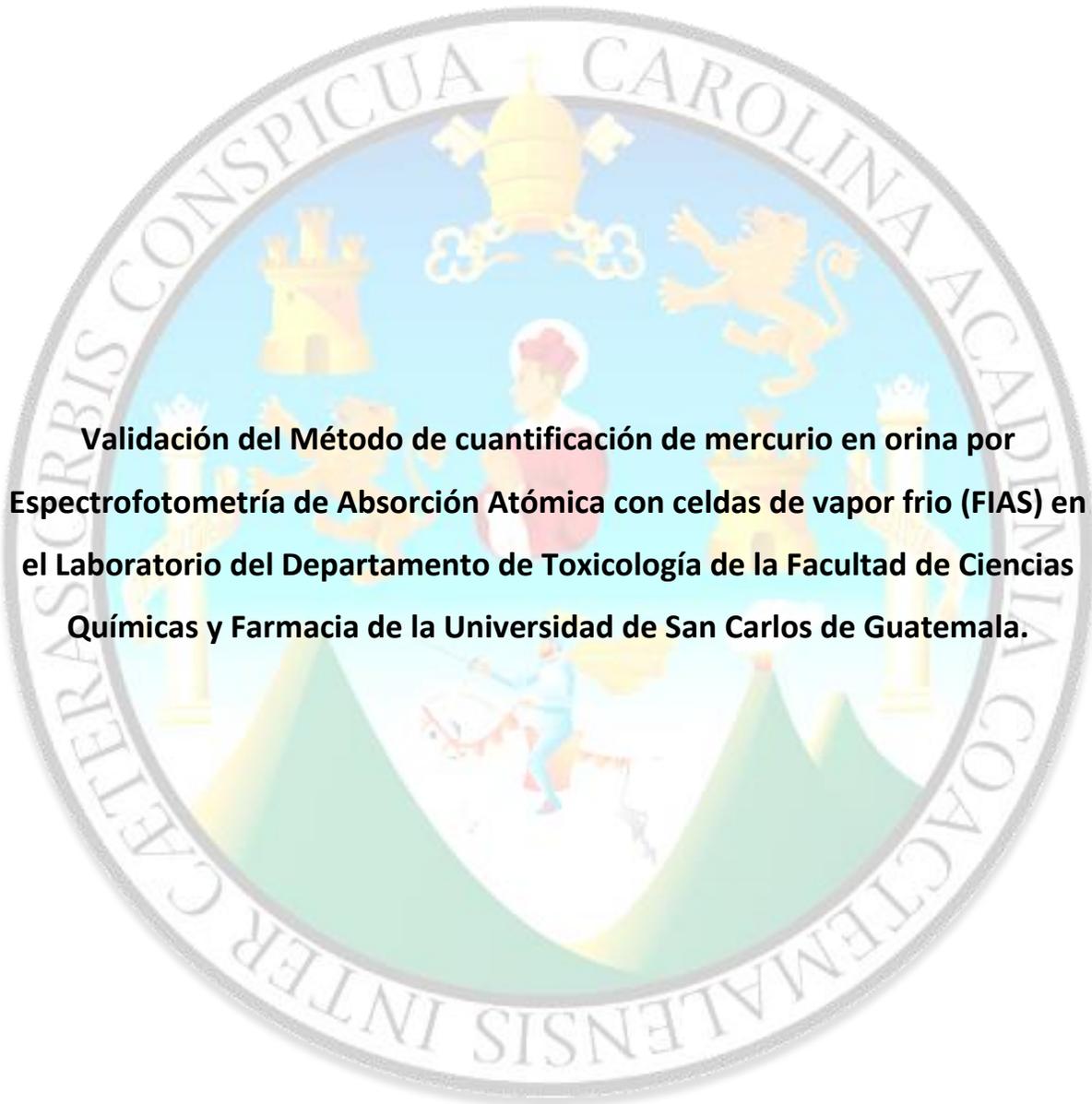


**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central shield with a figure on horseback, a castle, and a lion. The shield is set against a background of a blue sky and green hills. The Latin motto "CETERAS URBES CONSPICUA CAROLINA ACCADIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

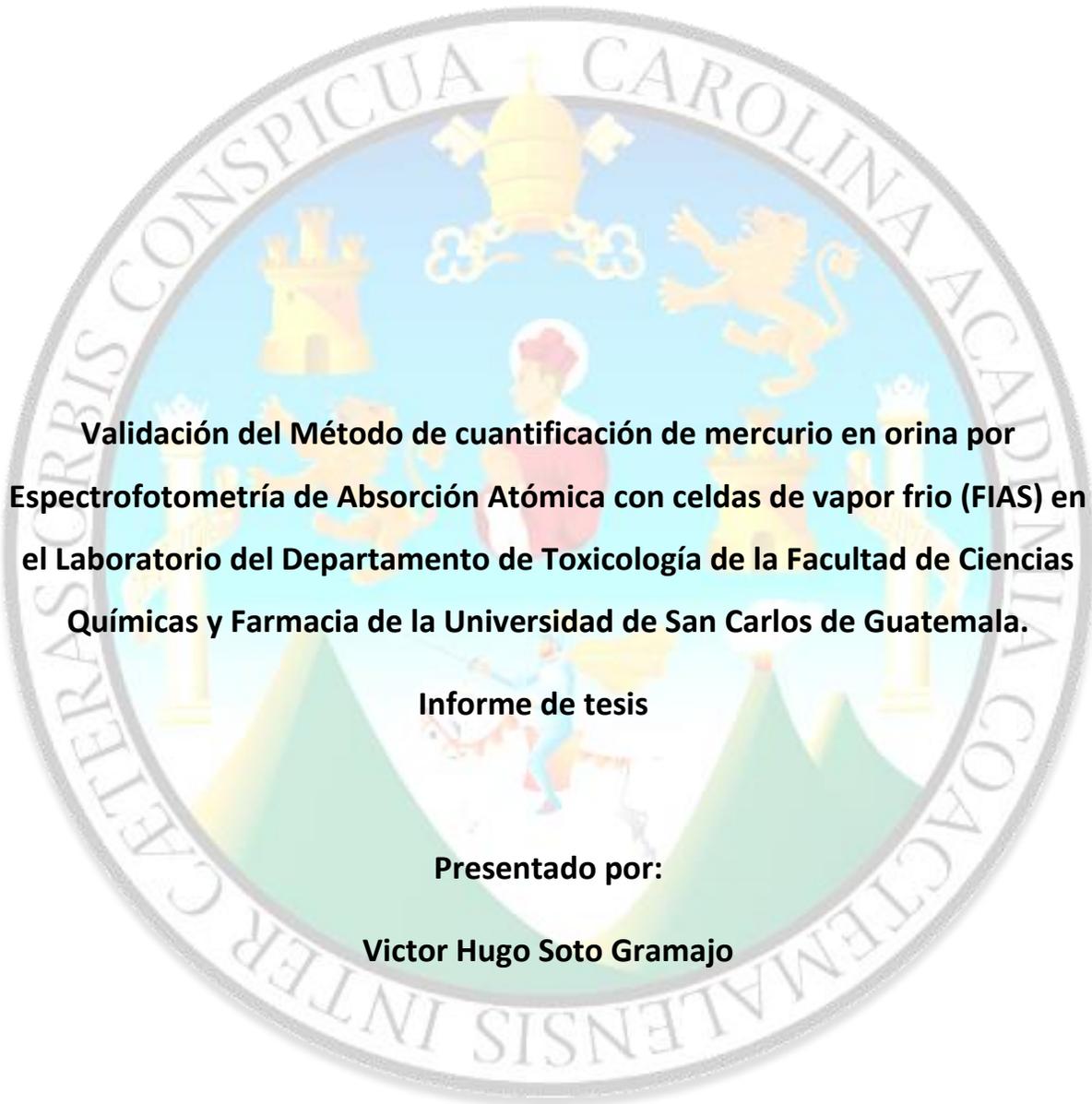
**Validación del Método de cuantificación de mercurio en orina por Espectrofotometría de Absorción Atómica con celdas de vapor frío (FIAS) en el Laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.**

**Victor Hugo Soto Gramajo**

**Químico Farmacéutico**

**Guatemala, Agosto de 2017**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a man in a red robe and a white hat, holding a staff. Above him is a golden crown. To the left is a golden castle, and to the right is a golden lion. The background is a light blue sky with a green mountain range at the bottom. The seal is surrounded by a grey border with Latin text: "CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER CETERAS CRIBIS CONSPICUA".

**Validación del Método de cuantificación de mercurio en orina por Espectrofotometría de Absorción Atómica con celdas de vapor frío (FIAS) en el Laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.**

**Informe de tesis**

**Presentado por:**

**Victor Hugo Soto Gramajo**

**Para optar al título de**

**Químico Farmacéutico**

**Guatemala, Agosto de 2017**

## **JUNTA DIRECTIVA**

Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda	Decano
M.A. Elsa Julieta Salazar Meléndez de Ariza	Secretaria
MSc. Miriam Carolina Guzmán Quilo	Vocal I
Dr. Juan Francisco Pérez Sabino	Vocal II
Lic. Carlos Manuel Maldonado Aguilera	Vocal III
Br. Andreina Delia Irene López Hernández	Vocal IV
Br. Carol Andrea Betancourt Herrera	Vocal V

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de San Carlos de Guatemala y a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

A la MSc. Carolina Guzmán Quilo por su asesoría, paciencia y apoyo en la realización de esta tesis.

A la MA. Aylin Santizo Juárez, por la revisión, apoyo y observaciones pertinentes para la elaboración eficaz del presente trabajo de investigación.

Al Departamento de Toxicología "Julio Valladares Márquez" al Centro de Información y Asesoría Toxicológica -CIAT- y al Laboratorio de Toxicología por permitirme realizar la *Tesis Ad Gradum*. En especial a personas tan capaces e inteligentes como lo son Fabiola Prado de Micheo y Gabriela Chaulón que gracias a su ayuda y consejos analíticos no se hubiera podido lograr dicha validación.

Al Hospital Nacional de Huehuetenango "Dr. Jorge Vides Molina" en especial a la Farmacia hospitalaria por permitirme realizar mi Ejercicio Profesional Supervisado y aprender del magnífico mundo de las ciencias farmacéuticas. A todas las personas que conocí en la institución y me hicieron una mejor persona y profesional en el equipo de salud.

Al departamento de Físicoquímica de la Escuela de Química en la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, infinitas gracias por todo el apoyo, conocimientos y consejos brindados a mi persona, además de la oportunidad laboral que me ofreció. El departamento que me bautizo como alma de químico y farmacéutico de profesión.

A los laboratorios farmacéuticos que abrieron sus puertas para que yo trabajara y empezara a aportar a la sociedad como profesional, a todos los compañeros de trabajo que me enseñaron todo el mundo del análisis químico y me formaron en el arte.

A todas las personas que de una u otra manera aparecieron en mi camino y aportaron sabiduría.

## DEDICATORIA

### **Acto que dedico:**

A Dios:

Por darme la vida y no dejarme en ningún momento, por la salud que me dio en todo este tiempo y sobre todo por la sabiduría que me otorgo en todo momento y así poder completar mi hermosa carrera universitaria. Nunca desmaye gracias a ti, te amo padre.

A mis padres:

Mayra Cristina Gramajo y Victor Hugo Soto, es para ustedes y por ustedes este logro, los amo con todo mi ser y con cada célula de mi cuerpo. Les agradezco por el esfuerzo y sacrificio realizado. Mil palabras no alcanzarían para expresar lo que significa el haberme dado la oportunidad de alcanzar esta meta.

A mis hermanas:

Mayralejandra y Mirka gracias por todo, por aguantar mis locuras, enojos, solo sepan que son mis princesas y que las amo.

A mis abuelas, tíos, primos:

Toda esa hermosa familia que Dios me ha dado, que siempre están para mí, en las buenas y en las malas. Los amo mucho mi querida familia, gracias por tanto. Los consejos que siempre me dieron, la sabiduría que aprendo de cada uno de ustedes, los ánimos y el apoyo para mi persona. Les digo que sin ustedes hubiera sido muy difícil este camino, pero llegue a la meta y a ustedes me debo.

A mis compañeros de la universidad y amigos:

A todos con los que pude compartir, gracias por los momentos tan divertidos y por el apoyo, esto es también gracias a cada uno de ustedes. Los laboratorios y las clases no hubieran sido tan divertidas sin su amistad. Esos amigos que siempre estuvieron a mi lado y siempre creyeron en mi talento y mi capacidad. Gracias por enseñarme a vivir. Gracias a mis alumnos en las diferentes universidades jóvenes ustedes me hicieron crecer como profesional.

## INDICE

<b>CONTENIDO</b>	<b>Página</b>
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	4
3. ANTECEDENTES	6
3.1. Investigaciones Previas	6
4. JUSTIFICACIÓN	8
5. OBJETIVOS	9
5.1. Objetivo General	9
5.2. Objetivos Específicos	9
6. HIPÓTESIS	10
7. MATERIALES Y MÉTODOS	11
7.1. Materiales	11
7.1.1. Universo	11
7.1.2. Muestra	11
7.1.3. Recursos	11
7.1.3.1. Recursos Humanos	11
7.1.3.2. Recursos Institucionales	11
7.1.4. Equipo e Instrumentos	12
7.1.5. Material y Cristalería	12
7.1.6. Reactivos y Materias Primas	12
7.1.7. Papelería y Equipo	13
7.2. Métodos	13
7.3. Diseño de la investigación	16
8. RESULTADOS	19
9. DISCUSIÓN	28
10. CONCLUSIONES	36
11. RECOMENDACIONES	38

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
13. ANEXOS (INDICE)	43

## 1. RESUMEN

En el convenio de Minamata sobre el mercurio se reconoce que este es un producto químico de preocupación mundial debido a su transporte a larga distancia en la atmósfera, su persistencia en el medio ambiente tras su introducción antropógena, su capacidad de bioacumulación en los ecosistemas y sus importantes efectos adversos para la salud humana y el medio ambiente (Minamata. 2014). Tomando en cuenta la problemática global de dicho elemento el laboratorio de Toxicología de la Universidad de San Carlos de Guatemala monitorea valores de mercurio en muestras de orina a personas que lo soliciten.

La validación de un método es, básicamente, el proceso de definir los requerimientos analíticos y confirmar que este tiene capacidades consistentes con el fin requerido. Es decir, la validación es la confirmación mediante examen y provisión de evidencias objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para un uso determinado. Inherente al concepto de validación se encuentra, por tanto, la necesidad de evaluar las características de funcionamiento del método, que comprenden la selectividad, los límites de detección y cuantificación del método, el intervalo de trabajo, la sensibilidad analítica, la veracidad, la precisión, la robustez y la incertidumbre de medida (INSHT. 1996). De modo que el laboratorio del Departamento de Toxicología de la Escuela de Química Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala propuso la validación del método de cuantificación de mercurio en orina por espectrofotometría de absorción atómica con celda de vapor frío (FIAS); evaluando los parámetros de desempeño analítico: linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y el rango de trabajo.

La linealidad del método y la linealidad del sistema en el intervalo de concentraciones de mercurio evaluadas, obtuvieron un valor del coeficiente de correlación en la curva con estándares acuosos ( $r$ ) de 0.99984 y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9968 mientras que los resultados de las muestras fortificadas con mercurio presentaron un

coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.9999, un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.99994 de manera que el análisis de varianza indica que existe una relación directamente proporcional entre la respuesta del equipo y la concentración de mercurio, con un nivel de confianza del 95%.

En la determinación de la exactitud del método, el porcentaje de recuperación promedio para las diferentes concentraciones evaluadas fue de 103.56%, estableciendo un rango en valores que van desde 74.3% a 119.3%, observando el rango de valores que se obtuvo al evaluar dicho parámetro se obtiene la cercanía entre el valor que es aceptado, establecido por un estándar de referencia y el valor experimental.

Durante la evaluación de la precisión y la repetibilidad del método analítico se demuestra que el método al ser efectuado por cualquier analista, cualquier día y con cualquier muestra, es un método preciso ya que posee un elevado grado de concordancia entre los resultados generados. Los resultados al evaluar el perfil de precisión demostraron que los coeficientes de variación son válidos debido a que son menores al 2%, lo que demuestra la buena repetibilidad del método analítico.

Se determinó que los resultados obtenidos por la metodología analítica muestran alta concordancia individual para concentraciones mayores al límite de detección el cual fue de 0.4144  $\mu\text{g/L}$ , es decir que esta es la concentración mínima que el equipo puede detectar pero no cuantificar a través de esta metodología analítica. A partir del análisis cuantitativo se determinó el límite de cuantificación obteniendo un valor de 1.3814  $\mu\text{g/L}$  de mercurio en orina, de este modo se sabe que a concentraciones que se encuentren menores al límite establecido de cuantificación no se puede asegurar resultados exactos y precisos. El rango de concentración en el cual las cuantificaciones analíticas se trabajaron fue de 0.743  $\mu\text{g/L}$  como límite inferior y 13.45  $\mu\text{g/L}$  como límite superior de mercurio en orina; tomando en cuenta este amplio rango se generan resultados precisos, exactos y con linealidad.

