



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

INDICE

1) RESUMEN	1
2) ABSTRACT	2
3) INTRODUCCIÓN	3
3.1) Mercurio	3
3.1.1) Emisión:	3
3.1.2) Exposición:	4
3.1.3) Efectos:	4
3.1.4) Bioacumulación:	4
3.1.5) Enfermedad de Minamata	5
3.2) Niveles de mercurio en productos marinos	6
3.3) Grupos de riesgo	7
3.4) España	8
3.4.1) Niveles de mercurio En España	8
3.4.2) Consumo de pescado	9
3.4.3) Alarma social	10
4) Justificación	11
5) Objetivos	13
6) Metodología	13
6.1) Selección de las especies a analizar	13
6.2) Liofilización	14
6.3) Hydra II_C	15
6.4) Medición mercurio	17
6.4.1) Curva patrón	17
6.4.2) Validación del método	20
6.4.3) Análisis muestras	21
7) Resultados y discusión	23
7.1) Algas	24
7.1.1) Alga Lechuga	24
7.1.2) Alga Espaguete	24
7.1.3) Alga Kombu	24
7.1.4) Discusión	24
7.2) Moluscos	25
7.2.1) Chirla	25
7.2.2) Almeja	26

7.2.3)	Ostra	26
7.2.4)	Discusión.....	26
7.3)	Peces	27
7.3.1)	Salmon.....	27
7.3.2)	Trucha	28
7.3.3)	Caballa.....	28
7.3.4)	Panga.....	28
7.3.5)	Rape.....	29
7.3.6)	Atún de ojo grande	29
7.3.7)	Bonito	29
7.3.8)	Pez espada	30
8)	Conclusiones	31
9)	Valoración personal	32
10)	Bibliografía	33
11)	Anexos	35

1) RESUMEN

España es un país con dieta mediterránea. En este tipo de dieta hay un gran consumo de pescados, de derivados de los mismos y de diferentes productos de origen marino. El consumo abundante de estos productos puede producir la bioacumulación de diferentes metales pesados (mercurio, cadmio, plomo...) en el organismo. En nuestro caso estudiaremos el mercurio.

Este ciclo empieza en los organismos más pequeños que incorporan metilmercurio (derivado del mercurio) a su organismo al no poder excretarse, dado que el metilmercurio es liposoluble y se queda retenido en la grasa. Según se escala en la cadena trófica, los peces que se encuentran son cada vez más grandes, por lo cual ingerirán más peces pequeños, lo que hará que se deposite una mayor cantidad de metilmercurio en su organismo. Este problema alcanza su mayor gravedad en las personas que tienen un consumo excesivo de las especies más grandes, como el pez espada o el atún rojo.

Para poder hacer un correcto análisis de este peligro se ha realizado un estudio previo, pues la zona de la que proviene el producto puede incidir en los resultados, así como las especies elegidas por lo anteriormente mencionado. Es crucial conocer la cantidad de mercurio presente en el producto final que va a estar disponible para el consumidor, para evitar la aparición de los problemas derivados de la ingesta continuada de este elemento tan tóxico.

Para ello se ha realizado un muestreo de las especies más relevantes para el estudio, se han liofilizado para evitar la pérdida del mercurio por ser volátil y se ha procedido a la determinación de mercurio mediante un instrumento de espectrometría de absorción atómica denominado “Hydra II” (Teledyne), correlacionando posteriormente los resultados con las especies analizadas.

2) ABSTRACT

Spain is a country with a Mediterranean diet. One of the characteristics of this type of diet is a large consumption of fish, of their derivatives and of different products of marine origin. The abundant consumption of these products may result in the bioaccumulation of different heavy metals (mercury, cadmium, lead...) in the organism. In this case we will study mercury.

Bioaccumulation begins with the smallest organisms that incorporate methylmercury (derived from mercury) into their body because it cannot be excreted, because methylmercury is fat soluble. When scaling through the trophic chain they will ingest more small fish that will cause a greater amount of methylmercury to be deposited into their body. This problem will reach its greatest severity in people who have excessive consumption of larger fish species, such swordfish or bluefin tuna.

In order to make a correct analysis of this danger, special attention has been given to select the target species, since the area from which the product comes can affect the results, as well as the species chosen for the aforementioned. It is crucial to know the amount of mercury present in the final product that will be available to the consumer in order to avoid the appearance of the problems derived from the continued intake of this toxic element.

Thus, a sampling of the most relevant species for the study has been established, they have been lyophilized to prevent any loss of mercury, and finally mercury has been determined by atomic absorption spectrometry using instrument called "Hydra II" (Teledyne) subsequently discussing the obtained results with the species analysed.

3) INTRODUCCIÓN

3.1) Mercurio

El mercurio es un elemento químico natural, el cual se puede encontrar en depósitos a lo largo de todo el mundo, sobre todo en forma de cinabrio (mineral compuesto por mercurio y azufre en proporción 85-15), así como en depósitos de carbón. En la tabla periódica figura como un metal pesado del bloque D, su nomenclatura es “Hg” y su número atómico es 80 (D. G. Cooper, 1976).

En la naturaleza lo podemos encontrar de tres formas distintas:

- Mercurio elemental: también llamado mercurio metálico, es el único metal líquido a temperatura ambiente, de color plateado utilizado en termómetros, bombas a vacío, lámparas fluorescentes... Es aquel que no ha reaccionado con ninguna sustancia, ya que en caso de hacerlo formaría compuestos.
Si esta forma se encuentra expuesta o se calienta (365,73°C) puede evaporarse en forma de vapor tóxico, el cual es invisible e inodoro (D. R. Lide, 2005).
- Mercurio inorgánico: se encuentra en forma de sales de mercurio, formando cristales o polvos de color blanco (excepto el cinabrio que es de color rojo).
- Mercurio orgánico: mayormente en forma de “metilmercurio”, se forma mediante una combinación del mercurio con radicales orgánicos. Esta acción es llevada a cabo sobre todo por organismos microscópicos. Es la forma orgánica más común y la que se ve involucrada en los procesos de bioacumulación, debido a sus propiedades liposolubles, por lo cual es la forma de mayor interés para este estudio.

3.1.1) Emisión:

La emisión al medio ambiente puede ocurrir por dos motivos:

Natural: al liberarse de la tierra y las rocas en condiciones de altas temperaturas como erupciones volcánicas o incendios, llegando de esta manera a la atmósfera.

Actividades humanas: el uso de centrales térmicas (plantas de carbón), en la minería de mercurio, plata y oro, en la quema de residuos que lo contengan y debido a una eliminación inadecuada (vertederos e incineradoras).

Este mercurio liberado acaba en la atmósfera en caso de la evaporación, y puede precipitar en las gotas de lluvia o con el tiempo debido a la propia gravedad, volviendo así a la tierra

o acabando en el agua. O directamente en el agua en aquellos casos de eliminación inadecuada de las industrias (María Antonia López Antón, 2018).

3.1.2) Exposición:

La forma más común de exposición y el motivo principal de este estudio, es mediante el consumo de pescados y mariscos que contengan unos niveles muy altos de metilmercurio. Este compuesto se encuentra adherido al tejido de estos alimentos gracias a sus propiedades liposolubles y resultando ser un grave peligro debido a su alta toxicidad.

También se puede producir dicha exposición en personas que inhalen vapores de mercurio, al liberarse este de algún contenedor, dispositivo roto... Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) 2017.

3.1.3) Efectos:

El mercurio actúa como una neurotoxina, pero la forma en la que esta afecta a las personas varía según: a) la forma en la que se encuentre (elemental, inorgánico u orgánico); b) la cantidad; c) la edad de la persona, así como su estado de salud general; d) la duración y e) la vía de exposición (OMS, 2017).

El metilmercurio (forma más relevante para este estudio), se encuentra en pequeñas cantidades en la mayoría de las personas, pero por debajo de niveles asociados a problemas en la salud. En caso de exposiciones de carácter moderado prolongadas o exposiciones agudas puede provocar pérdida de visión periférica, falta de coordinación, debilidad muscular, disfunción del habla, de la audición y de la capacidad de caminar.

Los bebés y los niños son más vulnerables a la exposición al metilmercurio que los adultos, dado que se encuentran en una etapa de desarrollo del cerebro y del sistema nervioso. Como consecuencia de la exposición a este compuesto se pueden ver afectados el pensamiento cognitivo, la atención, el lenguaje, la memoria y, las habilidades motoras y visuales (OMS, 2017).

3.1.4) Bioacumulación:

La bioacumulación es un proceso mediante el cual una sustancia química que se encuentra en el medio o en los alimentos, se concentra progresivamente en organismos vivos. Es un proceso individual que afecta a cada individuo por separado. Posteriormente la bioacumulación da lugar a un fenómeno llamado biomagnificación, el cual consiste en la transferencia de esta bioacumulación a lo largo de la cadena trófica, de manera que todo

el contaminante que se encontraba en el organismo de la presa pasa al organismo del depredador. Este depredador a su vez pasará a ser presa de otro depredador mayor. De esta forma, según se escala en la cadena trófica mayor es la acumulación del contaminante.

3.1.5) Enfermedad de Minamata

El primer ejemplo de lo peligroso para los humanos que puede llegar a ser el metilmercurio se descubrió en el caso de Minamata, que sirvió a su vez para concienciar a las autoridades sanitarias de la importancia del control sobre él mismo y su relación con el consumo de pescado.

Este caso data del 1956 en la ciudad de Minamata (Japón). Aunque el primer caso documentado es el de una niña llamada Tsukinoura, anteriormente se vieron comportamientos extraños en los gatos de la zona, llegándose a decir que los gatos estaban locos sin darle mayor importancia.

