional a la severidad de la enfermedad (dependiendo del órgano o tejido en que se acumule).

Los genomas de las células preneoplásicas, cancerosas y envejecidas comparten tres cambios importantes en los niveles de metilación, como eventos tempranos en el desarrollo de algunos tumores. Primero, la hipometilación de la heterocromatina que conduce a una inestabilidad genómica e incrementa los eventos de recombinación mitótica; segundo, hipermetilación de genes individuales y, finalmente hipermetilación de las islas CpG de genes constitutivos y genes tumor-supresores. Los dos niveles de metilación pueden

presentarse en forma individual o simultánea, en general, la hipermetilación está involucrada con el silenciamiento de genes y la hipometilación con la sobre-expresión de ciertas proteínas involucradas en los procesos de invasión y metástasis[180].

La metilación de ADN puede ser evaluada de manera general mediante el porcentaje de citosinas metiladas o estudiando las secuencias específicas de ADN. Obviamente, la información sobre el patrón de metilación de los genes individuales es de vital importancia, ya que permite conocer la distribución de sitios específicos, donde ocurre la hiper- o hipometilación y de esta manera poder profundizar en el conocimiento de los mecanismos de carcinogénesis[181-184].

La metilación global de ADN frecuentemente ha sido evaluada como un indicador a gran escala de los efectos epigenéticos ocurridos en plantas y animales bajo diferentes condiciones medioambientales[176, 185-189]. Existen varios métodos químicos que permiten evaluar y determinar la metilación global del ADN. En estos casos, se lleva a cabo la hidrólisis hasta obtener nucleótidos, nucleósidos o bases, dependiendo de las condiciones de tratamiento. Posteriormente estos compuestos son separados, mediante una técnica de separación cromatográfica o electroforética, determinando el porcentaje de metilación de los grupos citosina[187, 190-192]. Puesto que se evalúa el grado de metilación de citosinas/citidinas o desoxicitidinas liberadas del ADN, la información obtenida corresponde a la metilación global del ADN. Los procedimientos analíticos comunes involucran la cromatografía de alta resolución (HPLC) y la electroforesis capilar (CE) con detección por UV. Enfocándose en la cromatografía de líquidos, diferentes estudios se han centrado en las condiciones de preparación y separación de la muestra[186].

En general, la estructura, sus bases y metilación del DNA han sido ampliamente estudiados en diferentes ramas de la ciencia. Muchos de los estudios se han realizado utilizando algunas de las técnicas antes mencionadas., en especial la cromatografía de líquidos (HPLC), ha sido muy utilizada para la separación de los componentes del DNA como del RNA evaluado para diferentes tipos de muestras: plantas, gusanos marinos, sangre humana, células cancerosas, cultivos celulares, tejidos humanos[183, 185, 188, 189, 192-

195], para que de esta manera poder determinar la incidencia de eventos epigenéticos o genéticos en los tejidos de estudio.

En este trabajo se empleo la metodología desarrollada anteriormente en nuestro laboratorio y que consiste en la extracción ADN en tejido de lombriz de tierra, su posterior hidrólisis hasta desoxiribonucleosidos y la separación /cuantificación mediante HPLC con detección por UV.

## **7.2 OBJETIVO PARTICULAR**

Evaluar el nivel de metilación global de ADN en lombriz de tierra, para explorar la factibilidad de estos organismos como posibles biomarcadores de metales y su relación con posibles cambios epigeneticos.

## **7.3 MATERIALES Y METODOS**

### **7.3.1 Instrumentación**

Se utilizó el Cromatógrafo de Líquidos (HPLC) Agilent Series 1200 equipado con bomba cuaternaria, automuestreador y detector de arreglo de diodos, controlado por Chemstation (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). La columna cromatografica usada fue Luna C18 (250x 4.6mm, 5µm). Para su detección se utilizo el detector UV por arreglo de diodos (DAD), a una longitud de onda de 286 nm y como referencia la longitud de onda a 360 nm.

### **7.3.2 Reactivos, disoluciones y muestras**

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Las disoluciones fueron preparadas con agua desionizada ( 18.2 MΩ cm, Labconco, USA). Se utilizaron los siguientes reactivos NaCl (Sigma), Trizma Base (Tris(hydroximetil)amino-metano, Sigma), SDS: lauril sulfato (Sigma) , protenasa K (Sigma), isopropanol(Sigma), ETOH (Sigma), fosfato de amonio (Fluka), EDTA (Fluka), acetato de amonio (Fluka), MgCl<sub>2</sub> ( Fluka), acetato de zinc

deshidratado(Sigma), CaCl<sub>2</sub>( Sigma), NaOH (Fluka), DNAsa 1(Sigma), glicerol(Sigma ), Nucleasa p1(Sigma), ácido acético.

Dos oligonucleótidos 24-base DNA comerciales (Integrated DNA technologies, Inc. Coralville, IA, USA) con secuencia 5'-ACA CAC ACA CAC AGA GAG AGA GAG-3' (2A:1C:1G) and 5'- A(5mC)A (5mC)A(5mC) A(5mC)A (5mC)A(5mC) AGA GAG AGA GAG-3' (2A:1mC:1G) fueron usados para la preparación de las soluciones para la calibración, conteniendo 1, 2, 4 and 8 % de deoxycitidinas metiladas con respecto a la cantidad total de las bases de deoxyguanosina (5mdC/dG).

Las soluciones y disoluciones se prepararon de la siguiente manera: la solución buffer estéril se preparó a partir de una mezcla de NaCl 0.4M, Tris 10mM, EDTA 2 mM ajustado a pH 8.0 con HCl ); el SDS al 20% se preparó por disolución del lauril sulfato en agua (adicionar poco a poco el lauril sulfato en agua caliente y agitar lentamente para evitar que desarrolle mucha espuma); la proteasa K se preparó a una concentración de 20 mg mL<sup>-1</sup>.

La solución amortiguadora de digestión 10X fue elaborada mezclando 573 µL de ácido acético, 751 mg de glicina, 508 mg de cloruro de magnesio hexahidratado, 54.8 mg de acetato de zinc dihidratado y 14.7 mg de cloruro de calcio, aforando a un volumen de 50 mL con agua desionizada. La solución de DNAsa I 10U µL<sup>-1</sup> se preparó disolviendo 2.35 mg de DNAsa I en 500 µL de glicerol al 50% (esta solución es estable hasta por 6 meses manteniéndose a -20° C). La nucleasa P1 1.25 U µL<sup>-1</sup> se preparó mezclando 0.625 mg de nucleasa P1 en 100 µL de glicerol al 50%, (estable por 6 meses a -20° C).

La solución de fosfatasa alcalina 1U µL<sup>-1</sup> se elaboró con 5 µL de fosfatasa alcalina 10U µL<sup>-1</sup> diluidos en 45 µL de amortiguador para fosfatasa alcalina 1X. La solución amortiguadora para la fosfatasa alcalina 1X se preparó mezclando 5µL de amortiguador para fosfatasa alcalina 10X en 45 µL de agua.

### **7.3.3 Procedimientos analíticos**

#### **7.3.3.1 Extracción de ADN**

Para el análisis de ADN, se descongeló la parte de tejido de lombriz fresco seleccionado para este análisis y se colocaron alícuotas de 0.5-0.6 g de tejido en tubos Falcón de 15 mL, se homogenizaron (politrón) y tres submuestras fueron tomadas (aproximadamente

100 mg). La extracción de ADN fue desarrollada de acuerdo con Aljanabi and Martínez [196]. La metodología utilizada para la extracción de ADN en tejidos de lombriz fue adaptada y cambiado ligeramente al reportado en la literatura [171].

En breve, se pesaron aproximadamente 100 mg de tejido de lombriz de cada uno de los diferentes puntos de muestreo. Posteriormente, se adicionaron 800  $\mu\text{L}$  de solución buffer estéril (NaCl 0.4M, Tris-HCl 10mM, EDTA 2 mM pH 8.0) y se procedió a su homogenización con politrón de 10 a 15 segundos dependiendo de la muestra. Una vez homogenizadas las muestras, se centrifugaron 5 min a 13 000 g para quitar la espuma formada y después se les añadió 80  $\mu\text{L}$  de SDS al 20% (para una concentración final de 2%) y 8  $\mu\text{L}$  de proteasa K 20 mg  $\text{mL}^{-1}$  para una concentración final ( $400\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a cada una de las muestras. Se mezclaron en vórtex a máxima velocidad y se encubaron durante una hora a una temperatura de 65°C.

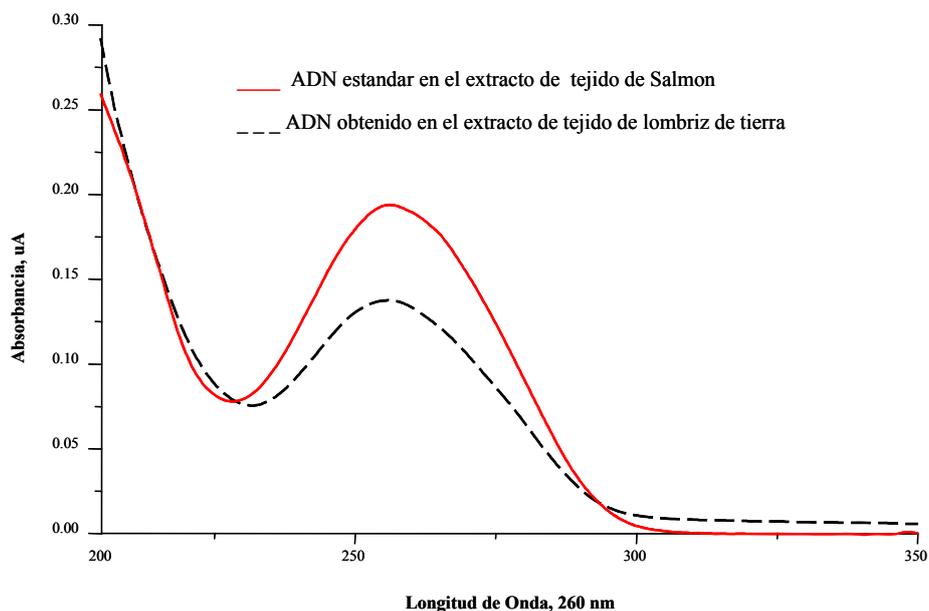
Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se les adicionó 600  $\mu\text{L}$  de solución saturada de NaCl (6M) y nuevamente se mezclaron en vórtex a máxima velocidad de 30 a 60 segundos y posteriormente se centrifugaron las muestras 30 minutos a 13 000 x g. Se tomó la máxima cantidad de sobrenadante de cada muestra y se colocó en tubos eppendorf de 2ml. Se centrifugaron 5 minutos (13000 x g) y después se les adicionó isopropanol en igual relación a la cantidad de sobrenadante (1000  $\mu\text{L}$  de sobrenadante adicionar 1000  $\mu\text{L}$  de isopropanol). Nuevamente se mezclaron hasta homogenizar completamente y se incubaron 1h a -20°C.

Posteriormente se descongelaron y centrifugaron 20 min, a 13 000 x g. Se retiró todo el sobrenadante, quedando una pequeña película muy delgada y transparente (algunas veces poco perceptible) en el fondo del microtubo. Se lavó esta película con 500  $\mu\text{L}$  de EtOH al 70% (para quitar las sales disueltas), mezclando en el vórtex a máxima velocidad durante 30s y centrifugando por 5 minutos a 13 000 x g. Una vez hecho esto, se procedió retirar todo el sobrenadante y lavar nuevamente con EtOH al 70%. Una vez lavadas y retirado todo el EtOH se dejaron secar. Cada película obtenida para cada una de las muestras se llevó a un volumen de 50  $\mu\text{L}$  con agua desionizada, para su posterior análisis por UV para la determinación de la calidad y cantidad del ADN obtenido.

Una vez obtenido el espectro UV para el ADN de todas las muestras de tejido analizados, y verificando que para la mayoría de ellas se obtuviera una buena calidad en el ADN extraído, se procedió a realizar la digestión de DNA para la obtención de los desoxinucleósidos.

### **7.3.3.2 Digestión de ADN para obtener desoxinucleósidos**

Para la digestión de DNA se utilizó el método descrito por Rozhon y colaboradores., 2008[178, 179]. La metodología empleada se describe a continuación: se colocó en un microtubo eppendorf de 1.5 mL de 1 a 10  $\mu\text{g}$  de ADN (obtenido en el proceso anterior). Se les añadieron 5 $\mu\text{L}$  de un amortiguador de digestión 10X y se mezclaron. Posteriormente, se le adicionaron 2  $\mu\text{L}$  de DNAsa I 10U  $\mu\text{L}^{-1}$  y 1  $\mu\text{L}$  de nucleasa P1 1.25 U  $\mu\text{L}^{-1}$  y se mezclaron en vórtex. Después, la mezcla anterior se incubó en baño de agua a 37° C durante 14 horas y luego se congelaron a 4° C por espacio de 1 h, una vez hecho esto, las muestras se incubaron en baño de agua hirviendo por 5 minutos y a cada muestra se le adicionó 5 $\mu\text{L}$  de NaOH 100mM y 2  $\mu\text{L}$  de fosfatasa alcalina 1 U  $\mu\text{L}^{-1}$  y se procedió a mezclar. Se incubaron durante 2 h a 37° C en baño de agua y después se centrifugaron 5 min (13 000 x g) y se diluyeron 4 veces con fase móvil para su posterior análisis por HPLC-UV.



**Figura 7.2.** Espectros de absorción en la región UV para: (a) estándar del ADN de salmón ( — ) y (b) ADN extraído del tejido de lombriz de tierra, del sitio 4 proveniente de La Laguna, en Lagos de Moreno)( - - - ).

### 7.3.3.3 Determinación de la metilación global de ADN mediante HPLC-DAD

En este trabajo se utilizó el procedimiento desarrollado previamente [186] con ligeros cambios de las condiciones cromatográficas. La columna analítica utilizada fue Luna C18 (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m) y se usaron cuatro fases móvil: agua desionizada (A), 40 mmol/L fosfato de amonio dibásico, 1 mmol/L EDTA, 13 mmol/L acetato de amonio, pH 4.1 (B), metanol (C) and acetonitrilo (D). El volumen de inyección fue de 80  $\mu$ L, y el programa de gradiente utilizado fue el siguiente: 0 to 4 min 78 % A, 20 % B, 2 % C; 4 to 11 min 77 % A, 20 % B, 3 % C; 11 to 16 min 35 % A, 20 % B, 25 % C, 20 % D; 16 to 16.8 min 30 % A, 20 % B, 25 % C, 25 % D; 16.8 to 17 min 78 % A, 20 % B, 2 % C con un flujo total 1 mL min<sup>-1</sup>. La longitud de onda de detección fue a 286 nm. La relación entre el área del pico del 5-metil-2'-deoxycitidina a 2'-deoxyguanosina ( $A_{5\text{mdC}} / A_{\text{dG}}$ ) fue usado como el modo de la señal analítica. En la etapa de calibración se utilizaron las mezclas de los oligonucleótidos comerciales que contenían 1, 2, 4, 8 % de 5mdC,  $r^2 = 0.9998$ .

### 7.3.3.4 Análisis Estadístico

Un análisis descriptivo fue llevado a cabo con la finalidad de obtener los valores de las desviaciones estándar y de los promedios. La evaluación de la posible relación entre los parámetros medidos, se obtuvo mediante un análisis de correlación. Los niveles de significancia fueron establecidos con  $p < 0.05$ . El software utilizado fue Estadística para Windows (StatSoft Inc. Tulsa OK).

