

**VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA  
PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y METILMERCURIO EN  
MUESTRAS DE CABELLO POR ANALIZADOR DIRECTO DE MERCURIO.**

**DIANA CAROLINA RUIZ PAEZ**



**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
MONTERÍA – CÓRDOBA  
2021**

**VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA  
PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y METILMERCURIO EN  
MUESTRAS DE CABELLO POR ANALIZADOR DIRECTO DE MERCURIO**

**DIANA CAROLINA RUIZ PAEZ**

**Trabajo de grado Presentado como requisito para optar el título de QUÍMICO**

**DIRECTOR**

**ROBERTH DE JESUS PATERNINA URIBE, M. Sc.**

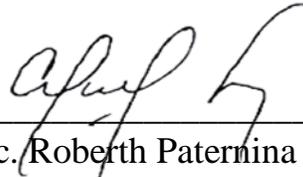
**CO-DIRECTOR**

**IVAN DAVID URANGO CÁRDENAS, M. Sc.**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
PROGRAMA DE QUÍMICA  
MONTERÍA – CÓRDOBA  
2021**

**Nota de aceptación:**

El trabajo de grado titulado “VALIDACIÓN E IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO Y METILMERCURIO EN MUESTRAS DE CABELLO POR ANALIZADOR DIRECTO DE MERCURIO” realizado por DIANA CAROLINA RUIZ PAEZ, cumple con los requisitos exigidos por la facultad de Ciencias Básicas para optar por el título de Químico y ha sido aprobado.



---

M.Sc. Roberth Paternina Uribe  
Director



---

M.Sc. Iván David Urango Cárdenas  
Codirector

Mauricio R Lora A  
Cc: 1067860302

---

M.Sc. Mauricio Rafael Lora Agamez  
Jurado



---

M.Sc. José Joaquín Pinedo Hernández  
Jurado

*Dedicatoria*

*A Dios primeramente por todo su amor, por darme sabiduría, salud y fuerzas para terminar mi carrera a pesar de las adversidades y este proyecto el cual es un logro muy importante para mí.*

*A mis padres Dionisio Miguel Ruiz Anichiarico y Ludis Rosa Paez Urango a los cuales me enseñaron el valor de la humildad y el respeto, a ellos dedico este logro por ser mi luz en momentos de oscuridad, por la educación que me brindaron y la confianza que siempre estuvo puesta en mí.*

*A mi hermana Danna Paola Ruiz Paez por ser esa chispa que alegra mis días, por su amor, compañía y las enseñanzas que me han dejado en todos los momentos que compartimos juntas.*

*A mi novio Alberto Rafael Flórez Soto por su amor, su compañía, sus sabias palabras y por estar a mi lado en los momentos de debilidad.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por mostrarme el camino y la fuerza para seguir adelante, fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, en el cumplimiento de este sueño.

Agradezco a la Universidad de Córdoba por permitir formarme tanto profesional como personalmente, a PhD José Luis Marrugo por permitir el desarrollo de este trabajo en el Laboratorio de Toxicología y Gestión Ambiental, adquiriendo muchos conocimientos y desarrollando aún más mis destrezas.

A todos los profesores que hacen parte del programa de química los cuales hicieron un gran aporte en mi formación tanto académica como personal a través de toda la carrera.

A mi director Roberth Paternina y Codirector Ivan Urango, quienes han sido un gran apoyo para mí en todo este proceso, gracias por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección, y en especial agradecimiento a la Profesora Saudith Burgos por todos sus aportes y consejos en todo momento.

A mis amigos Sol María López, Elibeth Arzuaga, Daniela Tano, María José Mendoza, Clarena Ceballos y Leandro fuentes, quienes fueron de apoyo y me brindaron su amistad incondicionalmente e hicieron de esta experiencia la mejor y a todos aquellos que aportaron un granito de arena en todo mi proceso.

Al grupo de toxicología y gestión ambiental, Joel, Daniela, Luis, German, Lucy, Dioris, Yuris, Sandra y en especial a mi primera codirectora Leidy Mercado por todas las enseñanzas, gracias por su apoyo.

Este trabajo de investigación se financia con recursos del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación - Minciencias y se realizó en el marco de Proyecto: Evaluación del grado de contaminación por mercurio y otras sustancias tóxicas y su afectación en la salud humana en las poblaciones de la cuenca del río Atrato, como consecuencia de las actividades de minería. Contrato de financiamiento RC No. 849-2018, Código Minciencias: 1112-894-66291.

# **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

## **TRABAJOS DE GRADO – Restricciones de uso**

### **DERECHOS DE PROPIEDAD INTELECTUAL – prohibición de reproducción**

Todo el material contenido en este documento está protegido por la Constitución política de Colombia, y las Leyes de propiedad intelectual a Derechos de Autor existentes en Colombia.

El uso de imágenes (figuras, mapas, fotografías, entre otras), tablas y demás elementos contenidos en este documento, que sea objeto de protección de la propiedad intelectual será únicamente para usos educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo, mencionando el autor o los autores. Cualquier uso distinto como el lucro o beneficio, reproducción, edición o modificación, entre otros aspectos, incurrirá en violación a la ley y estará sujeto a sanciones que se establezcan con el fin de proteger los derechos del titular de la propiedad intelectual.

La responsabilidad ética, legal y científica de las ideas, conceptos y resultados del proyecto, serán responsabilidad de los autores. Artículo 61, acuerdo N° 093 del 26 de noviembre de 2002 del consejo superior.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. RESUMEN.....	15
2. INTRODUCCIÓN .....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Objetivo general.....	19
3.2. Objetivos específicos .....	19
4. MARCO TEÓRICO .....	20
4.1. Mercurio (Hg) .....	20
4.1.1. <i>Propiedades físicas y químicas</i> .....	21
4.1.2. <i>Ciclo biogeoquímico del mercurio.</i> .....	21
4.1.3. <i>Toxicidad del mercurio</i> .....	22
4.1.4. <i>Mercurio en el ambiente y la salud humana</i> .....	23
4.2. Metilmercurio .....	23
4.3. Fuentes de contaminación.....	24
4.3.1. <i>Fuentes naturales</i> .....	25
4.3.2. <i>Fuentes antropogénicas</i> .....	25
4.4. Contaminación minera.....	25
4.5. Mercurio y metilmercurio en cabello.....	26
4.6. Metodología analítica para la determinación de mercurio total.....	26
4.6.1. <i>Interferencias</i> .....	27
4.7. Espectrometría de absorción atómica .....	27
4.8. Equipamiento utilizado .....	28
4.8.1. <i>DMA-80 Milestone</i> .....	28
4.8.2. <i>Analizador de mercurio RA-915M PYRO-915+</i> .....	29
5. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO.....	31
5.1. Linealidad y rango lineal .....	31
5.1.1. <i>La Linealidad</i> .....	31
5.1.2. <i>Rango lineal</i> .....	31
5.2. Límite de detección.....	33
5.3. Límite de cuantificación .....	34
5.4. Precisión.....	34

5.4.1.	<i>Repetibilidad</i> .....	34
5.4.2.	<i>Precisión intermedia</i> .....	34
5.5.	Exactitud .....	35
5.5.1.	<i>Porcentaje de error</i> .....	36
5.5.2.	<i>Porcentaje de recuperación</i> .....	36
5.6.	Incertidumbre.....	36
5.6.1.	<i>Fuentes de incertidumbre</i> .....	37
5.6.2.	<i>Componentes de la incertidumbre</i> .....	38
5.7.	Robustez y selectividad.....	38
6.	METODOLOGÍA .....	39
6.1.	Reactivos, materiales y equipos .....	39
6.1.1.	<i>Reactivos grado analítico</i> .....	39
6.1.2.	<i>Materiales</i> .....	39
6.1.3.	<i>Materiales de referencia</i> .....	40
6.1.4.	<i>Equipos</i> .....	40
6.2.	Análisis de muestras .....	40
6.2.1.	<i>Obtención de muestras en matriz biológica (cabello)</i> .....	40
6.2.2.	<i>Determinación de HgT</i> .....	40
6.2.3.	<i>Determinación de MeHg</i> .....	41
6.3.	Análisis Estadístico.....	41
7.	VALIDACIÓN DEL MÉTODO.....	42
7.1.	Incertidumbre.....	44
7.2.	Implementación.....	45
8.	RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	46
8.1.	Parámetros de validación para HgT y MeHg.....	47
8.1.1.	<i>Linealidad y rango lineal</i> .....	47
8.1.2.	<i>Análisis de regresión lineal HgT y MeHg</i> .....	48
8.1.3.	<i>Test t-student para la pendiente y el intercepto o variable independiente HgT y MeHg</i>	49
8.1.4.	<i>Test de cochran para HgT y MeHg</i> .....	50
8.1.5.	<i>Análisis de varianza</i> .....	51
8.1.6.	<i>Precisión del sistema para HgT y MeHg</i> .....	52
8.1.7.	<i>Exactitud</i> .....	53

8.1.8.	<i>Precisión del método para HgT y MeHg</i> .....	54
8.1.9.	<i>Precisión intermedia</i> .....	55
8.1.10.	<i>Exactitud del método</i> .....	55
8.1.11.	<i>Análisis material de referencia</i> .....	56
8.1.12.	<i>Límite de detección y cuantificación</i> .....	57
8.1.13.	<i>Robustez y selectividad del método para MeHg</i> .....	58
8.2.	<i>Incertidumbre</i> .....	59
8.2.1.	<i>Incertidumbre del estándar de Hg</i> .....	59
8.2.2.	<i>Incertidumbre peso molecular del Hg</i> .....	59
8.2.3.	<i>Incertidumbre Preparación estándar 0.01, 0.1, 1, Y 10 ppm.</i> .....	60
	<i>MeHg</i>	61
9.	CONTROL DE PROCESO PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS .....	62
10.	IMPLEMENTACIÓN .....	62
11.	CONCLUSIONES .....	64
12.	RECOMENDACIONES .....	66
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	67

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

<i>Abreviatura</i>	<i>Término</i>
EPA	Agencia de Protección Ambiental
DMA	Analizador Directo de Mercurio
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
g	Gramo
kg	Kilogramo
LC	Límite de Cuantificación
LD	Límite de Detección
HgT	Mercurio Total
MeHg	Metilmercurio
μL	Micro litro
mg	Miligramo
OMS	Organización Mundial de la Salud
%CV	Porcentaje de Coeficiente de Variación
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas Para el Medio Ambiente
μg	Microgramo

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pag</b>
<b>Figura 1.</b> Ciclo biogeoquímico del mercurio.....	22
<b>Figura 2.</b> Bioacumulación de metilmercurio .....	24
<b>Figura 3.</b> Contaminación minera con mercurio.....	26
<b>Figura 4.</b> Principio de operación del DMA-80 .....	29
<b>Figura 5.</b> DMA-80 Milestone.....	29
<b>Figura 6.</b> Principio de operación del Analizador de mercurio RA-915M PYRO-915+ Rumayor Villamil, 2015.....	30
<b>Figura 7.</b> Analizador de mercurio RA-915M PYRO-915+.....	30
<b>Figura 8.</b> Curva de calibrado de HgT para rango bajo (a), medio (b), alto (c) y MeHg para todo su rango (d).....	48
<b>Figura 9.</b> Gráficos de residuales de HgT para rango bajo (a), medio (b), alto (c) y MeHg para todo su rango (d).....	51

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pag</b>
<b>Tabla 1.</b> Diferentes formas químicas del mercurio en el ambiente .....	20
<b>Tabla 2.</b> Propiedades fisicoquímicas del Mercurio.....	21
<b>Tabla 3.</b> Valores orientativos aceptables según la AOAC para el factor de recuperación en función de la concentración del analito .....	35
<b>Tabla 4.</b> Condiciones del equipo utilizadas para el análisis .....	40
<b>Tabla 5.</b> Parámetros de validación del método para HgT .....	42
<b>Tabla 6.</b> Parámetros de validación del método para MeHg .....	43
<b>Tabla 7.</b> Identificación de las fuentes de incertidumbre para MeHg y HgT .....	44
<b>Tabla 8.</b> Fuentes de incertidumbre.....	44
<b>Tabla 9.</b> Rechazo de datos para HgT .....	46
<b>Tabla 10.</b> Rechazo de datos para MeHg .....	47
<b>Tabla 11.</b> Resumen de las ecuaciones de regresión para HgT y MeHg con sus respectivos coeficientes correlación y de determinación. ....	49
<b>Tabla 12.</b> Test t-student para la verificación de la pendiente y el intercepto HgT y MeHg	50
<b>Tabla 13.</b> Test de Cochran para HgT y MeHg.....	50
<b>Tabla 14.</b> Precisión del sistema para HgT .....	52
<b>Tabla 15.</b> Precisión del sistema para MeHg .....	53
<b>Tabla 16.</b> Exactitud del sistema para HgT y MeHg.....	53
<b>Tabla 17.</b> Repetibilidad del método para HgT y MeHg .....	54
<b>Tabla 18.</b> Precisión intermedia para HgT y MeHg.....	55
<b>Tabla 19.</b> Exactitud método HgT.....	56
<b>Tabla 20.</b> Exactitud del método para MeHg.....	56
<b>Tabla 21.</b> %R para material de referencia certificado .....	56
<b>Tabla 22.</b> Límite detección y cuantificación.....	57
<b>Tabla 23.</b> Análisis de comparación de varianzas entre cabello tinturado y sin tinturar .....	58
<b>Tabla 24.</b> Análisis de comparación de varianzas entre cabello sin tinturar lavado y sin lavar .....	58
<b>Tabla 25.</b> Incertidumbre debida a la preparación de estándares .....	60
<b>Tabla 26.</b> Incertidumbre combinada para el rango de trabajo HgT .....	60

<b>Tabla 27.</b> Incertidumbre debida a la preparación de estándar MeHg .....	60
<b>Tabla 28.</b> Incertidumbre combinada para el rango de trabajo MeHg .....	60
<b>Tabla 29.</b> Resumen de los parámetros de validación.....	61
<b>Tabla 30.</b> Análisis de muestras de cabello para HgT y MeHg .....	62

## LISTA DE ANEXOS

	<b>Pag</b>
<b>Anexo A.</b> Curva de calibrado por triplicado para cada rango HgT.....	73
<b>Anexo B.</b> Gráficas de regresión HgT.....	75
<b>Anexo C.</b> Precisión y exactitud HgT.....	76
<b>Anexo D.</b> Curva de calibrado por triplicado para todo el rango de trabajo MeHg.....	78
<b>Anexo E.</b> Gráficas de regresión MeHg.....	78
<b>Anexo F.</b> Precisión y exactitud MeHg.....	80
<b>Anexo F.</b> Incertidumbre diagrama de Ishikawa.....	82

## 1. RESUMEN

En el presente trabajo se validó una metodología analítica para la determinación de mercurio total y metilmercurio en cabello, la cual fue implementada por la técnica de espectrometría de absorción atómica, utilizando analizadores directo de mercurio DMA-80 y Analizador de mercurio RA-915M PYRO-915+, con el fin de obtener una técnica analítica que garantice la calidad, confianza y seguridad de los resultados, para ello se evaluaron los parámetros de validación necesarios como lo son: linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación, incertidumbre y robustez.

Los parámetros de validación arrojaron resultados que se encuentran dentro de los límites establecidos para una validación, los cuales fueron: HgT presenta linealidad para rango bajo (0,5 a 4,0 ng Hg) con un  $R^2$  de 0,9997, para rango medio (4,0 a 20 ng Hg) un  $R^2$  de 0,9990 y para rango alto (30 a 600 ng Hg) un  $R^2$  de 0,9986, para MeHg el  $R^2$  fue de 0,9997 en todo su rango. El límite de detección y cuantificación para HgT fue de 0,10 ng y 0,26 ng respectivamente, para MeHg fue de 0,59 ng y 1,61 ng respectivamente. La precisión en términos de (repetibilidad y precisión intermedia) se evaluó como %CV los cuales se encuentran dentro de los límites (<10%) según AOAC, tanto para HgT como para MeHg, lo cual indica que el método implementado es preciso, la exactitud expresada como (porcentaje de recuperación) para HgT estuvo entre 90,52-104,86% y para MeHg estuvo entre 84,92-111,13%, estos resultados se encuentran del rango designado por la AOAC, lo que concluye que los métodos son exactos.

Mediante los resultados obtenidos en la validación de esta metodología para la determinación de HgT y MeHg en Cabello, se concluyó que el método es confiable, brindando buenos resultados para el propósito establecido, debido a que los parámetros medidos se encuentran dentro de lo aceptado por la AOAC.

Palabras claves: Mercurio, Metilmercurio, Espectrometría, Validación, Cabello.

## ABSTRACT

In the present work, two analytical methods were validated for the determination of total mercury and methylmercury in hair, which were implemented by the atomic absorption spectrometry technique, using DMA-80 direct mercury analyzers and RA-915M PYRO-mercury analyzer. 915+, in order to obtain an analytical technique that guarantees the quality, confidence and safety of the results, for this, the necessary validation parameters were evaluated, such as: linearity, precision, accuracy, detection limit, quantification limit, uncertainty and robustness.

The validation parameters yielded results that are within the limits established for a validation, which were: HgT presents linearity for low range (0.5 to 4.0 ng Hg) with an R2 of 0.9997, for medium range (4.0 to 20 ng Hg) an R2 of 0.9990 and for high range (30 to 600 ng Hg) an R2 of 0.9986, for MeHg the R2 was 0.9997 throughout its range. The limit of detection and quantification for HgT was 0.10 ng and 0.26 ng respectively, for MeHg it was 0.59 ng and 1.61 ng respectively. The precision in terms of (repeatability and intermediate precision) was evaluated as% CV which are within the limits (<10%) according to AOAC, both for HgT and for MeHg, which indicates that the implemented method is precise, the accuracy expressed as (recovery percentage) for HgT was between 90.52-104.86% and for MeHg it was between 82.9-118.8%, these results are within the range designated by the AOAC, which concludes that the methods are exact.

