



Universidad Nacional del Nordeste

**Facultad de Ciencia Exactas y Naturales y
Agrimensura**

**“Diseño de Metodologías para la
Determinación de Selenio y
Mercurio en Muestras de Interés
Ambiental Mediante
Espectrofotometría en Fase
Sólida”**

**Trabajo de Tesis Presentado por:
Bioq. (Esp.) Cecilia Laura De Asmundis**

**Para Optar al Grado de:
Doctor Especialidad Química**

Director: Dr. Francisco Antonio Vázquez

2014

PREFACIO

Esta tesis forma parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor especialidad Química de la Universidad Nacional del Nordeste. Contiene resultados obtenidos en las investigaciones realizadas en la Cátedra de Química Analítica, Laboratorio de Química Ambiental de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, bajo la dirección del Doctor Francisco Antonio Vázquez.

Bioq. (Esp). Cecilia Laura De Asmundis

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas, familia, amigos y compañeros, que de un modo u otro han mostrado su interés, cariño, apoyo y paciencia, durante estos años de trabajo. Gracias a todos ellos por contribuir a que esta tesis llegue a buen fin.

A mi director de tesis, el Dr. Francisco Vázquez, por depositar su confianza en mí, por sus consejos, su paciencia, por darme ánimos y serenidad cuando era necesario.

Al Dr. Gerardo Pellerano, Dr. Hugo Acevedo y al Lic. César Romero, un especial agradecimiento por su valioso apoyo durante toda esta etapa y por su predisposición para aclarar mis dudas, sus sugerencias, sus aportes y por hacerme notar que no debo ahogarme en un vaso con agua, sino aprender a nadar en él.

A la Dra. Silvia Rodríguez, por haber compartido conmigo toda esta aventura, por responder a todas mis preguntas y por sus aportes para enriquecer este camino.

A todo los integrantes de la Cátedra de Química Analítica, del Laboratorio de Química Ambiental y del Laboratorio de Análisis de Productos Apícolas por recibirme y siempre estar dispuestos a ayudarme.

A todos y cada uno de mis compañeros y compañeras de la Facultad de Ciencias Agrarias y de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura por sus constantes muestras de apoyo.

A la Dra. Laura Leiva, jamás podré agradecerle lo suficiente, y a todas las personas que forman parte de la Secretaría de Investigación y Posgrado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura, por lograr que esta tesis llegara a destino.

A la Secretaría General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste por los subsidios otorgados.

A mis padres, que siempre han estado ahí mostrándome su apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida. Por darme siempre ánimos y enseñarme a luchar por lo que quiero. Especialmente a mi madre Laura, hacia la que no tengo suficientes palabras de agradecimiento. De tanto escucharme, conoce este trabajo tan bien como yo. Te adoro! Gracias.

A mi hermano Leonardo, a mi cuñada Soledad y a mis hermosos sobrinos Alejandro y Rodrigo, por el amor que a diario me brindan, por apoyarme incondicionalmente, por ser la fuente de mis alegrías y por impulsarme a seguir adelante.

A Belén, Margarita, Marina, Verónica, Juan Pablo, Gonzalo y a todos mis amigos, que participaron directa o indirectamente en el desarrollo de este trabajo, por las risas compartidas, por sus sugerencias, por alentarme en todo momento, por sus consejos, por acompañarme en los momentos de tensión y también de calma, y sobre todo por formar parte de mi vida.

A todos GRACIAS

PRÓLOGO

Es un hecho probado la esencialidad del selenio como micronutriente, destacándose sus funciones biológicas, antioxidantes y catalíticas. Es un elemento indispensable para el adecuado funcionamiento del sistema inmune y su ingesta podría estar asociada con la disminución del riesgo de padecer cáncer. Sin embargo, existe una brecha muy pequeña entre el consumo diario recomendado (entre 55 y 100 microgramos diarios) y los niveles tóxicos (ingestas mayores a 400 microgramos), teniendo en cuenta el aumento de la actividad antropogénica y la existencia de plantas acumuladoras de selenio.

La contaminación por mercurio no es de reciente data, ya en el año 1956 se manifestó la principal contaminación de mercurio en Japón que es conocida como el "desastre de Minamata", principalmente como consecuencia de la actividad humana, lo que constituye un riesgo tanto medioambiental como de salud pública. Es un elemento cuyo comportamiento en el ambiente es particularmente interesante y preocupante, debido a las posibilidades de volatilización y metilación. Así, puede encontrarse en una gran variedad de formas químicas siendo las más tóxicas los compuestos orgánicos, especialmente por su posibilidad de bioacumulación a lo largo de la cadena trófica.

Estos analitos se encuentran en muy bajos niveles de concentración en el medio ambiente. Por ello, se requiere disponer de una metodología analítica adecuada que combine un tratamiento de muestra que preserve las especies, y un sistema que permita su detección a los bajos niveles de concentración en que se encuentran habitualmente.

En la actualidad existen técnicas y métodos fiables para la detección de estas especies, pero la principal limitante de todas esas técnicas es la necesidad de disponer de instrumentación e instalaciones de mediana o elevada complejidad, que a menudo limitan la implementación más allá del entorno de laboratorio formal. En este contexto la espectrofotometría en fase sólida adquiere relevancia como técnica simple y con niveles de detección lo suficientemente sensibles para la determinación de estos elementos.

Según todo lo anterior, el principal objetivo de esta tesis ha sido el desarrollo de un método analítico fiable y seguro, como es la espectrofotometría en fase sólida, para la determinación de selenio y mercurio aplicable a diferentes tipos de muestras medioambientales.

El método consiste en la fijación de una especie coloreada que contiene al analito, sobre un soporte sólido de características particulares. Una vez fijado el complejo coloreado se realizan medidas espectrales que facilitan la cuantificación del analito con niveles de detección adecuados. Como resultado se logra disponer de técnicas versátiles por lo que han sido utilizadas para medir una amplia gama de analitos, tanto de naturaleza orgánica como inorgánica.

Se proponen y estandarizan los parámetros necesarios para la determinación de selenio y su aplicación a muestras foliares, y para la determinación de mercurio y su aplicación a muestras de aguas, mediante la utilización de la espectrofotometría en fase sólida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I. Introducción y Objetivos

1.1. Introducción	1
1.1.1. Selenio	1
1.1.2. Mercurio	3
1.2. Objetivos	6
1.2.1. General	6
1.2.2. Específicos	6

CAPÍTULO II. Generalidades

2.1. Propiedades Generales del Selenio y sus Minerales	11
2.1.1. Historia	11
2.1.2. Propiedades Físico-Químicas	12
2.1.3. Producción y Usos Industriales	15
2.1.4. Distribución Ambiental del Selenio	17
2.1.4.1. Contaminación del Aire	17
2.1.4.2. Contaminación del Suelo	18
2.1.4.3. Contaminación del Agua	18
2.1.4.4. Ciclo del Selenio	19
2.1.5. Relevancia Biológica del Selenio	20
2.1.6. Toxicocinética del Mercurio	22
2.1.7. Efectos Toxicológicos	23
2.2. Propiedades Generales del Mercurio y sus Minerales	25
2.2.1. Historia	25
2.2.2. Propiedades Físico-Químicas	26
2.2.3. Producción y Usos Industriales	28
2.2.4. Distribución Ambiental del Mercurio	30

2.2.4.1. Contaminación del Aire	31
2.2.4.2. Contaminación del Suelo	32
2.2.4.3. Contaminación del Agua	32
2.2.4.4. Ciclo del Mercurio	34
2.2.5. Toxicocinética del Mercurio	36
2.2.6. Efectos Toxicológicos	37

CAPÍTULO III. Espectrofotometría en Fase Sólida

3.1. Espectrofotometría	49
3.2. Espectrofotometría en Fase Sólida	49
3.3. Soportes Sólidos	50
3.3.1. Tipos de Soportes Sólidos	51
3.3.1.1. Intercambiadores Derivados del Estireno	52
3.3.1.2. Intercambiadores Derivados del Dextrano	53
3.3.1.3. Otros Tipos de Soportes: Resinas Adsorbentes	54
3.4. Desarrollo de Color en el Soporte Sólido	55
3.5. Medidas de Absorbancia en EFS	56
3.6. Ventajas y Usos de la EFS	58
3.6.1. Metodología de Batch	58
3.6.2. Análisis por Inyección en Flujo (FIA)	58

CAPÍTULO IV. Diseño Experimental

4.1. Introducción	64
4.2. Factores y Respuesta en la Optimización Multivariable	64
4.3. Superficies de Respuesta para Dos Factores de Tratamiento	65
4.4. Modelos Polinomiales Aproximados	66
4.5. Experimentos Secuenciales para el Análisis de Respuesta	67
4.6. Identificación de Variables Significativas con Análisis Factorial	67
4.7. Método de Box-Behnken	68
4.8. Determinación del Punto Óptimo	70

4.8.1. Inspección de la Superficie de Respuesta	71
4.8.2. Análisis Canónico	71
4.9. Caracterización de la Superficie de Respuesta	72

EXPERIMENTAL

CAPÍTULO V. Diseño y Desarrollo del Método

5.1. Selenio y Mercurio. Reactivos Utilizados	75
5.1.1. Solución de Rodamina B (Reactivo Cromogénico)	75
5.1.2. Solución Estándar de Selenio	76
5.1.3. Solución de Yoduro de Potasio 1 M	76
5.1.4. Solución de Difenilcarbazida (Reactivo Cromogénico)	76
5.1.5. Solución Estándar de Mercurio	77
5.1.6. Solución Reguladora de Hidróxido de Sodio/Dihidrógeno Fosfato de Potasio	77
5.1.7. Solución de Tritón X-100 al 5% v/v	77
5.1.8. Soluciones de Ácido Clorhídrico 0,1 M, 4 M y 6 M	78
5.1.9. Solución de Hidróxido de Sodio 0,1 M	78
5.1.10. Resina Aniónica Dowex 1X8	78
5.2. Instrumental y Materiales	79
5.2.1. Medidas Absorciométricas	79
5.2.2. Medidas y Ajustes de pH	79
5.2.3. Tratamiento de Muestras	79
5.2.4. Diseño Experimental	79
5.3. Selenio	80
5.3.1. Parámetros que Afectan la Formación del Complejo	80
5.3.2. Influencia del pH	80
5.3.3. Selección de la Resina	81
5.3.4. Orden de Adición de los Reactivos	82
5.3.5. Estudio de la Influencia de las Variables Químicas	83
5.3.6. Superficie de Respuesta y Optimización por el Método de Box-Behnken	84

5.3.7. Influencia de la Cantidad de Resina	88
5.3.8. Influencia del Tiempo de Agitación	89
5.3.9. Estabilidad del Complejo	90
5.3.10. Selección de Longitud de Onda del Complejo	90
5.3.11. Curva de Calibración	91
5.3.12. Resumen de las Condiciones Seleccionadas para la Determinación de Se(IV)	92
5.3.13. Resumen del Método Propuesto	93
5.4. Mercurio	94
5.4.1. Parámetros que Afectan la Formación del Complejo Hg-DFC	94
5.4.2. Selección de la Resina	94
5.4.3. Influencia de la Concentración de Difenilcarbazida (DFC)	95
5.4.4. Funcionalización de la Resina	95
5.4.5. Influencia del pH	96
5.4.6. Influencia del Volumen de Tensoactivo	97
5.4.7. Orden de Adición de los Reactivos	97
5.4.8. Influencia de la Cantidad de Resina	98
5.4.9. Influencia del Tiempo de Agitación	99
5.4.10. Estabilidad del Complejo	100
5.4.11. Selección de Longitud de Onda del Complejo	100
5.4.12. Curva de Calibración	101
5.4.13. Resumen de las Condiciones Seleccionadas para la Determinación de Hg(II)	102
5.3.13. Resumen del Método Propuesto	103
5.4.15. Colorimetría Visual (Semicuantitativa) de Hg(II)	103
CAPÍTULO VI. Validación y Aplicación del Método	
6.1. Validación	108
6.2. Parámetros Analíticos para la Determinación de Se(IV)	108
6.2.1. Linealidad	108
6.2.2. Límite de Detección y Límite de Cuantificación	109