## 7.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

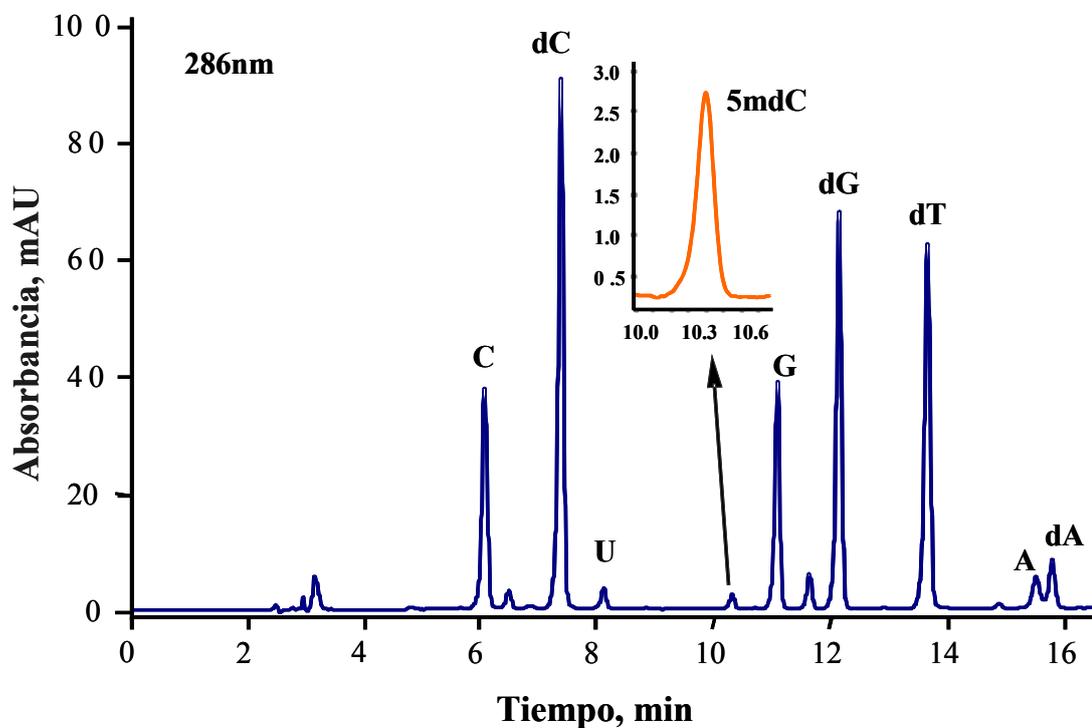
El objetivo de esta parte de trabajo ha sido examinar si existe alguna asociación entre el grado de metilación del ADN en lombriz de tierra y los niveles de concentración de elementos en los tejidos. De los siete sitios analizados, solo para los tejidos provenientes de los sitios 1, 2, 4, 5 y 7 se obtuvieron extractos de ADN de buena calidad ( $(A_{260}/A_{280}) > 1.5$ ). La pureza del ADN extraído fue evaluada de acuerdo con lo reportado en la literatura [171]. La determinación fue con base en la relación de la absorbancia obtenida a una longitud de onda de 260 nm y la obtenida a 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$  donde  $A$  es la absorbancia).

Los valores obtenidos para las muestras analizadas se encontraron en el intervalo de 1.65 a 1.78. En la figura 7.2 se presentan los espectros de absorción en la región UV obtenidos para estándar de ADN de salmón y para ADN obtenido en el análisis de tejido de lombriz de tierra, del sitio 4 (La Laguna, Lagos de Moreno).

En esta Figura se puede observar buena concordancia entre los espectros obtenidos para el ADN estándar y el ADN para tejido de lombriz, con el máximo de absorción en 260 nm, confirmando la extracción de ADN con esta metodología en muestras de tejido liofilizado, sin evidentes pérdidas del mismo.

El porcentaje de metilación global del ADN fue evaluado con base en la relación entre la señal de 5mdC (5-metil-2'-desoxicitidina) y la señal de dG (desoxiguanosina) de acuerdo con la siguiente ecuación:  $(A_{5mdC} / A_{dG}) \cdot 100 \%$ , donde  $A$  es el área del pico cromatográfico [186].

En la figura 7.3 se presenta el cromatograma obtenido por HPLC-UV (bajo las condiciones de operación antes descritas), en el análisis de tejido de lombriz de tierra perteneciente al punto de muestreo 4. En este cromatograma se puede observar la elución de los dos picos de interés para este estudio, dG y 5mdC, para este último se realizó una ampliación con la finalidad de obtener una mejor proyección del pico cromatográfico obtenido. Los tiempos de retención obtenidos fueron de  $10.3 \pm 0.48$  min y  $11.1 \pm 0.55$  min para 5mdC y dG respectivamente.



**Figura 7.3.** Cromatograma obtenido por HPLC-UV en el análisis de desoxicucleosidos del tejido de lombriz de tierra perteneciente al sitio de muestreo 4: La Laguna, en Lagos de Moreno, Jal.

Los porcentajes de metilación promedio obtenidos en el análisis de los tejidos provenientes de los sitios 1, 2, 4, 5 y 7 fueron  $2.49 \pm 0.07$  %;  $2.98 \pm 0.01$  %;  $3.38 \pm 0.1$  %;  $2.57 \pm 0.12$  %;  $3.53 \pm 0.12$  % respectivamente (Tabla 7.4). Estos valores son muy similares a los obtenidos por otros autores.

#### **7.4.1 La metilación global de ADN y los niveles de concentración de elementos en lombrices de tierra.**

En años recientes, se ha estudiado extensivamente el rol que desempeñan algunos químicos medioambientales en los eventos epigenéticos. En particular, los resultados obtenidos en estudios experimentales, además de las observaciones epidemiológicas indican la existencia de una relación entre diversos metales y metaloides y el estado actual de la metilación del ADN. La metilación global de ADN, es definida como la relación entre las citosinas metiladas y la cantidad total de las bases de citosina o guanina en el ADN; este parámetro ha sido utilizado ampliamente como un indicador de eventos epigenéticos a gran escala [165, 197]. La gran mayoría de los estudios que relacionan cambios epigenéticos con la presencia de metales/metaloides han sido enfocados en un elemento particular (As, Hg, Se, Ni, Cr) o sus formas químicas [164, 197, 198]; sin embargo, la información sobre los efectos globales, causados por la exposición de los organismos a una variedad de elementos que se encuentran presentes en forma natural en diferentes compartimientos medioambientales, es muy escasa.

Para profundizar en este tema, en este estudio se llevó a cabo el análisis estadístico de correlación entre los niveles de concentración de elementos y el porcentaje de metilación de ADN. Inicialmente, se consideraron los niveles de concentración de los elementos individuales encontrados en tejido de lombriz observándose la mayor significancia estadística para el arsénico total ( $\beta = -0.8456$ ,  $p = 0.071$ ). Para el resto de elementos, no se observó ninguna relación con el grado de metilación del ADN ( $p > 0.1$ ). Estos resultados corroboran estudios anteriores sobre el rol que juega el As en la hipometilación global del ADN [164, 197, 199, 200].

En particular, tanto el esquema aberrante de la metilación de ADN y el daño oxidativo, han sido relacionados *in vivo* con la metilación de As. Dado que, los procesos de transmetilación *in vivo* involucran la S-adenosilmetionina como un donador del grupo metilo y comprometen enzimas del grupo de metiltransferasas, no solo el arsénico sino también otros elementos metabolizados mediante la metilación podrían contribuir en la hipometilación global del ADN[43, 201].

**Tabla 7.1** Metilación global de ADN en lombrices de tierra y su relación con la biotransformación de elementos via metilación.

Sitio	ADN methyl. %	Concentraciones de elemtos en tejido, mg kg <sup>-1</sup> masa seca					
		As*	Hg*	(As + Hg)*	Organico** As + Hg	Inorganico** As + Hg	(As + Hg - Se + Sb)*
1	2.80	3.78	6.74	10.52	2.46	7.35	14.3
2	1.92	43.5	0.25	43.75	1.37	38.0	48.5
4	3.37	1.43	4.59	6.02	0.58	4.83	9.47
5	2.15	15.8	22.6	38.4	13.9	19.3	44.4
7	2.71	6.48	4.87	11.35	1.34	8.24	18.3
$\beta$	-	<b>-0.8456</b>	<b>-0.2302</b>	<b>-0.9406</b>	<b>-0.4595</b>	<b>-0.8807</b>	<b>-0.9526</b>
$p$	-	<b>0.071</b>	<b>0.710</b>	<b>0.017</b>	<b>0.436</b>	<b>0.049</b>	<b>0.012</b>

\* - Concentración total del elemento determinado en tejido por ICP-MS (todos los datos estan en las tablas 4.3 y 4.4).

\*\* - Suma de especies de As y Hg organico o inórganicos determinadas en tejido por HPLC – ICP-MS (los valores individuales estan dados en las tablas 5.2, 5.3, 6.2 y 6.3

$\beta$ ,  $p$  – Coeficiente de correlación y probabilidad evaluados por análisis estadístico entre la metilación global de AND y la concentración de elementos en tejido de lombriz de los sitios 1,2,4,5, 7.

Como se presentó en la sección previa, las lombrices poseen la capacidad para la conversión del As y Hg inorgánico a sus formas metiladas, por lo que se examino la relación entre suma de los niveles de ambos elementos y metilación de ADN. También se tomaron en cuenta como variables en el análisis de correlación la suma de todos elementos potencialmente biometilados en lombrices (As + Hg + Se + Sb) y sumas de las formas

orgánicas e inorgánicas de Hg y As. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 7.4. e indican una inversa correlación estadísticamente significativa entre metilación del ADN y suma de las concentraciones totales en biomasa de As + Hg y As + Hg + Se + Sb, así como para suma de las especies inorgánicas de As y Hg ( $\beta = -0.9406$ ,  $p = 0.017$ ;  $\beta = -0.9526$ ,  $p = 0.012$ ;  $\beta = -0.8807$ ,  $p = 0.049$  respectivamente, Tabla 7.4).

Aparentemente, todos los elementos que son biotransformados *in vivo* mediante metilación contribuyen en el estatus actual de la metilación de ADN en la lombriz de tierra. Puesto que no se observó la asociación significativa entre las especies orgánicas de As y Hg y la metilación de ADN, puede asumirse que una fracción del contenido actual de las especies metiladas presentes en el tejido ha sido asimilada del suelo y por ello no tiene ninguna relación con la metilación del ADN. Resumiendo, los resultados obtenidos se propone que el porcentaje de metilación global de ADN en lombrices de tierra puede ser un indicador de riesgo de cambios epigenéticos relacionados con la presencia de metales y metaloides en el medioambiente terrestre.

## 7.5 CONCLUSIONES

1. Se adaptó el procedimiento por HPLC-UV, desarrollado previamente para la determinación del grado de metilación global del ADN en lombrices de tierra.
2. En el análisis estadístico se observaron correlaciones inversas entre el grado de metilación del ADN y los niveles de concentración total de As, As + Hg y As + Hg + Sb + Se con la creciente significancia estadística en este orden, lo que indica que todos elementos potencialmente biometilados *in vivo* contribuyen en el estado actual de la metilación del ADN en lombrices provocando su hipometilación.
3. Considerando que la metilación global actual del ADN en las lombrices de tierra, se ve afectada por diversos elementos bajo los procesos de metilación, este parámetro puede ser usado como bioindicador del riesgo epigenético relacionado con la presencia de dichos elementos en diferentes ambientes terrestres.

## **CAPITULO 8**

# **DETERMINACIÓN DE METALES, ALGUNOS METALOIDES Y FLÚOR EN AGUA DE GRIFO DE LA CIUDAD DE LAGOS DE MORENO**

## 8.1. INTRODUCCIÓN

El presente capítulo contempla el análisis de elementos totales en agua de grifo de la ciudad de Lagos de Moreno, así como también, la determinación de la cantidad de flúor presente en las mismas muestras. Este trabajo surgió, debido a la inquietud personal por obtener información más completa, precisa y confiable sobre el perfil metálico contenido en el agua de grifo y al que los habitantes de la ciudad de Lagos de Moreno están diariamente expuestos. En base a que, durante todo el tiempo de desarrollo del trabajo investigación para la tesis doctoral trabajé con la Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS), pude apreciar las ventajas de usar el ICP-MS como detector específico de elementos por las ventajas ya antes mencionadas. Debido a esto, se me permitió desarrollar esta pequeña investigación como trabajo adicional a mi trabajo de tesis y como aportación personal, muy específicamente a la sociedad de esta ciudad.

Por otra parte, es importante mencionar, que en la literatura, existe poca información detallada y completa sobre el contenido general de metales / metaloides en agua de grifo, si bien existe información sobre uno o dos metales en particular, no la existe para los 18 elementos determinados en este trabajo, por otra parte, la información reportada por otros autores abarca de forma general (regional o estatal) y no en forma particular como en este caso.

### 8.1.1 El agua como recurso natural

El **agua** (del latín *aqua*) es el compuesto formado por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno (H<sub>2</sub>O). El término agua se aplica en el lenguaje corriente únicamente al estado líquido de este compuesto, mientras que se le asigna el término *hielo* a su estado sólido y el término *vapor de agua* a su estado gaseoso. Es el compuesto con el calor latente de vaporización más alto, 540 cal/g (2,26 kJ/g) y con el calor específico más alto después del litio, 1 cal/g (4,18 J/g).

El agua es un recurso natural esencial para la supervivencia de todas las formas conocidas de la vida en la tierra [202](no se conoce ninguna forma de vida que tenga lugar en su ausencia completa), pero que, muchas de las veces, debido a fuentes antropogénicas, puede llegar a estar tan contaminada que su ingesta puede resultar nociva para la salud de los seres humanos. Por otra parte, es el único compuesto que puede estar en los tres estados físicos (sólido, líquido y gaseoso) a las temperaturas que se dan en la Tierra. Se encuentra en forma líquida en los mares, ríos, lagos y océanos; en forma sólida, nieve o hielo, en los casquetes polares, en las cumbres de las montañas y en los lugares de la Tierra donde la temperatura es inferior a cero grados Celsius; y en forma gaseosa se encuentra formando parte de la atmósfera terrestre como vapor de agua. A temperatura ambiente es líquida, inodora, insípida e incolora, aunque adquiere una leve tonalidad azul en grandes volúmenes, debido a la refracción de la luz al atravesarla, ya que absorbe con mayor facilidad las longitudes de onda larga (rojo, naranja y amarillo) que las longitudes de onda corta (azul, violeta), desviando levemente estas últimas, provocando que en grandes cantidades de agua esas ondas cortas se hagan apreciables. El agua subterránea constituye la mayor reserva de agua potable en el mundo, por ello, es primordial conservarla y mantenerla libre de contaminación debida a fuentes antropogénicas, sin embargo, la composición geomorfológica en diferentes zonas del planeta determina la presencia en el agua subterránea de varios elementos y compuestos orgánicos e inorgánicos potencialmente nocivos para la salud humana como es el caso de pesticidas, mercurio, arsénico, plomo, cadmio, selenio o fluoruro [53, 203].

Por otro lado, hablando del flúor, el cual es de importancia para el presente trabajo, es trascendental saber que los iones fluoruro se encuentran en forma natural en el agua y pueden formar complejos con silicio, aluminio y boro. Estos complejos pueden existir en el agua debido al uso de complejos fluorados por la industria. En muchas ciudades la fluoración del agua potable se utiliza para la prevención de caries dental. Sin embargo, en muchas regiones los niveles de fluoruro exceden con mucho los límites máximos permisibles ( $1.5 \text{ mg L}^{-1}$ )[204, 205] y su presencia natural se convierte en un problema de salud pública.

