

## UN MÉTODO SENCILLO PARA MONITOREO DE MERCURIO EN HUMANOS

### A SIMPLE METHOD FOR MONITORING MERCURY IN HUMAN BEINGS.

AURISTELA MALAVÉ A.<sup>1</sup> Y PABLO CARRERO M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Oriente, Núcleo de Monagas, Departamento de Ciencias, Los Guaritos, Maturín

<sup>2</sup>Universidad de Los Andes, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Mérida

#### RESUMEN

Se describe un procedimiento de análisis rápido, sencillo y económico para determinar el contenido de mercurio en fluidos biológicos (sangre y orina) mediante la generación de vapor frío (GVF) y detección por espectroscopía de absorción atómica (EAA). La técnica de flujo continuo fue usada para la introducción de la muestra y los demás reactivos. Con este diseño todo el mercurio presente en la muestra es reducido para formar vapor de mercurio elemental usando un reductor. Mediante las curvas de calibrado se determinó que la altura de picos máxima se incrementa linealmente con la concentración de mercurio expresada por la ecuación:  $A = 0,0011 + 0,0060 [\text{Hg}]$  en un intervalo dinámico o lineal de 1,98 a 24,00 g/l;  $r = 0,9972$  y límite de detección = 1,06 g/l el cual fue determinado en base a la desviación estándar del blanco, y precisión entre 3 y 9%. Con el procedimiento propuesto, se determinó el contenido de mercurio en muestras de sangre y orina de 75 personas quienes solicitaron este servicio, los valores están en el rango entre 3,21 - 4,18 g/l y 2,54 - 3,62 g/l respectivamente, los cuales son considerados valores normales para estos fluidos biológicos.

PALABRAS CLAVES: espectroscopía de absorción atómica, mercurio, determinación, sangre, orina.

#### ABSTRACT

In this work, we describe a fast, simple and inexpensive analysis process for determining mercury contents in biological fluids (blood and urine) by means of cold vapor generation (CVG) and detection by atomic absorption spectroscopy (AAS). We used the continuous flow technique to introduce samples and other reagents. With this design, and by using a reducer, all mercury in the sample is reduced to form elementary mercury vapor. By means of the calibration curves, we determined that maximum peak height increases linearly with the mercury concentration expressed by the equation:  $A = 0.0011 + 0.0066[\text{Hg}]$  in a dynamic or linear interval of 1.98 to 24.00 g/l;  $r = 0.9972$ , with a detection limit = 1.06 g/l, which was determined on the basis of blank standard deviation, and a precision comprised between 3 and 9%. With this process, we determined the mercury contents in blood and urine samples taken from 75 persons who requested this test, and the values ranged between 3.21 - 4.18 g/l, and 2.54 - 3.62 g/l respectively, which are considered normal values for these biological fluids.

KEY WORDS: Atomic absorption spectroscopy, Mercury, Determination, Blood, Urine.

#### INTRODUCCIÓN

El mercurio es el elemento no radiactivo más tóxico sobre la tierra, famoso por su estado físico ya que es el único elemento metálico líquido a temperatura ambiente. Este elemento y sus compuestos se han empleado en buena parte de la historia humana, sus propiedades físicas y químicas lo convierten en un metal atractivo para aplicaciones científicas e industriales.

Entre los metales pesados el mercurio es considerado el contaminante ambiental más peligroso, no sólo por la gravedad de las enfermedades que causa en los seres humanos sino también por el efecto acumulativo a lo largo

de las cadenas tróficas naturales. Se ha comprobado que este metal se absorbe y acumula a través de la cadena alimenticia afectando al hombre, al que ingresa por vía oral y respiratoria.