Los pacientes ingresaban manifestando síntomas cerebrales de origen desconocido (convulsiones y dificultades para el habla y caminar). Según pasaban los años el número de casos en esta zona aumentaba cada vez más, y el principal sospechoso de esta catástrofe era la empresa Chisso, la cual operaba en la ciudad produciendo acetaldehído, proceso en el cual se utilizaba mercurio como catalizador. Hoy en día está comprobado que dicha empresa desechaba el mercurio restante de sus operaciones al mar, parte de este mercurio se convertía en metilmercurio y se introducía en un ciclo en el cual a través de los productos marinos acababa en el ser humano produciendo la enfermedad. Sí bien Chisso negaba rotundamente que fuesen los causantes, Tadao Takeicho y Haruhiko Tokuomi, profesores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Kumamoto afirmaron que: *“La enfermedad de Minamata es una enfermedad del sistema nervioso que es causada por la alimentación con pescado y marisco en el área local. El mercurio ha llamado nuestra atención como la causa posible de la contaminación del pescado y el marisco”*, el 22 de julio de 1959.

Con el paso de los años también aparecieron bebés que al nacer también la presentaban a pesar de un aparente estado de salud normal de la madre.

En 1968, doce años después del primer caso, con más de un centenar de víctimas y más de 400 personas con problemas neurológicos de mayor o menor gravedad, el gobierno japonés admitió que el metilmercurio era el responsable de dicha enfermedad, y que la

fábrica Chisso fue la responsable de la contaminación (se calcula que, en estos años desecho más de 80 toneladas de mercurio al mar), además de prohibir la pesca en esa zona. Con el paso de los años el nivel de mercurio en las aguas anexas a la empresa fue bajando, llegando a niveles por debajo de lo que establece la legislación. A pesar de ello se siguen llevando a cabo en la zona y los alrededores para llevar un evitar la aparición de nuevos casos (Tomé, 2019).

3.2) Niveles de mercurio en productos marinos

Como se ha explicado anteriormente el nivel de mercurio en los diferentes productos marinos, va a depender del nivel de la escala trófica en la que se encuentre. Así pues y según datos de la FDA (Food and drugs administration), los peces con mayor nivel de mercurio son aquellos peces carnívoros de gran tamaño, debido a la biomagnificación que han ido sufriendo. En este nivel se encuentra: el pez espada, el tiburón, el robalo Constantino y el atún de ojo grande, con concentraciones de mercurio que varían entre los 1,000 ppm y los 0,700 ppm. El caso del blanquillo varía según la zona de captura, ya que el blanquillo del atlántico tiene niveles bajos en relación con especies mucho más peligrosas (menos de 0,200 ppm) mientras que, si proviene del Golfo de México, pasa a ser el pescado con mayor concentración de mercurio (1200 ppm – 1400 ppm).

Según vamos descendiendo en el nivel de la cadena trófica el nivel de mercurio también va bajando. Con valores comprendidos entre los 0,600 ppm y 0,100 ppm, encontramos especies como el marlín, el mero, el atún, la merluza...

Por debajo de 0,100 ppm encontramos especies más pequeñas y aparecen también los mariscos, crustáceos y algas. Los cuales no superan estas concentraciones debido a su tamaño reducido. Para comprobar datos con mayor exactitud se puede comprobar la tabla de la FDA, que contempla los niveles de mercurio en pescado y marisco comercializado entre 1990-2012.

<i>Especies</i>	<i>Concentración Max (ppm)</i>	<i>Media (ppm)</i>	<i>Desv Est.</i>
<i>Pez espada</i>	3,22	0,995	0,539
<i>Atún ojo grande</i>	1,81	0,689	0,341
<i>Bonito</i>	-	0,358	0,138
<i>Rape</i>	0,289	0,181	0,075
<i>Trucha</i>	0,678	0,071	0,025
<i>Caballa</i>	-	0,050	-
<i>Salmon</i>	0,19	0,071	0,025
<i>Ostra</i>	0,25	0,012	-
<i>Almeja</i>	0,03	0,009	0,002

[Tabla 1. Niveles de mercurio en pescados y mariscos 1990-2012 FDA]

3.3) Grupos de riesgo

Si bien todos los seres humanos se pueden ver afectados por el metilmercurio, la gravedad de dicha afección, además de una serie de factores explicados anteriormente, va a depender de si se encuentra en un grupo de riesgo.

En el primer lugar en estos grupos de riesgo se encuentran los niños desde el momento de la gestación hasta los 9 años. Esto es debido a que se encuentran en una etapa del desarrollo del cerebro y el sistema nervioso. Como se ha señalado anteriormente los efectos neurotóxicos del mercurio pueden afectar gravemente este desarrollo.

Debido a esto mismo el siguiente grupo de riesgo son las mujeres embarazadas, pues el metilmercurio es capaz de penetrar la barrera placentaria y producir las alteraciones neurológicas anteriormente mencionadas en el feto. Pero no tan solo las mujeres embarazadas han de tomar precauciones a la hora de la alimentación, no superando las ingestas semanales recomendadas (1-4 raciones de pescado o marisco por semana). Las mujeres en edad fértil y sobre todo aquellas que busquen un posible embarazo, también deberán extremar las precauciones, pues en el caso de ingestas superiores aun siendo estas anteriores al embarazo, pueden afectar al feto en un posible embarazo próximo, puesto que el metilmercurio no se excreta con facilidad y permanece en el cuerpo durante periodos prolongados de tiempo.

También se encuentra en el grupo de riesgo aquellas personas que se encuentren expuestas de manera sistemática al mercurio (exposición crónica), personas que por razones de trabajo se ven expuestos al mercurio (existen límites de cantidades a las que se pueden exponer, así como tiempo de trabajo) aunque estas exposiciones son a Hg inorgánico, poblaciones que consuman una gran cantidad de pescado en la dieta, como pueblos pesqueros, poblaciones donde el pescado acapara una gran parte de la gastronomía (siendo estas exposiciones las relevantes para este estudio, dado que se dan al metilmercurio), como la dieta mediterránea o Japón. Y personas que viven en zonas donde la contaminación es muy elevada. Existen ejemplos como el de Minamata, pero hoy en día hay zonas de gran peligro, como el río Mekong en Vietnam o, zonas de la costa de Colombia debido a los restos de mercurio provenientes de la minería.

3.4) España

España es un país donde abunda la dieta mediterránea, pero también la encontramos en otros países como Italia, Portugal, Grecia y demás países anexos al mar Mediterráneo.

Dicha dieta se caracteriza por un gran consumo de productos de origen vegetal, aceite de oliva, pan y productos provenientes de cereales, un menor consumo de carnes rojas y un abundante consumo de pescado. Esto último es debido a la relativa facilidad con la que se puede conseguir dichos productos gracias a la situación geográfica del país, y es esto mismo lo que hace que España se encuentre en lo alto de las listas de países con mayores niveles de mercurio en su población, según el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF, 2014).

3.4.1) Niveles de mercurio En España

Como se ha visto anteriormente a partir del caso de Minamata, las autoridades sanitarias del mundo se dieron cuenta de la importancia del control de las cantidades de mercurio en la población, debido a las devastadoras consecuencias que originaba. Debido a esto se lleva a cabo un trabajo de biomonitorización humana con el fin de controlar los niveles de mercurio en la población en general y prevenir los efectos secundarios de los mismos.

En el caso de España un estudio realizado por el profesor Miguel Motas, profesor de toxicología de la universidad de Murcia, reveló que España se encuentra a la cabeza como el país europeo cuyos habitantes poseen más cantidad de mercurio en su organismo. En esta lista después de España se encuentra Francia, Italia y Grecia, países que mantienen relación con la dieta Mediterránea.

Dicho estudio combinaba tres tipos diferentes de muestras, 1900 de sangre, 1700 de orina y 600 de cabello, de residentes de toda España. Este estudio aparte de poner a España a la cabeza de Europa en cuanto a niveles de mercurio, también diferenció las comunidades autónomas donde este problema es más acentuado, Murcia, Valencia, Cataluña, Baleares y Andalucía. Datos que coinciden nuevamente con las zonas en contacto directo con el mar (franja mediterránea), por lo que se puede presuponer que es donde mayor consumo de pescado y marisco va a haber, debido a la facilidad con la que se puede acceder al mismo. No obstante, esta clasificación varía según el tipo de muestra que se mide en cada caso, además de características particulares de las personas en sí como la edad, puesto que una edad más avanzada conlleva un mayor nivel de mercurio debido a una mayor acumulación a lo largo del tiempo, también era mayor la cantidad de mercurio en aquellas personas que manifestaban superar la ingesta de pescado de cinco veces por semana, así como en las mujeres de manera general.

Una vez superada la franja mediterránea, las comunidades que resaltan son Galicia y País Vasco, siendo estas también zonas costeras. Todo esto evidencia que la problemática del mercurio está estrechamente relacionada con el consumo de pescado y marisco.

A pesar de estos datos, el profesor Miguel Motas considera que hay que tratar este problema con cautela, debido a la importancia del consumo de pescado en la dieta y debió a que eliminarlo sería más perjudicial que la presencia de estos niveles de mercurio. Si bien son datos elevados no ha de cundir el pánico, puesto que siguen siendo niveles aceptables por la OMS: *“La mayoría de la población estudiada se encuentra en los valores de referencia establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), lo que implica que la presencia de mercurio en su organismo no tiene efectos directos sobre la salud, pero sí se trata de niveles muy altos que hay que vigilar”* Miguel Motas.

3.4.2) Consumo de pescado

España es el país de Europa que más pescado consume, si bien se observa una bajada en los kilos totales de consumo con el paso de los años, esto es debido a la crisis económica, que ha dificultado la posibilidad de compra de determinados productos, así como el cambio en la conducta social de la gente, reduciéndose tanto el tiempo a la hora de elaborar la comida, como a la hora de comprar. Esto hace que disminuyan las comidas caseras y aumente el sector que ofrece la posibilidad de comer fuera de casa.

No obstante, y a pesar de todo ello, el consumo medio de pescado por persona en España se sitúa en 42,2 Kg al año. Una cifra muy elevada si la comparamos con la media mundial que se encuentra en 18,9 Kg al año. Entre los encuestados un 70% manifestaba consumir pescado y marisco dos veces por semana, mientras que el 90% al menos una vez por semana.

El salmón y la merluza son las especies que más se consumen en España, habiéndose consolidado el salmón, mientras que la merluza está sufriendo una bajada en las cifras de consumo. Después de estas dos especies encontramos la lubina y la dorada que están sufriendo un auge en su consumo.