6.2.3. Precisión	112
6.2.4. Reproducibilidad y Repetitividad	112
6.2.5. Estudio de Interferencias	113
6.3. Aplicación del Método	115
6.2.1. Obtención de Muestras	115
6.3.2. Tratamiento de Muestras	115
6.3.3. Procedimiento	115
6.3.4. Determinación de Selenio	116
6.4. Parámetros Analíticos para la Determinación de Hg(II)	118
6.4.1. Linealidad	118
6.4.2. Límite de Detección y Límite de Cuantificación	118
6.4.3. Precisión	119
6.4.4. Reproducibilidad y Repetitividad	119
6.4.5. Estudio de Interferencias	120
6.5. Aplicación del Método	120
6.5.1. Recolección y Conservación de Muestras	120
6.5.2. Tratamiento de Muestras	121
6.5.3. Procedimiento	121
6.5.4. Determinación de Hg(II)	122

CONCLUSIONES

CAPÍTULO VII. Conclusiones	125
7.1. Propósitos	125
7.2. Conclusiones	125
7.2.1. Determinación de Selenio por EFS	125
7.2.2. Validación y Aplicación del Método para la Determinación de Selenio	127
7.2.3. Determinación de Mercurio por EFS	128
7.2.4. Validación y Aplicación del Método para la Determinación de Mercurio	129
7.3. Conclusión Final	130

**“Empieza por hacer lo necesario,
luego haz lo posible y de pronto
estarás logrando lo imposible”.**

-San Francisco de Asis

CAPÍTULO I

CAPITULO I

1.1. Introducción

1.1.1. Selenio

El selenio es un elemento de importancia medioambiental, biológica y toxicológica. Se presenta naturalmente en el medio ambiente como impureza en la forma de selenuro (Se^{2-}) de sulfuros metálicos o con minerales de plata, cobre, plomo o níquel. Es liberado tanto a través de procesos naturales como de actividades humanas.

Los procesos de emisión natural de selenio incluyen la erosión de las rocas y suelos, emisiones volcánicas y la actividad de microorganismos y plantas¹. Entre las fuentes antropogénicas, la combustión de carbón y combustibles fósiles es la principal fuente de incorporación del selenio al aire. Aunque en las combustiones se forma SeO_2 , la presencia de SO_2 hace que se reduzca con rapidez a selenio elemental, que se une a cenizas y a partículas atmosféricas. La actividad industrial y agrícola ha acelerado la liberación del elemento de fuentes geológicas y lo ha puesto a disposición de la vida silvestre en los ecosistemas acuáticos y terrestres en todo el mundo².

Las plantas son capaces de incorporar selenio (a partir del suelo, agua o atmósfera), transportarlo y metabolizar distintas especies del elemento, empleando para todo ello mecanismos análogos a los del azufre. El selenato (SeO_4^{2-}) y el sulfato (SO_4^{2-}) compiten por los mismos sitios de unión en la membrana celular de las células de la raíz. También lo hacen por varias enzimas en la vía de asimilación del azufre, por ejemplo, por la ATP sulfurilasa, que conduce a la formación de análogos con selenio de cisteína y metionina (selenocisteína y selenometionina). Finalmente existen semejanzas entre el metabolismo del azufre y el selenio en la producción de compuestos volátiles liberados por las partes aéreas vegetales. El principal compuesto volátil del seleniuro es la dimetilseleniuro del cual la selenometionina es el principal precursor.

La mayoría de las plantas contienen más bien baja concentración foliar del elemento, alrededor de 25 mg.kg^{-1} en promedio. Sin embargo, algunas exhiben una gran capacidad para acumularlo. La absorción, acumulación y metabolización del selenio en la vegetación depende de varios factores, tales como el clima, los parámetros del suelo y la especie.

Cuando el selenio está presente en formas solubles, es fácilmente absorbido por las plantas, aunque las diferencias entre las especies son muy pronunciadas. Es absorbido de la tierra preferentemente como seleniato, SeO_4^{2-} o selenito, SeO_3^{2-} . En la mayoría de los casos existe una correlación lineal positiva entre el selenio en plantas y suelos³. El contenido del elemento en cultivos ha recibido recientemente mucha atención debido a su importancia en la cadena alimenticia. La mayoría de los datos disponibles son de fábricas de alimentos y forraje. Los granos de cereales, como fuente más común de selenio en la dieta; han sido ampliamente analizados⁴.

Se han descrito diversas técnicas analíticas para la determinación de la concentración total de selenio. Los métodos comunes incluyen la absorción atómica⁵, espectrofluorimetría⁶, la activación de neutrones⁷, el análisis electroquímico⁸, cromatografía de gases⁹, espectrofotometría¹⁰, y las técnicas de espectrometría de masas¹¹. También se han descrito métodos cinéticos para la determinación de selenio^{12,13}. Todas estas técnicas poseen un límite de detección en el orden del ng mL^{-1} . Algunos de estos métodos dan buena selectividad y sensibilidad, pero requiere equipos y reactivos muy caros, tiempos relativamente largos y los procedimientos en sí son muy complicados.

Se plantea en este trabajo de tesis un método espectrofotométrico en fase sólida discontinuo, simple y sensible para la determinación del contenido de selenio a nivel de trazas. Con el objeto de obtener las condiciones óptimas para el método se utilizará el modelo de superficie de respuesta basado en el diseño de Box-Behnken. Se evaluará la factibilidad de la reacción del elemento con el compuesto orgánico Rodamina B, estudiando las condiciones de pH, selección de resina, concentración de reactivo e influencia de posibles interferentes entre otras condiciones. Una vez estandarizado el método analítico, se aplicará para la determinación del analito que puede provenir de

muestras de agua específicamente o digestos provenientes de distintas matrices.

El Se(IV) oxida en medio fuertemente ácido al anión yoduro, obteniéndose el ión triyoduro (I_3^-) en solución acuosa, el cual posteriormente forma un complejo iónico coloreado, menos soluble, con la Rodamina B. El complejo resultante se determina espectrofotométricamente, ligándolo a la resina Dowex 1X8.

El método diseñado se ha aplicado a la determinación de Se(IV) en tres muestras de hierbas medicinales ampliamente consumidas.

1.1.2. Mercurio

El mercurio es uno de los elementos inorgánicos más estudiado desde el punto de vista toxicológico ambiental, como lo demuestra la gran disponibilidad de referencias bibliográficas al respecto^{14,15,16,17}. Su toxicidad es extremadamente severa.

Existen varios procesos a partir de los cuales el mercurio puede contaminar el suelo y el agua: por el vertido de desechos industriales, la acumulación de productos empleados en la agricultura (fungicidas) o por efectos naturales (ej: erupción de un volcán). Pero es principalmente a través de la combustión de combustibles fósiles que este metal es liberado a la atmósfera.

En la atmósfera el mercurio es transportado y transformado en varias especies con diferentes propiedades¹⁸. El tipo de especie de mercurio determina sus propiedades fisicoquímicas y consecuentemente afecta dramáticamente el destino, transporte y potencial toxicidad del mercurio para el ecosistema¹⁹. Las reacciones que causan el cambio de las formas químicas del mercurio son así de gran importancia.

El hecho de disponer de técnicas sencillas y confiables para su cuantificación en diversas matrices, es importante a la hora de proponer y diseñar sistemas de monitoreo (frecuentemente *in-situ*) en regiones que por su situación geográfica o política se encuentran distantes de los centros o laboratorios de referencia. En este contexto adquieren relevancia las técnicas

colorimétricas semi-cuantitativas que pueden realizarse en ausencia de instrumental por la simple observación ocular de productos coloreados (*naked-eye techniques*)^{20,21,22,23}, que a pesar de su baja sensibilidad brindan información relevante e inmediata sobre la situación al momento de ser realizados los tests.

En la actualidad existen numerosos métodos instrumentales para determinar mercurio a nivel de vestigios en distintas matrices, que poseen niveles de sensibilidad y selectividad ampliamente demostrados. Entre ellos ocupan un lugar destacado las técnicas espectrofotométricas de absorción atómica combinadas con la generación de hidruros (CVAAS)^{24,25,26,27}, junto a algunas otras técnicas de naturaleza electroquímica. Sin embargo, el problema principal que presentan estos métodos es la escasa disponibilidad de equipamiento en laboratorios de pequeña o baja complejidad, por lo que se hace necesario plantear alternativas que permitan la determinación confiable utilizando instrumentos sencillos, frecuentemente disponibles.

Se propone estudiar la posibilidad de la funcionalización de una resina de intercambio iónico (Resina estiren-divinilbencénica, Dowex 1X8) con el objeto de tornarla específica a la retención de iones Hg(II), presentes en soluciones acuosas. Para ello se evaluarán las condiciones de pH, selección de resina, concentración de reactivo e influencia de posibles interferentes. La resina funcionalizada se estudiará desde el punto de vista de su selectividad, como de las condiciones óptimas para la retención del elemento a través de un método espectrofotométrico en fase sólida discontinuo. Presenta como principales ventajas, la fácil accesibilidad a los reactivos que actuarán como ligandos, como así también su bajo costo, además de su gran versatilidad para ser utilizada en distintos sistemas analíticos, ya sea en una etapa de preconcentración o para la determinación de complejos cromáticos formados directamente sobre la resina, por espectrofotometría de absorción UV-Vis en fase sólida^{28,29}. Por último se debe señalar también que las técnicas que se realizan en soporte sólido producen una menor cantidad de residuos, lo que resulta ventajoso en relación a otras metodologías. Una vez estandarizada la

resina se aplicará para la determinación del analito, el cual puede provenir de muestras de agua contaminadas o digestos provenientes de distintas matrices.

El reactivo (ligando) para mercurio que se utilizará es la Difenilcarbazida, reactivo accesible y ampliamente utilizado para la determinación espectrofotométrica de Cr(VI)^{30,31,32}, que reacciona de manera prácticamente específica con Hg(II) en medio neutro-débilmente ácido, mediante la formación de un complejo, de color azul violáceo.

La finalidad es lograr una alternativa simple y de bajo costo (instrumental y económico) para realizar la detección de Hg(II).

La resina funcionalizada se aplicará a la determinación de Hg(II) en muestras de agua enriquecidas con el analito, mediante el uso de la Espectrofotometría en Fase Sólida en Batch y la Colorimetría Visual Semi-cuantitativa, técnicas sensibles y confiables, que además presentan como características su versatilidad y sencillez de implementación en laboratorios de mediana o baja complejidad.

1.2. Objetivos

1.2.1. General

➤ Diseñar y desarrollar métodos analíticos sencillos para selenio y mercurio, de alta sensibilidad y especificidad, que provean una alternativa de bajo costo y útil para laboratorios de escasa complejidad, aplicando la técnica de espectrofotometría en fase sólida.

1.2.2. Específicos

➤ Evaluar, determinar y perfeccionar las condiciones óptimas de la reacción química de coordinación.

➤ Seleccionar las resinas adecuadas para la ad/absorción de los complejos formados.