Elemento que existe ampliamente en la biosfera, conocido por su toxicidad, cuyos efectos han ido en ascenso en los últimos años debido a su extenso uso en industrias, agricultura, reparaciones dentales y sobre todo por la utilización irracional en la minería aurífera en Asia, Africa y en países latinoamericanos como Bolivia, Perú, Colombia, Venezuela y Brazil (Malmet *et al*, 1997). Sólo en el Amazonas de Brasil se estima que se han liberado alrededor de 2000 toneladas de mercurio durante las últimas dos décadas, de las cuales 45% son descargadas en

ríos y 55% en la atmósfera lo que ha generado un profundo impacto ambiental causando daños ecológicos y consecuentemente humanos por exposición ocupacional principalmente por inhalación (Akagi *et al*, 1995; Malmel *et al*, 1997; Moretón y Trevor, 1998) lo que lo hace un elemento tóxico de amplio significado ambiental y clínico (Friberg *et al*, 1986; Tsalev y Zaprianot, 1983). Este elemento existe en forma inorgánica y orgánica (cloruros de metil-, etil-, dietil- y fenilmercurio) las cuales difieren significativamente en sus toxicidades siendo esta última la más perjudicial para el hombre. De allí que, para los últimos años ha sido reconocido que el contenido de mercurio total (HgIn + HgOr) proporciona información insuficiente para evaluar su toxicidad potencial ya que ésta no depende sólo de su concentración sino también de su forma química (Burguera *et al*, 1999; Bagheri y Gholami, 2001). En la actualidad, el mercurio es usado en una variedad de productos debido principalmente a que es líquido a temperatura y presión ambiental, es un buen conductor eléctrico y es fácilmente volatilizado. Estas características permiten su aplicación en medicina, en equipos electrónicos, en la agricultura, en equipos científicos y en otros productos utilizados por el hombre; no obstante, se sabe que las amalgamas dentales y la dieta constituyen la principal exposición de la población a este elemento siendo los peces y sus productos la principal fuente de metilmercurio (Angerer y Schaller, 1988).

En la literatura existe una variedad de métodos analíticos que han sido utilizados para determinar mercurio que incluyen: espectrometría de absorción atómica con generación de vapor frío (EAA-GVF) (Galignani *et al*, 1998; Burguera *et al*, 1999; Bermejo-Barrera *et al*, 2001 y Hafez *et al*, 2001), espectrometría de absorción atómica con atomización electrotrémica (EAA-AE) (Clevenger *et al*, 1997 y Flores *et al*, 2001), espectrometría de fluorescencia atómica (EFA) (Clevenger *et al*, 1997; Shafawi *et al*, 1999; Amyot *et al*, 2001; Bagheri y Gholami, 2001 y Ramalhosa *et al*, 2001) y espectrometría de masa con plasma acoplado inductivamente (EM-PAI) (Allibone *et al*, 1999; Nixon *et al*, 1999; Chiou *et al*, 2001; Seibert *et al*, 2001 y Ugo *et al*, 2001) como las más aplicadas en los últimos años. A pesar de que más recientemente han surgido otras metodologías para este propósito (Bin *et al*, 2001; Bravo-Sánchez *et al*, 2001; Mondal *et al*, 2001; Murillo *et al*, 2001; San Vicente de la Riva *et al*, 2002 y Wuilloud *et al*, 2002) la EAA-GVF continua siendo la técnica más popular para la determinación de mercurio (Clevenger *et al*, 1997; Hill *et al*, 1998 y Flores *et al*, 2001) por su sencillez y bajo costo pero con la variante de que estos procedimientos requieren la destrucción de la materia orgánica por digestión húmeda (Adeloju *et al*, 1994; Landí y Fagioli, 1994) o por altas temperaturas las

cuales pueden repercutir en inadecuados valores de recuperación debido a pérdidas del elemento por volatilización a elevadas temperaturas. No obstante, una manera de solventar estos inconvenientes es mediante la incorporación de la etapa de pretratamiento de la muestra en línea (usualmente usando energía de microondas) mediante inyección en flujo (IF) y flujo continuo (FC) acoplado a diferentes técnicas de detección para el análisis en varios tipos de muestras (Welz *et al*, 1992; Cossa *et al*, 1995; Bloxham *et al*, 1996; Murphy *et al*, 1996; Woller *et al*, 1997; Galignani *et al*, 1998; Bagheri y Gholami, 2001)