La presente investigación validó el método de determinación de mercurio en orina utilizando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con celdas de vapor frío (FIAS), y asegura que los resultados que esta metodología genera, son resultados exactos, precisos y sobretodo confiables, en el momento de determinar mercurio en intoxicaciones o posibles intoxicaciones.

## 2. INTRODUCCIÓN

El uso del mercurio a lo largo de la historia de la humanidad le otorga a este elemento elevada importancia comercial, se presentan múltiples y variadas aplicaciones como lo son: la metalurgia de oro y plata, el uso en la fabricación de amalgamas dentales principalmente, productos farmacéuticos, plaguicidas, fungicidas, baterías, además de su uso más común en la fabricación de barómetros, termómetros, manómetros, esfigmomanómetros, entre otros. Debido al amplio uso del mercurio en un gran número de industrias, encontramos un incremento en el número de intoxicaciones por este elemento tan peculiar.

El mercurio es un metal pesado y su presencia en el cuerpo humano resulta tóxica a partir de ciertos niveles críticos que dependen fundamentalmente, de un conocimiento de las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta. Asimismo, depende del conocimiento de las variaciones en la exposición, absorción, metabolización y excreción en cualquier situación dada. Con respecto al modelo toxicocinético de eliminación, la eliminación del tóxico se realiza desde los compartimientos central, periférico y el cuarto compartimiento. El compartimiento central está formado por todos los órganos, menos riñón e hígado. El compartimiento periférico está constituido por el riñón, que acumula Hg por mayor tiempo y lo aclara muy lentamente. En este compartimiento periférico se incluye los procesos de filtración glomerular, secreción biliar y secreción por la mucosa intestinal. El cuarto compartimiento es el depósito per se y es el punto final antes de su excreción; lo integran orina, heces, pelo y uñas (Ramirez, 2008).

El riesgo mayor para la salud humana derivado de la presencia del mercurio en la naturaleza se centra en la exposición ocupacional a este metal, y es allí donde el diagnóstico para la intoxicación con este metal es vital para abordar su tratamiento y los cuidados que se deben tener en el transcurso de la intoxicación. El diagnóstico diferencial del hidrargirismo radica en la cuantificación del mercurio en muestras de orina no mayor de 24 horas, de manera que los profesionales de la salud involucrados en los casos de intoxicación deben actuar rápidamente para contrarrestar la toxicidad de este metal.

Para administrar un tratamiento adecuado dentro de las intoxicaciones con mercurio ya sea aguda o crónica, hay que partir de la premisa, que un tóxico como el mercurio, produce lesiones irreversibles a nivel del sistema nervioso. Cualquier tratamiento que se administre en un periodo florido de la intoxicación, tendrá pocas posibilidades de éxito. Por tanto la actuación correcta por parte de los profesionales y autoridades de la salud debe tener un marcado carácter preventivo.

La cuantificación de mercurio en sangre y en muestras de orina son una de las principales herramientas de diagnóstico para las intoxicaciones que presenta la exposición o ingesta de mercurio. Por tal motivo los métodos por los cuales el mercurio se cuantifica deben arrojar resultados confiables para las personas encargadas del diagnóstico y tratamiento de dicha intoxicación y se pueda emitir un diagnóstico certero. Dichos resultados por parte del método de análisis cuantitativo de mercurio, solo se pueden lograr si el método de cuantificación se encuentra validado. La validación de un método analítico no es más que un procedimiento para establecer pruebas documentadas que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño y que además son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas, tomando en cuenta que la validación genera confianza en el momento de obtener resultados generados por algún instrumento analítico basado en un método de análisis.

El laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala brinda el servicio de diagnóstico del hidrargirismo por medio del análisis de muestras de orina, utilizando el método de espectrofotometría de absorción atómica con celda de vapor frío (FIAS); se considera que el método analítico mencionado anteriormente debe estar validado ya que es muy importante, tomando en cuenta que evaluando los parámetros de desempeño analítico: linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y el rango, dentro de la validación del método se lograrán emitir resultados exactos y precisos, que sean reproducibles para generar un alto grado de confianza en la cuantificación de mercurio.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Investigaciones previas

La cuantificación de mercurio ya se ha realizado en varias ocasiones dentro de las instalaciones del Laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, así como como en el país, de manera que se ha utilizado la espectrofotometría de absorción atómica con celda de vapor frío (FIAS), siendo un método válido para la cuantificación de dicho elemento. En el ámbito internacional también ha generado un gran número de métodos y variaciones de los métodos relacionados en la determinación de mercurio, y la forma de llevar a cabo los ensayos.

Bolaños, Y., et. Al. En 2016 validaron el método de determinación de mercurio en muestras de sedimentos y tejidos biológicos, en el cual utilizaron un Analizador Directo de Mercurio (DMA-80), obteniendo resultados estadísticamente coherentes en su validación. (Bolaños, 2016).

Castillo, J.C., et. al. En el 2012 determinaron y cuantificaron el mercurio en termoformados y películas flexibles biodegradables elaboradas a partir de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) por espectrometría de absorción atómica, realizando la estandarización del método, para obtener resultados precisos y confiables. (Castillo, 2012).

En Ecuador en el año 2011, Alarcón, C.F, validó el método analítico para la determinación de mercurio en muestras de agua natural, residual y de consumo por medio de espectroscopia de absorción atómica con técnica de vapor frío (FIAS), haciendo énfasis en que la validación del método antes mencionado posee alto valor en la cuantificación de mercurio (Alarcón, 2011).

En la tesis de Maestro en Biociencias presentada por Hurtado, R.G., en el 2010, se determinó los niveles de mercurio en el hígado y el músculo de tiburones provenientes de las pesquerías de Sonora y Sinaloa, México. Utilizando el Método FIAS para la cuantificación de metal (Hurtado, 2010).

Rouanet, A.V., en el 2007 determinó y cuantificó el mercurio en tejido muscular de *Cichlasoma managuense* del lago de Amatitlán, por espectrofotometría de absorción atómica con vapor frío (Rouanet, 2007).

Escribá, C.M., Soto, M., Garcia, J.A, en el año 2007 realizaron la cuantificación de mercurio (Hg), por la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con celda de vapor frío (FIAS), en muestras de carne de tiburón provenientes de las costas del Atlántico y Pacífico de la república de Guatemala (Escribá, 2007).

La experiencia que se presenta en el Laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala con relación a la determinación de mercurio es muy amplia, como en el 2006, cuando Carrillo, R., estudio la exposición ocupacional al mercurio en estudiantes de la Facultad de Odontología de la Universidad de San Carlos de Guatemala, siendo este un estudio basal (Carillo, 2006).

Los niveles de concentración de mercurio se han obtenido utilizando espectrofotometría de absorción atómica con técnica de vapor frío en distintos tipos de matriz. Por ejemplo, se ha realizado la evaluación de los aspectos básicos del sistema de calidad implantado en el laboratorio de riesgos químicos del Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores (INSAT) de la Habana - Cuba en el año 2005 (Novas et al, 2006).

Palma, O.A, en el 2005 determina la concentración mercurial en orina de odontólogos profesionales de la Ciudad de Guatemala y la relación con el cumplimiento de medidas de protección para evitar la contaminación mercurial (Palma, 2005).

En Alemania se realizó un estudio para poder cuantificar los niveles de mercurio en niños, realizado en muestras de orina, cabello, utilizando diferentes técnicas analíticas entre ellas la espectroscopia de absorción atómica acoplada al sistema FIAS, todo esto llevado a cabo por Pesch, A., et. al. en el año 2002 (Pesch, 2002).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Debido a los altos niveles de contaminación química que se encuentran tanto en el medio ambiente como en las industrias en la actualidad, es importante que las técnicas aplicadas en el diagnóstico de intoxicaciones por mercurio sean veraces y que los resultados obtenidos a través de estas técnicas confirmen la sintomatología de la intoxicación. Tomando un enfoque en la vigilancia de los niveles de mercurio dentro del área ocupacional y en la población en general.

Los últimos avances desarrollados en la química analítica aportan un gran número de análisis específicos, los cuales son utilizados por la Toxicología para la detección y cuantificación de un amplio número de elementos químicos en medios biológicos. Los análisis toxicológicos en Guatemala ayudan a generar un diagnóstico diferencial, con lo cual los profesionales de salud pueden abordar las intoxicaciones con un alto grado de confianza y también pueden emitir un tratamiento adecuado en contra de ellas.

La presente investigación validó el método de determinación de mercurio en orina, utilizando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con celdas de vapor frío (FIAS), en donde se asegura que los resultados que esta metodología genera, son exactos, precisos y sobretodo confiables, en el momento de determinar mercurio en intoxicaciones agudas o crónicas.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo General**

Validar el método de cuantificación de mercurio en orina por espectrofotometría de absorción atómica con celdas de vapor frío (FIAS).

### **5.2. Objetivos Específicos**

- 5.2.1.** Corroborar que el método analítico utilizado para la cuantificación de mercurio en orina proporciona datos confiables.
- 5.2.2.** Demostrar la linealidad del método de cuantificación de mercurio.
- 5.2.3.** Demostrar la exactitud del método de cuantificación del mercurio.
- 5.2.4.** Demostrar la precisión del método de cuantificación de mercurio.
- 5.2.5.** Evaluar la repetibilidad del método.
- 5.2.6.** Determinar los límites de detección y los límites de cuantificación para el método evaluado.

## 6. HIPÓTESIS

El método de cuantificación de mercurio en orina por espectroscopia de absorción atómica con celdas de vapor frío (FIAS) utilizado en el laboratorio del Departamento de Toxicología de la Escuela de Química Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, cumple con los parámetros de desempeño analítico: linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y el rango.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1. MATERIALES**

#### **7.1.1. Universo**

Metodologías utilizadas para la determinación y cuantificación de mercurio por espectrofotometría de absorción atómica con celdas de vapor frío (FIAS).

#### **7.1.2. Muestra**

Muestras de orina con diferente concentración de estándar de mercurio preparadas en el Laboratorio del Departamento de Toxicología de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

#### **7.1.3. Recursos**

##### **7.1.3.1. Recursos Humanos**

- 7.1.3.1.1.** Investigador: Br. Victor Hugo Soto Gramajo
- 7.1.3.1.2.** Asesora: MSc. Carolina Guzmán Quilo.
- 7.1.3.1.3.** Revisora: MA. Aylin Santizo Juárez

##### **7.1.3.2. Recursos Institucionales**

- Biblioteca de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia en la Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Laboratorio del Departamento de Toxicología de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

#### **7.1.4. Equipo e instrumentos**

- Espectrofotómetro de absorción atómica marca Perkin Elmer, Modelo A- Analyst 700.
- Automuestreador Perkin Elmer, Modelo S10.
- Sistema de inyección en flujo –FIAS- Perkin Elmer, Modelo 100.
- Lámpara de mercurio.
- Refrigeradora

#### **7.1.5. Material y Cristalería**

- Recipientes PET (Polietileno Tereftalato)
- Balón volumétrico de 10 y 100 mL
- Pipetas de vidrio graduadas de 10 mL
- Pipetas de émbolo
- Puntas para pipetas de émbolo
- Frascos de reacción de polipropileno con forma cónica interna especial
- Guantes de látex.
- Campana de extracción.

#### **7.1.6. Reactivos y Materias Primas**

- Agua destilada
- Ácido Clorhídrico
- Ácido Sulfúrico
- Ácido Nítrico
- Cloruro de Estaño
- Peroxodisulfato
- Permanganato de Potasio
- Octanol
- Estándar de mercurio
- Gases: Acetileno y Aire comprimido

### **7.1.7. Papelería y equipo**

- Computadora
- Memoria USB
- Hojas de papel
- Impresora
- Tinta
- Fotocopias
- Folder con gancho
- Teléfono
- Gasolina

## **7.2. MÉTODOS**

### **7.2.1. Preparación de la muestra:**

Se necesita orina de 24 horas, la que debe almacenarse en un recipiente PET. Al ingresar al laboratorio INMEDIATAMENTE deben tomarse en recipientes del mismo tipo 50 mL de orina a los que se agregan 0.05 g de peroxodisulfato como preservante del metal. Almacenar en refrigeradora (si no se realiza pronto el análisis, congelar).

### **7.2.2. Preparación de disoluciones reactivas**

#### **7.2.2.1. Disolución estándar intermedia de mercurio 100 mg/L (1 ng/ $\mu$ L):**

Medir 1 mL de la disolución stock comercial de mercurio y transferir a un balón volumétrico de 10 mL. Aforar con la mezcla de ácidos

#### **7.2.2.2. Disolución estándar de trabajo de mercurio 1 mg/L (1 $\mu$ g/mL ó 1 ng/ $\mu$ L):**

De la disolución anterior, tomar 0.1 mL y transferir a un balón volumétrico de 10 mL. Llevar a volumen con mezcla de ácidos.

**7.2.2.3. Permanganato de potasio al 5 %:**

Pesar 5 g de permanganato de potasio, transferir a un balón volumétrico de 100 mL y aforar a 100 mL con agua.

**7.2.2.4. Ácido sulfúrico y ácido nítrico al 1.5 % v/v:**

Medir 1.5 mL de ácido nítrico y 1.5 mL de ácido sulfúrico y transferir a un balón volumétrico de 100 mL. Llevar a volumen con agua destilada.

**7.2.2.5. Cloruro de estaño al 5 % p/v en ácido clorhídrico al 10 % v/v:**

Preparar con la cantidad de HCl en total, se pesa la cantidad de Cloruro de Estaño, se agrega el ácido y se calienta hasta que se disuelva y esté transparente, dejar enfriar y llevar a volumen.

**7.2.3. Procedimiento****7.2.3.1. En copas PET selladas e identificadas, agregar:**

	<b>Estándar 1 µg/L</b>	<b>Estándar 2 µg/L</b>	<b>Estándar 3 µg/L</b>	<b>Muestra</b>	<b>Muestra control</b>	<b>Blanco</b>
<b>Orina de 24 horas</b>	--	--	--	5 mL	5 mL	--
<b>Agua destilada</b>	5 mL	5 mL	5 mL	--	4.5 mL	5 mL
<b>Mezcla de ácido sulfúrico y ácido nítrico al 1.5% v/v</b>	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL	5 mL
<b>Disolución estándar de trabajo de Mercurio 1 mg/L (1 µg/mL en mezcla de ácidos)</b>	10 µL	20 µL	40 µL	--	20 µL	--

<b>Agitar. El octanol y el permanganato de potasio, se agregan a cada copa, segundos antes de ensamblarla al dispositivo generador de hidruros-vapor frío.</b>						
<b>Octanol</b>	1 gota	1 gota				
<b>Permanganato de potasio al 5% p/v</b>	3-6 gotas	2 gotas				

#### 7.2.4. Cálculos

**7.2.4.1. Muestra:** El resultado de las lecturas de las muestras se multiplica por dos.

**7.2.4.2. Muestra Contaminada para calcular porcentaje de recuperación:**  
 Lectura muestra contaminada - lectura ppm muestra tal cual/0.5x100= % de Recuperación.

**7.2.5. Resultado:** Se expresan en  $\mu\text{g } \%$ .

**7.2.6. Parámetros analíticos recomendados para la lectura de mercurio con Cloruro de Estaño en el Equipo FIAS 100.**

**PARAMETROS:**

**Técnica:** Absorción atómica AA

**Longitud de Onda:** 253.7 nm

**Tiempo de Integración:** 20 segundos

**Proceso de datos:** 19 puntos

**Temperatura de la celda:** 100°C.

### 7.3. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

#### 7.3.1. Linealidad:

Se determina a partir de la relación lineal entre la señal del equipo y la concentración de mercurio encontrada, mediante la evaluación de 7 estándares realizando tres réplicas por cada uno de ellos. Los datos se someten a un análisis regresión lineal el cual se evalúa por medio del coeficiente de determinación  $r^2$  y análisis de varianza. (Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research and Center for Veterinary Medicine, 2001). Además se grafican los residuales de la regresión para observar si existe la posibilidad de encontrar sesgo y si los datos poseen una distribución normal.

#### 7.3.2. Exactitud:

Se calcula mediante el porcentaje de recuperación obtenido a partir de muestras a 7 concentraciones diferentes y 3 réplicas de cada una, aplicando la siguiente fórmula: **Cantidad encontrada ( $\mu\text{g/dL}$ ) \* (100%) / Cantidad original ( $\mu\text{g/dL}$ ) = % de recuperación**

Se evalúa mediante la prueba de hipótesis de la siguiente forma, aplicando a este análisis la Prueba de T de Student para una muestra, de dos colas con un nivel de confianza del 95%.

**$H_0: \mu = 100\%$  (de recuperación)**

**$H_a: \mu \neq 100\%$  (de recuperación)**

También se calculan los intervalos de confianza del 95% de la media del porcentaje de recuperación.

