

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Análisis de la presencia de metales pesados en productos de la pesca y su legislación reguladora

El término “metales pesados” se aplica al grupo de metales y metaloides de elevada densidad (superior a 5 g/cm³) que son tóxicos incluso a bajas concentraciones. El mercurio (Hg), el cadmio (Cd) y el plomo (Pb) están incluidos dentro de este colectivo, siendo contaminantes hasta en concentraciones traza (Alloway, 2013). Los metales pesados emitidos persisten al no poder ser degradados o destruidos, y resultan tóxicos o venenosos para los seres vivos. Cuando los suelos son contaminados, los metales son tomados por las plantas y estos son bioacumulados, por lo que los animales que se alimentan de ellas también acumulan estos metales en su interior, además de por beber aguas de la zona que contienen estos compuestos tóxicos, al igual que los seres vivos marinos de aguas contaminadas. Los humanos, por tanto, bioacumulamos también metales pesados durante un periodo de tiempo, a través del aire o agua, por consumo de plantas y de animales contaminados. Es decir, los seres vivos de un mismo ecosistema son contaminados a través de diversas vías a lo largo de sus ciclos de la cadena alimenticia (Duruibe *et al.*, 2007).

1.1.1. Mercurio

La contaminación medioambiental con mercurio se debe a su presencia de forma natural o al resultado de la actividad humana durante décadas. Se trata de un contaminante que puede ser transportado a distintos ecosistemas a través de la atmósfera, es persistente, tiene la capacidad de acumularse en los alimentos, y presenta efectos adversos para la salud humana y el medio ambiente. Hay numerosos procesos naturales que pueden emitir mercurio a la atmósfera como son las emisiones volcánicas, mientras que las emisiones antropogénicas extensivas son debidas principalmente a la quema de combustibles fósiles, producción de metales, extracción de oro, producción de cemento, industria cloroalcalina, incineración de residuos y amalgamas dentales (Branch *et al.*, 2008).

El mercurio puede estar presente en sistemas ambientales y biológicos en tres estados de oxidación posibles: Hg (0) (metálico), Hg (II) (mercúrico), Hg (I) (mercuroso), siendo la forma monovalente poco común por su inestabilidad. La forma dominante en agua y suelos es la forma inorgánica Hg (II), en la biota domina como metilmercurio, [CH₃Hg]⁺, y en la atmósfera se encuentra como Hg (0). Todas estas formas son tóxicas, pero la más problemática es la de metilmercurio, por tratarse de una neurotoxina. Además, el mercurio puede tener diversos efectos como toxicidad renal, infarto de miocardio, y disfunción del sistema inmunológico (Liu *et al.*, 2011). La Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos (European Food Safety Authority, EFSA) actualizó en 2012 la ingesta semanal tolerable (IST), estableciéndose en 1.3 µg/kg de metilmercurio, y 4 µg/kg de mercurio inorgánico (AECOSAN, 2017).

El mercurio se encuentra principalmente presente en pescados y mariscos, siendo la forma metilmercurio dominante en estas especies debido a su bioacumulación y biomagnificación en las mismas (Fitzgerald *et al.*, 2007). La UE estableció en 2006 los límites máximos de mercurio en determinados alimentos, pero fueron modificados adaptándose a la evidencia científica, siendo así los últimos, respecto a los productos de la pesca, los recogidos en el Reglamento (UE) No. 420/2011 (Tabla 1).

Tabla 1. Límites legales para mercurio en productos de la pesca (CE 1881/2006, modificado por CE 629/2008 y UE 420/2011).

Mercurio	
Alimento	Hg (mg/kg)
Productos de la pesca y carne de pescado, excluidas especies especificadas a continuación	0.50
Carne de los siguientes pescados: Rape, perro del norte, bonito, anguila, reloj, cabezudo, fletán, rosada del Cabo, marlín, gallo, salmonete, rosada chilena, lucio, tasarte, capellán, pailona, raya, gallineta nórdica, pez vela, pez cinto, sable negro, besugo o aligote, tiburón, escolar, esturión, pez espada, atún	1.00
Crustáceos, carne de los apéndices y del abdomen. Crustáceos similares (<i>Brachyura</i> y <i>Anomura</i>), carne de los apéndices.	0.50

1.1.2. Cadmio

El cadmio es un metal pesado, sin funciones nutricionales ni biológicas, que se encuentra en el medioambiente de forma natural, generalmente asociado a zinc, cobre o plomo. Suele ser un subproducto de procesos naturales como emisiones volcánicas, erosión de rocas o minerales, y derivado de actividades antropogénicas como la minería, emisiones industriales, polución debida a la incineración de residuos sólidos, lodos de depuradora o fertilizantes de fosfato. Se presenta como partículas en suspensión en el aire, como ion libre o formando complejos en el agua, y de manera soluble o insoluble formando complejos con constituyentes del suelo de carácter orgánico e inorgánico. Organismos de vida libre como crustáceos son acumuladores naturales de cadmio (Young, 2005).

El cadmio ha sido clasificado como cancerígeno en humanos, además de poseer numerosos efectos tóxicos, destacando la disfunción renal debida a una exposición prolongada. Presenta una acumulación en hígado y riñón elevada, estimándose una vida media de 10 a 30 años en humanos. La EFSA ha establecido una IST de cadmio de 2.5 µg/kg de peso corporal (AECOSAN, 2017).

En la Unión Europea hay establecidos límites máximos de cadmio en determinados alimentos, que son revisados periódicamente adaptándose a la evidencia científica. Actualmente, los límites para los alimentos objeto de este estudio (productos de la pesca) quedan recogidos en el Reglamento (CE) No. 1881/2006, modificado en algunos aspectos por el Reglamento (UE) No. 488/2014 (Tabla 2).

Tabla 2. Límites legales para cadmio en productos de la pesca (CE 1881/2006, modificado por UE 488/2014).

Cadmio	
Alimento	Cd (mg/kg)
Carne de pescado, excluidas especies especificadas a continuación	0.05
Carne de los siguientes pescados: caballa, atún, bichinique	0.10
Carne de los siguientes pescados: melva	0.15
Carne de los siguientes pescados: anchoa, pez espada, sardina	0.25
Crustáceos, carne de los apéndices y del abdomen. En cangrejos y crustáceo similares, la carne de los apéndices	0.50
Moluscos bivalvos	1.00
Cefalópodos, sin vísceras	1.00

1.1.3. Plomo

El plomo es el tóxico más destacable de todos los metales pesados, pues su peligrosidad es elevada incluso en pequeñas concentraciones debido a su fácil absorción y distribución por el organismo, siendo su forma inorgánica la que principalmente afecta a la población a través de la ingesta de alimentos y agua o por inhalación. Se trata de un contaminante medioambiental natural, además de estar presente en la atmósfera por emisiones del petróleo, minería y fundición (Rzymiski *et al.*, 2015). Sus principales efectos nocivos en humanos son la inhibición de la síntesis de hemoglobina, disfunción renal, articulaciones, sistema reproductivo y cardiovascular, y daño agudo y crónico del sistema nervioso central y periférico (Duruibe *et al.*, 2007). Ante la falta de evidencia de umbrales de toxicidad para los efectos críticos en la salud, en 2010 la EFSA consideró apropiado retirar el anterior umbral de seguridad toxicológica, por lo que actualmente no hay una ingesta tolerable recomendada para el plomo.