La información acerca de la concentración de mercurio en muestras ambientales y biológicas es de gran interés y actualidad ya que desde siempre ha sido conocido como un elemento tóxico que presenta daños asociados con su ingestión e inhalación, además de que es un elemento pesado al cual no se le ha detectado ninguna función vital en organismos vivientes y sus propiedades tóxicas han ido en ascenso en los últimos años debido a sus usos. Una manera de estimar el grado de contaminación mercurial en el sitio de trabajo, en el ambiente, por la utilización de amalgamas dentales y principalmente por la dieta es mediante la determinación del nivel de mercurio en varias matrices biológicas, en particular en sangre y orina (Angerer y Schaller, 1988). Tomando en cuenta la capacidad de la espectroscopía atómica de actuar como detector selectivo y específico para la detección de mercurio y la posibilidad de acoplamiento con flujo continuo y la generación de vapor frío es posible desarrollar un sistema (FC-GVF-EAA) de monitoreo rápido en sangre y orina.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Equipos

Se utilizó un Espectrómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer 3100 conectado con un computador personal dtk-TECH-1632 para la operación del software. Para la evaluación de la señal se usó una lámpara de cátodo hueco de mercurio Perkin Elmer junto con una celda de vidrio en forma de T y para la propulsión de los líquidos se empleó una bomba peristáltica Gilson Minipuls-3 de cuatro canales. Además se utilizó una plancha de calentamiento para las digestiones de las muestras.

### Procedimiento

El material de vidrio utilizado se dejó durante toda la noche en ácido nítrico al 20% (para evitar posible contaminación) y antes de ser usado se lavó varias veces con agua bidestilada.

Una solución patrón de  $\text{HgCl}_2$  1000 mg/l fue empleada para preparar diariamente las soluciones estándar de trabajo por apropiada dilución con agua en un rango de concentración de 1 a 6  $\mu\text{g/l}$ .

La solución de  $\text{NaBH}_4$  al 0,4% se estabilizó con  $\text{NaOH}$  0,05% preparándola diariamente.

La solución de trabajo de  $\text{SnCl}_2$  al 20% de preparó disolviendo 20 g en 20 ml de  $\text{HCl}$  en caliente y llevando la solución a un volumen final de 100 ml.

Para los ensayos preliminares y optimización de los parámetros se utilizó un pool de sangre aportado por un hospital local y para las pruebas “definitivas” muestras de sangre y orina de 75 personas, en su mayoría odontólogos quienes solicitaron los exámenes respectivos. Las muestras de sangre fueron tomadas mediante un vacutainer de la vena del antebrazo de varios individuos por punción, colocadas en tubos de ensayo y en cada caso se le añadió 15 unidades de heparina sódica por ml de sangre para luego ser almacenadas en refrigeración a 4°C hasta su análisis. En cuanto a las muestras de orina, éstas fueron colectadas por cada individuo en recipientes de polipropileno estériles durante 24 horas e igualmente fueron refrigeradas.

Durante los ensayos preliminares a las muestras, tanto digestadas como no digestadas, se les determinó el contenido de mercurio orgánico, inorgánico y exógeno utilizando dos procedimientos de reducción: uno con  $\text{NaBH}_4$  y el otro con  $\text{SnCl}_2$ . Asimismo, se realizaron estudios de recuperación utilizando muestras salpicadas con mercurio orgánico e inorgánico hasta finalmente llegar al esquema mostrado en la figura 1, de la configuración del sistema FC-GVF-EAA utilizado para el análisis de sangre y orina.