Como conclusión se observa que, si bien el consumo ha bajado en los últimos años, se sigue ingiriendo una gran cantidad de pescado fresco por parte de la población, y además este consumo se encuentra distribuido por todas las franjas de edad. Esto es importante ya que como se ha remarcado, el mercurio puede derivar en problemas graves para la salud, pero él no consumir pescado con la intención de evitar este problema, no haría otra cosa sí no derivar en problemas igualmente graves, por no poder gozar de las ventajas nutricionales (omega-3, vitaminas A, B, D y E, minerales como fosforo o calcio...) que nos proporciona.

3.4.3) Alarma social

Debido a la desinformación por parte de la sociedad, el problema del mercurio puede derivar en otros igualmente importantes, pues como antes se ha comentado el consumo de pescado azul refiere una gran cantidad de beneficios (en especial debido a los ácidos grasos omega-3), por lo que es muy importante que se siga consumiendo pescado azul, a pesar del riesgo que conlleva, en lugar de sustituirlo todo por pescado blanco (el cual tiene niveles mucho más bajos de mercurio) o directamente no consumir nada de pescado por miedo.

Y es que todo el pescado que llega al mercado lo hace bajo la presencia de un gran control, mediante el Reglamento (CE) N°1881/2006 (UE,2006), sección 3 del Anexo, establece un límite que varía entre 0,5 y 1,0 mg/Kg de pescado fresco, según las características del mismo. Las características que diferencian una u otra cantidad máxima de mercurio se refleja en la [Tabla 13.] del Anexo de este estudio.

Además del control a todo el pescado que entra al mercado, los ciudadanos cuentan con innumerables estudios que dan recomendaciones para una ingesta segura. En 2003 un

comité de expertos de la FAO y OMS revisó los límites de ingesta semanal tolerable provisional reduciéndolo de 3,3 µg/Kg de peso corporal a 1,3 µg/Kg de peso corporal. En 2004 y 2005 se publicaron estudios sobre la “exposición dietética al Hg” y sobre la “estrategia comunitaria sobre el mercurio”. En 2008 la Comisión Europea informó a los distintos estados miembros, que era imposible minimizar el riesgo únicamente mediante el establecimiento de contenidos máximos más estrictos en Hg en pescados, y que se tenía que elaborar recomendaciones de consumo a los consumidores, sobre todo para proteger aquellos grupos más vulnerables. Usando todos los datos recopilados y teniendo en cuenta el consumo medio de pescado según el modelo de dieta española, se obtuvo la estimación de ingesta media de mercurio para la población española: 0,225 y 0,184 µg/Kg de peso corporal/día para niños y adultos respectivamente.

Se establecieron raciones semanales recomendadas según el tipo de producto que se fuese a consumir, siendo 2-3 raciones para especies con contenidos de mercurio inferiores a 0,150ppm de Hg, 1 ración para especies comprendidas entre 0,150 y 0,400 ppm de Hg y limitando de manera estricta aquellas especies superiores a 0,400ppm de Hg. Estas recomendaciones se refieren a la población en general, en el caso de grupos de riesgo como niños menores de doce años, mujeres embarazadas o en periodo de lactancia, no se recomienda un consumo mayor a 50 g de grandes túnidos a la semana o más de 100 g cada dos.

4) Justificación

Teniendo en cuenta toda la información recopilada, se observan claramente los peligros que conlleva el mercurio. Al ser un elemento que llega a la naturaleza con relativa facilidad y una vez en el agua se transforma de su forma elemental a mercurio orgánico, entrando posteriormente en la cadena trófica, esto hace que el ser humano este expuesto al mismo con cierta facilidad en la dieta, además del resto de circunstancias (profesionales, accidentales...). A esta facilidad a la exposición hay que unirle la toxicidad del mercurio y sus compuestos, que pueden dar lugar a problemas neurológicos que derivan en debilidad muscular, disfunción del habla y la capacidad de caminar.

Además de estos síntomas en la población media, cabe destacar que las poblaciones de riesgo, véase niños desde el momento de la gestación hasta los 9 años, mujeres

embarazadas o en edad fértil y las personas que se encuentren expuestas de manera sistemática al mercurio, se van a ver afectadas de manera más grave. Los síntomas más preocupantes se dan en los niños, en los que se puede alterar el desarrollo cognitivo, la capacidad del habla o la motricidad. En los grupos expuestos de manera sistemática, si bien los síntomas serán los mismos que en la población media, estos aparecerán con mayor rapidez.

Por todo ello, es fundamental mantener un control estricto sobre todos los alimentos marinos que se consumen para saber con exactitud las cantidades de mercurio que cada especie puede contener, regulando los límites máximos por ley para evitar una exposición demasiado grande, además de los hábitos de consumo de la población, teniendo en cuenta todas las variantes que pueden afectar a dicho hábito, como edad, sexo, zona de residencia... Con todo ello se elaboran recomendaciones de consumo a los consumidores.

Gracias a trabajos de biomonitorización humana a lo largo de todo el mundo, y especialmente en aquellas zonas consideradas de riesgo, ya sea por un gran consumo de productos marinos debido a la cercanía a zonas costeras, o zonas en las que se encuentra una fuente de exposición de mercurio considerable como una mina, se ha comprobado que, si bien generalmente los niveles se encuentran por debajo de los valores de referencia establecidos por la Organización Mundial de la Salud, estos valores son más altos que en poblaciones que no se encuentran cercanas a estos puntos.

En el caso particular de España, se encuentra a la cabeza como el país de la Unión Europea donde los niveles de mercurio son más altos.

Todo esto hace que estudios como este sean de gran importancia para determinar los niveles de mercurio a los que se ve expuestos los consumidores.

5) Objetivos

El objetivo principal de este estudio es el “desarrollo de un método analítico para la determinación de mercurio en muestras de origen marino”, utilizando un instrumento de espectrometría de absorción atómica “Hydra IIc” diseñado específicamente para determinar este elemento. Para llegar a este objetivo principal se han de cumplir una serie de objetivos secundarios:

1. Realizar un estudio de las especies que se van a analizar.
2. Realizar un correcto proceso de liofilización, para evitar la pérdida de Hg al realizar las pruebas.
3. Determinación de la manera más efectiva de preparación de las muestras.
4. Estudio del calibrado.
5. Validación del método.
6. Determinación de la cantidad de Hg en las muestras seleccionadas.

6) Metodología

6.1) Selección de las especies a analizar

Teniendo en cuenta los principios de bioacumulación y biomagnificación, las especies de más interés son aquellas que se encuentran en la parte más alta de la cadena trófica, aunque también son importantes aquellas especies que por su gran consumo se encuentran muy abundantemente en la dieta. Por último y para confirmar si las previsiones son ciertas y si el método es capaz de analizar otros materiales, también se incluyen tres especies diferentes de moluscos y tres especies diferentes de algas.

A la hora de obtener las diferentes muestras es imprescindible que estas vengan acompañadas de información fundamental como: la naturaleza de las mismas, diferenciando las muestras provenientes de cría de aquellas provenientes de la captura salvaje, siendo mucho más valiosas para este estudio estas últimas. Además, en el caso de las muestras provenientes de piscifactorías es fundamental saber el país de

proveniencia, y en caso de captura salvaje la zona FAO (Food and agriculture organization) de captura.

Concretamente para el muestreo se obtuvieron ocho tipos de pescados diferentes, tres tipos de moluscos y tres tipos de algas:

Muestras	Naturaleza	Zona	Muestras	Naturaleza	Zona
Pez Espada	Salvaje	FAO 61	Caballa	Salvaje	FAO 34
Atún ojo grande	Salvaje	FAO 34	Ostra	Salvaje	FAO 37.1
Bonito	Salvaje	FAO 34	Almeja	Salvaje	FAO 27
Panga	Cría	Vietnam	Chirla	Salvaje	FAO 37
Salmon	Salvaje	FAO 67	Alga Espagueti	Salvaje	FAO 27 8.c
Rape	Salvaje	FAO 27	Alga Kombu	Salvaje	FAO 27 8.c
Trucha	Cría	España	Alga Lechuga	Salvaje	FAO 27 8.c

[Tabla 2. “Muestreo”: lista de todas las especies que se van a analizar posteriormente]

Las tres primeras especies se escogieron debido a su gran tamaño. La panga debido a las alertas que se han producido; las cuatro especies restantes debido al gran consumo que se hace de las mismas, y los moluscos y las algas para probar el método en otras especies para confirmar previsiones.

6.2) Liofilización

La liofilización es un proceso de deshidratación, basado en la sublimación del agua al ser sometida primero a una congelación y posteriormente a una bajada de la presión. Esto produce una transformación directa del agua de estado sólido a gas. En el caso de este estudio es necesario realizar este procedimiento para evitar la posterior pérdida del metilmercurio al manejar las muestras, debido a que este componente presenta una alta volatilidad si es expuesto al calor.

Este proceso se realizó empleando el liofilizador “Heto holten, Dry winner 8”, y el consta de tres etapas:

1. Congelación: En esta etapa se ha de alcanzar lo más rápidamente posible temperaturas de -20°C o inferiores. Para ello todas las muestras han de ser preparadas de manera adecuada previamente, procurando que el grosor no sea excesivo para asegurar de esta manera una correcta penetración del frío en las mismas. Una vez cortadas las muestras de pescado con el grosor correcto,

extraídos los moluscos de las conchas protectoras, se han de disponer en bandejas de aluminio junto con las algas, correctamente rotuladas y llevarlas al liofilizador donde comienza esta primera etapa de congelación.

2. Secado primario: En esta etapa se provoca un vacío dentro del liofilizador, lo cual provoca una bajada de presión que, junto con la baja temperatura de las muestras, provoca que comience la sublimación del agua que se encuentra en forma de hielo. Esta es la etapa donde más agua se va a eliminar del producto.
3. Secado secundario: En esta etapa la velocidad de sublimación va descendiendo progresivamente ya que cada vez resulta más complicado eliminar el agua de la muestra, puesto que cuanto más agua se sublima la que queda en el interior es el agua más fuertemente ligada a la misma.