En la UE hay establecidos límites máximos de plomo en determinados alimentos, quedando estos recogidos en el Reglamento (CE) No. 1881/2006, que fue revisado y corregido en el caso de productos de la pesca con el Reglamento (UE) No. 2015/1006 (Tabla 3).

Tabla 3. Límites legales para plomo en productos de la pesca (CE 1881/2006, modificado por UE 2015/1006).

Plomo	
Alimento	Pb (mg/kg)
Carne de pescado	0.30
Crustáceos, excluida carne oscura del cangrejo, cabeza y tórax de langosta y de crustáceos similares de gran tamaño	0.50
Moluscos bivalvos	1.50
Cefalópodos (sin vísceras)	1.00

1.2. Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente

Como se detalla en el apartado anterior, la presencia en el cuerpo humano de los metales pesados descritos, es indeseada por los efectos nocivos que causan, siendo la principal fuente de exposición a los mismos la alimentación. Por tanto, los niveles de mercurio, cadmio y plomo deben ser determinados en los productos de consumo diario. Con este objetivo, existen distintas técnicas de espectrometría atómica: absorción atómica de llama (FAAS), absorción atómica en horno de grafito (GF-AAS), emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) y espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) (Nardi *et al.*, 2009).

La técnica de plasma acoplado inductivamente con detección por espectrometría de masas (ICP-MS) es la más empleada en los laboratorios de análisis en la determinación y cuantificación de elementos traza en los alimentos. La técnica consiste en un sistema multielemental en el que se combinan el plasma acoplado inductivamente como fuente de vaporización e ionización de la muestra y un espectrómetro de masas que detecta estos átomos o iones del plasma (Thomas, 2013). Presenta numerosas ventajas respecto a las otras técnicas enunciadas como su capacidad de medida multielemental simultánea, límites de detección muy bajos (ppt), alta resolución espectral, y un rango dinámico lineal más amplio, que permite la detección de elementos principales y traza en la misma inyección. Sin embargo, presenta algunas limitaciones como las posibles interferencias de matriz o espectrales debido a la presencia de iones poliatómicos, el elevado tiempo que requiere la digestión de las muestras y la posible pérdida de analitos por volatilización en este proceso (Ammann, 2007; Nardi *et al.*, 2009).

La técnica ICP-MS consiste en la combinación de la generación de plasma ICP y el posterior análisis de los iones y átomos contenidos en el mismo mediante un espectrómetro de masas. El principio se basa en la introducción de una muestra líquida o gaseosa a través de un sistema que permita la generación de un aerosol, el cual atraviesa una antorcha en la que se ha generado un plasma, mediante una bobina de inducción y paso de argón encendido mediante descarga. Esto permite la generación de una corriente de iones que son canalizados al espectrómetro de masas donde es analizada la corriente, generando una señal eléctrica cuya intensidad depende de la cantidad de iones a los que corresponde la relación masa/carga detectada.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio es llevar a cabo un procedimiento de optimización del método para la determinación de mercurio, cadmio y plomo en productos de la pesca mediante la técnica ICP-MS. Para llevarlo a cabo, fueron definidos los siguientes objetivos secundarios: i) Determinación del rango de la recta de calibrado, ii) Elección del estándar interno e iii) Selección del isótopo adecuado para el análisis de cadmio.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos, estándares y disoluciones patrón

Para la preparación de las disoluciones se utilizó agua ultrapura grado tipo I de resistividad 18.2 MΩ.cm, y conductividad eléctrica a 25°C, 0.056 μS/cm. Se emplearon disoluciones de ácido clorhídrico 34-37% y ácido nítrico 67-69% concentradas ultrapuras. El argón gaseoso fue de alta pureza 99.99%, y la solución de chequeo y sintonización SmartTune Solution for Standard ELAN & DRC-e de 10, de mg/l de Be, Ba, Ce, Co, In, Mg, Pb, Rh y U (1% HNO₃). Para la preparación de las rectas de calibrado se utilizaron disoluciones patrones de Hg, Cd y Pb de espectroscopía atómica con calidad analítica pura de 1000 mg/l. Para la preparación de muestras adicionadas, se utilizaron patrones o material de referencia de la misma concentración y calidad, pero de marcas y lotes diferentes. Para el estudio de corrección de interferencias se emplearon disoluciones de espectroscopía atómica con calidad analítica pura de 10 μg/l de Se, 250 μg/l de Sn y 100 μg/l de Mo. El material de referencia empleado para las validaciones fue Fapas TET012RM (MR332, cangrejo enlatado). También fue necesaria la preparación de un conjunto de disoluciones madre que posteriormente fueron empleadas en el acondicionamiento de las muestras y en la elaboración de las rectas de calibrado: una disolución con una concentración de oro (Au) de 5000 μg/l, otra disolución con una concentración de metales pesados, Hg, Cd y Pb, de 200 μg/l, y otra disolución con un contenido de patrones internos, Rh¹⁰³, Y⁸⁹ e Ir¹⁹³, de 200 μg/l.

3.2. Equipos y material

Se empleó un espectrómetro de plasma inductivamente acoplado ELAN DRC-e (Perkin Elmer Sciex), acoplado a un muestreador automático modelo S10 Autosampler y un refrigerador Polyscience recirculator. El control del equipo se llevó a cabo con el software informático ELAN versión 3.3. La homogeneización de las muestras fue llevada a cabo con una trituradora eléctrica, y para la pesada de las mismas se empleó una balanza de precisión ST-210S. La digestión se realizó en un termobloque digestor SPB50-24 de Perkin Elmer. Durante todo el procedimiento, la utilización de ácidos ultrapuros obligó a que el material empleado en el laboratorio fuese de polipropileno y libre de metales.

3.3. Pretratamiento de muestras. Digestión y acondicionamiento final

Las muestras de productos de la pesca debieron ser homogeneizadas y tratadas previamente a su digestión. En las ocasiones en las que la muestra estaba congelada se procedió a su descongelación no forzada, y posteriormente se escurrió en un escurridor de polipropileno. El pescado debía ser eviscerado y tuvieron que eliminarse escamas, piel, espinas, cola, aletas y cabeza; por otro lado, en cefalópodos, la muestra se evisceró y se eliminó la piel del manto y la tinta; en el caso de los crustáceos se tomó la carne

blanca de apéndices y abdomen, salvo los crustáceos de pequeño tamaño que se homogeneizaron completos. Los pescados secos y/o salados como el bacalao, se sumergieron en agua desionizada durante 15 min en reposo y se escurrieron, previa a la homogeneización.

