

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE MERCURIO EN SANGRE Y PLASMA DE PACIENTES CON LEUCEMIA

Lic. Carolina Sthormes¹, Dra. Marinela Colina^{1,2*}, Dr. Rodolfo Salas³, Lic. Jervis Nava¹, Dr. Victor Granadillo⁴ y Lic. Brinolfo Montilla¹.

- 1.- Laboratorio de Química Ambiental, Departamento de Química, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo 4011. Venezuela.
- 2.- Empresa Innovación Ambiental Quitoano Ca. Av San Francisco No 29-25. San Francisco, Maracaibo Venezuela.
- 3.- Departamento de Biología. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo 4011. Venezuela.
- 4.- Laboratorio de Instrumentación Analítica. Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia. Maracaibo 4011. Venezuela.

*Autor para la correspondencia. Email: colinamarinela@gmail.com

Recibido: 22-11-2017 / Aceptado: 28-2-2018

RESUMEN

Se desarrollaron metodologías analíticas para la determinación de los niveles de mercurio en muestras de sangre completa y plasma de pacientes con leucemia registrados en el instituto Hematológico de Occidente, Maracaibo, evaluando la concentración total de Hg y sus especies químicas en muestras sanguíneas de los pacientes estudiados (n=34) y de sujetos controles (n=5), a través de HPLC-ICP-MS. El límite de detección obtenido calculado para la determinación de Hg en sangre completa y plasma fue de $1,39 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ y el límite de cuantificación fue $1,39 \mu\text{g Hg L}^{-1}$. Las concentraciones totales de mercurio en sangre y plasma fueron $16,89 \pm 8,76 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ [$8,22-45 \mu\text{g Hg L}^{-1}$] y $25,77 \pm 5,12 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ [$10,6-40,87 \mu\text{g Hg L}^{-1}$] respectivamente, mientras que para la población control fueron de $25,36 \pm 11,4$ [$10,6-40,87 \mu\text{g Hg L}^{-1}$] y $74,46 \pm 16,09$ [$64,38-102,82 \mu\text{g Hg L}^{-1}$]. La media de Hg-S del grupo de los varones evaluado fue $16,08 \pm 7,85 \mu\text{g Hg L}^{-1}$ y en las hembras $18,68 \pm 10,05 \mu\text{g L}^{-1}$, la media de Hg-S en las hembras fue significativamente superior ($P < 0,05$) que la media de Hg-S observada. Los límites de detección para las especies químicas de Hg estudiadas en sangre resultaron: CH_3Hg^+ ($0,7 \mu\text{g Hg L}^{-1}$), Hg^{+2} ($0,53 \mu\text{g Hg L}^{-1}$). Las concentraciones encontradas de Hg^{+2} y CH_3Hg^+ en los pacientes de leucemia en sangre completa y plasma fueron $8,16 \pm 1,67$ [$6,96 - 10,97$], $9,85 \pm 6,22 \mu\text{g Hg}^{+2} \cdot \text{L}^{-1}$ [$6,04 - 20,74$], y $11,47 \pm 4,33 \mu\text{g Hg}^{+2} \cdot \text{L}^{-1}$ [$7,28 - 18,63$], $11,28 \pm 5,40$ [$6,24 - 18,63$] respectivamente, mientras que para la población control fueron $10,04 \pm 3,84 \mu\text{g Hg}^{+2} \cdot \text{L}^{-1}$ [$5,41 - 15,86$], $12,24 \pm 5,76$ [$6,00 - 21,37$] y $33,48 \pm 8,62 \mu\text{g Hg}^{+2} \cdot \text{L}^{-1}$ [$27,59 - 48,36$], $28,44 \pm 13,13$ [$18,25 - 50,23$].

Palabras clave: leucemia, mercurio, sangre, plasma.

DETERMINATION OF MERCURY LEVELS IN BLOOD AND PLASMA OF PATIENTS WITH LEUKEMIA

ABSTRACT



In this work, analytical methodologies were developed for the determination of mercury levels in blood and plasma samples of patients with leukemia registered at the Haematological Institute of the West, Maracaibo, evaluating the total concentration of Hg and its chemical species in blood samples from the patients studied ($n = 34$) and of control subjects ($n = 5$), by the HPLC-ICP-MS. The calculated limit of detection found for the determination of Hg in blood and plasma was $1.39 \mu\text{g Hg/L}$ and the limit of quantification was $1.39 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$. The total mercury concentrations in blood and plasma of $16.89 \pm 8.76 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ [$8.22-45 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$] and $25.77 \pm 5.12 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ [$10.6-40.87 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$] respectively and for the control population were 25.3637 ± 11.4 [$10.6-40.87 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$] and 74.46 ± 16.09 [$64.38-102.82 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$]. The mean of Hg-S of the group of males evaluated was $16.08 \pm 7.85 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$, and in females were $18.68 \pm 10.05 \mu\text{g.L}^{-1}$, the mean of Hg-S in the females was significantly higher ($P < 0.05$) than the mean Hg-S observed. The detection limits for the Hg chemical species studied in blood are: Hg^+ ($0,7 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$), Hg^{+2} ($0,53 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$). The concentrations found for Hg^{+2} and CH_3Hg^+ in leukemia patients in blood and plasma were 8.16 ± 1.67 [$6.96-10.97$], $9.85 \pm 6.22 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$6.04-20.74$], and $11.47 \pm 4.33 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$7.28-18.63$], 11.28 ± 5.40 [$6.24-18.63$] respectively, while for the control population were $10.04 \pm 3.84 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$5.41-15.86$], 12.24 ± 5.76 [$6.00-21.37$] and $33,48 \pm 8.62 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$27.59-48.36$], 28.44 ± 13.13 [$18.25-50.23$].

Key words: leukemia, mercury, blood, plasma.

DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MERCÚRIO NO SANGUE E PLASMA DE PACIENTES COM LEUCEMIA

RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidas metodologias analíticas para a determinação dos níveis de mercúrio no sangue total e em amostras de plasma de pacientes com leucemia cadastrados no Instituto Hematológico do Oeste, Maracaibo, avaliando a concentração total de Hg e suas espécies químicas em amostras de sangue dos pacientes ($n=34$) e dos indivíduos controle ($n=5$), por HPLC-ICP-MS. O limite de detecção obtido calculado para a determinação de Hg no sangue total e plasma foi de $1,39 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ e o limite de quantificação foi de $1,36 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$. As concentrações totais de mercúrio no sangue e no plasma foram $16,89 \pm 8,76 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ [$8,22-45 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$] e $25,77 \pm 5,12 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ [$10,6-40,87 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$], respectivamente, enquanto que para a população de controle foram $25,36 \pm 11,4$ [$10,6-40,87 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$] e $74,46 \pm 16,09$ [$64,38-102,82 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$]. O Hg-S médio do grupo de machos avaliados foram de $16,08 \pm 7,85 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ e nas fêmeas $18,68 \pm 10,05 \mu\text{g.L}^{-1}$, a média de Hg-S nas fêmeas foi significativamente maior ($P < 0,05$) do que a média de Hg-S observada. Os limites de detecção das espécies químicas de Hg estudadas no sangue foram: CH_3Hg^+ ($0,7 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$), Hg^{+2} ($0,53 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$). As concentrações encontradas para Hg^{+2} e CH_3Hg^+ em pacientes com leucemia no sangue total e plasma foram $8,16 \pm 1,67$ [$6,96-10,97$], $9,85 \pm 6,22 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$6.04-20.74$] e $11.47 \pm 4.33 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$7.28-18.63$], 11.28 ± 5.40 [$6.24-18.63$] respectivamente, enquanto que para a população de controle foram $10,04 \pm 3,84 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$5,41-15,86$], $12,24 \pm 5,76$ [$6,00-21,37$] e $33,48 \pm 8,62 \mu\text{g Hg}^{+2}.\text{L}^{-1}$ [$27,59-48,36$], $28,44 \pm 13,13$ [$18,25-50,23$].