La determinación de fluoruros ha incrementado su importancia con el crecimiento de las prácticas de fluoración de aguas como una medida de salud pública. La mayoría de las aguas no sobrepasan los  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  de fluoruros, excepto cuando se contaminan con desechos industriales o aguas negras, sobre todo si provienen de industrias de acero, aluminio, fertilizantes, de la elaboración de esmaltes y vidrios, en la fabricación de gomas y almidones adhesivos así como del pretratamiento de cueros y pieles[206].

### 8.1.2 Antecedentes

Existen regiones en la República Mexicana donde las características geológicas prevalentes proveen a sus acuíferos de arsénico y flúor disueltos en el agua. Estos elementos constituyen parte de una gran cantidad de minerales, y naturalmente, a través de procesos geoquímicos las sales que contienen arsénico y flúor se solubilizan en los acuíferos[53]. Razón por la cual, en estados como Aguascalientes, Baja California Norte, Coahuila, Chihuahua, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, San Luis Potosí, Sonora y Zacatecas, se han encontrado concentraciones que sobrepasan los límites permisibles según los criterios correspondientes a la calidad del agua para elementos como el arsénico y/o flúor entre otros [53, 204].

En particular y enfocando la atención al presente trabajo, el municipio de Lagos de Moreno es una ciudad que cuenta con una superficie de  $2,849 \text{ km}^2$  y una población de 140 001 habitantes (INEGI 2010) y es uno de los municipios que conforma la región denominada de “Los Altos de Jalisco”. Esta región forma parte del cinturón Volcánico Trans-Mexicano (conocido también como Eje Neovolcánico), caracterizado por la termalidad de las aguas subterráneas[52].

La fuente principal de suministro de agua potable en la mayoría de las poblaciones de los altos de Jalisco, es de agua de pozos subterráneos que en muchos casos es de origen hidrotermal. Estas aguas termales se caracterizan por la presencia tanto de elementos como de compuestos químicos potencialmente tóxicos entre los que destacan el flúor, los nitratos y los metales pesados.

Se han realizado análisis a muestras de agua de diferentes fuentes de abastecimiento de esta región, encontrándose, en la mayoría de las muestras, elementos potencialmente tóxicos en los que destacan el arsénico, el flúor, mercurio y el selenio que se encontraron en concentraciones que sobrepasan los valores establecidos por (i) la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 para el agua potable ( $50 \mu\text{g L}^{-1}$  As,  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$  F,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  Hg y Se no incluido en la NOM vigente)[205]; (ii) WHO: World Health Organization ( $25 \mu\text{g L}^{-1}$  para el As,  $1 \mu\text{g L}^{-1}$  para el Hg,  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  para el Se). Cabe mencionar que en el proyecto de nueva Norma Oficial Mexicana, PROY-NOM-SSA1-250-2007, se modifican los máximos niveles permisibles:  $10 \mu\text{g As}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g Se L}^{-1}$ ,  $1.5 \text{ mg fluor L}^{-1}$ .

Para los habitantes de Lagos de Moreno, el consumo de agua potable es el principal aporte de estos tóxicos, el cual pudiera verse reflejado en la salud de la población, que se sabe, pueden inducir a fluorosis dental, hepatotoxicidad, hepatomegalia, osteoporosis causados por el flúor; problemas dérmicos, gastrointestinales, cardiovasculares y daños cerebrales debido a la ingesta de arsénico; mientras que, el riesgo por la ingesta de selenio es mínimo. En este trabajo se reportan los niveles de concentración de elementos metálicos y algunos metaloides en agua de grifo de la ciudad de Lagos de Moreno, Jal. La herramienta analítica de estudio fue la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente como fuente de ionización (ICP-MS). En el análisis de 16 muestras de agua, los valores promedio de concentraciones encontradas fueron:  $< 2 \mu\text{g L}^{-1}$  para el Cd, Sb, , Tl y Th; en el intervalo de 2 a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  se encontraron el Mn, Co, Se, Ag, Hg, Cr, As, Pb y U; y en el intervalo de 10 a  $80 \mu\text{g L}^{-1}$  fueron para el V, Cu y Zn. Por su parte, para el flúor las concentraciones obtenidas se encontraron en el intervalo de 2 a  $3 \text{ mg L}^{-1}$  para todas las muestras.

Debido a la composición de la corteza terrestre que se presenta en la ciudad de Lagos de Moreno, se ha estudiado extensivamente la distribución de metales y metaloides en diferentes compartimentos del medio ambiente. En los últimos años algunos grupos de investigación han realizado diferentes proyectos, obteniendo interesantes datos sobre la calidad del agua y, en particular sobre los niveles de metales pesados y metaloides en la región de los Altos de Jalisco[207, 208].

A pesar del extenso trabajo realizado, hasta la fecha no existe la información sólida y uniforme sobre los niveles de elementos considerados en la Norma Oficial Mexicana (NOM-127 SSA1-1994).

En este contexto, el presente trabajo ha sido enfocado en el estudio de la calidad del agua de consumo en la ciudad de Lagos de Moreno, teniendo como objetivo principal la determinación de elementos metálicos y algunos metaloides en agua de grifo, tomados en diferentes sitios de la ciudad. La herramienta analítica de estudio fue la espectrometría de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) como detector específico de elementos. La selección de la técnica fue con base en las siguientes características: (i) capacidad de análisis multielemental e isotópico, (ii) excepcionalmente bajos límites de detección para la mayoría de los elementos incluyendo los metaloides y algunos no metales ( en el intervalo de concentraciones desde pocas partes por trillón hasta partes por billón); (iii) amplio rango dinámico (típicamente del orden de 8 órdenes de magnitud de las concentraciones); (iv) muy pocas interferencias y, en consecuencia (v) alta precisión y exactitud de los resultados analíticos.

## **8.2 OBJETIVO PARTICULAR**

Obtener datos cuantitativos confiables de los niveles de concentración de elementos metálicos y de algunos metaloides en agua de grifo de la ciudad de Lagos de Moreno mediante su detección / cuantificación por Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

## **8.3. MATERIALES Y METODOS**

### **8.3.1 Instrumentación**

Se utilizó el espectrómetro de masas con ionización en plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) de Agilent Technology, modelo 7500ce; equipado con el nebulizador convencional concéntrico tipo Meinhard, la cámara de niebla con enfriamiento (tipo Peltier, 2°C) y la celda de colisión/reacción, automuestreador y controlado mediante el paquete Chemstation para la determinación de elementos totales.

El flúor por su parte, fue determinado utilizando un Espectrofotómetro UV/Vis Spectronic 3000 Array de Milton Roy, con celda de cuarzo y longitud de onda 570 nm.

### 8.3.2 Reactivos, disoluciones y muestras

Los reactivos fueron del grado analítico de pureza, se utilizó agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco, USA) para la preparación de las soluciones. Las calibraciones se realizaron empleando la solución estándar para el análisis medio ambiental de Agilent Technologies (10 mg L<sup>-1</sup> de Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Tl, V, Zn, U; 100 mg L<sup>-1</sup> de Fe, K, Ca, Na, Mg en 10% HNO<sub>3</sub>; 10 mg L<sup>-1</sup> de Hg en 10 % HNO<sub>3</sub>) y la solución de estándar interno (<sup>115</sup>In a 50 µg L<sup>-1</sup>). El ácido nítrico para análisis de trazas fue de Fluka (trace-select), el material de referencia certificado fue NIST 1643d (Trace Elements in Water).

#### 8.3.2.1 Recolección de muestras

Se analizaron las muestras de agua de grifo recolectadas en 16 sitios de muestreo de la ciudad de Lagos de Moreno (figura 1 ubicación de la ciudad). La toma de muestra se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-014-SSA1-1993): *Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados*. Para ello se utilizaron botellas de polipropileno de 500 ml, previamente descontaminada con ácido nítrico al 10% y lavadas con agua desionizada. En el sitio de muestreo se dejó correr el agua por lo menos tres minutos, la botella se enjuagó con tres porciones de agua y finalmente se llenó. Se tomaron dos muestras en cada sitio, en intervalos de tiempo de 30 minutos. El agua fue acidificada (1000µl de ácido nítrico (1:10) a cada muestra de 500 ml), al llegar al laboratorio se almacenó por máximo cuatro días antes de su análisis (4°C).



Figura 8.1. Ubicación de la ciudad de Lagos de Moreno, Jalisco.

### 8.3.3.1 Determinación de elementos totales

Las condiciones de operación del ICP-MS fueron seleccionadas diariamente (“tuning”), ajustando los parámetros hasta obtener la respuesta para óxidos y dobles cargas inferiores a 1.0% y 1.2% respectivamente. Los parámetros de plasma y condiciones de operación del ICP-MS para la determinación de iones metálicos en agua de grifo se presentan en la tabla 8.1. Para eliminar las interferencias isobáricas, se utilizó la celda de colisión con flujo de helio de  $3.0 \text{ mL min}^{-1}$ ; en el modo de análisis cuantitativo, se monitorearon los isótopos  $^{51}\text{V}$ ,  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{63}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{75}\text{As}$ ,  $^{82}\text{Se}$ ,  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{Cd}$ ,  $^{121}\text{Sb}$ ,  $^{200}\text{Hg}$ ,  $^{202}\text{Hg}$ ,  $^{205}\text{Tl}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{232}\text{Th}$ ,  $^{238}\text{U}$  con el tiempo de integración de 300 ms por isótopo.

Con las condiciones instrumentales establecidas, se llevó a cabo el proceso de calibración, utilizando como estándar interno  $^{115}\text{In}$  en una concentración  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ . Las soluciones de calibración conteniendo ocho niveles de concentración para cada uno de los elementos (0, 0.2, 0.4, 1, 2, 5, 10,  $20 \mu\text{g L}^{-1}$ ) fueron obtenidas diluyendo el estándar medio ambiental de Agilent Technologies. En la calibración multielemental, se obtuvieron los valores de coeficientes de regresión lineal  $r^2 > 0.9993$  para cada uno de los elementos.

El análisis de agua de grifo se realizó por triplicado; las muestras fueron diluidas 1:5 con agua desionizada e introducidas al sistema ICP-MS.

En paralelo se obtuvieron lecturas del blanco (agua desionizada, acidificada, centrifugada y diluida igual que las muestras) y del material de referencia (NIST 1643d). Los valores del blanco, medidos en unidades de concentración (BEC-blank equivalent concentration) fueron en el intervalo de 0 ng L<sup>-1</sup> a 80 ng L<sup>-1</sup>.

**Tabla 8.1.** Condiciones instrumentales de operación del sistema ICP-MS en la determinación de elementos totales en agua de grifo.

***ICP-MS — Determinación de elementos totales***

Potencia	1500W
Gas nebulizador	0.9 mL min <sup>-1</sup>
Gas make-up	0.17 mL min <sup>-1</sup>
Introducción de muestra	Meinhard nebulizer
Conos muestra y skimmer	Nickel
Profundidad muestra	10mm
Isótopos monitoreados	<sup>51</sup> V, <sup>52</sup> Cr, <sup>55</sup> Mn, <sup>59</sup> Co, <sup>60</sup> Ni, <sup>63</sup> Cu, <sup>68</sup> Zn, <sup>75</sup> As, <sup>82</sup> Se, <sup>107</sup> Ag, <sup>109</sup> Ag, <sup>111</sup> Cd, <sup>121</sup> Sb, <sup>200</sup> Hg, <sup>202</sup> Hg, <sup>207</sup> Pb, <sup>232</sup> Th, <sup>238</sup> U.
Modo de adquisición	Spectrum analysis
Tiempo de integración	300ms
Celda colisión/reacción	He, 3.0 mL min <sup>-1</sup>

### 8.3.3.2 Determinación de flúor

La determinación del flúor se desarrolló según lo establecido por la Norma Mexicana (NMX-AA-077-SCFI-2001): *Análisis de aguas - determinación de fluoruros en aguas naturales, residuales y residuales Tratadas*. Los reactivos utilizados fueron el Reactivo Spands Aquanal Profesional para la calibración de fluoruros de 0.02-1.5mg L<sup>-1</sup> de Fluka Analytical, la solución de zirconio empleada fue la solución estándar a una concentración de 1000mg L<sup>-1</sup> en HCl al 1 % de Productos Químicos Kalium, la solución patrón de F<sup>-</sup> a una concentración de 1000 mg L<sup>-1</sup> se prepara a partir del fluoruro de amonio (Fluka).

El proceso de calibración se realizó conteniendo siete niveles de concentración 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 y 1.50 mg L<sup>-1</sup> de flúor y 200 µL del reactivo Spands aquanal profesional (SPADNS:Zr 1:1 en HCl al 1%) para desarrollar el color y realizar su análisis posterior por UV.

Las determinaciones espectrofotométricas para la determinación de flúor en agua se realizaron en un Spectronic 3000, Milton Roí, con celda de cuarzo de 1cm de paso de luz y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm

#### 8.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para asegurar una buena calidad de los resultados analíticos en términos de precisión y exactitud, el procedimiento analítico fue basado en el método EPA 6020 (EPA- Agencia de Protección del Medio Ambiente, USA), aplicable al análisis por ICP-MS de bajas concentraciones (µg L<sup>-1</sup> e inferiores) de un alto número de elementos (hasta 60) en muestras de agua (ICP-MS method 6020, USEPA). Se optó por la determinación de la fracción disuelta de los elementos, omitiendo la etapa de digestión de las muestras.

De acuerdo con el método EPA 6020, la cuantificación fue sobre la base de las soluciones estándar multielementales y estandarización externa. Las posibles interferencias isobáricas fueron eliminadas mediante el uso de tecnología de celda de colisión / reacción usando flujo de helio de 3.0 mL min<sup>-1</sup>.

En la tabla 8.2 se muestran los Límites de Detección (LD) evaluados para cada uno de los elementos (tiempo de integración 300 ms, 9 lecturas), cuyos valores fueron suficientemente bajos para llevar a cabo la cuantificación de elementos en agua de grifo, donde se esperan niveles de ultratrazas. Como prueba de exactitud se llevó a cabo la determinación de elementos en el material de referencia certificado. En la tabla 8.2, se presentan los resultados obtenidos (promedios ± DE para 3 replicas) junto con los valores certificados. Se obtuvo muy buena concordancia para todos los elementos, lo que confirma la exactitud del procedimiento en el análisis del agua.

Con el fin de obtener la información sobre el contenido de elementos metálicos y metaloides en el agua de consumo humano, utilizada directamente por los habitantes de la ciudad de Lagos de Moreno, en este trabajo se optó por analizar el agua de grifo.

Para ello se recolectaron muestras de agua de grifo de 16 sitios de muestreo: (1) El Panteón, (2) El Carmen, (3) Barrio Bajo de Moya, (4) Paseos de la Montaña, (5) Nueva Santa Elena, (6) Centro, (7) Lomas del Valle, (8) Pueblo de Moya, (9) El Tepeyac, (10) El Calvario, (11) Cuesta Blanca, (12) San Miguel, (13) Las Huertitas, (14) Cañada de Ricos, (15) San Felipe y (16) La Luz., todas ellas localizadas en la ciudad de Lagos de Moreno, Jal.