El método de extracción de los metales fue una digestión ácida llevada a cabo con HNO₃ y HCl 6:1 (Andrade Kom *et al.*, 2008) en tubos DigiTube de 50 ml, y en un bloque digestor donde las muestras se sometieron a una rampa de temperatura (35 min hasta alcanzar los 45°C, y un período de estabilidad durante 1 min, a continuación 20 min hasta 65°C, y entonces se mantuvo a dicha temperatura durante 10 min, finalmente 10 min hasta alcanzar 100 °C, temperatura que se mantuvo durante 60 min). A continuación, se dejó enfriar la disolución obtenida tras la digestión y se reconstruyeron las muestras con agua ultrapura hasta los 50 ml, para finalmente proceder a su dilución. Todo este proceso se realizó también con un blanco de extracción cuya lectura permitió eliminar las posibles señales que pudieran afectar a la concentración de las muestras.

Tras el proceso de acondicionamiento de las muestras, se procedieron a realizar una serie de diluciones con el objetivo de que las concentraciones previstas de los analitos en la muestra que fuese a ser analizada se encontrasen dentro del rango de sus rectas de calibrado. Cada tubo de 10 ml de clase A contenía 0.5 ml de patrón interno de Rh¹⁰³, Y⁸⁹ e Ir¹⁹³ a una concentración de 200 µg/l, y una concentración de muestra según el factor de dilución empleado (1:2 y 1:20). Finalmente, fueron enrasados con agua ultrapura.

3.4. Preparación de las rectas de calibrado

Para el calibrado instrumental, fue necesario preparar dos rectas de calibrado con cada elemento a validar de distinto rango para su posterior análisis comparativo. Las concentraciones fueron 0.2, 1, 2, 5, 10, 20 y 40 µg/l para el rango 0.2 – 40 µg/l, y 0.5, 1, 2, 5, 10, 20 µg/l para el rango 0.5 – 20 µg/l en el caso de las rectas de Hg y Pb, y 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 µg/l para el rango 0.1 – 10 µg/l en el Cd, a partir de una disolución madre de 200 µg/l de Hg, Cd y Pb.

En la preparación de las rectas de calibrado, al agruparse los tres metales pesados, fue necesaria la adición de oro (Au) y HCl, como elementos estabilizadores del mercurio, el cuál es muy inestable a temperatura ambiente. Al igual que en el acondicionamiento de las muestras, también se preparó un blanco en las mismas condiciones que los puntos de la recta de calibrado, pero sin adicionar la disolución de los metales pesados, para comprobar que no existe efecto memoria (control de blanco).

3.5. Isótopos de medida

Los isótopos empleados en el análisis elemental fueron seleccionados siguiendo la premisa de seleccionar el isótopo de mayor abundancia y menor número de interferentes en las matrices de estudiadas. Además, se tuvo en cuenta que el equipo carece de celda de colisión.

En trabajos anteriores del grupo de investigación (Ballesteros, 2016) quedaron definidos los isótopos seleccionados para el mercurio (Hg²⁰²) y plomo (Pb²⁰⁶) en el caso de metales pesados, y se propuso el Cd¹¹⁴ como isótopo para el análisis al ser el más abundante, cuyos principales interferentes son el Sn, Mo y Se. Se estableció respecto a Sn y Mo la pertinente ecuación de corrección teniéndose en cuenta que debía medirse un

isótopo de cada interferente que no generase interferencia con el elemento estudiado (Ecuación 1), en cambio no se realizó la corrección para selenio pues al aplicar la ecuación correspondiente tuvo lugar una sobrecorrección (Nardi *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2011; Ballesteros, 2016). La no obtención de los resultados esperados determinó el inicio de un estudio comparativo de dicho isótopo con otros posibles.

$$Cd^{114} = -(0.02250 \cdot Sn^{118}) - (-1.63 \cdot mass108) \quad \text{Ec. 1}$$

donde 0.02250 es la relación entre la abundancia natural del isótopo Sn¹¹⁴ y la del isótopo Sn¹¹⁸, Sn¹¹⁸ es la medida de la intensidad del isótopo 118 del estaño, Sn, 1.63 es la relación entre la abundancia natural del isótopo Mo⁹⁸ y del Mo⁹² y mass108 es la intensidad en la masa 108 de ⁹²Mo¹⁶O⁺.

3.6. Estándares internos

Con el fin de evitar el efecto matriz en las muestras sometidas a análisis, se emplearon estándares internos. Esta técnica se llevó a cabo mediante la introducción, tanto en las disoluciones de calibración como en las muestras y blancos, de una concentración conocida de un elemento de referencia que se supiera que no estaba presente en las matrices a analizar y cuyas propiedades químicas y espectroscópicas fuesen similares al analito. Así, cuando tuviese lugar el efecto matriz, tanto la señal analítica del analito como del estándar interno cambiarían de manera similar. Esto, junto con el hecho de que la supresión o mejora de la señal depende del número másico (Vanhaecke *et al.*, 1992), determinó que la corrección del efecto matriz sólo fuese posible empleando un estándar interno con un número másico y un potencial de ionización próximos al de los elementos analizados. Por ello, para el análisis de Hg²⁰², Cd¹¹¹ y Cd¹¹⁴, y Pb²⁰⁶ se escogieron como posibles estándares internos, Rh¹⁰³, Y⁸⁹ e Ir¹⁹³ (Tabla 4).

Tabla 4. Número másico (M) y potencial de ionización (PI) de los metales pesados sometidos a análisis, Hg²⁰², Cd¹¹¹ y Cd¹¹⁴, y Pb²⁰⁶ y los estándares internos propuestos para corregir el efecto matriz, Rh¹⁰³, Y⁸⁹ e Ir¹⁹³.

Elemento	M (g/mol)	PI (eV)
Hg	200.59	10.51
Cd	112.40	9.03
Pb	207.19	7.46
Rh	102.91	7.76
Y	88.91	6.62
Ir	192.20	9.25

3.7. Procedimiento operatorio

3.7.1. Encendido y chequeo diario del equipo

El encendido del equipo se llevó a cabo generando vacío durante el tiempo óptimo de 24 h, por lo que la digestión y acondicionamiento de muestras eran realizadas ese mismo día, así como la preparación de las disoluciones madre y las de calibrado para que, al día siguiente, se diese comienzo a las medidas analíticas.

Antes de comenzar las medidas, el equipo fue puesto en marcha y equilibrado durante 20 min, y entonces se procedió al ajuste diario del equipo ICP-MS mediante el empleo de la disolución comercial, Smart Tune Solution. Durante esta sintonización

diaria, la configuración del equipo fue optimizada en sensibilidad e interferencias (óxidos, iones de doble carga), ruido y precisión (Palmieri *et al.*, 2011).

Este chequeo se realizó con la finalidad de conocer el estado del equipo ICP-MS. La disolución pretendía cubrir todo el rango de masas de los elementos, de tal forma que el equipo reconociera los isótopos de los mismos y generara un informe en el que se determinase si la situación del equipo era óptima para su utilización.