Las condiciones en las que se llevaron a cabo este proceso fueron:

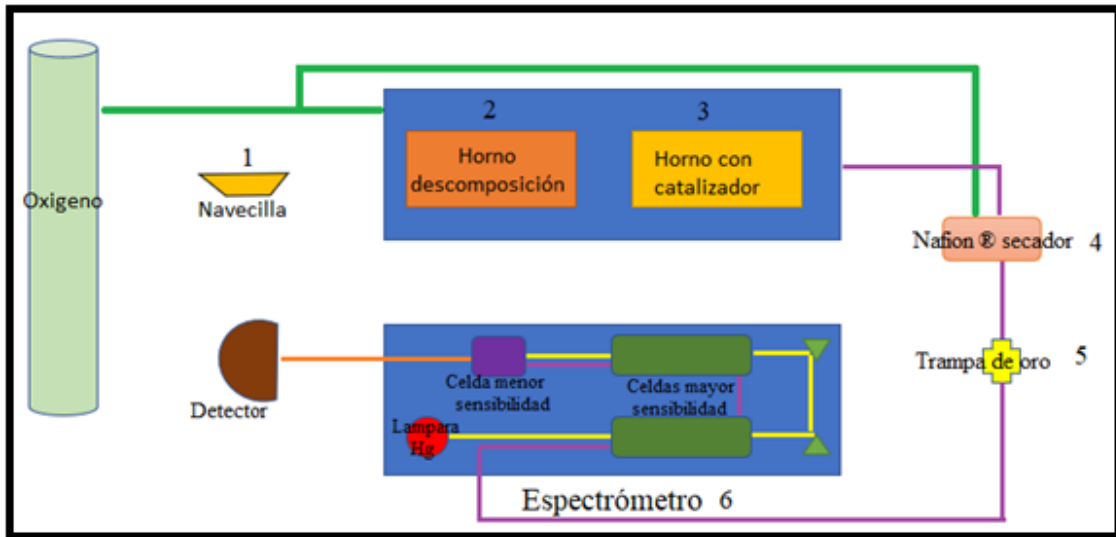
Etapa	N.º	Tº	Tiempo	Etapa	N.º	Tº	Tiempo
Congelación	1.1	-20	30'	Secado 1º	6	5	6h
	1.2	-20	30'		7	5	6h
Secado 1º	1	-20	2h		10	5	6h
	2	-15	4h	Secado 2º	1	5	10h
	3	-10	4h		2	5	10h
	4	-5	4h		5	5	10h
	5	0	4h				

[Tabla 3 “Liofilización”: se reflejan las condiciones de las tres etapas de liofilización de las muestras]

6.3) Hydra IIc

El Hydra IIc es un equipo de medición de mercurio, que permite su detección y cuantificación a nivel de trazas, tanto en muestras sólidas como semisólidas, con bastante rapidez (aproximadamente, 7 minutos por muestra).

La muestra se puede analizar directamente ya que se produce una descomposición térmica a alta temperatura, no necesita pretratamiento, y se vaporiza el Hg y se concentra en una trampa de oro, para al final realizar una medición de absorción atómica con una fuente de radiación a 253,652 nm y con un rango dinámico entre 0,05-1500ng.



[Figura 1. Proceso de descomposición y análisis de las muestras] (Jeff Forsberg, 2014)

La muestra (1) se pesa en una navecilla y se introduce en un horno donde se produce su calentamiento y oxidación (2), en presencia de oxígeno o aire. La temperatura se eleva en dos etapas, una primera para secar la muestra (si es un líquido) y una segunda para descomponerla. En esta descomposición se forman gases los cuales se transportan a través de un segundo horno con un catalizador (3) donde se eliminan los halógenos, óxidos de nitrógeno y óxidos de azufre. Los productos de combustión restantes, entre los que se encuentra el Hg en fase de gas, son transportados a través de un secador Nafion® (4) para eliminar el vapor de agua y posteriormente a una trampa de oro (5), que amalgama el Hg metálico. Una vez se ha descompuesto y eliminado todos los compuestos volátiles de la muestra, la trampa de oro es calentada para liberar todo el mercurio que ha ido amalgamando, y que, mediante un gas portador se transporta al espectrómetro (6).

Una vez el Hg atómico en fase gaseosa llega al espectrómetro se dirige a dos celdas ópticas: una primera más larga, que proporciona mayor sensibilidad y, por tanto, es adecuada para medir las concentraciones más bajas y, posteriormente, a una segunda celda óptica más corta, y que, por tanto, proporciona menor sensibilidad (para determinar concentraciones más altas). De esta manera se amplía el rango dinámico de trabajo. Una lámpara de Hg emite radiación a través de las celdas usando un sistema de espejos reflectantes que el Hg absorbe de forma proporcional a su concentración y se obtiene una señal transitoria de absorción atómica.

6.4) Medición mercurio

Una vez liofilizadas las muestras, estas deben de ser trituradas para aumentar la homogeneidad, y a la vez facilitar su manejo. Esta trituración se lleva a cabo en la misma bolsa a mano, dado que al estar liofilizada la muestra tiene una gran facilidad para desmenuzarse. Una vez terminada esta etapa se podrá medir el mercurio existente en cada muestra, pero previamente se ha de realizar una curva patrón de mercurio.

6.4.1) Curva patrón

Para esta curva patrón se determinan ocho puntos diferentes, con valores de Hg aproximadamente de: (0,05/0,1/0,5/1/2,5/5/7,5/10) ng Hg en cada uno de ellos, para ello se usan pipetas de 50 100 y 200 μL que toman esas cantidades de las disoluciones, de manera que la cantidad de mercurio existente en cada toma se corresponda a los distintos puntos de curva patrón.

Para calcular la concentración de las disoluciones se realizan los siguientes cálculos:

$$0.05\text{ngHg}: [\text{Hg}] \rightarrow \frac{m}{v} = \frac{0,05 \cdot 10^{-9}}{50 \cdot 10^{-6}} = 10^{-6} \text{ g/l} \rightarrow 1 \mu\text{g/L}$$

Obteniendo de esta manera:

ng Hg	Concentración	μL muestra	ng Hg	Concentración	μL muestra
0,05	1 $\mu\text{g/L}$	50 μL	2,5	50 $\mu\text{g/L}$	50 μL
0,1	1 $\mu\text{g/L}$	100 μL	5	50 $\mu\text{g/L}$	100 μL
0,5	10 $\mu\text{g/L}$	50 μL	7,5	50 $\mu\text{g/L}$	150 μL
1	10 $\mu\text{g/L}$	100 μL	10	50 $\mu\text{g/L}$	200 μL

[Tabla 4. Cálculo de las concentraciones de las disoluciones.]

Por lo tanto, a partir de 3 disoluciones de Hg (1 $\mu\text{g/L}$, 10 $\mu\text{g/L}$ y 50 $\mu\text{g/L}$) se construye toda la curva. Para obtener estas tres disoluciones, al tratarse de unas concentraciones muy bajas es recomendable partir de una disolución de concentración mayor y posteriormente ir diluyéndola hasta obtener las disoluciones deseadas.

Se comienza desde una disolución madre D_m que se obtiene diluyendo 10 μL de una disolución patrón de Hg de concentración (1000 mg/L) en 10 mL de ácido nítrico. Esta disolución madre tendrá una concentración de 1mg/L. Pipeteando diferentes cantidades

de esta disolución madre y diluyéndolas en 10 mL de ácido nítrico se obtienen las tres disoluciones con las que vamos a trabajar para preparar la curva patrón.

Para calcular exactamente cuál es la cantidad de disolución madre necesaria para cada disolución se realiza este cálculo:

$$C_m * V_m = C_{1/2/3} * V_{1/2/3}$$

Para calcular la disolución tres: $1 \text{ mg/L} * V_m = 50 * 10^{-6} \text{ mg/L} * 10 * 10^{-3} \text{ L} \rightarrow V_m = 500 \text{ } \mu\text{L}$

Para obtener las tres disoluciones:

<i>Disolución</i>	$\mu\text{L de } D_m$	Concentración final
D_1	10 μL	1 $\mu\text{g/L}$
D_2	100 μL	10 $\mu\text{g/L}$
D_3	500 μL	50 $\mu\text{g/L}$

[Tabla 5. Disoluciones finales teóricas.]

Pero a la hora de trabajar en el laboratorio al trabajar con cantidades tan pequeñas, el valor real no se ajusta totalmente a las cantidades teóricas calculadas, por lo cual se pesan todas las operaciones llevadas a cabo, para recalcular las concentraciones con las que se trabaja y obtener de este modo los datos exactos.

Para obtener la disolución madre (D_m) se pesaron 9,9 μL de disolución patrón de Hg en 10,231 ml de ácido nítrico llegándose a una concentración de 0,966 mg/L. A partir de esta disolución se obtienen las demás:

<i>Disolución</i>	Concentración teórica	$D_m \mu\text{L}$ tomados	mL HNO_3	Concentración real
D_1	1 $\mu\text{g/L}$	1,117 μL	10,1676 mL	1,11 $\mu\text{g/L}$
D_2	10 $\mu\text{g/L}$	100 μL	10,26 mL	9,49 $\mu\text{g/L}$
D_3	50 $\mu\text{g/L}$	506,7 μL	10,7478 mL	45,54 $\mu\text{g/L}$

[Tabla 6. Disoluciones finales reales.]