Through the results obtained in the validation of this methodology for the determination of HgT and MeHg in Hair, it was concluded that the method is reliable, providing good results for the established purpose, because the measured parameters are within what is accepted by the AOAC.

Keywords: Mercury, Methylmercury, Spectrometry, Validation, Hair.

## 2. INTRODUCCIÓN

El Hg es uno de los contaminantes más peligrosos por sus niveles de toxicidad, está distribuido ampliamente en el ambiente de manera natural y mayormente por acciones antropogénicas, donde se modifica su ciclo natural y afecta sustancialmente a todos los compartimientos ambientales (Pacyna, 2020). La forma metilada del Hg es incluso más tóxica, porque tiene la característica de bioacumularse y biomagnificarse en el organismo afectando principalmente al sistema nervioso, además, atraviesa con facilidad la barrera placentaria y hematoencefálica lo cual genera un mayor riesgo en las mujeres en estado gestacional (Varga, et al 2019).

El Metilmercurio se forma cuando el mercurio elemental se libera al ambiente y se transforma a través de los procesos de metilación en complejos orgánicos presentes en los sedimentos, además se somete a un notable proceso de biomagnificación y se acumula en el tejido muscular de pescados y de especies de larga vida acuática, los cuales son consumidos más tarde por los seres humanos (Sánchez, 2018). Las formas orgánicas como el metilmercurio, son las asociadas a mayor variedad de efectos adversos para la salud humana, aproximadamente el 80% del mercurio total en el cabello está en forma metilada (PNUMA 2010). El cabello es una matriz ampliamente utilizada en numerosos estudios en todo el mundo, es estable a temperatura ambiente, fácil de almacenar, transportar y puede ser conservado por largos periodos de tiempo (Poulin, 2008).

En cuanto a la validación de estas metodologías, existen pocos métodos analíticos empleados para la determinación de HgT y MeHg en cabello (Ruiz, 2016). los cuales proporcionan información parcial acerca de su impacto en la salud humana y el medio ambiente, sin embargo, las validaciones que se han realizado son a nivel internacional, en Colombia no se ha realizado validaciones para determinar Mercurio total y metilmercurio en cabello, que es considerado un contaminante potencial (Ruiz, 2016).

Este trabajo se diseñó con el objetivo de tener un método validado que permitiera la cuantificación de Hg y MeHg en cabello con el fin de conocer de manera certera su posible toxicidad sobre las personas expuestas a este contaminante. Por lo que es necesario disponer de métodos analíticos listos para su uso que sean simples, de bajo costo, rápido tratamiento y sin efectos colaterales para el medio ambiente. Los métodos propuestos dan la posibilidad

de estimar el contenido de MeHg y HgT en muestras de cabellos utilizando dos instrumentos con una alta sensibilidad y exactitud en el proceso (Maggi et al 2007). De acuerdo a los métodos establecidos para realización de la validación, por la técnica de espectrometría de absorción atómica, se estipularon los parámetros óptimos para la determinación de estos compuestos, los cuales cumplen con todos los criterios establecidos de aceptación según la AOAC. La técnica se implementó con muestras tomadas en la subregión de (Bojayá) en el departamento del Chocó.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Toxicología y Gestión Ambiental de la Universidad De Córdoba en el Grupo de Investigación en Aguas, Química Aplicada y Ambiental, el cual cuenta con todas las técnicas y equipos requeridos para la realización del trabajo.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Validar e implementar un método analítico para la determinación de Mercurio total (HgT) y metilmercurio (MeHg) en muestras de cabello empleando Analizadores Directo de Mercurio.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Estandarizar la metodología (EPA 7473) para la determinación de HgT en cabello por Analizador Directo de Mercurio DMA-80.
- Estandarizar una metodología para la determinación de MeHg en cabello usando el equipo Lumex RA 915M y el PYRO-915+.
- Determinar los parámetros de validación de calidad analítica como linealidad, rango lineal, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, robustez, precisión e incertidumbre.
- Implementar la aplicación de las metodologías validadas en el análisis de muestras de cabello provenientes de la región de la cuenca del río Atrato.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1. Mercurio (Hg)

El mercurio es uno de los elementos estables más pesados presentes en la naturaleza, con número atómico 80 y peso atómico 200, en su presentación en el medio ambiente es un líquido blanco plateado, también es un metal que en concentraciones de traza es altamente tóxico y dañino para los ecosistemas y para los seres humanos, además forma soluciones-amalgamas con otros metales (oro, plata, platino, uranio, cobre, plomo, sodio y potasio) (Londoño et al., 2016). De acuerdo con (Ruiz, 2016), este metal es fácilmente metilado por microorganismos, se bioacumula en la biota y se biomagnifica en la cadena alimenticia.

El mercurio es considerado el único metal que a temperatura ambiente puede permanecer en estado líquido, las interacciones electrónicas que forman los enlaces metálicos de sus átomos son débiles, esta característica le permite al mercurio tener una alta ductilidad y maleabilidad (Mora, 2019).

**Tabla 1.** Diferentes formas químicas del mercurio en el ambiente

Forma del mercurio	Propiedades químicas y biológicas
Elemental $\text{Hg}^0$	Comparativamente menos reactivo y menos tóxico en el medio ambiente, pero altamente tóxico cuando se inhala en forma de vapor.
$\text{Hg}^{2+}$	Tóxico, pero no puede atravesar la membrana biológica
Organomercuriales $\text{RHg}^+$	Muy tóxico, específicamente metilmercurio, fácilmente transportable a través de membranas biológicas, se somete a biomagnificaciones.
Diorganomercurial $\text{R}_2\text{Hg}$	Menos tóxico, cambios en $\text{RHg}^+$ en medio ácido
Sulfuro mercúrico $\text{HgS}$	Altamente insoluble y no tóxico; atrapado en el suelo de esta forma.

Fuente. Datos recuperados de (Kumari, 2020)

#### 4.1.1. *Propiedades físicas y químicas*

El mercurio en su estado metálico tiene como característica que presenta un alto coeficiente de dilatación con el cual produce una expansión de volumen homogéneo en estado líquido y también puede producir una alta tensión superficial, estas características lo hacen muy útil para su implementación en instrumentos que se utilizan para medir la temperatura, en la tabla 2 se muestran las propiedades fisicoquímicas del mercurio (Mora, 2019).

**Tabla 2.** Propiedades fisicoquímicas del Mercurio

<b>Propiedades</b>	<b>Características</b>
Punto de fusión	-38.87 °C
Número atómico	80
Masa atómica	200,59 g/mol
Punto de ebullición	357.72 °C
Densidad (g/ml) a diferentes temperaturas	13.534 (25 °C), 13.546 (20 °C), 14,43
Calor de vaporización (25 °C)	14,652 Kcal/mol
Tensión superficial (25 °C)	484 dinas/cm
Resistividad eléctrica (20 °C)	95,76 $\mu\text{ohm cm}$
Calor latente de fusión	11,8 J/g
Solubilidad en agua	20-30 $\mu\text{g/l}$ . Insoluble en agua y disolventes organices
Viscosidad (20 °C)	1,55 mPas
Calor de fusión	2297 J/átomo
Calor de vaporización	59149 J/átomo
Presión de vapor	0,16 pa
Valencia	1.2

**Fuente.** Datos recuperados de (Mora, 2019).

#### 4.1.2. *Ciclo biogeoquímico del mercurio.*

El mercurio inicia su ciclo desde la emisión en la corteza terrestre, luego pasa al aire, al agua y a los suelos, donde llega a los organismos vivos y posteriormente se dispone a ser consumido por el hombre a través de la cadena alimenticia. La forma más común de encontrar

el mercurio en los organismos es la de MeHg que se forma cuando el Hg es biotransformado por los microorganismos que se encuentran en los océanos, lagos y ríos, bioacumulándose así en las diferentes especies acuáticas que habitan en estos ecosistemas, el Hg se encuentra en concentraciones más altas en las especies carnívoras grandes y los peces de mayor edad (Sánchez, 2018).

Este metal puede dispersarse por toda la capa terrestre en los diferentes compartimientos, entre las acciones de distribución se encuentran los agentes biológicos externos como los efectos climáticos y medioambientales, así el flujo continuo de este elemento por todos los compartimientos se le conoce como ciclo del mercurio (Saniewska & Bełdowska, 2017).

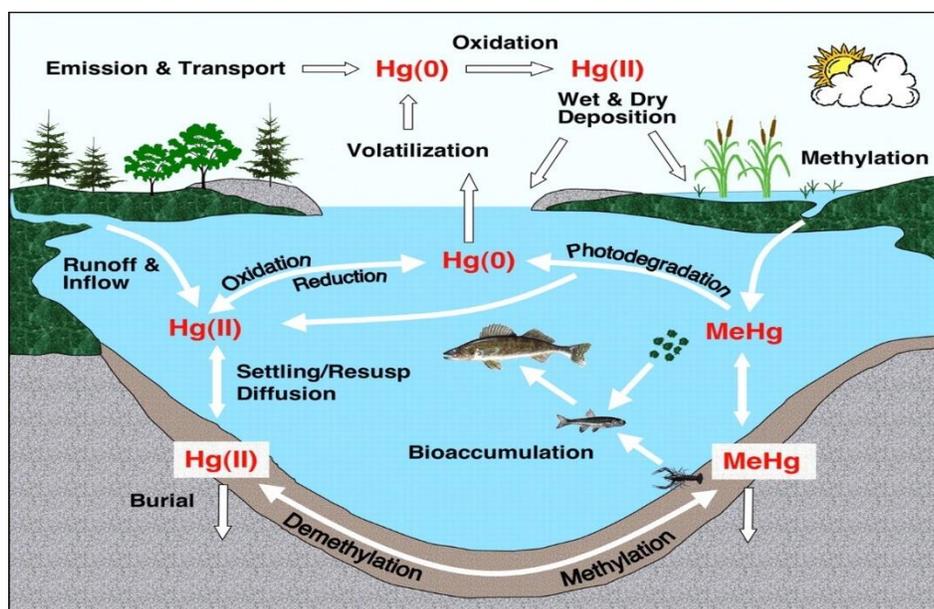


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del mercurio (Engstrom, 2007).

#### 4.1.3. Toxicidad del mercurio

El mercurio cuando se encuentra en la forma de metilmercurio es considerado sumamente tóxicos para el ser humano, ya que afecta directamente el sistema nervioso central y el periférico, la OMS señala que cuando se inhala este tipo de contaminantes el sistema nervioso e inmunitario pueden verse afectados significativamente, además de observarse en las personas trastornos neurológicos y del comportamiento (OMS, 2017b), el límite permisible recomendado por la OMS en las personas es de  $0.5 \mu\text{g/g}$  (Vargas, et al 2019).

Los efectos tóxicos del Hg dependerán de la forma química en la que se encuentre, los efectos del metilmercurio (MeHg) son más tóxicos que el mercurio elemental y sus sales inorgánicas, pues es absorbido eficientemente en el tracto gastrointestinal, pasa de la sangre, al cerebro y traspasa la barrera placentaria, en el caso de las mujeres en estado de gestación, el feto sufre graves afectaciones ya que sistema nervioso central sufre daños irreversibles. (Ruiz, 2016).

Todas las personas están expuestas directa o indirectamente al mercurio, algunas exposiciones son consideradas crónica y puede presentar síntomas en las personas como temblores, hipertrofia de tiroides, taquicardia, gingivitis, eretismo, pérdida de memoria, y alucinaciones, también está la exposición aguda que se da en un lapso de tiempo breve, pero en niveles de concentración alto (Londoño et al., 2016).

#### **4.1.4. Mercurio en el ambiente y la salud humana**

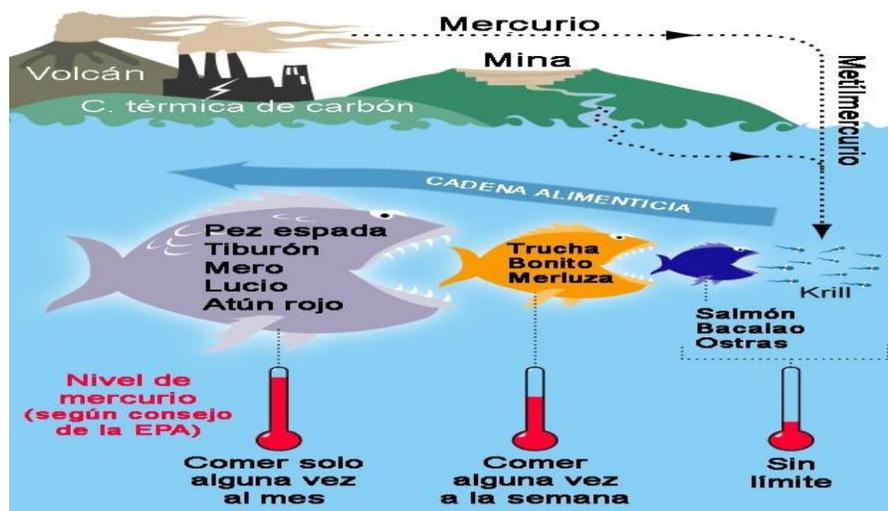
En los últimos años se han desarrollado estrategias para determinar los niveles de mercurio en los diferentes compartimientos ambientales: hidrosfera, suelo, atmósfera y biota (plantas y animales). Partiendo de la investigación realizada por la exposición al mercurio en los seres humanos es cada día mayor, ya que el mercurio en el medio ambiente es cada vez más tóxico, persistente y tiene una mayor movilidad, el metilmercurio afecta significativamente a las mujeres en edad fértil, ocasionando problemas a nivel neurológico del feto, por lo que se considera de gran preocupación para el ser humano (Pacyna, 2020).

Tanto el Hg como el MeHg, luego de que estos se generan por procesos naturales o también por procesos antrópicos, tienen la cualidad que logran ingresar a la cadena trófica, a través de las bacterias, fito y zooplancton, peces que usualmente pueden tener hábitos alimenticios que los colocan al inicio de la cadena trófica, y posteriormente siguen los que superan en el nivel trófico o también por el ser humano (Gusso-Choueri PK *et al.*, 2018).

## **4.2. Metilmercurio**

El compuesto orgánico del mercurio más abundante en el medio ambiente, es el metilmercurio (MeHg), el cual es generado principalmente por microorganismos como (bacterias metanogénicas) por medio de un proceso llamado metilación (Llorente-Ballesteros, et al 2011).

Es de importante preocupación debido a sus efectos adversos para la salud, está presente en la mayoría de las especies acuáticas y se bioacumula y biomagnifica en el medio acuático por la cadena alimenticia (Poulin y World Health Organization, 2008). Principalmente la exposición humana a MeHg es a través del consumo de peces contaminados y mamíferos marinos (Wang et al., 2013).



**Figura 2.** Bioacumulación de metilmercurio

**Nota.** Diagrama mostrando la penetración del mercurio en la cadena alimenticia marina con los niveles que acumulan los distintos tipos de peces y las recomendaciones de la EPA sobre sus cantidades de consumo aconsejables. Datos recuperados de <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:MercuryFoodChain-01.png>.

### 4.3. Fuentes de contaminación

Existen diferentes tipos de fuentes que aporten mercurio al medio ambiente, este tipo de fuentes ocasionando un impacto significativo sobre la flora, fauna y la sanidad de los seres humanos. Estas fuentes pueden clasificarse en naturales y antropogénicas (Méndez, 2018).

Las fuentes naturales de mercurio se encuentran principalmente asociadas a minerales de presentes en rocas y suelos, estos productos pueden aparecer producto de fenómenos de erosión, escorrentía y evaporación y pueden llegar a generar así un transporte del mercurio desde los océanos, y así generar en su transcurso interacción con seres vivos, y dado un proceso de bioacumulación de este metal, lo integran a la biosfera para así poder establecer un equilibrio en la naturaleza (Ministerio de Salud y Protección Social, 2018).

#### **4.3.1. Fuentes naturales**

La mayor fuente natural de Hg es la desgasificación de la corteza terrestre, las emisiones de los volcanes, la evaporación desde los cuerpos de agua y la erosión de rocas (Luna Arcila & Soto Hoyos, 2016).

#### **4.3.2. Fuentes antropogénicas**

La contaminación con en la zona norte del país se genera en beneficio de la extracción de oro el cual es extraído mezclando la roca triturada enriquecida con el metal precioso con Hg metálico esto con el fin de formar amalgama entre los dos metales. Dado que la manipulación de este proceso se realiza con las manos ocasiona el derramamiento directo de grandes cantidades de mercurio en los ríos y en cuerpos de aguas que se encuentren aledaños. La amalgama mercurio-oro que se obtiene es quemada por los seres humanos a campo abierto donde se deja por separado el oro y se libera así el metal en forma de vapor a la atmosfera (Barrios, 2017).

#### **4.4. Contaminación minera**

Usualmente se emplea la actividad minera como una opción que ayuda al aporte económico de muchas familias, es empleada hace cientos de años desde que existe la cultura indígena precolombina, la extracción del oro en sus comienzos se daba de manera simple, en las que se empleaba las altas temperaturas y se tenía en cuenta la diferencia de densidades para la difusión de este, en los últimos años en Colombia el sector minero ha tomado mucha fuerza, esto con el fin del aprovechamiento de las riquezas naturales y la obtención de un beneficio monetario (Martínez & Reinaldo, 2018).

Los residuos de la minería constituyen focos de emisión de contaminantes que pueden contener elementos con potencial toxicidad como los metales pesados. El Hg, As, Cd, Pb, Ni, Cu, Zn y Fe son algunos de los metales comúnmente encontrados en acumulaciones de residuos sólidos generados durante los procesos mineros (Berkowitz, 2007). De acuerdo a la última actualización de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer-IARC, existen evidencias suficientes que clasifican como carcinógenos al metilmercurio (compuesto orgánico del mercurio) (Rahman, 2019).



**Figura 3.** Contaminación minera con mercurio (Blesa, 2015).

#### **4.5. Mercurio y metilmercurio en cabello**

El análisis de cabello es una importante herramienta en el campo de la toxicología debido a las características que lo componen, ya que es fácil de almacenar, puede ser transportado y conservado durante largo tiempo (López, 2019). La forma más tóxica para los seres humanos es la del Hg en forma orgánica (MeHg) y generalmente más del 80% del mercurio en el cabello se encuentra de esta forma, debido a que es absorbido por los folículos pilosos como complejos de MeHg-Cisteína (Pino et al, 2018).

La incorporación de mercurio en el cabello en crecimiento es directamente proporcional a la concentración en sangre, el cual puede tener un retraso alrededor de 1-2 meses desde la ingesta de MeHg (Raimann, et al 2014).

#### **4.6. Metodología analítica para la determinación de mercurio total**

Para la metodología EPA 7473 en analizador directo de mercurio el calentamiento controlado en un horno de descomposición oxigenada se utiliza para liberar mercurio de muestras sólidas y acuosas en el instrumento. La muestra se seca y luego se descompone térmica y químicamente dentro del horno de descomposición. Los productos de descomposición son transportados por el flujo de oxígeno a la sección catalítica del horno. La oxidación se completa y los halógenos y los óxidos de nitrógeno / azufre quedan atrapados. Los productos de descomposición restantes se llevan luego a un amalgamador que atrapa selectivamente el mercurio (Instructivo de manejo y operación del analizador directo de mercurio DMA-80, 2016).

Después de lavar el sistema con oxígeno para eliminar los gases o productos de descomposición restantes, el amalgamador se calienta rápidamente y libera vapor de mercurio. El oxígeno que fluye transporta el vapor de mercurio a través de celdas de absorbancia ubicadas en la trayectoria de la luz de un espectrofotómetro de absorción atómica de una sola longitud de onda. La absorbancia (altura del pico o área del pico) se mide a 253,7 nm en función de la concentración de mercurio. El método se puede utilizar para especies individuales de mercurio cuando se ha utilizado un método o instrumentación adecuados para la separación (si se emplean modificaciones, se requeriría la verificación del rendimiento aceptable del método) (Bolaños et al., 2016).

#### **4.6.1. Interferencias**

Los disolventes, la cristalería y otros equipos de procesamiento de muestras pueden causar interferencias si no están libres de contaminación. Además, los efectos sobre la memoria del análisis de una muestra con concentraciones más altas de mercurio pueden traspasar las interferencias de mercurio a la siguiente muestra con concentraciones más bajas de mercurio. Los grupos de muestras que contienen relativamente más y menos mercurio deben analizarse juntos para minimizar los efectos en la memoria de las interferencias de arrastre (EPA, 1998).

#### **4.7. Espectrometría de absorción atómica**

La espectrometría de absorción atómica se basa en la absorción de luz por los átomos de un elemento a cuantificar en una muestra, cuando se hace incidir en ella un haz de luz emitido por una lámpara con una rigurosa longitud de onda definida, la cual corresponde a la longitud de onda de emisión característica del elemento particular escogido para el análisis. La extensión a la cual la luz es absorbida provee una estimación de la concentración del elemento en la muestra, la cual debe estar en solución (Sánchez, 2008).

El empleo de la espectrometría de absorción atómica, es el método analítico de trazas de metales pesados y metaloides en diversas matrices (biológicos, alimentos, filtros de captación ambiental, etc.). Esta técnica, permite valorar el grado de contaminación medioambiental y la exposición a determinados tóxicos industriales, nivel de metales en un alimento, nivel de metales en componentes biológicos etc (Reyes et al, 2016).

## 4.8. Equipamiento utilizado

### 4.8.1. DMA-80 Milestone

El analizador de mercurio DMA-80 Milestone emplea el principio de descomposición térmica, amalgamación y absorción atómica, con un flujo continuo de oxígeno y presenta como ventaja que la muestra puede ser analizada directamente del medio de captación (Instructivo de manejo y operación del analizador directo de mercurio DMA-80, 2016), para el análisis de las muestras se emplean cubetas de cuarzo.

El calentamiento controlado en un horno de descomposición oxigenada se usa para liberar mercurio de muestras sólidas y acuosas en el instrumento. La muestra se seca y luego se descompone térmica y químicamente dentro del horno de descomposición.

Los productos de descomposición restantes se transportan a un amalgamador de oro que atrapa selectivamente el mercurio, el amalgamador se calienta rápidamente, liberando vapor de mercurio (EPA 7473 de US EPA) (López, 2016). El DMA-80 consta de un auto muestreador, porta muestras, horno de secado/descomposición, horno catalizador, amalgama y espectrofotómetro, como se observa en la figura 4.

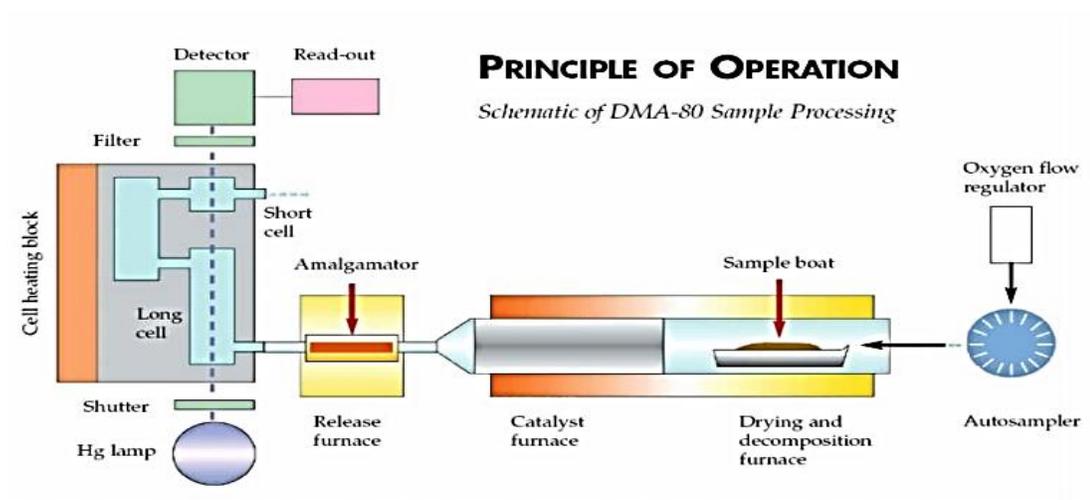


Figura 4. Principio de operación del DMA-80 (Madera, 2019).

Una vez se alcanza el tiempo de la etapa de amalgamación se libera el mercurio a una temperatura de 850°C para pasar a través de un sistema de dos celdas ópticas donde es cuantificado mediante espectrofotometría de absorción atómica la cual está fundamentada en la capacidad que tienen los elementos en su estado atómico basal de absorber radiación electromagnética a longitudes de onda específicas para cada elemento.

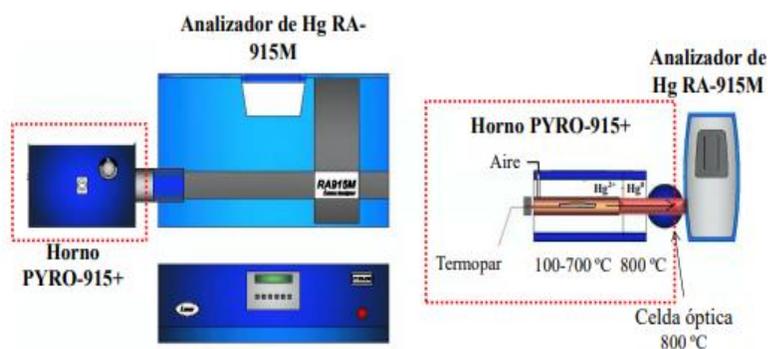
El sistema de detección contiene una lámpara de mercurio que emite una luz a una longitud de onda de 253.65 nm como una función de la concentración de mercurio y un detector UV de diodo de silicio para cuantificar el mercurio. Para la evaluación de la señal se utiliza el área bajo el pico generado de la medición (Bolaños-Álvarez, et al 2016).



**Figura 5.** DMA-80 Milestone.

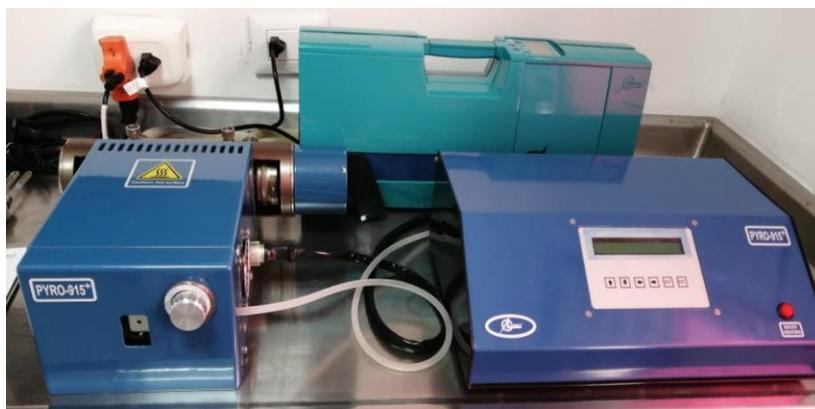
#### ***4.8.2. Analizador de mercurio RA-915M PYRO-915+***

El analizador de mercurio RA-915M con pirolizador PYRO-915+, con longitud óptica grande de celdas de análisis y ventanas calentadas en las celdas analíticas, se ha desarrollado para la determinación exclusiva de mercurio directo (no se necesitan procedimientos de pretratamiento) en muestras orgánicas complejas a nivel de unos pocos  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , se basa en la atomización del mercurio contenido en la muestra en un accesorio para descomposición térmica PYRO-915+ y la posterior medición de la absorción de la radiación de resonancia de 254 nm por átomos de mercurio utilizando la corrección Zeeman para la absorción de fondo (Rumayor Villamil, 2015).



**Figura 6.** Principio de operación Analizador de mercurio RA-915M PYRO-915+( Rumayor Villamil, 2015).

En cuanto al proceso de medición se coloca la muestra (de entre 20 a 300 mg) en el recipiente correspondiente. Y posteriormente se activa la integración de la celda de análisis e inserta el recipiente de la muestra en el accesorio PYRO-915+. La integración estará terminada en un plazo de 60 a 120 s, cuando la señal analítica vuelva al punto inicial (Lumex Instruments, 2020).



**Figura 7.** Analizador de mercurio RA-915M PYRO-915+

## 5. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados entregados por dicho método son confiables. Cuando se realiza la validación de un método por parte de laboratorio, lo que se busca es poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos (Eurachem, 2016).

Los métodos utilizados en un laboratorio de química analítica han de ser evaluados y sometidos a prueba para asegurarse de reportar resultados confiables, para lo cual es necesario establecer el procedimiento de validación para los métodos aplicados en el laboratorio, se determinan por lo general los siguientes criterios de calidad:

- Linealidad
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Precisión
- Exactitud
- Incertidumbre de la medición.
- Robustez

### 5.1. Linealidad y rango lineal

#### 5.1.1. *La Linealidad*

Es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra dentro de un rango establecido (Aguirre, 2014).

#### 5.1.2. *Rango lineal*

No existe una definición universal para el establecimiento correcto del rango lineal ni mucho menos un procedimiento sistemático bien establecido para su determinación. Sin embargo, se puede definir como el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito para el cual se ha demostrado la correcta precisión, exactitud y linealidad del método descrito (Báguena-Polo et al., 2015).

Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento. Dentro del intervalo establecido se recomienda estudiar al menos 4 niveles de concentración. Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las concentraciones  $x$  y la respuesta  $y$ . Según (Laguna, 2014), la relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo:

$$y = mx + b \quad \text{Ec. 1}$$

En la recta de regresión  $x$  es la concentración,  $y$  la respuesta,  $m$  el valor de la pendiente y,  $b$  el término independiente. La pendiente  $b$  se encuentra relacionada con la sensibilidad del método de forma que a mayor pendiente mayor sensibilidad, respuesta del método frente a los cambios de la concentración del analito.

El coeficiente de correlación ( $r$ ) nos indica el grado de relación entre la variable  $x$  (concentración), y la variable  $y$  (respuesta). Su valor máximo es 1, si  $r$  es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre variables. El valor recomendable para el coeficiente de correlación es  $\geq 0.999$ , aunque en el caso de impurezas se admite  $\geq 0.990$ , la viabilidad del método de la curva de calibrado queda establecida por el coeficiente de determinación esta asegurar que los datos experimentales se ajustan al modelo lineal escogido, normalmente se acepta  $r^2 > 0,990(25)$ . (Laguna, 2014).

Según (Laguna, 2014), se realizará el test estadístico de homogeneidad de varianza de Cochram.

Dónde:

$$G_{calc.} = \left( \frac{S_{MAX}^2}{\sum S_i^2} \right) \quad \text{Ec. 2}$$

$S_{MAX}^2$  = Varianza mayor en la curva de calibrado.

$\sum S_i^2$  = Suma de las varianzas de todos los puntos de la curva de calibrado.

## 5.2. Límite de detección

Se define como la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectado, aunque no necesariamente cuantificado con precisión y exactitud.

Límite de detección del instrumento (LDI): Concentración de componente que produce una señal superior a cinco veces la relación señal/ruido del instrumento. Similar en muchos aspectos al «nivel crítico» y al «criterio de selección». Este límite se ha establecido en 1,645 veces el valor  $S$  de los análisis en blanco (Methods: S, 2015).

$$LDI = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{m} \quad \text{Ec. 3}$$

$m$  = es la pendiente de la curva de calibrado.

$S_{bl}$  = desviación estándar de las réplicas del blanco.

$Y_{bl}$  = promedio de las réplicas del blanco.

El laboratorio adopta la utilización del límite de detección del método (LDM): como la concentración de componente que, cuando se procesa a través del método completo, produce una señal con una probabilidad del 99% de ser diferente del blanco. Durante siete repeticiones de la muestra, la media debe ser 3,14( $s$ ) superior al blanco, donde  $s$  es la desviación estándar de siete lecturas de una muestra. El LDM es mayor que el LDI, ya que las repeticiones y las fases de proceso demuestran pueden variar con los componentes (Methods: S, 2015).

$$LDM = \bar{X} + 3,14 * S \quad \text{Ec. 4}$$

Donde:

$\bar{X}$  = Promedio de las lecturas

$S$  = Desviación estándar del promedio

### 5.3. Límite de cuantificación

Se define como la mínima cantidad de analito que puede determinarse cuantitativamente con una adecuada exactitud y precisión, es aquel que se considera como el primer punto de la curva realizada para cuantificación (Miller, 2016).

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{m} \quad \text{Ec. 5}$$

$m$  = es la pendiente de la curva de calibrado.

$S_{bl}$  = desviación estándar de las réplicas del blanco.

$Y_{bl}$  = promedio de las réplicas del blanco.

### 5.4. Precisión

La precisión es la medida de cuán cerca o dispersos están los resultados uno de otros, depende exclusivamente de la dispersión del error aleatorio y varía inversamente a éste. La precisión es una propiedad cualitativa y no tiene valor numérico por lo que la variabilidad debido a fluctuaciones aleatorias se cuantifica mediante otro concepto distinto: la imprecisión del procedimiento de medida. La imprecisión es la desviación típica  $P$ , la varianza o el coeficiente de variación de un conjunto de mediciones de una magnitud bajo las condiciones especificadas (Duffau et al., 2010).

#### 5.4.1. Repetibilidad

Grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas del mismo mensurando bajo las mismas condiciones de medición; es la medida de la variabilidad de los resultados cuando el método es aplicado por un solo analista, con un mismo equipo, en corto período de tiempo (Judith et al, 2008).

#### 5.4.2. Precisión intermedia

Evalúa la precisión del método frente a variaciones internas del laboratorio (analista, instrumento, día, etc.).

La precisión de un método analítico se expresa como el coeficiente de variación (CV) de una serie de medidas y se calcula matemáticamente según (Judith et al, 2008), como la siguiente ecuación:

$$CV(\%) = \frac{S}{\bar{X}} * 100 \quad \text{Ec. 6}$$

Dónde:

S= desviación estándar

$\bar{X}$ =media aritmética de los resultados

### 5.5. Exactitud

La exactitud se define como el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia. El término “exactitud”, está aplicado a un conjunto de resultados de un ensayo, y supone una combinación de componentes aleatorios y un componente común de error sistemático o sesgo. Se expresa en términos de porcentaje de error (%E) y/o como porcentaje de recuperación (%R) (Miller, 2016).

**Tabla 3.** Valores orientativos aceptables según la AOAC para el factor de recuperación en función de la concentración del analito

% Analito	Relación	Unidades	Factor de Recuperación
100	1	100%	98-102
10	10 <sup>-1</sup>	10%	98-102
1	10 <sup>-2</sup>	1%	97-103
0.1	10 <sup>-3</sup>	0.1%	95-105
0.01	10 <sup>-4</sup>	100ppm	90-107
0.001	10 <sup>-5</sup>	10ppm	80-110
0.0001	10 <sup>-6</sup>	1ppm	80-110
0.00001	10 <sup>-7</sup>	100ppb	80-110
0.000001	10 <sup>-8</sup>	10ppb	60-115
0.0000001	10 <sup>-9</sup>	1ppb	40-120

### 5.5.1. Porcentaje de error

$$\%error = \frac{(\text{valor teórico} - \text{valor experimental})}{\text{valor teórico}} * 100 \quad \text{Ec. 7}$$

### 5.5.2. Porcentaje de recuperación

$$\%R = \frac{X_m}{\mu} * 100 \quad \text{Ec. 8}$$

Dónde:

$X_m$ : es valor medio hallado.