#### 7.3.3. Repetibilidad:

Se evalúa utilizando una sola muestra contaminada, evaluándola mediante 10 réplicas de la misma, bajo las mismas condiciones, sometiendo los resultados al

cálculo de media, desviación estándar y coeficiente de variación el cual debe corresponder a un valor < 5.0% (American Public Health Association, American Waterworks Association, Water Environment Federation, 1998).

#### **7.3.4. Perfil de precisión:**

A partir de las muestras contaminadas con mercurio con 3 réplicas cada una, se calcula el coeficiente de variación para cada una de las concentraciones evaluadas. De tal forma se toman tres puntos por debajo del valor normal y otros tres puntos por encima del valor normal, de manera que se utilizan concentraciones con valores de 1, 2, 4, µg/L, un valor normal de 5 µg/L, además de concentraciones con valores de 8, 10 y 12 µg/L.

#### **7.3.5. Límite de detección:**

Se determina a partir de la menor concentración de mercurio que puede detectarse pero no necesariamente cuantificarse mediante la siguiente fórmula:

$$X_{LOD} = \frac{3\sigma}{S}$$

Donde:

$\sigma$  = desviación estándar de la respuesta del blanco

S = La pendiente de la curva de calibración (Holcombe, H., Teddington, L.G, 1998.)

(Argentina. Organismo Argentino de Acreditación OAA, 2008).

#### **7.3.6. Límite de cuantificación:**

Se calcula a partir del valor menor del analito en la muestra, que puede ser determinado con aceptable precisión y exactitud. Aplicando la siguiente fórmula:

$$X_{LOQ} = \frac{10\sigma}{S}$$

Donde:

$\sigma$  = desviación estándar de la respuesta del blanco

S = La pendiente de la curva de calibración

Criterio de precisión de un CV=10% en el límite de cuantificación. (Argentina. Organismo Argentino de Acreditación OAA., 2008).

#### **7.3.7. Rango**

Se determina a partir de la mayor a la menor concentración de mercurio que el equipo pudo detectar (Argentina. Organismo Argentino de Acreditación OAA., 2008).

## 8. RESULTADOS

### 8.1. LINEALIDAD

Para la determinación de la linealidad del método, se realizó una curva de calibración mediante la evaluación de 7 estándares acuosos de mercurio a concentraciones 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12  $\mu\text{g/L}$ , realizando tres réplicas por cada uno de ellos (Tabla 1), tomando en cuenta que se determinó la relación lineal entre la señal del equipo (Absorbancia) y la concentración de mercurio encontrada. Luego los datos al ser sometidos al análisis de regresión lineal (Gráfica 1), se obtuvo un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.99984 y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9968 (Tabla 2). El análisis de varianza determinó un valor de  $p$  menor a 0.05 (Tabla 3). Además se graficaron los residuales de la regresión para observar si existe la posibilidad de encontrar sesgo y si los datos poseen una distribución normal (Gráfica 2).

**Tabla 1. Valores de concentración y absorbancia de los estándares acuosos utilizados en la regresión lineal.**

No.	Concentración	Señal (ABS)	Promedio Señal (ABS)	Promedio Concentración $\mu\text{g/L}$	SD	C.V%
1	blanco	-0.001	-0.00133333	0.225	6E-04	-43.3
2	blanco	-0.001				
3	blanco	-0.002				
1	1 $\mu\text{g/L}$	0.005	0.00466667	1.279	0.002	32.733
2	1 $\mu\text{g/L}$	0.003				
3	1 $\mu\text{g/L}$	0.006				
1	2 $\mu\text{g/L}$	0.006	0.00733333	1.885	0.002	20.83
2	2 $\mu\text{g/L}$	0.007				
3	2 $\mu\text{g/L}$	0.009				
1	4 $\mu\text{g/L}$	0.02	0.01533333	3.561	0.006	41.929
2	4 $\mu\text{g/L}$	0.008				
3	4 $\mu\text{g/L}$	0.018				
1	6 $\mu\text{g/L}$	0.028	0.02633333	5.923	0.002	5.8007
2	6 $\mu\text{g/L}$	0.026				
3	6 $\mu\text{g/L}$	0.025				
1	8 $\mu\text{g/L}$	0.034	0.03433333	7.686	6E-04	1.6816
2	8 $\mu\text{g/L}$	0.035				
3	8 $\mu\text{g/L}$	0.034				
1	10 $\mu\text{g/L}$	0.046	0.04633333	10.271	6E-04	1.2461
2	10 $\mu\text{g/L}$	0.046				
3	10 $\mu\text{g/L}$	0.047				
1	12 $\mu\text{g/L}$	0.056	0.055	12.169	0.001	1.8182
2	12 $\mu\text{g/L}$	0.054				
3	12 $\mu\text{g/L}$	0.055				

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

**Tabla 2. Resultados estadísticos de la regresión lineal en estándares acuosos**

Datos Regresión lineal	
Coficiente de Correlación	0.99984
R-cuadrada	99.968 por ciento
R-cuadrado (ajustado para g.l.)	99.9627 por ciento
Error estándar del est.	0.000395572
Error absoluto medio	0.000265208
Estadístico Durbin-Watson	1.40202 (P=0.0673)
Autocorrelación de residuos en retraso 1	-0.048969

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en STATGRAPHICS centurión XVI.

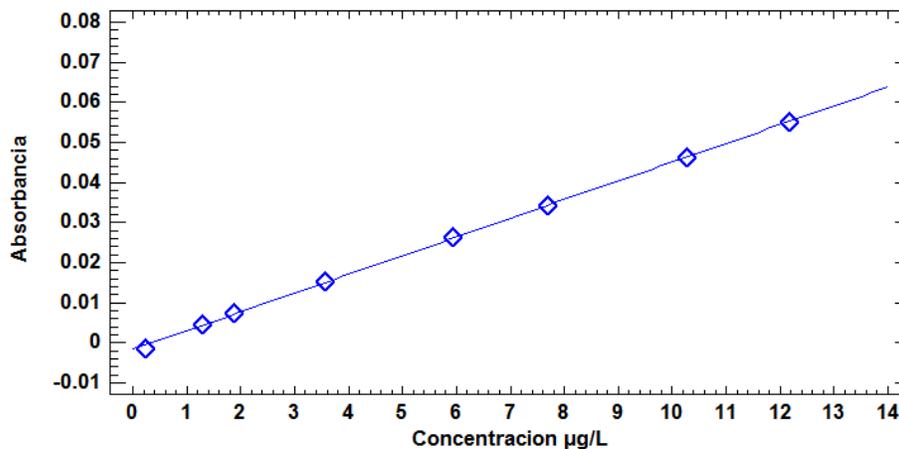
**Tabla 3. Análisis de varianza de la regresión lineal de la recta de calibración y sus residuos.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00293751	1	0.00293751	18772.72	0.0000
Residuo	9.38864E-7	6	1.56477E-7		
Total (Corr.)	0.00293844	7			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en STATGRAPHICS centurión XVI.

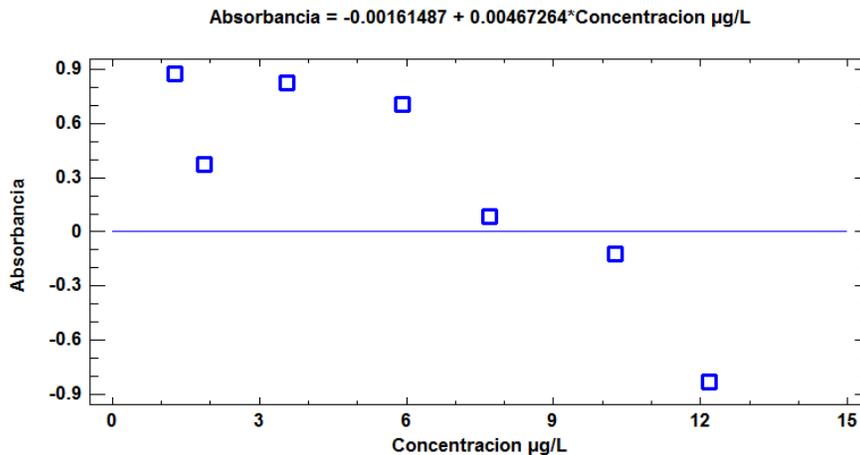
**Gráfica 1. Curva de regresión lineal con estándares acuosos**

CURVA DE CALIBRACIÓN CON ESTANDARES ACUOSOS  
 $Absorbancia = -0.00161487 + 0.00467264 \cdot Concentraci\acute{o}n \mu g/L$



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en STATGRAPHICS centurión XVI.

**Gráfica 2. Residuales tipificados de la recta de calibración con estándares acuosos.**



**Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en STATGRAPHICS centurión XVI.**

A continuación se evaluaron muestras, con distintas concentraciones de mercurio en orina; tomando en cuenta que el valor normal de mercurio en orina es  $5 \mu\text{g/L}$ , se realizaron determinaciones de tres niveles por debajo y tres por arriba de lo normal con tres réplicas de cada nivel a distintas concentraciones 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12  $\mu\text{g/L}$  (Tabla 1) (ver Anexo 1).

Los resultados de las muestras fortificadas fueron corregidos previamente por la recta de calibración con estándares acuosos. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de regresión lineal (Gráfica 3) obteniendo un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.9999, un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.99994, una pendiente ( $m$ ) = 0.00613708 y un intercepto ( $\beta$ ) de 0.00463515 (Tabla 4), con un valor de  $p$  menor a 0.05 según el análisis de varianza de un solo factor (Tabla 5). Además se graficaron los residuales de la regresión para observar si existe la posibilidad de encontrar sesgo y si los datos poseen una distribución normal (Gráfica 4).

**Tabla 4. Resultados estadísticos de la curva de calibración en muestras de orina fortificadas**

<b>Datos Regresión lineal</b>	
Coefficiente de Correlación	0.999972
R-cuadrada	99.9943 por ciento
R-cuadrado (ajustado para g.l.)	99.9934 por ciento
Error estándar del est.	0.000185076
Error absoluto medio	0.000142117
Estadístico Durbin-Watson	2.55038 (P=0.6447)
Autocorrelación de residuos en retraso 1	-0.341798

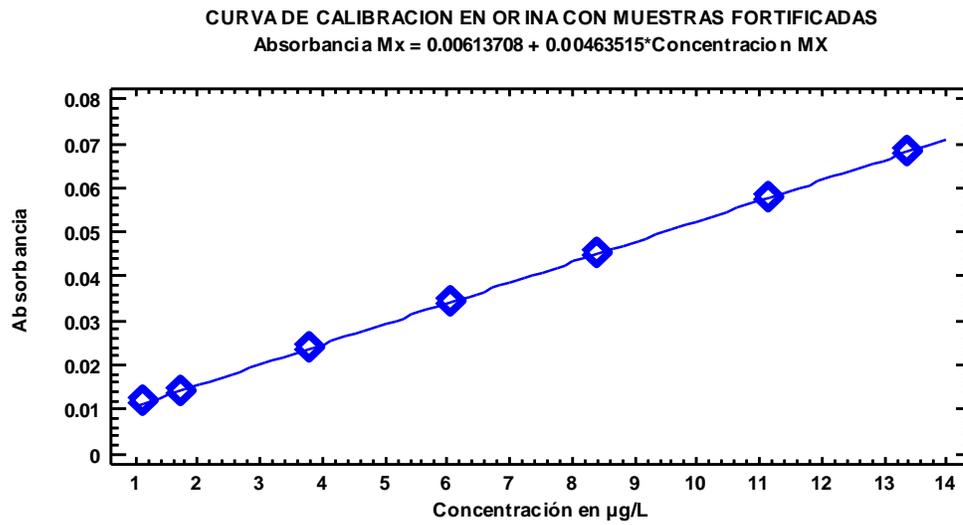
**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en STATGRAPHICS centurión XVI.

**Tabla 5. Análisis de varianza de la regresión lineal de la recta de calibración y sus residuos en orina fortificada.**

<b>Fuente</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Gl</b>	<b>Cuadrado Medio</b>	<b>Razón-F</b>	<b>Valor-P</b>
Modelo	0.00363374	1	0.00363374	106084.87	0.0024
Residuo	2.05519E-7	6	3.42531E-8		
Total (Corr.)	0.00363394	7			

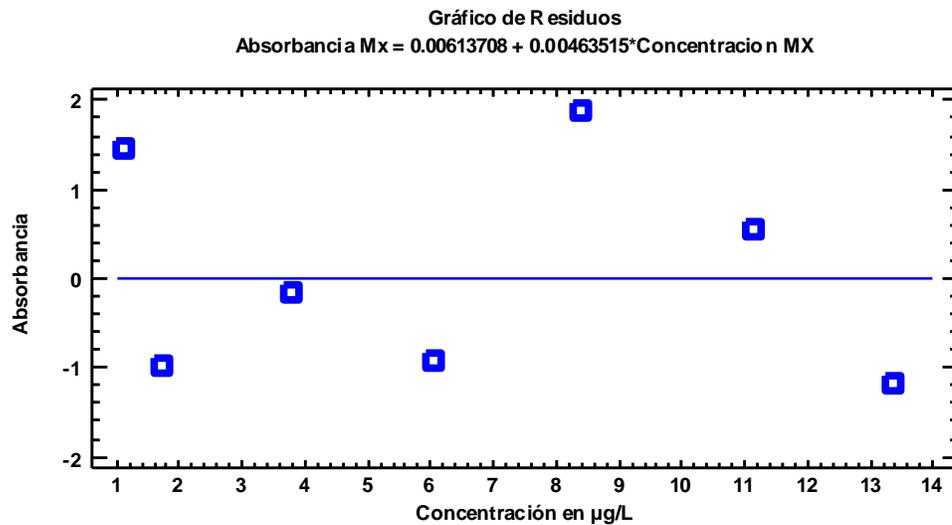
**Fuente:** Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en STATGRAPHICS centurión XVI.

**Gráfica 3. Curva de regresión lineal en muestras de orina fortificadas**



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en STATGRAPHICS centurión XVI.

**Gráfica 4. Gráfica de residuales tipificados de la recta de calibración en muestras de orina fortificada**



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en STATGRAPHICS centurión XVI.

## 8.2. EXACTITUD

Para evaluar la exactitud del método se calculó el porcentaje de recuperación de cada repetición obteniéndose un rango de 74.3% a 119.3% (Tabla 6), con una media para todos los niveles de concentraciones de 103.56%. Se obtuvieron desviaciones estándar de 0.09 a 0.38 y coeficientes de variación en un rango de 0.72% a 30.73% (Tabla 2) (ver Anexo 1). También se pudo determinar la exactitud del método en términos de veracidad a través del sesgo estandarizado con un valor de 0.335058 (Tabla 6).

Además se evaluó mediante la prueba de hipótesis de la siguiente forma, aplicando a este análisis la Prueba de T de Student para una muestra, de dos colas con un nivel de confianza del 95% (Tabla 7). También se obtuvieron los intervalos de confianza al 95% (inferior y superior) para cada uno de los porcentajes de recuperación obtenidos según los distintos niveles de concentración (Tabla 7).

Se aplicó además un análisis de varianza a fin de comprobar que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de recuperación de mercurio a distintas concentraciones y su variación entre grupos, encontrándose un valor de  $p = 0.2392$  (Tabla 8).

**Tabla 6. Resumen Estadístico para % de recuperación**

Recuento	21
Promedio	103.558
Desviación Estándar	15.4375
Coefficiente de Variación	14.907%
Mínimo	74.3
Máximo	119.3
Rango	65.0
Sesgo Estandarizado	0.335058
Curtosis Estandarizada	0.798033

**Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en STATGRAPHICS centurión XVI.**

**Tabla 7. Intervalos de Confianza al 95% para el porcentaje de recuperación**

Intervalos de confianza del 95.0% para la media: 103.558 +/- 7.02706 [96.531, 110.585]
Intervalos de confianza del 95.0% para la desviación estándar: [11.8106, 22.2928]

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en STATGRAPHICS centurión XVI.

**Tabla 8. Análisis de varianza para contrastar el porcentaje de recuperación a diferentes niveles de concentración.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1888.04	6	314.673	1.53	0.2392
Intra grupos	2878.26	14	205.59		
Total (Corr.)	4766.3	20			

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Análisis de datos en STATGRAPHICS centurión XVI.

### 8.3. REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN

Se representó la dispersión de los datos en una serie de repeticiones, la cual fue evaluada por el desempeño analítico repetibilidad. Se realizaron 10 repeticiones bajo las mismas condiciones; analista, equipo, realizando los análisis durante un corto periodo de tiempo, utilizando un estándar con una concentración de 4µg/L, la cual es menor al valor teórico de mercurio en orina (5µg/L), con la finalidad de determinar la precisión con valores menores al parámetro establecido por el laboratorio (Tabla 9).