3.7.2. Medida de las muestras

Una vez demostradas las condiciones óptimas del equipo, y tras haber preparado las rectas de calibrado y acondicionado las muestras, se crearon las secuencias donde se indicaban las posiciones en que debían ser colocadas cada una de las muestras en el Autosampler. Se establecieron en primer lugar las disoluciones que conforman cada uno de los puntos de la recta de calibrado, seguidas entonces de las muestras, seleccionándose además el método adecuado en función del analito medido. En la secuencia también fueron incluidos varios blancos de lavado o reactivo (matrices que no contienen los elementos que se van a valorar, ya sea con agua destilada o con los ácidos utilizados en la preparación de muestras), entre muestras diferentes, con el objetivo de comprobar que no existe efecto memoria o contaminación cruzada en la zona de transporte. Además, también se introdujo un estándar de verificación (patrón preparado igual que los de calibración, pero proveniente de un lote diferente) de forma periódica, para comprobar que la correcta recuperación de los elementos estudiados; también se analizó un estándar de deriva al final de la secuencia (patrón de concentración intermedia de la recta de calibrado) con el fin de controlar que no habían tenido lugar derivas de la calibración desde el momento de la realización de la misma (Laso, 2015).

Una vez el equipo realizó las medidas para conformar las rectas de calibrado de cada analito, se obtuvieron los parámetros de ordenada en el origen, pendiente de la recta, desviación de la pendiente, coeficiente de correlación, señales de intensidad, señales de intensidad del patrón interno y residuales. Las mediciones de las muestras generaron un documento en formato PDF donde estaban recogidas las intensidades medias, intensidades netas, concentración, desviaciones y concentración del blanco de extracción. Todos estos datos, junto con el peso de las muestras y las posibles diluciones, fueron fundamentales para el cálculo de los principales conceptos de interpretación de los resultados obtenidos con el equipo ICP-MS.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación del rango de la recta de calibrado

El rango de linealidad está limitado por el límite de cuantificación, el coeficiente de linealidad y el error residual, y depende del tipo de técnica, elemento y equipo empleado. Asimismo, el rango de la recta de calibrado debe tener en cuenta las concentraciones previstas del analito en la muestra que va a ser analizada por el equipo, incluyendo las diluciones y operaciones de preparación de muestra que sean de aplicación. Como regla general, la función de calibrado debería estar entre 1/5 o 1/10 del límite de cuantificación y 5 veces el mismo (Djedjibegovic, 2012). Esto supone una relación de 1 a 25 o 1 a 50 para el intervalo lineal. En caso contrario, pueden producirse desviaciones de la linealidad incluso en medidas lineales debido a fenómenos de autoabsorción (Laso, 2015).

Hasta el momento, el rango que había sido empleado (según relación de 1 a 50 para el intervalo lineal) era excesivamente amplio, impidiendo así una correcta cuantificación en el caso de las concentraciones correspondientes a las del límite de cuantificación del método (LOQ). Éste se diseñó para que fuera común a todos los metales pesados objetivo, de tal forma que el último punto de la recta cubriera las mayores lecturas realizadas, pero sin tener en cuenta posibles diluciones de las muestras. Esta recta de calibración, al estar abarcando un amplio rango (0.2 a 40 µg/L), conllevaba una ligera pérdida de exactitud, traduciéndose en un aumento de la incertidumbre.

Así, en este estudio, se propuso medir las muestras bajo la recta de calibrado validada anteriormente, de rango 0.2 - 40 µg/l y una nueva recta de 0.5 - 20 µg/l para Hg y Pb y de 0.1 -10 µg/l para Cd, y llevar a cabo un análisis comparativo de los resultados obtenidos. Esta disminución del rango podía conducir a una mejora de precisión en la lectura de las concentraciones, y con ello una disminución del límite de cuantificación del método. Esto es importante para hacer frente a las especificaciones reglamentarias respecto al límite de cuantificación (Sección 3.8.2.), garantizando con ello la fiabilidad de la medida.

Para determinar qué calibración es la más adecuada, se realizó un estudio de la linealidad de las rectas mediante la valoración de los errores residuales. En el estudio de la linealidad de las rectas de calibrado bajo los nuevos rangos (Tabla 5) se observó que los errores residuales disminuían considerablemente con un rango más estrecho. Es decir, los resultados eran más exactos y precisos y la incertidumbre era menor. Para el establecimiento de los criterios de evaluación de la recta en función del error residual, se analizaron estudios previos (Perkin Elmer, 2013) y el histórico del laboratorio del que se obtuvieron buenos resultados. Así, a partir de lo anterior, se estableció que los criterios de aceptación del valor residual son del 10%, excepto en el primer punto de la recta de calibrado (15% para el Hg, 25% para el Cd y 30% para el Pb), y en el segundo punto de la recta en el caso del Pb, donde el criterio de aceptación pasaría al 15%. Debe señalarse que este estudio de la linealidad en distintos rangos se realizó con los isótopos seleccionados en trabajos anteriores y teniendo en cuenta las posibles fuentes de interferencias. En base a ese estudio, los isótopos seleccionados fueron Hg²⁰² y Pb²⁰⁶ (Ballesteros, 2016), mientras que en el caso del cadmio, al no haber sido determinado con precisión, se propusieron dos (Sección 4.3), Cd¹¹¹ y Cd¹¹⁴.

Tabla 5. Errores residuales obtenidos en el estudio anterior de la linealidad de la recta de calibrado 1 (rango 0.2 - 40 µg/l) y la recta de calibrado 2 propuesta en este estudio (rango 0.5 - 20 µg/l para Hg²⁰² y Pb²⁰⁶, y rango 0.1 – 10 µg/l para Cd¹¹¹ y Cd¹¹⁴).

		Concentración (µg/l)	0.2	1	2	4	10	20	40
Error Residual (%) - Recta de calibrado 1 -	Hg ²⁰²		61.5	9.8	4.9	1.5	3.5	5.2	1.1
	Pb ²⁰⁶		172.5	21.6	10.4	3.7	2.2	4.6	1.3
	Cd ¹¹¹		203	29.5	12.6	1.4	4.1	5.7	1.7
	Cd ¹¹⁴		84.5	11.8	6.9	2.5	0.5	2.9	0.8
Error Residual (%) - Recta de calibrado 2 -	Concentración (µg/l)		0.5	1	2	5	10	20	
	Hg ²⁰²		15.0	7.8	6.9	5.7	1.3	0.6	
	Pb ²⁰⁶		21.6	9.6	3.4	4.2	3.5	4.8	
	Concentración (µg/l)		0.1	0.5	1	2	5	10	

	Cd ¹¹¹	10.0	3.4	4.2	3.5	4.8	1.0
	Cd ¹¹⁴	14.0	1.2	3.3	3.5	4.2	0.9

Al restringir el rango de la recta de calibrado, los residuales estaban dentro de los criterios de calidad exigidos y definidos. Los errores residuales obtenidos para el primer punto con la recta 1 resultaron excesivos; tras la eliminación del último punto de la recta y el reprocesado de la misma para volver a calcularlos sin este punto, el error residual disminuyó, aunque se mantuvo algo superior al de la recta 2 (resultados no mostrados).