➤ Validar la metodología analítica diseñada.

➤ Aplicar la técnica desarrollada para selenio y mercurio en muestras de interés ambiental, mediante el uso de espectrofotometría en fase sólida discontinua.

¹ Cutter, G.A. (1985). Determination of selenium speciation in biogenic particles and sediments. *Analytical Chemistry*. Volume 57, Issue 14, p. 2954-2955.

² Winkel, L.H.E.; Johnson, C.A.; Lenz, M.; Grundl, T.; Leupin, O.X.; Amini, M.; Charlet, L. (2012). Environmental selenium research: From microscopic processes to global understanding. *Environmental Science & Technology*. Volume 46, Issue 2, p. 571-579.

³ Adriano; D.C. (2001). *Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals*. 2^{da} edición. Editorial Springer-Verlag, New York.

⁴ Heard, J.W.; Stockdale, C.R.; Walker, G.P.; Leddin, C.M.; Dunshea, F.R.; McIntosh, G.H.; Shields, P.M.; McKenna, A.; Young, G.P.; Doyle, P.T. (2007).

Increasing selenium concentration in milk: Effects of amount of selenium from yeast and cereal grain supplements. Journal of Dairy Science. Volume 90, Issue 9, p. 4117-4127.

⁵ Hegedűs, O.; Hegedűsová, A.; Šimková, S.; Pavlík, V.; Jomová, K. (2008). *Evaluation of the ET-AAS and HG-AAS methods of selenium determination in vegetables.* Journal of Biochemical and Biophysical Methods. Volume 70, Issue 6, p. 1287-129.

⁶ Safavi, A.; Mirzaee, M. (2000). *Spectrofluorimetric kinetic determination of selenium (IV) by flow injection analysis in cationic micellar medium.* Talanta. Volume 51, Issue 2, p. 225-230.

⁷ Beladel, B.; Nedjimi, B.; Mansouri, A.; Tahtat, D.; Belamri, M.; Tchanchane, A.; Khelfaoui, F.; Benamar, M.E.A. (2013). *Selenium content in wheat and estimation of the selenium daily intake in different regions of Algeria.* Applied Radiation and Isotopes. Volume 71, Issue 1, p. 7-10.

⁸ Panigati, M.; Falciola, L.; Mussini, P.; Beretta, G.; Facino, R.M. (2007). *Determination of selenium in Italian rices by differential pulse cathodic stripping voltammetry.* Food Chemistry. Volume 105, Issue 3, p. 1091-1098.

⁹ Poole, C.F.; Evans, N.J.; Wibberley, D.G. (1977). *Determination of selenium in biological samples by gas—liquid chromatography with electron-capture detection.* Journal of Chromatography A. Volume 136, Issue 1, p. 63-72.

¹⁰ Arikan, B.; Tunçay, M.; Apak, R. (1996). *Sensitivity enhancement of the methylene blue catalytic—spectrophotometric method of selenium(IV) determination by CTAB.* Analytica Chimica Acta. Volume 335, Issues 1-2, p. 155–167.

¹¹ Montes-Bayón, M.; Grant, T.D.; Meija, J.; Caruso, J.A. (2002). *Selenium in plants by mass spectrometric techniques: developments in bio-analytical methods.* Journal of Analytical Atomic Spectrometry. Volume 17, Issue 9, p. 1015-1023.

¹² Chand, V.; Prasad, S. (2009). *Trace determination and chemical speciation of selenium in environmental water samples using catalytic kinetic*

spectrophotometric method. Journal of Hazardous Materials. Volume 165, Issues 1-3, p. 780-788.

¹³ Gürkan, R.; Akçay, M. (2003). *Kinetic spectrophotometric determination of trace amounts of selenium based on the catalytic reduction of maxilon blue-SG by sulfide*. Microchemical Journal. Volume 75, Issue 1, p. 39-49.

¹⁴ Mergler, D.; Anderson, H.A.; Chan, L.H.M.; Mahaffey, K.R.; Murray, M.; Sakamoto, M.; Stern, A.H. (2007). *Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern*. AMBIO: A Journal of the Human Environment. Volume 36, Issue 1, p. 3-11.

¹⁵ Stein, E.D.; Cohen, Y.; Winer, A.M. (1996). *Environmental distribution and transformation of mercury compounds*. Environmental Science and Technology. Volume 26, Issue 1, p. 1-43.

¹⁶ Ullrich, S.M.; Tanton, T.W.; Abdrashitova, S.A. (2001). *Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation*. Environmental Science and Technology. Volume 31, Issue 3, p. 241-293.

¹⁷ Valentino, L.; Torregrossa, M.V.; Saliba, L.J. (1995). *Health effects of mercury ingested through consumption of seafood*. Water Science and Technology. Volume 32, Issues 9-10, p. 41-47.

¹⁸ Lin, C.J.; Pehkonen, S.O. (1999). *The chemistry of atmospheric mercury: a review*. Atmospheric Environment. Volume 33, Issue 13, p. 2067-2079.

¹⁹ Beucher, C.; Wong-Wah-Chung, P.; Richard, C.; Mailhot, G.; Bolte, M.; Cossa, D. (2002). *Dissolved gaseous mercury formation under UV irradiation of unamended tropical waters from French Guyana*. Science of the Total Environment. Volume 290, Issues 1-3, p. 131-138.

²⁰ Ren, W.X.; Bhuniya, S.; Zhang, J.F.; Lee, Y.H.; Lee, S.J.; Kim, J.S. (2010). *A new fluorogenic chemodosimetric system for mercury ion recognition*. Tetrahedron Letters. Volume 51, Issue 44, p. 5784-5786.

²¹ Tan, J.; Yan, X.P. (2008). *2,1,3-Benzoxadiazole-based selective chromogenic chemosensor for rapid naked-eye detection of Hg²⁺ and Cu²⁺*. Talanta. Volume 76, Issue 1, p. 9-14.

- ²² Wanichacheva, N.; Siriprumpoonthum, M.; Kamkaew, A.; Grudpan, K. (2009). *Dual optical detection of a novel selective mercury sensor based on 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolyl subunits*. Tetrahedron Letters. Volume 50, Issue 16, p. 1783-1786.
- ²³ Yang, H.; Qian, J.; Li, L.; Zhou, Z.; Li, D.; Wu, H.; Yang, S. (2010). *A selective phosphorescent chemodosimeter for mercury ion*. Inorganica Chimica Acta. Volume 363, Issue 8, p. 1755-1759.
- ²⁴ Gallignani, M.; Bahsas, H.; Brunetto, M.R.; Burguera, M.; Burguera, J.L.; Pena, Y.P. (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. Volume 369, Issues 1-2, p. 57-67.
- ²⁵ Hight, S.C.; Cheng, J. (2005). *Determination of total mercury in seafood by cold vapor-atomic absorption spectroscopy (CVAAS) after microwave decomposition*. Food Chemistry. Volume 91, Issue 3, p. 557-570.
- ²⁶ Ma, X.; Huang, B.; Cheng, M. (2007). *Analysis of trace mercury in water by solid phase extraction using dithizone modified nanometer titanium dioxide and cold vapor atomic absorption spectrometry*. Rare Metals. Volume 26, Issue 6, p. 541-546.
- ²⁷ Torres, D.P.; Vieira, M.A.; Ribeiro, A.S.; Curtius, A.J. (2005). *Determination of inorganic and total mercury in biological samples treated with tetramethylammonium hydroxide by cold vapor atomic absorption spectrometry using different temperatures in the quartz cell*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. Volume 20, Issue 4, p. 289-294.
- ²⁸ Camel, V. (2003). *Solid phase extraction of trace elements*. Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. Volume 58, Issue 7, p. 1177-1233.
- ²⁹ Spivakov, B.Y.; Malofeeva, G.I.; Petrukhin, O.M. (2006). *Solid-phase extraction on alkyl-bonded silica gels in inorganic analysis*. Analytical Sciences. Volume 22, Issue 4, p. 503-519.
- ³⁰ Padaruskas, A.; Judentien, A.; Naujalis, E.; Paliulionyt, V. (1998). *On-line preconcentration and determination of chromium(VI) in waters by high-*

performance liquid chromatography using pre-column complexation with 1,5-diphenylcarbazide. Journal of Chromatography A. Volume 808, Issues 1-2, p. 193-199.

³¹ Rajesh, N.; Jalan, R.K.; Hotwany, P. (2008). *Solid phase extraction of chromium(VI) from aqueous solutions by adsorption of its diphenylcarbazide complex on an Amberlite XAD-4 resin column.* Journal of Hazardous Materials. Volume 150, Issue 3, p. 723-727.

³² Wróbel, K.; Wróbel, K.; López-de-Alba, P.L.; López-Martínez, L. (1997). *Enhanced spectrophotometric determination of chromium (VI) with diphenylcarbazide using internal standard and derivative spectrophotometry.* Talanta. Volume 44, Issue 11, p. 2129-2136.

“Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano”.

-Isaac Newton

CAPÍTULO II

CAPITULO II

El propósito de este capítulo es suministrar información acerca de las propiedades químicas y físicas generales de los elementos que serán utilizados durante el desarrollo del trabajo. Establecer los ciclos naturales del selenio y mercurio en la naturaleza así como sus usos industriales a fin de exhibir los riesgos de contaminación existentes para ambos elementos y presentar los mecanismos de sus beneficios y efectos perjudiciales tanto para el ser humano como para la vegetación.

2.1. Propiedades Generales del Selenio y sus Minerales

2.1.1. Historia

El elemento selenio fue descubierto por el químico sueco Jöns Jacob Berzelius en 1817. Berzelius al visitar la fábrica de ácido sulfúrico de Gripsholm observó un líquido pardo rojizo producido durante la oxidación del dióxido de azufre proveniente de piritas de cobre, que calentado al soplete desprendía un olor fétido que se consideraba entonces característico y exclusivo del elemento telurio, sin embargo el resultado de sus investigaciones indicaron que se estaba en presencia de un nuevo elemento, lo que conllevó al descubrimiento del elemento selenio. Más tarde, el perfeccionamiento de las técnicas de análisis permitió detectar su presencia en distintos minerales pero siempre en cantidades extraordinariamente pequeñas.

Su nombre deriva de la palabra griega "*selene*" que significa "*luna*". Este nombre le fue dado por su parecido al telurio (llamado así por la Tierra).

En el año 1954, los primeros indicios de funciones biológicas específicas del elemento selenio se descubrió en los microorganismos. Su esencialidad para la vida de mamíferos fue descubierta en 1957 cuando Shwartz y Foltz demostraron que el selenio era capaz de prevenir la necrosis hepática en ratas deficientes de vitamina E¹. En 1973 Rotruck lo identifica como el centro activo del enzima glutation peroxidasa de los mamíferos².

Sin embargo, el selenio era reconocido como un elemento tóxico, ya que su consumo en exceso había sido relacionado con ceguera, dolor abdominal, diarrea, taquicardia, taquipnea y letargo en animales de granja³.

2.1.2. Propiedades Físico-Químicas

Pertenece al grupo 16 de la Tabla Periódica situado entre los elementos azufre y telurio, siendo sus propiedades físico-químicas intermedias entre metal y no metal. En su forma natural es un sólido, de aspecto gris metálico (**Figura N° 2.1.**), y rara vez se presenta en su estado elemental en la naturaleza.



Fig. N°2.1.: Selenio Nativo

Su símbolo químico es Se. Tiene un peso atómico de 78,96 unidades de masa atómica (u.m.a.) y número atómico 34. Con valores de punto de fusión y de ebullición de 221°C y 685°C respectivamente. Posee un valor de densidad de 4,819 g cm⁻³. No es soluble, ni en agua ni en alcohol, pero sí es algo soluble en disulfuro de carbono, y totalmente soluble en éter⁴.