**Tabla 9. Evaluación de la repetibilidad del método analítico para el STD (4 µg/L)**

Repetición	Concentración	Absorbancia
	(Mx + STD 4µg/L)	
1	3.872	0.024
2	3.567	0.023
3	3.927	0.024
4	3.668	0.023
5	3.54	0.023
6	3.289	0.021
7	3.264	0.021
8	3.25	0.021
9	3.369	0.022
10	3.665	0.023
$\bar{x}$	3.5411	0.0225
SD	0.246133862	0.001178511
CV	6.95%	5.24%

\* SD = Desviación estándar. CV% = Coeficiente de variación

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Para evaluar el perfil de precisión se determinaron los parámetros de calidad como la desviación estándar en un rango de 0.09 a 0.38 y para el coeficiente de variación un rango de 0.72% a 30.73%, tomando en cuenta para ambos casos todas las concentraciones (Tabla 3) (ver Anexo 1).

#### 8.4. LIMITE DE DETECCIÓN Y LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

El límite de detección se define como aquella concentración que proporciona una señal instrumental significativamente diferente de la señal de una muestra en blanco, o la señal de fondo. El valor obtenido para el límite de detección es de 0.41444  $\mu\text{g/L}$  en el método y según el equipo instrumental utilizado. En la Tabla 10 se tabularon los valores del blanco de trabajo utilizados para los cálculos de dicho parámetro.

Seguidamente se determinó el límite de cuantificación el cual es el límite de concentración más bajo para mediciones cuantitativamente precisas. El límite de cuantificación experimental es de 1.3814  $\mu\text{g/L}$  de mercurio en orina (Tabla 11).

**Tabla 10. Valores de las absorbancias de 10 réplicas de un blanco de calibración.**

Absorbancia del Blanco	
0.001	
0.002	
0.002	
0.002	
0.002	
0.001	
0.001	
0.001	
0.003	
0.002	
<b>0.0017</b>	<b>Promedio</b>
<b>0.000640312</b>	<b>SD</b>

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

**Tabla 11. Límite de detección y Límite de cuantificación para la determinación de mercurio en orina por AA.**

<b>Límite de detección</b>	<b>0.4144 <math>\mu\text{g/L}</math></b>
<b>Límite de cuantificación</b>	<b>1.3814 <math>\mu\text{g/L}</math></b>

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

### **8.5. RANGO**

El rango de concentración sobre el cual las mediciones analíticas se trabajaron fue de 0.743  $\mu\text{g/L}$  como límite inferior y 13.45  $\mu\text{g/L}$  como límite superior de mercurio en orina.

## 9. DISCUSIÓN

La validación apropiada de métodos analíticos se ha convertido en una parte esencial en el desarrollo y caracterización de un sin número de moléculas. La validación de un método analítico consiste en utilizar un diseño experimental para demostrar que el método puede generar resultados precisos dentro del alcance de uso previsto. Comprender la aplicación y las limitaciones del método en proceso de validación permite una evaluación precisa de la información generada. Por lo tanto si un método analítico no ha sido validado los datos proporcionados por tal método no son fiables.

La toxicología tiene como premisa que “la toxicidad depende de la dosis”, Paracelso (1493-1541). Esto quiere decir que todas las relaciones dosis-respuesta requieren del análisis de su concentración. La química analítica desempeña un papel importante en la investigación toxicológica, de tal modo que la determinación de mercurio en orina utilizando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica con celdas de vapor frío (FIAS) es necesaria para la cuantificación de dicho elemento dentro del laboratorio del Departamento de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos.

La validación del método analítico realizada en el Laboratorio de Toxicología determina parámetros de calidad en el análisis, dichos parámetros de calidad engloban los resultados en un ambiente preciso y certero. Los resultados de los análisis que se realicen utilizando el método validado serán resultados verídicos y trazables. Existen parámetros de desempeño analítico: linealidad, exactitud, precisión, repetibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y el rango, los cuales validan eficazmente el método analítico en estudio.

La **linealidad** es la capacidad de un método de análisis, dentro de un determinado intervalo, de dar una respuesta o resultados instrumentales que sean proporcionales a la cantidad del analito que se habrá de determinar en la muestra de laboratorio (Duffau, B, 2010).

Se determinó en la sección de Resultados el rango lineal en las muestras de estándares acuosos como se observa en la Gráfica 1 con la ayuda de los datos en la Tabla 1, en donde se describe la función respuesta (curva de calibración), de la absorbancia y la concentración del analito. Dicha curva de calibración se establece en cada análisis con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de concentración conocida, los cuales cubren el intervalo de trabajo con mercurio. Se recomienda trabajar con valores cercanos al cero y valores superiores al valor normal de mercurio en orina (Duffau, B, 2010). Luego de observar la Gráfica 1, se analiza el comportamiento de la curva y se estableció cuantitativamente el rango lineal. Se estableció el comportamiento lineal del método con los datos obtenidos experimentalmente observando la Tabla 2. Para una curva de calibración o trabajo, es recomendable que el coeficiente de correlación obtenido sea mayor o igual a 0.999, aunque para el caso de trazas se admite un valor igual o mayor que 0.99 (Duffau, B. 2010).

Luego de haber mencionado los resultados obtenidos estadísticamente; se sabe que el coeficiente de correlación obtenido en la curva con estándares acuosos ( $r$ ) es de 0.99984, el cual indica el grado de relación entre concentración de mercurio y la absorbancia obtenida, tomando en cuenta que el valor es cercano a la unidad denota una correlación positiva perfecta entre las variables con una pendiente positiva, existiendo dependencia total entre las variables y demostrando la linealidad de la curva de calibración. El coeficiente de determinación ( $r^2$ ), que es el cuadrado del coeficiente de correlación de Pearson, da la proporción de variación de la variable Y que es explicada por la variable X (variable predictora o explicativa). Si la proporción es igual a 0, significa que la variable predictora tiene NULA capacidad predictiva de la variable a predecir (Y). Cuanto mayor sea la proporción, mejor será la predicción. Si llegara a ser igual a 1 la variable predictora explicaría TODA la variación de Y, y las predicciones NO tendrían error (Duffau, B, 2010). En la Tabla 2 se observa el valor del coeficiente de determinación ( $r^2$ ) el cual es de 0.9968, interpretando que la concentración de mercurio en orina se correlaciona linealmente con la absorbancia detectada en el equipo.

Siguiendo el protocolo de validación propuesto, se evaluaron las muestras de orina fortificadas con concentraciones conocidas de mercurio, realizando tres determinaciones por debajo y tres determinaciones por arriba del valor normal de mercurio en orina ( $5 \mu\text{g/L}$ ), dando lugar a una curva con tres réplicas de las siguientes concentraciones: 1, 2, 4, 6, 8, 10,  $12 \mu\text{g/L}$  como se puede observar en la Tabla 1 (ver Anexo 1).

Los resultados de las muestras fortificadas con mercurio fueron corregidos por la recta de calibración con estándares acuosos mencionada anteriormente. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de regresión lineal (Gráfica 3) obteniendo un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.9999, un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.99994, una pendiente ( $m$ ) = 0.00613708 y un intercepto ( $\beta$ ) de 0.00463515 (Tabla 4), con un valor de  $p$  menor a 0.05 según el análisis de varianza de un solo factor (Tabla 5). De tal modo que el análisis de varianza indica que existe una relación directamente proporcional entre la respuesta del equipo y la concentración de mercurio, con un nivel de confianza del 95%. Además se graficaron los residuales de la regresión (Gráfica 4), teniendo como resultado una calibración lineal, debido a que los residuales obtenidos gracias a la concentración tienen un comportamiento aleatorio a una porción de la gráfica que limita la regresión lineal. Ningún residual tipificado se aleja tres veces la desviación estándar, por tal razón se establece que la observación del modelo estimado cumple con la hipótesis del modelo de regresión (Tabla 4).

El método de cuantificación de mercurio en orina por espectrofotometría de absorción atómica con celdas de vapor frío (FIAS), presenta la habilidad de obtener resultados experimentales los cuales son directamente proporcionales a la concentración de mercurio en orina en un rango de concentraciones de trabajo. Por tanto el método analítico cumple con el parámetro de desempeño analítico *Linealidad* discutido con anterioridad.

Con relación a la validación realizada, se encuentra el parámetro de desempeño analítico ***Exactitud*** el cual refiere a la medición de la diferencia entre los resultados previstos del análisis y el valor de referencia aceptado, debido a un error sistemático del método y del

laboratorio. Normalmente se expresa en porcentaje. La exactitud y la precisión determinan el error total del análisis. La exactitud se determina teóricamente utilizando material de referencia certificado (MRC) si es posible, métodos de referencia, estudios en colaboración o mediante comparación con otros métodos (UNODC. 2010).

Para la comprobación de dicho parámetro se calculó el porcentaje de recuperación obtenido a partir de muestras a siete concentraciones diferentes y tres réplicas de cada una. Tomando en cuenta que el porcentaje de recuperación de un analito en un método analítico se entiende como la respuesta del detector ante una adición o extracción de analito de la matriz, en comparación con su respuesta ante la concentración real del estándar de referencia verdadero, en resumen se toma como el porcentaje de analito o estándar interno presente inicialmente en el espécimen, que llega hasta el final del procedimiento analítico, según el Manual de directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos de UNODC (Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito) (UNODC. 2010).

Como se menciona en el párrafo anterior se calculó el porcentaje de recuperación, obteniéndose un rango el cual fue establecido en valores que van desde 74.3% a 119.3% como límite superior (Tabla 6), con una media para todos los niveles de concentraciones de 103.56%. Se obtuvieron desviaciones estándar de 0.09 a 0.38 y coeficientes de variación en un rango de 0.72% a 30.73% presente en la Tabla 2 (ver Anexo 1). También se pudo determinar la exactitud del método en términos de veracidad a través del sesgo estandarizado con un valor de 0.335058 (Tabla 6). Al comparar estos valores con otros estudios previos realizados por Alarcón, C., se encontró que mediante la determinación de mercurio en agua natural, residual y de consumo por esta misma técnica obtuvieron porcentajes de recuperación de 98.15 a 102.65%. (Alarcón, C. 2011). Según indica la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Ministerio de Salud de Costa Rica, los valores obtenidos en todos los casos evaluados se deben encontrar dentro de un rango de porcentaje de recuperación de 70% al 120% al trabajar con trazas de menos de 1 ppb (Ministerio de Salud de Costa Rica. 2006). Observando el rango de valores que se obtuvo

al evaluar dicho parámetro se obtiene la cercanía entre el valor que es aceptado establecido por un estándar de referencia y el valor experimental.

Por su parte el sesgo es la diferencia entre el valor promedio obtenido de los resultados de prueba con respecto a un valor de referencia aceptado o conocido (Vega, G. 2011). En términos estadísticos, la exactitud está relacionada con el sesgo de una estimación, esto quiere decir que en cuanto menor es el sesgo más exacta es una estimación, encontrando que el valor de sesgo experimental fue de 0.335058 el cual comprueba que la estimación es más exacta comparando los valores teóricos y experimentales. Además se determinó mediante la prueba de hipótesis, aplicando el análisis de T de Student para una muestra, de dos colas con un nivel de confianza del 95% (Tabla 7). También se obtuvieron los intervalos de confianza al 95% con respecto a la media  $103.558 \pm 7.02706\%$  [96.531%, 110.585%] para cada uno de los porcentajes de recuperación obtenidos según los distintos niveles de concentración (Tabla 7), este análisis indica que no se presentan diferencias significativa entre la recuperación media y el 100%, por lo que los valores de exactitud son aceptados (Skoog et al, 2005). El resultado del análisis de varianza a fin de comprobar que no existe diferencia estadísticamente significativa entre el porcentaje de recuperación de mercurio a distintas concentraciones y su variación entre grupos, encontrándose un valor de  $p = 0.2392$  (Tabla 8).

Al no existir diferencia significativa entre el valor de la media de recuperación y la cantidad añadida de analito, podemos deducir que el porcentaje de recuperación del analito es muy cercano al 100%, y el método evaluado genera resultados con *Exactitud* en la determinación de mercurio en muestras de orina.

La precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo recibe el nombre de **Repetibilidad**, la cual fue evaluada según la dispersión de los datos en una serie de diez repeticiones como se observa en la Tabla 9, trabajando

con una muestra con concentración de  $4\mu\text{g/L}$ , observando un valor promedio de  $3.5411\mu\text{g/L}$ , una desviación estándar  $0.246$  y un coeficiente de variación de  $6.95\%$ .

La evaluación del perfil de precisión determinó los parámetros de calidad con una desviación estándar en un rango de  $0.09$  y  $0.38$  y para el coeficiente de variación en un rango de  $0.72\%$  a  $30.73\%$  presente en la Tabla 3 (ver Anexo 1). La precisión encontrada en el método analítico demostró el grado de concordancia o la dispersión de los resultados. El valor de desviación estándar representado en el rango anterior fue menor que el  $2\%$  de RSD, establecido para que un método analítico presente resultados precisos según Medina, J. y Berrocal, J en el 2008.

La evaluación de la Precisión demostró *Repetibilidad y Precisión* en el método analítico, estableciendo que cuando dicho método es realizado por un mismo analista, bajo las mismas condiciones (equipo, reactivos e intervalo de tiempo) genera una desviación estándar que es menor al  $2\%$  y presenta resultados cercanos entre sí mismos.

El proceso de validación del método analítico requirió la evaluación del **Límite de detección** el cual se refiere a la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede detectar aunque no cuantificar bajo las condiciones experimentales descritas para dicho método (Alarcón, C. 2011). Para este parámetro de desempeño se obtuvieron diez valores de las absorbancias de diez réplicas de un blanco de calibración como se observa en la Tabla 10, obteniendo un promedio de  $0.0017$  de absorbancia por parte del equipo analítico y la desviación estándar de  $0.00064$ . Como se estableció en el apartado Límite de detección en el diseño experimental de esta validación, se realizó el análisis matemático donde el límite de detección es; tres veces la desviación estándar partido la pendiente de la curva de calibración, obteniendo un valor de  $0.4144\mu\text{g/L}$  para el límite de detección, es decir que esta es la concentración mínima que el equipo puede detectar pero no cuantificar a través de esta metodología analítica.

Los valores del *límite de detección* se encuentran debajo del último punto de la curva de calibración utilizada en la validación analítica. Tomando en cuenta el valor del límite de detección mencionado en el párrafo anterior, se interpreta de modo que si la

concentración está por debajo de estos valores, no serán detectados, es decir, no arrojarán una señal detectable. Si bien un valor mayor al límite de detección arroja una señal, ésta es sólo una medida cualitativa, ya que los valores de límite de cuantificación son mayores.

El **límite de cuantificación** es un parámetro de pruebas de límite. Es la concentración más baja de analito que pueda detectarse bajo las condiciones experimentales establecidas. De esta manera, las pruebas de límites solamente fundamentan que la concentración del analito está por encima o por debajo de un nivel de seguridad. Este parámetro hace referencia a la mínima concentración del compuesto en estudio que es posible detectar con certeza y precisión, es decir que se puede diferenciar la respuesta dada por un blanco, el cual contiene todos los componentes de la muestra menos el compuesto de estudio (Jofre, V. 2009).

El límite de cuantificación se estimó con el promedio y la desviación estándar de las medidas de las muestras usadas en la determinación del límite de detección, obteniendo un valor de 1.3814  $\mu\text{g/L}$  de mercurio en orina como se observa en la Tabla 11. Tomando en cuenta el resultado anterior, que el valor es mayor al primer punto de calibración de la curva 1  $\mu\text{g/L}$ , de este modo se sabe que a concentraciones que se encuentren menores al límite establecido de cuantificación, no se puede asegurar resultados exactos y precisos en valores de mercurio en orina. En la determinación de mercurio en orina por el método del vapor frío con cloruro de estaño a través de Espectrofotometría de absorción atómica realizado por Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo en España, se establece un valor para el límite de cuantificación de 5  $\mu\text{g/L}$  de mercurio en orina, en donde se establece un intervalo de trabajo que va desde 5  $\mu\text{g/L}$  a 200  $\mu\text{g/L}$  de mercurio en orina. (INSHT. 1996).

El **rango** de concentración en el cual las cuantificaciones analíticas se trabajaron fue de 0.743  $\mu\text{g/L}$  como límite inferior y 13.45  $\mu\text{g/L}$  como límite superior de mercurio en orina. Gracias a que se realizaron determinaciones de estándares de mercurio a una

concentración mayor que la establecida dentro del método llegando hasta 20 µg/L de mercurio y validando la linealidad del método.