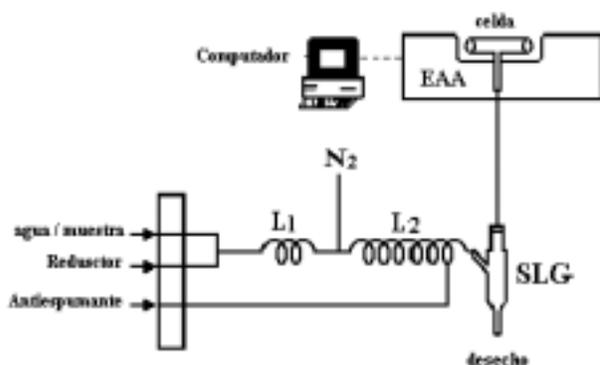


Figura 1. Esquema del sistema FC-GVF-EAA utilizado.  
L1: 15 cm; L2: 100 cm.

### Funcionamiento del Sistema FC-GVF-EAA.

Como ya se mencionó, el diagrama del sistema utilizado para la determinación de mercurio está mostrado en la figura 1. El mismo consta de una bomba peristáltica que mantiene un flujo constante para la solución del reductor ( $\text{SnCl}_2$  o  $\text{NaBH}_4$ ), del antiespumante y de agua bidestilada a manera de establecer la línea base del sistema. Además contiene dos zonas de reacción (L1 y L2), un separador líquido-gas y una celda de absorción alineada en el paso óptico del espectrofotómetro de absorción atómica.

Una vez que la línea base es establecida el canal portador es sacado del recipiente de agua e introducido en las diferentes soluciones estándares (para la construcción de las curvas de calibrado) o en las diferentes muestras. Esta muestra se une con el reductor en el primer reactor L1 donde tiene lugar la reducción del mercurio contenido en la muestra a mercurio elemental ( $\text{Hg}^0$ ) el cual es un vapor atómico. Seguidamente este vapor entra en contacto con un flujo de  $\text{N}_2$ , utilizado como gas de arrastre, el cual conduce al  $\text{Hg}^0$  a través de L2 hacia el separador de fases donde el líquido es separado al desecho y el gas finalmente es conducido a la celda para ser medido y finalmente cada lectura es registrada en el computador.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar fueron establecidas las condiciones de trabajo. El espectrómetro de absorción atómica fue fijado a una longitud de onda de 253,7 nm; el ancho de rendija fue establecido a 0,7 nm; la corriente de la lámpara fue de 5 mA sin corrector de fondo a objeto de obtener el máximo de transmitancia, la celda fue alineada vertical y horizontalmente. Además, también fue establecido el flujo de nitrógeno en 0,20 l/min y la bomba peristáltica finalmente fue fijada en un flujo de muestra/agua de 14 ml/min, el reductor en 6,7 ml/min y el antiespumante en 4,5 ml/min.

Los ensayos preliminares fueron iniciados sin tratamiento previo de las muestras tanto de orina como de sangre completa no obteniéndose resultados satisfactorios debido a la formación de espuma en el separador líquido/gas, lo cual fue una de las principales dificultades presentadas durante este estudio por las características naturales de las muestras en particular para la sangre, lo que originó serios problemas durante la lectura debido a que la celda de absorción se humedecía inmediatamente y además dificulta la liberación de los vapores de  $\text{Hg}$  en el separador. Por estas razones fue necesario añadir una sustancia antiespumante para tratar de minimizar este inconveniente. Se seleccionó para este

estudio un antiespumante comercial (Quideco) preparado a un 5% en agua. Para los siguientes ensayos se decidió prescindir de este tensoactivo realizando una digestión previa de las muestras a base de ácidos fuertes ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{HNO}_3$  y  $\text{HCl}$ ) y mezclas de ellos. Para este caso se logró recuperar el mercurio inorgánico prácticamente en su totalidad, no siendo así para el mercurio orgánico utilizando tanto el  $\text{NaBH}_4$  como el  $\text{SnCl}_2$  como reductores logrando recuperar sólo hasta un máximo de 40%.

En vista de que los mejores resultados, en particular para el mercurio inorgánico, se obtuvieron en los casos en que se empleó la digestión a base de la mezcla  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$  (1:1 v/v), se fijó este método para realizar las digestiones sucesivas tanto para las muestras de sangre como de orina. Lo similar de los resultados obtenidos utilizando  $\text{NaBH}_4$  o  $\text{SnCl}_2$  como reductor condujo a realizar los análisis de servicio utilizando este último a una concentración de 20%, reportando así los resultados como cantidad de mercurio inorgánico.