Se puede encontrar en su forma más reducida: Se(-II), la elemental: Se(0) y en las formas oxidadas: Se(+IV) y Se(+VI). Forma una gran variedad de compuestos orgánicos (formando complejos con aminoácidos en las proteínas) e inorgánicos (sales seleniuros, selenitos y selenatos), de forma compleja en el medioambiente y en los sistemas vivos (**Tabla 2.1.**).

Tabla 2.1. Principales especies de selenio en medioambiente y seres vivos^{5,6,7,8}

Compuestos Inorgánicos	Compuestos Orgánicos		
Selenio Elemental	Sulfuro Dimetilselenio	Trimetilselenonio	Seleno-metil-selenometionina
Seleniuros Metálicos	Óxido Dimetilselenio	Selenometionina	Selenohomocisteína
Seleniuro de Hidrógeno	Propianato Dimetilselenio	Selenocisteína	Selenourea
Dióxido de Selenio	Metilselenol	Selenocistina	Selenocolina
Ácido Selenoso y Selenitos	Ácido Metilselénico	Selenoetionina	Selenio-adenoxil selenohomocisteína
Ácido Selénico y Selenatos	Dimetilseleniuro	Selenometilcisteína	Selenoazúcares
Seleniocianato	Dimetildiseleniuro	γ -glutamil-seleno-metilselenocisteína	Selenoproteínas

Posee 6 isótopos naturales, de los cuales cinco son estables. El ⁸²Se tiene un tiempo de vida largo por lo que en la práctica se considera estable⁹ (Tabla 2.2.).

Tabla 2.2. Isótopos del Selenio

Isótopos Naturales	Abundancias Isotópicas (%)	Isótopos Sintéticos
⁷⁴ Se	0,89	⁷² Se
⁷⁶ Se	9,37	⁷⁵ Se
⁷⁷ Se	7,63	⁷⁹ Se
⁷⁸ Se	23,77	
⁸⁰ Se	49,61	
⁸² Se (radioactivo)	8,73	

Existen además 10 isótopos artificiales de corta vida tales como ⁷⁵Se (se emplea en radiodiagnóstico como trazador en la visualización de tumores

malignos y páncreas. También se usa en la radiografía complementando a los rayos X, los ensayos de calidad, el control de procesos y la esterilización), y el ^{79}Se (utilizado para obtener imágenes del páncreas con seleniometionina marcada con el isótopo).

El elemento selenio se presenta en varias formas alotrópicas: rojo amorfo o vítreo; rojo cristalino (monocíclico); gris metálico (hexagonal) y el selenio negro, que es la variedad metálica, en estado muy fino de subdivisión. Al calentarlo desprende un olor característico, parecido al de las coles podridas.

El selenio rojo está formado por moléculas de Se_8 , monoclinicas (solubles en disolventes orgánicos) y no conductores de la electricidad. Es metaestable, se transforma en Se gris, en mayor medida cuanto más alta sea la temperatura. El selenio gris es la forma estable. Está formado por cadenas helicoidales de selenio, situadas paralelamente en el cristal; cada una rodeada de otras seis. Los enlaces en la cadena son covalentes y moleculares entre las láminas. Es poco conductor de la electricidad, pero el efecto de la luz hace que la conductividad aumente unas 1000 veces, disminuyendo de nuevo en ausencia de ésta¹⁰.

Es una sustancia natural, sólida, ampliamente distribuida, aunque de forma irregular, en la corteza terrestre. Se encuentra comúnmente en rocas y en el suelo. En el ambiente, por lo general, no se encuentra en forma elemental, sino combinado con sulfuro o con minerales de plata, cobre, plomo o níquel. Arde en el aire con una flama azul para dar dióxido de selenio, SeO_2 y se combina con oxígeno para formar varias sustancias con la apariencia de cristales blancos o incoloros. Algunos de los compuestos de selenio son gases como el seleniuro de hidrógeno, H_2Se , gas venenoso, incoloro e inflamable con un olor desagradable, gran toxicidad y estabilidad térmica menor que la del sulfuro de hidrógeno. Disuelto en agua, el seleniuro de hidrógeno puede precipitar muchos iones de metales pesados como seleniuros muy poco solubles. Los ácidos no oxidantes, no reaccionan con el selenio; pero los ácidos nítrico (diluido o concentrado, en frío o en caliente) y ácido sulfúrico

concentrado caliente y los hidróxidos alcalinos fuertes lo disuelven, dando lugar a compuestos de oxidación del elemento selenio¹¹.

Se conocen numerosos compuestos orgánicos con enlaces C-Se e incluyen desde simples selenoles (RSeH), ácido selenénico (RSeOH), haluros organil selénicos (RSeX), seleniuros diorganílicos y diseleniuros (R₂Se y R₂Se₂), hasta moléculas que exhiben actividad biológica, como los selenoaminoácidos y los selenopéptidos¹².

2.1.3. Producción y Usos Industriales

Los minerales del selenio no se encuentran en suficiente cantidad para tener utilidad como fuente comercial y por ello los minerales de sulfuro de cobre seleníferos son los que representan la fuente primaria.

Su extracción es bastante complicada. Suele obtenerse de los humos formados durante la calcinación de los sulfuros minerales, sobre todo de cobre y cinc, de los lodos rojos que se recogen en el fondo de las cámaras de plomo en la síntesis del ácido sulfúrico y en el refinado electrolítico del cobre.

Comúnmente, la producción comienza por oxidación con carbonato de sodio para producir dióxido de selenio. El dióxido de selenio se mezcla a continuación con agua y se acidifica la solución para formar ácido selenioso (etapa de oxidación), posteriormente se lo hace burbujear con el dióxido de azufre (etapa de reducción) para dar lugar a selenio elemental¹³.

El selenio elemental producido en las reacciones químicas, invariablemente aparece como la forma amorfa: un polvo de color rojo ladrillo insoluble. Cuando éste se funde rápidamente, origina la forma vítrea de color negro, que se vende generalmente en la industria como perlas.

Hasta los años sesenta, el selenio tenía tan sólo una aplicación importante, y era como aditivo en la formación del vidrio¹⁴. La adición de seleniuro de cadmio (CdSe), a una mezcla de vidrio, daba un color rojo rubí que era de gran valor para los artesanos que trabajaban el vidrio. También se utilizaba para anular los tintes de color verde o amarillo causados por otras impurezas durante el proceso de fabricación de vidrio. También se usa como pigmento en plásticos, pinturas, barnices, cerámica y tintas.

Cuando se inventó la xerografía, para las duplicaciones de documentos, el elemento selenio se convirtió en un agente que afectaba a la vida de todos, adquiriendo una importancia que hasta entonces no tenía, gracias a las propiedades fotoconductoras del elemento¹⁵.

Hace tiempo, se utilizaba en la electrónica, pero se ha reducido su uso para este propósito en los últimos años. Su aplicación en rectificadores ha disminuido por el mayor empleo de los elementos silicio y germanio. Todavía se lo encuentra en las células solares¹⁶, en los diodos emisores de luz (LED) de color azul y blanco y medidores de luz.

El sulfuro de selenio es un ingrediente común de champú anticaspa porque inhibe el crecimiento del hongo que causa la descamación del cuero cabelludo. También se usa para tratar ciertos problemas de piel causados por otros hongos¹⁷.

El selenato de sodio (Na_2SeO_4) es un insecticida usado para combatir insectos en los cultivos de plantas ornamentales, particularmente crisantemos y claveles; los insecticidas se esparcen alrededor de las raíces y es distribuido por la planta¹⁸.

Otras aplicaciones incluyen, exposímetros fotográficos para fotografías en blanco y negro, algunas cámaras de rayos X, aditivo metalúrgico que mejora la capacidad de ciertos aceros para ser maquinados; se puede mezclar con bismuto para crear un latón sin plomo¹⁹ o catalizador en diferentes reacciones, sobre todo las reacciones de deshidrogenación.

El elemento selenio también actúa como nutriente (micronutriente), encontrándose presente en productos alimenticios como pan, cereales, pescados, carnes, huevos, etc. Se encuentra además formando parte de varias enzimas. La selenocisteína posee propiedades nucleofílicas que la hacen ideal para la catálisis de reacciones oxidorreductoras²⁰.

Es antioxidante, pues ayuda a neutralizar radicales libres del organismo humano y es necesario para el correcto funcionamiento de la glándula tiroides y por otra parte es un estimulante del sistema inmunológico.

2.1.4. Distribución Ambiental del Selenio

El elemento selenio se encuentra de manera natural en la corteza de la Tierra, formando parte de la gran mayoría de las rocas o suelos. En el orden de abundancia de los elementos, ocupa el sexagésimo noveno lugar, es por consiguiente bastante escaso ya que su contenido en la corteza terrestre se estima aproximadamente en 7×10^{-5} %, encontrándose en forma de seleniuros de elementos pesados y, en menor cantidad, como elemento libre en asociación con azufre elemental²¹.

Las fuentes naturales de selenio incluyen la erosión de las rocas y suelos, emisiones volcánicas, la actividad de microorganismos que liberan compuestos volátiles de selenio²² y la bioconcentración del elemento en ciertas plantas²³.

Las fuentes antropogénicas incluyen la quema de carbón, minería y la fundición de minerales de sulfuro. Otras emisiones proceden de la incineración de basuras²⁴ y del humo de los cigarrillos. Estas emisiones son mayoritariamente en forma de óxidos de selenio.

La existencia del selenio en distintas formas químicas dentro de la naturaleza viene dado por factores como la temperatura, la concentración de oxígeno, la luz solar, pH, salinidad y potencial redox²⁵.

2.1.4.1. Contaminación del Aire

La combustión de carbón y combustibles fósiles es la principal fuente de incorporación del selenio al aire. Aunque en las combustiones se forma SeO_2 , la presencia de SO_2 hace que se reduzca con rapidez a selenio elemental, que se une a cenizas y a partículas atmosféricas. La atmósfera juega un papel muy importante en el ciclo biogeoquímico del selenio²⁶. Por otro lado, las reacciones de metilación de éste en aguas, suelos y sedimentos por acción de hongos y bacterias dan lugar a especies volátiles como el dimetilseleniuro: $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, contribuyendo a su dispersión.

La deposición atmosférica de selenio contribuye a la contaminación de la biosfera (agua, suelo, plantas)²⁷. En el aire los niveles del elemento son generalmente bajos, entre $0,1 - 10 \text{ ng m}^{-3}$, aunque estos valores pueden aumentar debido a procesos de origen antropogénico (actividades industriales).

El valor límite tolerable para diversos compuestos del selenio es de $0,2 \text{ ng m}^{-3}$ en aire.

2.1.4.2. Contaminación del Suelo

La reactividad química del selenio en el suelo influye fuertemente en su solubilidad y por tanto en la disponibilidad. En suelos oxidantes y a pH alto, el selenio elemental y los seleniuros son oxidados a selenatos, los que son asimilados por las plantas. A valores muy bajos de pH se ve favorecida la forma selenito y es fuertemente fijada por el suelo coprecipitando con el hierro²⁸. Algunas bacterias reducen los compuestos orgánicos y minerales a seleniuro de hidrógeno (H_2Se) volátil mientras que otras oxidan el selenio a selenato o a trióxido de selenio (SeO_3).