Por lo mencionado con anterioridad se puede afirmar que el método de cuantificación de mercurio en orina por espectroscopia de absorción atómica con celdas de vapor frío (FIAS) utilizado en el laboratorio del Departamento de Toxicología de la Escuela de Química Farmacéutica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala presenta resultados de linealidad, especificidad, precisión y exactitud satisfactorios que permiten obtener resultados seguros y confiables en los análisis toxicológicos realizados en dicha institución.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1.** El método analítico utilizado para la cuantificación de mercurio en orina proporciona datos confiables cumpliendo los parámetros de desempeño analítico.
- 10.2.** Se demostró el cumplimiento de la linealidad del método y la linealidad del sistema en el intervalo de concentraciones de mercurio evaluadas, obteniendo el valor del coeficiente de correlación en la curva con estándares acuosos ( $r$ ) de 0.99984 y el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.9968 mientras que los resultados de las muestras fortificadas con mercurio presentaron un coeficiente de correlación ( $r$ ) de 0.9999, un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0.99994 de manera que el análisis de varianza indica que existe una relación directamente proporcional entre la respuesta del equipo y la concentración de mercurio, con un nivel de confianza del 95%.
- 10.3.** Se demostró la exactitud del método con un porcentaje de recuperación promedio para las diferentes concentraciones evaluadas de 103.56%, estableciendo un rango en valores que van de 74.3% a 119.3%. Este rango de valores refleja la cercanía entre el valor que es aceptado establecido por un estándar de referencia y el valor experimental.
- 10.4.** Se demostró la precisión y la repetibilidad del método analítico ya que al ser efectuado por cualquier analista, cualquier día y con cualquier muestra, es un método preciso ya que posee un elevado grado de concordancia entre los resultados generados.

- 10.5.** Los resultados al evaluar el perfil de precisión demostraron que los coeficientes de variación son válidos debido a que son menores al 2%, valor establecido para dicho parámetro, lo cual demuestra la buena repetibilidad del método analítico.
- 10.6.** Se determinó que los resultados obtenidos por la metodología analítica muestran alta concordancia individual para concentraciones mayores al límite de detección el cual fue de 0.4144 µg/L, es decir que esta es la concentración mínima que el equipo puede detectar pero no cuantificar a través de esta metodología analítica.
- 10.7.** A partir del análisis cuantitativo se determinó el límite de cuantificación obteniendo un valor de 1.3814 µg/L de mercurio en orina, de este modo se sabe que a concentraciones que se encuentren menores al límite establecido de cuantificación no se puede asegurar resultados exactos y precisos.
- 10.8.** El rango de concentración en el cual las cuantificaciones analíticas se trabajaron fue de 0.743 µg/L como límite inferior y 13.45 µg/L como límite superior de mercurio en orina, tomando en cuenta este amplio rango se generan resultados precisos, exactos y con linealidad.
- 10.9.** Los resultados permiten concluir que el método de cuantificación de mercurio en orina por espectroscopia de absorción atómica con celdas de vapor frío (FIAS) utilizado en el laboratorio del Departamento de Toxicología de la Universidad de San Carlos de Guatemala cumple con parámetros de desempeño analítico propuestos en la validación del mismo, comprobando su linealidad en los resultados, especificidad al mercurio, precisión y exactitud. De modo que al momento de realizar la metodología de trabajo se obtienen resultados seguros y confiables.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1.** El método analítico demanda que la señal producida se deba inequívocamente al mercurio, esto se puede eliminar quitando interferencias de sustancias y/o compuestos orgánicos que alteren el valor, de modo que se debe monitorear la preparación de la muestra, el lavado de cristalería, condiciones instrumentales.
- 11.2.** La validación del método generó resultados fiables y certeros, sin embargo es válido recomendar utilizar otro agente reductor como el borohidruro de sodio en lugar del cloruro de estaño. Con el objetivo de comparar ambos resultados y establecer analíticamente con cuál de las dos metodologías se obtiene un mejor análisis de mercurio en orina.
- 11.3.** Se recomienda evaluar la reproducibilidad del método analítico en otro laboratorio, tomando en cuenta otros analistas y otro equipo, gracias a que dicho parámetro no se evaluó en la validación propuesta.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Antuña, I. (2007). *Efectos Toxicológicos e Impacto Ambiental del Mercurio. Validaciones y Sistemas de control de calidad de ensayos químicos bajo sistema de calidad ISO 17025:2005*. Rosario – Santa Fe – Argentina. Pp. 22
- Baird, C. (1999). *Environmental Chemistry*. 2nd Ed. W.H. Freeman & Company. Pp. 65
- Bolaños-Álvarez, Kirenia, Cos-Negret, Aniel, Guillén-Arruebarrena, & Ana Maray, Torres-Martín. (2016). Validación del método de determinación de mercurio en muestras de sedimentos y tejidos biológicos utilizando un Analizador Directo de Mercurio (DMA-80). *Revista Cubana de Química*, 28(3), 784-792.
- Carrasquero, A. Adams, M. (2002). *Comparación de métodos para el análisis de mercurio en suelos procedentes del callao, Estado de Bolívar, Venezuela*. INCI v.27 n.4 Caracas. Pp 87
- Castellucci, F. (2005). *Recomendaciones armonizadas para la validación de métodos de análisis en un solo laboratorio*. Resolución OENO 8/2005. Simposio sobre armonización de sistemas de garantía de calidad para laboratorios analíticos. OIV: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. France. Pp 281
- Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos. (2002). *Guía de validación de métodos analíticos*. México A. C. Pp 34
- Colombo L, Mangione S.B., Figlioglia A. (2008). *Soil profile distribution of heavy metals in soil attended with sewage sludge for eight years*. *Agr. Med. Inter. J. of Agric. Sci.* 128: Pp. 273-283
- Duffau, B. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos"*. Instituto de Salud Publica de Chile. Chile. Pp 16-22

- Español, C.S. (2001). *Toxicología del mercurio. Actuaciones preventivas en sanidad laboral y ambiental*. Minas de Almaden y Arrayanes S.A. Servicio prevención riesgos laborales
- FDA. 2000. Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation Chemistry, Manufacturing, and Controls Documentation. /Center for Drug Evaluation and Research.
- Harris, D. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo*. Editorial Reverté. Volumen 1. Edición N°3. Pp. 924
- Harvey, D. (2002). *Química Analítica Moderna*. Editorial McGraw- Hill/Interamericana de España, Madrid-España. Pp. 542
- Haswell, S.J., (1991). *Atomic Absorption Spectrometry; Theory, Design and Applications*. Elsevier, Amsterdam.
- Housecraft, C.E. & Sharpe, A.G. (2006). *Química Inorgánica*. 2ª Edición. Editorial Pearson Prentice Hall. Pp. 423
- INSHT. (1996). *Determinación de mercurio en orina - Método del vapor frío con cloruro de estaño en Espectrofotometría de absorción atómica*. Ministerio de trabajo y asuntos sociales. España. Consultado el 22 de Marzo del 2017. Disponible en: [http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/MetodosAnalisis/Ficheros/MB/MB\\_019\\_A94.pdf](http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/MetodosAnalisis/Ficheros/MB/MB_019_A94.pdf)
- Jofre, V. (2009). *Validación de la metodología analítica para la determinación de ácidos grasos en aceites de oliva extra virgen*. Universidad de Chile. Chile. Pp. 22. Consultado el 14 de Marzo del 2017. Disponible en: [http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-jofre\\_v/html/index.html](http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2009/qf-jofre_v/html/index.html)
- Kiely, G. (1999). *Ingeniería ambiental*. 1ra edición. McGraw Hill. Madrid. Pp. 488
- Ramirez, A.V. (2008). *Intoxicación ocupacional por mercurio*. Facultad de Medicina. Vol 69 Lima. pp. 46-51

- Lacerda, L.D., Salomons, W. (2005). *El Mercurio en la Amazonía. Serie Tecnología Ambiental: 3*. Río de Janeiro. Pp. 78.
- Lenntech. (2009). *Mercurio (Hg) Propiedades químicas y efectos sobre la salud y el medio ambiente*. Holding B.V. Consultado en: [www.lenntech.com](http://www.lenntech.com),
- Manosalvas, J.F. (2005). *Determinación de metales pesados en material particulado PM10 por espectrofotometría de absorción atómica*. Disertación de Licenciatura en Ciencias Químicas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Ecuador. Pp. 640
- Manuhan, S, E. (2002). *Toxicological Chemistry*. 2da edición. Lewis Publishers. Pp. 374
- Maroto, A. (2002). *Incertidumbre en métodos analíticos de rutina*. Universitat Rovira I Virgili. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. France. Pp. 304
- Minamata. (2014). *El convenio de Minamata sobre el mercurio y su implementación en la región de América Latina y el Caribe*. PNUMA. Uruguay. Pp. 10. Consultado el 24 de Marzo del 2017. Disponible en: [http://www.mercuryconvention.org/Portals/11/documents/publications/informe\\_Minamata\\_LAC\\_ES\\_FINAL.pdf](http://www.mercuryconvention.org/Portals/11/documents/publications/informe_Minamata_LAC_ES_FINAL.pdf)
- Ministerio de Salud de Costa Rica. (2006). *Guía de validación de métodos analíticos*. Costa Rica. Consultado el 03 de febrero del 2017, disponible en: <http://www.controlmetrologico.com/docs/guiavalidacionmetodosanaliticos.pdf>
- Norma INEN ISO/IEC 17025. 2005. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*. Selección de Métodos. Pp. 37
- Novas, A.J., Diaz Padrón,H., Gonzalez, R.M,. (2006). *Evaluación del sistema de calidad implantado en el laboratorio de riesgos químicos del instituto nacional de salud de los trabajadores*. Departamento de Riesgos Químicos, Instituto Nacional de Salud de los Trabajadores, La Habana, Cuba
- O'Neill, P. (2005). *Environmental Chemistry*. Chapman & Hall. London. Pp. 635

- Proske, o, Ensslin, F, Blumenthal, H. (1960). *Análisis de Metales*. Editorial Aguilar. Vol 2. 657pp.
- Revelle, P, Revelle, C. (1984). *The environment issues and choices for society*. 2da edición. Willard Grant Press. Boston.
- Rouessac, A, Rouessac, F. (2007). *Chemical Analysis. Modern Instrumentation Methods and Techniques*. Second Edition. University of Le Mans, France.
- Sanchez, L, (2005). *Control de la Contaminación de las Aguas. III Curso Internacional de Aspectos Geológicos de Protección Ambiental*. Vol 1. UNESCO. Pp. 17
- Sepúlveda, L., Agudelo, L., Arengas, A. (2006). *El mercurio, sus implicaciones en la salud y en el ambiente*. Documental. Pp. 29
- Skoog, D. ,West D. 2001. *Análisis Instrumental*. 8va. Edición, editorial Interamericana, México
- Skoog, D, A.; West, D,M. (2005). *Fundamentos de Química analítica*. Octava edición. International Thomson Editors, S.A. Pp. 1172
- Valiente, L. (2005). *Determinación del nivel de mercurio en aguas y soluciones ácidas*. Instituto nacional de Tecnología Industrial (INTI) – Química, Laboratorio de Análisis de Trazas. Consultado el 28 de febrero del 2014, disponible en: [www.inti.gov.ar](http://www.inti.gov.ar)
- Vega. G. (2011). *Comisión de control analítico y ampliación de cobertura*. Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos. Secretaria de Salud Mexicana. Mexico. Pp. 10
- UNODC. (2010). *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos*. Austria Pp. 56
- Winefordner, J. (2003). *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Department of Chemistry and Environmental Science New Jersey Institute of Technology. Volumen 162. Pp. 462

### 13. ANEXOS (INDICE)

13.1.	ANEXO No. 1 (TABLAS DE RESULTADOS)	44
13.2.	ANEXO No. 2 (MARCO TEÓRICO)	46
13.2.1.	Metales pesados en el medio ambiente y mercurio	46
13.2.2.	Intervención de mercurio (Hg) en el ecosistema.	47
	Características y propiedades	
13.2.3.	Ciclos del mercurio en el medio ambiente	49
13.2.4.	Usos industriales del mercurio	51
13.2.5.	Contaminación provocada por mercurio	52
13.2.6.	Límites de exposición permisibles de mercurio	53
13.2.7.	Intoxicación por mercurio	54
13.2.7.1.	Características del mercurio y toxicocinética	54
13.2.7.2.	El mercurio elemental	54
13.2.7.3.	Las sales de mercurio inorgánico	55
13.2.7.4.	El mercurio orgánico	55
13.2.7.5.	Fisiopatología	57
13.2.7.6.	Manifestaciones clínicas	58
13.2.7.7.	Diagnóstico	59
13.3.	Técnicas de detección de los niveles de contaminación	60
13.4.	Generalidades de la espectroscopía de absorción atómica (AAS).	60
	Principios y usos	
13.4.1.	Técnica de Atomización con generación de vapor frío.	61
13.4.2.	Métodos de cuantificación	63
13.4.3.	Interferencias analíticas	64
13.5.	Proceso de validación de métodos analíticos	65
13.5.1.	Requerimientos para la validación de métodos	66
13.5.2.	Estimación de los criterios de aceptación	69
13.5.3.	Exigencias para la elaboración de informes de resultados	69
13.5.4.	Alcance de los estudios de validación	70
13.5.5.	Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo y de calibración	71

### 13.1. ANEXO No. 1 (TABLAS DE RESULTADOS)

Tabla 1. Valores de concentración y absorbancia de las muestras fortificadas utilizadas en la regresión lineal.

No.	Concentración	Señal	Promedio señal	Concentración	Concentración Corregida	Promedio concentración
1	blanco orina	0.006	0.006	1.5	-0.1	-0.017333333
2	blanco orina	0.007		1.811	0.211	
3	blanco orina	0.005		1.437	-0.163	
1	Mx 1µg/L	0.01	0.011666667	2.343	0.743	1.146666667
2	Mx 1µg/L	0.013		2.993	1.393	
3	Mx 1µg/L	0.012		2.904	1.304	
1	Mx 2µg/L	0.014	0.014	3.283	1.683	1.731333333
2	Mx 2µg/L	0.013		3.123	1.523	
3	Mx 2µg/L	0.015		3.588	1.988	
1	Mx 4µg/L	0.024	0.023666667	5.472	3.872	3.788666667
2	Mx 4µg/L	0.023		5.167	3.567	
3	Mx 4µg/L	0.024		5.527	3.927	
1	Mx 6µg/L	0.034	0.034	7.686	6.086	6.046333333
2	Mx 6µg/L	0.035		7.758	6.158	
3	Mx 6µg/L	0.033		7.495	5.895	
1	Mx 8µg/L	0.043	0.045333333	9.577	7.977	8.399
2	Mx 8µg/L	0.047		10.32	8.72	
3	Mx 8µg/L	0.046		10.1	8.5	
1	Mx 10µg/L	0.059	0.058	12.95	11.35	11.17
2	Mx 10µg/L	0.058		12.86	11.26	
3	Mx 10µg/L	0.057		12.5	10.9	
1	Mx 12µg/L	0.068	0.068	15.05	13.45	13.38
2	Mx 12µg/L	0.068		14.87	13.27	
3	Mx 12µg/L	0.068		15.02	13.42	

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Tabla 2. Parámetros de calidad para la exactitud y precisión según el método analítico propuesto.