Estos resultados fueron similares a los publicados en un estudio del contenido de mercurio, cadmio, plomo y cobre en los pescados del río Neretva (Bosnia-Herzegovina), en el que el método propuesto estableció concentraciones de los metales entre un rango de 3 a 5 veces los límites de detección instrumentales, entre 2 y 20 µg/l (Djedjibegovic, 2012). También Chevallier (2015) procedió de forma similar en la determinación de 31 elementos en muestras de alimentos con una reducción del límite máximo, en este caso de 20 µg/l a 10 µg/l. Asimismo, en otros estudios se demuestra esta tendencia a establecer unos límites lo más estrechos posibles con el objetivo de aumentar la exactitud del método; como en el estudio de la determinación de 21 elementos en varias muestras de alimentos (Millour, 2011), cuyo rango de la recta de calibrado fue más estrecho que el del presente estudio; entre 5 y 10 µg/l.

4.2. Elección del estándar interno

Es bien conocido que la naturaleza y concentración del efecto matriz de la muestra tiene una influencia directa en la supresión o mejora de las señales del analito. La estandarización interna del ICP-MS respecto a la validación del método, es una forma efectiva de compensar la inestabilidad instrumental, la deriva de la señal o el efecto matriz. Asimismo, puede provocar una mejora en la precisión y exactitud del método, siempre y cuando sea escogido apropiadamente. Los residuales estándares, así como el porcentaje de recuperación del estándar interno para cada elemento, son los controles de calidad que se establecen para determinar si el estándar está funcionando correctamente, y por tanto si se está corrigiendo el efecto matriz (Vanhaecke, 1992).

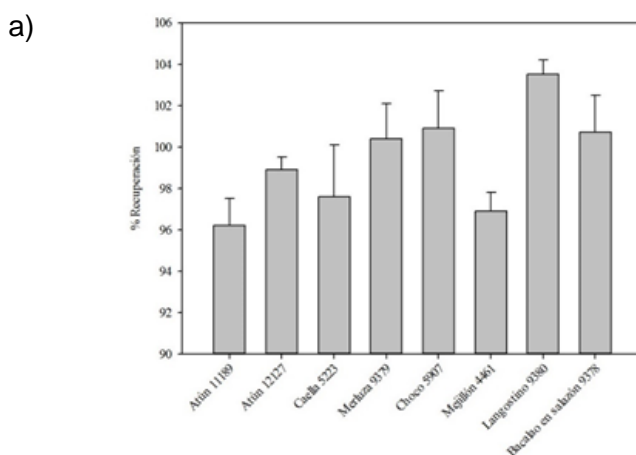
La selección del estándar interno, como ya se ha explicado anteriormente (Sección 3.6), es función de su ausencia en las matrices sometidas a análisis, y de sus propiedades químicas y espectroscópicas, que han de ser similares a las del analito sometido a estudio. En trabajos anteriores (Ballesteros, 2016; Rodríguez, 2016), se realizó una propuesta teórica de diferentes patrones internos que permitieron, en el caso de cada uno de los analitos (Hg, Cd, Pb), adaptarse a éstos y corregir de manera adecuada, si existiesen, las interferencias de matriz. En esos trabajos, se empleó inicialmente un único patrón interno, Rh¹⁰³, con buenos resultados para las matrices estudiadas. No obstante, el empleo de este único patrón implicaba el riesgo potencial de que se pudieran detectar diferencias de comportamiento de nuevas matrices ensayadas dentro del grupo “productos de la pesca”. Por ello, en este trabajo se propuso realizar un estudio comparativo de las recuperaciones obtenidas al utilizar otros estándares internos, y comprobar si el estándar interno del método en vigor conseguía mejores resultados y cumplía criterios de corrección del efecto matriz para todos los tipos de muestras (depredadores, cefalópodos, conservas y salazones).

De acuerdo a lo anterior, para el análisis de los metales pesados Hg, Cd y Pb, se propuso el uso de tres estándares internos, seleccionados principalmente en función del

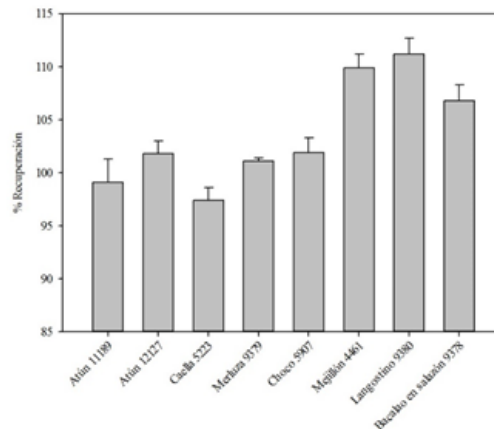
potencial de ionización y de la masa del elemento (Sección 3.6): Rodio (Rh^{103}), Ytrio (Y^{89}) e Iridio (Ir^{193}). Así, si los tres se comportaban igual, la medición de los analitos era óptima. Sin embargo, si cada uno se comportaba de un modo distinto en una determinada muestra era indicativo de que estaba teniendo lugar efecto matriz, y por tanto, no ejercían su funcionalidad en ese caso.

Los porcentajes de recuperación del estándar interno se establecieron en base a estudios previos (Perkin Elmer, 2013) y al histórico del laboratorio de los que se obtuvieron buenos resultados. Consecuentemente, quedó establecido que entre valores del 85 al 115% no estaba teniendo lugar efecto matriz en las muestras complejas habitualmente analizadas en el laboratorio, como puede ser el bacalao en salazón o el mejillón. Como se comprobó, el estándar interno elegido inicialmente, Rh^{103} (Figura 1a), cumplía los criterios de aceptación y rechazo en referencia a la señal del estándar en cada muestra respecto al blanco, y no existían diferencias significativas con Y^{89} e Ir^{193} (Figura 1b y 1c). Todos los datos estaban próximos al 100% de recuperación, excepto en el caso de Y^{89} que presentó malas recuperaciones para mejillón y langostino, debido probablemente a una mala tendencia en este tipo de muestras, pues en el análisis de la presencia de los otros metales pesados la tendencia era la misma (resultados no mostrados). Estos resultados indican que sería necesario seguir estudiando este tipo de muestras con este estándar. Por tanto, según los porcentajes de recuperación obtenidos, el Rh^{103} era un buen estándar interno para los metales pesados estudiados. Para corroborarlo, se procedió al estudio de la linealidad de las rectas de calibrado donde se había introducido una cantidad definida de estándares.