Debido a que estas concentraciones son algo diferentes a las que se esperaba teóricamente, los puntos de calibrado se tienen que recalcular:

Para el punto 1: $1,117 * 10^{-6} = \frac{m}{50 * 10^{-6}} \quad m = 0,055 \text{ ng Hg}$

ng Hg	Concentración	μL muestra	ng Hg	Concentración	μL muestra
0,055	1,11 μg/L	50 μL	2	45,54 μg/L	50 μL
0,111	1,11 μg/L	100 μL	4	45,54 μg/L	100 μL
0,474	9,49 μg/L	50 μL	6	45,54 μg/L	150 μL
0,949	9,49 μg/L	100 μL	9	45,54 μg/L	200 μL

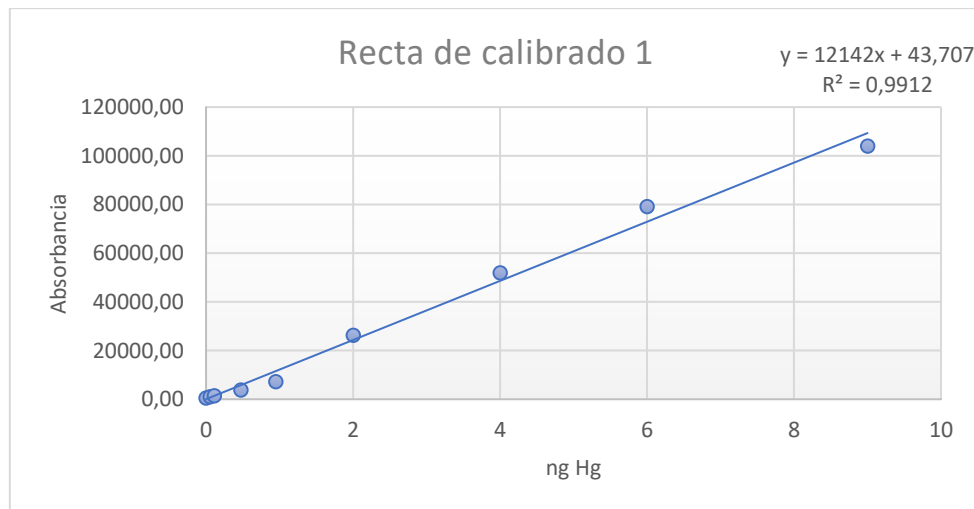
[Tabla 7. Puntos de la recta de calibrado.]

Teniendo los puntos y las absorbancias se hace la recta de calibrado:

Dis.1
Dis.2
Dis.3

Puntos	ng Hg	Abs
B	0	417,00
1	0,055	967,33
2	0,111	1349,67
3	0,474	3695,67
4	0,949	7139,00
5	2	26226,00
6	4	51883,67
7	6	79119,00
8	9	103877,00

[Tabla 8. Absorciones de la recta]



[Figura 2. Recta de calibrado 1.]

Mirando la recta se observa que el punto n° 4 y el punto n° 8 se alejan del comportamiento lineal esperado, proporcionando un R^2 demasiado bajo (0,9912) y un valor de la ordenada (43) que se encuentra muy alejado del blanco. Por lo tanto, se considera oportuno despreciar estos dos puntos dando como lugar otra recta:



[Figura 3. Recta de calibrado final.]

En esta la R^2 ya tiene un valor mucho más alto (0,9989), aunque la ordenada en el origen es negativa. En general, esta recta no sería adecuada para valores de absorbancia bajos por este motivo.

6.4.2) Validación del método

Para la validación del método se empleó un material de referencia certificado: “Aquatic plant (Lagaroiphon major) BCR-060”, este material tiene una concentración certificada de Hg de: 0,34 +/- 0,04 mg/Kg. Al medir este material se obtuvieron los siguientes resultados:

Media	s	DSR	Intervalo de confianza (95%)
0,435	0,006	1,449	0,0156

[Tabla 9. Calculo para la validación del método con BCR-060]

En la tabla se especifica la media de las tres medidas obtenidas y se calcula la desviación estándar (s), la desviación estándar relativa (DSR), y el intervalo de confianza al 95%. Como se puede ver, aunque el valor obtenido es relativamente cercano al esperado, los intervalos de confianza no solapan, siendo por tanto la diferencia estadísticamente significativa. Esto puede deberse a que los análisis mediante esta técnica se realizan con

una masa muy inferior a la recomendada (12,5 mg) por el fabricante del CRM, que son 100 mg, con lo que la falta de homogeneidad del material puede afectar al resultado.

Teniendo en cuenta que la primera validación no fue óptima, se probó con otro material de referencia certificado “NIST 1570a Trace elements in spinach leaves”, en este caso la concentración de mercurio certificada era; 0,030 +/- 0,003 mg/Kg, los resultados obtenidos al analizar este material fueron los siguientes:

Media (3)	DE	DER	INTEC (95%)
0,034	0,001	3,491	0,003

[Tabla 10. Calculo para la validación del método con NIST 1570a.]

En el caso de este material, los resultados si demuestran las buenas prestaciones del método para este tipo de muestras, ya que los intervalos de confianza se solapan con los proporcionados por el fabricante.

En cualquier caso, hay que considerar que desviaciones del orden del 15-30% pueden ocurrir, dependiendo de la homogeneidad de la muestra.

6.4.3) Análisis muestras

Antes del análisis de las muestras, todos los días se realizó un calibrado del instrumental de tres puntos, midiendo el blanco, el punto 1, el punto 3 y el punto 7, para emplear la ecuación obtenida en cada calibración diaria para los cálculos. Estos puntos se miden con una navecilla de cuarzo, por su medio ácido.

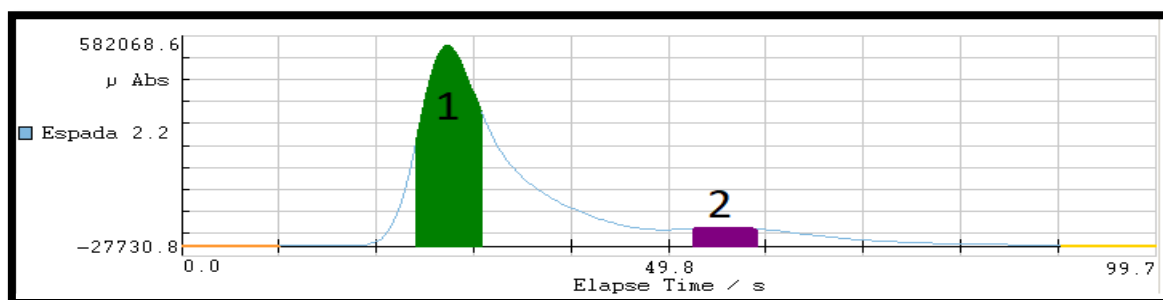
Las muestras se han de medir en navecillas de níquel. Para ello, primero se tara la balanza con la cubeta vacía y, posteriormente se pesa la muestra. El peso de muestra se escogió teniendo en cuenta la concentración que se esperaba obtener en cada muestra. Si la concentración esperada es pequeña se pesa entre 0,010g y 0,015g, en cambio sí se espera una concentración muy alta se pesa entre 0,0040g y 0,0060g, para evitar que el valor de la absorbancia se salga del rango lineal. Cada muestra se mide tres veces y posteriormente teniendo en cuenta las absorbancias obtenidas, se puede optimizar el peso que se ha de tomar en las siguientes medidas (bajándolo si se ha obtenido una absorbancia muy alta o

subiéndolo si esta ha sido demasiado baja). Una vez pesadas se llevan al instrumento de absorción atómica, el cual gracias a la posibilidad de automatización que ofrece, permite dejar las cubetas en el orden deseado y las va midiendo una a una.

Para automatizar las medidas se van introduciendo los racks, en los cuales se especifica el nombre de cada muestra, y las condiciones a las que se van a someter. En este caso las condiciones serán las mismas para todas las muestras, con una etapa de secado a 150°C durante 120" y una etapa de descomposición a 600°C durante 120".

Cada muestra se mide por triplicado, obteniendo de esta manera tres pesos y sus correspondientes absorbancias. Estos datos se introducen en una tabla, la cual calcula automáticamente la cantidad de Hg que contiene esa muestra, usando la ecuación resultante del calibrado diario del instrumental. Sabiendo la cantidad de Hg y el peso de la muestra se calcula la concentración de Hg en la muestra. Y como para cada muestra se obtienen tres resultados en la misma tabla se calcula la media de las tres concentraciones, la desviación estándar, la desviación estándar relativa y el intervalo de confianza 95%.

Es importante destacar que, como anteriormente se ha mencionado, el instrumento es capaz de realizar la detección del analito en dos rangos diferentes gracias a dos celdas ópticas. El propio instrumental muestra la medida de la celda que considera adecuada para cada muestra, aunque en todo momento se puede acceder a ambos valores.



[Figura 4. Señal obtenida al analizar una muestra]

En la imagen se puede observar una determinación de una de las muestras de pez espada, que ofrece dos señales siendo 1 la determinación con la celda de mayor sensibilidad y 2 la determinación en la celda de menor sensibilidad. Teniendo en cuenta la concentración de Hg esperable en las muestras se empleará siempre la determinación de mayor sensibilidad, pero en el caso de obtener alguna muestra con una cantidad anormalmente grande de Hg, se deberá proceder a un recalibrado, usando puntos con concentraciones más altas de Hg y las absorbancias detectadas por la celda de menor sensibilidad.

	Peso	Abs	Escala	Hg	Concentra	Media	s	DSR	Intervalo de confianza (95%)
Caballa 1	0,0098	43430	LOW	3,669	0,374				
	0,0105	46559	LOW	3,931	0,374				
	0,0098	43803	LOW	3,700	0,378	0,375	0,001	0,49	0,375 ± 0,004

[Tabla 11. Ejemplo de calculo de concentraci3n de una muestra.]

Este es un ejemplo de lo anteriormente mencionado y los c3lculos de todas las muestras al completo se pueden observar de manera m3s detallada en la [Tabla 14.] del Anexo.