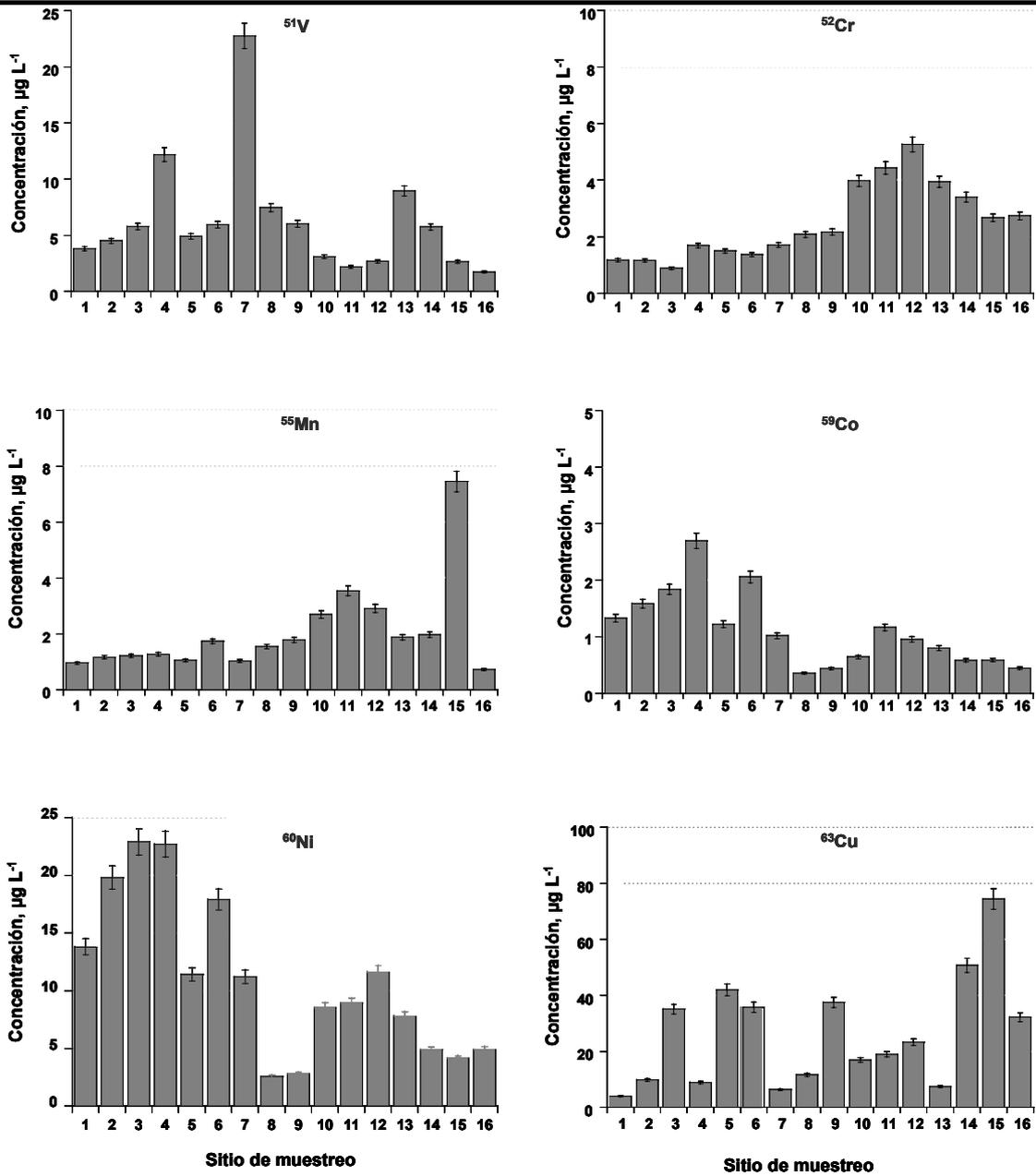


Figura 8.2 Resultados de determinación de <sup>51</sup>V, <sup>52</sup>Cr, <sup>55</sup>Mn, <sup>59</sup>Co, <sup>60</sup>Ni, <sup>63</sup>Cu en agua de grifo de 16 sitios de muestreo. (En cada caso se presenta el valor promedio ± desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).

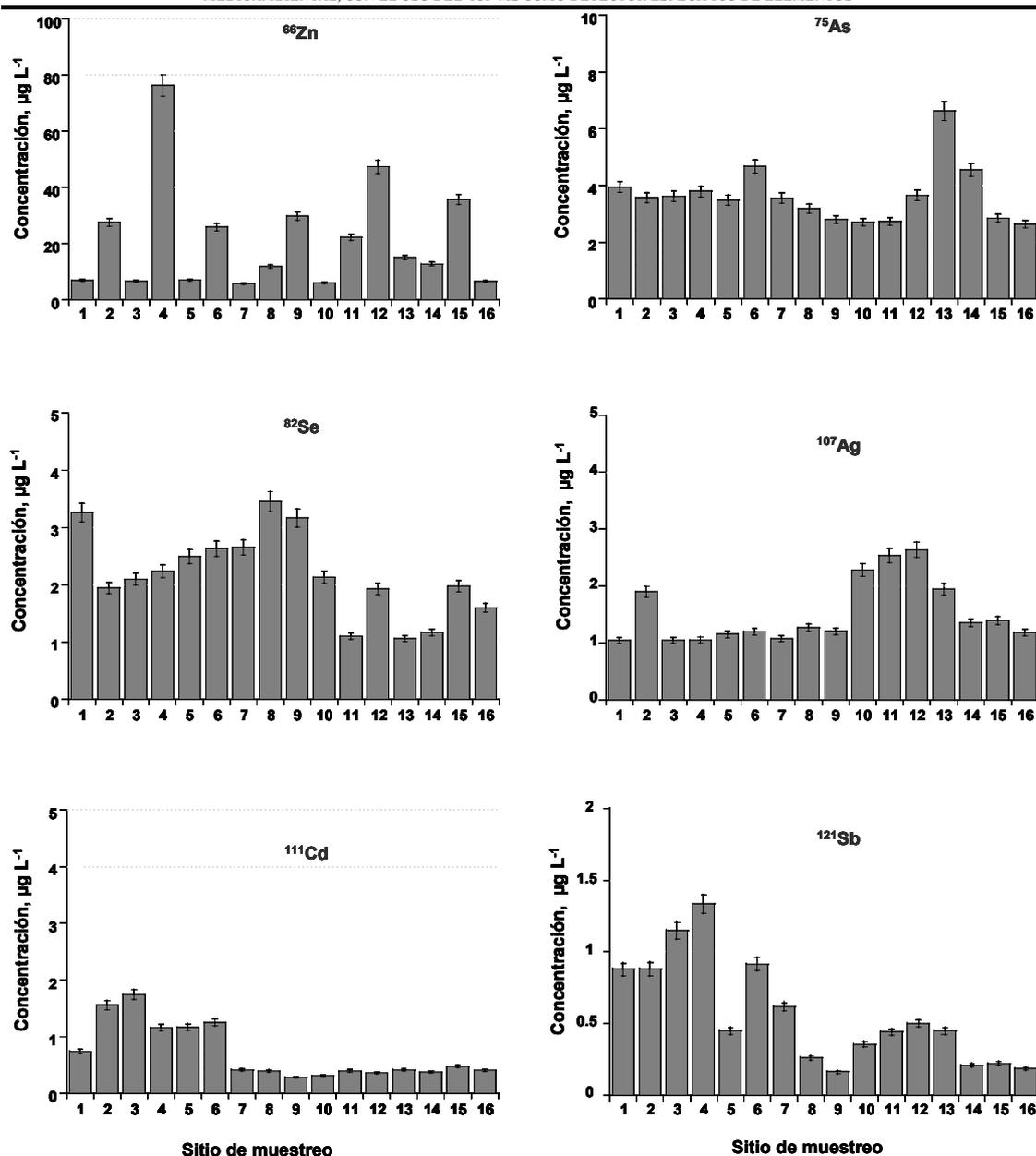


Figura 8.3 Resultados de determinación de <sup>68</sup>Zn, <sup>75</sup>As, <sup>82</sup>Se, <sup>107</sup>Ag, <sup>111</sup>Cd, <sup>121</sup>Sb y en agua de grifo de 16 sitios de muestreo. (En cada caso se presenta el valor promedio ± desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).

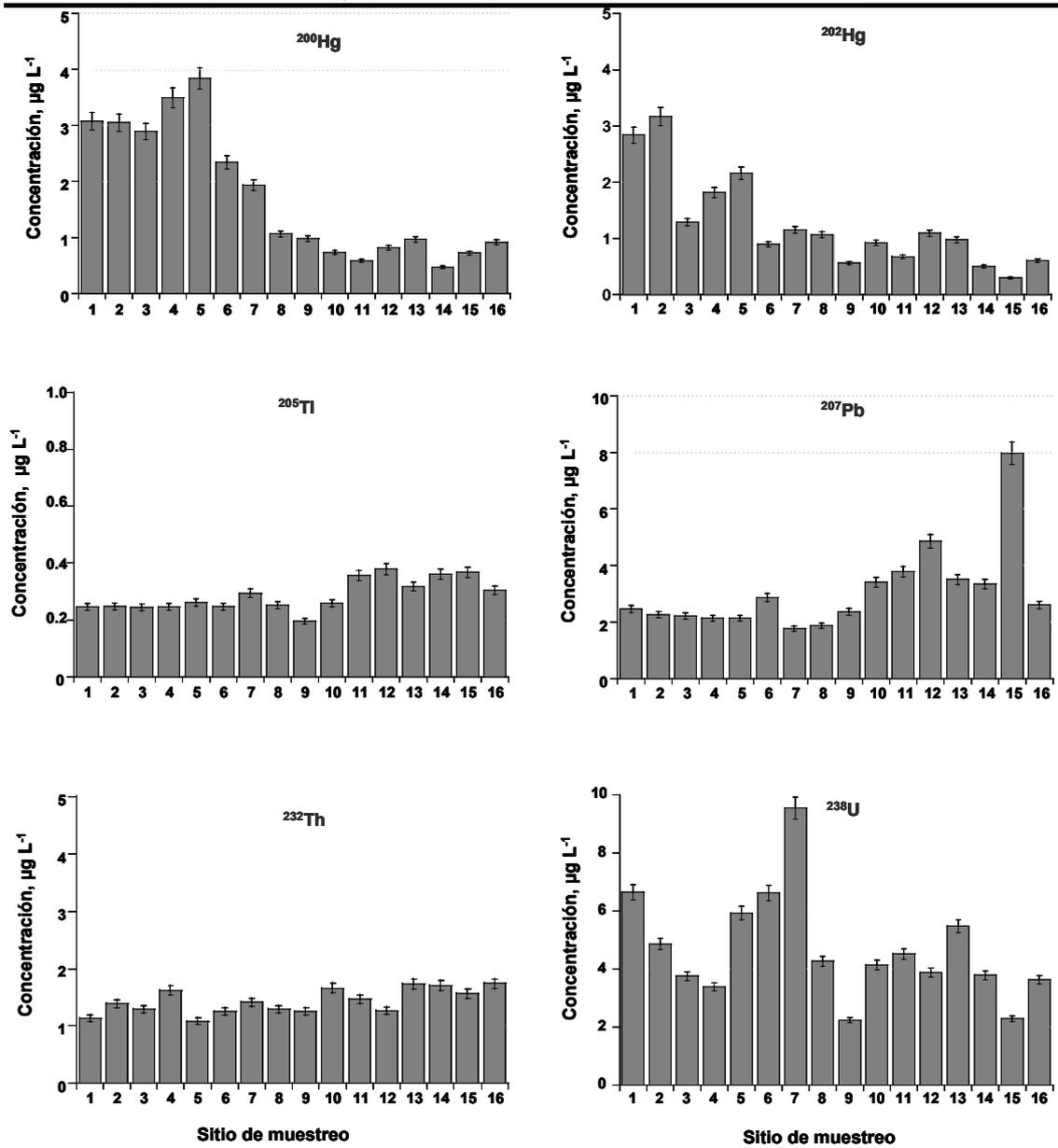


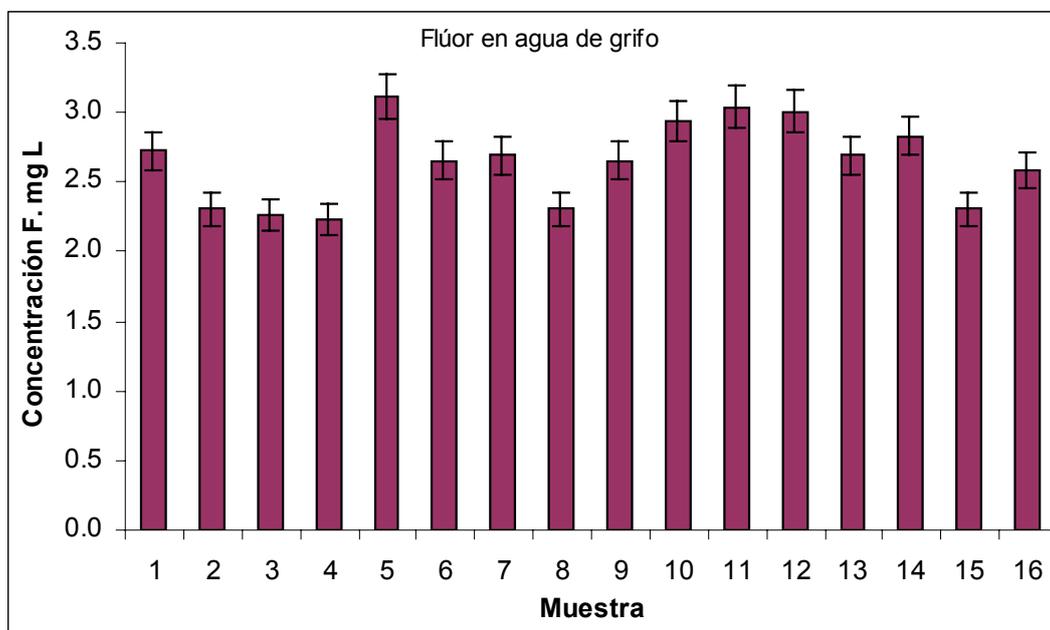
Figura 8.4 Resultados de determinación de <sup>200</sup>Hg, <sup>202</sup>Hg, <sup>206</sup>Tl, <sup>207</sup>Pb, <sup>232</sup>Th, <sup>238</sup>U en agua de grifo de 16 sitios de muestreo. (En cada caso se presenta el valor promedio ± desviación estándar, obtenidos en el análisis por triplicado).

Con el propósito de observar las variaciones entre los contenidos de elementos metálicos y metaloides presentes en el agua de grifo de los diferentes sitios de muestreo, los resultados se presentan en forma de gráficas en las figuras 8.2, 8.3 y 8.4 y en la tabla 8.3 se resumen las concentraciones en  $\mu\text{g L}^{-1}$  obtenidas para los isótopos monitoreados en los 16 sitios de muestreo. Así en la figura 8.2, se presentan los resultados obtenidos para  $^{51}\text{V}$ ,  $^{52}\text{Cr}$ ,  $^{55}\text{Mn}$ ,  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Ni}$  y  $^{63}\text{Cu}$ ; en la figura 8.3 los correspondientes a  $^{68}\text{Zn}$ ,  $^{75}\text{As}$ ,  $^{82}\text{Se}$ ,  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{Cd}$  y  $^{121}\text{Sb}$  y en la figura 8.4 los resultados para  $^{200}\text{Hg}$ ,  $^{202}\text{Hg}$ ,  $^{206}\text{Tl}$ ,  $^{207}\text{Pb}$ ,  $^{232}\text{Th}$  y  $^{238}\text{U}$ . En estas figuras se puede observar que los 16 sitios de muestreo contienen diferentes niveles de concentración para la mayoría de los elementos determinados. De manera general, la variación de la concentración de los elementos monitoreados en el agua de grifo oscilan de:  $< 2 \mu\text{g L}^{-1}$  para el Cd, Sb, Tl y Th; en el intervalo de 2 a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  se encontraron el Mn, Co, Se, Ag, Ni, Hg, Cr, As, Pb y U; y en el intervalo de 10 a  $80 \mu\text{g L}^{-1}$  fueron para el V, Ni, Cu y Zn. Estos valores son bastante similares a los ya reportados por otros autores también en el análisis de agua de grifo pero de la ciudad de Guanajuato, Gto. [34]. Las diferencias existentes entre las dos localidades, como ya se mencionó antes, se debe principalmente a factores tales como ubicación, tipo de suelo y procedencia del agua de abastecimiento (superficial o subterránea).