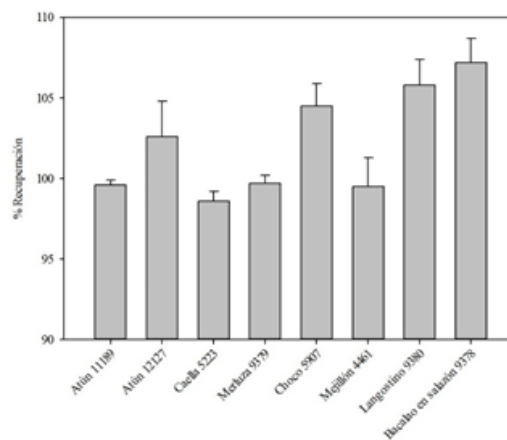
Figura 1. Porcentajes de recuperación y desviación estándar los estándares internos sometidos a estudio a) Rh^{103} , b) Y^{89} c) Ir^{193} , para cada una de las muestras en las que se analizó la presencia de Hg^{202} .



b)



c)



4.2.1. Verificación del estándar interno en la calibración

El modelo de ajuste aplicado era una calibración con estándar interno en la que se introducía una cantidad conocida de estándar, tanto a las muestras como a los patrones de calibración. Así, en el caso de las rectas de calibración se debía asegurar que la respuesta del equipo fuese similar, por ejemplo en linealidad, evaluando las señales residuales obtenidas, al igual que se había realizado anteriormente en la Sección 4.1.

En la Tabla 6, se observa que los resultados que se obtuvieron respecto a los criterios de aceptación y rechazo del valor residual, eran similares empleando los distintos estándares internos estudiados, a excepción del primer punto de la recta de calibrado. Con el estándar interno Rh^{103} , la respuesta del equipo era mejor al realizar las mediciones de los isótopos seleccionados de los metales pesados, pues como se observa en la Tabla 6, los criterios de aceptación estaban mejor definidos en los primeros puntos de las rectas de calibrado.

Tabla 6. Errores residuales obtenidos de las rectas de calibración de rangos 0.5 – 20 $\mu\text{g/l}$ en la determinación de Hg^{202} y Pb^{206} , y rango 0.1 – 10 $\mu\text{g/l}$ para Cd^{111} y Cd^{114} , para una concentración de patrón interno (Rh^{103} , Y^{89} , Ir^{193}) de 200 $\mu\text{g/l}$.

		Concentración ($\mu\text{g/l}$)	0.5	1	2	5	10	20
Error residual	Rh^{103}	Hg^{202}	12.2	2.1	1.2	2.2	0.4	0.2
		Pb^{206}	23.2	9.1	0.8	2.7	1.6	0.6

(%)	Y ⁸⁹	Hg ²⁰²	20.2	5.5	1.7	3.3	1.2	0.5
		Pb ²⁰⁶	31.0	12.6	0.3	3.8	2.5	0.8
	Ir ¹⁹³	Hg ²⁰²	18.8	6.1	0.4	3.1	0.8	0.7
		Pb ²⁰⁶	29.8	13.2	1.6	3.6	2.1	0.7
		Concentración (µg/l)	0.1	0.5	1	2	5	10
Error residual (%)	Rh ¹⁰³	Cd ¹¹¹	23.0	2.6	1.3	0.3	2.4	0.6
		Cd ¹¹⁴	33.0	0.8	0.8	0.3	1.1	0.3
	Y ⁸⁹	Cd ¹¹¹	37.0	3.6	1.9	0.2	2.9	0.7
		Cd ¹¹⁴	37.0	0.2	0.2	0.2	1.6	0.4
	Ir ¹⁹³	Cd ¹¹¹	46.0	3.8	3.0	1.0	2.9	0.7
		Cd ¹¹⁴	46.0	0.4	0.9	1.0	1.6	0.4

Para una determinación multielemental suelen usarse entre 3 o 4 estándares internos con número másico próximo al del analito para aumentar la precisión del método. Vanhaecke *et al.*, (1992) y Ataro *et al.* (2008) utilizaron también una disolución que contenía 3 estándares internos distintos. Al igual que en el presente estudio, Lewen *et al.* (2004) evaluaron la presencia de distintos metales pesados (entre los que se encontraban el Pb, Cd y Hg en compuestos farmacéuticos, utilizando también tres estándares internos, siendo uno de los estándares internos empleados el Rh¹⁰³. Igualmente, en el caso del análisis de elementos esenciales y tóxicos en muestras de alimentos, el rodio fue el elemento empleado como estándar interno adicionado a muestras y patrones de calibración (Nardi *et al.*, 2009). Para mantener una baja sensibilidad a los óxidos y a los iones de doble carga, y conseguir una elevada precisión en la detección de Hg, Cd, Pb y Cu, se seleccionó Rh¹⁰³ en el análisis de muestras de pescado (Djedjibegovic *et al.*, 2012).

Se concluyó que, pese a comprobarse que el Rh¹⁰³ era un buen estándar interno para los tres isótopos sometidos a estudio, se continuaría utilizando la mezcla de los tres estándares. Así, aunque en la mayoría de las ocasiones se informara del resultado obtenido para el Rh¹⁰³, en el caso que no se cumpliera el criterio de calidad se podría proporcionar el resultado con mejor porcentaje de recuperación de estándar interno.

4.3. Selección del isótopo adecuado para el análisis de cadmio

En trabajos anteriores del grupo de investigación (Ballesteros, 2016), quedaron definidos los isótopos seleccionados para el mercurio (Hg²⁰²) y plomo (Pb²⁰⁶) en el caso de metales pesados. Sin embargo, no se determinó con precisión el isótopo para el cadmio, pues se propuso el Cd¹¹⁴ como isótopo para el análisis al ser el más abundante, a expensas de un estudio de los resultados obtenidos en el laboratorio que descartara definitivamente el resto de isótopos una vez aplicada la ecuación de corrección oportuna.

Generalmente, mediante el método de Total Quant se eliminaron de forma eficiente los elementos interferentes de la señal de cadmio y el rango de recuperación se situó en torno al 100%. Sin embargo, aunque una vez aplicada la ecuación de corrección, los resultados de los porcentajes de recuperación obtenidos mejoraron significativamente, aún se cuantificaban los interferentes de molibdeno y estaño. Esto concuerda con lo demostrado en otros estudios en los que se afirma que el método por corrección matemática no es suficiente para muestras con baja concentración de Cd y alta de Mo, Zr

y Sn (Park *et al.*, 2000). Así, en el caso del Cd¹¹⁴ además de todos los interferentes polivalentes que se podían formar (⁹⁸Mo¹⁶O⁺, ⁹⁸Ru¹⁶O⁺, ⁷⁶Se³⁸Ar, ⁷⁸Se³⁶Ar, ⁷⁴Se⁴⁰Ar, ⁹⁶Mo¹⁸O, ¹²⁶Te²⁺, ¹²⁶Xe²⁺), se encontraba el ¹¹⁴Sn, el cuál es muy abundante y de alta concentración en algunas muestras, sobre todo pescados enlatados. Concretamente, a partir de los resultados obtenidos para el material de referencia (cangrejo enlatado), se demostró que la fórmula de corrección no era suficiente para corregir la interferencia por Sn cuando estaba a altas concentraciones. Así, como se observa en la Tabla 7, las recuperaciones obtenidas en el isótopo seleccionado para el análisis de cadmio hasta ahora (Cd¹¹⁴) estaban alejadas del óptimo establecido del 100%, incluso al diluir la muestra para que los valores de la señal se encontrasen dentro del rango de la recta de calibrado. Estos resultados sugirieron que la eficacia del método podía ser mejorada seleccionando un isótopo distinto al Cd¹¹⁴. En este trabajo se planteó la selección del isótopo Cd¹¹¹, de mayor abundancia natural y menor número de interferentes. En este caso, existía una posible interferencia por potasio (K), debido a una posible formación de un compuesto con hidrógeno y oxígeno, que podían provenir de los ácidos empleados para la digestión y del agua utilizada para la dilución de la muestra. Los porcentajes de recuperación obtenidos próximos al óptimo del 100%, demostraron que la concentración de este posible compuesto debía ser muy baja y no provocaba interferencia de consideración (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentajes de recuperación del Cd¹¹⁴ y del Cd¹¹¹ en el material de referencia cangrejo MR332 con factores de dilución 1:2 y 1:20 obtenidos en distintos días, tras haberle aplicado la ecuación de corrección.