7) Resultados y discusi3n

A continuaci3n, se muestra un resumen de los resultados obtenidos:

Muestra	Media (Hg mg/Kg)	s (mg/Kg)	DSR %	Intervalo de confianza (95%)
<i>Alga Lech</i>	0,007	0,0003	4,69	0,0009
<i>Alga Espg</i>	0,007	0,0006	9,19	0,0016
<i>Alga Kom</i>	0,001	0,0014	12,51	0,0036
<i>Chirla</i>	0,259	0,089	34,4	0,111
<i>Almeja</i>	0,965	0,081	8,46	0,101
<i>Ostra</i>	0,180	0,056	31,5	0,070
<i>Salmon 1</i>	0,124	0,008	6,48	0,020
<i>Salmon 2</i>	0,119	0,001	1,38	0,004
<i>Trucha 1</i>	0,350	0,013	3,85	0,033
<i>Trucha 2</i>	0,310	0,033	10,8	0,083
<i>Caballa 1</i>	0,375	0,001	0,49	0,004
<i>Caballa 2</i>	0,304	0,004	1,53	0,011
<i>Panga</i>	0,022	0,002	11,9	0,006
<i>Rape 1</i>	1,070	0,024	2,31	0,061
<i>Rape 2</i>	1,160	0,088	7,58	0,218
<i>At3n 1</i>	0,976	0,014	1,51	0,036
<i>At3n 2</i>	0,866	0,010	1,16	0,024
<i>Bonito 1</i>	5,110	0,040	0,82	0,104
<i>Bonito 2</i>	4,430	0,126	2,85	0,314
<i>Pez espada 1</i>	1,690	0,051	3,04	0,127
<i>Pez espada 2</i>	16,59	0,552	3,33	1,371
<i>Pez espada 3</i>	1,485	0,106	7,18	0,264

[Tabla 12. Resumen de todos los resultados obtenidos.]

7.1) Algas

Las algas son pertenecientes al grupo de las plantas, se encuentran en el escalafón más bajo de la cadena trófica, por lo cual la bioacumulación es un proceso insignificante en este organismo, y los niveles esperados de Hg son bajos. Debido a esto tan solo se midió una muestra de cada una de las algas, puesto que no supone un peligro real de mercurio.

7.1.1) Alga Lechuga

De las tres muestras de algas que se analizaron esta fue la única que se liofilizó de una manera correcta, lo cual permitió una pulverización adecuada y se consiguió una homogenización óptima de la muestra. El resultado obtenido fue 0,007 mg/Kg, un resultado esperable y muy por debajo del límite legal de 0,5 mg/Kg.

7.1.2) Alga Espagueti

Esta alga en el proceso de liofilización no perdió suficiente cantidad de agua, por lo tanto, la desecación fue ineficaz, lo que provocó que la muestra no se pudiese pulverizar, obligando a cortar trozos directamente del alga a la hora de pesar. Todo esto disminuye de manera considerable la homogeneidad de la muestra. No obstante, el resultado medio obtenido fue 0,007 mg/Kg, un resultado nuevamente esperable y muy por debajo del límite legal.

7.1.3) Alga Kombu

En esta alga el proceso de liofilización fue igual de ineficaz que el anteriormente mencionado, dando lugar a las mismas complicaciones. Finalmente, el resultado obtenido fue de 0,001 mg/Kg, un resultado incluso menor que el de las anteriores algas y por consiguiente también muy por debajo del límite legal.

7.1.4) Discusión

Tal y como cabía esperar, al no estar situadas en la parte elevada de la cadena trófica, las cantidades de mercurio presentes en algas debían de ser muy bajas y así lo fueron, encuadrándose todas dentro del marco legal establecido. Sí bien la parte de la liofilización ineficaz de dos de ellas pudiera haber resultado un problema, no lo fue finalmente, al obtenerse unos resultados semejantes al cortar trozos enteros de las muestras.

7.2) Moluscos

En este caso se han analizado chirlas, almejas y ostras, que son animales invertebrados, que poseen una concha calcárea que protege la masa visceral. Son animales de pequeño tamaño, por lo cual la biomagnificación no sería esperable en ellos. Sin embargo, dado que son filtradores de agua, si las aguas en las que se encuentran están contaminadas, estos productos contaminantes se acumularan en estos seres. Como ejemplo cabe mencionar que una ostra puede llegar a filtrar cinco litros de agua por hora.

No obstante, y suponiendo que no provengan de aguas contaminadas, los contenidos de mercurio esperables en estos animales son bajos, según la [Tabla 1.], la almeja debería contener 0,009 mg/Kg y la ostra 0,012 mg/Kg, no existiendo datos sobre la chirla.

El principal problema de estas muestras fue la homogenización, pues al ser la parte visceral (parte de interés para la medición) muy pequeña, obligó a que se tuviesen que juntar varios especímenes (varias chirlas, varias almejas y varias ostras) para pulverizarlas juntas, para poder obtener de esta manera suficiente cantidad de muestra para el análisis. Al pulverizarlas, la naturaleza de la muestra (al ser muy pequeña, tener parte de sal y pequeños trozos desprendidos de la concha) impedía poder tener una correcta pulverización. Todo esto provocó que al pesar una muestra se tuviese una gran incertidumbre sobre que parte en concreto provenía dicha pesada. Todo esto provocó que los moluscos fuesen las únicas muestras con una desviación estándar relativa mayor al 15%, aun siendo las únicas muestras que en vez de medirse por triplicado se midieron cinco veces cada una.

7.2.1) Chirla

Fue la primera muestra de esta naturaleza que se midió y los resultados fueron anómalos, tanto que eran mucho más altos de lo esperado y además muy dispares entre sí. Esto obligó a medir cinco veces cada muestra dando un resultado final de 0,259 mg/Kg, que sí bien se encuentra por debajo del límite legal de 0,5 mg/Kg y no se encontraron datos de la chirla en la bibliografía, estaban muy por encima de los datos que se tenían de la almeja y la ostra, siendo además estos dos más grandes que las chirlas. Además, debido a los problemas de homogeneidad anteriormente mencionados, la desviación estándar relativa fue de un 34,4%.

7.2.2) Almeja

Fue una muestra que también se tuvo que medir cinco veces dado que los resultados que se iban obteniendo eran dispares, pero al final esta resultó ser la única muestra de los moluscos que acabo por debajo del 15% recomendable de desviación estándar relativa, con un 8,46%. El resultado obtenido fue de 0,965 mg/Kg, un resultado que se encuentra muy por encima del límite legal de peces y productos de la pesca de 0,5 mg//Kg.

7.2.3) Ostra

En este caso también se realizaron cinco mediciones de la muestra y la desviación estándar relativa volvió a aumentar hasta 31,1%. Lo resultados obtenidos fueron los más bajos en moluscos 0,180 mg/Kg, y se encuentran dentro del límite legal pero más de diez veces por encima de lo esperado.

7.2.4) Discusión

Los resultados obtenidos están muy alejados de lo que se esperaba, según la bibliografía encontrada. Sobre la chirla no se disponían datos, pero se supuso que al ser un molusco más pequeños que los otros dos de los que si se tenía datos, los resultados deberían de ser inferiores a estos. Sin embargo, esto depende de la fuente de mercurio. Si proviene del filtrado, entonces un tamaño menor puede aumentar la concentración. En cualquier caso, el resultado fue bastante elevado a pesar de encontrarse por debajo del límite.

Las ostras presentaron el resultado más bajo de los moluscos, y aunque también se encontraba por debajo del límite legal, la concentración hallada fue más de diez veces superior a la esperada.

La explicación a estos resultados puede estar relacionada con la naturaleza de la zona de captura. Ambas muestras fueron capturadas en la zona FAO 37, más concretamente en la zona FAO 37.2.1 en la chirla y la zona FAO 37.1 la ostra. Esta zona corresponde al mar mediterráneo, el cual hace años que presenta un preocupante aumento de la contaminación. Esto es debido a la industria, a todos los desechos que se generan en los grandes núcleos urbanos cercanos a las costas y al turismo. Todo esto podría relacionarse con el aumento de mercurio en estas muestras.

En lo que respecta a la almeja, el resultado es cien veces mayor al esperable basándose en la [Tabla 1.], encontrándose ampliamente por encima del límite legal, llegado incluso casi a rebasar el límite especial que solo incluye a peces que por su naturaleza acumulan una gran cantidad de mercurio de 1,0 mg/Kg.

La procedencia de estas muestras es de la zona FAO 27.9 correspondiente a la costa portuguesa y española, hasta el estrecho de Gibraltar del océano Atlántico. Este resultado sirve para dar veracidad, a las cada vez más frecuentes voces que dicen que el nivel de mercurio en los productos marinos se está disparando (Cinnirella et al., 2019).

7.3) Peces

Este es el apartado más heterogéneo debido a la diferente naturaleza de todas las muestras tomadas, por lo que cada caso se va a tratar en particular, pues hasta la legislación en el Reglamento (CE) N°1881/2006, diario oficial de la Unión Europea (DOUE) de 2006 , indica límites máximos diferentes según las especies, estableciendo 0,5 mg/Kg para la mayoría de pescados y productos marinos, pero diferenciando algunos que por su naturaleza acumulan más mercurio, como el rape, el pez espada, el tiburón y demás peces de gran tamaño, para los que establece un límite especial de 1,0 mg/Kg.

Cabe destacar que, en este apartado, al encontrarse muestras que debido a su naturaleza si va a contener cantidades de mercurio más elevadas que las anteriores, se han medido dos muestras diferentes de cada pescado, excepto del pez espada que se han medido tres y la panga que se ha medido solo una.

7.3.1) Salmon

Esta muestra se liofilizó y se pulverizó correctamente, dando lugar a un polvo muy homogéneo que facilitó tanto las pesadas como el obtener unos resultados semejantes. Los resultados obtenidos fueron 0,124 y 0,119 mg/Kg, ambos por debajo del límite legal de 0,5mg/Kg, pero el doble de lo esperado, pues la [Tabla 1.] preveía un nivel de 0,07 mg/Kg.

La proveniencia de esta muestra es la zona FAO 67, esta corresponde con la zona del Pacífico Norte, más concretamente la costa de Alaska y esta puede ser una explicación a este nivel algo más alto del esperado, pues un estudio realizado por el Centro Nacional francés de investigación científica (CNRS) y Universidad de Colorado, publicado en la revista “Nature”, indico que la vegetación y el suelo de la tundra de Alaska acumula mercurio a lo largo de todo el año, y en la primavera en la época de deshielo, este mercurio es arrastrado y acaba en las aguas anexas a las zonas en las que se encontraba (Martin Jiskra, 2017).