#### Caracterización analítica del sistema

Establecido todo lo anterior, se llevó a cabo la caracterización analítica del sistema. Sobre la base de los resultados preliminares se realizaron curvas de calibración entre 0 y 30  $\mu\text{g/l}$  de Hg en las cuales se encontró una zona comprendida entre 0 y 25  $\mu\text{g/l}$  donde existe una relación lineal entre la respuesta instrumental y la concentración de Hg, observándose posteriormente una zona donde la linealidad de la curva disminuye ligeramente con un descenso de su pendiente. Mediante la aplicación del método de los mínimos cuadrados de los datos se determinó que la altura de picos máximas se incrementa linealmente con la concentración de mercurio expresadas por la ecuación:  $A = 0,0011 + 0,006[\text{Hg}]$  en un intervalo dinámico o lineal de 1,98 a 24,00  $\mu\text{g/l}$ ;  $r = 0,9972$  y límite de detección = 1,06  $\mu\text{g/l}$  el cual fue determinado en base a tres veces la desviación estándar del blanco, y precisión entre 3 y 9%.

Para la evaluación de la exactitud del método, se utilizaron muestras de sangre y orina salpicadas con mercurio orgánico e inorgánico, lográndose pobres recuperaciones para las primeras (< 40%), resultado que puede ser debido en gran parte a la mayor volatilidad del mercurio orgánico a bajas temperaturas por lo que resulta en pérdidas durante el proceso de digestión, y para las últimas se obtuvieron recuperaciones casi en su totalidad (94 – 98%) validándose la efectividad del método sólo para mercurio inorgánico.

Con el procedimiento descrito, se determinó el conte-

nido de mercurio en muestras reales de sangre y orina de 75 personas, en su mayoría odontólogos, quienes solicitaron este servicio y cuyo análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico de computadoras "Statistical Analysis System for Unix"

Los datos evidencian que existe un 95% de confianza de que la media poblacional del contenido de mercurio en sangre está entre 3,2100 y 4,1820 con una media muestral de  $3,6960 \pm 2,1120$  y en orina está entre 2,5411 y 3,6242  $\mu\text{g/l}$  con una media muestral de  $3,0827 \pm 2,3538$   $\mu\text{g/l}$ . Los valores obtenidos están dentro de los valores normales del contenido de mercurio inorgánico para estos fluidos biológicos (Gaceta Oficial de la República de Venezuela N° 5.382, 1999)

#### CONCLUSIONES

El procedimiento descrito en el presente trabajo es rápido, sencillo y económico para determinar el contenido de mercurio en fluidos biológicos (sangre y orina) mediante generación de vapor frío, utilizando la técnica de flujo continuo para la introducción de la muestra y demás reactivos, y detección por espectroscopía de absorción atómica. Mediante los ensayos preliminares y el análisis de muestras de sangre y orina se encontró que el sistema descrito es bien efectivo y exacto para la determinación de mercurio inorgánico lo que está de acuerdo para poblaciones con poco consumo de pescados y otras comidas marinas que en general son las que aportan el mercurio orgánico a la dieta. Por esta razón el método es totalmente aplicable a localidades poco consumidoras de especies marinas tal como la ciudad de Mérida en la cual la muestra poblacional está compuesta en su mayoría por odontólogos quienes necesitan monitorear los niveles de este elemento por lo que se espera que el mercurio presente en estas muestras sea principalmente inorgánico (Burguera y Burguera, 1993 y Gallignani et al, 1998).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADELOJU, S. DHINDSA, H. & TANDON, R. 1994. Evaluation of some wet decomposition methods for mercury determination in biological and environmental materials by cold vapour atomic spectroscopy. *Anal. Chim. Acta*, 285(3): 359-368.
- AKAGI, H., MALM, O., BRANCHES, F. & KINJO, Y. 1995. Human exposure to mercury due to gold mining in the Tapajós River basin, Amazon, Brazil: speciation of mercury in human hair, blood and urine. *Water, Air, Soil pollut.*, 80(1-4): 85-94.