Por otra parte, el estudio realizado por Ramos y colaboradores donde determinaron Hg, Pb, Cd, Cu, Zn en muestras de agua del Río Ebro en España, encontrando concentraciones hasta de  $325 \mu\text{g L}^{-1}$  para el Zn,  $3.93 \mu\text{g L}^{-1}$  para el Pb,  $2.06 \mu\text{g L}^{-1}$  para el Cd y de  $5.53 \mu\text{g L}^{-1}$  para el Cu [111], dichos valores parecen corroborar los resultados obtenidos en este trabajo.

Por otro lado, una segunda parte de este trabajo fue evaluar la cantidad de flúor presente en las muestras de agua de grifo, siguiendo la metodología descrita en la Norma Mexicana (NMX-AA-077-SCFI-2001): *Análisis de aguas - determinación de fluoruros en aguas naturales, residuales y residuales Tratadas*. Estudios realizados por Hurtado y col. en la Zona de los Altos de Jalisco, reportan específicamente para Lagos de Moreno concentraciones de flúor de 4.77 a  $4.96 \text{mg L}^{-1}$  en noviembre de 1999 y febrero del 2000 respectivamente[52]. En la figura 8.5 se presenta gráficamente la distribución de las concentraciones de flúor determinadas en las muestras de agua de grifo en los 16 sitios de

muestreo analizados, observando uniformidad en todas las muestras y encontrándose valores de flúor que se encuentran en el intervalo de 2.2 a 3.1 mg F<sup>-</sup> L<sup>-1</sup>.



**Figura 8.5.** Concentraciones de flúor determinado en agua de grifo para 16 sitios de muestreo en la ciudad de Lagos de Moreno, Jal. (En cada uno de los casos se presenta el valor promedio  $\pm$  desviación estándar).

Sobre la base de la normatividad vigente (NOM-127 SSA1- 1994, USEPA 2006), los resultados obtenidos indican que el agua de grifo en Lagos de Moreno no está contaminada por metales y metaloides. Sin embargo, en ocho sitios de muestreo, las concentraciones de mercurio sobrepasaron el máximo nivel permisible por la Norma Oficial Mexicana ( $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ) [34] y en todas ellas la cantidad de flúor determinado está por encima del nivel permitido ( $1.5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Respecto a éste último, Húrtado y colaboradores reportan para la determinación de F<sup>-</sup> (en aguas superficiales y en diferentes épocas del año) para la Zona de Los Altos de Jalisco, abarcando 20 municipios, concentraciones que van desde 0.15 hasta  $13 \text{ mg L}^{-1}$  en forma general.

**Tabla 8.2** Resultados de determinación de elementos totales en agua de grifo de 16 sitios de muestreo. Concentraciones reportadas en  $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{DE}$

Sitio	Isótopos monitoreados, $\mu\text{g L}^{-1} \pm \text{DE}$																	
	<sup>51</sup> V	<sup>52</sup> Cr	<sup>55</sup> Mn	<sup>59</sup> Co	<sup>60</sup> Ni	<sup>63</sup> Cu	<sup>66</sup> Zn	<sup>75</sup> As	<sup>82</sup> Se	<sup>107</sup> Ag	<sup>111</sup> Cd	<sup>121</sup> Sb	<sup>200</sup> Hg	<sup>202</sup> Hg	<sup>205</sup> Tl	<sup>207</sup> Pb	<sup>232</sup> Th	<sup>238</sup> U
1	3.81±0.18	117±5.61	0.96±0.02	1.33±0.05	13.8±0.69	3.97±0.20	6.95±0.32	3.94±0.21	3.26±0.22	1.04±0.04	0.74±0.03	0.88±0.03	3.07±0.15	2.84±0.14	0.25±0.01	2.46±0.14	1.13±0.04	6.64±0.28
2	4.51±0.21	1.16±0.06	1.17±0.06	1.58±0.06	19.8±0.91	9.83±0.45	27.5±1.38	3.56±0.19	1.94±0.07	1.90±0.06	1.55±0.08	0.88±0.03	3.05±0.15	3.17±0.17	0.25±0.01	2.26±0.13	1.39±0.05	4.87±0.22
3	5.79±0.22	0.89±0.03	1.22±0.06	1.84±0.07	22.9±1.11	35.1±1.48	6.63±0.31	3.61±0.15	2.10±0.08	1.05±0.03	1.74±0.09	1.15±0.06	2.89±0.14	1.29±0.06	0.24±0.01	2.22±0.13	1.30±0.06	3.75±0.19
4	12.2±0.58	1.69±0.08	1.27±0.06	2.69±0.11	22.7±1.07	8.87±0.41	76.3±3.81	3.79±0.13	2.24±0.10	1.05±0.03	1.2±0.06	1.34±0.07	3.49±0.18	1.82±0.08	0.25±0.02	2.14±0.12	1.62±0.08	3.39±0.17
5	4.90±0.19	1.49±0.07	1.05±0.05	1.22±0.06	11.4±0.45	42.0±1.70	7.05±0.23	3.48±0.14	2.49±0.11	1.15±0.03	1.17±0.06	0.45±0.01	3.84±0.21	2.16±0.13	0.26±0.01	2.14±0.12	1.09±0.05	5.93±0.27
6	5.96±0.23	1.36±0.07	1.74±0.09	2.06±0.10	17.9±1.07	35.7±1.40	25.8±1.30	4.67±0.22	2.63±0.13	1.20±0.04	1.25±0.05	0.92±0.04	2.34±0.13	0.89±0.03	0.25±0.01	2.87±0.13	1.26±0.06	6.62±0.31
7	22.8±1.12	1.71±0.08	1.03±0.05	1.02±0.05	11.2±0.05	6.30±0.29	5.68±0.17	3.55±0.13	2.66±0.13	1.08±0.03	0.41±0.02	0.62±0.03	1.94±0.90	1.15±0.06	0.29±0.01	1.77±0.06	1.41±0.06	9.55±0.48
8	7.46±0.35	2.08±0.10	1.54±0.06	0.35±0.01	2.56±0.10	11.6±0.56	11.9±0.39	3.18±0.13	3.46±0.18	1.27±0.04	0.39±0.01	0.26±0.01	1.06±0.05	1.07±0.05	0.25±0.02	1.88±0.06	1.29±0.05	4.27±0.23
9	6.03±0.31	2.17±0.11	1.78±0.06	0.44±0.01	2.79±0.11	37.5±1.91	29.8±1.42	2.80±0.15	3.17±0.17	1.20±0.04	0.28±0.01	0.16±0.01	0.98±0.06	0.56±0.02	0.20±0.01	2.36±0.14	1.25±0.05	2.24±0.15
10	3.09±0.14	3.98±0.15	2.69±0.13	0.64±0.03	8.55±0.33	16.9±0.86	6.05±0.32	2.70±0.13	2.13±0.12	2.28±0.10	0.31±0.01	0.35±0.01	0.73±0.06	0.92±0.04	0.26±0.02	3.41±0.15	1.66±0.06	4.14±0.21
11	2.19±0.10	4.43±0.22	3.54±0.15	1.17±0.71	8.93±0.35	19.0±0.87	22.2±1.13	2.73±0.13	1.10±0.09	2.54±0.12	0.39±0.01	0.44±0.02	0.58±0.03	0.67±0.03	0.36±0.01	3.78±0.15	1.47±0.05	4.52±0.24
12	2.68±0.11	5.26±0.25	2.91±0.12	0.95±0.04	11.6±0.58	23.3±1.02	47.3±2.11	3.65±0.21	1.93±0.11	2.64±0.12	0.36±0.01	0.50±0.02	0.82±0.04	1.09±0.05	0.38±0.02	4.86±0.25	1.27±0.03	3.88±0.18
13	8.96±0.45	3.94±0.16	1.87±0.09	0.80±0.04	7.81±0.38	7.48±0.23	15.0±0.75	6.63±0.40	1.06±0.08	1.95±0.10	0.41±0.01	0.45±0.02	0.97±0.06	0.97±0.04	0.32±0.02	3.51±0.17	1.73±0.06	5.48±0.26
14	5.75±0.31	3.40±0.14	1.97±0.09	0.58±0.02	4.89±0.24	50.7±2.45	12.7±0.67	4.54±0.33	1.17±0.07	1.36±0.09	0.38±0.01	0.21±0.01	0.47±0.02	0.50±0.02	0.36±0.02	3.34±0.17	1.70±0.06	3.78±0.18
15	2.64±0.12	2.67±0.10	7.45±0.32	0.59±0.02	4.15±0.21	74.3±3.72	35.7±1.34	2.84±0.13	1.98±0.08	1.39±0.09	0.47±0.02	0.22±0.01	0.72±0.03	0.29±0.01	0.37±0.02	7.97±0.35	1.57±0.05	2.29±0.11
16	1.74±0.09	2.74±0.10	0.73±0.03	0.44±0.01	4.91±0.22	32.2±1.61	6.57±0.30	2.63±0.13	1.60±0.06	1.18±0.06	0.40±0.02	0.18±0.01	0.91±0.05	0.61±0.02	0.30±0.02	2.60±0.13	1.74±0.06	3.63±0.18

**Tabla 8.3.** Resumen de los resultados obtenidos del análisis de agua de grifo y los niveles establecidos por la Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-1994) y por la Agencia de Protección al Medio Ambiente (USEPA, 2006).

Elemento	Norma para agua potable mg L <sup>-1</sup>			Resultados obtenidos µg L <sup>-1</sup>		
	NOM	MCL <sup>1</sup>	SDWR <sup>2</sup>	Promedio±DE	Valor mínimo	Valor máximo
As	0.05	0.01	-	3.64 ± 0.17	2.6	6.6
Cu	2.0	1.3	-	25.9 ± 1.91	4.0	74
Cr	0.05	0.1	-	2.51 ± 0.13	0.9	5.3
Hg	0.001	0.002		1.74 ± 0.90	0.5	3.8
Mn	0.15	-	0.05	2.06 ± 0.91	0.7	3.5
Pb	0.025	0.015	-	3.10 ± 0.16	1.8	8.0
Sb	-	0.006	-	0.56 ± 0.02	0.2	1.3
Se	-	-	-	2.18 ± 0.11	1.1	3.5
V	-	0.03	-	6.28 ± 0.31	1.7	23
Zn	5.0	5.0	5.0	21.5 ± 1.07	5.7	76
Cd	0.005	-	-	0.71 ± 0.04	0.3	1.7
Co	-	-	-	1.10 ± 0.06	0.4	2.7
F	1.5	1.5	1.5	2.65 ± 0.11	2.2	3.1

1- MCL(maximum contaminant level)- máximos niveles permisibles en agua potable USEPA.

2-SDWR (secondary drinking water regulation)- valores guía o niveles que no deberían de ser excedidos para conservar características aceptables organolépticas (sabor, color, etc.)

Como ya se ha mencionado, es muy importante contar con técnicas analíticas con bajos límites de detección que permitan un análisis confiable en la determinación cuantitativa de especies contaminantes presentes en el agua, para que de esta manera se pueda optar por la mejora o creación leyes que permitan la regulación de las concentraciones permisibles en el agua y así evitar posibles daños adversos tanto a la salud del ser humano como de todo ser vivo que la consume (animales o plantas).

## 8.5 CONCLUSIONES

1. En este trabajo se llevó a cabo la determinación de una serie de metales, metaloides contenidos de flúor en agua de grifo de la ciudad de Lagos de Moreno.
2. El empleo del ICP-MS como herramienta analítica ha permitido obtener la información cuantitativa para los elementos presentes en concentraciones mayores a  $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$  en una sola corrida de muestra y prácticamente sin tratamiento previo.
3. La exactitud de los resultados obtenidos fue demostrada mediante la cuantificación de elementos en el Material de Referencia Certificado (NIST 1643d) para este tipo de análisis.
4. Los resultados obtenidos muestran que el agua de grifo de Lagos de Moreno no presenta problemas de contaminación por metales y metaloides, excepto por el mercurio que sobrepasa el valor establecido por la Norma Oficial Mexicana de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .
5. La cantidad de fluoruro detectado en todas las muestras sobrepasa el valor establecido por la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-077-SCFI-2001 de  $1.5 \text{mgF}^{-1} \text{L}^{-1}$ . En la mayoría de las muestras se detectaron concentraciones en el intervalo de 2 a  $3 \text{mg L}^{-1}$  de flúor.

## **CAPITULO 9**

# **CONCLUSIONES GENERALES**

El enfoque principal de este trabajo ha sido en el desarrollo de los procedimientos para la cuantificación de metales/metaloides y sus especies en diferentes tipos de muestras ambientales; tratando de cubrir amplio rango de aplicaciones y, en particular contribuir en la solución de problemática regional. Los dos elementos de mayor interés han sido el mercurio y el arsénico. El trabajo de investigación se realizó en tres etapas, cada una de ellas centrada en una temática actual de la siguiente manera:

**Etapa 1:** El análisis de especiación de arsénico como herramienta para evaluar la factibilidad de remoción de arsénico inorgánico y orgánico de las soluciones acuosas con el uso de hierro elemental en forma de polvo y de nanopartículas.

**Etapa 2:** Desarrollo de un nuevo procedimiento de determinación de mercurio inorgánico y de metilmercurio en pescado con el fin de asegurar la confiabilidad de los resultados expresados como concentración de las especies individuales en muestras frescas, proporcionando de esta manera los valores que pueden ser directamente empleados en la evaluación de las porciones de pescado en alimentos, de acuerdo con la reglamentación de la USEPA.

**Etapa 3:** Estudio analítico de la utilidad de la lombriz de tierra como bioindicador de metales/metaloides en suelo.

Como primer resultado del trabajo se han puesto a punto los procedimientos para la cuantificación de las concentraciones totales de V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se, Ag, Cd, Sb, Hg, Pb en muestras acuosas, en suelos y en biomasa de lombrices, basados en el digestión de muestra y la determinación por ICP-MS. Asimismo se trabajó con las condiciones de extracción de especies arsenicales y de mercurio a partir de las muestras de suelo y tejidos. Se propuso un novedoso procedimiento para especiación de mercurio inorgánico y metilmercurio y se adaptó el procedimiento de especiación de As(III), As(V), DMAs(V), mediante acoplamiento de HPLC con ICP-MS como detector específico de los elementos. En cada uno de los casos, se examinó la calidad de los resultados obtenidos, mediante evaluación de los principales parámetros analíticos, cálculo de porcentajes de recuperación, pruebas de precisión y de exactitud.

La utilidad de los procedimientos que se acaban de mencionar ha sido demostrado en el análisis de muestras reales. Los resultados obtenidos en cada una de las etapas han permitido avanzar en el conocimiento en tres tipos de problemática. Las conclusiones específicas de relevancia medio ambiental, formuladas en cada una de las etapas del trabajo se resumen a continuación.

**Etapas 1:** El análisis de especiación de arsénico como herramienta para evaluar la factibilidad de remoción de arsénico inorgánico y orgánico de las soluciones acuosas con el uso de hierro elemental en forma de polvo y de nanopartículas.