7.3.2) Trucha

En el tratamiento de liofilización y pulverizado las muestras se comportaron según lo esperado, y los resultados obtenidos fueron 0,350 y 0,310 mg/Kg, unos valores inferiores al límite legal de 0,5 mg/Kg, pero nuevamente superior a lo esperado según la [Tabla 1.], que indicaba un valor de 0,07 mg/Kg.

El distintivo de esta muestra que la diferencia de todas las demás analizadas hasta ahora, es que esta trucha no es salvaje, si no que proviene de una piscifactoría. Dicha piscifactoría según el etiquetado del producto se encuentra en España, todo esto hace que los resultados obtenidos sean muy singulares, puesto que en las piscifactorías no puede ocurrir un efecto de bioacumulación por depredación, sin disponer de más datos como la localización exacta de la piscifactoría, no se puede hacer un juicio mayor de los motivos de estos resultados anormalmente altos.

7.3.3) Caballa

Esta fue otra muestra con un excelente comportamiento a la hora de la liofilización y la pulverización. Los resultados obtenidos fueron 0,375 y 0,304 mg/Kg, resultados nuevamente inferiores al límite legal de 0,5 mg/Kg, pero superiores a lo esperado teniendo en cuenta la [Tabla 1.] que indicaba valores unos siete veces inferiores 0,05 mg/Kg.

Además, en este caso teniendo en cuenta la proveniencia de la muestra, zona FAO 34, sin mayor especificación y al referirse a una zona muy amplia de atlántico centro-este cercano a las costas de África, no se puede realizar una valoración más en detalle de los posibles motivos de este resultado.

7.3.4) Panga

Otra muestra con un comportamiento excelente en el tratamiento previo a ser medida, y con un resultado de 0,022 mg/Kg, un resultado muy bajo que se encuentra dentro del marco legal. De este pescado no se ha encontrado bibliografía de datos concretos, pero si sorprende el resultado, pero de manera positiva en este caso. Puesto que esta es la segunda y última muestra que proviene de piscifactoría, pero esta según el etiquetado se encuentra ubicada en Vietnam, país en el que la contaminación es bastante elevada, lo que invitaba a esperar un resultado mayor (Hoang Quoc Anh et al., 2019).

No obstante, cabe destacar que dicha muestra es la única que debido a que en ninguna pescadería se comercia en fresco, se tuvo que comprar congelada.

7.3.5) Rape

Este pescado sí bien se liofilizó correctamente, a la hora de la pulverización dio lugar a una muestra poco pulverulenta y muy deshilachada, lo que complicó la homogenización y la pesada. Los resultados obtenidos fueron 1,070 y 1,160 mg/Kg, que se encuentran ligeramente por encima del límite legal que para este pescado y todos los siguientes, 1,0 mg/Kg. Y considerablemente superior a lo esperado por la bibliografía encontrada que indicaba un valor de 0,181 mg/Kg.

No obstante, hay que ser cautos al ser la diferencia con el valor legal pequeño.

Así cabe destacar que el intervalo de confianza para las muestras en este caso es de 0,061 y 0,218 mg/Kg, lo cual hace que la segunda se encuentre dentro del rango legal y la primera fuera por muy poco. La zona de captura tampoco permite esclarecer el motivo del alto nivel de Hg en esta muestra, puesto que proviene de la zona FAO 27 correspondiente al Atlántico noreste sin mayor especificación.

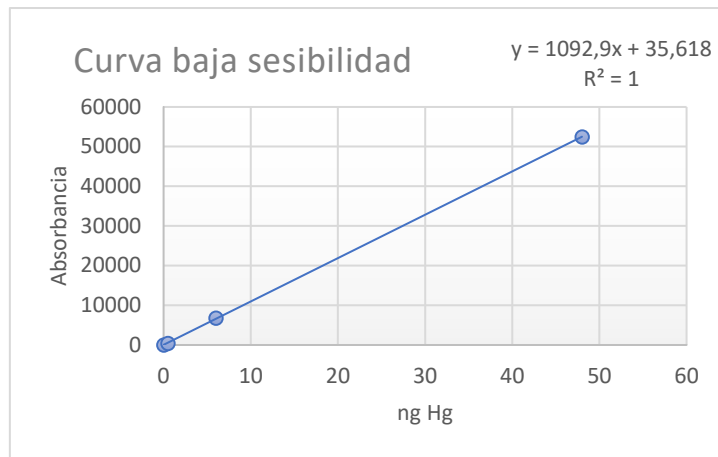
7.3.6) Atún de ojo grande

Fue otra muestra que se liofilizó y pulverizó correctamente, y posteriormente se obtuvieron unos resultados de 0,976 y 0,886 mg/Kg. Un resultado que se encuentra por debajo del límite legal de 1,0 mg/Kg. Además, esta es la primera muestra de esta naturaleza que se encuentra muy cerca del valor encontrado en la bibliografía de 0,689 mg/Kg.

La zona de captura fue FAO 34, correspondiente nuevamente al Atlántico centro este.

7.3.7) Bonito

La liofilización en esta muestra no ocurrió correctamente, quedando cierta humedad debido a la grasa de la misma. Esto provocó que la pulverización fuese más complicada y no se lograra un polvo totalmente homogéneo. Además, a la hora de medir la absorbancia de cada pesada, el valor obtenido se salía por mucho del rango de linealidad. Por lo tanto, se tuvo que realizar un recalibrado del instrumental con puntos mucho más concentrados, con los que se obtuvo una nueva ecuación usando las absorbancias dadas por la celda de baja sensibilidad.



[Tabla 12. Curva de baja sensibilidad para muestras con valores elevados.]

Con esta nueva ecuación y los datos de baja sensibilidad se hizo una tabla similar para calcular todos los datos anteriormente mencionados, obteniéndose unos resultados de 5,11 y 4,43 mg/Kg, un resultado muy superior al límite legal de 1,0 mg/Kg y muy superior al comparado con lo esperado en la [Tabla 1.]de 0,358 mg/Kg.

La zona de procedencia ofrece el mismo problema de inexactitud que en las anteriores muestras, al ser la zona FAO 34. Esta es la primera muestra que refiere una diferencia tan grande con lo esperado y supera por un margen tan amplio el límite legal más alto.

7.3.8) Pez espada

Fue la última muestra que se midió, ya que era de la que se esperaba una concentración teórica más elevada. El proceso de liofilización y pulverización no fue perfecto, pero si lo suficientemente satisfactorio como para obtener una muestra bastante homogénea. En este caso se midieron tres muestras diferentes y una de ellas ofrecía señales por encima del rango lineal, por lo que para calcular el resultado final se tuvo que usar la ecuación del recalibrado que se hizo para el bonito. Los resultados fueron 1,690 16,59 y 1,485 mg/Kg, todos por encima del límite, aunque este hecho no sea tan sorprendente porque el resultado esperado era de 0,995 mg/Kg al borde del límite legal.

Por ello los resultados de 1,690 y 1,485 a pesar de estar por encima del límite legal son unos resultados comprensibles en esta especie, pero el resultado de 16,59 resulta más preocupante puesto que supone un peligro mayor para el consumidor. La explicación de estos resultados la podemos encontrar nuevamente en la zona de captura, que corresponde a la zona FAO 61, zona respectiva al pacifico noreste en contacto con la costa de Asia y

Japón. Esta zona ha demostrado ser conflictiva en el pasado con casos como el de Minamata, aunque no se puede especificar más por falta de información. Además, el pez espada es un gran depredador y al no poder realizar controles a todas las piezas que se introducen al mercado y teniendo en cuenta la gran variabilidad que puede existir entre ejemplares, parece que este pez acumuló una cantidad de Hg 10 veces mayor que los otros por alimentarse mucho más o en zonas más contaminadas.

8) Conclusiones

Este estudio confirma la importancia del control sobre el mercurio en la población debido a las graves consecuencias que puede acarrear sobre la salud humana. Por tanto, y dados los efectos beneficiosos que la ingesta de pescado tiene en la salud humana, es recomendable controlar las cantidades a ingerir, siguiendo las recomendaciones de la FAO y la OMS de ingesta semanal.

En lo referente a la parte práctica del estudio cabe remarcar que el proceso de liofilización no ocurrió de la misma manera en todas las muestras, esto es debido a que fue una mezcla muy heterogénea de diferentes especies, y todas se vieron sometidas al mismo tratamiento. Si este estudio se repitiese teniendo los datos de esta liofilización, se podría optimizar para aquellas muestras que la liofilización resultó ineficaz. La pulverización también se podría mejorar en aquellas muestras que dieron un polvo más grueso o deshilachado del deseado, empleando un molino mecánico en vez de realizar este proceso de manera manual. La parte de medición resultó ser sencilla y directa, pudiendo automatizarse en casi toda su totalidad.

Respecto a los resultados, la mayoría de las muestras se encontraban dentro del límite legal. Sin embargo, casi todas daban valores superiores a los esperados de acuerdo con la [Tabla 1] (menos las algas y la panga), y algunas de las muestras se encontraban incluso por encima de los límites legales establecidos. Este hecho indica que dichos valores de referencia son meramente orientativos

9) Valoración personal

Este estudio me ha permitido desarrollar muchas capacidades aprendidas a lo largo de la carrera, en primer lugar, para seleccionar la información necesaria previa al estudio, hacer un primer sondeo con toda la información adquirida, eliminando aquella de dudosa procedencia o que no se ajuste a las necesidades del estudio. Con toda esta información elaborar un camino lógico a seguir dentro del trabajo, desarrollando cada uno de los apartados que aparecen en el mismo.

En segundo lugar, me ha permitido poner en práctica distintos conocimientos sobre el uso de instrumental, tanto en la liofilización, como en la medición de las muestras mediante el uso de espectrometría de absorción atómica. Y este apartado es muy importante ya que no se trabaja en un ambiente controlado como en las practicas, donde si bien a veces aparecen contratiempos, como bien me dijo una compañera del laboratorio, “las practicas están hechas para que salgan bien, esto no”, eso implicó una serie de problemas que fueron apareciendo y que tenía que ir solucionando.