- AMYOT, M., AUCLAIR, J.C. & POISSANT, L. 2001. In situ high temporal resolution analysis of elemental mercury in natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 447(1-2): 153-159.
- ANGERER, J. & SCHALLER, K.H. (Eds). 1988. Deutsche Forschungsgemeinschaft, Analysis of hazardous substances in biological materials, in: methods for biological monitoring, VCH, Weinheim, vol. 2, pp. 196-211.
- BAGHERI, H. & GHOLAMI, A. 2001. Determination of very low levels of dissolved mercury (II) and methylmercury in rivers waters by continuous flow with on-line UV decomposition and cold-vapor atomic fluorescence spectrometry after preconcentration on a silica gel-2-mercaptobenzimidazol sorbent. *Talanta*, 55(6): 1141-1150.
- BERMEJO-BARRERA, P., MUÑOZ-NAVEIRO, O., MOREDO-PIÑEIRO, A. & BERMEJO-BARRERA, A. 2001. The multivariate optimisation of ultrasonic bath-induced acid leaching for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 439(2): 211-227.
- BIN, C., XIAORU, W. & LEE, F. 2001. Pyrolysis coupled with atomic absorption spectrometry for the determination of mercury in chinese medicinal materials. *Anal. Chim. Acta*, 447(1-2): 161-169.
- BLOXHAM, M.J., HILL, S.J. & WORSFOLD, P.J. 1996. Determination of mercury species in sea-water by liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection. *J. Anal. At. Spectrom*, 11(2): 145-148.
- BRAVO-SÁNCHEZ, L., SAN VICENTE DE LA RIVA, B., COSTA-FERNÁNDEZ, J., PEREIRO, R. & SANZ-MEDEL, A. 2001. Determination of lead and mercury in sea water by preconcentration in a flow injection system followed by atomic absorption spectrometry detection. *Talanta*, 55(6): 1071-1078.
- BURGUERA, J.L., QUINTANA, I., SALAGER, J.L., BURGUERA, M., RONDÓN, C., CARRERO, P., ANTON DE SALAGER, R. & PETIT DE PEÑA, Y. 1999. The use of emulsions for the determination of methylmercury and inorganic mercury in fish-eggs oil by cold vapor generation in a flow injection system with atomic absorption spectrometric detection. *Analyst*, 124(3): 593-599.
- BURGUERA, M. & BURGUERA, J.L. 1993. Whole blood and urine mercury levels in a non-exposed general population and in dental surgeons, in: M. Anke, D. Meissner, C.F. Mills (Eds), Trace elements in man and animals—Tema 8, Verlag Media Touristik, Gersdorf, Germany, pp. 121-130.
- CHIOU, C., JIANG, S. & SURESH, K. 2001. Determination of mercury compounds in fish by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-vapor generation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, 56(7): 1133-1142.
- CLEVENGER, W.L., SMITH, B.W. & WINEFORDNER, J.D. 1997. Trace determination of mercury: a review. *Crit. Rev. Anal. Chem*, 27(1): 1-26.
- COSSA, D., SAN JUAN, J., CLOUD, J., STOCKWELL, P.B. & CORNS, W.T. 1995. Automated technique for mercury determination at sub-nanogram per litre levels in natural waters. *J. Anal. At. Spectrom*, 10(3): 287-291.
- FLORES, E.M., WELZ, B. & CURTIUS, A.J. 2001. Determination of mercury in mineral coal using cold vapor generation directly from slurries, trapping in a graphite tube, and electrothermal atomization. *Spectrochim. Acta Part B*, 56(9): 1605-1614.
- GACETA OFICIAL DE LA REPÚBLICA DE VENEZUELA N° 5.382 EXTRAORDINARIO. 1999. Normas y procedimientos para definir los criterios clínicos y analíticos para determinar la intoxicación del personal expuesto a la contaminación mercurial y la conducción de los casos clínicos, pp. 18-25.
- GALLIGNANI, M., BAHAS, H., BRUNETTO, M.R., BURGUERA, M., BURGUERA, J.L. & PETIT DE PEÑA, Y. 1998. A time-based flow injection-cold vapor-atomic absorption spectrometry system with on-line microwave sample pre-treatment for the determination of inorganic and total mercury in urine. *Anal. Chim. Acta*, 369(1-2): 57-67.
- HAFEZ, M.A., KENAWY, I.M. & LASHEIN, A.R. 2001. Preconcentration and separation of total mercury in environmental samples using chemically modified chloromethylated polystyrene-PAN (ion-exchanger) and its determination by cold vapour atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 53(4): 749-760.