- 1) Se demostró la utilidad del procedimiento de especiación de As en estudio de la remoción de diferentes especies arsenicales en las soluciones acuosas.
- 2) Los resultados obtenidos en el análisis de las soluciones de especies individuales demostraron la factibilidad del uso de  $\text{Fe}^0$  en polvo y en forma de nanopartículas para remover las especies inorgánicas, observando la mejor cinética de remoción en presencia de nanopartículas.
- 3) En los experimentos con las soluciones de As(III) y de mezcla de las tres especies (As(III), As(V), DMAs(V)) se observó que, el decremento inicial de la concentración de As(III) está acompañado por el incremento de la concentración de As(V); después de 90 min de contacto, las concentraciones de ambas especies disminuyen gradualmente hasta la remoción prácticamente completa de As(III) y As(V) finalizando 3 horas de contacto. Estos resultados confirman el mecanismo de remoción propuesto anteriormente y basado en la oxidación de As(III) a As(V) y su posterior precipitación en forma de arsenato de hierro ( $\text{Fe}(\text{AsO}_4)$ ).
- 4) Debido a la mayor toxicidad de las formas inorgánicas de arsénico respecto a sus formas orgánicas (DMAs(V)), los resultados preliminares sugieren que el uso de nanopartículas de  $\text{Fe}^0$  podría ser una interesante alternativa para la remoción de arsénico inorgánico de los sistemas acuáticos.

**Etapas 2:** Desarrollo de un nuevo procedimiento de determinación de mercurio inorgánico y de metilmercurio en pescado con el fin de asegurar la confiabilidad de los resultados expresados como concentración de las especies individuales en muestras frescas, proporcionando de esta manera los valores que pueden ser directamente empleados en la evaluación de las porciones de pescado en alimentos, de acuerdo con la reglamentación de la USEPA.

- 5) La novedad del procedimiento propuesto consiste en la modificación de las condiciones de extracción respecto a los reportados anteriormente y en el uso del ión bismuto como el EI, lo que ha permitido eliminar la etapa de liofilización o secado de muestra, corregir los errores relacionados con incompleta extracción y obtener los resultados finales como la concentración de cada una de las especies en la porción de masa fresca.
- 6) La selección del EI fue con base en las similitudes entre iones  $\text{Bi}^+$  y  $\text{Hg}^{2+}$  en términos de tamaño y carga así como la afinidad al grupo  $-\text{SH}$  en cisteína. Por otro lado, la capacidad de análisis multielemental de la técnica ICP-MS ha permitido registrar las señales de mercurio y de IE simultáneamente.
- 7) La homogeneización y extracción de especies de mercurio y de EI se llevó a cabo en un solo etapa, agregando al tejido fresco el ácido perclórico, la cisteína y la mezcla tolueno:metanol inmediatamente antes de la homogeneización con ayuda de un politrón. Para mejorar el rendimiento de la extracción, se colocó la mezcla obtenida en el baño de ultrasonido.
- 8) Se ha demostrado que el procedimiento propuesto permite mejorar la precisión y exactitud de los resultados respecto al mismo procedimiento sin utilizar el método de EI y también respecto a los resultados obtenidos cuando la extracción de las especies se llevó a cabo con el ácido clorhídrico. Sin restar importancia, el procedimiento de recuperación fue mejor usando tejido fresco que el materia seca.
- 9) El procedimiento propuesto es sencillo y rápido, proporcionando datos que pueden ser directamente comparados con valores establecidos por diferentes regulaciones gubernamentales (concentración de Hg en masa húmeda).

**Etapas 3:** Estudio analítico de la utilidad de la lombriz de tierra como bioindicador de metales/metaloides en suelo.

- 10) La determinación de los los elementos en muestras de suelo y en tejidos de lombriz provenientes de siete diferentes sitios confirmaron que cada uno de ellos presenta diferente perfil de elementos, cubriendo de esta manera relativamente amplio rango de concentraciones a las que estaban expuestas de manera crónica las lombrices.
- 11) Los resultados de los análisis estadísticos revelaron la correlación directa entre los niveles de Mn, Co, Zn, As, Se, Ag, Sb, Hg, Pb en suelo y en tejido de lombriz, lo que indica que sus niveles de concentración en estos organismos podrían ser de utilidad como bioindicadores del estatus actual de estos elementos en un ambiente terrestre dado. Entre los elementos determinados en este estudio, para todos aquellos que pueden ser biotransformados mediante los procesos de metilación se observó la correlación directa entre sus niveles en tierra y lombriz.
- 12) Con el fin de verificar si la lombriz de tierra presenta la habilidad de convertir las formas inorgánicas de los elementos en sus especies metiladas, se llevó a cabo el análisis de especiación de Hg y As en suelos y tejidos provenientes de cinco sitios, donde se encontraron suficientemente altas concentraciones totales de estos dos elementos. Los resultados obtenidos revelaron prevalencia de las formas inorgánicas en muestras de los suelos, mientras que en los tejidos se encontraron especies inorgánicas y orgánicas. Con base en estos resultados se ha demostrado que las lombrices no solamente tienen capacidad de captar las dos formas orgánicas e inorgánicas presentes en suelo, pero también convierten las formas inorgánicas en especies metiladas.
- 13) Puesto que diferentes procesos de biometilación comparten enzimas del grupo metiltransferasas y usan S-adenosilmetionina como donador del grupo metil, ha sido propuesto que la metilación de metales/metaloides puede competir con la metilación de ADN, lo que podría ser uno de los mecanismos en epigenética. Una vez demostrado que lombrices de tierra tienen capacidad de biometilar As y Hg, se examinó posible asociación entre niveles de estos dos elementos (y otros potencialmente biotransformados por el mismo mecanismo: Se y Sb) y la metilación

global de ADN en lombrices. La determinación del porcentaje de la metilación global de ADN se llevó a cabo mediante la separación de desoxinucleótidos por cromatografía de líquidos en fase inversa con detección UV. Como resultado, se observó estadísticamente significativa correlación inversa entre el porcentaje de citosinas metiladas en el ADN y las concentraciones totales en biomasa para los siguientes elementos: As, As + Hg, Hg + As+ Se + Sb ( $\beta = -0.8456$ ,  $p = 0.071$ ;  $\beta = -0.9406$ ,  $p = 0.017$ ;  $\beta = -0.9526$ ,  $p = 0.012$  respectivamente) así como para la suma de las formas inorgánicas de As + Hg ( $\beta = -0.8807$ ,  $p = 0.049$ ). Estos resultados indican que la biometilación de los elementos en lombrices de tierra podría favorecer la hipometilación de ADN. Se propone que el grado de metilación global de ADN en lombrices podría ser considerado como un bioindicador de riesgo de no deseados cambios epigenéticos en ambientes terrestres, donde los organismos vivos son expuestos a elementos susceptibles a biometilación.

Finalmente, como la parte complementaria del trabajo de investigación correspondiente a trabajo de tesis, se la llevado a cabo la determinación por ICP-MS de metales/metaloides en agua de grifo recolectada en la ciudad de Lagos de Moreno. En las mismas muestras se determonó también el flúor, aplicando la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-077-SCFI-2001. Cabe resaltar que, el objetivo en este caso fue contribuir con los conocimientos adquiridos durante la realización de la tesis en la problemática regional. Con base en los resultados obtenidos, se han formulado los siguientes conclusiones de relevancia medio ambiental:

- 14) El agua de grifo de Lagos de Moreno no presenta problemas de contaminación por metales y metaloides, excepto por el mercurio que sobrepasa el valor establecido por la Norma Oficial Mexicana de  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .
- 15) La cantidad de fluoruro detectado en todas las muestras sobrepasa el valor establecido por la Norma Oficial Mexicana NMX-AA-077-SCFI-2001 de  $1.5 \text{ mgF}^{-1} \text{ L}^{-1}$ . En la mayoría de las muestras se detectaron concentraciones en el intervalo de  $2$  a  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de flúor.

## **CAPITULO 10**

### **REFERENCIAS**

1. Terlecka, E., *Arsenic speciation analysis in water samples: a review of the hyphenated techniques*. Environ Monit Assess, 2005. **107**(1-3): p. 259-84.
  2. Kannamkumarath, S.S., et al., *Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis*. J Chromatogr A, 2002. **975**(2): p. 245-66.
  3. Summers, A.A. and S. Silver, *Microbial transformation of metals*. Annu Rev Microbiol, 1978. **36**: p. 637-672.
  4. Quevauviller, P., *Certified Reference Materials: A Tool for Quality Control of Elemental Speciation Analysis*, in *Elemental Speciation. New Approaches for Trace Element Analysis*, J.A. Caruso, K.L. Sutton, and K.L. Ackley, Editors. 2000, Elsevier Science: Amsterdam. p. 531.
  5. Michalke, B., *Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples*. Ecotoxicol Environ Saf, 2003. **56**(1): p. 122-39.
  6. Gomez-Ariza, J.L., et al., *Sample treatment in chromatography-based speciation of organometallic pollutants*. J Chromatogr A, 2001. **938**(1-2): p. 211-24.
  7. Wrobel, K., et al., *ICP-MS: Metals and Much More*, in *Advances in Mass Spectrometry*, A.E. Ashcroft, G. Brenton, and J.J. Monaghan, Editors. 2004. p. 248.
  8. Wrobel K, Wrobel K, and C. JA., *Pretreatment procedures for characterization of arsenic and selenium species in complex samples utilizing coupled techniques with mass spectrometric detection*. Anal Bioanal Chem, 2005. **381**: p. 317-331.
  9. Michalke, B. and P. Schramel, *Third international conference on trace element speciation in biomedical, nutritional and environmental sciences*. Anal Bioanal Chem, 2005. **381**(2): p. 394-6.
  10. Uden, P.C., *Gas Chromatographic and Supercritical Fluid Chromatographic Techniques for Elemental Speciation*, in *Element Speciation: New Approaches for Trace Element Analysis*, J.A. Caruso, K.L. Sutton, and K.L. Ackley, Editors. 2000, Elsevier Science: Amsterdam. p. 451.
  11. Uden, P.C., *Metal Analysis: Gas and Liquid Chromatography*, in *Encyclopedia of Separation Science*, I.D. Wilson, M. Cooke, and C.F. Poole, Editors. 2000, Academic Press: San Diego. p. 3347-3354.
  12. Caruso, J.A. and M. Montes-Bayon, *Elemental speciation studies--new directions for trace metal analysis*. Ecotoxicol Environ Saf, 2003. **56**(1): p. 148-63.
  13. Lobinski, R., et al., *Elemental speciation and coupled techniques-toward faster and reliable analyses*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1998. **13**: p. 859-867.
  14. Castillo, J.R., *Especiación multielemental en materia orgánica natural: Conceptos y técnicas acopladas de separación-detección*.: Espaa.
  15. Niedzielski, P. and M. Siepak, *Analytical Methods for Determining Arsenic, Antimony and Selenium in Environmental Samples*. Polish Journal of Environmental Studies, 2003. **12**(6): p. 653-667.
  16. Skoog, D.A., et al., *Química Analítica*. 2002: McGraw Hill.
  17. Koppenaal W. , D., G.C. Eiden, and C.J. Barinaga, *Collision and reaction cells in atomic mass spectrometry: development, status, and applications*. J. Anal. At. Spectrom., , 2004. **19**: p. 561-570.
  18. Agilent-Technologies, *ICP-MS Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, I. Agilent Technologies, Editor. 2005.
-

19. Waddel, R., et al., *Inductively Coupled Plasma mass Spectrometry for Elemental Speciation: Applications in the New Millenium*. Applied Spectroscopy Reviews, 2005. **40**: p. 33-69.
  20. Mendoza-Olivares, D. and F.d.J. Amezcuita-Lopez, *Extracciones y sistemas cromatograficos*, ed. U.d. Guanajuato. 2007.
  21. Quattrocchi, O.A., S.A. de Andrizzi, and R.F. Laba, *Introduccion al HPLC, Aplicacion y Practica. Cap. 10, Analisis Cuantitativo*. 1992, Argentina.
  22. Miller, D.D., *Quimica de los alimentos*. 2006: Limusa Wiley.
  23. Bissen Monique and F.F. H., *Arsenic a Review. Part I: Ocurrance, Toxicity, Speciation, Mobility*. Acta hydrochim. hydrobiol., 2003. **31**(1): p. 9-18.
  24. Sanchez-Rodriguez Andres Felipe and R.-A.M.d. Carmen, *Arsenicismo*. Rev Cent Dermatol Pascua, 2000. **9**(1): p. 25-32.
  25. Tetsushi, S., *Separation and Analysis of Toxic arsenic Species, using LC-ICP-MS*. Agilent Technologies, 2003.
  26. Petkova-Simeonova Verguinia, et al., *Evaluación de diversos minerales para la remoción de arsénico de agua para consumo humano*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
  27. Campos, V., *Estudio de un método alternativo para la purificación de arsénico del agua*. Revista de la Sociedad Química de México, 2003. **47**(3): p. 283-286.
  28. Ingeniero- ambiental, *Arsenico (As)*, in [www.ingenieroambiental.com.ar](http://www.ingenieroambiental.com.ar). 1999: Argentina.
  29. Biterna, M., et al., *Arsenate removal by zero valent iron: batch and column tests*. J Hazard Mater, 2007. **149**(3): p. 548-52.
  30. Wrobel Kazimierz, et al., *Determination of As(III), As(V), monomethylarsonic acid, dimethylarsenic acid and arsenobetaine by HPLC-ICP-MS: analysis of reference materials, fish tissues and urine*. Talanta, 2002. **58**: p. 899-907.
  31. ICPMS, A.A.a.S.b., *Arsenic Analysis and Speciation*. Technical Articles, 2008.
  32. Roy Pradosh and S. Anupama, *Metabolism and toxicity of arsenic: a human carcinogen*. Current science, 2002. **82**(1): p. 38-45.
  33. Saxena V.K., Kumar Sanjeev, and S. V.S., *Ocurrance, behaviour ans speciation of arsenic in groundwater*. Current science, 2004. **86**(2): p. 281-284.
  34. Landero-Figueroa, J.A., et al., *Perfil de Elementos Metalicos y de Algunos Metaloides en Aguas de Grifo de la Ciudad de Guanajuato*. Acta Universitaria, 2008. **18**(2): p. 5-10.
  35. Da- Costa, E.W.B., *Variation in the Toxicity of Arsenic Compounds to Microorganisms and the Suppression of the Inhibitory Effects by Phosphate*. Applied Microbiology, 1972. **23**(1): p. 46-53.
  36. Katsoyiannis Ioannis, Zouboulis Anastasios, and J. Martin, *Kinetics of Bacterial As(III) Oxidation and Subsequent As(V) Removal by Sorption onto Biogenic Manganese Oxides during Groundwater Treatment*. Ind. Eng. Chem. Res., 2004. **43**: p. 486-493.
  37. Raj-Kanel Sushil, et al., *Transport of surface-modified iron nanoparticle in porous media and application to arsenic (III) remediation*. J. Nanopart Res, 2007. **9**: p. 725-735.
-