	STD	STD	STD	STD	STD	STD	STD
# Replicas	[1µg/L]	[2µg/L]	[4µg/L]	[6µg/L]	[ 8µg/L]	[10 µg/L]	[12µg/L]
1	0.743	1.683	3.872	6.086	7.977	11.35	13.45
2	1.393	1.523	3.567	6.158	8.72	11.26	13.27
3	1.304	1.988	3.927	5.895	8.5	10.9	13.42
[ $\bar{x}$ ]	1.14666667	1.73133333	3.7886667	6.04633333	8.399	11.17	13.38
SD	0.35240649	0.2362379	0.1939287	0.135913	0.3816582	0.2381176	0.0964365
CV%	30.733124	13.644852	5.1186525	2.2478576	4.5440912	2.1317602	0.7207512
SESGO	-1.6085984	0.8821428	-1.576639	-1.201472	-1.107459	-1.457863	-1.545393
Recuperación (%)	114.67%	86.57%	94.72%	100.77%	104.99%	111.70%	111.50%

Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

Tabla 3. Porcentajes de recuperación según los distintos niveles de concentración de mercurio

Réplica	1 µg/dL	2 µg/dL	4 µg/dL	6 µg/dL	8 µg/dL	10 µg/dL	12 µg/dL
1	74.30	84.15	96.80	101.43	99.71	113.50	112.08
2	119.30	76.15	89.18	102.63	109.00	112.60	110.58
3	110.40	99.40	98.18	98.25	106.25	109.00	111.83
IC 95%	101.33	86.57	94.72	100.77	104.99	111.70	111.50

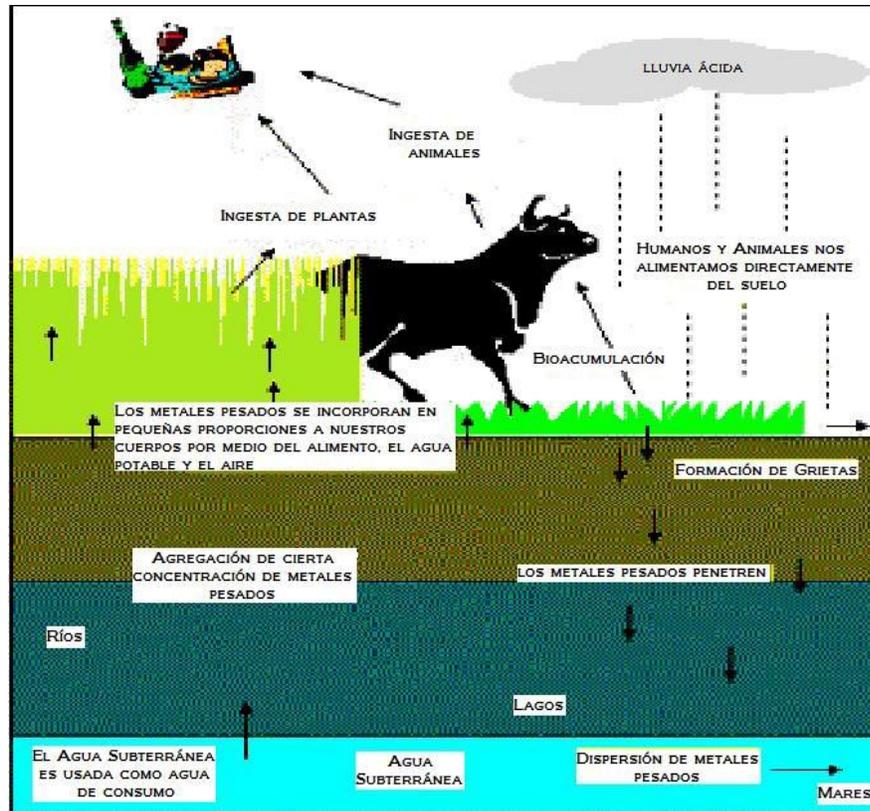
Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

## **13.2. ANEXO No. 2 (MARCO TEÓRICO)**

Los laboratorios deben demostrar que sus métodos analíticos ofrecen resultados fiables, pues las decisiones que se toman están basadas en la información que estos proporcionan. En este sentido, la validación de las metodologías junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad permite demostrar a los laboratorios que sus métodos analíticos proporcionan resultados con un alto grado de confianza. Según la norma NTE INEN-ISO/IEC 17025, los laboratorios deben validar todos los métodos que estos utilicen, tanto los empleados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrolladas por otros laboratorios. Además, es necesario que se validen los métodos de referencia, así como todo el procedimiento analítico, teniendo en cuenta el intervalo de concentraciones y matrices de las muestras de rutina (Maroto, 2002).

### **13.2.1. Metales pesados en el medio ambiente y mercurio**

Los metales pesados son componentes naturales de la corteza terrestre, los cuales tienen una concentración inferior al 0.01%. El término de metal pesado, refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una relativa densidad alta y sea tóxico o venenoso en concentraciones bajas. En la Gráfica 1, se observa que tanto en el suelo, agua y aire existen metales pesados que se encuentran en bajas concentraciones y tienen la capacidad de provocar cambios evolutivos debido a sus efectos dañinos en elementos bióticos, dado a que tienden a bioacumularse y no pueden ser degradados o destruidos. La acción provocada por la lluvia ácida o la actividad industrial genera la formación de grietas en los suelos, ocasionando que los metales pesados penetren hacia aguas subterráneas, ríos, lagos, mares. En pequeñas proporciones se incorporan a los cuerpos por medio del alimento, el agua potable y el aire. Sin embargo, en concentraciones altas pueden conducir a la intoxicación. El envenenamiento por metales pesados podría resultar, de la contaminación del agua potable, las altas concentraciones en el aire cerca de fuentes de emisión, o producto de la ingesta de alimentos (Baird, 1999).



Gráfica 1 Procesos de absorción de metales pesados

Fuente: Kiely, 1999

### 13.2.2. La Intervención de mercurio (Hg) en el ecosistema. Características y propiedades

El mercurio se manifiesta de manera natural en el medio ambiente, ocupa el lugar 67 de abundancia entre los elementos de la corteza terrestre. Rara vez se le encuentra en estado puro, de color blanco plateado y brillante, se caracteriza por ser el único metal líquido a temperatura ambiente, lo cual no es buen conductor del calor comparado con otros metales, pero sí es buen conductor de la electricidad. Se combina fácilmente con muchos otros metales como el oro o la plata produciendo amalgamas. Es insoluble en agua pero soluble en ácido nítrico y ácido sulfúrico concentrado. Es incompatible con el acetileno, el amoníaco, el cloro y los metales (Lacerda & Salomons, 2005).

El mercurio en su estado más conocido es bivalente, esto significa que se asocia con sólo dos átomos. Es dañino por inhalación, ingestión y contacto: se trata de un producto muy irritante para la piel, ojos y vías respiratorias (Housecraft y Sharpe, 2006). Si no está encapsulado el mercurio metálico, usualmente a temperaturas por encima de los 40 °C se volatiliza parcialmente formando vapores de mercurio que son incoloros e inodoros, tóxicos y corrosivos, más pesados que el aire. La emanación de vapores de mercurio presenta una relación directamente proporcional con la temperatura, esto es, a mayor temperatura, mayor cantidad de vapores de mercurio emanados (Lacerda & Salomons, 2005). En este sentido, la Tabla No.1 contiene información acerca de las propiedades fisicoquímicas más importantes del mercurio:

PROPIEDAD	DETALLE
Nombre	Mercurio
Nomenclatura	Hg
Número atómico	80
Valencia	1,2
Estado de oxidación	+2
Electronegatividad	1,9
Radio covalente (Å)	1,49
Radio iónico (Å)	1,10
Radio atómico (Å)	1,57
Configuración electrónica	(Xe)4f <sup>14</sup> 5d <sup>10</sup> 6s <sup>2</sup>
Primer potencial de ionización (eV)	10,51
Masa atómica (g/mol)	200,59
Densidad (g/ml)	16,6
Punto de ebullición (°C)	357
Punto de fusión (°C)	-38,4
Sólido (at)	7.640
Dilatación	Uniforme

Fuente: Proske et al, 1960 y Lenntech, 2009

El mercurio puede enlazarse con otros compuestos como mercurio monovalente Hg (I) o divalente Hg (II). A partir del Hg (II) se pueden formar diversos compuestos

orgánicos e inorgánicos de mercurio. Algunos de los compuestos inorgánicos de mercurio son: sulfuro de mercurio (HgS), óxido de mercurio (HgO) y cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) conocidos como sales de mercurio. La mayoría de estos compuestos son polvos o cristales blancos, a excepción del sulfuro de mercurio, que es rojo y se vuelve negro con la exposición a la luz. Algunas sales de mercurio como el HgCl<sub>2</sub> son lo bastante volátiles para existir como gas atmosférico. Sin embargo, la solubilidad en agua y reactividad química de estos gases inorgánicos de mercurio hacen que su degradación en la atmósfera sea mucho más rápida que el mercurio elemental. Esto significa que la vida atmosférica de los gases de mercurio divalentes son mucho más corta en relación al gas de mercurio elemental (Lacerda & Salomons, 2005).

Cuando el mercurio se combina con carbono se forman compuestos conocidos como compuestos "orgánicos" de mercurio u organomercuriales. Existe una gran cantidad de compuestos orgánicos de mercurio como el di-metil-mercurio, fenil-mercurio, etil-mercurio y metil-mercurio que es el más conocido de todos los compuestos orgánicos por ser generado por microorganismos y procesos naturales. El metilmercurio, es un compuesto particularmente inquietante para la comunidad porque puede acumularse en muchos peces de agua dulce y salada, así como en mamíferos marinos comestibles (O'Neill, 2005).

### **13.2.3. Ciclos del mercurio en el medio ambiente**

En su ciclo global, el mercurio pasa de los continentes, por desgasificación a los océanos, gracias a la acción de la lluvia y la esorrentía. El mercurio que llega a los océanos se volatiliza y se puede depositar nuevamente en los continentes por acción de los vientos o en los mismos océanos (Sepúlveda et al, 2006). Por ello, las reacciones de óxido-reducción transforman las sales inorgánicas de mercurio (HgCl<sub>2</sub>, HgO y HgS). El HgS insoluble, al oxidarse se transforma en sulfitos y sulfato de mercurio solubles, que permiten la ionización del metal y su participación en

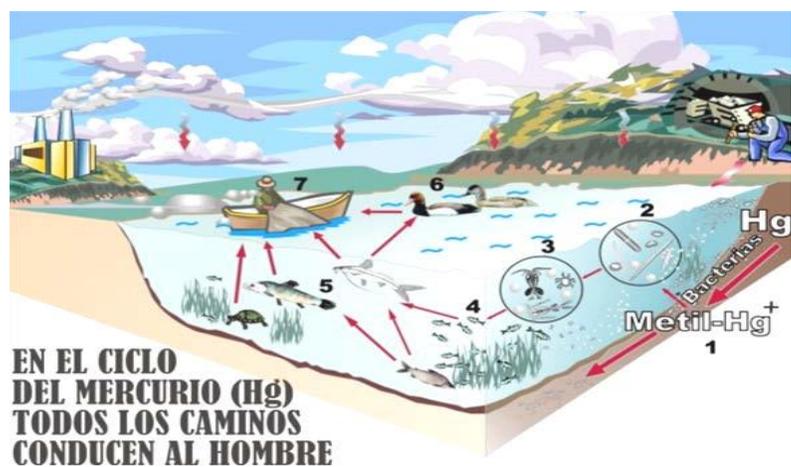
reacciones químicas posteriores. Los vapores de mercurio se oxidan y se transforman en mercurio iónico divalente en presencia de agua y oxígeno.

El mercurio iónico divalente ( $\text{Hg}^{+2}$ ) puede sufrir dos importantes reacciones en el medio. La primera es la reducción a vapor de mercurio metálico en condiciones reductoras apropiadas con ayuda de algunas bacterias del género *Pseudomonas*. Su biotransformación permite que el plancton contaminado con metil-mercurio sirva de alimento para pequeños peces y mariscos que bioacumulan este elemento, los peces de mayor tamaño y los depredadores, que se alimentan de los de menor tamaño, concentran aún más el mercurio en sus tejidos, proceso conocido como biomagnificación. Estos peces pueden ser comidos por animales superiores como aves o mamíferos, incluso el hombre (Valiente, 2005). Este proceso se encuentra evidenciado en el Gráfico 2.

La segunda reacción es la conversión a compuestos de metil y di-metil-mercurio y las interconversiones entre estos compuestos; dichas metilaciones se producen anaeróbica y aeróbicamente. La vía anaeróbica comprende la metilación de mercurio inorgánico por compuestos de metilcobalamina producidos por bacterias metanogénicas en un ambiente moderadamente reductor. En la vía aeróbica, el metil-mercurio unido a la homocisteína, se metila por procesos celulares que, normalmente, dan lugar a la formación de metionina (Sepúlveda et al, 2006).

Gráfica 2. Modelo conceptual del ciclo del mercurio en el medio ambiente

Fuente: Valiente, 2005



#### 13.2.4. Usos industriales del mercurio

El mercurio metálico se utiliza para la fabricación de interruptores eléctricos y conmutadores automáticos para los refrigeradores como material líquido de contacto, como fluido de trabajo en bombas de difusión en técnicas de vacío, en la fabricación de rectificadores de vapor de mercurio, termómetros, barómetros, tacómetros y termostatos. En la manufactura de lámparas de vapor de mercurio y tubos fluorescentes. Se utiliza en la formación de amalgamas de plata y zinc en odontología como empastes de dientes. Se usa como cátodo en la producción electrolítica como electrodos de referencia en la medición de potenciales y en titulaciones potenciométricas (Carrasquero & Adams, 2002).

El  $\text{HgCl}_2$ , precipita proteínas y se usa como conservante de tejidos y catalizador químico. El cloruro mercurioso o calomel se usa en terapéutica dermatológica como mercurio amoniacado antiséptico y antipsoriásico. El óxido rojo de mercurio se emplea en la fabricación de las pinturas anti-incrustantes que se aplican en los cascos de los barcos y como pigmento rojo. Los óxidos sirven tanto para hacer baterías secas de larga duración como para producir antisépticos. Las sales oxomercúricas, como el sulfonato de mercurio, sirven de catalizadores en la síntesis de ácido acético, cloruro de vinilo y metilestireno (Revelle & Revelle, 1984). El nitrato ácido de mercurio (mordiente de piel de conejo para convertirlo en fieltro) para taxidermia y tratamientos especiales de pieles. El fluoruro mercúrico para la fluoración de compuestos orgánicos; las sales en las pinturas protectoras, el tratamiento de la madera y el papel. Las sales mulcionadas son usadas como fármacos dermatológicos tópicos (psoriasis, pigmentaciones y antisépticos). El fulminato de Hg es detonante de cartuchería, fácilmente absorbible y cáustico irritante. El acetato de mercurio (alquil) se usa en el tratamiento de granos y simientes, como plaguicida en árboles frutales y como absorbente del etileno. Los fenilmercúricos se utilizan en agricultura como antisépticos para el tratamiento de

la madera y los granos. El mercurocromo, el mercurófén, el timerfonato sódico y el timerosal son fármacos antisépticos (Sepúlveda et al, 2006).

### **13.2.5. Contaminación provocada por mercurio**

Debido a la toxicidad que presentan los metales pesados es importante mencionar que no se han encontrado métodos de destrucción o degradación, por lo cual estos deben ser dispuestos de una forma tal que sean inmovilizados para minimizar su dispersión y las consecuencias de su contaminación tanto en plantas, agua, aire, suelo, animales y el hombre (Sepúlveda & Velasco, 2002). El factor a tener en cuenta ante un posible contaminante es su bioacumulación, ya que cuando este tipo de sustancias penetran en los seres vivos no son metabolizadas (Colombo et al, 2008). La contaminación existente provocada por la presencia de mercurio en el medioambiente es una aflicción mundial. En el planeta la concentración de mercurio siempre ha sido la misma, así como con el resto de los elementos químicos naturales, pero la contaminación surge de la mayor movilización que el mercurio sufre desde el comienzo de la era industrial (Sánchez, 2005).

Las actividades industriales que hoy por hoy continúan liberando al ambiente contaminantes mercuriales son, la obtención de oro y plata a partir de minerales por medio de la formación de amalgamas mercuriales; baterías; incineradores de residuos domiciliarios; hospitalarios e industriales; la fabricación de termómetros; barómetros y de contadores directos de corriente eléctrica; lámparas eléctricas y válvulas de radio; la producción de hilo y varillas de tungsteno-molibdeno; la fabricación de compuestos farmacéuticos e instrumentos quirúrgicos que contienen sales de mercurio; la tinción de cristales ópticos y grabados fotográficos; el encurtido del cuero y la manufactura de sombreros de fieltro; la identificación de huellas dactilares mediante el empleo de un polvo de mercurio y yeso y el relleno de cavidades dentarias con amalgamas (Valiente, 2005).

En la Tabla 2, se pueden apreciar los porcentajes de consumo promedio de mercurio en el grupo de países llamados industrializados en América, países denominados desarrollados o industrializados según la ONU los cuales son: Canadá, Estados Unidos y Barbados. De alguna manera, estos países denotan la dimensión de los riesgos, de acuerdo con cada quehacer industrial (Lacerda & Salomons, 2005):

Tabla No. 2 Consumo de mercurio en países industrializados

ACTIVIDAD INDUSTRIAL	CONSUMO DE MERCURIO
Plantas de compuestos cloro-alcalis	25%
Equipo eléctrico	20%
Usos militares	20%
Pintura	15%
Sistemas de medición y control	10%
Agricultura	5%
Odontología	3%
Laboratorios	2%

Fuente: Manuhan, 2002 y Sepúlveda *et al*, 2006.

El envenenamiento agudo por mercurio se caracteriza por trastornos de la función intestinal y renal, y por alteraciones del sistema nervioso central. Las exposiciones leves están caracterizadas por pérdida de la memoria, temblores, inestabilidad emocional (angustia e irritabilidad), insomnio e inapetencia. A exposiciones moderadas, se observan desórdenes mentales más importantes y perturbaciones motoras. Las exposiciones breves a altos niveles de vapor de mercurio pueden producir daños pulmonares y la muerte (Valiente, 2005).

### **13.2.6. Límites de exposición permisibles de mercurio**

Los límites permisibles para el mercurio son según TLV (valores límite umbral) en Hg<sup>0</sup> de 0.05 mg/m<sup>3</sup>. En TWA (media ponderada en el tiempo) 0.01 mg/m<sup>3</sup>. En STEL

(Límite de exposición a corto plazo)  $0.03 \text{ mg/m}^3$ . En el caso de vapor de mercurio, su exposición máxima debe ser de  $0.05 \text{ mg/m}^3$  según la TWA. La FDA de los Estados Unidos, fijó un máximo permisible de 0.5 ppm en los alimentos; la OMS en 1971 fijó para la ingesta semanal 0.3 mg de Hg metálico y 0.2 mg de metilmercurio; y en España el límite permisible para alimentos es de 1 mg/L (Lacerda & Salomons, 2005).