Día	FD	%REC Cd ¹¹⁴	%REC Cd ¹¹¹
1	1:2	109.03 ± 1.1	106.93 ± 1.7
2	1:2	112.70 ± 0.5	111.45 ± 0.8
1	1:20	83.94 ± 0.9	92.93 ± 1.2
2	1:20	85.75 ± 0.8	94.61 ± 0.5

Cd¹¹¹ y Cd¹¹⁴ son los isótopos más comúnmente empleados en la determinación de cadmio a nivel traza o ultratrazo (Guo *et al.*, 2011), además del Cd¹¹² por su abundancia en muestras ambientales y biológicas (Huang y Hu, 2008). Generalmente, el isótopo de cadmio que es monitorizado es el Cd¹¹⁴ por presentar una mayor abundancia y una buena recuperación. Sin embargo, hay situaciones particulares en las que este isótopo no puede emplearse, como son las de este estudio. Por ejemplo, Chan *et al.* (2006) encontraron que, en una muestra de piña enlatada, la concentración de estaño era tan alta que daba un falso negativo en la lectura para el Cd¹¹⁴ después de haberse corregido y emplearon la lectura de Cd¹¹¹ para obtener unos resultados más precisos.

Los resultados obtenidos empleando distintas matrices (Figura 2) mostraron que el Cd¹¹¹ presentó un mejor porcentaje de recuperación, en el rango 97.2 - 100.8% y por tanto unos resultados más exactos que el Cd¹¹⁴ (90.9-110.1%). Este comportamiento pudo deberse a la superposición espectral de los iones interferentes en el caso del Cd¹¹⁴.

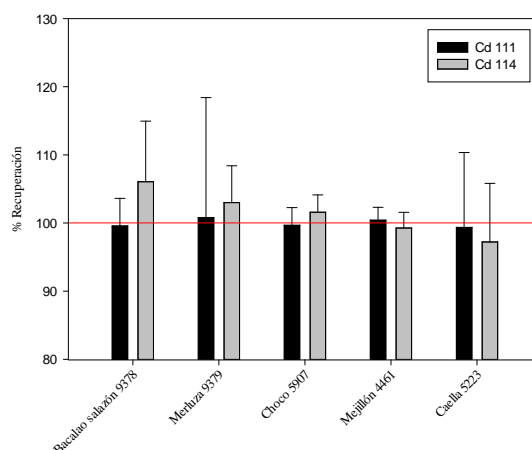


Figura 2. Porcentajes de recuperación obtenidos en la medida de los isótopos Cd¹¹¹ y Cd¹¹⁴ en distintas matrices.

Se encontraron diversas referencias en las que el isótopo Cd¹¹¹ es el seleccionado en la determinación de cadmio mediante ICP-MS en matrices alimentarias. Por ejemplo, en un estudio que empleó isótopos libres de interferencias para determinar 11 elementos traza en materiales de referencia de sedimentos marinos (McLaren *et al.*, 1987). Igualmente, éste fue el isótopo seleccionado en el caso del análisis de elementos traza y minoritarios en leche y yogur por ICP-MS (Khan *et al.*, 2014) donde además se estableció un rango del porcentaje de recuperación (en torno al 91 - 107%) muy similar al presentado en este estudio. El Cd¹¹¹ fue también el isótopo de cadmio considerado en un estudio de elementos tóxicos y esenciales en distintas muestras de alimentos realizado por el Laboratorio de Toxicología de Brasil (Nardi *et al.*, 2009). Millour *et al.*, (2011), publicaron un método de validación para el análisis de 21 elementos en muestras de alimentos. En el caso del cadmio, monitorizaron los mismos dos isótopos ante posibles interferencias isobáricas y poliatómicas. En dicho estudio, el Cd¹¹¹ fue finalmente seleccionado en lugar del Cd¹¹⁴ debido a posibles interferencias isobáricas con el estaño (Sn¹¹⁴), lo que demuestra que ante mayor número de elementos a analizar y mayores interferencias, el isótopo Cd¹¹¹ es el que se establece preferentemente para el análisis.

5. CONCLUSIONES

Este estudio pretendía una optimización del método para la determinación de metales pesados (Hg, Cd y Pb) en productos de la pesca mediante la técnica IPC-MS, con el fin de garantizar la fiabilidad de sus análisis y cumplir con todas las especificaciones que permitirían poder ser acreditada bajo normativa ISO 17025 por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC). Según los objetivos estudiados, se pudieron extraer las siguientes conclusiones:

- La tendencia a establecer unos límites lo más estrechos posibles de los rangos de las rectas de calibrado, consigue aumentar la exactitud y precisión del método, y con ello se alcanza una incertidumbre menor.
- El Rh¹⁰³ es un buen estándar interno para la determinación de los tres isótopos de los metales pesados sometidos a estudio (Hg, Cd y Pb) en productos de la pesca frescos, congelados y en conserva. El empleo simultáneo de tres estándares (Rh¹⁰³, Y⁸⁹, Ir¹⁹³) permite ampliar el rango de matrices a analizar de manera óptima.
- Empleando distintas matrices, ante un mayor número de elementos a analizar y mayores interferencias, el isótopo de cadmio Cd¹¹¹ es el que

ofrece mayor precisión y exactitud y por ello es preferible para el análisis frente al Cd¹¹⁴.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Laboratorios Vital S.L. la realización de los ensayos en sus instalaciones, así como la ayuda material y técnica aportada.