$\mu$ : Valor aceptado como verdadero.

La recuperación esperada depende de la matriz de la muestra, de la complejidad del procedimiento y tratamiento de las concentraciones de analito en la misma. Aunque es deseable alcanzar valores de recuperación cercanos al 100%, en matrices complejas y en análisis de trazas son habitualmente valores 90%, 80%, 70% y hasta de un 50%. En estos casos es importante que, aunque la recuperación sea baja, la precisión del método sea alta ya que entonces se puede aplicar un factor de corrección (Eurachem, 2016).

## 5.6. Incertidumbre

En la práctica, la incertidumbre sobre los resultados puede provenir de muchas posibles fuentes. Las fuentes típicas de incertidumbre son: efectos instrumentales, estequiometría, efectos de cálculo, efectos aleatorios, pureza de reactivos, condiciones de medición, efectos de operador. El diagrama de causa efecto (Ishikawa) es una forma conveniente de hacer una lista de las causas de incertidumbre, mostrando cómo se relacionan unas con otras e indicando su influencia en la incertidumbre del resultado. Para calcular la incertidumbre que aporta cada fuente es necesario calcular los errores aleatorios y sistemáticos, los cuales se relacionan dependiendo del número de mediciones, los equipos usados o materiales de referencia. El propósito es identificar cuantas fuentes sea posible y cuantificarlas por estudios de precisión y exactitud (Schmid, 2015).

$$U_a = \left( \frac{S * T}{n} \right) \quad \text{Ec. 9}$$

$$U_b = \left( \frac{A}{\sqrt{3}} \right) \quad \text{Ec. 10}$$

Dónde:

S = desviación estándar de la medición

T = valor de t student tabulado para 95% y n-1 grados de libertad

A = exactitud especificada del instrumento en términos de porcentaje

n = valor nominal de la medida

La incertidumbre se combina a partir de la ley de propagación de errores:

$$U_c = \sqrt{(U_a^2 + U_b^2)} \quad \text{Ec. 11}$$

Luego se multiplica por un factor de cobertura k (2 ó 3) que depende del nivel de confianza (95% ó 99.7%) obteniéndose la incertidumbre expandida  $U_e$

$$U_e = U_c * k \quad \text{Ec. 12}$$

Este valor de k puede ser insuficiente si la incertidumbre combinada está basada en condiciones estadísticas con pocos grados de libertad (menor de 6). Entonces se usa el valor de T de student tabulado para un 95% de confianza y n-1 grados de libertad, expresándose los resultados del método junto con la incertidumbre expandida, (Schmid, 2015).

$$\text{Concentración del analito} = x \pm U_e \quad \text{Ec. 13}$$

Dónde: X = promedio de los resultados de las réplicas.

### **5.6.1. Fuentes de incertidumbre**

En la práctica, la incertidumbre de un resultado puede surgir de algunas posibles fuentes, siendo algunos ejemplos la definición incompleta del mensurando, el muestreo, efectos de matriz e interferencias, condiciones ambientales, incertidumbres de equipos másicos o

volumétricos, valores de referencia, aproximaciones y asunciones incorporadas en el método de medida y procedimiento, y variaciones aleatorias (Eurachem, 2012).

### **5.6.2. Componentes de la incertidumbre**

Al estimar la incertidumbre global, puede ser necesario tomar cada fuente de incertidumbre y tratarla de forma separada para obtener la contribución de esa fuente. Cada una de las contribuciones separadas a la incertidumbre es un componente de la incertidumbre. Cuando se expresa como desviación estándar, un componente de la incertidumbre se conoce como incertidumbre estándar. Si hay una correlación entre algunos de los componentes entonces esto tiene que tenerse en cuenta mediante la determinación de la covarianza. Sin embargo, a menudo es posible evaluar el efecto combinado de diversos componentes. Esto puede reducir el esfuerzo global y, cuando los componentes cuyas contribuciones se evalúan conjuntamente están correlacionados, puede entonces que no sea necesario considerar la correlación (Eurachem, 2012).

### **5.7. Robustez y selectividad**

La robustez es una medida de la capacidad que tiene el método analítico de permanecer inalterado por pequeñas variaciones en el procedimiento del método. Con ello, se puede inferir que las variables son más significativas a la hora de realizar las medidas y, por lo tanto, deben ser controladas (Jurado, 2008).

Por la complejidad de la matriz en este caso cabello es necesario asegurarse de la eliminación de interferencias. La IUPAC (2001) en sus últimas recomendaciones ha definido la selectividad como “la extensión en la que un método puede utilizarse para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes con un comportamiento similar”.

El Estudio que se realizó dentro del laboratorio para evaluar el comportamiento del proceso analítico en el que se efectuaron pequeños cambios en las condiciones de la matriz (cabello), semejantes a aquellos que sugieren en los diferentes ambientes de prueba fueron: el lavado del cabello y el tinturado, ya que estas dos modificaciones al ser implementadas para la determinación de MeHg en cabello nos permite obtener información de los efectos de cambios menores de una forma rápida y sistemática en el procedimiento (Eurachem, 2012).

## 6. METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó en las instalaciones del laboratorio de toxicología y gestión ambiental de la Universidad de Córdoba, el cual siguió una secuencia de tres fases: una optimización de los parámetros de análisis, validación e implementación del método validado en muestras de Cabello provenientes de los habitantes de la cuenca del río Atrato, departamento del Chocó.

### 6.1. Reactivos, materiales y equipos

#### 6.1.1. Reactivos grado analítico

- Hidróxido de sodio (NaOH) al 98% certificado pureza
- Cysteina grado reactivo marca MERCK
- Cloruro de sodio (NaCl) marca MERCK
- Agua destilada tipo II
- Sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) marca MERCK
- Bromuro de potasio (KBr) marca MERCK
- Ácido clorhídrico (HCl) suprapuro
- Tolueno HPLC marca MERCK
- Sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
- Acetato de sodio

#### 6.1.2. Materiales

- Beakers de 50,100 y 250 mL, (SCHOTT DURAN).
- Balón volumetricos de 25 mL, (SCHOTT DURAN).
- Transferpipetas de 10-100 µL,
- Transferpipetas de 100-1000 µL
- Puntas para transfer de 10, 100 y 1000 µL
- Tubos para centrifugar 15 y 50 mL (BIOGEALIX)
- Celdas de cuarzo y niquel
- Gradillas
- Espátula

### 6.1.3. *Materiales de referencia*

- Solución Estándar Certificada de Mercurio 1000 mg/L en HNO<sub>3</sub> 0,5 M.
- Material de referencia certificado de cabello (Human Hair IAEA-086)

### 6.1.4. *Equipos*

- Analizador directo de mercurio. DMA-80 evo. (Milestone italiano)
- Analizador de mercurio RA-915M PYRO-915+
- Balanza analítica (OHAUS) con sensibilidad de 0,1 mg
- Centrifugadora (HETTICH ROTOFIX 32<sup>a</sup>)
- Baño Ultrasonido (Fisher Scientific FS60)

## 6.2. **Análisis de muestras**

### 6.2.1. *Obtención de muestras en matriz biológica (cabello)*

Las muestras de cabello fueron obtenidas del área occipital de la cabeza e incluyen por lo menos 20 hilos de cabello con una longitud promedio de 1,0 cm (aproximadamente 10 mg en total), cortado con tijeras a la raíz del cabello. Se sujeta la muestra con una cinta adhesiva de tal forma que se pueda identificar la parte de la raíz del cabello y se coloca la muestra en sobres de papel almacenándolas a temperatura ambiente (Ministerio de Salud y Protección Social, 2018).

### 6.2.2. *Determinación de HgT*

Para la determinación de mercurio total, se lava el cabello con una solución de Acetona al 80%, se corta con tijeras hasta obtener una muestra uniforme, se pesan aproximadamente 20 mg de cabello en celdas de níquel para el análisis por DMA-80 (EPA 7473, 2007)

**Tabla 4.** Condiciones del equipo utilizadas para el análisis

<b>Proceso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Secado	250 °C	60 seg
Descomposición	650 °C	720 seg
Tiempo de espera	600 °C	60 seg
Amalgamador	700 °C	12 seg

### 6.2.3. Determinación de MeHg

Para el metilmercurio se realizó el mismo tratamiento de la muestra que se hizo para determinar mercurio total, se adiciona aproximadamente 100 mg de muestra en tubos de polipropileno y se agrega hidróxido de sodio y cisteína al 1%, se lleva a calentamiento durante una hora en un baño termostático, se deja reposar, se adiciona 1mL de cloruro de sodio al 10% y se lleva a 10 ml con agua destilada, luego se toma una alícuota de 5mL y en el mismo tubo se le adiciona sulfato de cobre saturado, KBr, HCl y 2 mL de tolueno, se agita manualmente y luego se centrifuga, se repite dos veces esa misma extracción, se recolectan los extractos en otro tubo que contenga cisteína al 1% y finalmente se toman 100µL de la fase de cisteína y se adiciona en la celda que posteriormente se inserta en el accesorio PYRO-915+ para ser analizado por el analizador de mercurio RA-915M (Sarmani et al, 1997).

Los resultados son directamente obtenidos desde el equipo en ug/L de Hg para el extracto y el cálculo de la concentración en el cabello se realiza de la siguiente manera:

$$\text{Me Hg (mg/kg como Hg)} = \frac{C * 4}{W} \quad \text{Ec. 14}$$

Donde:

C: Concentración en el extracto expresada en µg/L de Hg.

4: Volumen de solución de cisteína 1 %.

W: Peso de la muestra en gramos

### 6.3. Análisis Estadístico

Los datos fueron registrados en la computadora y se utilizaron los programas Statgraphics centurión xvi y Excel 2016 para el análisis estadístico. Todas las evaluaciones estadísticas se realizaron empleando los métodos convencionales (Análisis de regresión, Análisis de varianza (ANOVA), Test de verificación de la pendiente, Test de verificación de la variable independiente, Test de Cochran) y las diferencias se consideraron significativas a  $p < 0,05$  (con límite de confianza  $> 95\%$ ), el coeficiente de variación (con límite de confianza  $< 10\%$ ) y desviación estándar que no supera el 5% según la AOAC.

## 7. VALIDACIÓN DEL MÉTODO

En la tabla 5 y 6 se evidencian los procedimientos para la determinación de los parámetros de validación para HgT y MeHg respectivamente.

**Tabla 5.** Parámetros de validación del método para HgT

Parámetro	Metodología	Cálculo
<b>Linealidad y rango lineal</b>	Se analizaron estándares de concentraciones variables de Hg en tres rangos (0.05-4.5) ng Hg (5.0-20.0) ng Hg y (30-800) ng Hg preparadas a partir de la solución patrón de 10 mg/L preparada a partir de la solución estándar de 1000 mg/L	$r^2$ <b>Ec. 15</b>
<b>LDI</b>	Se realizó 15 veces la medición del blanco de reactivo	$LDI = 1,645 \times S_B$ <b>Ec. 16</b>
<b>LDM</b>	Se realizó 15 veces la medición del blanco de procedimiento	$LDM = 3,14 \times S_B$ <b>Ec. 17</b>
<b>LC</b>	Se realizó 15 veces la medición del blanco de procedimiento	$LC = 10 \times S_B$ <b>Ec. 18</b>
<b>Exactitud</b>	<b>Porcentaje error</b>	Se evaluó a partir de las mediciones de los estándares de concentraciones y material de referencia certificado $E_r = \frac{\bar{x} - x_t}{x_t} \times 100$ <b>Ec. 19</b>
	<b>Porcentaje de recuperación</b>	Se adicionaron a las muestras de cabello tres niveles de concentración dentro del intervalo de trabajo (bajo, medio y alto). $\%R_M = \frac{C_{MA} - C_M}{C_A} \times 100$ <b>Ec. 20</b>
<b>Precisión</b>	<b>Repetibilidad</b>	Se cuantifico estándares y muestras fortificadas por quintuplicado de concentraciones baja, media y alta (2, 10 y 100 ng Hg) $CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$ <b>Ec. 21</b>
	<b>Precisión intermedia</b>	Se evaluaron los mismos estándares y muestras con adición en diferentes días (3 días) y analistas (2 analistas) por triplicado.
<b>Incertidumbre</b>	Después de evaluar la metodología y determinar los parámetros de validación se procedió a calcular la incertidumbre realizando una lista de las fuentes asociadas a esta investigación. Algunas de estas fuentes son detalladas en el diagrama de Ishikawa en el anexo G	

Las muestras para el porcentaje de recuperación fueron dopadas por (adición estándar) a tres rangos de concentración de la curva de calibrado de HgT, para el rango bajo se pesó muestra de cabello de concentración conocida y se adicionó sobre la muestra 2 ngHg, para el rango medio el mismo procedimiento, pero con 10 ngHg y para rango alto 100 ngHg, estos rangos de concentración son escogidos por el analista.

**Tabla 6.** Parámetros de validación del método para MeHg

Parámetro	Metodología	Cálculo	
<b>Linealidad y rango lineal</b>	Se analizaron estándares de concentraciones variables de CH <sub>3</sub> HgCl preparados a partir de la solución patrón de 1 mg/L preparada a partir de la solución estándar de 57 mg/L de CH <sub>3</sub> HgCl	$r^2$	<b>Ec. 15</b>
<b>LDI</b>	Se realizó 15 veces la medición del blanco de reactivo	$LDI = 1.645 \times S_B$	<b>Ec. 16</b>
<b>LDM</b>	Se realizó 15 veces la medición del blanco de procedimiento	$LDM = 3,14 \times S_B$	<b>Ec. 17</b>
<b>LC</b>	Se realizó 15 veces la medición del blanco de procedimiento	$LC = 10 \times S_B$	<b>Ec. 18</b>
<b>Porcentaje error</b>	Se evaluó a partir de las mediciones de los estándares de concentraciones y material de referencia certificado	$E_r = \frac{\bar{x} - x_t}{x_t} \times 100$	<b>Ec. 19</b>
<b>Exactitud</b>	<b>Porcentaje de recuperación</b> Para MeHg se aplicará la metodología de extracción. Esto se realizará por triplicado y se expresará como %R y se adicione al cabello tres niveles de concentración dentro del intervalo de trabajo (bajo, medio y alto).	$\%R_M = \frac{C_{MA} - C_M}{C_A} \times 100$	<b>Ec. 20</b>
<b>Precisión</b>	<b>Repetibilidad</b> Se midieron estándares y muestras con adición de estándar por triplicado de concentraciones baja, media y alta (20, 1000 y 2000 ng MeHg)	$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$	<b>Ec. 21</b>
	<b>Precisión intermedia</b> Se evaluaron los mismos estándares y muestras con adición en diferentes días (3 días) y analistas (2 analistas) por triplicado.		
<b>Incertidumbre</b>	Después de evaluar la metodología y determinar los parámetros de validación se procedió a calcular la incertidumbre realizando una lista de las fuentes asociadas a esta investigación, indicadas en el anexo G.		
<b>Robustez</b>	Se realizó 10 veces la medición de 4 muestras en diferentes condiciones de cabello tinturado y no tinturado, lavado y sin lavar. aplicando la metodología de extracción para MeHg.		

Las muestras para el porcentaje de recuperación fueron dopadas por (adición estándar) a tres rangos de concentración de la curva de calibrado para MeHg. para el rango bajo se adicione sobre la muestra 20 ng MeHg, para el rango medio el mismo procedimiento, pero con 1000 ng MeHg y para rango alto 2000 ng MeHg, estos rangos de concentración son escogidos por el analista.

## 7.1. Incertidumbre

**Tabla 7.** Identificación de las fuentes de incertidumbre para MeHg y HgT

Procedimiento	Variable	Fuentes individuales
Preparación de estándares	Pureza del patrón	Certificado del reactivo
	Cantidad de estándar concentrado tomado a partir del cual se prepara cada dilución	Calibración balanza Resolución balanza Temperatura de medición Repetibilidad
Curva de calibrado	Volumen preparado de solución diluida	Calibración del balón aforado Temperatura de medición Repetibilidad Tolerancia de los matraces
	Alícuota de estándar	Calibración de la transferpipeta Temperatura de medición Repetibilidad
Masa	Respuesta del equipo	Repetibilidad de las mediciones Masa tara
	Masa de la muestra	Masa de tara más la muestra Masa de la muestra

**Tabla 8.** Fuentes de incertidumbre

	Cálculo estadístico	
Incertidumbre debida a la curva de calibrado	$Sx_0 = \frac{S}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - C_{pro})^2}{S_{xx}}}$	Ec. 22
	$S_{xx} = \sum_i (C_j - C_{pro})^2$	Ec. 23
Incertidumbre por pesada en balanza (U <sub>bal</sub> )	$S = \sqrt{\frac{\sum(A_j - (B_0 + (B_1 * C_j))^2}{n - 2}}$	Ec. 24
	$U_{cal} = \sqrt{2 * 0,0003004^2 + S^2}$	Ec. 25
	$U_{bal} = \frac{U_{cal}}{W}$	Ec. 26
Incertidumbre por dilución (U <sub>vol</sub> )	$U_{ext} = \frac{a_b}{\sqrt{6}}$	Ec. 27
	$U_{temp} = \frac{\Delta T * 0,0002 * V_{bal}}{\sqrt{3}}$	Ec. 28

---

$$U_{vol} = \sqrt{(U_{ext})^2 + (U_{temp})^2 + S^2} \quad Ec. 29$$

$$U_{prep} = \sqrt{(U_{pur})^2 + (U_{PM})^2 + (U_{bal})^2 + (U_{vol})^2} \quad Ec. 30$$

Incertidumbre por precisión y exactitud

$$U = \frac{S}{x}$$

Ec. 31

---

### **Dónde:**

- ❖  $S_{x0}$ : Concentración del metal medido por el equipo
- ❖  $S_{xx}$ : Desviación debida a la curva de calibración
- ❖  $S$ : Desviación estándar de los residuales
- ❖  $U_{cal}$ : Incertidumbre típica asociada a un valor certificado
- ❖  $U_{bal}$ : Incertidumbre pesada de balanza
- ❖  $U_{ext}$ : Incertidumbre por exposición del dispositivo en condiciones extremas
- ❖  $U_{temp}$ : Incertidumbre debido a la temperatura
- ❖  $U_{vol}$ : Incertidumbre por dilución
- ❖  $U_{prep}$ : Incertidumbre preparación del estándar
- ❖  $U$ : Incertidumbre expandida

## **7.2. Implementación**

Este trabajo se deriva de un macroproyecto titulado: Evaluación del grado de contaminación por mercurio y otras sustancias tóxicas y su afectación en la salud humana en las poblaciones de la cuenca del río Atrato, como consecuencia de las actividades de minería. Dicho proyecto se llevó a cabo con el fin de dar respuesta a lo expuesto en la sentencia T-622-16 de la corte constitucional de Colombia. Las muestras de cabello obtenidas de la población sujeta a estudio son los habitantes del municipio de Bojayá, perteneciente al departamento del Chocó por la cuenca del río Atrato, estas se analizaron en el laboratorio de Toxicología y Gestión Ambiental de la universidad de Córdoba, bajo los parámetros de validación establecidos y los criterios de análisis estadísticos propuestos en el ítem 6.3.

## 8. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Antes de calcular los diferentes parámetros de validación los datos obtenidos fueron evaluados para identificar datos anómalos con la ayuda del test de rechazo de datos de Grubbs. Las tablas 9 y 10 muestran los resultados obtenidos del análisis estadístico de rechazo de datos para HgT y MeHg respectivamente. Los datos obtenidos no generaron ningún dato anómalo, por lo cual ninguno de los datos recopilados fue considerado atípico, este criterio fue aplicado para verificar que, en esta serie de datos, alguno o algunos de los valores no difieran del resto.

Para ellos se aplicó el test de rechazo de datos de Grubbs. Se aceptó la hipótesis nula (H<sub>0</sub>: todos los datos medidos proceden de la misma población) al presentarse que el test de Grubbs calculado para rango bajo y alto en todos los ensayos son menores al G<sub>crítico</sub> con nivel de confianza del 95%.

Como los resultados no presentan datos anómalos se calcularon las variables estadísticas necesarias establecidas para la validación del método.

**Tabla 9.** Rechazo de datos para HgT

Análisis de Hg en cabello por DMA-80									
Ensayo	STD	STD	STD	Muestr	Muestra	Muestra	Muestra	MRC	LD- LC
	BAJO	MEDIO	ALTO	a	+AD Bajo	+AD Medio	+AD Alto		
[µg/kg]									
Muestr									
	Std 2	Std 10	Std 100	a	2	10	100		
<b>Promedio</b>	2,02	10,2	103,1	2,27	4,08	12,1	107,1	551,9	0,01
<b>S</b>	0,05	0,18	2,20	0,05	0,12	0,17	0,36	26,31	0,00
<b>n</b>	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00
<b>Valor</b>									
<b>Máximo</b>	2,1	10,5	106,1	2,3	4,3	12,3	107,6	607,7	0,02
<b>Valor</b>									
<b>Mínimo</b>	1,95	10,00	100,21	2,19	3,98	11,89	106,52	528,10	0,01
<b>G Alto</b>	1,43	1,86	1,37	1,79	2,56	1,43	1,46	2,10	1,88
<b>G bajo</b>	-1,58	-1,06	-1,31	-1,49	-0,82	-1,17	-1,70	-0,91	-0,83
<b>G Crítico</b>	2,11	2,11	2,11	2,11	2,11	2,11	2,11	2,11	2,11

**Tabla 10.** Rechazo de datos para MeHg

Análisis de MeHg en cabello por Analizador RA-915M PYRO-915+									
Ensayo	STD	STD	STD	Muestra	Muestra	Muestra		LD-	
	BAJO	MEDIO	ALTO	Muestra	+AD Bajo	+AD Medio	+AD Alto	MRC	LC
	Std 20	Std1000	Std2000	Muestra	[µg/kg]				
	20	1000	2000	Muestra	20	1000	2000		
<b>Promedio</b>	19,3	981,2	1835,1	175,7	405,7	9450,7	16409,0	0,25	0,75
<b>S</b>	1,25	8,29	26,35	14,22	21,61	225,64	1494,29	0,02	0,19
<b>n</b>	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00	9,00
<b>Valor</b>									
<b>Máximo</b>	21,2	993,8	1863,9	199,0	445,3	9797,1	17730,0	0,29	0,98
<b>Valor</b>									
<b>Mínimo</b>	17,7	965,5	1788,3	159,5	367,0	9209,4	13661,9	0,22	0,42
<b>G Alto</b>	1,53	1,53	1,09	1,64	1,83	1,54	0,88	1,72	1,18
<b>G bajo</b>	-1,29	-1,89	-1,78	-1,14	-1,79	-1,07	-1,84	-1,64	1,71
<b>G Critico</b>	2,11	2,11	2,11	2,11	2,11	2,11	2,11	2,11	2,11

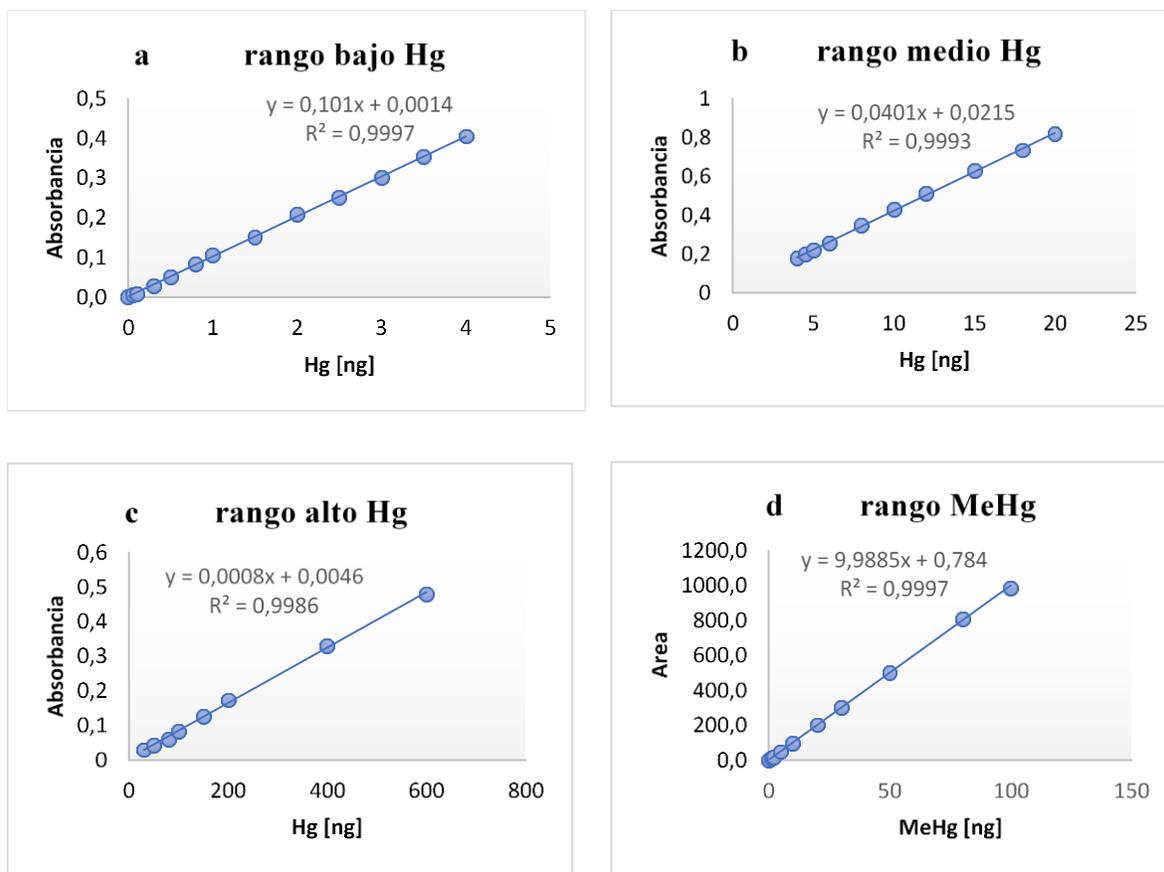
## 8.1. Parámetros de validación para HgT y MeHg

### 8.1.1. Linealidad y rango lineal

A continuación, se observa en la figura 8 los intervalos lineales estudiados de las curvas de calibrado para Mercurio en rango bajo, medio y alto, utilizando los datos del anexo A, al igual que para MeHg en todo su rango teniendo en cuenta los datos del anexo D, donde se muestra la ecuación de la recta obtenida y el coeficiente de correlación de los valores graficados mayor de 0.99 para cada rango.

Después de realizar los gráficos que se encuentran en el anexo B y E, se observó de forma cualitativa el comportamiento de cada curva y a partir de este análisis se escogió el rango de trabajo dentro del cual existió linealidad. Se prepararon curvas de calibración en tres días con diferentes niveles de concentración para cada rango que van desde: 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 ng de Hg para rango bajo, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0, 8.0, 10, 12, 15, 18, 20 ng de Hg para rango medio, 30, 50, 80, 100, 150, 200, 400, 600 ng de Hg para rango alto y 0.1, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 30, 50, 80, 100 ng de MeHg para todo su rango.

La figura 8 muestra los diagramas de dispersión para la relación entre las concentraciones de metales y los valores de absorbancia correspondientes para HgT y MeHg en cada rango de trabajo.



**Figura 8** Curva de calibrado de HgT para rango bajo (a), medio (b), alto (c) y MeHg para todo su rango (d).

En cuanto a la evaluación de linealidad se realizaron los siguientes análisis estadísticos: Análisis de regresión lineal, test de la verificación de la pendiente y el intercepto (T-student), Test de Cochran y análisis de varianza.

### 8.1.2. Análisis de regresión lineal HgT y MeHg

En la tabla 11 se muestran los valores de las correspondientes variables para las curvas de calibración de HgT y MeHg para cada rango de concentración, se muestra los valores de  $R^2$  en tres días consecutivos con valor mayor o igual a 0,998, para los coeficientes de correlación y los coeficientes de determinación indicando una relación fuerte entre ambas variables, y un bajo error típico asociado a los datos obtenidos.

Según Magnusson y Ornemark (2014), si el valor de  $R^2$  obtenido es superior a 0,995, la respuesta analítica es lineal en determinados rangos de concentración. Se muestra el

coeficiente de variación (%CV) debido a los factores de respuesta en el que no supera el 5%, lo cual se encuentra dentro de los límites establecidos por la AOAC.

**Tabla 11.** Resumen de las ecuaciones de regresión para HgT y MeHg con sus respectivos coeficientes correlación y de determinación.

		<b>HgT</b>		
	<b>Variables</b>	<b>X</b>	<b>S</b>	<b>%CV</b>
Rango bajo	m (intercepto)	0,1008	0,0013	1,301
	b (pendiente)	0,0017	0,0001	5,882
	r <sup>2</sup>	0,9994	0,00005	0,005
Rango medio	m (intercepto)	0,0401	0,0002	0,718
	b (pendiente)	0,0212	0,0012	5,677
	r <sup>2</sup>	0,9990	0,0005	0,051
Rango alto	m (intercepto)	0,0008	0	0
	b (pendiente)	0,0055	0,0004	7,260
	r <sup>2</sup>	0,9983	0,0010	0,107
		<b>MeHg</b>		
	<b>Variables</b>	<b>X</b>	<b>S</b>	<b>%CV</b>
Todo el Rango	m (intercepto)	0,2269	0,0069	3,0418
	b (pendiente)	9,9901	0,0066	0,0661
	r <sup>2</sup>	0,9997	5,7735E-05	0,0057

### **8.1.3. Test t-student para la pendiente y el intercepto o variable independiente HgT y MeHg**

Se realizó la prueba de la t de Student, siendo n-1 los grados de libertad y  $\alpha=0,05$ , en la que se comprobó la importancia del intercepto y la pendiente con respecto al cero (Tabla 12). El intercepto de la recta de ajuste está cercano a cero, al aplicársele la prueba de Student se obtuvo un valor de t experimental menor que el valor de t tabulado con una probabilidad del 95%, lo que permitió establecer que no existen diferencias estadísticamente significativas, quedando así demostrada la proporcionalidad del sistema, además se cumple con el test de student de la pendiente, ya que t experimental es mayor que el valor de t tabulado en cada caso, lo cual nos indica que nuestra pendiente es distinta de cero y puede utilizarse para calcular la concentración del analito correspondiente, tanto para HgT como para MeHg.

**Tabla 12.** Test t-student para la verificación de la pendiente y el intercepto HgT y MeHg

<b>HgT</b>						
<b>T-student para la pendiente</b>			<b>T-student para el intercepto</b>			
T	Rango bajo	Rango medio	Rango alto	Rango bajo	Rango medio	Rango alto
Tcal	7,70	2,74	5,43	0,05	0,25	0,13
Ttab	1,79	1,83	1,89	1,79	1,83	1,89

<b>MeHg</b>	
<b>T-student para la pendiente</b>	<b>T-student para el intercepto</b>
T	Todo el Rango
Tcal	305,5
Ttab	1,833

**8.1.4. Test de Cochran para HgT y MeHg**

Se aplicó el test de Cochran para corroborar que las varianzas de los datos son homogéneas, los resultados obtenidos para HgT y MeHg cumple con el test de Cochran ya que el  $G_{exp} < G_{tabla}$  para cada uno de los rangos especificados, lo que indica que las varianzas de las concentraciones son homogéneas y el factor concentración no influye en la variabilidad de los resultados con un grado de significancia  $\alpha$  igual 0.05.

**Tabla 13.** Test de Cochran para HgT y MeHg

<b>HgT</b>			
<b>G</b>	<b>Rango bajo</b>	<b>Rango medio</b>	<b>Rango alto</b>
$G_{experimental}$	0,403	0,001	0,075
$G_{tablas}$	0,4069	0,445	0,515

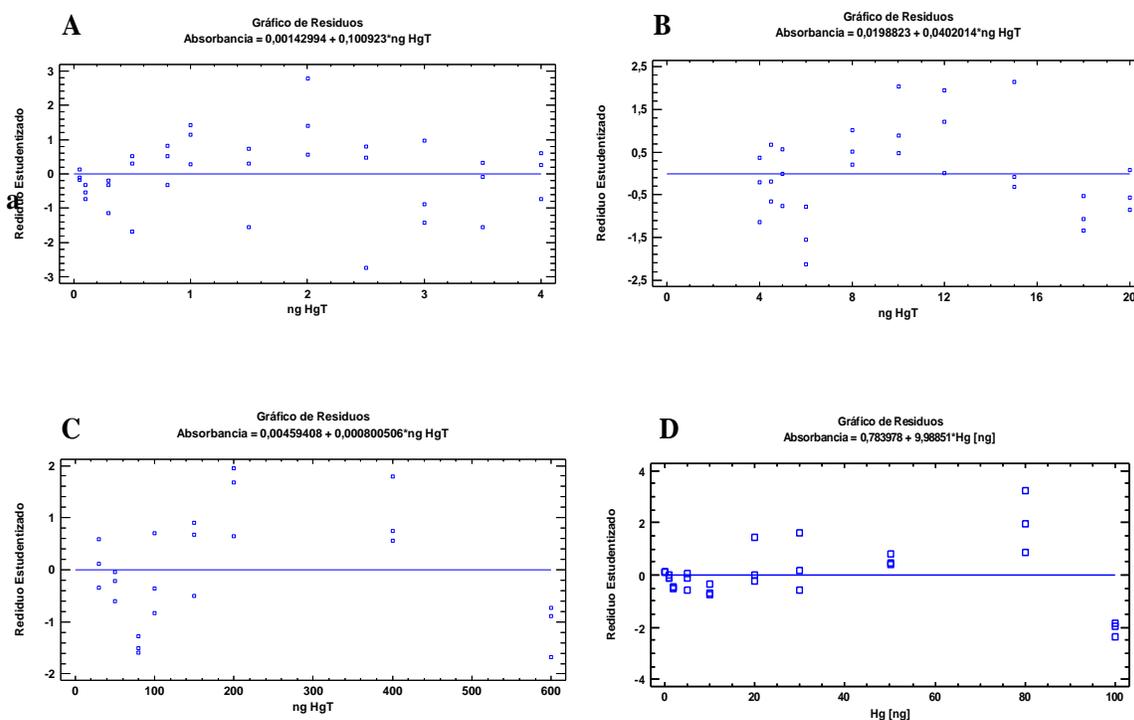
  

<b>MeHg</b>	
<b>G</b>	<b>Todo el Rango</b>
$G_{experimental}$	0,523
$G_{tablas}$	0,523

### 8.1.5. Análisis de varianza

Basados en las pruebas de Anova de un factor, la cual estipula que F calculada siempre tiene que ser mayor que F tabulada para que no se considere una diferencia significativa.

El análisis de varianza permitió determinar que el valor F calculado para HgT en los rangos bajo, medio y alto 33275.5, 17670.8, 12147.0 respectivamente y MeHg en todo su rango 78231,39 tienen valores mayores al F crítico = 3,08, indicativo de que el modelo lineal se ajusta para la relación entre la absorbancia a partir de la concentración con un nivel de significación del 5%.



**Figura 9.** Gráficos de residuales de HgT para rango bajo (a), medio (b), alto (c) y MeHg todo su rango (d)

En la figura 9 se muestra la representación de los residuales, la cual confirma la validez del modelo. No se observa una tendencia característica en los residuos, es decir hay una distribución aleatoria para las diferentes concentraciones de HgT y MeHg.