### **13.2.7. Intoxicación por mercurio**

#### **13.2.7.1. Características del mercurio y toxicocinética**

Los pacientes pueden sufrir intoxicación por cualquier tipo de mercurio, sin embargo, es importante considerar que este metal puede pasar de un estado a otro, es decir, de su estado inorgánico pasar al orgánico por un ciclo global, bien conocido: el mercurio elemental se evapora y las corrientes de aire lo transportan hacia los océanos, donde se precipita, puede cambiar su forma por el metabolismo microbiano y convertirse en metilmercurio que tiene la capacidad de acumularse en los organismos (bioacumulación) y concentrarse en las cadenas tróficas (biomagnificación).

#### **13.2.7.2. El mercurio elemental**

Es la más volátil de las formas inorgánicas. La exposición a sus vapores se produce en el medio ocupacional y es conocida desde la antigüedad. En la minería se utiliza en la extracción y purificación del oro, mediante un proceso denominado amalgamación, en donde se agrega mercurio metálico al material extraído de la mina para obtener una amalgama con el oro, que posteriormente se somete a fundición liberando vapores de mercurio que impregnan el aire; adicionalmente, dicha amalgama es refundida en las tiendas que compran oro, un estimado del consumo de mercurio en este proceso es de aproximadamente 1.32 kg de mercurio por 1 kg de oro producido; el mercurio sobrante es arrojado a las fuentes

de agua y sus ecosistemas (sufriendo procesos de biotransformación). Usualmente no se toman medidas de protección en la minería artesanal. Como resultado de esto, los trabajadores tienen una exposición ocupacional directa e indirecta a través de las aguas y los alimentos contaminados.

#### **13.2.7.3. Las sales de mercurio inorgánico**

Existen en dos estados de oxidación, como sales mercuriosas monovalentes, o como sales mercúricas divalentes. Los usos del mercurio inorgánico incluyen la producción de piezas electrónicas, la elaboración de plásticos, tinturas, curtimbres, explosivos, fungicidas y germicidas, entre otros. La descarga a los ríos de los desechos industriales procedentes de estas actividades, ha introducido el mercurio en el ambiente en diversas zonas del mundo.

#### **13.2.7.4. El mercurio orgánico**

Se utiliza en diversas ocupaciones tales como en la fabricación de medicamentos (timerosal), fungicidas, preservativos de madera, entre otros. Como el mercurio tiene diferentes formas, inorgánica y orgánica, la toxicocinética varía dependiendo de la presentación como se describe a continuación:

**Absorción:** la respiratoria es la vía más importante para el ingreso del mercurio metálico (especialmente de origen ocupacional); se calcula que el 80% de los vapores inhalados se absorben desde el alveolo. La vía digestiva es poco importante para el mercurio elemental, sin embargo, para los derivados orgánicos como el metilmercurio es de un 95%; aproximadamente el 10% de las sales de mercurio se absorben luego de la disociación de las formas divalentes como el cloruro de mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) y para las formas monovalentes se absorban (como el calomel cuya fórmula es  $\text{HgCl}$ ), se requiere su oxidación a formas divalentes.

La absorción por vía cutánea está dada principalmente por el contacto con los derivados órgano-mercuriales; sin embargo, algunos polvos y ungüentos

contienen HgCl (sal inorgánica) y su absorción variara de acuerdo con la concentración del metal, la integridad de la piel y la liposolubilidad del vehículo.

**Distribución:** luego de su absorción, el 90% de los compuestos orgánicos se transporta en eritrocitos unidos a la hemoglobina y el 50% del inorgánico se transporta en el plasma unido a la albúmina. El mercurio se distribuye ampliamente en todos los tejidos, predominantemente en los riñones, hígado, bazo y sistema nervioso central (SNC). El patrón de distribución al SNC del mercurio elemental y orgánico difiere de las sales inorgánicas debido a que estas últimas son menos liposolubles. En el cerebro, el mercurio elemental y el orgánico se acumulan principalmente en la materia gris (corteza occipital y parietal), núcleos del tálamo y cerebelo; el mercurio divalente  $Hg^{2+}$  (inorgánico) se deposita principalmente en el epitelio del túbulo proximal y en el hígado. El mercurio se deposita en el cabello y las uñas, encontrándose concentraciones del mercurio orgánico aproximadamente 250 veces la encontrada en sangre total. El metil y el etilmercurio atraviesan con facilidad la barrera placentaria y se acumulan en el feto; además se han encontrado compuestos mercuriales en la leche de mujeres expuestas y en la sangre de los recién nacidos.

**Metabolismo:** el mercurio sufre varias biotransformaciones en el organismo. El elemental ( $Hg^0$ ) entra fácilmente al SNC y se convierte en los cationes mercúricos ( $Hg^{2+}$ ) por la enzima hidrogeno peróxido catalasa; esta transformación hace que se disminuya la liposolubilidad del vapor de mercurio y sufra una acumulación en SNC. El mercurio elemental también puede sufrir metilación por un proceso poco conocido, pero un 0.05%-0.26% del mercurio administrado, se convierte en metilmercurio. A la inversa, y en menor extensión, los iones mercúricos pueden ser reducidos al estado elemental, aunque el sitio, por mecanismos poco claros.

**Eliminación:** el mercurio absorbido se excreta por diferentes vías dependiendo del tipo de presentación. El mercurio elemental y las sales de mercurio se excretan principalmente por vía renal a través de unas proteínas de membrana que se

utilizan para secretar ácidos orgánicos; la excreción del mercurio orgánico es principalmente fecal. La vida media del metal depende también de la forma del mercurio, como describe en la tabla siguiente:

**Vida media biológica de las diferentes formas de mercurio**

<b>Forma del mercurio</b>	<b>Vida media biológica organismo en conjunto</b>	<b>Vida media biológica en órganos y tejidos</b>
<i>Mercurio metálico y sales inorgánicas.</i>	35 a 90 días Media: 60	Pulmón: 1.7 días Riñón: 64 días Cerebro menor a un año
<i>Metilmercurio</i>	110 a 190 días Media: 120 días	Sangre: 70 días Cerebro: 120 días

**Fuente: (Peña, 2010)**

### **13.2.7.5. Fisiopatología**

El mercurio bajo su forma ionizada se fija a los sustituyentes orgánicos celulares ricos en grupos sulfidrilo (-SH); la unión es covalente con el azufre que se halla en forma de grupo sulfidrilo. El mercurio divalente reemplaza al hidrogeno, formando mercaptanos del tipo X-Hg-SR y Hg (SR)<sub>2</sub>, donde X es un radical electronegativo y R una proteína. El mercurio es capaz de unirse también con grupos fosforilos, carboxilo, amida y amina, afectando así diversos sistemas. Su acción toxica se centra en la inhibición de diversas enzimas claves para el funcionamiento del organismo pero dicho efecto no se reduce a estos cambios, si no que puede generar precipitación de proteínas sintetizadas por las neuronas, disminuye la producción energética celular y la actividad mitocondrial por disfunción enzimática. El mercurio también perturba los sistemas de transporte de potasio y la ATP-asa de membrana. Disminuye el transporte activo de azucars, aminoácidos y precursores de ácidos nucleicos. También se le ha atribuido un mecanismo inmune a algunas manifestaciones de la toxicidad por mercurio tales como la acrodinia y la glomerulonefritis. Aunque el mercurio se puede depositar en todos los tejidos, las células más sensibles son las neuronas del cerebro y cerebello.

### **13.2.7.6. Manifestaciones clínicas**

La toxicidad depende de la forma química cantidad, vía de exposición y vulnerabilidad de la persona expuesta. Los efectos tóxicos se pueden presentar en cualquier sistema del organismo especialmente en el sistema nervioso central.

#### **Intoxicación aguda**

Es poco frecuente en el medio industrial, salvo accidentes. Se da luego de la exposición inhalatoria a vapores de mercurio elemental. Inicialmente hay un compromiso pulmonar con dolor torácico, tos, neumonitis, bronquitis, bronquiolitis, se pueden desarrollar complicaciones como neumonía, edema pulmonar, y aun falla respiratoria. También existe compromiso digestivo con dolor abdominal, náuseas, vómito, diarrea y gingivitis.

La toxicidad aguda también puede deberse a la ingestión de derivados inorgánicos, que produce rápidamente un cuadro de gastroenteritis aguda por la acción corrosiva sobre la mucosa del aparato digestivo, cursando con dolor retroesternal y epigástrico, disfagia, vómito, diarrea, deshidratación y sangrado del tracto digestivo. Al segundo o tercer día puede aparecer estomatitis con sialorrea, tumefacción gingival, halitosis, sabor metálico y úlceras sangrantes. En vista del efecto corrosivo que pueden tener las sales inorgánicas en el tracto gastrointestinal, puede alterarse la barrera y aumentar la absorción del metal, produciendo consecuentemente una última fase, consistente en insuficiencia renal anúrica por necrosis tubular necrótica con intensa uremia.

#### **Intoxicación crónica por mercurio elemental**

La exposición a los vapores, es la forma más frecuente de intoxicación por mercurio elemental en el medio laboral tanto en la minería como en la industria y constituye el denominado "hidrargirismo". Produce las siguientes alteraciones:

**Sistema nervioso central:** en una primera fase aparecen trastornos psíquicos como irritabilidad, tristeza, ansiedad, insomnio, temor, pérdida de memoria, excesiva timidez, labilidad emocional, hiperexcitabilidad o depresión, a todo este conjunto de síntomas se ha denominado “eretismo mercurial”. El gran síntoma del hidrargirismo es el temblor, el cual tiene características típicas de origen cerebeloso, dificultando los movimientos que exigen precisión y puede hacerse objetivo mediante diversas pruebas como el trazado de líneas curvas y rectas, y la prueba de escritura, que pueden poner en manifiesto la evolución de la enfermedad o la eficacia del tratamiento o generalmente inicia en la lengua, labio parpados y dedos de las manos al comienzo en forma de temblor fino, que se extiende a las manos, y al aumentar la intensidad, tiende a ser intencional, lo que le diferencia de la enfermedad de Parkinson.

#### **13.2.7.7. Diagnóstico**

El diagnóstico de la intoxicación se hace por una combinación de criterios clínicos, historia de exposición y concentraciones en líquidos biológicos. Es importante tener en cuenta la complejidad de la cinética del mercurio, ya que en ocasiones se observan personas con un cuadro clínico florido y valores de laboratorio normales y personas con niveles altos de Hg en orina y asintomáticos.

El mercurio puede detectarse en muestras biológicas, tales como la orina, sangre, cabello y uñas. Se sugiere la toma de una muestra de orina de 24 horas que debe recolectarse en un recipiente plástico previamente tratado con ácido nítrico al 10%. Según parámetros internacionales, se considera intoxicado aquel individuo que tenga concentraciones de mercurio en orina de 24 horas mayores de 35µg/L o 35µg/gr de creatinina y en sangre, valores mayores de 15µg/L en aquellos casos de exposición a mercurio elemental o sales inorgánicas al final de la jornada laboral. Para aquellos casos de intoxicación por mercurio orgánico, la muestra de orina no es ideal, ya que, como se mencionó antes su excreción es principalmente

fecal, por tanto se prefiere la toma de muestras sanguíneas para su determinación (Peña, 2010).

### **13.3. Técnicas de detección de los niveles de contaminación**

Para detectar y medir la concentración de mercurio en los diferentes estratos de la biosfera se utilizan muchas técnicas, entre las cuales se destacan; el método colorimétrico de la ditizona, el fotómetro para luz ultravioleta, la absorvimetría atómica, el método de espectrofotometría de absorción atómica sin llama y el detector de gases (Sepúlveda & Velasco, 2002).

### **13.4. Generalidades de la espectroscopía de absorción atómica (AAS).**

#### **Principios y usos**

Los métodos analíticos espectroscópicos se fundamentan en medir la cantidad de radiación que producen o absorben las especies moleculares o atómicas de interés. Es posible clasificar los métodos espectroscópicos según la región del espectro electromagnético utilizado para la medida. Las regiones del espectro que se han utilizado abarcan los rayos gama, rayos X, radiación ultravioleta (UV), radiación infrarroja (IR), microondas y radiofrecuencias (RF). La espectroscopía, es conocida como la ciencia que establece las interacciones de la radiación electromagnética absorbida, dispersada o emitida por átomos, moléculas u otras especies químicas (Skoog *et al*, 2005).

Dado que cada especie posee estados energéticos característicos, la espectroscopía puede utilizarse para identificarlas y cuantificarlas. Constituye la base del análisis espectroquímico, donde la interacción de la radiación electromagnética con la materia genera información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición de una muestra. Dentro del análisis espectroquímico, la espectroscopía atómica estudia la absorción y emisión de la radiación por especies atómicas, las cuales son generadas y examinadas en un medio gaseoso de alta energía, que constituye una fuente de vaporización-atomización-ionización-

excitación, la atomización en particular se logra únicamente a altas temperaturas, salvo el caso del mercurio que presenta presión de vapor favorable a temperatura ambiente. (Rouessac & Rouessac, 2007).

La espectroscopía atómica se usa ampliamente para analizar átomos metálicos en cantidades traza (ppm, ppb) en minerales, muestras biológicas, metalúrgicas, farmacéuticas, aguas, alimentos, suelos y sedimentos. En el Gráfico 3, se muestra un esquema típico del equipo de absorción atómica que consiste en: una lámpara de cátodo hueco, una lámpara de deuterio para corrección de lectura por absorción no atómica, un modulador o detector, un atomizador, un monocromador y un transductor o amplificador (Manosalvas, 2005; Harris, 2007).

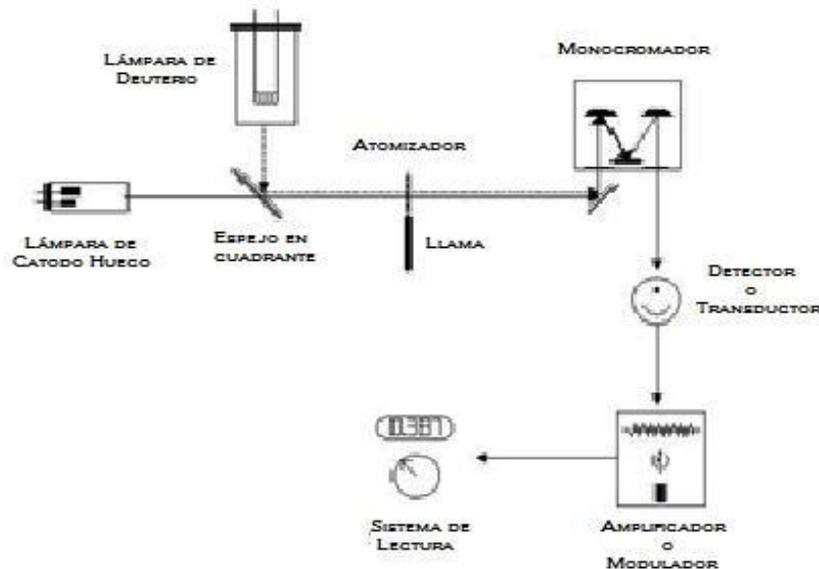


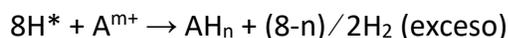
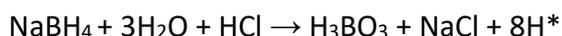
Gráfico 2.3 Esquema de equipo de absorción atómica Fuente: Castro, 2000.

#### 13.4.1. Técnica de Atomización con generación de vapor frío.

La técnica de atomización por vapor frío, es aplicable solo a la determinación de Hg por ser el único metal que tiene una adecuada presión de vapor a temperatura ambiente, por ello no es necesario entregarle la energía de una llama a la muestra de análisis (Antuña, 2007). Se convierte todo el mercurio de la muestra en Hg (II) y posteriormente se reduce a Hg<sup>0</sup> por adición de cloruro de estaño (SnCl<sub>2</sub>) o

borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ) que actúan como agente reductor. El mercurio volátil es acarreado por un gas inerte ( $\text{Ar}$  o  $\text{N}_2$ ) a una celda de cuarzo interpuesta sobre el paso óptico. Dependiendo de la cantidad de Hg que posea la muestra de análisis, este se abre camino, con la ayuda del gas de arrastre hasta llegar a la celda, absorbiendo la energía proveniente de la lámpara y traduciéndose en señal de absorbancia como muestra el Gráfico 4 (Harvey, 2002).