Palavras-chave: leucemia, mercúrio, sangue, plasma.

1. INTRODUCCIÓN

Entre los metales pesados el mercurio se considera como uno de los contaminantes más peligrosos en el medio ambiente (Granadillo, 2009; Son, Lee, Paek & Lee, 2009; Vesterberg, 1991; Galignani, Bahsas, Brunetto, Burguera & Petit de Peña, 1998; Leermakers, Baeyens, Quevauviller & Horvat, 2005) no solo por la gravedad de las enfermedades que causa sino por los efectos irreversibles que provoca en los seres humanos (Bello *et al.*, 2005). La toxicidad del mercurio depende de su forma química (Li *et al.*, 2008; Marcano & Troconis, 2001; Issaro, Abi-Ghanem & Bermond, 2009). Se puede

encontrar en tres formas básicas: mercurio elemental (Hg^0) conocido como mercurio metálico (como en los termómetros y amalgamas y en las actividades mineras de oro) (Vupputuri *et al.*, 2005) mercurio inorgánico (Ino-Hg), principalmente cloruro de mercurio (como en los cosméticos, los laxantes y antisépticos) y mercurio orgánico, básicamente metilmercurio (Met-Hg) o etilmercurio (Et-Hg) se produce a través del consumo de mariscos y crustáceos, y de algunos peces de agua dulce contaminadas y las vacunas que contienen timerosal respectivamente (Rodrigues *et al.*, 2009).

En diferentes estudios se ha demostrado que la exposición a altos niveles de metilmercurio afecta negativamente la función neurológica, renal, inmunes, sexuales, entre otras; pero poco se sabe sobre el potencial de inducir a otros efectos adversos para la salud (Rodrigues *et al.*, 2009). Algunos informes en animales y humanos sugieren que la exposición al metilmercurio puede afectar a la variabilidad del ritmo del corazón, enfermedad cardíaca y la presión arterial, sin embargo, los datos son limitados (Vupputuri *et al.*, 2005). Sin embargo, a pesar de la diferencia de toxicidad relacionada con la forma de mercurio, la concentración de mercurio total en la sangre es por lo general utilizada para estimar los resultados clínicos después de la exposición al mercurio.

Entre las técnicas analíticas para la determinación de mercurio se encuentran la espectrometría de absorción atómica y atomización electrotérmica (ETAAS), espectrometría de absorción atómica con vapor frío (CVAAS), (Galignani *et al.*, 1998; Marcano & Troconis, 2001; Caldwell *et al.*, 2009) cromatografía de gases combinada con espectrometría de masas (CG-MS), el plasma acoplado inductivamente con espectrometría de masas (ICP-MS) (Nixon, Burritt & Moyer, 1999; Rosen & Hieftje, 2004) entre otras.

Por otra parte, la proporción entre las formas químicas de mercurio en la sangre puede variar entre los individuos. Esto hace que sea indispensable contar con métodos analíticos, basados en el análisis de especiación que puede diferenciar entre las formas químicas en la sangre para el diagnóstico de los riesgos (Rodrigues *et al.*, 2009).

El análisis de especiación por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplada a un espectrómetro de masas resulta más apropiada para la separación de especies polares, lo que supone una ventaja en la especiación de Hg inorgánico y orgánico (Cámara & Madrid, 2005). Además, proporciona convenientes avances, tanto en la sensibilidad así como en la selectividad, detección, y la alta capacidad de multi-isótopos para el análisis de bajas concentraciones del Hg en muestras ambientales y de sangre (Nash & McSheehy, 2007; Monperrus *et al.*, 2005; Fernández 2017).

1.1. Leucemia

Las leucemias son un grupo heterogéneo de enfermedades que se distinguen por infiltración de la médula ósea, sangre y otros tejidos, por células neoplásicas del sistema hematopoyético. Son enfermedades neoplásicas que se deben a mutación somática de la célula progenitora, según su estirpe celular afectada, ya sea la línea mieloide o la linfoide. Incluye a un grupo heterogéneo de neoplasias que difieren respecto a su agresividad, célula de origen, características clínicas y respuestas al tratamiento (Mckenzie, 2000; Ortega, Osnaya & Rosas, 2007).

La enfermedad se clasifica en dos amplios grupos con base en la agresividad de la enfermedad: 1) aguda, la cual si no se trata provoca rápidamente la muerte, en el transcurso de meses, 2) crónica, una variante menos agresiva que si no se trata causa la muerte en meses a años. Estos dos grupos principales se clasifican en mieloides o linfoides de acuerdo al origen de la célula progenitora leucémica. Si predominan células mielocíticas u otras células derivadas de la célula progenitora UFC-GEMM la enfermedad se llama leucemia mielogena. Si predominan las células linfoides la enfermedad se llama leucemia linfocítica. Por tanto, con el uso de estos dos sistemas de clasificación que vinculan la agresividad de la enfermedad y el origen de la célula, se reconocen cuatro tipos de leucemia: leucemia mieloblástica aguda (LMA) (a veces conocida como leucemia no linfocítica aguda), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica (LLC) (Ortega et al., 2007).

1.2. Mercurio

El mercurio, no es un elemento esencial, es un inhibidor de las reacciones de enzimas catalizadas y la síntesis de proteínas (Aschner & Aschner, 1990). El mercurio se encuentra en forma elemental o formando parte de compuestos inorgánicos y orgánicos; cada una de estas formas posee sus propias cualidades toxicológicas. Los compuestos más peligrosos del mercurio son los alquilmercurio, entre los que predomina el metilmercurio (Florez, Armijo & Mediavilla, 1997).

La elevada toxicidad del mercurio se debe a su gran afinidad con los grupos –SH presentes en las proteínas del organismo; de este modo se fija a membranas e inactiva múltiples enzimas de los seres vivos. La estructura molecular de cada compuesto de mercurio, su estabilidad en el organismo y sus vías de eliminación conforman sus propiedades toxicológicas, específicas para cada compuesto (Florez et al, 1997; OMS, 2013).