BIBLIOGRAFÍA

- AECOSAN, Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2017). Seguridad Alimentaria. Gestión de Riesgos. Seguridad Química. Contaminantes. Metales pesados. Recuperado el 12 de enero de 2017, de http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/cadmio.htm.
- Alloway, B. J. (2013). Heavy metals in soils. *Springer Netherlands: Environmental pollution*, 22, 3-9.
- Ammann, A. A. (2007). Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *Journal of Mass Spectrometry*, 42(4), 419-427.
- Andrade Korn, M. D. G., da Boa Morte, E. S., Batista dos Santos, D. C. M., Castro, J. T., Barbosa, J. T. P., Teixeira, A. P., Pereira Barbosa, J. T., Paixao Texeira, A., Pires Fernandes, A., Welz, B., Carvalho dos Santos, W. P., Batista Guimaraes, E., dos Santos, N., & Korn, M. (2008). Sample preparation for the determination of metals in food samples using spectroanalytical methods—a review. *Applied Spectroscopy Reviews*, 43(2), 67-92.
- Ataro, A., McCrindle, R. I., Botha, B. M., McCrindle, C. M. E., & Ndibewu, P. P. (2008). Quantification of trace elements in raw cow's milk by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Food Chemistry*, 111(1), 243-248.
- Ballesteros, B. (2016). Puesta a punto de la técnica espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) en el análisis de metales pesados y otros elementos nutricionales (Trabajo Fin de Máster). Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España.
- Chan, K. C., Yip, Y. C., Chu, H. S., & Sham, W. C. (2006). High-throughput determination of seven trace elements in food samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 89(2), 469-479.
- Chevallier, E., Chekri, R., Zinck, J., Guérin, T., & Noël, L. (2015). Simultaneous determination of 31 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation based on the accuracy profile. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 35-41.
- Djedjibegovic, J., Larssen, T., Skrbo, A., Marjanović, A., & Sober, M. (2012). Contents of cadmium, copper, mercury and lead in fish from the Neretva river (Bosnia and Herzegovina) determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Food Chemistry*, 131(2), 469-476.
- Duruibe, J. O., Ogwuegbu, M. O. C., & Egwurugwu, J. N. (2007). Heavy metal pollution and human biotoxic effects. *International Journal of Physical Sciences*, 2(5), 112-118.
- European Commission. (2005). Reglamento (CE) No. 466/2001 de la Comisión de 8 de marzo de 2001 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 2005, L77/1.
- European Commission. (2006). Reglamento (CE) No. 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 2006, L364/5.

- European Commission (2008). Reglamento (CE) No. 629/2008 de la Comisión de 2 de julio de 2008 que modifica el Reglamento (CE) No. 1881/2006 por lo que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 2008, L173/6.
- European Commission (2011). Reglamento (UE) No. 420/2011 de la Comisión de 29 de abril de 2011 que modifica el Reglamento (CE) No. 1881/2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 2011, L111/3.
- European Commission (2014). Reglamento (UE) No. 488/2014 de la Comisión de 12 de mayo de 2014 que modifica el Reglamento (CE) No. 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de cadmio en los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 2014, L138/75.
- European Commission (2015). Reglamento (UE) No. 2015/1005 de la Comisión de 25 de junio de 2015 que modifica el Reglamento (CE) No. 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de plomo en determinados productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 2015, L161/9.
- Evans, E. H., & Giglio, J. J. (1993). Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry. A review. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 8(1), 1-18.
- Fitzgerald, W. F., Lamborg, C. H., & Hammerschmidt, C. R. (2007). Marine biogeochemical cycling of mercury. *Chemical reviews*, 107(2), 641-662.
- Guo, W., Hu, S., Zhao, J., Jin, S., Liu, W., & Zhang, H. (2011). Removal of spectral interferences and accuracy monitoring of trace cadmium in feeds by dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 97(2), 154-159.
- Huang, C., & Hu, B. (2008). Silica-coated magnetic nanoparticles modified with γ -mercaptopropyltrimethoxysilane for fast and selective solid phase extraction of trace amounts of Cd, Cu, Hg, and Pb in environmental and biological samples prior to their determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 63(3), 437-444.
- Khan, N., Jeong, I. S., Hwang, I. M., Kim, J. S., Choi, S. H., Nho, E. Y., Choi, J. Y., Par, K. S., & Kim, K. S. (2014). Analysis of minor and trace elements in milk and yogurts by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). *Food chemistry*, 147, 220-224.
- Laborda, F., Medrano, J., & Castillo, J. R. (2001). Quality of quantitative and semiquantitative results in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 16(7), 732-738.
- Laso, J. (2015). Técnica Instrumental: ICP Masas. Madrid: Gabinete de Servicios para la Calidad.
- Lewen, N., Mathew, S., Schenkenberger, M., & Raglione, T. (2004). A rapid ICP-MS screen for heavy metals in pharmaceutical compounds. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 35(4), 739-752.
- Liu, G., Cai, Y., & O'Driscoll, N. (2011). Environmental chemistry and toxicology of mercury. New Jersey: John Wiley & Sons.

- May, T. W., & Wiedmeyer, R. H. (1998). A table of polyatomic interferences in ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*, 19, 150-155.
- McLaren, J. W., Beauchemin, D., & Berman, S. S. (1987). Application of isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry to the analysis of marine sediments. *Analytical Chemistry*, 59(4), 610-613.
- Millour, S., Noël, L., Kadar, A., Chekri, R., Vastel, C., & Guérin, T. (2011). Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(1), 111-120.
- Nardi, E. P., Evangelista, F. S., Tormen, L., Saint, T. D., Curtius, A. J., de Souza, S. S., & Barbosa, F. (2009). The use of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of toxic and essential elements in different types of food samples. *Food Chemistry*, 112(3), 727-732.
- Palmieri, H. E., Knupp, E. A., Auler, L. M., Gomes, C. C., & Windmoeller, C. C. (2011). Direct quantification of thorium, uranium and rare earth element concentration in natural waters by ICP-MS. International Nuclear Atlantic Conference, Belo Horizonte, MG, Brazil.
- Park, C. J., Cho, K. H., Suh, J. K., & Han, M. S. (2000). Determination of cadmium in sediment reference materials by isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry with correction of tin isobaric interference using mass bias equations. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 15(5), 567-570.
- Perkin Elmer. ICP-Mass Spectrometry. ELAN DRC II (2013). Washington University in St. Louis, St. Louis, USA.
- Rodríguez, P. (2016). Puesta a punto y validación de método para la determinación de metales pesados y sodio con ICP-MS (Trabajo Fin de Máster). Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España.
- Rzymiski, P., Tomczyk, K., Poniedzialek, B., Opala, T., & Wilczak, M. (2015). Impact of heavy metals on the female reproductive system. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 22(2), 259-264.
- Thomas, R. (2002). A beginner's guide to ICP-MS Part XII - A review of interferences. *Spectroscopy*, 17(10), 24-31.
- Thomas, R. (2013). Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners. Boca Ratón: CRC press.
- UNEP Chemicals Branch. (2008). The global atmospheric mercury assessment: Sources, emissions and transport. Recuperado el 15 de enero de 2017 de: <http://www.chem.unep.ch/mercury/>
- Vanhaecke, F., Vanhoe, H., Dams, R., & Vandecasteele, C. (1992). The use of internal standards in ICP-MS. *Talanta*, 39(7), 737-742.
- Young, R. A. (2005). Toxicity profiles: toxicity summary for cadmium. Risk Assessment Information System, RAIS, University of Tennessee. Recuperado el 12 de diciembre de 2016 de: <https://rais.ornl.gov/tox/profiles/cadmium.html>.
- Zhou, H., & Liu, J. (1997). The simultaneous determination of 15 toxic elements in foods by ICP-MS. *Atomic Spectroscopy*, 18, 115-118.