### 8.1.6. Precisión del sistema para HgT y MeHg

La precisión se expresa como el coeficiente de variación de una serie de medidas, a continuación, se muestran los resultados de precisión evaluados como repetibilidad y precisión intermedia utilizando los datos del anexo C y F.

#### 8.1.6.1. Repetibilidad y precisión intermedia

En la tabla 14 y 15 se observa que el parámetro estadístico precisión definiéndolo en términos del coeficiente de variación (%CV) promedio para los distintos rangos de trabajo cumple con el criterio de aceptación de calidad analítica estipulado para este tipo de análisis (<10%).

En la determinación de la repetibilidad y precisión intermedia, los coeficientes de variación calculados para el sistema se determinaron en tres niveles de concentración y en tres días diferentes tanto para HgT como para MeHg. En ambos casos los valores no fueron superiores al 10%, obteniéndose así valores inferiores al aceptado como máximo para el método EPA 7473, lo cual indica que el método de análisis es preciso.

**Tabla 14.** Precisión del sistema para HgT

<b>Repetibilidad</b>				
	<b>ng Hg</b>	<b>%CV</b>		
		<b>Día 1</b>	<b>Día 2</b>	<b>Día 3</b>
<b>Rango bajo</b>	2	0,288	1,280	1,059
<b>Rango medio</b>	10	0,479	0,227	1,092
<b>Rango alto</b>	100	0,479	1,545	1,674
<b>Precisión intermedia</b>				
	<b>ng Hg</b>	<b>%CV</b>		
<b>Rango bajo</b>	2	2,36		
<b>Rango medio</b>	10	1,79		
<b>Rango alto</b>	100.	2,14		

**Tabla 15.** Precisión del sistema para MeHg

<b>Repetibilidad</b>				
	<b>ng Hg</b>	<b>%CV</b>		
		<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 3</b>
<b>Rango bajo</b>	20	2,646	4,162	2,120
<b>Rango medio</b>	1000	0,350	0,720	0,394
<b>Rango alto</b>	2000	2,048	1,545	0,941
<b>Precisión intermedia</b>				
	<b>ng Hg</b>	<b>%CV</b>		
<b>Rango bajo</b>	20	6,46		
<b>Rango medio</b>	1000	0,84		
<b>Rango alto</b>	2000	1,44		

**8.1.7. Exactitud**

La tabla 16 muestra la exactitud expresada como porcentaje de error. El %E mostrado es el promedio de los %E para cada nivel. En el análisis del parámetro exactitud se cumplen los criterios de aceptación estipulados en este tipo de estudio dentro de los cuales el porcentaje de error relativo (%E) para la exactitud de HgT en cada nivel bajo, medio y alto y MeHg en todo su rango de las curvas, se encuentran los resultados dentro del rango de aceptación ( $\pm 5\%$ ) según lo establecido en AOAC.

**Tabla 16.** Exactitud del sistema para HgT y MeHg

<b>HgT</b>			<b>MeHg</b>		
<b>Rango</b>	<b>Curva</b>	<b>%E</b>	<b>Rango</b>	<b>Curva</b>	<b>%E</b>
<b>Rango bajo</b>	2 ng	1,20	<b>Rango bajo</b>	20 ng	3,30
<b>Rango medio</b>	10 ng	1,91	<b>Rango medio</b>	1000 ng	1,81
<b>Rango alto</b>	100 ng	3,10	<b>Rango alto</b>	2000 ng	3,42

### 8.1.8. Precisión del método para HgT y MeHg

La guía ISO 3534-1:199322, define la exactitud como “la proximidad en la concordancia entre un resultado y el valor de referencia aceptado” y esta misma norma establece que la precisión es el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo unas condiciones estipuladas.

#### 8.1.8.1. Repetibilidad

La repetibilidad para HgT y MeHg se muestran en la tabla 17. Los resultados obtenidos por el equipo se expresan en ng de Hg y MeHg, se compararon los resultados obtenidos para cada muestra con los reportados por la AOAC internacional (Association of Official Analytical Chemists) y el valor establecido por el IDEAM, para definir si el método cumplía en cuanto a repetibilidad del método.

Teniendo en cuenta los resultados de la tabla 17, se definió este parámetro en términos de porcentaje de coeficiente de variación (%CV) para los tres niveles de concentración de HgT (bajo: 2ng; medio:10ng; alto:100ng) y MeHg (bajo: 20ng; medio:1000ng; alto:2000ng). Se observa que los coeficientes de variación están por debajo de los límites establecidos por la AOAC y también se encuentran por debajo del 10%, valor establecido por el IDEAM para la estandarización de métodos analíticos (IDEAM, 2006), por lo tanto, se cumplen con las especificaciones establecidas en cuanto a la repetibilidad del método.

**Tabla 17.** Repetibilidad del método para HgT y MeHg

HgT		MeHg	
Muestra	%CV	Muestra	%CV
Cabello Dia 1	1,19	Cabello Dia 1	0,69
Cabello Dia 2	1,37	Cabello Dia 2	4,47
Cabello Dia3	1,06	Cabello Dia 3	0,97
Cabello +Adición 2 ng	4,40	Cabello +Adición 20 ng	1,26
Cabello +Adición 10 ng	1,07	Cabello +Adición 1000 ng	0,38
Cabello +Adición 100 ng	2,35	Cabello +Adición 2000 ng	0,44

### 8.1.9. Precisión intermedia

A continuación, la precisión intermedia se expresa cómo %CV para las muestras de cabello se evaluó por 2 analistas entre días, con tres niveles de concentración diferente. En la tabla 18 se observa que al promediar los resultados de cada muestra con adicionado el coeficiente de variación en cada caso fue mayor que el obtenido para repetibilidad, esto debido a que se producen pequeños errores en la medición entre los analistas que pueden generar diferencias en los resultados del proceso de medición.

La precisión intermedia definiéndola en términos del coeficiente de variación (%CV) promedio para los distintos rangos de trabajo cumple con el criterio de aceptación de calidad analítica estipulado para este tipo de análisis (<10%) para matrices según la AOAC, por lo tanto, se acepta que el método de análisis es preciso.

**Tabla 18.** Precisión intermedia para HgT y MeHg

HgT		MeHg	
Muestra	%CV	Muestra	%CV
Cabello 1	3,84	Cabello 1	7,90
Cabello1+Adición 2 ng	2,94	Cabello1+Adición 20 ng	5,33
Cabello1+Adición 10 ng	1,38	Cabello1+Adición 1000 ng	2,39
Cabello1+Adición 100ng	0,33	Cabello1+Adición 2000 ng	9,11

### 8.1.10.Exactitud del método

La exactitud del método desarrollado se evaluó con base en el porcentaje de recuperación utilizando los datos que se encuentran en el anexo C y F. Se calculó el %R, y los resultados que se observan en las tablas 19 y 20 son los promedios de los días que se realizó cada replica para cada analito. En base a estos datos se concluye que los %R son satisfactorios; lo que nos indica que el método utilizado es apropiado. Los resultados en base al porcentaje de recuperación se encuentran dentro del intervalo de aceptación de 80-120 % según la AOAC internacional (Association of Official Analytical Chemists) lo cual indica que el método no presenta perdidas de analito (<80%) o interferencia de matriz (>120%).

**Tabla 19.** Exactitud método HgT

Muestra	%R		
	Día 1	Día 2	Día 3
Cabello 1 +Adición 2ng	97,61	84,94	88,91
Cabello 1 +Adición 10Ng	97,52	99,62	97,73
Cabello 1 +Adición 100 ng	105,01	104,50	105,15

**Tabla 20.** Exactitud del método para MeHg.

Muestra	%R		
	Día 1	Día 2	Día 3
Cabello 1 + Adición 20ng	88,25	84,92	86,45
Cabello 2 + Adición 1000ng	96,22	97,16	100,15
Cabello1 + Adición 2000 ng	111,13	102,76	104,54

**8.1.11. Análisis material de referencia**

Se realizó análisis al material de referencia (IAEA-086 Human Hair para HgT) obteniéndose los resultados mostrados en la tabla 21. Dado que nuestro resultado se encuentra dentro de los límites de aceptación del MRC, podemos decir que nuestro método presenta un buen desempeño analítico, tanto en veracidad ( $\%E < 5\%$ ) como en precisión ( $\%CV < 10\%$ ).

**Tabla 21.** %R para material de referencia certificado

Réplicas	HgT	MeHg
1	0,523	0,246
2	0,506	0,249
3	0,543	0,291
4	0,582	0,268
5	0,571	0,258
6	0,562	0,249
7	0,566	0,221
8	0,578	0,239
9	0,564	0,276
<b>Promedio</b>	0,555	0,255
<b>Desv. Estándar</b>	0,025	0,0208
<b>CV</b>	4,652	8,156
<b>%R</b>	96.21	97.58
<b>MRC (mg/Kg)</b>	0.573	0.258
<b>Intervalo</b>	0.534 – 0.612	0.236 – 0.279

### 8.1.12. Límite de detección y cuantificación

Para corroborar el límite de detección del método, se analizaron 15 estándares de blancos, se determinó el promedio, la desviación estándar de las concentraciones y se le aplicó el test de rechazo para saber los datos anómalos obteniendo los datos que se muestran en la tabla 9 y 10 para HgT y MeHg respectivamente. Además, en los resultados de la prueba estadística t-student con 95% de aceptabilidad realizada a 15 blancos se observa que entre los datos obtenidos no hay ninguno anómalo.

El límite de detección y límite de cuantificación se calculó mediante el procedimiento descrito en la metodología, obteniéndose los siguientes resultados: para HgT el LC (1,61) y LDM (0,59) y para MeHg LC (1,90) y LDM (0,70) calculados utilizando las Ecu (3 y 5), además que se determinó el LDI (0,26) para HgT y LDI (0,31) para MeHg calculado por las Ecu (4) como se observa en la tabla 22.

**Tabla 22.** Límite detección y cuantificación.

Réplicas	HgT (ug/kg Hg)	MeHg (ug/kg Hg)
1	0,01	0,70
2	0,01	0,78
3	0,02	0,48
4	0,01	0,42
5	0,04	0,94
6	0,04	0,98
7	0,03	0,74
8	0,06	0,88
9	0,04	0,84
10	0,05	0,70
11	0,05	0,64
12	0,01	0,42
13	0,01	0,50
14	0,02	0,94
15	0,02	0,78
<b>Promedio</b>	0,03	0,72
<b>Desviación</b>	0,16	0,18
<b>LDI</b>	0,26	0,31
<b>LDM</b>	0,59	0,70
<b>LCM</b>	1,61	1,90

### 8.1.13. Robustez y selectividad del método para MeHg

El cálculo de la robustez para la determinación de metilmercurio, se llevó a cabo evaluando los dos diseños experimentales planteados en la metodología, en donde se analizó el efecto del lavado y tinturado del cabello para visualizar los cambios significativos que pueden tener sobre el método, a través de un análisis de varianza y coeficiente de variación como se muestra en las tablas 23 y 24.

**Tabla 23.** Análisis de comparación de varianzas entre cabello tinturado y sin tinturar

	Cabello tinturado lavado	Cabello tinturado sin lavar
Media	8,2	7,6
Varianza	0,14	0,05
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	9
F	2,70	
P(F<=f) una cola	0,07	
Valor crítico para F (una cola)	3,18	
%CV	4,25	5,12

Se analizaron muestras de cabello tinturado lavado y sin lavar. En el análisis de varianza el valor F calculado para las muestras es menor que el valor crítico de F, esto quiere decir que no existe diferencia significativa entre muestras.

**Tabla 24.** Análisis de comparación de varianzas entre cabello sin tinturar lavado y sin lavar

	Cabello sin tinturar lavado	Cabello sin tinturar sin lavar
Media	7,594	7,566
Varianza	0,10876	0,05856
Observaciones	10	10
Grados de libertad	9	9
F	1,857240437	
P(F<=f) una cola	0,185021556	
Valor crítico para F (una cola)	3,178893104	
%CV	2,64	2,89

El objetivo principal que emplea la robustez es describir bajo qué condiciones ya establecidas en el método, en este caso EPA 7473 se puede obtener resultados confiables con pequeñas variaciones Inter laboratorio o cambios en la rutina que se emplea para la ejecución de este.

El procedimiento al no permanecer inalterado con los cambios de preparación y conservación de la muestra provee información de su comportamiento en la rutina utilizada. Un método es más robusto cuanto menos dependa de una rutina estricta. Por ejemplo, cuando se considera

el lavado del cabello algo fundamental, esto con la finalidad de eliminar el contenido de grasa presente en la muestra y propio de la misma, ya que cuando se somete al proceso directo de medición estos pueden ocasionar datos erróneos en la medida no brindando resultados confiables y precisos. La robustez se evaluó, además, considerando la influencia del tinte en el cabello, ya que en su composición pueden formar elementos mercuriales (Benarroch, et al 2013), se prepararon muestras de cabello tinturado y sin tinturar y se realizó la medición de la muestra a través del proceso de extracción que se realiza para MeHg.

Los valores de los coeficientes de variación (CV) encontrados y puestos en evidencia en las tablas anteriores permiten aseverar condiciones de robustez. Además, en el análisis de varianza el valor F calculado para las muestras es menor que el valor crítico de F, esto quiere decir que no existe diferencia significativa entre muestras. Después de realizar los ensayos de robustez se demuestra que el método presenta confiabilidad, con medidas que no resultan afectadas por pequeñas variaciones en los parámetros del método establecido.

## **8.2. Incertidumbre**

El cálculo de incertidumbre para la determinación de mercurio y metilmercurio, se realizó como una sumatoria de fuentes individuales como se muestra a continuación:

### **8.2.1. Incertidumbre del estándar de Hg**

Para este cálculo se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

Peso molecular del Hg

Aforo realizado para su preparación (incluye calibración del material volumétrico utilizado).

$$U_{estandar} = 3,12E-03$$

### **8.2.2. Incertidumbre peso molecular del Hg**

Incertidumbre medida debido al peso molecular del estándar.

$$U_{peso\ molecular} = 0,000058$$

### 8.2.3. Incertidumbre Preparación estándar 0.01, 0.1, 1, Y 10 ppm.

**Tabla 25.** Incertidumbre debida a la preparación de estándares

Fuente	Descripción	Símbolo	HgT
Preparación de estándares	Volumen de blanco	Vb	6.15E-04
	Volumen final de estándar	VE	1.24E-03
	Estándar 0,01	E1	4,86E-04
	Estándar 0,1	E2	1,46E-04
	Estándar 1	E3	5,28E-04
	Estándar 10	E4	1,46E-03

**Tabla 26.** Incertidumbre combinada para el rango de trabajo HgT

FUENTE	DESCRIPCIÓN	Símbolo	Rango alto	Rango medio	Rango bajo
Masa de la muestra	Masa tara del recipiente	M <sub>0</sub>	5.50E-05	1.50E-05	7.60E-05
	Masa del recipiente con muestra	M <sub>f</sub>	6.60E-05	5.60E-05	5.41E-05
	Masa de muestra	M <sub>m</sub>	1.32E-04	6.21E-04	1.31E-04
Concentración Exactitud	Curva de calibrado	Cal	1.95E-02	1.27E-02	5.78E-02
	Recuperación	Rec	5.64E-03	2.90E-03	1.18E-02
Precisión	Repetibilidad	Rep	2.10E-04	4.80E-03	2.13E-02
	Precisión intermedia	PI	7.0E-03	8.10E-03	6.13E-02
Incertidumbre final expandida		U <sub>exp</sub>	0.62	0.25	0.37
Concentración medida		Conc	14	7	2.0
Valor reportado			14±0.62	7± 0.25	2.0 ± 0.37

**Tabla 27.** Incertidumbre debida a la preparación de estándar MeHg

Fuente	Descripción	Símbolo	CH <sub>3</sub> Hg
Preparación de estándares	Volumen final de estándar	VE	1.34E-03
	Estándar 0,01	E1	5.26E-03
	Estándar 57	E2	8.60E-04
	Estándar 1	E3	3.36E-03

**Tabla 28.** Incertidumbre combinada para el rango de trabajo MeHg

FUENTE	DESCRIPCIÓN	Símbolo	Rango alto	Rango medio	Rango bajo
Masa de la muestra	Masa tara del recipiente	M <sub>0</sub>	9.10E-04	9.10E-04	7.20E-04
	Masa del recipiente con muestra	M <sub>f</sub>	9.10E-05	9.10E-04	8.10E-04
	Masa de muestra	M <sub>m</sub>	1.29E-04	1.29E-04	2.39E-04
Concentración Exactitud	Curva de calibrado	Cal	1.59E-02	6.64E-02	7.30E-03
	Recuperación	Rec	2.38E-02	7.53E-02	8.20E-03
Precisión	Repetibilidad	Rep	6.30E-02	3.48E-02	4.42E-02
	Precisión intermedia	PI	6.34E-02	8.15E-02	6.8E-02
Incertidumbre final expandida		U <sub>exp</sub>	0.34	0.23	0.65
Concentración medida		Conc	1.58	5.32	342
Valor reportado			1.58± 0.34	5.32±0.23	342±37.65

Al estimar la incertidumbre global, fue necesario tomar cada fuente de incertidumbre y tratarla de forma separada para obtener la contribución de esa fuente. Cada una de las contribuciones separadas a la incertidumbre es un componente de la incertidumbre (EURACHEM, 2019). Para esto se calculó la incertidumbre final expandida a partir de las incertidumbres estándares de cada variable, cumpliendo el criterio de confiabilidad del 95%, además se realizó la tabulación y cálculo de estos datos en una plantilla de Excel.

De acuerdo a las tablas anteriores se puede determinar que el mayor aporte a la incertidumbre se da por parte de la precisión intermedia, este resultado se atribuye a que las mediciones de la muestra fueron realizadas entre analistas diferentes y la preparación de los estándares son realizadas durante tres días distintos y las condiciones del laboratorio pueden variar, así como también se debe tener en cuenta que para estándares de concentraciones muy bajos se hace necesario emplear dilución en su preparación, lo que puede generar un significativo aporte de incertidumbre a la fuente mencionada.