Con toda la información recopilada y los resultados correctos obtenidos, el siguiente reto fue la redacción del trabajo, seguir las pautas establecidas y encuadrarse en un margen dado, sin saturar innecesariamente el trabajo con información insustancial.

Como resumen general opino que es un trabajo que me ha ayudado a ver como se trabaja fuera de un entorno dirigido, que además me ha permitido poner en práctica capacidades aprendidas estos años, y como último, pero no menos importante, me ha permitido informarme de un tema que resulta ser un peligro tan importante como lo es el mercurio y las interacciones que tiene este con nosotros. Así como las causas del continuo crecimiento de este problema, y la certeza de que se tiene que empezar a remediar antes de que sea demasiado tarde, todas las causas que provocan este acentuado crecimiento del mismo.

10) Bibliografía

US EPA. (2019). *Información básica sobre el mercurio / US EPA*. Disponible en: <https://espanol.epa.gov/espanol/informacion-basica-sobre-el-mercurio> [Consultado: 15 oct. 2019].

Organización Mundial de la Salud (2017). *El mercurio y la salud*. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/mercury-and-health> [Consultado: 17 oct. 2019].

Tomé, C. (2019). *El caso de los enfermos de Minamata*. Cuaderno de Cultura Científica. Disponible en: <https://culturacientifica.com/2018/03/04/caso-los-enfermos-minamata/> [Consultado: 17 Oct. 2019].

US EPA. (2019). *Efectos en la salud por la exposición al mercurio / US EPA*. Disponible en: <https://espanol.epa.gov/espanol/efectos-en-la-salud-por-la-exposicion-al-mercurio> [Consultado: 15 Oct. 2019].

Aecosan.msssi.gob.es. (2019). *Aecosan - Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición*. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/mercurio.htm [Consultado: 17 Oct. 2019].

D. G., Cooper. (1976). *La tabla periódica*. Barcelona: Reverté, S.A, pp.79-82.

Forsberg, J. (2014). *Teledyne Leeman Labs Mercury Analyzers for Today's Lab "Thermal Decomposition Hg Analyzer"*.

Diario oficial de la Union Europea (2006). *REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN de 19 de diciembre de 2006*. DOUE.

Jiskra, M. (2017). *Mercury in the Arctic Ocean: Stopover in the tundra*. Disponible en: <http://www.cnrs.fr/en/mercury-arctic-ocean-stopover-tundra>.

RASFF (2014). *2014 anual report*. Disponible en: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2014.pdf

Cimaindustries.com. (2019). *Las principales etapas de la liofilización – CIMA® INDUSTRIES*. Disponible en: <https://cimaindustries.com/es/las-principales-etapas-de-la-liofilizacion/> [Consultado: 30 Oct. 2019].

Cinnirella, S., Bruno, D., Pirrone, N., Horvat, M., Zivkovic, I., Evers, D., Johnson, S. and Sunderland, E. (2019). *Mercury concentrations in biota in the Mediterranean Sea, a compilation of 40 years of surveys*. Disponible en:
<https://www.nature.com/articles/s41597-019-0219-y.pdf>

Hoang, Q., Tri Manh, T., Nguyen, T. and Shin, T. (2019). *Screening analysis of organic micro-pollutants in road dusts from some areas in northern Vietnam: A preliminary investigation on contamination status, potential sources, human exposure, and ecological risk*.

Rumble, J., Lide, D. and Bruno, T. (n.d.). *CRC handbook of chemistry and physics [2019-2020]*.

López Anton, M. y Martínez Tarazona, M. (2018). *El mercurio*. Madrid: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

11) Anexos

3.3	Mercurio	
3.3.1	Productos de la pesca (26) y carne de pescado (24) (25), excluidas las especies enumeradas en el punto 3.3.2. El contenido máximo se aplica a los crustáceos, excluida la carne oscura del cangrejo, así como la cabeza y el tórax de la langosta y de crustáceos similares de gran tamaño (Nephropidae y Palinuridae)	0,50
3.3.2	Carne de los siguientes pescados (24) (25): rape (Lophius species) perro del norte (Anarhichas lupus) bonito (Sarda sarda) anguila (Anguilla species) reloj (Hoplostethus species) granadero (Coryphaenoides rupestris) fletán (Hippoglossus hippoglossus) marlin (Makaira species) gall (Lepidorhombus species) salmonete (Mullus species) lucio (Esox lucius) tasarte (Orcynopsis unicolor) mollera (Tricopterus minutes) pailona (Centroscyrnus coelolepis) raya (Raja species) gallineta nórdica (Sebastes marinus, S. mentella, S. viviparus) pez vela (Istiophorus platypterus) espadilla (Lepidopus caudatus, Aphanopus carbo) besugo o aligote (Pagellus species) tiburón (todas las especies) sierra (Lepidocybium flavobrunneum, Ruvettus pretiosus, Gempylus serpens) esturión (Acipenser species) pez espada (Xiphias gladius) atún (Thunnus species, Euthynnus species, Katsuwonus pelamis)	1,0

[Tabla 13. Reglamento (CE) N°1881/2006 (UE,2006)]

	Peso	Abs	Escala	Hg	Concentra	Media	DE	DER	INTEC (95%)
Alga Lec	0,0139	962	LOW	0,115	0,008				
	0,0104	524	LOW	0,079	0,008				
	0,0106	577	LOW	0,083	0,008	0,007	0,0003	4,69	0,0009
Espg	0,0223	1245	LOW	0,145	0,007				
	0,0185	1023	LOW	0,129	0,007				
	0,0225	1641	LOW	0,176	0,008	0,007	0,0006	9,19	0,0016
Kombu	0,0121	1498	LOW	0,165	0,014				
	0,0151	1508	LOW	0,165	0,011				
	0,0109	926	LOW	0,121	0,011	0,011	0,0014	12,51	0,003
Chirla	0,0081	38452	LOW	3,256	0,402				
	0,0101	20284	LOW	1,737	0,172				

	0,0101	41917	LOW	3,545	0,351				
	0,0098	29476	LOW	2,506	0,256				
	0,0099	13489	LOW	1,169	0,118	0,259	0,089	34,48	0,111
Almeja	0,00825	94557	LOW	7,947	0,963				
	0,0064	74697	LOW	6,286	0,982				
	0,0102	100703	LOW	8,462	0,830				
	0,0045	69218	LOW	5,827	1,295				
	0,0052	47024	LOW	3,970	0,763	0,966	0,083	8,60	0,103
Ostra	0,0065	10442	LOW	0,915	0,141				
	0,0064	19954	LOW	1,710	0,267				
	0,0073	17700	LOW	1,521	0,208				
	0,0102	15972	LOW	1,377	0,135				
	0,0063	10757	LOW	0,941	0,149	0,180	0,056	31,53	0,070
Salmon 1	0,0064	8504	LOW	0,746	0,117				
	0,0085	13075	LOW	1,129	0,133				
	0,0084	12106	LOW	1,048	0,125	0,124	0,008	6,49	0,020
Salmon 2	0,0098	13685	LOW	1,186	0,121				
	0,0096	13055	LOW	1,133	0,118				
	0,0158	22338	LOW	1,909	0,121	0,119	0,001	1,39	0,004
Trucha 1	0,0147	63832	LOW	4,978	0,339				
	0,013	57770	LOW	4,509	0,347				
	0,0099	46177	LOW	3,614	0,365	0,350	0,013	3,85	0,033
Trucha 2	0,015	52216	LOW	4,080	0,272				
	0,0102	42956	LOW	3,365	0,330				
	0,0151	64034	LOW	4,994	0,331	0,310	0,033	10,82	0,083
Caballa 1	0,0098	43430	LOW	3,669	0,374				
	0,0105	46559	LOW	3,931	0,374				
	0,0098	43803	LOW	3,700	0,378	0,375	0,001	0,49	0,004
Caballa 2	0,0112	44509	LOW	3,437	0,307				
	0,0102	39471	LOW	3,053	0,299				
	0,0117	46694	LOW	3,603	0,308	0,304	0,004	1,53	0,011
Panga	0,0046	949	LOW	0,114	0,025				
	0,0053	1057	LOW	0,123	0,023				
	0,0079	1432	LOW	0,155	0,020	0,022	0,002	11,96	0,006
Rape 1	0,0135	168677	LOW	14,150	1,048				
	0,0073	95277	LOW	8,008	1,097				
	0,0098	124322	LOW	10,438	1,065	1,07	0,024	2,32	0,061
Rape 2	0,0035	52326	LOW	4,415	1,262				
	0,0077	100465	LOW	8,439	1,096				
	0,0048	64205	LOW	5,408	1,127	1,16	0,088	7,58	0,218
Atun 1	0,0044	51817	LOW	4,373	0,994				
	0,0069	79694	LOW	6,703	0,971				
	0,0056	64205	LOW	5,408	0,966	0,976	0,014	1,52	0,036

Atun 2	0,0047	53572	LOW	4,126	0,878				
	0,0045	50149	LOW	3,866	0,859				
	0,0062	69631	LOW	5,348	0,863	0,866	0,010	1,16	0,024
Bonito 1	0,0064	35713	HIGH	32,672	5,105				
	0,005	27751	HIGH	25,380	5,076				
	0,0063	35526	HIGH	32,500	5,159	5,11	0,041	0,82	0,104
Bonito 2	0,0054	27024	HIGH	24,715	4,577				
	0,0029	14011	HIGH	12,798	4,413				
	0,0029	13740	HIGH	12,550	4,328	4,43	0,126	2,85	0,314
Espada 1	0,004	80208	LOW	6,747	1,687				
	0,0057	111497	LOW	9,365	1,643				
	0,0038	78854	LOW	6,633	1,746	1,69	0,051	3,04	0,127
Espada 2	0,0028	48846	HIGH	44,698	15,964				
	0,0047	87162	HIGH	79,786	16,976				
	0,0038	69967	HIGH	64,040	16,853	16,5	0,552	3,33	1,371
Espada 3	0,0024	49726	LOW	3,833	1,597				
	0,0037	71115	LOW	5,460	1,476				
	0,0027	48482	LOW	3,739	1,385	1,48	0,106	7,18	0,264

[Tabla 14. Tabla de resultados]