38. Tuzen, M., et al., *Arsenic speciation in natural water samples by coprecipitation-hydride generation atomic absorption spectrometry combination*. *Talanta*, 2009. **78**(1): p. 52-56.
  39. Wilson Steven, Kelly Walton, and H. Thomas, *Arsenic Removal in Water Treatment Facilities: Survey of Geochemical Factors and Pilot Plant Experiments.*: p. 5-15.
  40. Aposhian HV, *Enzymatic Methylation of Arsenic Species and Other New Approaches to Arsenic Toxicity*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997. **37**: p. 397-419.
  41. Zakharyan, R.A. and H.V. Aposhian, *Arsenite Methylation by Methylvitamin B12 and Glutathione Does Not Require an Enzyme*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999. **154**: p. 287-291.
  42. Cullen, W.R. and K.J. Reimer, *Arsenic Speciation in the Environment*. *Chem Rev*, 1989. **89**: p. 713-764.
  43. Pilsner, J.R., et al., *Associations of Plasma Selenium with Arsenic and Genomic Methylation of Leukocyte DNA in Bangladesh*. *Environ Health Perspect*, 2010.
  44. Kuehnelt, D., J. Lintschinger, and W. Goessler, *Arsenic compounds in terrestrial organisms. IV. Green plants and lichens from an old arsenic smelter site in Austria*. *Applied Organometallic Chemistry*, 2000. **14**: p. 411-420.
  45. Alauddin, M., et al., *Speciation of arsenic metabolite intermediates in human urine by ion-exchange chromatography and flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry*. *J Environ Sci Health Part A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 2003. **38**(1): p. 115-28.
  46. Styblo, M., *Biological mechanisms and toxicological consequences of methylation of arsenic*, in *Toxicology of Metals: Biochemical Aspects*, R.A. Goyer and M.G. Cherian, Editors. 1995, Springer Verlag: Berlin. p. 407-433.
  47. Styblo, M., et al., *The role of biomethylation in toxicity and carcinogenicity of arsenic: a research update*. *Environ Health Perspect*, 2002. **110 Suppl 5**: p. 767-71.
  48. Kumaresan M., R.P., *Overview of speciation chemistry of arsenic*. *Current science*, 2001. **80**(7): p. 837-846.
  49. Szpunar, J., *Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics*. *Analyst*, 2005. **130**(4): p. 442-65.
  50. Francesconi, K.A. and D. Kuehnelt, *Determination of species: A critical review of methods and applications, 2000-2003*. *Analyst*, 2004. **129**: p. 373-395.
  51. Mahlkech, J., B. Steinich, and I. Navarro de Leon, *Ground water chemistry and mass transfers in the Independence aquifer, central Mexico, by using multivariate statistic and mass-balance models*. *Environmental Geology*, 2004. **45 (6)**: p. 781-795.
  52. Hurtado R., Gardea-Torresdey J., and T. K.J., *Fluoride occurrence in tap water at " Los altos de Jalisco" in the Central Mexico Region*. *Conference on Hazardous Waste Research*, 2000.
  53. Vega-Gleason, S., *Riesgo Sanitario Ambiental por la Presencia de Arsenico y Fluoruros en los Acuíferos de Mexico*. *Comision Nacional del Agua. Gerencia de Saneamiento y Calidad del Agua*.
-

54. Ghurye Ganesh and C. Dennis, *Laboratory study on the oxidation of Arsenic (III) to Arsenic (V). Cap.1 Introduction*. 2001: p. 1-13.
55. Francesconi, K.e.a., *Arsenic species in an arsenic hyperaccumulating fern, Pityrogramma calomelanos: a potential phytoremediator of arsenic-contaminated in soils*. Sci Total Environ, 2002. **284 (1-3)**: p. 37-35.
56. Krishna, M.V., et al., *A combined treatment approach using Fenton's reagent and zero valent iron for the removal of arsenic from drinking water*. J Hazard Mater, 2001. **84(2-3)**: p. 229-40.
57. Cundy, A.B., L. Hopkinson, and R.L. Whitby, *Use of iron-based technologies in contaminated land and groundwater remediation: A review*. Sci Total Environ, 2008. **400(1-3)**: p. 42-51.
58. Zhang-Wei-xian, *Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview*. Journal of nanoparticle Research, 2003. **5**: p. 323-332.
59. Xu, Y. and D. Zhao, *Reductive immobilization of chromate in water and soil using stabilized iron nanoparticles*. Water Research, 2007. **41**: p. 2101-2108.
60. Instituto de Ciencia Ambiental y Desarrollo, U., *Transferencia Tecnológica: Nanopartículas de hierro para remediación ambiental*. 2006.
61. B'Hymer, C. and J.A. Caruso, *Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry*. J Chromatogr A, 2004. **1045(1-2)**: p. 1-13.
62. Wrobel, K., et al., *Determination of As(III), As(V), monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and arsenobetaine by HPLC-ICP-MS: Analysis of reference materials, fish tissues and urine*. Talanta, 2002. **58(5)**: p. 899-907.
63. Manning, B., *Arsenic Speciation in As (III)- and As(V)- Treated Soil Using XANES Spectroscopy*. Microchimica Acta 2005. **151**: p. 181-188.
64. Amjad, S., H. Seishiro, and Y. Hiroshi, *Extraction and Especiación of Arsenic in Hair Using HPLC-ICPMS*. Analytical Sciences, 2001. **17 Supplement**: p. 1729.
65. Hristovski, K., et al., *Simultaneous removal of perchlorate and arsenate by ion-exchange media modified with nanostructured iron (hydr)oxide*. J Hazard Mater, 2008. **152(1)**: p. 397-406.
66. Kanel, S.R., J.M. Greneche, and H. Choi, *Arsenic(V) removal from groundwater using nano scale zero-valent iron as a colloidal reactive barrier material*. Environ Sci Technol, 2006. **40(6)**: p. 2045-50.
67. Diner, B.M. and B.E. Brenner, *Toxicity of mercury*, Ervin, Michelle.
68. Mizanur Rahman, G.M., T. Fahrenholz, and H.M. Skip Kingston, *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**: p. 83-92.
69. Cabañero-Ortiz, A.I., Y. Madrid-Albarran, and C. Camara-Rica, *Evaluation of different sample pre-treatment and extraction procedures for mercury speciation in fish samples*. J. Anal. At. Spectrom, 2002. **17**: p. 1595-1601.
70. Sanchez-Uria, J.E. and A. Sanz-Medel, *Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples*. Talanta, 1998. **47**: p. 509-524.
71. 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*. J. Chromatographic A, 2007. **1156(1-2)**: p. 331-339.
72. McSheehy, S., A. Polatajko, and T. Lindemann, *Speciation of Mercury in Environmental and Biomedical Samples Using HPLC Coupled to the XSERIES 2 ICP-MS*, in *GC, LC, GC/MS, and LC/MS Application Notebook*. 2008. p. 23.
73. Linderman, T., et al., *Simultaneous Mercury and Tin Speciation Using GC-HR-ICP-MS*, in *GC, LC, GC/MS, and LC/MS Applications Notebook*. 2008. p. 22.
74. Vallant, B., R. Kadnar, and W. Goessler, *Development of a new HPLC method for the determination of inorganic and methylmercury in biological samples with ICP-MS detection*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2007. **22**: p. 322-325.
75. Valko, M., H. Morris, and M.T. Cronin, *Metals, toxicity and oxidative stress*. Curr Med Chem, 2005. **12(10)**: p. 1161-208.
76. Hasegawa, T., et al., *Speciation of mercury in salmon egg cell cytoplasm in relation with metallomics research*. Talanta, 2005. **68(2)**: p. 465-9.
77. Burger, J., A.H. Stern, and M. Gochfeld, *Mercury in commercial fish: optimizing individual choices to reduce risk*. Environ Health Perspect, 2005. **113(3)**: p. 266-71.
78. [w.cfsan.fda.gov/~comm/haccp4.html](http://w.cfsan.fda.gov/~comm/haccp4.html), *Fish and fisheries products hazards and controls guidance, U.S. Food and Drug Administration*. Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2001.
79. Harrington, C.F., *The speciation of mercury and organomercury compounds by using high- performance liquid chromatography*. Trends Anal Chem, 2000. **19(2-3)**: p. 167-179.
80. Yin, Y., et al., *A new vapor generation system for mercury species based on the UV irradiation of mercaptoethanol used in the determination of total and methyl mercury in environmental and biological samples by atomic fluorescence spectrometry*. Anal Bioanal Chem, 2007. **388(4)**: p. 831-6.
81. 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*. Anal Bioanal Chem, 2008. **390(8)**: p. 2123-32.
82. Hight, S.C. and J. Cheng, *Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma - mass spectrometry (ICP - MS): Method development and validation*. Anal Chim Acta, 2006. **567**: p. 160-172.
83. Krystek, P. and R. Ritsema, *Analytical product study of germanium-containing medicine by different ICP-MS applications*. J Trace Elem Med Biol, 2004. **18(1)**: p. 9-16.
84. Margetinova, J., P. Houserova-Pelcova, and V. Kuban, *Speciation analysis of mercury in sediments, zoobenthos and river water samples by high-performance liquid chromatography hyphenated to atomic fluorescence spectrometry following preconcentration by solid phase extraction*. Anal Chim Acta, 2008. **615(2)**: p. 115-23.
85. Chiou, C.S., S.J. Jiang, and K.S. Kumar Danadurai, *Determination of mercury compounds in fish by microwave-assisted extraction and liquid chromatography - vapor generation - inductively coupled plasma mass spectrometry*. Spectrochim Acta Part B, 2001. **56**: p. 1133-1142.
-

86. Harrington, C.F., *The Speciation of Mercury and Organomercury Compounds by Using High-Performance Liquid Chromatography*. Trends Anal Chem, 2000. **19**: p. 167-179.
  87. Dopp E, et al., *Environmental distribution, analysis, and toxicity of organometal(loid) compounds*. Crit Rev Toxicol, 2004. **34**: p. 301-333.
  88. Houserova, P., et al., *Liquid chromatographic--cold vapour atomic fluorescence spectrometric determination of mercury species*. J Sep Sci, 2006. **29**(2): p. 248-55.
  89. Huang, Z.Y., et al., [*Determination of trace mercury species in water and soil samples with atomic fluorescence spectrometry*]. Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi, 2007. **27**(11): p. 2361-6.
  90. Zhang, Z.S., et al., *Bioaccumulation of Total and Methyl Mercury in Three Earthworm Species (Drawida sp., Allolobophora sp., and Limnodrilus sp.)*. Bull Environ Contam Toxicol, 2009.
  91. Vidler, D.S., et al., Appl. Organomet. Chem., 2007. **21**: p. 303.
  92. Sun, J., et al., [*Analysis of total mercury and methylmercury concentrations in four commercially important freshwater fish species obtained from Beijing markets*]. Wei Sheng Yan Jiu, 2006. **35**(6): p. 722-5.
  93. Carro, A.M. and M.C. Mejuto, *Application Of Chromatographic and Electrophoretic Methodology to the Speciation of Organomercury Compounds in food Analysis*. J Chromatogr A, 2000. **882**: p. 283-307.
  94. Chaleil, D., et al., *Enhanced bismuth digestive absorption in rats by some sulfhydryl compounds: nmr study of complexes formed*. J Inorg Biochem, 1981. **15**(3): p. 213-21.
  95. [www.cfsan.fda.gov/~frf/seamehg2.html](http://www.cfsan.fda.gov/~frf/seamehg2.html), consulted 20.02.09.
  96. Burns, D.T.e.a., *Use of terms "recovery" and "apparent recovery" in analytical procedures*. Pure and Applied Chemistry, 2002 IUPAC. **74**: p. 2201-2205.
  97. Regine, M.B., et al., *Mercury distribution in fish organs and food regimes: Significant relationships from twelve species collected in French Guiana (Amazonian basin)*. Sci Total Environ, 2006. **368**(1): p. 262-70.
  98. Marsalek, P., et al., Acta Vet. BRNO 2005. **74**: p. 427.
  99. Baeta, A.P., et al., WIT Trans. Biomed. Health, 2006. **10**: p. 183.
  100. L.F. Chang, S.J. Jiang, and A. C. Sahayam, J. Chromatographic. A, 2007. **1176**: p. 143.
  101. Wang, M., et al., Talanta, 2007. **71**: p. 2034.
  102. Hinojosa-Reyes, L., et al., Anal. Chim. Acta, 2009. **631**: p. 121.
  103. Chen, J., et al., Talanta, 2009. **77**: p. 1381.
  104. Santoyo, M.M., et al., *Analytical speciation of mercury in fish tissues by reversed phase liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with Bi(3+) as internal standard*. Talanta, 2009. **79**(3): p. 706-11.
  105. Shahmansouri, M.R., et al., *Heavy Metals Bioaccumulation by Iranian and Australian Earthworms (Eisenia fetida) in the Sewage Sludge Vermicomposting*. Iranian J. Env. Health Sci. Eng., 2005. **2**(1): p. 28-32.
  106. Georgescu B.C., W., *The role of earthworms as biological indicators of soil contamination*. Bulletin USAMV-CN, 2007. **63**.
  107. Maboeta, M.S., L. Van Rensburg, and P.J. Jansen Van Rensburg, *Earthworm (Eisenia fetida) Bioassay to Assess the Possible Effects of Platinum Tailings*
-

- Disposal Facilities on the Environment Along a Gradient*. Applied Ecology and Environmental research, 2007. **6**(2): p. 13-19.
108. Andre, A., et al., *Bioavailability and cellular effects of metals on lumbricus terrestris inhabiting volcanic soils*. Environmental Pollution, 2006. **142**: p. 103-108.
109. Suthar, S. and S. Singh, *Bioconcentrations of metals (Fe, Cu, Zn, Pb) in earthworms (Eisenia fetida), inoculated in municipal sewage sludge: do earthworms pose a possible risk of terrestrial food chain contamination?* Environ Toxicol, 2009. **24**(1): p. 25-32.
110. Rossbach, M. and M. Stoeppler, *Multielement fingerprinting for characterization: earthworm samples from the environmental specimen bank of the FRG*. Fresenius Z Anal Chem, 1988. **332**: p. 636-639.
111. Ramos, L., et al., *Heavy metal pollution in water, sediments, and earthworms from the Ebro River, Spain*. Bull Environ Contam Toxicol, 1999. **63**(3): p. 305-11.
112. Kyung-Hee, S., K. Ju-Yong, and K. Kyoung-Woong, *Earthworm Toxicity Test for the Monitoring Arsenic and Heavy Metal-Containing Mine Tailings*. Environ Eng Sci, 2007. **24**: p. 1257-1265.
113. Conder, J.M., R.P. Lanno, and N.T. Basta, *Assessment of metal availability in smelter soil using earthworms and chemical extractions*. J Environ Qual, 2001. **30**(4): p. 1231-7.
114. Vandevijvere, S., et al., *Fluoride intake through consumption of tap water and bottled water in Belgium*. Int J Environ Res Public Health, 2009. **6**(5): p. 1676-90.
115. Yoshida, S., Y. Muramatsu, and W.J.G.M. Peijnenburg, *Multi-element analyses of earthworms for radioecology and ecotoxicology*. radioprotection, Suppl. 1, 2005. **40**: p. S491-S495.
116. Vijver, M.G., et al., *Biological significance of metals partitioned to subcellular fractions within earthworms (Aporrectodea caliginosa)*. Environ Toxicol Chem, 2006. **25**(3): p. 807-14.
117. Koster, M., et al., *Comparison of the method of diffusive gels in thin films with conventional extraction techniques for evaluating zinc accumulation in plants and isopods*. Environ Pollut, 2005. **133**(1): p. 103-16.
118. Darling, C.T. and V.G. Thomas, *Lead bioaccumulation in earthworms, Lumbricus terrestris, from exposure to lead compounds of differing solubility*. Sci Total Environ, 2005. **346**(1-3): p. 70-80.
119. Watts, M.J., et al., *Quantitative arsenic speciation in two species of earthworms from a former mine site*. J Environ Monit, 2008. **10**(6): p. 753-9.
120. Bohlen, P.J., *Earthworms*. Encyclopedia of Soil Science, 2002: p. 370-373.
121. [www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com).
122. Sturzenbaum, S.R., et al., *Metal ion trafficking in earthworms. Identification of a cadmium-specific metallothionein*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 34013-8.
123. Landero Figueroa JA, et al., *Effect of some heavy metals and soil humic substances on the phytochelatin production in wild plants from silver mine areas of Guanajuato, Mexico*. Chemosphere, 2008. **70**: p. 2084-2091.
124. Vijver, M.G., et al., *Metal accumulation in earthworms inhabiting floodplain soils*. Environ Pollut, 2007. **148**(1): p. 132-40.
-