1.3. Análisis de especiación

El análisis de especiación de muestras clínicas cada vez es más ampliamente aceptado para la nutrición y/o efectos toxicológicos. Según la unión internacional de Química Pura Aplicada (IUPAC son las siglas en inglés de: *International Union of Pure and Applied Chemistry*), el análisis de especiación se define como el proceso de análisis de identificación y/o cantidades de medida de uno o más formas químicas individuales en una muestra, y la especiación de un elemento se define como la distribución de un elemento entre las especies químicas definidas en un sistema (Rodrigues *et al.*, 2009).

Recientemente, la especiación de mercurio se estableció mediante el acoplamiento de HPLC con espectrometría de absorción atómica (AAS son las siglas en inglés de: *Atomic Absorption Spectrometry*), espectrometría de emisión con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES son las siglas en inglés de: *Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometer*), plasma inducido por microondas con flujo de argón (MIP son las siglas en inglés de: *Microwave Induced Plasma*) e ICP-MS. Aunque los detectores de la ICP-OES, MIP e ICP-MS tienen capacidades analíticas únicas para la especiación, la instrumentación, y los costos de las mediciones analíticas les dificulta el ser adaptados como los detectores comunes de cromatografía (Gallignani *et al.*, 1998; Castilhos *et al.*, 2006).

Rodrigues *et al.* (2009) utilizaron un método simple para la determinación de Met-Hg y Hg inorgánico en sangre usando cromatografía líquida con espectrometría con plasma acoplado inductivamente (LC-ICP-MS) y un procedimiento rápido para la preparación de la muestra. La extracción de las especies de mercurio se realizó usando una columna cromatográfica C18 de fase reversa empleando como fase móvil mercaptoetanol al 0,05%, L-cisteína 0,4%, acetato de amonio 0,06 M y metanol al 5%. Los límites de detección del método fueron 0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ y 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para el mercurio inorgánico y el metilmercurio, respectivamente.

En el presente trabajo, se realizó la determinación analítica de los niveles de mercurio, así como sus especies químicas (Hg^{2+} y $\text{CH}_3\text{-Hg}^+$) en sangre completa y plasma de pacientes afectados por la leucemia e individuos sanos utilizando la cromatografía acoplada a la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestreo

La recolección de muestras de sangre se realizó a través de un muestreo aleatorio con 5 personas controles y 34 pacientes de leucemia del Instituto Hematológico de Occidente de Maracaibo, Venezuela, provenientes la gran mayoría de la ciudad de Barquisimeto. Se seleccionaron 5 personas controles que no estaban en contacto con este metal y así establecer el grado de exposición e intoxicación con el mercurio en los individuos expuestos. A cada individuo control se le extrajo 6 mL de sangre vía venosa, se tomaron con jeringas desechables y se colocaron en tubos de polipropileno con tapas a presión, que contenían 0,13 mL de EDTA al 10% para las determinaciones de mercurio. Las muestras de sangre completa se centrifugaron a aproximadamente 5500 rpm durante 15 min para obtener el plasma y las células sanguíneas. Las muestras colectadas fueron refrigeradas a 4 °C hasta el momento de su análisis.

3.2. Materiales y Equipos

Todas las medidas se realizaron con un ICP-MS Agilent modelo 7500 equipado con un muestreador automático modelo ASX-500 Series para la determinación de Hg total y la especiación. Para el tratamiento de las muestras se utilizó un Agitador Vortez–Genre modelo K500 – G (Fisher Scientific) y una Centrifugadora DINAC marca Clay Adams modelo 101. Para la especiación se utilizó un HPLC modelo Agilent 1200 con una columna de fase reversa (XDB-C18, 5µm, 150mm x 4,6 mm, Zorbax Eclipse Columns Agilent, USA). Centrifugadora marca Labnet para la extracción de las muestras. En la **Tabla 1** se muestran las condiciones iniciales de operación del HPLC-ICP-MS.

3.3. Reactivos

Todos los reactivos fueron de grado analítico. Las soluciones stock de Hg^{+2} (ca. 1000 mg.L⁻¹) y CH_3Hg^+ (ca. 1000 mg.L⁻¹) se prepararon gravimétricamente a partir de cloruro de mercurio (Merck) y cloruro de metilmercurio (Riedel de Haen, Seelze, Germany) disolviendo 0,125 g en 10 mL de HNO_3 al 10% (v/v). Se preparó ácido nítrico (Merck) al 2% usado para los patrones de la curva de calibrado. Para aforar las muestras mineralizadas se utilizó agua desionizada grado I ASTM con valores de resistencia eléctrica >16.6 MΩcm² a 25°C.

Los reactivos adicionales para el estudio de especiación fueron: ácido etilendiaminotetracético (EDTA) Riedel-de Haen (Alemania), metanol de grado HPLC (99,8% v/v), 2- mercaptoetanol Merck (99%), Acetato de amonio Merck (98%).

Se aplicó el test estadístico de la t de student para la comparación de concentraciones en diferentes partes de ese estudio.

Tabla 1. Condiciones de trabajo empleadas en HPLC-ICP-MS para la separación y cuantificación de algunas especies de mercurio en sangre completa y plasma.

Parámetros de ICP-MS		Datos
Potencia (Rf)		1400W
Nebulizador		Concéntrico
Velocidad de la bomba del nebulizador (rpm)		0,4
Flujo del plasma (L.min ⁻¹)		14,5
Flujo de gas de arrastre (L.min ⁻¹)		0,9
Flujo de gas de enfriamiento (L.min ⁻¹)		0,17
Isótopo monitoreado		²⁰² Hg
Método de adquisición de la data		Spectrum
Parámetros de HPLC		
Columna		C ₁₈
Fase Móvil	2-Mercaptoetanol, acetato de amonio, EDTA, metanol	
Composición de la fase móvil	0,1%, 0,06M, 2mM, 3%	
Caudal de flujo	1 mL.min ⁻¹	
Modo de elución	Isocrático	
Volumen de inyección	50 µL	
Método de adquisición de la data	Análisis de tiempo de resolución	

3.4. Determinación de mercurio total en sangre

Para la determinación de Hg total en sangre se realizó la digestión en medio básico de 0,5 mL de sangre con dos gotas de octanol, 2 mL de hidróxido de amonio 1M, 4 mL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en un baño con hielo, este último es un agente oxidante que acelera la digestión de las muestras orgánicas elevando la temperatura. Este procedimiento produce soluciones claras de las muestras sin partículas disueltas o capas grasosas. Luego se aforaron a 10 mL con agua desionizada en balones y se analizaron utilizando ICP-MS por triplicado. En la determinación de mercurio total se monitoreo el isótopo más abundante, estable y libre de interferencia como ²⁰²Hg. Este procedimiento es rápido y por lo tanto susceptible para la preparación de muestras en las que se analizan elementos volátiles tales como el Pb y el Hg.