- HILL, S., DAWSON, J., PRICE, W., SHUTTLE, I., SMITH, C. & TYSON, J. 1998. Atomic spectrometry update – Advances in atomic absorption and fluorescence spectrometry and related techniques. *J. Anal. At. Spectrom.*, 13(8): 131R-170R.
- MALMET, O., GUIMARAES, J., CASTRO, M., BASTOS, W. & VIANA, J. 1997. Follow-up of mercury levels in fish, human hair and urine in the Madeira and Tapajós basins, Amazon, Brazil. *Water, Air, Soil Pollut.*, 97(1-2): 45-51.
- MONDAL, B.C., DAS, D. & DAS, A.K. 2001. Application of a new resin functionalised with 6-mercaptopurine for mercury and silver determination in environmental samples by atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 450(1-2): 223-230.
- MORETON, J. & TREVOR, H. 1998. Simple direct method for the determination of total mercury levels in blood and urine and nitric acid digests of fish by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 13(7): 659-665.
- MURILLO, M., CARRIÓN, N., CHIRINOS, J., GAMMIERO, A. & FASSANO, E. 2001. OPTIMIZATION OF EXPERIMENTAL PARAMETERS FOR THE determination of mercury by MIP/AES. *Talanta*, 54(2): 389-385.
- RAMALHOSA, E., RÍO, S., PEREIRA, E., VALE, C. & DUARTE, A. 2001. Simple methodology for methylmercury and inorganic mercury determinations by high-performance liquid chromatography-cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 448(1-2): 135-143.
- SAN VICENTE DE LA RIVA, B., COSTA-FERNÁNDEZ, J.M., PEREIRO, R. & SANZ-MEDEL, A. 2002. Spectrafluorimetric method for the rapid screening of toxic heavy metals in water samples. *Anal. Chim. Acta*, 451(2): 203-210.
- SEIBERT, E.L., DRESSLER, V.L., POZEBON, D. & CURTIUS, A. J. 2001. Determination of Hg in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry after on-line pre-concentration. *Spectrochim. Acta Part B*, 56(10): 1963-1971.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM FOR UNIX, VERSIÓN 6.12, para una máquina paralela IBM RS600, instalado.
- UGO, P., ZAMPIERI, S., MORETTO, L.M. & PAOLUCCI, D. 2001. Determination of mercury in process and lagoon waters by inductively coupled plasma-mass spectrometric analysis after electrochemical preconcentration: comparison with anodic stripping at gold and polymer coated electrodes. *Anal. Chim. Acta*, 434(2): 291-300.
- WELZ, B., TSALEV, D.L. & SPERLING, M. 1992. On line microwave sample pretreatment for the determination of mercury in water and urine by flow-injection cold-vapour atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 261(1-2): 91-103.
- WOLLER, A., GARRAND, H., MARTIN, F., DONARD, O.F. & FODOR, P. 1997. Determination of total mercury in sediments by microwave-assisted digestion-flow injection-inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 12(1): 53-56.
- WUILLOUD, J., WUILLOUD, R.G., SILVA, M.F., OLSINA, R.A. & MARTÍNEZ, L.D. 2002. Sensitive determination of mercury in tap water by cloud point extraction pre-concentration and flow injection-cold vapor-inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, 57(2): 365-374.