125. Langdon, C.J., et al., *Arsenic speciation in the earthworms Lumbricus rubellus and Dendrodrilus rubidus*. Environ Toxicol Chem, 2003. **22**(6): p. 1302-8.
  126. Button, M., et al., *Arsenic biotransformation in earthworms from contaminated soils*. J Environ Monit, 2009. **11**(8): p. 1484-91.
  127. Schultz, E. and A. Joutti, *Arsenic Ecotoxicity in Soils*, in *Espoo 2007*. 2007, Finnish Environment Institute. p. 1-56.
  128. Geiszinger, A., et al., *Determination of Arsenic Compounds in Earthworms*. Environmental Science and Technology, 1998. **32**(15): p. 2238-2243.
  129. Rudawska M and L. T., *Trace elements in fruiting bodies of ectomycorrhizal fungi growing in Scots pine (Pinus sylvestris L.) stands in Poland*. Sci Total Environ, 2005. **339**: p. 103-115.
  130. Langdon, C.J., et al., *Interactions between earthworms and arsenic in the soil environment: a review*. Environ Pollut, 2003. **124**(3): p. 361-73.
  131. Burton DT, et al., *Bioaccumulation of total mercury and monomethylmercury in the earthworm Eisenia fetida*. Water air soil pollut, 2006. **170**: p. 37-54.
  132. Ernst G, Zimmermann S, and Christie P, *Mercury, cadmium and lead concentrations in different ecophysiological groups of earthworms in forest soils*. Environ Pollut, 2008. **156**: p. 1304-1313.
  133. Veltman K, et al., *Metal accumulation in the earthworm Lumbricus rubellus. Model predictions compared to field data*. Environ Pollut 2007. **142**: p. 428-436.
  134. van Vliet, P.C., S.E. van der Zee, and W.C. Ma, *Heavy metal concentrations in soil and earthworms in a floodplain grassland*. Environ Pollut, 2005. **138**(3): p. 505-16.
  135. Nahmani, J., M.E. Hodson, and S. Black, *A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms*. Environ Pollut, 2007. **145**(2): p. 402-24.
  136. Tischer S. and *Earthworms (Lumbricidae) as bioindicators: the relationship between in-soil and in-tissue heavy metal content*. Polish J Ecol, 2009. **57**: p. 513-523.
  137. Nei L, et al., *Novel approaches to bioindication of heavy metals in soils contaminated by oil shale wastes*. Oil Shale, 2009. **26**: p. 424-431.
  138. Hinton JJ, Veiga MM, and B.K. N., *Using earthworms to assess Hg distribution and bioavailability in gold mining soils*. Soil Sedim Contam, 2009. **18**: p. 512-524.
  139. Rahtkens K and v.d.T. KT., *Heavy metals in earthworms of Baden-Württemberg's results from a long-term investigation with ecotoxicological evaluation Texte - Umweltbundesamt 2007*. **34-07**: p. 121-141.
  140. Thayer JS, *Review: Biological Methylation of Less Studied Elements*. J Inorg Biochem 2002. **16**: p. 677-691.
  141. Driehaus, W., *Arsenic removal solutions for a world wide health problem using iron based adsorbent*
  142. Leemakers, M., et al., *Toxic arsenic compounds in environmental samples: Speciation and validation*. Trends in Analytical Chemistry, 2006. **25**(1): p. 1-10.
  143. Heitkemper DT, et al., *Determination of total and speciated arsenic in rice by ion chromatography and induced plasma mass spectrometry*. J Anal At Spectrom, 2001. **16**: p. 299-306.
  144. Day JA, et al., *A study of method robustness for arsenic speciation in drinking water samples by anion exchange HPLC-ICP-MS*. Anal Bioanal Chem, 2002. **373**: p. 664-648.
-

145. Furst, A., *My saga with earthworms*. Food Cham Toxicol, 2002. **40**: p. 789-791.
  146. Plytycz B, et al., *Earthworms for monitoring metal contamination: from cells to molecules*. Environmental Pollution: New Research 2007: p. 47-98.
  147. Ma WK, et al., *Development of a simulated earthworm gut for determining bioaccessible arsenic, copper, and zinc from soil*. Environ Toxicol Chem, 2009. **28**: p. 1439-1446.
  148. Suthar S., *Metal remediation from partially composted distillery sludge using composting earthworm Eisenia fetida*. J Environ Monit, 2008. **10**: p. 1099-1106.
  149. Button M, et al., *DNA damage in earthworms from highly contaminated soils: Assessing resistance to arsenic toxicity by use of the Comet assay*. Mutat Res. **696**: p. 95-100.
  150. Maity S, Bhattacharya S, and C. S., *Metallothionein response in earthworms Lampito mauritii (Kinberg) exposed to fly ash*. Chemosphere, 2009. **77**: p. 319-324.
  151. Scott-Fordsmand JJ and W. JM., *Biomarkers in earthworms*. Rev Environ Contam Toxicol 2000. **165**: p. 117-159.
  152. Bierkens J, et al., *Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality*. Chemosphere 1998. **37**: p. 2935-2947.
  153. Zheng R and L. C., *Effect of lead on survival, locomotion and sperm morphology of Asian earthworm, Pheretima guillelmi*. J Environ Sci (China), 2009. **21**: p. 691-695.
  154. Vandecasteele B, et al., *Earthworm biomass as additional information for risk assessment of heavy metal biomagnification: a case study for dredged sediment-derived soils and polluted floodplain soils*. Environ Pollut, 2004. **129**: p. 363-375.
  155. Espinosa-Reyes G, et al., *DNA damage in earthworms (Eisenia spp.) as an indicator of environmental stress in the industrial zone of Coatzacoalcos, Veracruz, Mexico*. J Environ Sci Health, Part A, 2010. **45**: p. 49-55.
  156. Fourie F, Reinecke SA, and R. AJ., *The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay*. Ecotoxicol Environ Saf, 2007. **67**: p. 361-368.
  157. Reinecke, S.A. and A.J. Reinecke, *The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms*. Arch Environ Contam Toxicol, 2004. **46**(2): p. 208-15.
  158. Li M, et al., *Comparative effects of Cd and Pb on biochemical response and DNA damage in the earthworm Eisenia fetida (Annelida, Oligochaeta)*. Chemosphere, 2009. **74**: p. 621-625.
  159. Steinberg CEW, Stürzenbaum SR, and M. R., *Genes and environment — Striking the fine balance between sophisticated biomonitoring and true functional environmental genomics*. Sci Tot Environ, 2008. **400**: p. 142-161.
  160. Hirano T and T. K., *Heavy Metal -Induced Oxidative DNA Damage in Earthworms : A Review*. Appl Environ Soil Sci, 2010.
  161. Nakashima T, et al., *8-Hydroxydeoxyguanosine generated in the earthworm Eisenia fetida grown in metal -containing soil*. Mut Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2008. **654**: p. 138-144.
  162. Mellor J, Dudek P, and C. D., *A glimpse into the epigenetic landscape of gene regulation*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **118**: p. 116-122.
  163. Delcuve, G.P., M. Rastegar, and J.R. Davie, *Epigenetic control*. J Cell Physiol, 2009. **219**(2): p. 243-250.
-

164. Salnikow, K. and A. Zhitkovich, *Genetic and Epigenetic mechanisms in Metal Carcinogenesis and Cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic and Chromium*. Chem Res Toxicol, 2008. **21**(1): p. 28-44.
165. Wrobel, K., K. Wrobel, and J.A. Caruso, *Epigenetics: an important challenge for ICP-MS in metallomics studies*. Anal Bioanal Chem, 2009. **393**: p. 481-486.
166. Berg, J.M., J.L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry*. Fifth edition ed. 2002, United States of America: W. H. Freeman and Company.
167. Watson, et al., *Molecular Biology of the Gene*. fifth edition ed, ed. Pearson. 2004: Pearson.
168. Murray, R.K., et al., *Harper's Illustrated Biochemistry*. Ed. 26 ed. 2003: McGraw-Hill.
169. Lewin, B., *Genes IX*. 2008: Jones and Bartlett.
170. Charles R., C. and S. Cassandra L., *Genomics: The Science and Technology Behind the Human Genome Project. Capitulo 1. DNA Chemistry and Biology*, ed. J.W.a. Sons. 1999. 1-28.
171. Salah M., A. and m. Iciar, *Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques*. Nucleic Acids Research, 1997. **25**(22): p. 4692-4693.
172. Gronbaek, K., C. Hother, and P.A. Jones, *Epigenetic changes in cancer*. Apms, 2007. **115**(10): p. 1039-59.
173. Mohn, F. and D. Schubeler, *Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation*. Trends Genet, 2009. **25**(3): p. 129-136.
174. Rodenhiser, D. and M. Mann, *Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications*. CMAJ, 2006. **174**(3): p. 341-348.
175. Tchurikov, N.A., *Molecular mechanisms of epigenetics*. Biochemistry (Mosc), 2005. **70**(4): p. 406-423.
176. Kazimierz, W., et al., *Phosphorus and osmium as elemental tags for the determination of global DNA methylation- A novel application of high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry in epigenetic studies*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**: p. 609-614.
177. Wrobel, K., K. Wrobel, and J.A. Caruso, *Epigenetics: an important challenge for ICP-MS in metallomics studies*. Anal Bioanal Chem, 2008. **393**: p. 481-486.
178. Rozhon, W., et al., *Rapid quantification of global DNA methylation by isocratic cation exchange high-performance liquid chromatography*. Anal Biochem, 2008. **375**(2): p. 354-60.
179. Baubec, T., et al., *Effective, homogeneous and transient interference with cytosine methylation in plant genomic DNA by zebularine*. Plant J, 2009. **57**(3): p. 542-54.
180. 

[http://www.imbiomed.com/1/1/articulos.php?method=showDetail&id\\_revista=48&id\\_seccion=220&id\\_ejemplar=3610&id\\_articulo=35050](http://www.imbiomed.com/1/1/articulos.php?method=showDetail&id_revista=48&id_seccion=220&id_ejemplar=3610&id_articulo=35050), Consulted 3 noviembre de 2010.
181. Marsit, C.J., et al., *Carcinogen exposure and gene promoter hypermethylation in bladder cancer*. Carcinogenesis, 2006. **27**(1): p. 112-6.
182. Ballestar, E., et al., *Methyl-CpG binding proteins identify novel sites of epigenetic inactivation in human cancer*. Embo J, 2003. **22**(23): p. 6335-45.

183. Johnston, J.W., et al., *HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors*. *Plant Physiol Biochem*, 2005. **43**(9): p. 844-53.
  184. Zhang, A.H., et al., *Analysis of p16 gene mutation, deletion and methylation in patients with arseniasis produced by indoor unventilated-stove coal usage in Guizhou, China*. *J Toxicol Environ Health A*, 2007. **70**(11): p. 970-5.
  185. Fieldes, M.A., et al., *DNA hypomethylation in 5-azacytidine-induced early-flowering lines of flax*. *Theor. Appl. Genet.*, 2005. **111**: p. 136-149.
  186. Armando, A.M., et al., *High-performance liquid chromatography determination of 5-methyl-2-deoxycytidine, 2-deoxycytidine, and other deoxynucleosides and nucleosides in DNA digest*. *Analytical Biochemistry*, 2008. **374**: p. 378-385.
  187. Lund, G., et al., *DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(28): p. 29147-54.
  188. del Gaudio, R., R. Di Giaimo, and G. Geraci, *genome methylation of the marine annelid worm *Chaetopterus variopedatus*: Methylation of CpG in an expressed H1 histone gene*. *FEBS Lett.*, 1997. **417**: p. 48-52.
  189. Fuke, C., et al., *Age-related changes in 5-methylcytosine content in human peripheral leukocytes and placentes: An HPLC-based study*. *Ann. Hum. Genet.*, 2004. **68**: p. 196-204.
  190. Oakeley, E.J., *DNA methylation analysis: a review of current methodologies*. *Pharmacol Ther*, 1999. **84**(3): p. 389-400.
  191. Fraga, M.F., et al., *High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues*. *Electrophoresis*, 2002. **23**(11): p. 1677-81.
  192. Friso, S., et al., *A method to assess genomic DNA methylation using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry*. *Anal. Chem.*, 2002. **74**: p. 4526-4531.
  193. Fiala, E.S., et al., *Inhibition of DNA cytosine methyltransferase by chemopreventive selenium compounds, determined by an improved assay from DNA cytosine methyltransferase and DNA cytosine methylation*. *Carcinogenesis*, 1998. **19**: p. 597-604.
  194. Chakrabarty, D., K.W. Yu, and K.Y. Paek, *Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*)*. *Plant. Sci.*, 2003. **165**: p. 61-68.
  195. Song, L., et al., *Specific method for the determination of genomic DNA methylation by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*. *Anal. Chem.*, 2005. **77**: p. 504-510.
  196. Aljanabi, S.M. and I. Martinez, *Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques*. *Nucl Acids Res*, 1997. **25**(22): p. 4692-4693.
  197. Baccarelli A and B. V., *Epigenetics and environmental chemicals*. *Curr Opin Pediatr*, 2009. **21**: p. 243-251.
  198. Dopp E, et al., *Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004. **20**: p. 156-165.
-

199. Jensen TJ, et al., *Arsenicals produce stable progressive changes in DNA methylation patterns that are linked to malignant transformation of immortalized urothelial cells*. Toxicol Appl Pharmacol 2009. **241**: p. 221-229.
200. Pilsner JR, et al., *Mercury-associated DNA hypomethylation in polar bear brains via the LUMinometric Methylation Assay: a sensitive method to study epigenetics in wildlife*. Mol Ecol. **19**: p. 307-314.
201. Davis CD and U. EO., *DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrient interactions*. Exp Biol Med (Maywood), 2004. **229**: p. 988-995.
202. Pradeep, T. and Anshup, *Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review*. Thin Solid Films, 2009. **517**: p. 6441-6478.
203. Hudak, P.F., *Elevated fluoride and selenium in west Texas groundwater*. Bull Environ Contam Toxicol, 2009. **82**(1): p. 39-42.
204. de Victorica- Almeida, Galván-García, and Mendoza-Rosas., *Estudio de tres procesos para la reducción del contenido de fluoruros en aguas de abastecimiento público y su efecto sobre la remoción de arsénico*. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental Cancún, Mexico, 2002.
205. *Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994*. 1994.
206. Economía, S.d., *NMX-AA-077-SCFI-2001 Water Analysis-Determination of Fluoride in Natural, Wastewater and Wastewater Treated-Test Method*. 2001.
207. Hurtado-Jimenez, R., *Environmental evaluation of the drinking water problems due to fluoride and other related pollutants at "los Altos de Jalisco", Mexico*. 2005.
208. Hurtado-Jimenez, R. and J.L. Gardea-Torresdey, *Arsenic in drinking water in the Los Altos de Jalisco region of Mexico*. Rev Panam Salud Publica, 2006. **20**(4): p. 236-47.