3.5. Determinación de mercurio total en plasma

Para la determinación de Hg total en plasma se realizó la digestión en medio básico de 0,1 mL de sangre con 400 µL de hidróxido de amonio 1 M, 800 µL de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y 2 gotas de octanol en un baño con hielo. Luego se transfirieron a balones de 10 mL y se aforaron con agua desionizada. Se analizaron por ICP-MS por triplicado. En la determinación de mercurio total se monitoreo el isótopo más abundante, estable y libre de interferencia como ²⁰²Hg.

3.6. Tratamiento de las muestras para el análisis de especiación

Para la extracción del mercurio que contienen las muestras se tomaron 250 µL de sangre y se colocó en tubos de polipropileno con 4,75 mL de una solución que contenía: L-cisteína al 0,05%, HCl al 0,1%, 2-mercaptoetanol al 0,1% y fue sonificada en un baño de ultrasonido por 15 min. Las soluciones resultantes fueron centrifugadas a aproximadamente 5000 rpm durante 15 min y filtradas. La extracción de la muestra se realizó por triplicado y los blancos de la extracción fueron preparados de la misma manera.

3.7. Determinación de las especies de mercurio

Se utilizó una fase móvil propuesta en el método descrito por Colina, Gardiner, Rivas & Troncone (2011), utilizando acetato de amonio 0,06M, 2-mercaptoetanol al 0,1%, metanol al 3% y EDTA 0,002 M como eluyente. La identificación y cuantificación de las especies de Hg se logró mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS.

Ambos métodos fueron validados y optimizados a través de la medición de los parámetros analíticos: exactitud, precisión, interferencias, límites de detección y cuantificación, sensibilidad instrumental y aplicabilidad, entre otros.

Para evaluar la precisión del método, se inyectó al sistema una muestra (3 réplicas) las cuales se midieron por triplicado y de esta forma la desviación estándar relativa de las medidas se tomó como la precisión. Por su parte para la exactitud se prepararon disoluciones de concentración conocida y se inyectaron en el sistema cromatográfico para así obtener el porcentaje de recuperación. Se utilizó la prueba estadística t de student para la comparación de medias

4. RESULTADOS

4.1. Parámetros analíticos para la determinación de mercurio total:

La curva de calibración para la determinación de mercurio total tuvo un coeficiente de correlación aceptable para la determinación: $y = 2046,3 - 2592,9X$; ($R^2 = 0,997$). Estos resultados permitieron la determinación analítica del Hg total en las diferentes muestras clínicas empleadas usando ICP-MS con buenos límites de detección y de sensibilidad. El límite de detección calculado por Miller & Miller (2002) encontrado para la determinación de Hg en sangre completa y plasma fue de 1,39 µg Hg.L⁻¹ y el límite de cuantificación de 1,39 µg Hg.L⁻¹ con una sensibilidad instrumental 88,94.

4.1.1 Exactitud y precisión del método

En la **Figura 1** se presentan la curva de calibración y las de adición estándar para cada muestra. Se observó paralelismo entre las pendientes obtenidas para Hg tanto en las curvas de calibración como en la adición estándar, lo que indicó la ausencia de interferencias no espectrales en las determinaciones de mercurio en las muestras de sangre. Al comparar las pendientes de la curva de calibración y adición estándar obtenidas para mercurio se obtuvieron porcentajes de error menores al 5%, lo cual evidencia la ausencia de interferencias no espectrales.

Los estudios de recuperación se realizaron en muestras reales de sangre a las cuales se le agregaron cantidades conocidas de patrón, donde se obtuvo una recuperación entre 91 y 97% del analito.

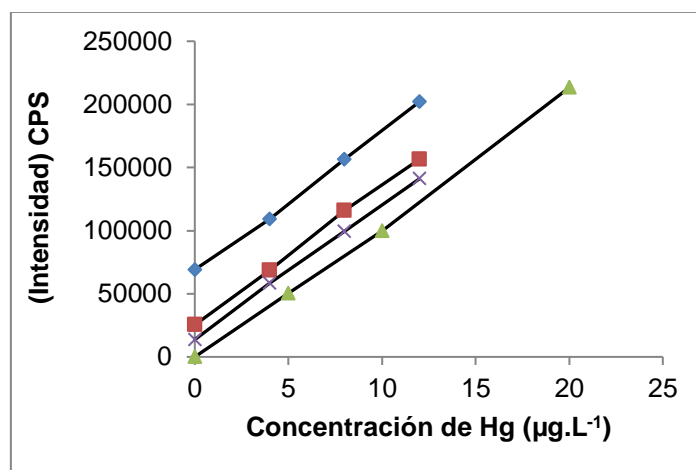


Figura 1. Gráfica del estudio de interferencias por adición estándar.

El estudio de precisión del método desarrollado para la determinación de Hg en sangre completa y plasma sanguíneo de pacientes con leucemia, se realizó en muestras reales diluidas, los valores de precisión, como desviación estándar y desviación estándar relativa, obtenidos en la corrida y entre corrida para la determinación de mercurio en sangre completa. Para este estudio se utilizaron 3 muestras de sangre preparadas por triplicado. Los resultados muestran una buena precisión, con una desviación estándar relativa promedio para muestras de sangre de 4,39%, entre corrida y 0,22% en la corrida, respectivamente. El método propuesto estuvo libre de interferencias, es confiable, reproducible y puede ser utilizado para la determinación del mercurio en muestras de sangre completa.

4.1.2. Optimización de la digestión en medio básico de las muestras de sangre completa

Se evaluó la digestión en medio básico de las muestras de sangre con diferentes volúmenes y concentraciones de hidróxido de amonio y peróxido de hidrógeno. Se dejó constante la cantidad de sangre y de octanol añadida, 0,5 mL y dos gotas, respectivamente. Se observó que con 2 mL de NH_4OH y 4 mL de H_2O_2 se obtuvieron los mejores resultados (**Tabla 2**).

Tabla 2. Resultados obtenidos en la optimización de la digestión para la determinación de mercurio total en sangre.

Concentración NH_4OH (mol.L ⁻¹)	Volumen (ml) de ($\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2$)	Concentración de Hg ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
		$\bar{X} \pm \text{DE}$
1	2/4	64,97 \pm 1,6
	4/4	55,36 \pm 2,5
	2/6	56,68 \pm 4,0
	4/6	53,07 \pm 3,3
2	2/4	57,83 \pm 2,1
	4/4	58,53 \pm 1,9
	2/6	55,34 \pm 3,6
	4/6	53,24 \pm 2,6

El octanol se añadió antes de la adición del oxidante para evitar la formación de espuma. La producción de oxígeno gaseoso y de las especies de CO_2 durante la oxidación de la muestra podría explicar la formación de espuma. Además de combatir la espuma este alcohol reduce la tensión superficial de esta solución (Biasino, Domínguez & Alvarado, 2007).

4.2. Concentraciones de mercurio en sangre y plasma de los pacientes con leucemia y los individuos controles

La **Tabla 3** muestra las concentraciones de mercurio total en pacientes con leucemia e individuos controles. Para los pacientes con leucemia se encontró una concentración promedio de mercurio en sangre de $16,889 \pm 8,759 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ [8,22 - 45 $\mu\text{g Hg.L}^{-1}$] y $25,36 \pm 11,41 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$ [10,6 - 40,87 $\mu\text{g Hg.L}^{-1}$] para la población control. No existen diferencias significativas ($P \leq 0,05$) entre la concentración de mercurio en sangre de los pacientes con leucemia y la población control, lo cual nos indica que el Hg podría no tener relación con la aparición de la enfermedad.

Al comparar los resultados encontrados de sangre completa con los descritos por Granadillo (2009), se encontró que existen diferencias significativas ($P < 0,05$), lo cual se deduce que estos individuos controles estuvieron más expuestos a este metal. Se debe tomar en cuenta

que las muestras analizadas en este estudio provinieron de la ciudad de Barquisimeto y las evaluadas por Granadillo (2009) fueron pacientes y controles de la ciudad de Maracaibo.

Tabla 3. Comparación entre la concentración de mercurio en sangre completa y plasma de pacientes con leucemia e individuos controles.

Tipo de muestra	Pacientes con leucemia (n=34) $\mu\text{g Hg.L}^{-1}$	Individuos Controles (n=5) $\mu\text{g Hg.L}^{-1}$
Sangre completa	$16,89 \pm 8,76$	$25,36 \pm 11,41$
Plasma	$25,77 \pm 5,12$	$74,46 \pm 16,09$

Granadillo (2009) encontró que el nivel de mercurio promedio en sangre era de $13,5 \pm 3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (intervalo experimental $9,5-17,3 \mu\text{g.L}^{-1}$) para 32 pacientes con leucemia. Este fue el único estudio encontrado en pacientes con leucemia. Araragi *et al.* (2003), determino en un estudio con 380 dentistas que la concentración promedio era de $8,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ y el 7,4% de la población estudiada presentaba niveles superiores a $15 \mu\text{g.L}^{-1}$. En este estudio el 91% de la población estudiada presentó niveles superiores a 10 ppb en sangre y plasma indicando que se encuentran bajo riesgo toxicológico. En la ciudad de Maracaibo estuvo establecida por más de 30 años una planta de Clorosoda que utilizaba mercurio en sus celdas.

Estudios realizados por Chen *et al.* (2005) encontraron un alto contenido de Hg en personas laboralmente expuestas y habitantes de una zona de alta polución en la República Popular China. Estos investigadores señalaron valores 60 veces más altos en el grupo expuesto ($60,8 \pm 70,2 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$) en comparación al grupo control ($0,91 \pm 0,28 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$). De igual manera, Silva *et al.* (2004) observó un promedio de $31 \mu\text{g}$ de Hg.L^{-1} ($4-130 \mu\text{g Hg.L}^{-1}$) en buscadores de oro del río Amazonas brasileño.

Los límites normales marcados por la OMS, los valores de referencia de mercurio en individuos no expuestos son inferiores a $8 \mu\text{g.L}^{-1}$ en sangre total (Morales & Reyes, 2003) y para personas sin consumo de pescado con altas concentraciones de mercurio, es del orden de 5 a $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Las diferencias encontradas en los niveles de mercurio sanguíneo parecen ser que la población control trabajó en laboratorios de química y también se encontró que la mayoría de estos tenían amalgamas. El mercurio presente en las amalgamas dentales se encuentra en su forma metálica que es poco tóxica. Sin embargo, este metal se evapora a 25°C , presentándose como vapor de mercurio que es muy tóxico.

Considerando que, al tomar bebidas calientes como café, té o chocolate, las temperaturas en la boca pueden llegar a 40 y 60 °C, puede esperarse la liberación del vapor de mercurio cada cierto tiempo, exponiendo al paciente a una exposición crónica, este hecho fue evaluado experimentalmente y se comprobó que existía un aumento de la tasa de evaporación (Hursh *et al.*, 1976).

Estudios realizados por Morales & Reyes (2003), revelaron que existe una fuerte correlación entre los valores de mercurio en plasma, sangre total, orina y el número de amalgamas presentes en la cavidad bucal de 244 personas que trabajan en una unidad odontológica. En Brasil se encontró una concentración de mercurio en la sangre promedio de la población control (N=17) de 26,8 µg.L⁻¹.

Las concentraciones de Hg promedios encontrados en plasma de los pacientes de leucemia fue 25,77 ± 5,12 µg Hg.L⁻¹ [17,52 – 32,48 µg Hg.L⁻¹] y para los controles 74,46 ± 16,09 [64,38 – 102,82 µg Hg.L⁻¹]. Al comparar estas medias experimentales se encontró que presentaron diferencias estadísticamente significativas (P<0,05) lo que nos indica que la población control está expuesto en mayor grado al tóxico que los pacientes con leucemia.

En este trabajo no se encontró contribución de la aparición de la leucemia con el aumento de los niveles de Hg total en sangre y plasma encontrados en los pacientes con leucemia, al igual que lo encontró Granadillo (2009), quien no encontró diferencias significativas entre los niveles de Hg en los pacientes con leucemia y los individuos controles por lo que no se encontró ninguna relación con la enfermedad. Sin embargo, los resultados obtenidos son de importancia y deben ser tomados en cuenta para estudios posteriores.

Wilhelm *et al.* (1996), encontraron valores en mercurio total sanguíneo 1,5 veces más elevados en mujeres que en hombres, además encontraron una mayor concentración de mercurio en sangre en la población de 15 hombres que en las mujeres (N=28). En todo caso, los datos son contradictorios, atribuyen la diferencia que se encuentran entre los hombres y mujeres al mayor consumo de pescado por parte de los hombres en su grupo de trabajo. La distribución de la población estudiada, según los valores de total Hg-S (Hg-Sangre) y Hg-P (Hg-Plasma) de acuerdo al sexo se registra en la **Tabla 4**. La media de Hg-S del grupo de los varones evaluado fue (16,08 ± 7,85), y en las hembras (18,68 ± 10,05) µg.L⁻¹, la media de Hg-S en las hembras fue significativamente superior (P<0,05) que la media de Hg-S observada en las varones.

Tabla 4. Distribución de los pacientes con leucemia estudiados según los valores de Hg-S y Hg-P, de acuerdo al sexo.

Sexo	n	%	Hg-S (ug.L ⁻¹)	Sexo	n	%	Hg-P (ug.L ⁻¹)
			X ± DE				X ± DE
M	21	61,76	16,08 ± 7,85	M	7	70	20,02 ± 3,57
F	13	38,24	18,68 ± 10,05	F	3	30	26,87 ± 5,51
Total	34	100	16,889 ± 8,759	Total	10	100	25,77 ± 5,12

Significación estadística de la diferencia entre las medias considerando el sexo, establecido a través de la prueba t-Student para muestras independientes.

Hg-S: mercurio total en sangre; Hg-P: mercurio total en plasma

4.3. Especiación de mercurio

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron una fase estacionaria enlazada al octadecilsilano de 5 µm y como fase móvil una solución que contenía: Acetato de amonio 0,06 M, EDTA 2 mM, 2- mercaptoetanol 0,1% y metanol al 3%, a un flujo constante de 1ml.min⁻¹, en modo isocrático. La identificación y cuantificación de las especies de Hg se logró mediante el acoplamiento HPLC-ICP-MS.

4.3.1. Optimización de los parámetros operacionales

En las **Figuras 2 y 3** se muestran los cromatogramas correspondientes a las especies de mercurio Hg⁺² y CH₃Hg⁺ respectivamente, obtenidos a partir de soluciones de 100 ppb. Como se puede observar tanto el CH₃Hg⁺ como el Hg⁺² presentan un rango de respuesta lineal lo suficientemente amplio para una buena cuantificación, así como también una alta simetría en las señales cromatográficas, lo que refleja una buena selectividad del sistema cromatográfico.

Los estudios se iniciaron con una fase móvil compuesta por 0,06 M de acetato de amonio esta concentración se fijó ya que es capaz de mantener un pH favorable de 6,5, también se fijó en 0,1% de 2-mercaptoetanol como un compromiso entre la selectividad y el tiempo de retención. Por otra parte, se evaluaron diferentes concentraciones de metanol en la fase móvil y se varió entre 3% y 5%. Las concentraciones superiores al 5% no fueron evaluadas ya que conducen a la inestabilidad del plasma y a un aumento en los residuos de carbón en los conos. Luego se añadió un cuarto componente el EDTA 2 mM un agente quelante utilizando el metanol al 3% obteniendo una separación completa entre el CH₃Hg⁺ y el Hg⁺².

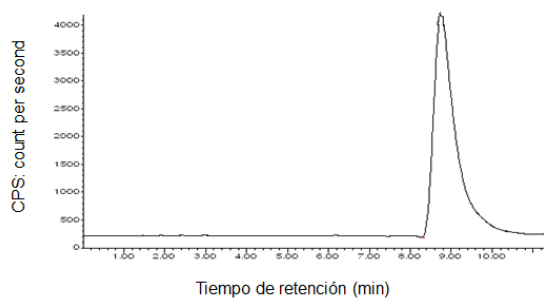


Figura 2. Cromatograma obtenido para Hg^{+2} (100 ppb) donde se observa valores adecuados de intensidad y tiempo de retención para esta especie.

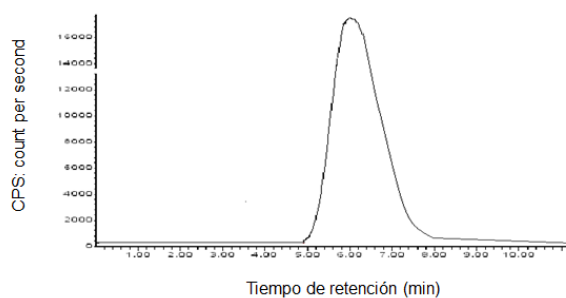


Figura 3. Cromatograma obtenido para una solución de CH_3Hg^+ (100 ppb) donde se observa valores adecuados de intensidad y tiempo de retención para esta especie.

Los estudios se iniciaron con una fase móvil compuesta por 0,06 M de acetato de amonio esta concentración se fijó ya que es capaz de mantener un pH favorable de 6,5 también se fijó en 0,1% de 2-mercaptoetanol como un compromiso entre la selectividad y el tiempo de retención. Por otra parte, se evaluaron diferentes concentraciones de metanol en la fase móvil y se varió entre 3% y 5%. Las concentraciones superiores al 5% no fueron evaluadas ya que conducen a la inestabilidad del plasma y a un aumento en los residuos de carbón en los conos. Luego se añadió un cuarto componente el EDTA 2 mM un agente quelante utilizando el metanol al 3% obteniendo una separación completa entre el CH_3Hg^+ y el Hg^{+2} .

Como se puede apreciar en la **Figura 3**, el CH_3Hg^+ presenta un menor tiempo de retención con respecto al Hg^{+2} esto es debido a la afinidad que presenta la fase estacionaria con los distintos iones, ya que la fase estacionaria es capaz de aumentar la retención de las especies a medida que se incrementa la relación carga/masa de éstos; por tanto disminuye el radio de hidratación y aumenta la polarizabilidad induciendo un dipolo y la atracción sobre la resina.

En la **Figura 4** se muestra una buena separación de las especies de mercurio usando una solución de metilmercurio y mercurio inorgánico (15 ppb). En la **Figura 5** se observa la separación cromatográfica para una muestra real de sangre completa.

En la **Tabla 5** se observan los valores de los parámetros cromatográficos como lo son: tiempo de retención, factor de retención, número de platos teóricos, factor de selectividad y resolución de la columna.

Los valores de K' y de los tiempos de retención demuestran una elución eficiente en términos de tiempo, los resultados de la resolución (R_s) muestran también un grado de separación correcta de los analitos ya que presentan valores por encima de 1,5 del mismo

modo los resultados en cuanto al factor de selectividad (α) demuestran que esta resulta efectiva para la separación de las dos especies de mercurio corroborando la eficiencia de la separación cromatográfica.

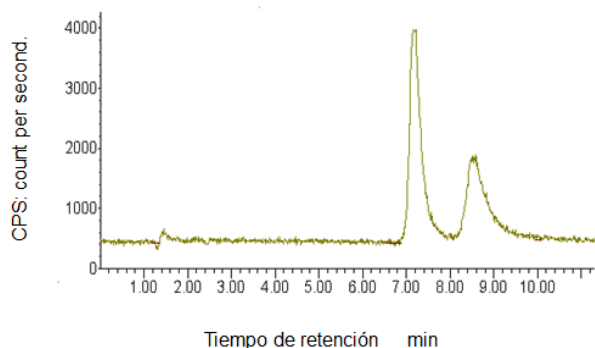


Figura 4. Cromatograma obtenido para una mezcla de CH_3Hg , Hg^{+2} (15 ppb c/u) donde se observan valores adecuados para la intensidad (CPS) y el tiempo de retención (min).

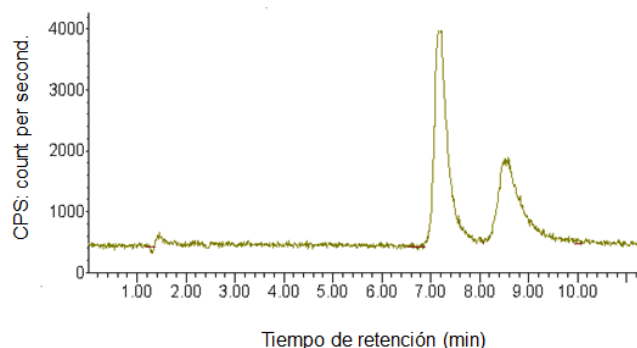


Figura 5. Cromatograma obtenido para las especies de mercurio en una muestra real de sangre completa.

4.3.2. Parámetros analíticos en el análisis de especiación

Las curvas de calibración para las especies Hg^{+2} ($y = 199,67X + 0$) ($R^2 = 0,9996$) y CH_3Hg^+ ($y = 369,78X + 194,44$) ($R^2 = 0,9971$) resultaron aceptables. Con límites de detección, cuantificación y sensibilidad de la metodología también aceptables: Para Hg^{+2} , LD: $0,53 \mu\text{g.L}^{-1}$, Lq: $0,53 \mu\text{g.L}^{-1}$, sensibilidad: 199,67 y para CH_3Hg^+ , LD: $0,70 \mu\text{g.L}^{-1}$, Lq: $0,71 \mu\text{g.L}^{-1}$, sensibilidad: 369,78.

Tabla 5. Parámetros cromatográficos para la separación de las especies de Hg estudiadas a una concentración de $15 \mu\text{g.L}^{-1}$ c/u utilizando una columna C_{18} , fase móvil acetato de amonio 0,06 M, EDTA 2 mM, 2- mercaptoetanol 0,1% y metanol al 3%, a un flujo de 1ml.min^{-1} .

Especie	Tiempo de retención (min)	Factor de retención (K')	Número de platos teóricos (N)	Factor de selectividad (α)	Resolución (R_s)
Hg^{+2}	8,76	5	71	1,26	1,77
CH_3Hg^+	7,24	3,96	117		

Los estudios de recuperación y de precisión se realizaron en muestras reales de sangre a las cuales se le agregaron cantidades conocidas de patrón (20 ppb), donde se obtuvo una

recuperación entre 97 y 98% del analíto las cuales fueron leídas por triplicado, estos resultados fueron favorables lo que indica que es un método confiable, reproducible y puede ser utilizado para la determinación de las especies de mercurio en muestras de sangre completa y plasma.

4.4. Concentraciones de mercurio inorgánico y mercurio orgánico en sangre y plasma de los pacientes con leucemia y los individuos controles

Se analizaron 5 muestras de sangre y 5 de plasma de pacientes con leucemia y de población control. Los resultados obtenidos en los análisis de especiación de mercurio realizados se muestran en la **Tabla 6**, donde todas las concentraciones están expresadas en $\mu\text{g.L}^{-1}$. Asimismo, se indican los valores promedio y la desviación estándar calculados de las especies de mercurio en plasma y sangre.

Las concentraciones de Hg^{+2} encontradas en la sangre de los pacientes con leucemia fue de $8,16 \pm 1,67$ [$6,96$ - $10,97 \mu\text{g.L}^{-1}$] y para los controles $10,04 \pm 3,84$ [$5,41$ - $15,86 \mu\text{g.L}^{-1}$]. Estas medias experimentales fueron comparadas encontrando que no existen diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Asimismo, las concentraciones encontradas de CH_3Hg^+ en sangre de pacientes con leucemia y la población control no presentaron diferencias estadísticamente significativas. En el caso de las concentraciones de CH_3Hg^+ y Hg^{+2} en plasma de los pacientes con leucemia al ser comparadas con las de la población control presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$).

Tabla 6. Concentraciones de Hg^{+2} y CH_3Hg^+ en sangre y plasma de pacientes con leucemia e individuos controles.

Tipo de muestra	Pacientes con leucemia (n=5) $\mu\text{g Hg.L}^{-1}$		Individuos Controles (n=5) $\mu\text{g Hg.L}^{-1}$	
	Hg^{+2}	CH_3Hg^+	Hg^{+2}	CH_3Hg^+
Sangre completa	$8,16 \pm 1,67$	$9,85 \pm 6,22$	$10,04 \pm 3,84$	$12,24 \pm 5,76$
Plasma	$11,47 \pm 4,33$	$11,28 \pm 5,40$	$33,48 \pm 8,62$	$28,44 \pm 13,13$

Es probable que la mayor cantidad de mercurio encontrada en el plasma se debe a que la cantidad de proteínas totales del plasma es alrededor de 7 g a 7,5 g/100 mL de sangre y ellas constituyen la mayor parte de los sólidos del plasma (Harper, 1966).

El CH_3Hg^+ se encuentra en los glóbulos rojos de la sangre con pequeñas variaciones entre los individuos, y parte del Hg^{+2} que se encuentra en los glóbulos rojos suele atribuirse a la de-metilación del CH_3Hg^+ . En la sangre más del 90% de CH_3Hg^+ se une a la hemoglobina en los glóbulos rojos, mientras que el Hg^{+2} se distribuye en el plasma y en los glóbulos rojos. Por lo tanto, el total de Hg en la sangre se utiliza a veces como una medida de la exposición de CH_3Hg^+ y el total de Hg en el plasma se utiliza como medida indirecta de la exposición a Hg^{+2} (Vesterberg, 1991).

En la literatura consultada no se encontró información sobre los valores de referencia para el Hg^{+2} y el CH_3Hg^+ presentes en la sangre.

5. CONCLUSIONES

A lo largo de la investigación realizada se ha llegado a las siguientes conclusiones:

Las características analíticas evaluadas muestran que el método desarrollado para la determinación de mercurio total en sangre y plasma es confiable.

No se encontró ninguna relación entre las concentraciones totales de mercurio ni en las de sus especies en sangre completa y plasma con la leucemia.

Para la determinación de las especies estudiadas de mercurio en la sangre y plasma el método desarrollado es confiable y reproducible, con un límite de detección para las especies químicas de Hg estudiadas en sangre y plasma aceptables.

6. RESPONSABILIDADES ÉTICAS

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Conflicto de Intereses: Ninguno

7. REFERENCIAS

- Araragi, S., Kondoh, M., Kawase, M., Saito, S., Higashimoto, M. & Sato, M. (2003). "Mercuric chloride induces apoptosis via a mitochondrial- dependent pathway in human leukemia cells". *Toxicology*, 184, 1-9.
- Aschner, M. & Aschner, J.L. (1990). "Mercury Neurotoxicity: Mechanisms of Blood-Brain Barrier Transport". *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 14, 169-176.
- Bello, S.C., Rodriguez, M.C., Fernández, D.R., Vásquez, A., Ocando, A.M., Contreras, J.R., Berglund, M., Lind, B., Bjornberg, K., Palm, B., Einarsson, O. & Vahter, M. (2005). "Interamericano de las variaciones individuales de la exposición al mercurio biomarcadores: una evaluación transversal". *Environmental Health*, 4, 20-24.
- Biasino, J., Domínguez, J. & Alvarado, J. (2007). "Hydrogen peroxide in basic media for whole blood sample dissolution for determination of its lead content by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry", *Talanta*, 73, 962-964.
- Caldwell, K.L., Mortensen, M.E., Jones, R.L., Caudill, S.P. & Osterloh, J.d. (2009). "Total blood mercury concentrations in the U. S. population: 1999-2006". *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 1-11.
- Cámara, R. C. & Madrid, A. Y. (2005). "Acumulación-interacción de especies de mercurio y selenio en tejidos animales: Desarrollo de nuevas metodologías de análisis", Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Analítica, Madrid, España.
- Castilhos, Z.C., Rodrigues-Filho, S., Rodrigues, A.P.C., Villas-Bôas, R.C., Siegel, S., Veiga, M.M. & Beinhoff, C. (2006). Mercury contamination in fish from gold mining areas in Indonesia and human health risk assessment. *Science of the Total Environment*, 368, 320-325.
- Chen, C. L., Qu, B., Li, L., Xing, G., Jia, T., Wang, Y., Gao, P., Zhang, M., Li, W., Chen Y.Z. & Chai. (2005). "Increased oxidative DNA damage, as assessed by urinary 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine concentrations and serum redox status in persons exposed to mercury". *Clinical Chemistry*, 51(4), 759-767.
- Colina, M.N., Gardiner, P.H.E., Rivas, Z. & Troncone, F. (2011). "Mercury Speciation in Lake Maracaibo, Venezuela, Using Reversed Phase HPLC and ICP-MS", *Atomic Spectroscopy*, 32, 1-11.
- Fernández, S. (2017). Nuevos materiales para la especiación de mercurio: biotransformación de metales en organismos modelo. Tesis Doctoral, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, ESPAÑA. <http://eprints.ucm.es/45630/1/T39427.pdf>.
- Florez, J., Armijo, J.A. & Mediavilla, A. (1997). *Farmacología Humana*, 3era edición, Masson, S.A., Barcelona, España, pp 1007-1014.
- Galignani, M., Bahsas, M.R., Brunetto, M.R., 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". *Analytica Chimica Acta*, 369, 57-67.
- Granadillo, M. (2009). "Desarrollo metodológico para la especiación de metales en muestras de sangre de pacientes con Leucemia o Linfoma", Tesis Doctoral, Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Departamento de Química, Laboratorio de Instrumentación Analítica y Química Ambiental, Maracaibo, pp 37.
- Harper, H. (1966). *Manual de Química Fisiológica*, 1era edición, El manual moderno, S.A., México 11, D.F, pp 145.
- Hursh, J.B., Clarkson, T.W., Cherian, M.G., Vostal, J.V. & Mallie, R.V. (1976). "Clearance of mercury (Hg-197, Hg-203) vapor inhaled by human subjects". *Archives of Environmental & occupational Health*, 31, 302-309.
- Issaro, N., Abi-Ghanem, C. & Bermond, A. (2009). "Fractionation studies of mercury in soils and sediments: A review of the chemical reagents used for mercury extraction", *Analytica Chimica Acta*, 631, 1-12.
- Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P. & Horvat, M. (2005). "Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation", *TrAC Trends Analytical Chemistry*, 24 (5), 383-393.
- Li, Y., Chen, C., Li, B., Li, W., Qc, L., Dong, Z., Nomura, M., Gao, Y., Zhao, J., Hu, W., Zhao, Y. & Chai, Z. (2008). "Mercury in human hair and blood samples from people living in Wanshan mercury mine area, Guizhou, China: An XAS study", *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102, 500-506.

Determinación de los Niveles de Mercurio en Sangre y Plasma de Pacientes con Leucemia

- Marcano, V. & Troconis, A.R. (2001). "Evaluación del contenido de mercurio en el pescado expendido en la ciudad de Mérida, Venezuela". *Revista de Ecología Latinoamericana*, 8(2), 15-24.
- Mckenzie, S.B. (2000). *Hematología Clínica*, 2da edición, México: Editorial El Manual Moderno S.A., pp 3,4.
- Miller, J.N. & Miller, J.C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4ta edición, Prentice Hall, Madrid, España, pp 44-46, 126.
- Monperrus, M., Tessier, E., Veschambre, S., Amouroux, D. & Donard. O. (2005). Simultaneous speciation of mercury and butyltin compounds in natural waters and snow by propylation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 381, 854-862.
- Morales, I. & Reyes, R. (2003). "Mercurio y salud en la odontología". *Revista de Saúde Pública*, 37, 266-272.
- Nash, M. & McSheehy, S. (2007). Isotopic Analysis, Laboratoire de Chimie-Analytique, BioInorganique et Environnement, University of Pau, France. The Speciation of Mercury in Biomedical and Environmental Samples using HPLC coupled to the XSERIES 2 ICP-MS, Part of Thermo Fisher Scientific, Application note: 40782.
- Nixon, D.E., Burritt, M.F. & Moyer, T.P. (1999). "The determination of mercury in whole blood and urine by inductively coupled plasma mass spectrometry", *Spectrochimica Acta Part B*, 54, 1141-1153.
- Organización Mundial de la salud (OMS). (2013). Efectos de la exposición al mercurio en la salud de las personas que viven en comunidades donde se practica la minería aurífera artesanal y en pequeña escala. Ginebra, Suiza. http://www.who.int/ipcs/assessment/public_health/mercury_asgm_es.pdf
- Ortega, M.A., Osnaya, M.L. & Rosas, J.V. (2007). "Leucemia linfoblástica aguda". *Medicina Interna de México* 23, 26-33.
- Rodrigues, J.L., De Souza, S.S., De Oliveira, V.C. & Barboza, F. (2009). "Methylmercury and inorganic mercury determination in blood by using liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry and a fast sample preparation procedure". *Talanta*, 1-6.
- Rosen, A. L. & Hieftje, G. M. (2004). "Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation". *Spectrochimica Acta, Part B*, 59, 135-146.
- Silva, I., J. Nyland, A. Goman, A. Perisse, A. Ventura, C. Santos, J. De Souza, C. Bureo, N. Rose Y E. Silbergeld. (2004). "Mercury exposure, malaria, and serum antinuclear/antinucleolar antibodies in amazon populations in Brazil: a cross-sectional study". *Environmental Health*, 3 (11), 1–12.
- Son, J., Lee, J., Paek, D. & Lee, J. (2009). "Blood levels of lead, cadmium, and mercury in the Korean population: Results from the Second Korean National Human Exposure and Bio-monitoring Examination", *Environmental Research*, 109, 738-744.
- Vesterberg, O. (1991). "Automatic method for quantitation of mercury in blood, plasma and urine", *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 23, 227-235.
- Vupputuri, S., Longnecker, M., Daniels, J.L., Guo, X. & Sandler, D.P. (2005). "Blood mercury level and blood pressure among US women: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2000", *Environmental Research*, 97, 195-200.
- Wilhelm, M., Muller F. & Idel, H. (1996). "Biological monitoring of mercury vapour exposure by scalp hair analysis in comparison to blood and urine". *Toxicology Letters*, 88, 221-226.