**Tabla 29.** Resumen de los parámetros de validación

<b>Parámetro</b>	<b>HgT</b>		<b>MeHg</b>	
LD		0,59		0,70
LC		1,61		1,90
Exactitud %R	Rango bajo	90,52%	Rango bajo	96.54%
	Rango medio	98,25%	Rango medio	97.85%
	Rango alto	104,86%	Rango alto	106.14%
Repetibilidad %CV	Rango bajo	4.40	Rango bajo	1,26
	Rango medio	1,07	Rango medio	0,38
	Rango alto	2,35	Rango alto	0,44
Precisión intermedia %CV	Rango bajo	2,94	Rango bajo	5,33
	Rango medio	1,38	Rango medio	2,39
	Rango alto	0,33	Rango alto	4,11

## 9. CONTROL DE PROCESO PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS

Al realizar la validación se tuvo en cuenta el control de proceso, el cual se aplicará a cada lote de muestra, este quedara consignado en el procedimiento estándar operativo para la determinación de mercurio total y metilmercurio en cabello, del laboratorio de toxicología y gestión ambiental de la universidad de Córdoba, bajo las siguientes condiciones: Se realizó un duplicado cada 20 Muestras, un adicionado cada 40 muestras, un blanco cada 20 muestras y la medición del material de referencia por triplicado cada 100 muestras, esto dependiendo de los análisis que se realicen en el laboratorio diariamente.

## 10. IMPLEMENTACIÓN

Para la implementación de la metodología se seleccionan muestras de cabello de la población del municipio de Bojayá departamento de Chocó, las cuales fueron recolectadas por profesionales en el área ambiental y posteriormente trasportadas al laboratorio para su tratamiento y análisis, el total de personas evaluadas fue de 100 muestras. Se compararon los valores obtenidos con valores de referencia para Hg y MeHg en cabello arrojando valores por encima del límite permisible de mercurio en cabello según la OMS ( $>0.5 \mu\text{g/g}$ ) (Kerguelen, 2020).

**Tabla 30.** Análisis de muestras de cabello para HgT y MeHg

MUESTRA	Máx. valor	Mín. valor	S	Media	Moda	Total, Muestras
Cabello Hg (ug/g)	5,9319	3,0102	0,8328	3,5261	3,5737	100
Cabello MeHg (ug/g)	4,6238	2,0482	0,8246	2,3620	3,3489	100

En Colombia, uno de los problemas más importante asociado a la minería aurífera es la contaminación por mercurio y otras sustancias tóxicas constituyéndose en un factor de riesgo para la salud humana (López, et al 2016). Estas muestras fueron tomadas en marco del macroproyecto titulado: Evaluación del grado de contaminación por mercurio y otras

sustancias tóxicas y su afectación en la salud humana en las poblaciones de la cuenca del río Atrato, como consecuencia de las actividades de minería.

La metodología se implementó en muestra de Cabellos provenientes de los habitantes de la cuenca del río Atrato, departamento del Chocó, el cual está ubicado en la zona norte de Colombia, hace parte del Chocó biogeográfico, y es considerada una de las zonas con más biodiversidad del planeta.

En la tabla 29 se observa los resultados de la implementación, que como era de esperarse, los niveles de mercurio en cabello superando los límites permisibles OMS ( $>0.5 \mu\text{g/g}$ ) con un promedio de 5,124 Hg ( $\mu\text{g/g}$ ) y 4,406 MeHg ( $\mu\text{g/g}$ ), de uno de los factores más importantes que interfiere en la cantidad de mercurio presente en el cabello es el consumo de pescado contaminado ya que en estudios anteriores este presenta un riesgo para la salud humana, siendo esta la principal vía de exposición (OMS, 2008). Un elevado índice de mercurio y metilmercurio en cabello como se presenta en las muestras analizadas en el presente trabajo podría representar un riesgo para la salud humana y posibles complicaciones para la salud de estas personas.

## 11. CONCLUSIONES

- Se validó el método 7473 de la US EPA para la determinación de mercurio y metilmercurio en cabello mediante el uso de los equipos DMA 80 (Analizador Directo de Mercurio) y Analizador de mercurio RA-915M PYRO-915+.
- La exactitud definiéndola en base al porcentaje de recuperación es buena, debido a que se obtuvo resultados entre el 90,52% hasta 104,86% para HgT y de 82,9% hasta 118,8% para MeHg, los cuales se encuentran entre los límites aceptados por la AOAC (80%-120%). Para los estándares el porcentaje de error fue <5%, el cual se encuentra entre los límites de aceptación.
- La precisión del método evaluada como repetibilidad y precisión intermedia definiéndola en términos de coeficiente de variación fueron menores al 5% tanto para Mercurio como para Metilmercurio, los cuales cumplen con los criterios de aceptación establecidos.
- Para el límite de detección del método y límite de cuantificación, se observó que el equipo detecta concentraciones de 0.59 ng de Hg y 0,70ng de MeHg y cuantifica a partir de 1,61 ng de Hg y 1,90 ng de MeHg, lo cual demuestra veracidad del método para la determinación de estos dos analitos.
- Para un nivel de confianza del 95% se obtuvo una incertidumbre experimental de  $\pm 0.37$  para el nivel bajo,  $\pm 0.25$  para el nivel medio y  $\pm 0.62$  para el nivel alto de HgT y  $\pm 0.65$  para el nivel bajo,  $\pm 0.23$  para el nivel medio y  $\pm 0.34$  para el nivel alto de MeHg lo cual es acorde para el análisis del método.
- El método validado demostró tener una buena linealidad para ambos compuestos, lo que se confirmó con las pruebas estadísticas que mostraron la buena relación entre los datos y la no existencia de diferencia estadísticamente significativa entre el valor F calculado para HgT en los rangos bajo, medio y alto 33275.5, 17670.8, 12147.0 respectivamente y MeHg en todo su rango 78231,39 siendo estos mayores al valor F crítico = 3,08, con un nivel de confianza del 95%.
- En cuanto a la robustez del método para MeHg al evaluarse la capacidad del resultado de no sufrir alteraciones por pequeñas modificaciones en los parámetros del análisis, se comprobó que las pequeñas modificaciones de la rutina para ejecutar la metodología no interfieren en los resultados obtenidos.

- Se implementó el método desarrollado en muestras de cabello de habitantes del municipio de Bojayá en el departamento del Chocó expuestos a este tipo de contaminación, en las cuales se encontraron altas concentraciones de Hg y MeHg.

## 12. RECOMENDACIONES

- Analizar las muestras el mismo día de realizar la extracción de MeHg debido a que el analito es volátil y poco estable, por tanto, puede haber pérdida del mismo.
- Preparar diario las soluciones de sulfato de cobre, bromuro de potasio y cisteína.
- Se recomienda dejar calentar las muestras para la identificación de MeHg por más tiempo (30 minutos) para obtener una mejor extracción del compuesto.
- Quemar la celda de cuarzo del DMA-80 antes de introducir la muestra, para eliminar cualquier contaminación con mercurio.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia de Protección Ambiental (EPA). (2021). Cómo las personas están expuestas al mercurio [Internet]. Mercurio. Disponible en: <https://www.epa.gov/mercury/how-people-are-exposed-mercury>
- Aguirre L, García T, Illera M JM. (2014). Validación de métodos analíticos AEFI. Madrid, Asoc española Farm la Ind. 87.
- Astolfi, M. L., Protano, C., Marconi, E., Piamonti, D., Massimi, L., Brunori, M., Vitali, M., Canepari, S. (2019). Método simple y rápido para la determinación de mercurio en cabello humano mediante espectrometría de fluorescencia atómica de generación de vapor frío. *Microchem J*, Vol. 150, 104186. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104186>
- Báguena-Polo, J., Gotor-Navarra, G., Broto-Puig, F., & Blanco-Roca, M. J. (2015). Cálculo de la incertidumbre asociada a los resultados basado en la validación de un procedimiento de análisis. aplicación en la determinación de cloruros por HPLC en lixiviados. *Afinidad*, 65(533).
- Barrios, S. (2017). Creación de un instrumento para la valoración de las actividades de la vida diaria básicas en personas con trastornos del neurodesarrollo. Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura. Retrieved from <https://docplayer.es/77540368-Tesis-doctoral-tesis-doctoral.html>.
- Benarroch, L., Revelante, V. (2013). Elementos Químicos Determinados por Análisis del Cabello en Muestras de Pacientes de Varias Poblaciones venezolanas desde 1991 a 2011. *Informe Médico*. vol. (15) N.1 p5-14. 10p.
- Blesa M, Castro G. (2015). Historia natural y cultural del mercurio. Buenos Aires: Asociación Argentina para el Progreso de las Ciencias.
- Bolaños-Álvarez, Y., Cos-Negret, K., Guillén-Arruebarrena, A., & Torres-Martín. A. M. (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.
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., & Sandoval, S. (2010). Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “aspectos generales sobre la validación de métodos”. Santiago: Instituto De Salud Pública.

- Engstrom, D. R. (2017). Fish Respond When the Mercury Rises. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(No. 42), 16394-16395.
- EPA. Method 7473. Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, Amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry [Internet]. Washington, DC; 1998. Disponible en: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-7473.pdf>
- Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores. (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados (1ªed.). Disponible en [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
- Fuentes-Gandara F, Pinedo-Hernández J, Marrugo-Negrete J, Díez S. (2018). Human health impacts of exposure to metals through extreme consumption of fish from the Colombian Caribbean Sea. *Environ Geochem Health*. 40(1):229-42.
- Garrido Peralta, C. (2021). Exposición a mercurio y alteraciones en la salud en zonas de minería aurífera del municipio de el Carmen de Atrato en el departamento de Chocó. Ministerio de Salud y Protección Social.
- González-Estecha, M., Bodas-Pinedo, A., Guillén-Pérez, J. J., Rubio-Herrera, M. A., Ordóñez-Iriarte, J. M.<sup>a</sup>, Trasobares-Iglesias, E. M., Martell-Claros, N., Martínez-Álvarez, J. R., Farré-Rovira, R., Herráiz-Martínez, M. A., Martínez-Astorquizd, T., Calvo, M., Sáinz-Martín, M., Bretón-Lesmes, I., Prieto-Menchero, S., Llorente-Ballesteros, M.<sup>a</sup> T., Martínez-García, M.<sup>a</sup> J., Salas-Salvadó, J., Bermejo-Barrera, P., García-Donaire, J. A., Cuadrado-Cenzual, M.<sup>a</sup> A., Gallardo-Pino, C., Moreno-Rojas, R., Arroyo-Fernández, M., & Calle-Pascual, A. (2014). Exposición al metilmercurio en la población general; toxicocinética; diferencias según el sexo, factores nutricionales y genéticos. *Nutrición Hospitalaria*, 30(5), 969-988. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2014.30.5.7727>
- Gusso-Choueri PK, Araújo G, Cruz A, Stremel T, Campos S, Abessa D. (2018). Metals and arsenic in fish from a Ramsar site under past and present human pressures: Consumption risk factors to the local population. *Sci Total Environ*. 628–629:621–630. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.005>.
- Iaquinta, F., Álvarez, C., Cousillas, A., Mañay, N. (2019). Desarrollo y optimización de una metodología para la determinación de metales y semimetales en cabello. *Revista del laboratorio tecnológico del Uruguay*. (No. 18), 142-153. DOI: 10.26461/18.01

- Kerguelén S. M. C., (2020). Condiciones de exposición de la población habitante de la cuenca del río Atrato (municipio de Turbo) y su relación con niveles de mercurio en cabello producto de la actividad de minería de oro. (Tesis de maestría). Universidad de Córdoba. Montería-Colombia.
- Kumari, S. (2020). Recent developments in environmental mercury bioremediation and its toxicity: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*.
- Laguna, C. (2014). *Correlación y regresión lineal*. Instituto Aragónes de Ciencias de la Salud.
- Llorente-Ballesteros, M. T., Vírveda-Chamorro, I., Peral-Jiménez, R., Sanz-Grimaldi, M. J., Ruiz-Tejada, M. A., López-Colón, J. L. (2011). Metilmercurio en el cabello de población infantil. *Sanid. Vol. 67, (No. 3), 299-303*.
- Londoño-Franco, L. F., Londoño-Muñoz, P. T., Muñoz-García, F. G. (2016). Los riesgos de los metales pesados en la salud humana y animal. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, Vol. 14 (No. 2), 145-153*. DOI:10.18684/BSAA(14)145-153.
- Lopez Bravo, M., Santos Luna, J., Quezada Abad, C., Segura Osorio, M. y Perez Rodriguez, J. (2016). Actividad minera y su impacto en la salud humana. *ciencia unemi, Vol. 9(No. 17), 92-100*. Disponible en: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/255>
- López, J. E. (2019). El pelo como matriz toxicológica. *Gac. int. cienc. Forense, Vol. 1 (No. 30), 10-17*. [https://www.uv.es/gicf/3R1\\_Esparza\\_GICF\\_30.pdf](https://www.uv.es/gicf/3R1_Esparza_GICF_30.pdf).
- López, M. C. (2016). Desarrollo de un método analítico para la determinación de mercurio atmosférico. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Medellín-Colombia.
- Luna Arcila, M. M., & Soto Hoyos, E. J. (2016). Consideraciones Ambientales por el uso de mercurio en minería aurífera en el municipio del Bage, Antioquia. *Estrategias de Produccion Limpia*. Universidad De Córdoba, Facultad De Ingeniería.
- Madera, P. M. C., (2019). Especiación de mercurio en sedimentos de la mojana sucreña mediante desorción térmica programada. (Tesis de pregrado). Universidad de Córdoba. Montería-Colombia.
- Marrugo Negrete, J., Pinedo-Hernández, J., Paternina-Urbe, R., Quiroz-Aguas, L., & Pacheco-Florez, S. (2018). Distribución espacial y evaluación de la contaminación ambiental por mercurio en la región de la Mojana, Colombia. *Revista MVZ Córdoba, 23(S), 7062-7075*. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1481>

- Marrugo-Negrete, J., Norberto-Benitez, L., y Olivero-Verbel, J. (2008). Distribution of mercury in several environmental compartments in an aquatic ecosystem impacted by gold mining in northern Colombia. *Arch Environ Contam Toxicol*.55(2):305–316.
- Martínez, J. A., & Reinaldo, M. (2018). Extracción de Oro en Colombia. Contaminación y remediación de suelos en Colombia: aplicado a la minería del oro (págs. 12-15). Bogotá-Colombia: Ediciones EAN.
- Méndez, C. B. (2018). Evaluación del grado de contaminación con mercurio (Hg) en laguna la señoraza: evaluación del grado de contaminación con mercurio (Hg) en laguna la señoraza: agua, sedimentos y biota.
- Method Epa 7473 (2007): Mercury in Solids and Solutions by Thermal Decomposition, Amalgamation, and Atomic Absorption Spectrophotometry, part of Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods. 17, 304.
- Miller, J. N., Miller, J. C. (2002). Estadística y quimiometría para química analítica. Pearson Educación. <https://sceqa.files.wordpress.com/2012/05/quimica-y-quimiometria.pdf>.
- Ministerio de Minas y Energía, Unidad de Planeación Minero Energética (UPME) Ministerio de Minas y Energía, Universidad de Córdoba. (2014) Estudio de la Cadena de Mercurio en Colombia con énfasis en la actividad minera de oro-Tomo 3 [Internet]. Disponible en: [http://www.upme.gov.co/SeccionMineria\\_sp/cadena\\_de\\_mercurio/Cadena\\_Mercurio\\_Tomo\\_III.pdf](http://www.upme.gov.co/SeccionMineria_sp/cadena_de_mercurio/Cadena_Mercurio_Tomo_III.pdf)
- Ministerio de Salud y Protección Social (MSPS). (2018). Informe final “Evaluación del grado de contaminación por mercurio y otras sustancias tóxicas, y su afectación en la salud humana en las poblaciones de la cuenca del río Atrato, como consecuencia de las actividades de minería”. PP. 39(1). 38-40.
- Mora-Duarte, Y. F. (2019). Estrategia didáctica desde el enfoque ciencia, tecnología y sociedad para la enseñanza de los efectos del mercurio sobre la salud y el ambiente, (Tesis de Maestría). Universidad nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co>
- OMS. El mercurio y la salud [Internet]. WHO. 2017b [citado 17 de abril de 2021]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/es/>
- Pacyna, J. M. (2020). Avances recientes en la investigación del mercurio. *Ciencia del Medio Ambiente Total*, Vol 738, 139955. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139955>.

- Pino, A., Bocca, B., Forte, G., Majorani, C., Petrucci, F., Senofonte, O., Alimonti, A. (2018). Determination of mercury in hair of children. *Cartas de toxicología*, Vol. 298, 25-32. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.1215>.
- Rahman MM, Hossain KFB, Banik S, Sikder MT, Akter M, Bondad SEC, et al. (2019). Selenium and zinc protections against metal-(loids)-induced toxicity and disease manifestations: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*.168:146-63.
- Raimann, Ximena, Rodríguez O, Lorena, Chávez, Paulina, & Torrejón, Claudia. (2014). Mercurio en pescados y su importancia en la salud. *Revista médica de Chile*, 142(9), 1174-1180. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872014000900012>.
- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Díaz, M., Gonzáles, E. (2016). Contaminación por metales pesados: implicaciones en salud, ambiente y seguridad alimentaria. *Revista Ingeniería, Investigación y Desarrollo*. Vol. 16, (No. 2), 66-77.
- Richter, P. (2017). Validación de métodos analíticos. Presentación, Santiago de Chile.
- Ruiz-Chaves, I. (2016). Metodologías analíticas utilizadas actualmente para la determinación de mercurio en músculo de pescado. *Pensamiento Actual*, 16(26), 113.
- Rumayor Villamil, M. (2015). Nuevos desarrollos en la identificación de especies de mercurio en sólidos mediante desorción térmica. (Tesis de Doctorado) Universidad de Oviedo.
- Sánchez, I. D. C. (2018). Técnicas alternativas para la extracción de oro sin el uso de mercurio y su potencial aplicación a pequeña escala y minería artesanal en Colombia. (Tesis de pregrado). Bogotá, UNAD-Colombia.
- Sánchez-Rodríguez, L., H. (2009). Comparación de dos métodos de determinación de mercurio total en cabello por espectroscopías de absorción atómica con generador de hidruros y diferencial de efecto zeeman con pirolizador. (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Bogotá-Colombia.
- Sanguino, L. V., Díaz, R., Peña. D., Machado. C., Barrera, A. L. (2020). Plan de Intervención Primaria para el manejo de la Contaminación por Mercurio en la población minera del Departamento del Chocó. *Diplomado de Profundización Gestión de la Salud Pública*. UNAD-Colombia.

- Saniewska, D., & Bełdowska, M. (2017). Mercury fractionation in soil and sediment samples using thermo-desorption method. *Talanta*, 168(3), 152–161. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.026>
- Sarmani, S. B., Haman, R. B., Abdulilah, M. P., y Hamzah, A. (1997). Determination of mercury and methylmercury in hair samples by neutron activation. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol. 216, (No. 1), 25-27.
- Schmidt, W. A., & Lazos, R. (2015). Guía para estimar la incertidumbre de la medición. Centro Nacional De Metrología.
- Standard Methods. (2015). for the Examination of Water and Wastewater, 23rd Edition.
- Vargas-Licona, S. P., Marrugo-Negrete, J. L. (2019). Mercurio, metilmercurio y otros metales pesados en peces de Colombia: riesgo por ingesta. *Acta biol. Colomb.* Vol 24(No. 2), 232-242.

## ANEXOS

**ANEXO A.** Curva de calibrado por triplicado, para cada rango.

**Tabla A1.** Puntos por triplicado para la curva de calibrado rango bajo

ng Hg	ABS
0,05	0,0057
0,05	0,0070
0,05	0,0060
0,1	0,0092
0,1	0,0101
0,1	0,0084
0,3	0,0269
0,3	0,0303
0,3	0,0309
0,5	0,0449
0,5	0,0541
0,5	0,0532
0,8	0,0857
0,8	0,0808
0,8	0,0844
1	0,1072
1	0,1084
1	0,1036
1,5	0,1541
1,5	0,1463
1,5	0,1560
2	0,2092
2	0,2142
2	0,2057
2,5	0,2572
2,5	0,2430
2,5	0,2558
3	0,2983
3	0,3083
3	0,3004
3,5	0,3543
3,5	0,3560
3,5	0,3483
4	0,4076
4	0,4062
4	0,4021

**Tabla A2.** Puntos por triplicado para la curva de calibrado rango medio

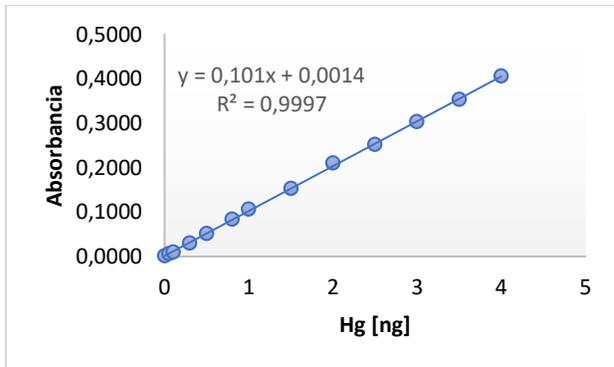
<b>ng Hg</b>	<b>ABS</b>
4	0,1788
4	0,1708
4	0,184
4,5	0,1991
4,5	0,2067
4,5	0,1949
5	0,2259
5	0,2208
5	0,2141
6	0,2541
6	0,2476
6	0,2433
8	0,3434
8	0,3506
8	0,3461
10	0,4299
10	0,4393
10	0,4262
12	0,5023
12	0,5131
12	0,5189
15	0,6201
15	0,6408
15	0,6222
18	0,7388
18	0,7343
18	0,7321
20	0,8246
20	0,819
20	0,8166

**Tabla A3.** Puntos por triplicado para la curva de calibrado rango alto

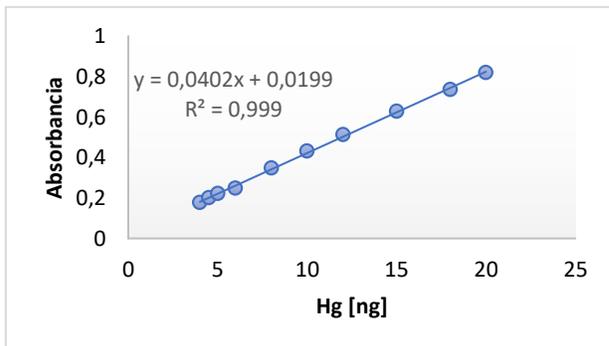
<b>ng Hg</b>	<b>ABS</b>
30	0,0264
30	0,0294
30	0,0324
50	0,0407
50	0,0443
50	0,0432
80	0,0587
80	0,0592
80	0,0605
100	0,0823
100	0,0892
100	0,0792
150	0,1306
150	0,1214
150	0,1291
200	0,1689
200	0,1766
200	0,1752

400	0,3296
400	0,3356
400	0,3284
600	0,4755
600	0,4806
600	0,4797

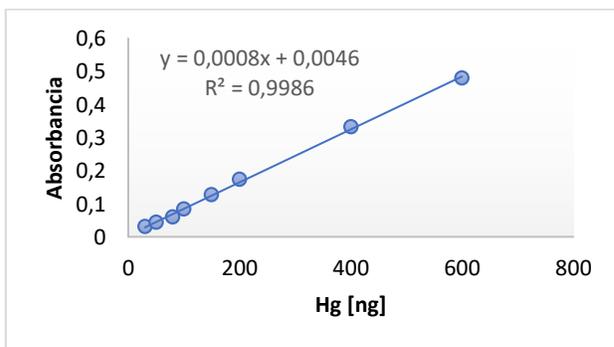
**ANEXO B.** Graficas de regresión para el Mercurio.



**Figura B1.** Curva de calibrado rango bajo



**Figura B2.** Curva de calibrado rango medio



**Figura B3.** Curva de calibrado rango alto.

ANEXO C. Precisión y exactitud.

**Tabla C1.** Precisión del sistema para HgT

		ng Hg			Precisión intermedia		
		DIA 1	DIA 2	DIA 3	Promedio	SD	%CV PI
<b>Muestras</b>	<b>Repetibilidad</b>	2,23	2,32	2,24	2,266	0,051	<b>2,26</b>
		2,24	2,36	2,28			
		2,19	2,29	2,25			
	<i>Promedio</i>	2,220	2,323	1,969			
	<i>SD</i>	0,026	0,032	0,021			
	<i>%CV</i>	<b>1,188</b>	<b>1,370</b>	<b>1,059</b>			
	<i>%CV promedio</i>	<b>1,206</b>					
<b>Nivel bajo [2 ng]</b>	<b>Repetibilidad</b>	2,03	2,08	1,97	2,025	0,048	<b>2,36</b>
		2,04	2,09	1,95			
		2,03	2,04	1,99			
	<i>Promedio</i>	2,035	2,071	1,969			
	<i>SD</i>	0,006	0,027	0,021			
	<i>%CV</i>	<b>0,288</b>	<b>1,280</b>	<b>1,059</b>			
	<i>%CV promedio</i>	<b>0,876</b>					
<b>Nivel medio [10 ng]</b>	<b>Repetibilidad</b>	10,19	10,05	10,54	10,198	0,183	<b>1,79</b>
		10,17	10,03	10,39			
		10,10	10,00	10,31			
	<i>Promedio</i>	10,153	10,026	10,414			
	<i>SD</i>	0,049	0,023	0,114			
	<i>%CV</i>	<b>0,479</b>	<b>0,227</b>	<b>1,092</b>			
	<i>%CV promedio</i>	<b>0,600</b>					
<b>Nivel alto [100 ng]</b>	<b>Repetibilidad</b>	105,12	100,36	101,36	103,105	2,204	<b>2,14</b>
		106,12	103,49	103,56			
		105,49	102,25	100,21			
	<i>Promedio</i>	105,574	102,032	101,710			
	<i>SD</i>	0,506	1,576	1,702			
	<i>%CV</i>	<b>0,479</b>	<b>1,545</b>	<b>1,674</b>			
	<i>%CV promedio</i>	<b>1,232</b>					

**Tabla C2.** Exactitud del sistema para HgT

		ng Hg	Promedio	SD	%R	%R promedio
<b>Muestra</b>	DIA -1	2,23	2,21952	0,026372974		
		2,24				
		2,19				
	DIA -2	2,32	2,32291	0,03183371		
		2,36				
		2,29				
	DIA -3	2,24	2,25512	0,021997319		
		2,28				
		2,25				
						NA
<b>Nivel bajo [2 ng Hg]</b>	DIA -1	4,38	4,17191	0,185026975	97,62	
		4,09				
		4,04				
	DIA -2	4,06	4,02267	0,040207612	84,99	
		3,98				
		4,03				
	DIA -3	4,06	4,03436	0,031778457	88,96	
		4,04				
		4,00				
						90,52
<b>Nivel medio [10 ng Hg]</b>	DIA -1	12,01	11,97007	0,03333032	97,51	
		11,96				
		11,95				
	DIA -2	12,26	12,28025	0,042729017	99,57	
		12,25				
		12,33				
	DIA -3	11,97	12,02107	0,160901649	97,66	
		12,20				
		11,89				
						98,25
<b>Nivel alto [100 ng Hg]</b>	DIA -1	107,220	107,22333	0,425009804	105,00	
		106,800				
		107,650				
	DIA -2	106,980	106,83000	0,268514432	104,51	
		106,520				
		106,990				
	DIA -3	107,560	107,33333	0,220302822	105,08	
		107,320				
		107,120				
						104,86

## ANEXO D. Puntos para la curva de calibrado MeHg

**Tabla D1.** Puntos para la curva de calibrado 1 MeHg

<b>ng Hg</b>	<b>ABS</b>
0,1	1,57
1	10,81
2	17,57
5	49,88
10	96,44
20	200,03
30	296,52
50	502,73
80	810,32
100	987,38

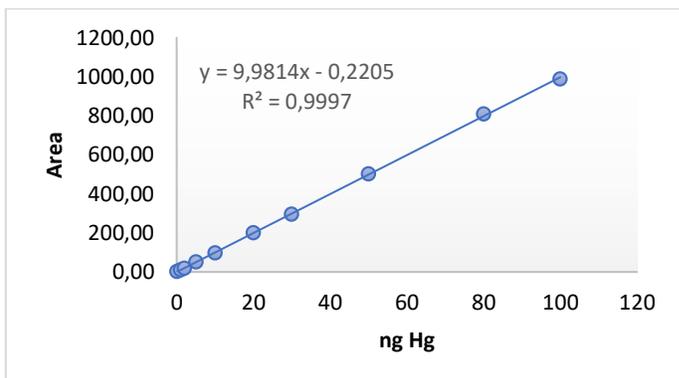
**Tabla D2.** Puntos para la curva de calibrado 2 MeHg

<b>ng Hg</b>	<b>ABS</b>
0,1	1,51
1	10,86
2	17,20
5	51,12
10	95,84
20	200,43
30	301,52
50	503,37
80	811,46
100	989,02

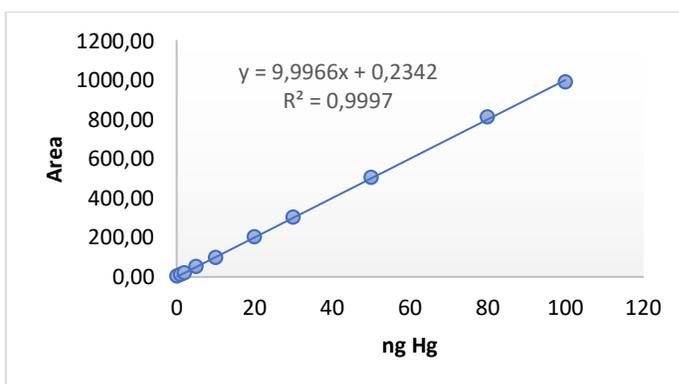
**Tabla D3.** Puntos para la curva de calibrado 3 MeHg

<b>ng Hg</b>	<b>ABS</b>
0,1	1,57
1	10,73
2	17,68
5	50,14
10	96,01
20	201,64
30	300,58
50	502,31
80	811,15
100	988,55

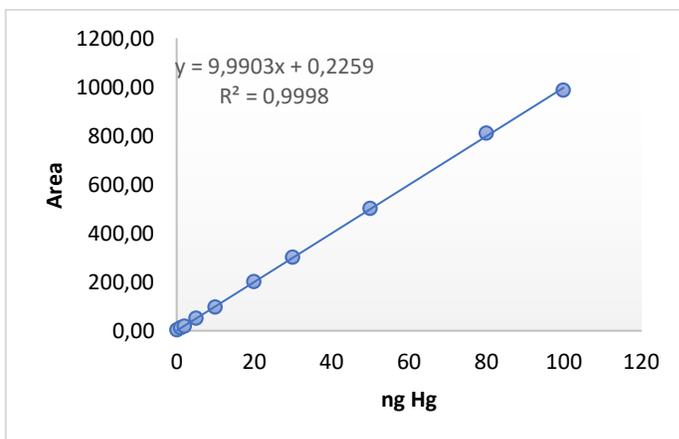
**ANEXO E.** Curva de calibrado por triplicado, para todo el rango MeHg



**Figura E1.** Curva de calibrado 1 MeHg



**Figura E2.** Curva de calibrado 2 MeHg



**Figura E3.** Curva de calibrado 3 MeHg

ANEXO F. Precisión y exactitud.

Tabla F1. Precisión del sistema para MeHg

		ng			Precisión intermedia		
		DIA 1	DIA 2	DIA 3	Promedio	SD	%CV PI
Muestras	<b>Repetibilidad</b>	159,54	199,05	174,34	175,688	13,884	<b>7,90</b>
		161,47	181,99	177,47			
		159,54	190,71	177,08			
	<i>Promedio</i>	160,181	190,585	176,298			
	<i>SD</i>	1,118	8,532	1,708			
	<i>%CV</i>	<b>0,698</b>	<b>4,476</b>	<b>0,969</b>			
	<i>%CV promedio</i>	<b>2,048</b>					
Nivel bajo [20]	<b>Repetibilidad</b>	18,28	19,84	21,24	19,333	1,249	<b>6,46</b>
		17,72	18,28	20,36			
		18,68	18,84	20,76			
	<i>Promedio</i>	18,227	18,987	20,787			
	<i>SD</i>	0,482	0,790	0,441			
	<i>%CV</i>	<b>2,646</b>	<b>4,162</b>	<b>2,120</b>			
	<i>%CV promedio</i>	<b>2,976</b>					
Nivel medio [1000]	<b>Repetibilidad</b>	978,80	977,28	993,88	981,227	8,290	<b>0,84</b>
		977,84	965,52	986,12			
		984,20	978,00	989,40			
	<i>Promedio</i>	980,280	973,600	989,800			
	<i>SD</i>	3,429	7,007	3,895			
	<i>%CV</i>	<b>0,350</b>	<b>0,720</b>	<b>0,394</b>			
	<i>%CV promedio</i>	<b>0,488</b>					
Nivel alto [2000]	<b>Repetibilidad</b>	1788,32	1826,16	1844,60	1835,160	26,349	<b>1,44</b>
		1852,24	1800,64	1829,24			
		1854,28	1857,04	1863,92			
	<i>Promedio</i>	1831,613	1827,947	1845,920			
	<i>SD</i>	37,507	28,242	17,378			
	<i>%CV</i>	<b>2,048</b>	<b>1,545</b>	<b>0,941</b>			
	<i>%CV promedio</i>	<b>1,511</b>					

**Tabla F2.** Exactitud del sistema para MeHg

		$\mu\text{g/L}$	Promedio	SD	%R	%R promedio
<b>Muestra</b>	DIA -1	159,54	160,181	1,1178		
		161,47				
		159,54				
	DIA -2	199,05	190,585	8,5315		
		181,99				
		190,71				
	DIA -3	174,34	176,298	1,7077		
		177,47				
		177,08				
						NA
<b>Nivel bajo [20]</b>	DIA -1	410,45	416,005	5,2573	88,25	
		420,91				
		416,65				
	DIA -2	445,30	412,778	28,4891	84,92	
		392,26				
		400,77				
	DIA -3	367,09	388,383	18,5665	86,45	
		401,16				
		396,90				
						86,54
<b>Nivel medio [1000]</b>	DIA -1	9209,48	9282,401	79,5308	96,24	
		9367,20				
		9270,52				
	DIA -2	9654,22	9396,398	223,2992	97,12	
		9270,52				
		9264,45				
	DIA -3	9490,05	9673,302	161,9420	100,19	
		9797,16				
		9732,70				
						97,85
<b>Nivel alto [2000]</b>	DIA -1	17238,394	16271,629	1590,7514	111,13	
		14435,651				
		17140,842				
	DIA -2	17718,707	16628,534	979,1964	102,76	
		15823,702				
		16343,193				
	DIA -3	13661,900	16326,869	2309,0139	104,54	
		17588,639				
		17730,069				
						106,14

ANEXO G. Incertidumbre EPA 7473

Figura G1. Diagrama de Ishikawao o "causa-efecto" de las fuentes de incertidumbre para MeHg y Hg en cabello por EPA 7473