La técnica de generación de vapor frío a través de espectroscopía de absorción atómica consta de tres etapas fundamentales que son: la generación y volatilización del hidruro, la transferencia del mismo y su posterior atomización en el espectrómetro de absorción atómica. La reacción generada por el borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ ), el ácido clorhídrico ( $\text{HCl}$ ), y la muestra de análisis es conducida a través del equipo de generación hacia el espectrómetro de absorción atómica por medio del efecto del flujo del gas de arrastre ( $\text{Ar}$  o  $\text{N}_2$ ), del cual se obtiene:



Donde  $\text{H}^*$  es el hidrógeno nascente; “A” es el elemento formador de hidruro y “m” su estado de oxidación (que puede no coincidir con “n”, el índice de coordinación) (Skoog *et al*, 2005).

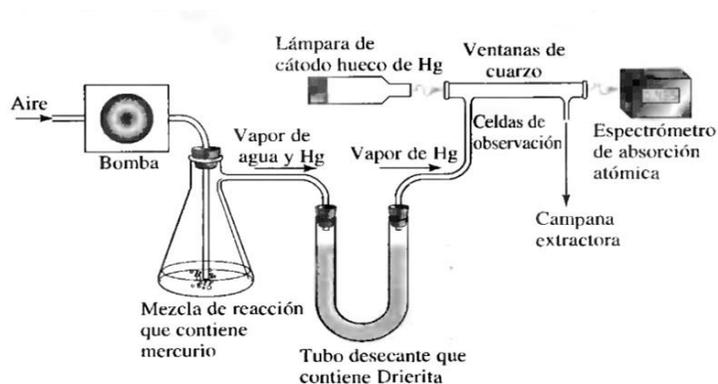


Gráfico 4 Esquema del proceso de determinación de mercurio por generación de vapor frío Fuente: Skoog *et al*, 2005

### 13.4.2. Métodos de cuantificación

La cuantificación se basa en la ley de Lambert-Beer, que expresa lo siguiente: cuando un haz de luz de una longitud específica pasa a través de una sustancia, cierta cantidad de radiación es absorbida por la sustancia y otra porción se transmite a través de ésta. La cantidad de energía absorbida, depende de la concentración de sustancia y del trayecto óptico que recorre el haz de luz. La transmitancia (T) de la solución, es la fracción de radiación incidente transmitida por la solución, que se representa en la ecuación 1. (Harris, 2007).

$$T = I / I^{\circ} \quad (1)$$

En donde:

T= transmitancia

I = radiación transmitida

I<sup>o</sup> = radiación incidente

La absorbancia es el logaritmo negativo de la transmitancia, que se exhibe en la ecuación 2.

$$ABS = - \log T \quad (2)$$

En la ecuación 3 se demuestra que la absorbancia, es directamente proporcional a la longitud de la trayectoria de la radiación (*b*) y concentración de la sustancia absorbente (*c*). Donde (*a*) es una constante de proporcionalidad, cuyo nombre está dado por las unidades en que esta constante esté expresada. Si sus unidades son litro g<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> se llama coeficiente de absorción, y si son litro mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> se llama absorptividad molar (Harris, 2007).

$$ABS = a * b * c \quad (3)$$

La cuantificación se puede llevar a cabo mediante una serie de métodos entre los que se puede citar la construcción de curvas de calibración y el método de adiciones. El análisis mediante curvas de calibración se hace elaborando una gráfica de la absorbancia versus la concentración, midiendo la absorbancia de

varios patrones de distintas concentraciones, con lo cual se obtiene una línea recta que pasa por el origen. La pendiente de esta recta estará dada por el coeficiente de absorción ( $a$ ) y el trayecto óptico ( $b$ ), por lo tanto a medida que aumenta la concentración ( $c$ ), aumenta la absorbancia de la muestra (Harvey, 2002).

### **13.4.3. Interferencias analíticas**

En ciertas determinaciones se pueden presentar problemas en el análisis, estos pueden ser resueltos en dependencia de la experiencia y conocimientos que tenga el analista, sobre la metodología a utilizar. En espectrofotometría existen ciertas interferencias analíticas las cuales pueden producir errores en la cuantificación, pero pueden ser corregidas según su origen. Las interferencias pueden ser de varios tipos: espectrales, químicas, por ionización y de matriz (Harvey, 2002).

Las interferencias se producen cuando otro átomo distinto al analito absorbe una longitud de onda con una diferencia de 1nm. Estas interferencias están íntimamente relacionadas con el poder de resolución del monocromador, y puede ser minimizada por modulación de la amplitud de la fuente de radiación (Haswell, 1991).

Estas son más comunes que las interferencias espectrales, pueden ser minimizadas si se escogen las condiciones de trabajo adecuadas (Harvey, 2002). Existen algunos compuestos que son difíciles de disociar, esto significa que no se los puede atomizar con facilidad. El uso de llamas de distintas temperaturas o el uso de agentes liberadores como el EDTA, son formas de corregir estas interferencias (Haswell, 1991).

Las interferencias por ionización se presentan en llamas muy calientes. A temperaturas elevadas de la flama y del horno, los átomos con bajos potenciales de ionización son efectivamente ionizados. Cualquier ionización reduce la población de los átomos libres tanto en el estado basal como en el estado excitado, disminuyendo entonces la sensibilidad de la determinación (Skoog & West, 2001).

Este problema se resuelve rápidamente añadiendo un exceso (aproximadamente de 100 veces) de un elemento más fácilmente ionizable, como K, Cs o Sr, para inhibir la ionización tanto en las soluciones de la muestra como en las de calibración. También puede ser eliminada al controlar las condiciones de análisis, como la temperatura de llama y flujo de los gases (Haswell, 1991).

Finalmente, las interferencias de matriz, se registran, debido a que cada matriz líquida de una muestra tiene distinta composición, por lo tanto, la tensión superficial y la viscosidad serán diferentes, estas características pueden afectar el proceso de nebulización y posteriormente la cuantificación del analito (Harvey, 2002). El principal problema, es que la velocidad de aspiración de la muestra difiera a la velocidad de aspiración del estándar. Si estas características no se controlan de modo que no cambien durante el análisis, la cantidad de átomos en la llama en un momento dado puede variar y dar lecturas incorrectas. Para evitar este tipo de interferencia hay que tener una composición igual entre las muestras y los patrones, de modo que estos ingresen y se nebulicen de la misma forma (Haswell, 1991).

### **13.5. Proceso de validación de métodos analíticos**

La validación de métodos, es una de las medidas universalmente reconocidas como parte necesaria de todo sistema completo de garantía de calidad en la química analítica. Es la confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva que revele el cumplimiento de requisitos para una utilización o aplicación específica de un método de análisis previsto. En el pasado, ISO, IUPAC y AOAC INTERNATIONAL han cooperado para elaborar protocolos o directivas comunes sobre la realización e interpretación de estudios de la eficiencia de métodos analíticos, sobre ensayos de aptitud, sobre control interno de calidad en laboratorios de química analítica, y sobre el uso de datos de recuperación en las mediciones analíticas. La IUPAC, se ha encargado ahora de elaborar protocolos para establecer directrices de validación de métodos de análisis en un solo laboratorio. Dichas directrices ofrecen

recomendaciones mínimas sobre los procedimientos que deben seguirse para garantizar una validación adecuada de los métodos analíticos (Castellucci, 2005).

La validación es necesaria porque proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados lo cual permite un conocimiento profundo de sus características de funcionamiento. Los métodos analíticos deben ser validados para cumplir con las exigencias legales requeridas por organismos de acreditación (FDA, 2000).

La validación se aplica a un protocolo definido para determinar un analito específico y el rango de concentraciones en un tipo de material de prueba particular utilizado para un propósito específico. En general, la validación debe comprobar que el método se comporte de forma adecuada para la finalidad perseguida en todo el conjunto de concentraciones del analito y de materiales de referencia a los que se aplica. Por consiguiente, estas características y los criterios de adecuación al propósito, deben especificarse en su totalidad antes de realizarse la validación (Castellucci, 2005).

#### **13.5.1. Requerimientos para la validación de métodos**

La autora coincide con el criterio que para validar un método analítico se requiere de ciertas normas, que incluyen buena organización funcional, el suficiente número de analistas capacitados, instalaciones adecuadamente abastecidas con equipos y aparatos apropiados, calificados y en buen estado de funcionamiento para el desarrollo de los procesos analíticos, métodos escritos disponibles, actualizados y certificados, procedimientos adecuados para toma de muestras, utilización de reactivos correctos y soluciones valoradas idóneas, así como material auxiliar pertinente y en perfectas condiciones de uso, utilización de patrones y muestras de referencia, verificación y supervisión de los resultados obtenidos de cada análisis y que los registros de dichos análisis efectuados sean auditables, proporcionar una correcta información y comunicación de los resultados

obtenidos, higiene limpieza y seguridad, control y seguimiento de calidad mediante inspecciones y auditorías internas con personal de la propia sección de trabajo (Norma INEN ISO/IEC 17025, 2005).

El laboratorio, debe utilizar los métodos de ensayo o de calibración que satisfagan las necesidades del cliente y que sean apropiados para los ensayos o calibraciones que se realizan. Es necesario elaborar un procedimiento que especifique las acciones a realizarse, y todo lo relativo al ensayo, condiciones ambientales, equipo pertinente, reactivos, manipulación, preparación de estándares, material de referencia, muestras de análisis y cálculos (Norma INEN ISO/IEC 17025, 2005).

La normalización de métodos es una actividad previa a la validación, para obtener un conocimiento general del método de ensayo; se aplican los pasos para poner el método en funcionamiento de forma razonable y consistente, si no se logran satisfacer los criterios en esta etapa, se puede corregir y hacer ajustes (FDA, 2000).

Los parámetros de validación deben ser entendidos antes de la ejecución de la misma; si el método es oficial o ya tiene parámetros estadísticos, debe ser verificado en condiciones de laboratorio.

En la Tabla 3, se enuncian las medidas que un método analítico debe seguir para poder ser validado.

Tabla No.3 Parámetros de Validación de un Método Analítico

PARÁMETRO	DEFINICIÓN
<b>Selectividad / Especificidad</b>	Capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente un analito sin interferencias.
<b>Linealidad</b>	<p>Función de respuesta instrumental conocida como recta de calibrado:</p> $y = a+bx$ <p>Donde "y" es la linealidad</p> <p>Que es la proporcionalidad entre concentración de analito y el sistema de respuesta.</p>
<b>Sensibilidad</b>	Considerada como la pendiente de la curva, es la capacidad de un método analítico de registrar ligeras variaciones de la concentración.
<b>Precisión</b>	<p>Repetibilidad: Precisión de un análisis donde la única fuente de variación es el análisis de muestras repetidas.</p> <p>Reproducibilidad: Precisión obtenida cuando se comparan los resultados de distintas muestras, análisis o métodos.</p>
<b>Límite de Cuantificación</b>	Es la más baja concentración del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión, repetibilidad y exactitud exigida por la norma o cliente.
<b>Límite de Detección</b>	<p>Mínima concentración de analito que puede detectarse pero no necesariamente cuantificarse.</p> <p>Es determinado comparando los valores obtenidos con los valores definidos como teóricos.</p>
<b>Exactitud</b>	$\% \text{ Recuperación} = \frac{X_{\text{obtenido}}}{X_{\text{teórico}}} \cdot 100$
<b>Intervalo o Rango de Trabajo</b>	Está comprendido entre el límite de cuantificación y el valor del mayor patrón usado.
<b>Incertidumbre</b>	Gama de valores posibles que es razonable esperar de una medida o resultado; abarca todos los errores, tanto sistemáticos como aleatorios.

Fuente: Harvey, 2002 y Winefordner, 2003.

### **13.5.2. Estimación de los criterios de aceptación**

Los requisitos pueden ser establecidos por la demanda que ha originado la necesidad analítica de determinar límites de cuantificación, exactitud y precisión. Si no se dispone de requisitos regulados, la fuente de información es bibliográfica o por la experiencia adquirida durante la normalización del método (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2002).

La obtención de la función de respuesta instrumental, puede realizarse con seis niveles de concentración (5 patrones más un blanco), cinco veces en condiciones de repetibilidad. Para la determinación de la exactitud (recuperación) de materiales de referencia, mediante tres niveles, con cinco repeticiones. El procesamiento de las muestras se realiza en condiciones de repetibilidad y aplicando el método completo. En el tratamiento estadístico se realiza el análisis de varianza simple de los resultados obtenidos para el cálculo de la precisión por niveles, además de los límites de detección y cuantificación, el intervalo de trabajo y la incertidumbre asociada a cada nivel (Norma INEN ISO/IEC 17025, 2005).

### **13.5.3. Exigencias para la elaboración de informes de resultados**

Mediante un informe de ensayo validado que resuma los parámetros determinados, se deben recopilar las características del método. Todos los datos obtenidos de la realización deben ser perfectamente auditables en los diarios de laboratorio u hojas de trabajo. Los informes técnicos emitidos deben incluir las referencias de la calibración y cualificación de los instrumentos utilizados, y los resultados de la verificación de los parámetros de idoneidad, antes de iniciar el estudio de la validación.

En tal sentido, se debe describir el procedimiento del método utilizado, además, se entregan los resultados de cada parámetro incluyendo esquemas, copias originales de espectros, curvas de calibración, etc. Un certificado de validación

deberá ser firmado por las personas responsables, e incluye un resumen del protocolo y de los resultados obtenidos o bien anexarse al final del informe. Finalmente, los documentos referentes a la validación se deben archivar adecuadamente durante todo el tiempo de vigencia del método analítico validado (Harvey, 2002; Norma INEN ISO/IEC 17025, 2005).

#### **13.5.4. Alcance de los estudios de validación**

El alcance de la validación de un método nuevo, modificado o desconocido depende del estatus del método y de la competencia del laboratorio encargado de llevarla a cabo (Castellucci, 2005). Mediante un ensayo colectivo, el laboratorio debe comprobar si es capaz de alcanzar su rendimiento publicado o si es capaz de cumplir los requisitos de las tareas analíticas.

El laboratorio debe realizar estudios de la fidelidad, del sesgo (incluidos estudios de variación de la matriz) y posiblemente estudios de la linealidad, aunque puede omitir algunas pruebas, como por ejemplo la de robustez (Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, 2002). En el laboratorio, es necesario utilizar un método validado, pero con una nueva matriz, en un ensayo colectivo que debe ser comprobado. Se contrasta el mismo rango de validación con la aplicación de un método empírico. Es decir, la cantidad estimada es simplemente el resultado hallado tras aplicar el procedimiento. Esto difiere de las mediciones que valoran cantidades independientes del método, como la concentración de un analito particular en una muestra, en las que el sesgo del método es convencionalmente cero y la variación de la matriz es irrelevante (Winefordner, 2003).

### 13.5.5. Aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo y de calibración

Los documentos emitidos son una parte esencial de la validación ya que intervienen en todo el proceso. Consiste en un plan práctico diseñado para el desarrollo de la validación tanto en la parte experimental como en los cálculos de la misma. En la Tabla 2.4, se presenta el esquema de un protocolo de validación (Winefordner, 2003; Norma INEN ISO/IEC 17025, 2005):

Tabla No.4 Fases de Validación de Métodos Analíticos

ITEMS	DEFINICIÓN
<b>Objetivo</b>	Exposición clara de la finalidad de la validación y propuesta de fechas de inicio y final.
<b>Responsables</b>	Personas que llevarán a cabo la validación y quienes aprobarán.
<b>Factores críticos</b>	Se identificarán los factores de mayor influencia sobre las características de funcionamiento del método analítico.
<b>Parámetros a estudiar</b>	Se seleccionan en función de las características de la muestra, tipo de método analítico y rango de concentración del analito.
<b>Muestras</b>	Se realizará de acuerdo con los procedimientos escritos que indican también los sistemas de rotulación y tratamiento previo de las muestras.
<b>Equipos</b>	Se han de identificar los aparatos a utilizar en el proceso de validación, y comprobar que están convenientemente cualificados, incluyendo estos datos en el informe de validación.
<b>Métodos analíticos</b>	Existirán métodos escritos provisionalmente describiendo el procedimiento para la determinación de parámetros a evaluar, con indicación de reactivos, patrones, materiales, técnicas y cálculos.
<b>Límites de aceptación</b>	Se establecerán a priori para cada uno de los parámetros, basándose en las necesidades o finalidad del método y en la información recogida durante la fase de desarrollo del procedimiento analítico.

Fuente: FDA, 2000.



Victor Hugo Soto Gramajo

Autor



MSc. Carolina Guzmán Quilo

Asesora

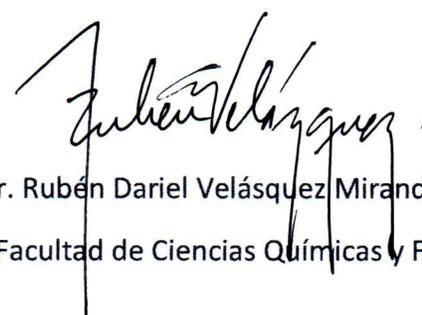


MA. Aylín Santizo Juárez

Revisora



MA. Raquel Azucena Pérez Obregón  
Directora de la Escuela de Química Farmacéutica



Dr. Rubén Dariel Velásquez Miranda  
Decano Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia