

Control de la concentración de metilmercurio en productos pesqueros para el consumo humano mediante el empleo de polímeros de impronta molecular y de nanopartículas derivatizadas

Control of the methylmercury concentration in fish and seafood products for human consumption using molecularly imprinted polymers (MIPs) and derivatized nanoparticles

Rodríguez Fernández R, Peña Vázquez E, Moreda Piñeiro A, Bermejo Barrera P

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Química, Universidad de Santiago, Santiago de Compostela, A Coruña, España.

Esta investigación ha sido financiada por FUNDACIÓN MAPFRE

Resumen

Objetivo: Desarrollar un polímero de impronta molecular para la determinación de metilmercurio en muestras de alimentos de origen marino.

Material y métodos: Se sintetizó un polímero de impronta molecular (MIP) que emplea fenobarbital como ligando no vinilado para unirse al metilmercurio. Se utilizó la técnica de polimerización por precipitación. El MIP sintetizado fue empleado para funcionalizar nanopartículas magnéticas con el fin de mejorar el proceso de extracción del metilmercurio de las muestras.

Resultados: El MIP con fenobarbital fue aplicado para la determinación de la concentración de metilmercurio en dos materiales de referencia de concentración certificada para el análisis de muestras de alimentos marinos (BCR-463, tejido de atún, y TORT-2, hepatopáncreas de langosta). Los valores de concentración experimentales obtenidos fueron de $3,04 \pm 0,16 \mu\text{g/g}$ y $0,152 \pm 0,013 \mu\text{g/g}$ respectivamente, coincidiendo con los valores certificados de forma estadísticamente significativa (test t, 95% confianza).

Conclusiones: Se ha sintetizado un MIP para la determinación de la concentración de metilmercurio a bajas concentraciones en muestras de alimentos de origen marino.

Palabras clave:

Metilmercurio, polímero impronta molecular, atún, extracción selectiva.

Abstract

Objective: The development of a molecularly imprinted polymer support for methylmercury determination in fish and seafood samples.

Materials and methods: A molecularly imprinted polymer was synthesized using the precipitation technique and phenobarbital as a non-vinylated ligand for binding methylmercury. The synthesized MIP was used for the functionalization of magnetic nanoparticles in order to improve the process of methylmercury extraction from the samples.

Results: The MIP prepared with phenobarbital was applied to the determination of methylmercury concentration in two certified reference materials used for fish and seafood samples analysis (BCR-463, tuna fish, and TORT-2, lobster hepatopancreas). The experimental values ($3.04 \pm 0.16 \mu\text{g/g}$ and $0.152 \pm 0.013 \mu\text{g/g}$ respectively) and the certified values showed no statistically significant difference (t test, 95% confidence level).

Conclusions: We have synthesized a MIP for determining methylmercury in fish and seafood samples at low concentrations.

Key words:

Methylmercury, molecularly imprinted polymer, tuna fish, selective extraction.

Correspondencia

P Bermejo Barrera
Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Avda. das Ciencias s/n, Santiago de Compostela, 15782 A Coruña, España

I Introducción

Los niveles de mercurio en el medio ambiente debido a la actividad humana han aumentado considerablemente en los últimos años debido a procesos como la utilización de combustibles fósiles, la minería o la incineración de residuos. El mercurio tiene gran facilidad para formar especies orgánicas en los medios naturales, siendo éstas las más peligrosas debido a su elevada toxicidad. Una de estas especies, el metilmercurio, es generada en los medios naturales por acción microbiana o por el metabolismo de los organismos marinos, con una mayor acumulación en los animales de mayor tamaño, como es el caso del atún o el pez espada. Al tratarse de una especie liposoluble, sortea fácilmente la barrera hematoencefálica y actúa como un potente neurotóxico, afectando principalmente al sistema nervioso central. Adicionalmente, existen evidencias crecientes de que los sistemas cardiovascular e inmunológico también pueden ser afectados. El metilmercurio se absorbe posiblemente como cloruro de metilmercurio en el tracto intestinal, por inhalación o a través de la piel. La intoxicación provoca inicialmente ataxia, dificultades en la audición y el habla, y constricción del campo visual. En casos extremos conduce al coma y a la muerte [1]. La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) ha desaconsejado el consumo de atún y pez espada por parte de embarazadas y niños menores de tres años [2]. Por todo ello, la peligrosidad del metilmercurio a muy bajas concentraciones pone de manifiesto la necesidad de desarrollar un método sensible y selectivo para su determinación en muestras de alimentos marinos.

De entre todos los métodos de extracción y determinación de mercurio y metilmercurio, la extracción en fase sólida empleando polímeros de impronta molecular (MIP-SPE) como sorbentes altamente selectivos, nos permite analizar concentraciones bajas debido a su capacidad para preconcentrar las especies de interés al mismo tiempo que eliminamos posibles interferencias para la determinación. La técnica de la impronta molecular se basa en la preparación de un polímero altamente entrecruzado alrededor de un analito «plantilla», en presencia de un monómero adecuado. A continuación, se realiza la polimerización en presencia de un entrecruzante. Por último, el polímero debe ser sometido a un proceso de limpieza para eliminar el analito de las cavidades formadas, que serán capaces, posteriormente, de retener selectivamente el analito en una muestra compleja [3]. El objetivo de nuestro trabajo es desarrollar un polímero de impronta molecular para la determinación de metilmercurio en muestras de alimentos de origen marino.

I Material y métodos

Para la síntesis del polímero se empleó cloruro de metilmercurio (Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.), fenobarbital (Sigma-Aldrich, Steinhelm, Alemania), ácido metaacrílico (Sigma-Aldrich, Steinhelm, Alemania), etilenglicoldimetacrilato (Sigma-Aldrich, Steinhelm, Alemania), 2,2' azobisisobutironitrilo (Fluka, Steinhelm, Alemania), acetónitrilo (Scharlau, Barcelona, España), tolueno (Scharlau, Barcelona, España) y tiourea (Sigma-Aldrich, Steinhelm, Alemania). Además se han utilizado nanopartículas de óxido de hierro (Fe_3O_4) y PEG-6000 (Sigma-Aldrich, Steinhelm, Alemania). Los materiales de referencia certificados utilizados para comprobar la exactitud del método fueron el BCR-463 (tejido de atún) (Community Bureau of Reference BCR, Bruselas, Bélgica) y el TORT-2 (hepatopáncreas de langosta) (National Research Council, Ottawa, Canadá).

Para la síntesis polimérica se empleó una incubadora de temperatura controlable (JP-Selecta, Barcelona, España) y un Roller Movil-Rod® (JP-Selecta, Barcelona, España) para agitación. Para la determinación de la concentración de metilmercurio de las muestras se empleó un equipo de absorción atómica de fuente continua de alta resolución ContrAA® 300 acoplado a un sistema de generación de vapor frío (CV-HRCSAAS) (Analytik Jena, Jena, Alemania). Para la caracterización de los polímeros sintetizados se emplearon los siguientes instrumentos: un analizador elemental Flash 1112 (Termo Finnigan, Waltham, EE.UU.), un analizador elemental EA 1108 (Carlo Erba, Milán, Italia), un espectrómetro de fluorescencia de rayos X con ánodo de molibdeno y otro con ánodo secundario de pirografito y hierro, de manufactura propia de la Universidad de Santiago de Compostela, un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo FESEM Ultra Plus (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y un espectrómetro FT-IR-UATR Spectrum Two (PerkinElmer, Waltham, EE.UU.).

Para la síntesis del polímero de impronta molecular se utilizó cloruro de metilmercurio como plantilla, fenobarbital como ligando para formar el complejo con el metilmercurio, ácido metaacrílico (MAA) como monómero y etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) como entrecruzante. Como disolvente de polimerización se empleó una mezcla de acetónitrilo y agua. La polimerización se llevó a cabo bajo agitación lenta a 60° C durante 24 horas. Para el polímero blanco o NIP, el procedimiento de síntesis fue el mismo pero sin añadir la plantilla de metilmercurio. Las masas de reactivos utilizadas en la síntesis de estos polímeros se muestran en la Tabla 1. Antes de poder emplear el MIP para realizar la extracción, la plantilla de metilmercurio tuvo

Tabla 1. Cantidades de reactivos para sintetizar el MIP de fenobarbital y masa de polímero obtenida

	Plantilla (MeHg ⁺)	Ligando (Fenobarbital)	Monómero (MAA)	Entrecruzante (EGDMA)	Iniciador (AIBN)	Masa Polímero
MIP	18,3 mg	61 mg	51,2 µL	365 µL	43,3 mg	1,7915 g
NIP	-	61 mg	51,2 µL	365 µL	43,3 mg	1,5129 g

que ser eliminada de la matriz polimérica, pasando una disolución concentrada acuosa de tiourea y ácido clorhídrico a través del cartucho en un proceso que se denomina sangrado. Una vez sangrado el polímero, el cartucho quedó listo para realizar la SPE.

Extracción del MeHg⁺

Para liberar el metilmercurio de los productos pesqueros se realizó una extracción en medio orgánico (tolueno), utilizando un método desarrollado a partir del Kwasiak *et al.* [4]. Porciones de 200 mg de cada muestra se llevaron a tubos de centrifuga. Cada porción se lavó primero con acetona, y después se le añadieron 2,5 mL de HCl 6M y 2,5 mL de tolueno. Los tubos se colocaron en un baño de ultrasonidos durante 30 minutos a 60° C y los extractos se centrifugaron otros 30 minutos a 3.500 rpm a temperatura ambiente. La fracción orgánica se recogió, se repitió la extracción con otros 2,5 mL de tolueno y finalmente se juntaron los extractos.

MIP-SPE

Para la extracción del metilmercurio en fase sólida (SPE) se empaquetó una porción de MIP (150 mg) en un cartucho. El extracto orgánico obtenido previamente a partir de la muestra de alimento se hizo pasar a través del cartucho, previamente acondicionado al pH adecuado (8,5), a un flujo bajo (0,5 mL/min), produciéndose la retención del metilmercurio en el MIP empaquetado. Tras la carga de la muestra, el metilmercurio fue eluido del cartucho con una disolución de tiourea acidificada.

Resultados

En los experimentos preliminares a la síntesis del polímero se realizaron experimentos con distintos agentes complejantes para evaluar su capacidad de retención y su afinidad por el mercurio inorgánico y el metilmercurio. Los ligandos seleccionados para el estudio fueron el amonio pirrolidín ditiocarbamato (APDC), el ditiocarbamato (DDTC), el EDTA, el fenobarbital y la ditizona. Se realizaron extracciones (en duplicado) líquido-líquido en cloroformo empleando patrones de Hg(II) y metilmercurio

(MeHg⁺) para poder comparar el poder complejante con respecto a las dos especies.

Asumiendo que el complejo entre el ligando y el mercurio pasa a la fase orgánica, se analizaron las fases acuosas para comprobar qué cantidad de mercurio o metilmercurio quedaba sin complejar (a menor cantidad en la fase acuosa, mayor retención por parte del ligando). Los resultados indicaron que el fenobarbital extrae el metilmercurio a un nivel similar a la ditizona, pero extrae peor el Hg(II). Es decir, es más selectivo para el metilmercurio que la ditizona (Figura 1).

Tras la selección del fenobarbital se repitió el experimento sólo para este ligando, tamponando la fase acuosa a diferentes pHs entre 4,5 y 10,5. De nuevo se analizó la cantidad de mercurio que no quedaba retenida y que permanecía en la fase acuosa, dando como resultado que la mayor retención por parte del fenobarbital se produce a un pH en torno a 8,5 (Figura 2).

Síntesis del polímero de impronta molecular

El MIP de fenobarbital se sintetizó utilizando el método de precipitación según el procedimiento experimental detallado con anterioridad. Las masas de polímero obtenidas

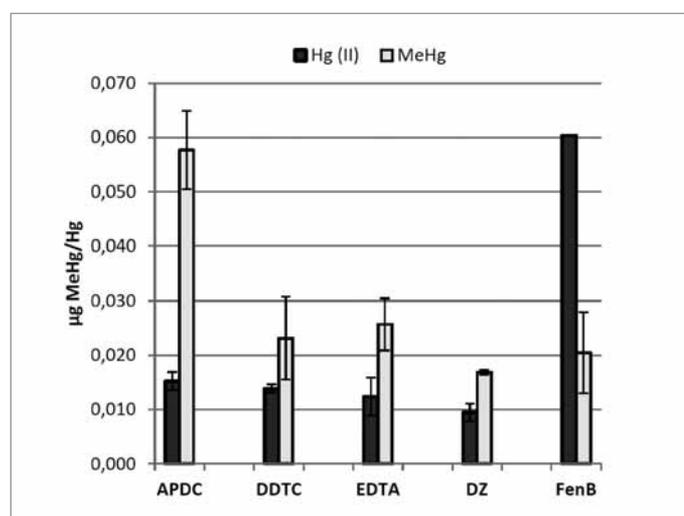


Fig. 1. Evaluación de la eficacia de diferentes complejantes para Hg(II) y MeHg⁺ (µg de Hg no retenidos).

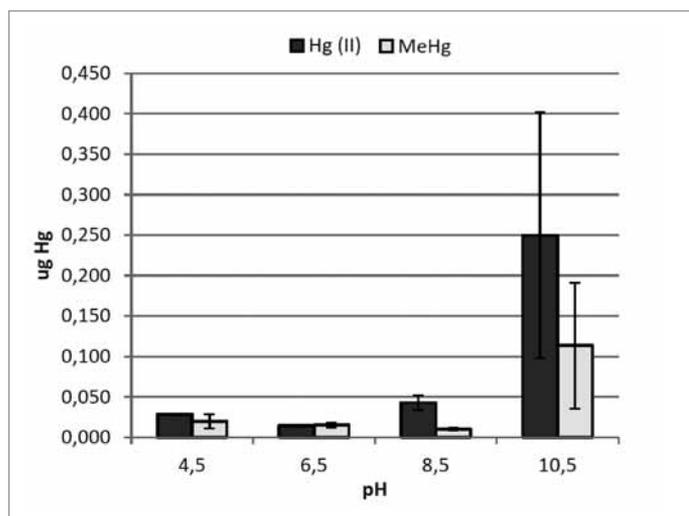


Fig. 2. Eficacia de extracción de Hg(II) y MeHg⁺ para el fenobarbital a diferentes pH (µg no retenidos).

para el MIP que empleaba fenobarbital como complejante del metilmercurio y el NIP se muestran en la Tabla 1. Las diferencias entre uno y otro podrían deberse a diferencias en el grado de hidratación tras el proceso de secado en estufa.

Caracterización del MIP de fenobarbital

El polímero sintetizado fue caracterizado mediante distintas técnicas: análisis elemental (Tabla 2), espectroscopia infrarroja, fluorescencia de rayos X (XFR) y microscopía electrónica de barrido. Los espectros de fluorescencia permitieron observar la presencia del mercurio en la matriz polimérica del MIP y cómo se elimina en la etapa de sangrado (Figura 3). Las imágenes de microscopía muestran las diferencias en la morfología entre el MIP de fenobarbital y el NIP o polímero blanco, sintetizado sin la presencia de la plantilla de metilmercurio (Figura 4). Estas diferencias en cuanto a porosidad podrían deberse al distinto grado de hidratación. En cuanto a los espectros infrarrojos, no se observaron diferencias significativas entre los espectros de MIP, MIP sangrado y NIP.

Tabla 2. Análisis elemental del MIP de fenobarbital

Elemento	MIP fenobarbital	MIP fenobarbital (sangrado)
Nitrógeno	57,19%	55,26%
Carbono	7,42%	7,23%
Hidrógeno	0,62%	0,74%
Azufre	-	2,08%
Oxígeno	21,18%	20,92%

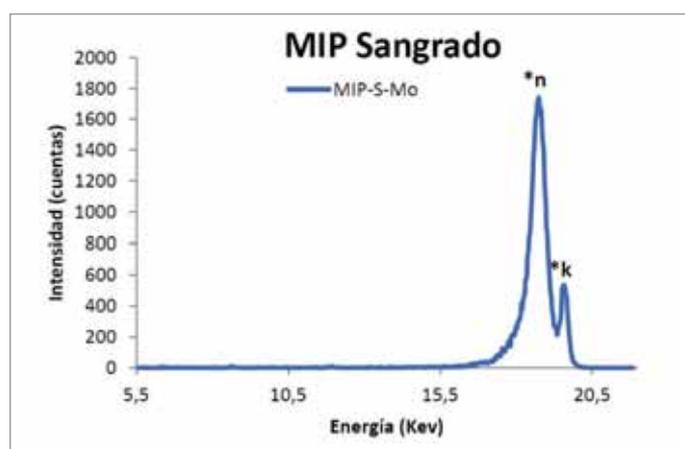
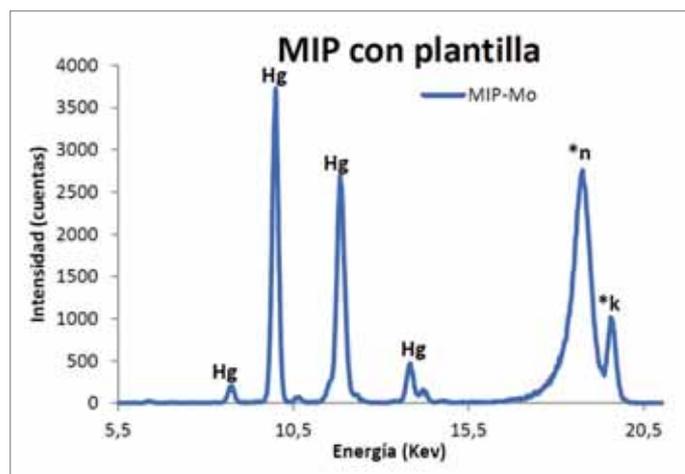


Fig. 3. Espectros XRF del MIP de fenobarbital con plantilla de MeHg⁺ y sangrado.

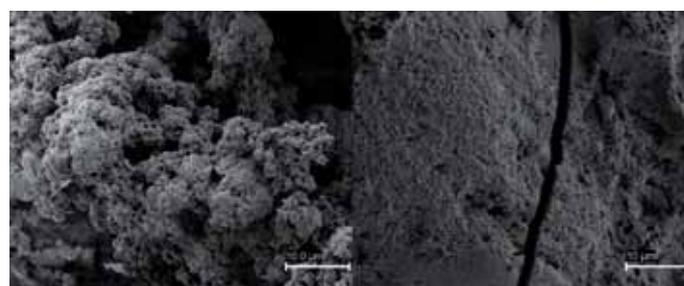


Fig. 4. Micrografías del MIP de fenobarbital (izquierda) y el NIP (derecha).

Determinación de metilmercurio en materiales de referencia certificados

Los resultados de la medida de los extractos obtenidos en triplicado a partir de los materiales de referencia analizados se muestran en la Tabla 3. El material de referencia BCR-463, se trata de una muestra de tejido de atún liofilizado en el que la práctica totalidad del mercurio se encontraba como metilmercurio. Sin embargo, el material TORT-2 era

Tabla 3. Comparación entre los valores de concentración obtenidos para los materiales de referencia y sus valores certificados

Material de referencia	Valor certificado ($\mu\text{g/g}$)	MIP fenobarbital ($\mu\text{g/g}$)
BCR-463 (músculo de pescado)	$3,04 \pm 0,16$	$3,14 \pm 0,20$
TORT-2 (hepatopáncreas de langosta)	$0,152 \pm 0,013$	$0,155 \pm 0,006$

Tabla 4. Cantidades de reactivo añadidas y masa obtenida de nanopartículas derivatizadas (NMIP)

	Plantilla (MeHg ⁺)	Ligando	Monómero (MAA)	Entrecruzante (EGDMA)	Iniciador (AIBN)	NPs funcionalizadas (Fe ₃ O ₄ -PEG)	Masa de polímero
NMIP fenobarbital	9,15 mg	30,5 mg	25,6 μL	233,5 μL	21,65 mg	250 mg	316,9 mg

una muestra de hepatopáncreas de langosta con un contenido en mercurio total de $0,27 \pm 0,06 \mu\text{g/g}$, es decir, solamente el 55% es metilmercurio. Mediante el método desarrollado, se pudo diferenciar, por tanto, entre concentración de metilmercurio y mercurio total.

Síntesis de nanopartículas magnéticas funcionalizadas con polímeros de impronta molecular

Una vez obtenido el polímero de impronta molecular, se utilizó para el desarrollo de un nuevo método de extracción en fase sólida empleando nanopartículas magnéticas funcionalizadas con dicho polímero. La utilización de nanopartículas nos permitió trabajar con partículas esféricas más regulares y de menor tamaño, aumentando el área superficial y, por tanto, la capacidad de absorción de las mismas, además de lograr mayor reproducibilidad entre réplicas.

Las nanopartículas funcionalizadas con MIPs (NMIPs) se sintetizaron siguiendo la técnica descrita por Hu *et al.* [5]. En tubos de vidrio se introdujeron las cantidades correspondientes de fenobarbital y metilmercurio como molécula plantilla. Sobre la mezcla sólida se añadieron 6 mL de dimetilformamida (DMF) como disolvente y se agitó hasta una disolución completa. Por último, se añadió el monómero (MAA) y se conservó la mezcla en oscuridad 12 horas. Pasado este tiempo, se añadió la mezcla anterior sobre una disolución acuosa de nanopartículas funcionalizadas con polietilenglicol (PEG), formándose una emulsión entre la fase orgánica y la acuosa en la que se produjo la polimerización. Se agregó el entrecruzante (EGDMA) y el iniciador (AIBN) y se colocó el recipiente en un baño de ultrasonidos durante 4 horas a 60° C.

También se sintetizaron nanopartículas con polímero blanco NIP, con idéntico procedimiento pero sin añadir la

plantilla de metilmercurio. Las masas obtenidas de NMIPs se muestran en la Tabla 4. Al igual que ocurre con el MIP libre, las nanopartículas funcionalizadas tienen que ser sometidas a un proceso de sangrado para eliminar la plantilla de metilmercurio. En este caso ha de controlarse la disolución del extractante, ya que las nanopartículas de hierro se disuelven en un medio elevadamente ácido. Se seleccionó una mezcla de tiourea 1M en ácido acético al 20% y metanol al 50% como disolución extractante, consiguiendo la eliminación prácticamente completa del metilmercurio de la matriz (Figura 5). Los experimentos preliminares con estas nanopartículas derivatizadas son prometedores pero se deben optimizar los parámetros de la carga y elución, tales como el tiempo de agitación o el pH de la muestra, además de tratar de mejorar el procedimiento para la eliminación de la plantilla. Una vez optimizado el proceso, el siguiente paso sería la aplicación a muestras reales de pescados y moluscos.

Discusión

Los polímeros sintetizados para la determinación de mercurio suelen emplear ligandos que poseen átomos de azufre en su estructura, por la facilidad para unirse al mercurio. Se ha determinado mercurio inorgánico en aguas utilizando MIPs sintetizados mediante polimerización por dispersión empleando un tiazol como ligando [6] o en muestras de suero con MIPs sintetizados a partir de derivados de la cisteína [7]. Otros trabajos que emplean esta técnica de polimerización para determinar mercurio en muestras acuosas realizan la polimerización sobre superficies o sílice modificada [8][9]. En el caso de la especie metilmercurio, se han empleado los MIPs sintetizados por precipitación para el análisis de muestras de suelo o pelo humano [10], y los sintetizados por dispersión para el análisis de muestras de agua de mar [11].

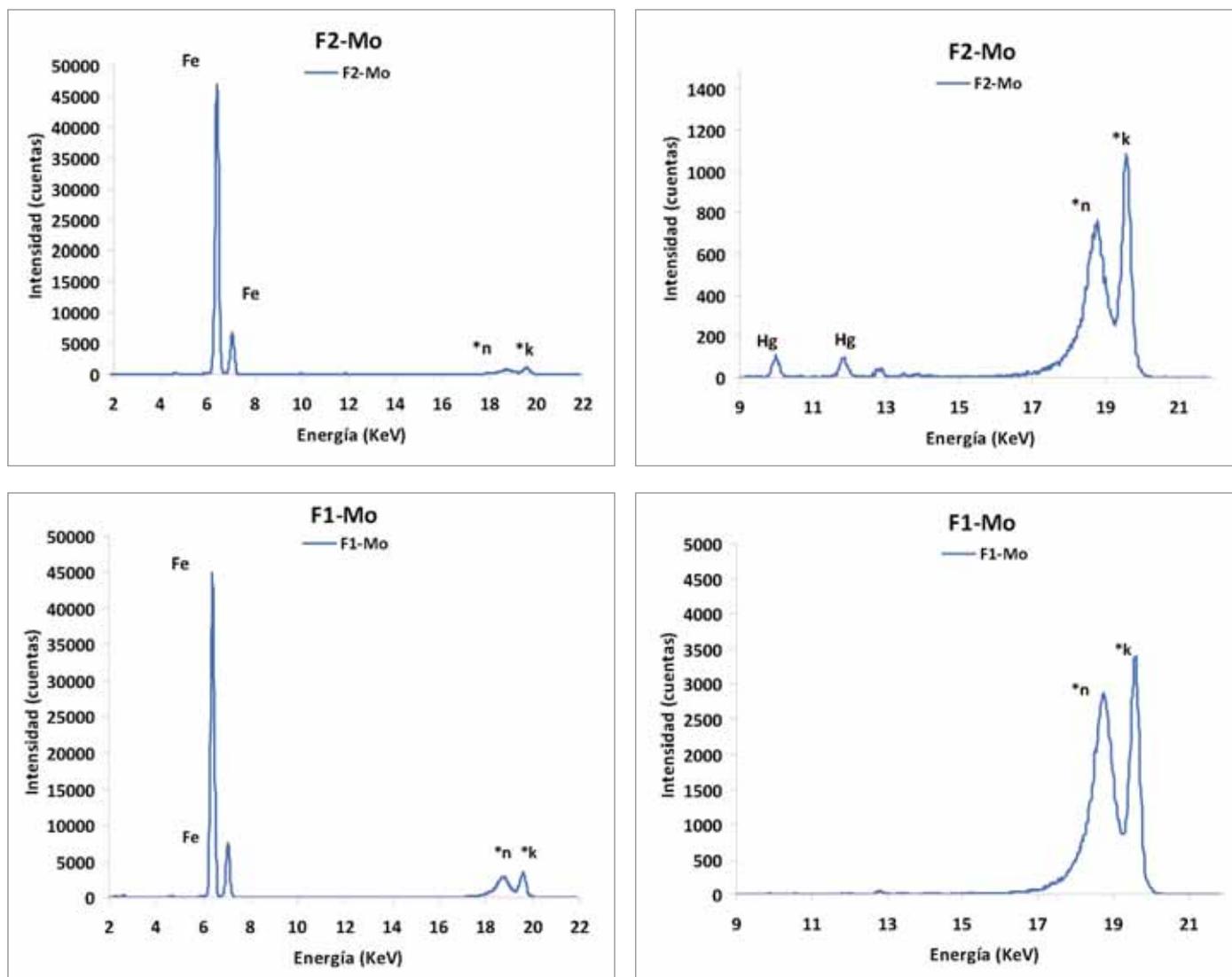


Fig. 5. Espectros XRF de las nanopartículas magnéticas funcionalizadas con el MIP de fenobarbital sangrado (F1) y con plantilla (F2). En los espectros de la derecha se observa la desaparición de la señal correspondiente al Hg.

Otros trabajos recogidos en la bibliografía también estudian la determinación de metilmercurio y principalmente mercurio inorgánico mediante la utilización de nanopartículas metálicas. Así, las nanopartículas de plata y especialmente de oro derivatizadas se utilizan para la determinación colorimétrica [12-16], y los *quantum dots* (nanopartículas semiconductoras) para la detección fluorimétrica [17-19]. Las nanopartículas magnéticas, principalmente de óxido de hierro, y derivatizadas con MIPs aumentan la capacidad de extracción del analito de la disolución, simplificando los métodos de SPE, y han sido utilizadas para la posterior determinación de mercurio mediante técnicas atómicas [20][21].

El polímero de fenobarbital es el segundo que se sintetiza en este grupo de investigación para la determinación de

MeHg⁺. Anteriormente se había desarrollado un MIP que empleaba ditizona como ligando y 4-vinilpiridina como monómero, el cual se basaba principalmente en anteriores trabajos sobre polímeros de impronta iónica para el níquel, como los realizados por Otero *et al.*, [22] y Saraji *et al.*, [23]. El polímero que emplea el fenobarbital se basó en los métodos tradicionales colorimétricos para la determinación de barbitúricos y en los MIPs sintetizados para la determinación de este fármaco [24-27].

Con este nuevo polímero, se han conseguido mejorar algunas de las características del procedimiento de SPE desarrollado que utilizaba el MIP de ditizona. La síntesis del MIP de ditizona generaba partículas más grandes e irregulares, impidiendo empaquetar correctamente el mismo en cartuchos y

que con éstos se pudiesen obtener resultados reproducibles. Tanto la eliminación de la plantilla de metilmercurio como la SPE se tenía que realizar en modo discontinuo (modo *batch*), el cual, a pesar de lograr resultados precisos y exactos, es un método que necesita de unas etapas de filtrado y recuperación del MIP que resultan lentas y tediosas, además de la inevitable pérdida de masa de polímero en cada uno de los ciclos. El modo *batch* consiste en añadir una cantidad conocida de polímero a la disolución de la que se quiere extraer el analito. Tras la extracción es necesario recuperar las partículas de polímero mediante filtración. El modo cartucho del MIP de fenobarbital evita estas etapas de filtrado, no se producen pérdidas de polímero y se acortan los procesos de sangrado, carga y elución, pudiéndose además controlar los flujos de muestra o eluyente que pasan a través del cartucho mediante la bomba peristáltica acoplada. La posibilidad de hacer la SPE tanto de muestras acuosas como en disolventes orgánicos con recuperaciones próximas al 100% aporta versatilidad a la hora de tratar diferentes tipos de muestras y extractos. La principal ventaja de la carga de los MIPs con la fase orgánica radica en que, habitualmente, al realizarse una extracción de este tipo de analitos con tolueno, éstos necesitan ser separados y determinados mediante cromatografía de gases [28], o si no realizar una nueva etapa de reextracción a fase acuosa, con el fin de determinar estas especies por absorción atómica [20].

La novedad con respecto a otros trabajos sobre polímeros de impronta molecular para la determinación de MeHg⁺ es que se ha conseguido aplicar los MIPs para metilmercurio al modo columna. Büyüktiryaki *et al.*, [11] realizan todos los experimentos utilizando el modo *batch* y Liu *et al.* [10] nombran el modo en columna pero realiza casi todos los experimentos en modo *batch*, lo que da a entender que los resultados en modo columna no fueron del todo satisfactorios.

El pH óptimo para la extracción en fase sólida del MIP sintetizado es de 8,5. Es ligeramente superior al de los otros trabajos anteriores, ya que el polímero sintetizado por Büyüktiryaki *et al.* [11], utilizando metacrililoil-(L)-cisteína metilester (MAC) como agente complejante, tiene su máximo de adsorción a pH 7,0. No podemos observar si se produce una caída en la retención del polímero a pHs más básicos debido a que solo evalúa la retención hasta pH 8. El MIP desarrollado por Liu tiene ese máximo a pH 5, utilizando en este caso 4-etenilfenil-4-formato-6-fenil-2,2'-bipiridina como ligando, aunque la retención se mantiene estable en el intervalo de pH 4-6.

El método de polimerización por precipitación utilizado en este trabajo es más sencillo que la polimerización por

dispersión empleada en los trabajos anteriormente citados, así como el método de extracción de la plantilla. Liu *et al.* [10], por ejemplo, tratan el polímero sintetizado en una disolución de tiourea 1M en HCl 6M durante 48 horas y calentando a 60° C, mientras que el sangrado completo de las jeringas del MIP de fenobarbital se consigue en un período de 3-4 horas. A pesar de que este polímero ha sido sintetizado preferentemente con el objetivo de aplicarlo al análisis de muestras de productos pesqueros, en vista de su versatilidad (puede emplearse con muestras acuosas o extractos orgánicos), podría utilizarse para la determinación de metilmercurio en otras matrices diferentes, y por tanto destinarse al análisis de, por ejemplo, aguas naturales o residuales, muestras de sedimentos y suelos (MSPD) [29]. ■

Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a FUNDACIÓN MAPFRE por la financiación de la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Casas JS. Química bioinorgánica. Madrid: Síntesis; 2002.
2. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/rincon_consumidor/s_ubseccion/mercurio_pescado.shtml. Último acceso: 12/06/2014.
3. Sellergren B. Molecularly imprinted polymers: Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry. Germany: Elsevier; 2001.
4. Kwásniak J, Falkowska L, Kwásniak M. The assessment of organic mercury in Baltic fish by use of an in vitro digestion model. Food Chem 2012; 132:752-758.
5. Hu Y, Li Y, Liu R, Tan W, Li G. Magnetic molecularly imprinted polymer beads prepared by microwave heating for selective enrichment of β -agonists in pork and pig liver samples. Talanta 2011; 84:462-70.
6. Dakova I, Karadjova I, Georgieva V, Georgiev G. Ion-imprinted polymethacrylic microbeads as new sorbent for pre-concentration and speciation of mercury. Talanta 2009; 78:523-9.
7. Andaç M, Mirel S, Senel S, Say R, Ersöz A, Denizli A. Ion-imprinted beads for molecular recognition based mercury removal from human serum. Int J Biol Macromol 2007; 40:159-66.
8. Güney O, Cebeci FC. Molecularly imprinted fluorescent polymers as chemosensors for the detection of mercury ions in aqueous media. J Appl Polym Sci 2010; 117:2373-9.

9. Wang Z, Wu G, He C. Ion-imprinted thiol-functionalized silica gel sorbent for selective separation of mercury ions. *Microchim Acta* 2009; 165:151-7.
10. Liu Y, Zai Y, Chang X, Guo Y, Meng S, Feng F. Highly selective determination of methylmercury with methylmercury-imprinted polymers. *Anal Chim Acta* 2006; 575:159-65.
11. Büyüktiryaki S, Say R, Denizli A, Ersöz A. Mimicking receptor for methylmercury preconcentration based on ion-imprinting. *Talanta* 2007; 71:699-705.
12. Knecht MR, Sethi M. Bio-inspired colorimetric detection of Hg²⁺ and Pb²⁺ heavy metal ions using Au nanoparticles. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394:33-46.
13. Lin Y, Huang C, Chang H. Gold nanoparticle probes for the detection of mercury, lead and copper ions. *Analyst* 2011; 136:863-71.
14. Zhang F, Zeng L, Yang C, Xin J, Wang H, Wu A. A one-step colorimetric method of analysis detection of Hg²⁺ based on an in situ formation of Au@HgS core-shell structures. *Analyst* 2011; 136:2825-30.
15. Ramesh GV, Radhakrishnan TP. A universal sensor for mercury (Hg, HgI, HgII) based on silver nanoparticle-embedded polymer thin film. *ACS Appl Mater Interfaces* 2011; 3:988-94.
16. Chang H, Hsiung T, Huang Y, Huang C. Using rhodamine 6G-modified gold nanoparticles to detect organic mercury species in highly saline solutions. *Environ Sci Technol* 2011; 45:1534-9.
17. Yuan C, Zhang K, Zhang Z, Wang S. Highly selective and sensitive detection of mercuric ion based on a visual fluorescence method. *Anal Chem* 2012; 84:9792-801.
18. Jaiswal A, Ghosh SS, Chattopadhyay A. Quantumdot impregnated-chitosan film for heavy metal ion sensing and removal. *Langmuir* 2012; 28:15687-96.
19. Wang Y, Liu Y, He X, Li W, Zhang Y. Highly sensitive synchronous fluorescence determination of mercury (II) based on the denatured ovalbumin coated CdTe QDs. *Talanta* 2012; 99:69-74.
20. Park M, Seo S, Lee IS, Jung JH. Ultraefficient separation and sensing of mercury and methylmercury ions in drinking water by using aminonaphthalimide-functionalized Fe₃O₄@SiO₂ core/shell magnetic nanoparticles. *Chem Commun* 2010; 46:4478-80.
21. Mehdinia A, Roohi F, Jabbari A. Rapid magnetic solid phase extraction with in situ derivatization of methylmercury in seawater by Fe₃O₄/polyaniline nanoparticle. *J Chromatogr A* 2011; 1218:4269-74.
22. Otero-Romaní J, Moreda-Piñeiro A, Bermejo-Barrera P, Martín-Esteban A. Synthesis, characterization and evaluation of ionic-imprinted polymers for solid-phase extraction of nickel from seawater. *Anal Chim Acta* 2008; 630:1-9.
23. Saraji M, Yousefi H. Selective solid-phase extraction of Ni(II) by an ion-imprinted polymer from water samples. *J Hazard Mater* 2009; 167:1152-7.
24. Hu S, Wang S, He X. An amobarbital molecularly imprinted microsphere for selective solid-phase extraction of phenobarbital from human urine and medicines and their determination by high-performance liquid chromatography. *Analyst* 2003; 128:1485-9.
25. Beltran A, Borrull F, Cormack PAG, Marcé RM. Molecularly imprinted polymer with high-fidelity binding sites for the selective extraction of barbiturates from human urine. *J Chromatogr A* 2011; 1218:4612-8.
26. Mohajeri SA, Ebrahimi SA. Preparation and characterization of a lamotrigine imprinted polymer and its application for drug assay in human serum. *J Sep Sci* 2008; 31:3595-602.
27. De Bruijn D. Quantitative barbiturate determination in urine and serum. *Clin Chim Acta* 1974; 53:385-8.
28. Marsálek P, Svobodová Z. Rapid determination of methylmercury in fish tissues. *Czech J Food Sci* 2006; 24:138-42.
29. Gañán J, Gallego-Picó A, Gacinuño RM, Fernández-Hernando P, Morante S, Sierra I, *et al.* Development of a molecularly imprinted polymer-matrix solid-phase dispersion method for selective determination of β -estradiol as anabolic growth promoter in goat milk. *Anal Bioanal Chem* 2012; 403:3025-9.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este trabajo. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.