El clima, el tipo de suelo y la concentración de materia orgánica tienen influencia en la disponibilidad real del elemento en el suelo. La concentración en las plantas depende de estos parámetros y de su contenido en proteínas, observándose niveles entre $0,01 - 1000 \mu\text{g g}^{-1}$. Las plantas con un contenido en selenio de más de $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ se llaman acumuladores primarios de selenio, mientras que las que contienen entre $50-500 \mu\text{g g}^{-1}$ son acumuladores secundarios. La mayoría de las plantas (forrajes, cereales y legumbres) contienen concentraciones menores a $30 \mu\text{g g}^{-1}$, generalmente entre $0,1 - 0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ ²⁹.

2.1.4.3. Contaminación del Agua

En el agua, el elemento selenio aparece debido a la meteorización de las rocas y la lixiviación de los suelos, procesos que están controlados por factores biológicos y microbiológicos, encontrándose principalmente como selenato aunque el selenito y las formas organometálicas también están presentes³⁰.

El contenido de selenio en aguas subterráneas y superficiales es variable pudiendo ir de $0,1$ a $100 \mu\text{g L}^{-1}$, lo cual depende de factores físico-químicos. En las aguas potables la cantidad es más variable siendo normalmente menor o igual a $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Los límites legales de potabilidad se sitúan entre 8 y $10 \mu\text{g L}^{-1}$ dependiendo de las normativas de cada país y muy raramente estos valores son superados³¹.

2.1.4.4. Ciclo del Selenio

El elemento selenio se presenta naturalmente en el ambiente (**Figura N° 2.2.**). Es liberado tanto a través de procesos naturales como de actividades humanas.

Niveles bajos de selenio se pueden presentar en suelos o agua a través de la erosión de las rocas. Será entonces tomado por las plantas o acabará en el aire cuando es absorbido en finas partículas de polvo. Es más probable que el elemento selenio entre en el aire a través de la combustión de carbón y aceite, en forma de dióxido de selenio (SeO_2), que puede sufrir transformaciones químicas justificando la presencia de selenito (SeO_3^{2-}) y selenato (SeO_4^{2-}) en el agua de lluvia, tales como: hidratación, reducción por la presencia de SO_2 u oxidación por acción del oxígeno del aire.

La temperatura del suelo, la humedad, las concentraciones de selenio solubles en agua, la estación del año, el contenido en materia orgánica y la actividad microbiana determinarán la rapidez con la que el elemento se mueve a través del suelo³². Los niveles de oxígeno en el aire y la acidez del suelo aumentarán las formas móviles.

La agricultura puede no solo incrementar el contenido del elemento selenio en el suelo; también puede aumentar las concentraciones del mismo en las aguas superficiales, ya que las aguas de drenaje de irrigación pueden transportarlo.

El comportamiento del elemento en el ambiente depende fuertemente de sus interacciones con otros componentes y de las condiciones ambientales en el lugar en concreto.

Su transferencia desde el ambiente al hombre y animales procede principalmente por dos vías: inhalación e ingestión. Existe evidencia de que el selenio puede acumularse en los tejidos corporales y puede ser transportada en la cadena alimenticia hacia niveles superiores. Normalmente esta biomagnificación comienza cuando los animales ingieren plantas que han estado absorbiendo cantidades de selenio³³. Por ello, el estudio de la bioacumulación en los invertebrados suele considerarse como factor crítico en la determinación de sus efectos en los organismos superiores.

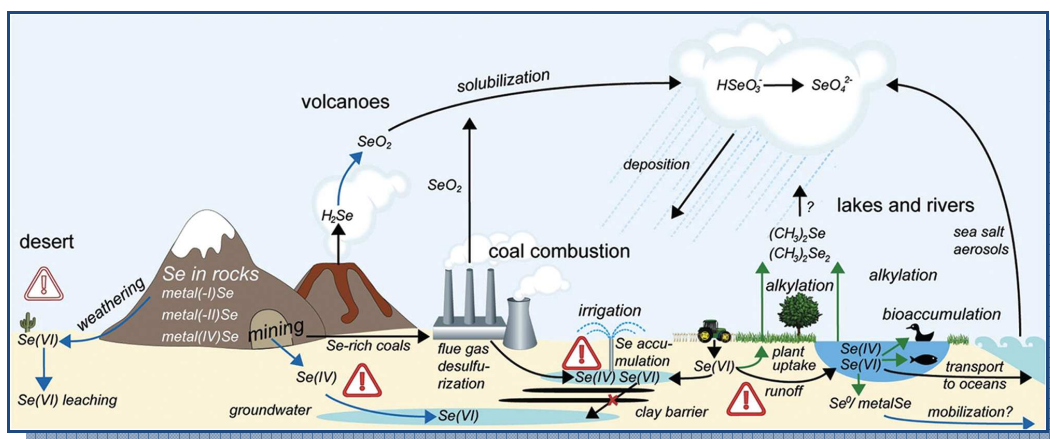


Fig. N°2.2.: Ciclo del Selenio. Las flechas azules indican los procesos de oxidación y flechas verdes indican los procesos de reducción de las especies de Se. Símbolos de advertencia indican ajustes ambientales específicos que se encuentran en riesgo de desarrollar deficiencia (símbolo abierto) o exceso (símbolo sombreado) de Se³⁴

2.1.5. Relevancia Biológica del Selenio

Al selenio a nivel de trazas se lo considera un elemento esencial de interés clínico y nutricional, cuyas funciones biológicas (antioxidante y catalítica) se ejercen a través de las selenoproteínas (**Tabla 2.3.**).

Tabla 2.3. Selenoproteínas

Selenoproteínas	Funciones	Localización
Glutacionas Peroxidasas	Antioxidantes	
Glutaciona celular	Antioxidante y reserva de Se	Citosol
Glutaciona gastrointestinal	Antioxidante (protección frente hidroperóxidos lipídicos)	Tracto gastrointestinal, hígado
Glutaciona plasmática	Antioxidante	Plasma, leche materna, riñón
Fosfolípido hidroperoxidasa	Antioxidante (protección frente hidroperóxidos lipídicos en membrana celular)	Membrana celular, núcleo, citosol, mitocondrias, espermatozoides
Yodotironina deyodinasas	Regulación de la tiroides	
Tipo 1 (ID1)	Producción T3	Tiroides, hígado, riñón
Tipo 2 (ID2)	Producción T3	Glándula tiroidea, glándula pituitaria, SNC, músculo cardíaco

Tipo 3 (ID3)	Degradación T3	Cerebro, piel, placenta
Tiorredoxina reductasa	Antioxidante, regulación procesos redox intracelulares y proliferación celular	Células cancerígenas, tejidos, piel, tiroides
Selenofosfato sintetasa	Síntesis de selenofosfato, precursor de SeCys	Bacterias
Selenoproteína P	Antioxidante, transporte, reserva de Se	Plasma, tiroides, hígado, corazón, pulmón
Selenoproteína W	Posible función redox y antioxidante involucrado en metabolismo cardíaco	Músculo, bazo, testículos, cerebro
Selenoproteína-15 kDa	Función redox	Próstata, tiroides
Selenoproteína-18 kDa	Reserva	Riñón y otros tejidos

Es necesario para el funcionamiento adecuado del sistema inmune, podría tener efectos beneficiosos en el tratamiento del SIDA y parece ser un oligoelemento esencial para contrarrestar la virulencia de la hepatitis. Por otro lado, una ingesta adecuada de selenio puede prevenir el riesgo de padecer cáncer.

Los beneficios del elemento selenio para los seres vivos fueron descritos por primera vez en 1957³⁵ pero fue en el año 1973³⁶ cuando se comprobó su función bioquímica en animales. Posee acción reductora, a través de la selenocisteína presente en la enzima glutatión peroxidasa (GSH-Px; EC 1.11.1.9) que cataliza la reducción de peróxido de hidrógeno en presencia de glutatión reducido y, por lo tanto, inhibe la propagación del daño celular producido por los radicales libres durante el metabolismo o frente a un estrés oxidativo en los tejidos animales. Además, el elemento selenio tiene un efecto protector ante la intoxicación por los elementos mercurio, cadmio, arsénico, hierro, cobre y otros metales pesados. Forma parte de la estructura de las tironina-5'-desyodasas, implicadas en la síntesis de hormonas tiroideas sulfatadas; de la selenoproteína P, la que está relacionada con la protección de las células del endotelio vascular frente al daño oxidativo; y parte de enzimas que intervienen en el metabolismo hepático de xenobióticos. Está

implicado en la espermatogénesis, a través de las selenoproteínas prostática y testicular.

Parece que, tanto el envejecimiento de los organismos, como la aparición de tumores cancerosos^{37,38} podrían estar relacionados con los efectos degenerativos causados por los radicales libres. Debido a ello, la mayoría de los estudios recientes llegan a la conclusión de que existe una relación inversa entre la ingesta de selenio en la dieta y la mortalidad producida por el cáncer^{39,40,41,42}.

Igualmente, el elemento se relaciona con otro tipo de enfermedades que implican el deterioro de los tejidos, como la enfermedad de Keshan (enfermedad cardíaca), la enfermedad de Kashin-Beck (enfermedad de los huesos)⁴³ y el cretinismo endémico mixedematoso.

Actualmente los estudios médicos van encaminados a relacionar el contenido de este elemento con enfermedades que tienen gran importancia en la sociedad actual como el sida, alzheimer, diabetes, etc.

En 1994 Sappey y colaboradores^{44,45} encuentran que pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) padecen una deficiencia de selenio en el plasma, además de apreciar una disminución ostensible en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa. Finalmente, en 1998⁴⁶, se encontró que existe una relación entre el estrés oxidativo y el estado de selenio con el desarrollo de la neuropatía diabética.

2.1.6. Tóxicocinética del Selenio

Los humanos pueden estar expuestos de varias formas diferentes: a través de la comida o el agua (principal vía), o por contacto con tierra o aire que contiene altas concentraciones de selenio (personas que trabajan en las industrias del metal, industrias recuperadoras de selenio e industrias de pintura, principalmente a través de la respiración).

La biodisponibilidad del selenio depende de la forma en la que es ingerido. El selenio orgánico se encuentra como selenometionina, selenocisteína o en forma metilada⁴⁷. Las formas inorgánicas incluyen las sales de selenito y selenato. La mayoría de las formas alimentarias de selenio

(aminoácidos selénicos y selenio inorgánico) son eficazmente absorbidas a nivel del duodeno y el íleon anterior. La absorción entérica del selenito está influenciada por las concentraciones de otros nutrimentos como la vitamina A, vitamina E y vitamina C⁴⁸.

La selenometionina es la que más fácilmente se absorbe y se metaboliza siguiendo el transporte activo del intestino delgado mediante un transportador dependiente de sodio. Luego de su absorción la selenometionina se une a la hemoglobina para luego acumularse en hígado y músculo. La selenocisteína también es absorbida en el intestino, pero de manera menos eficiente y es absorbida por los eritrocitos por medio de un transportador aun no identificado. El selenio inorgánico se absorbe pasivamente y es almacenado menos efectivamente que el orgánico⁴⁹.

El mayor sitio de almacenaje de selenio en el cuerpo es el músculo esquelético, con aproximadamente el 28 - 46% del selenio total. Los riñones, por otro lado, contienen la mayor cantidad de selenio por base de peso y sólo una pequeña fracción del selenio plasmático se encuentra en forma de glutatión peroxidasa.

2.1.7. Efectos Toxicológicos

La toxicidad depende de factores como la forma química, la especie biológica, la concentración y las posibles transformaciones que puede sufrir en su interacción con el medio.

Muchas especies orgánicas asociadas al selenio son esenciales por lo que su toxicidad se reduce.

Los síntomas típicos de intoxicación son: infección o irritación ocular y nasal, irritabilidad, vómitos y mareos, problemas respiratorios y pulmonares, daños oculares y cutáneos, caries, aumento en la frecuencia de abortos, problemas cardiovasculares y cáncer.

Los signos de toxicidad intracelulares son: deformaciones estructurales, reducción de la división celular, alteraciones de la fotosíntesis, alteraciones del transporte electrónico en la célula y en la producción de ATP; inhibición de

actuación de los sistemas enzimáticos. Tanto el selenito como el selenato son agentes mutágenicos.

El elemento selenio en el hombre tiene efectos carcinogénicos en piel, hígado, pecho y colon, siendo los de pecho y colon los de mayor relevancia por ser causados por la peroxidación de las grasas. La Agencia Internacional de la Investigación del Cáncer (IARC) ha incluido al elemento dentro del grupo 3 (el agente no es clasificable en relación a su carcinogenicidad en humanos).

2.2. Propiedades Generales del Mercurio y sus Minerales

2.2.1. Historia

El elemento mercurio y su mineral principal, el cinabrio (sulfuro mercúrico, HgS), son conocidos y utilizados desde tiempos remotos.

En el siglo IV A.C., el mercurio ya era empleado por Aristóteles en ceremonias religiosas⁵⁰. Su consumo había sido escaso hasta fines del siglo XV y casi utilizado exclusivamente como pigmento rojo, bermellón para la fabricación de pinturas. El pigmento mencionado es obtenido a partir del cinabrio finamente molido y mezclado con aceites de origen animal o vegetal. En Egipto se encontró la primera muestra de mercurio líquido en una tumba que data del 1600 A.C. y tanto griegos como romanos emplearon al elemento mercurio para la preparación de cosméticos, medicamentos y amalgamas^{50,51}. Tuvo singular trascendencia en la Edad Media⁵⁰, aunque su verdadera expansión industrial no se produjo hasta el siglo XX.

Muchas civilizaciones creían que el mercurio poseía propiedades místicas y el poder de prolongar la vida. En la antigüedad los alquimistas trataron de transmutar metales base como el plomo, en oro a través de la acción del mercurio, otros lo usaban para protegerse contra los malos espíritus y purificar la sangre. Además, siempre se creyó que el mercurio poseía propiedades curativas y se utilizó durante los siglos XV al XX como antiséptico, laxante o para curar enfermedades tales como la sífilis y la tiña.

Su nombre castellano procede del dios Mercurio⁵¹, aunque existe la creencia que en la antigüedad a cada metal se le asignaba un cuerpo celeste, siendo el planeta mercurio el asignado a este elemento. Para evitar confusiones con idénticos nombres (metal, planeta y dios) los griegos llamaron al metal "*Hidrargiro*" palabra que significa plata líquida, mientras que los romanos latinizaron esta expresión en "*Hidrargyrum*" que quiere decir plata viva. De esta denominación proceden el símbolo químico del mercurio (Hg) y el sustantivo "*Hidrargirismo*", intoxicación producida por el vapor de mercurio o por algunos de sus compuestos.

2.2.2. Propiedades Físico-Químicas

Se encuentra en el grupo 12 de la Tabla Periódica junto con el cadmio y el cinc. El mercurio elemental es un metal denso, con una densidad a 20 °C de $13,5955 \text{ g cm}^{-3}$, por lo que se considera un metal pesado. De color blanco, con brillo de plata, inalterable al aire, incluso en ambientes húmedos¹¹. Se encuentra en estado líquido bajo condiciones normales de presión y temperatura. Debido a su gran tensión superficial tiende a dividirse en gotitas cuando se le esparce en una superficie plana¹¹ (**Figura N°2.3**).



Fig. N°2.3.: Gota de mercurio elemental a presión ambiental

Su símbolo químico es Hg, posee un número atómico de 80, un peso atómico de 200,59 u.m.a., con valores de temperatura de fusión de y ebullición a presión normal $-38,87^{\circ}\text{C}$ (la más baja de todos los metales) y $356,58^{\circ}\text{C}$ respectivamente. La presión de vapor del elemento es independiente de la temperatura, vaporizándose rápidamente en condiciones normales.

Presenta siete isótopos estables y cuatro isótopos radioactivos inestables (**Tabla 2.4.**) y tres estados de oxidación: Hg(0) metálico, Hg(I) mercurioso y Hg(II) mercúrico, siendo sus propiedades químicas muy diferentes. Las formas mercuriosas y mercúricas pueden formar un gran número de compuestos inorgánicos (sales mercuriosas y mercúricas) y orgánicos (metilmercurio, dimetilmercurio y fenilmercurio), aunque la forma mercuriosa no es estable bajo condiciones ambientales normales⁵² (**Tabla 2.5. y Tabla 2.6.**).

Tabla 2.4. Isótopos del Mercurio

Isótopos Estables	Abundancias Isotópicas (%)	Isótopos Inestables
^{196}Hg	0,15	^{194}Hg
^{198}Hg	9,97	^{195}Hg
^{199}Hg	16,87	^{197}Hg
^{200}Hg	23,10	^{203}Hg
^{201}Hg	13,18	
^{202}Hg	29,86	
^{204}Hg	6,87	

Tabla 2.5. Clasificación de las Especies de Mercurio⁵³

Especies Volátiles	$\text{Hg}^0 - \text{Hg}(\text{CH}_3)_2$
Especies Reactivas	Hg^{2+} acomplejada con materia orgánica $\text{HgX}^+ - \text{HgX}_2 - \text{HgX}^{3-} - \text{HgX}^{4-}$ HgO sobre partículas de aerosol
Especies No Reactivas	$\text{CH}_3\text{Hg}^+ - \text{CH}_3\text{HgCl} - \text{CH}_3\text{HgOH}$ $\text{Hg}(\text{CN})_2 - \text{HgS}$

Tabla 2.6. Principales compuestos inorgánicos y orgánicos del mercurio. Adaptado de AZEVEDO⁵⁴

Compuestos Inorgánicos		Compuestos Orgánicos	
Sulfuro de Mercurio (II)	HgS (Cinabrio)	Cloruro de Metilmercurio	$\text{H}_3\text{C-Hg-Cl}$
Cloruro de Mercurio (II)	HgCl_2	Dimetilmercurio	$\text{H}_3\text{C-Hg-CH}_3$
Cloruro de Mercurio (I)	Hg_2Cl_2	Dietilmercurio	$\text{H}_3\text{C-CH}_2\text{-Hg-CH}_2\text{-CH}_3$
Óxido de Mercurio (II)	HgO	Fenilmercurio	$\text{H}_5\text{C}_6\text{-Hg}^+$
Óxido de Mercurio (I)	Hg_2O		
Nitrato de Mercurio (I)	$\text{Hg}_2(\text{NO}_3)_2$		

El mercurio no es un elemento abundante. Ocupa el número 62 en la clasificación de elementos por orden de importancia en la corteza terrestre. Su abundancia es solamente del $0,5 \times 10^{-5}\%$ en peso, que corresponde a $2,5 \times 10^{-7}$ átomos por cada 100 átomos de silicio⁵⁵.

A temperatura ambiente conduce mal la corriente eléctrica, pero se convierte en un excelente conductor en las proximidades del cero absoluto (superconductor). A elevada temperatura, en estado de vapor, conduce la electricidad¹¹.

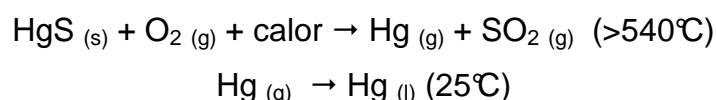
Su coeficiente de dilatación térmica es prácticamente uniforme entre 0°C y 300°C por lo que se utiliza en la construcción de termómetros. Por su elevada densidad y baja presión de vapor se usa también en barómetros y bombas de vacío.

Disuelve numerosos metales con formación de amalgamas; sin embargo, no lo hace con el hierro por lo que se comercializa y conserva en frascos de ese metal.

Se combina con el azufre y halógenos, pero es realmente inerte excepto frente al ácido nítrico que es su mejor disolvente, tanto diluido como concentrado, en frío y en caliente; también es soluble en ácido sulfúrico, pero sólo concentrado y en caliente.

2.2.3. Producción y Usos Industriales

El mercurio se extrae como sulfuro de mercurio (II): HgS en minas de mineral de cinabrio. La forma metálica se refina a partir del cinabrio mediante un proceso de tostación a temperaturas superiores a los 540°C en las que el cinabrio no es estable y se descompone. De esta manera se vaporizan el mercurio y dióxido de azufre y por condensación se genera mercurio metálico líquido^{56,57}.



A pesar de que el elemento mercurio y sus compuestos no tienen ninguna función metabólica conocida y que su presencia en los organismos vivos se considera indeseable y potencialmente peligrosa⁵⁸, no ocurre lo mismo

con sus aplicaciones ya que son variadas y útiles. Los empleos del mercurio son conocidos desde la antigüedad ya que la extracción de cinabrio y su posterior transformación en azogue (nombre antiguo dado al elemento mercurio) es una actividad desde comienzos de nuestra era. Por tanto, uno de los primeros usos que cabe destacar es su empleo en minería y metalurgia^{58,59}. Así, el elemento mercurio adquirió trascendencia gracias a su utilización, a partir de mediados del siglo XVI, en los procesos de extracción de oro y plata mediante amalgamación.

Dentro de sus aplicaciones; las agrícolas son las más importantes, ya que forma parte de pesticidas y fungicidas (tratamientos de semillas a base de fenilmercurio que se aplica a los cultivos para evitar plagas).

Se usa también en la industria del cloro-álcali como catalizador, que produce NaOH y Cl_{2(g)} de alto grado de pureza como productos de consumo^{60,61}. Ciertos equipos electrónicos y eléctricos como los interruptores o las lámparas fluorescentes y espectrofotómetros ultravioletas (UV) lo utilizan como materia prima^{60,61,62}. En la fabricación de pinturas, puede emplearse como pigmento en forma de sulfuro de mercurio (HgS), y como fungicida para evitar la decoloración provocada por los microorganismos^{60,61,63}.

Otros usos del mercurio incluyen aleación por amalgama de los empastes dentales^{60,61,64}, fabricación de termómetros, de plásticos, instrumentos de medida como barómetros, hidrómetros o pirómetros, cosméticos, cremas y jabones, detergentes, recubrimiento de espejos, así como su empleo en investigación y en santería^{58,60,63,65}.

Actualmente la mayoría de las aplicaciones del mercurio se fundamentan en sus usos industriales que dependen principalmente del aprovechamiento de algunas de sus propiedades físico-químicas como volumen de expansión, conductividad eléctrica y capacidad para alearse con otros metales.

2.2.4. Distribución Ambiental del Mercurio

El mercurio es uno de los elementos inorgánicos más estudiado desde el punto de vista toxicológico ambiental, como lo demuestra la gran disponibilidad de referencias bibliográficas al respecto^{66,67,68,69}.

En el ambiente, el mercurio elemental puede combinarse con cloro, azufre y otros elementos para formar sales y complejos inorgánicos. La biotransformación del mercurio inorgánico a metilmercurio: CH_3Hg^+ por microorganismos acuáticos es la responsable de la bioacumulación del metilmercurio⁷⁰. Debido a su toxicidad, a su movilización como formas metiladas generadas por la acción de bacterias anaerobias y a otros factores de contaminación, el mercurio causa mucha preocupación como metal pesado contaminante⁷¹.

Se encuentra naturalmente en la corteza terrestre, alrededor de $80 \mu\text{g kg}^{-1}$. Las fuentes de emisión de mercurio se deben a procesos naturales como la actividad volcánica, los incendios forestales, la erosión de las rocas, el movimiento de masas de aguas de ríos y lagos, y los procesos biológicos.

La actividad humana, en particular, desde la revolución industrial de finales del siglo XVIII e inicios del XIX, contribuyó al aumento significativo del mercurio y sus compuestos⁷². Entra en el medio ambiente desde un gran número de fuentes diversas relacionadas con el uso del elemento por el hombre. Éstas incluyen los productos químicos de laboratorio desechados, baterías, termómetros rotos, la quema de combustibles fósiles (en especial de carbón), la minería de mercurio, de plata y de oro (donde el mercurio es utilizado como amalgama y luego liberado a la atmósfera por evaporación), los pesticidas, los procesos de producción de cloro e hidróxido de sodio, y los equipos médicos y dentales y, anteriormente, fungicidas para el césped y productos farmacéuticos.

Una tercera fuente también es la remoción de fuentes históricas de mercurio, por ejemplo, en suelos, sedimentos, agua, y residuos no tratados⁷⁰.

Cada una de estas fuentes, tomadas individualmente, puede no contribuir mucho al balance total de metal tóxico, pero el efecto global puede ser sustancial⁷¹. El riesgo de exposición solo puede ser minimizado mediante el control estricto del movimiento del elemento en el ambiente, evitando su derivación hacia fuentes de agua en donde se transforma en su forma más tóxica⁷³. Existen técnicas de remediación para este metal contaminante, como los rellenos sanitarios, procesos de lavado y lixiviación, tratamientos térmicos;

pero sus costos son muy elevados^{74,75}. Actualmente se está trabajando en métodos de biorremediación, más baratos como la fitorremediación⁷⁶.

En nuestro país son motivo de preocupación los impactos sanitarios y ambientales que significa la cesión de mercurio al ambiente, su modificación desde formas metálicas hacia formas orgánicas y su consiguiente ingreso en la cadena alimentaria, es por eso que a partir de la Ley 24.051 sobre régimen de residuos peligrosos: generación, manipulación, transporte y tratamiento, se han sancionado diversos decretos y resoluciones a fin de fortalecer las medidas preventivas de contaminación por mercurio en el ambiente, como ser el Decreto N° 181/1992, Decreto N° 831/1993, Resolución N° 139/2009 y Resolución N°274/2010.

2.2.4.1. Contaminación del Aire

El vapor de mercurio emergente de suelo y agua ingresa a la atmósfera, donde es transportado y redistribuido sobre la superficie terrestre. Este mercurio atmosférico puede ser absorbido por el fitoplancton o ingerido por el zooplancton, otros microorganismos o por los peces⁷².

La química atmosférica del mercurio implica diversas interacciones entre las especies presentes. El ciclo está dominado por mercurio elemental (más del 95%). Su lenta oxidación permite que se resida en la atmósfera aproximadamente un año, tiempo suficiente para que se distribuya sobre todo el planeta. El resto, aparece en la forma mercúrica (Hg^{2+}) tanto unido a partículas en suspensión como, en menor medida, en forma gaseosa⁷⁷. Se ha encontrado que el escaso Hg^{2+} que se encuentra en forma gaseosa es depositado por vía húmeda de manera mucho más rápida (desde horas a meses) que el Hg^{2+} unido a partículas (su tiempo de residencia es similar al mercurio metálico)⁷⁸.

Otras especies como metilmercurio: CH_3Hg^+ y dimetilmercurio: $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ también han sido detectadas en el aire en muy baja concentración⁷⁹.

Los niveles del elemento y compuestos derivados son generalmente mayores en áreas urbanas e industriales.

2.2.4.2. Contaminación del Suelo

El estado químico en el que se encuentra en el suelo está relacionado con propiedades tales como el carácter químico de la fase acuosa, el pH, el potencial de reducción y el contenido orgánico en la matriz del suelo con capacidad para formar complejos (posee alta afinidad por este tipo de materia)⁸⁰. Además este metal se adsorbe a minerales arcillosos y óxidos de hierro, aluminio y manganeso. Aunque los complejos inorgánicos son bastante solubles en agua y, por tanto, de gran movilidad; muchos de ellos forman nuevos complejos con la materia orgánica (principalmente con los ácidos fúlvicos y húmicos, polímeros naturales componentes del suelo) y coloides minerales del suelo o sedimento. Son este tipo de complejos los que principalmente definen el comportamiento del mercurio.

El mecanismo de acumulación de mercurio en los vegetales se conoce a través de dos fuentes: absorbido a partir de la atmósfera, mediante procesos de intercambio gaseoso en la superficie de la hoja; o bien, tomando del suelo el mercurio disponible, en la forma soluble e intercambiable. La absorción de gases de Hg^0 a través de las hojas es mucho más eficiente que la absorción de Hg^{2+} por las raíces. Las plantas muestran gran capacidad para acumular mercurio en las partes aéreas, así como para absorber el elemento en suelos con altos contenidos de mercurio⁸¹.

2.2.4.3. Contaminación del Agua

Debido a que hay pocas fuentes naturales del mercurio importantes y a qué la mayoría de los compuestos inorgánicos de este elemento son relativamente insolubles, durante algún tiempo se supuso que el mercurio no era un serio contaminante del agua⁷¹. Sin embargo, las concentraciones inesperadamente altas de mercurio encontradas en el agua y en los tejidos de los peces son el resultado de la formación del ión metilmercurio soluble (CH_3Hg^+) y del dimetilmercurio volátil (CH_3HgCH_3), por acción de bacterias anaerobias presentes en los sedimentos. El mercurio de estos compuestos se concentra en el tejido graso del pez. El agente de metilación por el que el mercurio inorgánico se convierte en compuestos de metilmercurio es la metilcobalamina, que se cree es un intermediario en la síntesis de metano

realizada por las bacterias metanogénicas y ciertos hongos de los sedimentos acuáticos⁸².

La destrucción o transformación de contaminantes tóxicos en aguas es un aspecto relevante de la química y tecnología ambiental. El desarrollo de nuevas tecnologías para la remediación de ambientes contaminados está incluido dentro del área prioritaria "Conocimiento y Uso Sustentable de los Recursos Naturales Renovables y Protección del Medio Ambiente" del Plan Estratégico Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación "Bicentenario" (2006 - 2010) establecido por el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. En nuestro país, la presencia de contaminantes en aguas naturales e industriales, sobre todo en aquellas destinadas a consumo humano, incide gravemente en la calidad de vida de extensas porciones de la población. Entre sus contaminantes se destacan por su presencia en efluentes industriales, su elevada toxicidad y por la dificultad de su tratamiento, los metales pesados como mercurio, plomo, arsénico, cadmio y cromo, los cuales han sido clasificados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) entre las 20 sustancias químicas más peligrosas para la salud humana.

En la **Tabla 2.7.** se dan valores guía para estos contaminantes establecidos por las legislaciones internacional (basados en datos proporcionados por la Organización Mundial de la Salud - OMS) y Nacional (cifras dispuestas por el Código Alimentario Argentino - CAA).

Tabla 2.7. Concentraciones Máximas Permitidas en Diferentes Fuentes de Agua

Especies Químicas	Consumo Humano (OMS) ^{a,83}	Consumo Humano (CAA) ^{b,84}	Bebida para Ganado ⁸⁵	Agua de Riego ⁸⁵
As	10 µg L ⁻¹	10 µg L ⁻¹	500 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹
Cd	3 µg L ⁻¹	5 µg L ⁻¹	20 µg L ⁻¹	No Regulado
Cr	50 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	1000 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹
Hg	6 µg L ⁻¹	1 µg L ⁻¹	3 µg L ⁻¹	No Regulado

Pb	10 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹	200 µg L ⁻¹
----	-----------------------	-----------------------	------------------------	------------------------

^a OMS: Organización Mundial de la Salud

^b CAA: Código Alimentario Argentino

2.2.4.4. Ciclo del Mercurio

Se define como *ciclo del mercurio* al flujo continuo del elemento en la atmósfera, suelo y agua, basado en el comportamiento del Hg en los diferentes medios, en las reacciones químicas involucradas, así como en la forma de transporte y su destino final (Figura N°2.4).

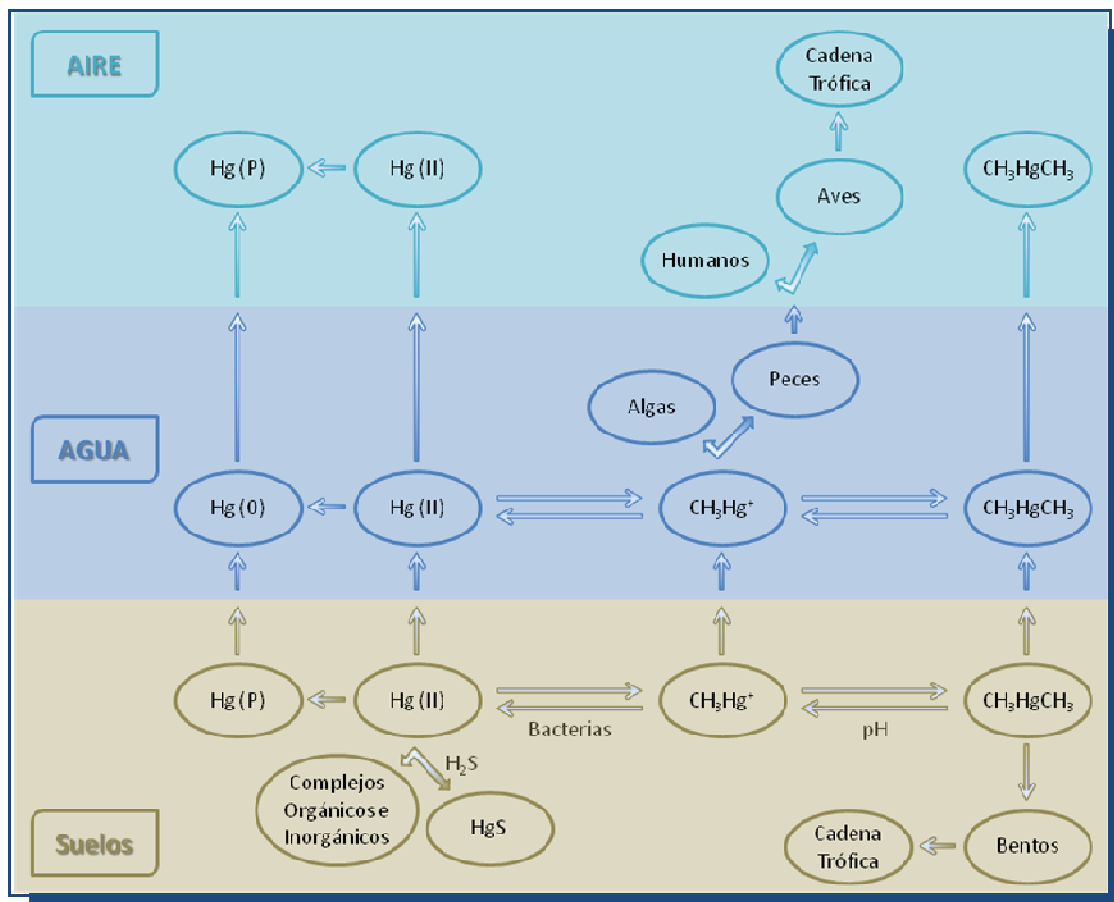


Fig. N°2.4.: Interacciones en la Distribución del Mercurio entre los Compartimentos Ambientales

En el agua, el mercurio se encuentra principalmente en forma inorgánica, la cual puede transformarse en compuestos orgánicos por acción de los microorganismos presentes en los sedimentos. De éstos, puede ser absorbido por el plancton, las algas y, sucesivamente, transmitirse a los

organismos de niveles tróficos superiores como los peces, las aves rapaces e, incluso, el hombre. Una parte del metal que se encuentra disuelto puede evaporarse e ingresar a la atmósfera; al ser una forma estable y poco soluble en agua, se transporta por las corrientes de aire y se acumula en las nubes o neblinas donde es oxidado, para luego precipitarse a los ecosistemas terrestres a través de lluvia o nieve^{86,87,88} y depositarse así en los suelos.

En el suelo, el mercurio se encuentra principalmente en forma inorgánica, puede formar parte de la materia orgánica y ser incorporado a las plantas por absorción a través de las raíces, o convertirse en formas orgánicas a través de la acción de bacterias. Puede evaporarse al ambiente, biomagnificarse a través de la cadena trófica o ser arrastrado a los océanos, a través de los mantos superficiales y profundos, con lo que se cierra el ciclo del mercurio en la naturaleza⁸⁹ (Figura N° 2.5.).

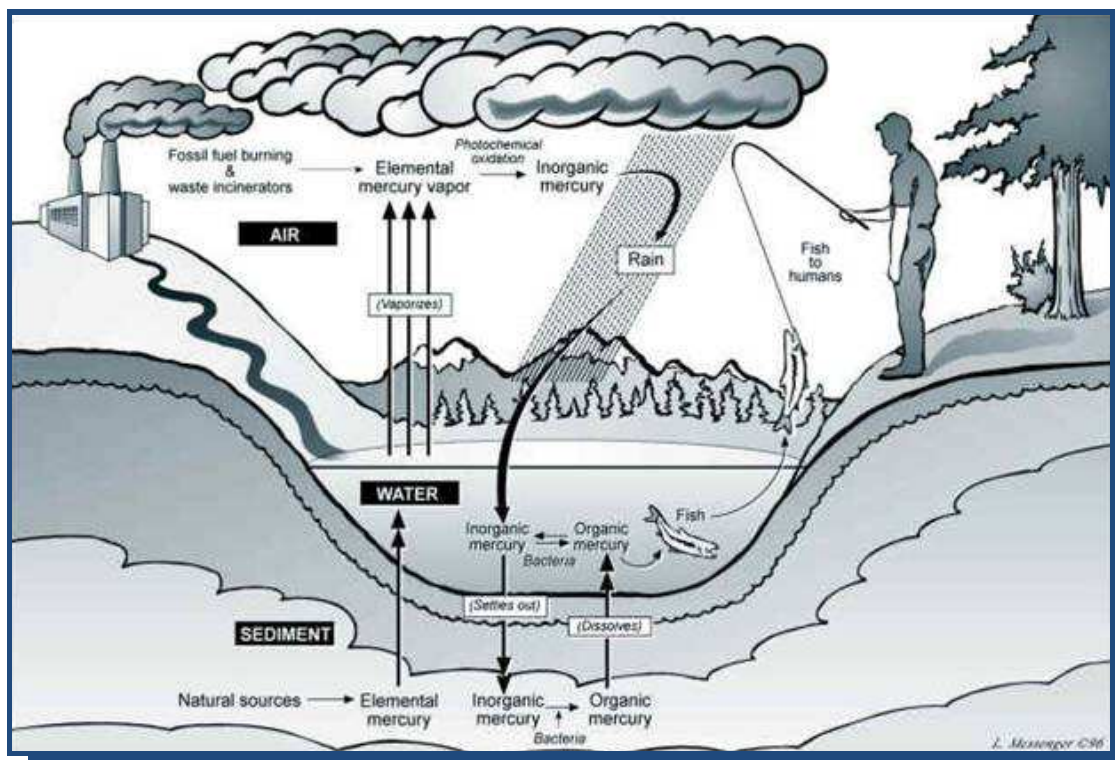


Fig. N°2.5.: Ciclo del Mercurio
Fuente: http://www.mercury.utah.gov/atmospheric_transport.htm

2.2.5. Toxicocinética del Mercurio

El mercurio metálico no se absorbe por vía cutánea. Por vía digestiva podría absorberse si se encontrara bien disuelto en el bolo alimenticio. Por el contrario los vapores se absorben en un 90%. Atraviesa la membrana alveolar pulmonar hacia la sangre y tejidos, donde el Hg^0 se oxida a ión mercúrico perdiendo la capacidad de difundirse. Queda luego retenido en los glóbulos rojos, sistema nervioso central y riñones⁹⁰ (gran afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas). La vida media en el organismo es de 23 - 40 días.

Los compuestos inorgánicos se absorben hasta un 20% por vía digestiva (a mayor solubilidad mayor biodisponibilidad) y muy poco por vía respiratoria o cutánea (debido a su carácter hidrofílico) a menos que los productos sean cáusticos aumentando el porcentaje de absorción al lesionar piel o mucosas. No obstante, las sales inorgánicas como el HgCl_2 tampoco acceden al cerebro tan eficazmente como lo hacen el metilmercurio: CH_3Hg^+ o los vapores de mercurio metálico. Afectan a los riñones y pueden dañar el estómago y los intestinos, únicamente si estos compuestos son ingeridos en grandes cantidades⁹¹.

Los compuestos organomercuriales son solubles en los lípidos y disolventes orgánicos por lo que son absorbidos de manera más eficaz y atraviesan con mayor facilidad las membranas biológicas que los compuestos inorgánicos. Los fenilmercurio tienen un 50% de absorción y los alquilvercurio un 80% por vía digestiva. Los alquilvercurio también se absorben por piel y pulmón. La mayor parte del metilmercurio: CH_3Hg^+ va al cerebro, hígado y riñón. Su carácter lipofílico junto con su difícil eliminación (vida media 70 días) le proporciona la propiedad de bioacumularse. Liberan lentamente mercurio metálico. La desmetilación ocurre en riñón, hígado, bazo y heces, y la desetilación en riñón e hígado.

Dentro del organismo, los compuesto del mercurio y mercurio elemental, circulan en sangre unidos a las membranas celulares. Se acumulan en riñones (túbulo contorneado proximal y asa de Henle). Atraviesan la barrera hematoencefálica y la placentaria. En las células se acumulan en los lisosomas

y mitocondrias. Los alquilderivados por ser liposolubles tienen gran neurotropismo.

Su eliminación es principalmente renal y a través de las heces desde el hígado por vía biliar (circuito enterohepático). Puede encontrarse en menor medida en saliva, lágrimas y sudor.

2.2.6. Efectos Toxicológicos

La intoxicación por mercurio se denomina hidrargirismo o mercurialismo. La intoxicación aguda por mercurio inorgánico provoca gastroenteritis y nefritis, que desemboca en insuficiencia renal; aunque rara, es posible la intoxicación crónica por sales de mercurio, cuyas manifestaciones son básicamente nerviosas.

El mercurio elemental y el metilmercurio: CH_3Hg^+ son tóxicos para el sistema nervioso central y el periférico. La inhalación de vapor de mercurio es perjudicial para los sistemas nervioso e inmunitario, el aparato digestivo y los pulmones y riñones, con consecuencias a veces fatales. Las sales de mercurio inorgánicas son corrosivas para la piel, los ojos y el tracto intestinal y, al ser ingeridas, pueden resultar tóxicas para los riñones⁹².

Tras la inhalación o ingestión de distintos compuestos de mercurio o tras la exposición cutánea a ellos se pueden observar trastornos neurológicos y del comportamiento, con síntomas como temblores, insomnio, pérdida de memoria, efectos neuromusculares, cefalea o disfunciones cognitivas y motoras. Se han descrito efectos en los riñones que van de la proteinuria a la insuficiencia renal.

El mercurio inorgánico tiene una gran afinidad por el sulfuro de forma que su modo de actuación principal en los organismos vivos es, por un lado, la interferencia en las funciones enzimáticas y la síntesis de proteínas mediante su unión a grupos sulfidrilo, y por otro, la precipitación de proteínas, en especial las sintetizadas por las neuronas⁹³.

En la **Tabla 2.8.** se resumen los principales puntos de ataque de los compuestos del mercurio en los diferentes compartimentos de organismos superiores y los daños ocasionados.

Tabla 2.8. Efectos Patológicos de los Compuestos del Mercurio

Punto de Ataque	Acción
Células	La membrana celular contiene grupos -SH que son esenciales para las propiedades normales de permeabilidad y transporte de la membrana celular. Estos grupos - SH tienen una elevadísima afinidad por el mercurio y sus compuestos. Disminuye la producción energética celular y la actividad mitocondrial, por inhibición de la síntesis de proteínas que entran en las estructuras de las mitocondrias. En la membrana lisosomal, se liberan enzimas proteolíticas que son factores potenciales de necrosis celular.
Sistema Renal	Disminuye la actividad de las fosfatasa alcalinas en las células tubulares proximales del riñón, en el cerebro y en los neutrófilos. El mercurio también perturba los sistemas de transporte del túbulo proximal: transporte de potasio y ATP-asa de membrana.
Sistema Nervioso	Disminuye el transporte activo de azúcares, aminoácidos y precursores de ácidos nucleicos en las proteínas de estructura y en las enzimáticas, provocando así la muerte celular. Las células más sensibles serían las neuronas del cerebro y cerebelo.
Sistema Inmunológico	Disminuye los anticuerpos humorales.
Genes	El mercurio puede fijarse sobre los ácidos desoxirribonucleicos con desnaturalización bihelicoidal o asociaciones reversibles con las bases (adenina, timina). Esto puede explicar las aberraciones cromosómicas y anomalías congénitas observadas durante las intoxicaciones alimentarias con el metilmercurio.

La captación de mercurio por parte de las plantas juega un papel muy importante en la entrada de los metales a las cadenas alimentarias terrestres. En las plantas terrestres vasculares, puede ocurrir por las raíces o por medio de las hojas, a través de estomas⁹⁴. Las plantas marítimas absorben el mercurio acumulado en los sedimento a través de sus raíces, contrario a otras plantas que lo absorben por la hojas y follaje y adicionalmente tienen un gran capacidad para acumular cantidades importantes de mercurio y metilmercurio⁹⁵.

En las plantas, los efectos de los metales empiezan en la raíz, ya que este es el órgano responsable de asimilar los nutrientes del medio, y afectan sucesivamente el resto de la planta⁹⁶. En las hojas se producen graves daños en los cloroplastos y las mitocondrias, lo que altera los procesos de fotosíntesis y de respiración. En una fase más avanzada de alteración se producen intensos cambios metabólicos y de regulación celular, y ocurre finalmente el

estímulo de la senescencia por acumulación crónica del metal pesado, lo que puede resultar en la muerte de la planta⁹⁷.

¹ Hatfield, D.L.; Berry, M.J.; Gladyshev, V.N. (2012). *Selenium: Its molecular biology and role in human health*. 3^{ra} edición. Editorial Springer, Nueva York.

² Rotruck, J.T.; Pope, A.L.; Ganther, H.E.; Swanson, A.B.; Hafeman, D.G.; Hoekstra, W.G. (1973). *Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase*. *Science*. Volume 179, Issue 4079, p. 588-590.

³ Greenwood, N.N.; Earnshaw, A. (1997). *Chemistry of the elements*. 2^{da} edición. Editorial Butterworth-Heinemann, Boston.

⁴ Miessler, G.L.; Fischer, P.J.; Tarr, D.A. (2013). *Inorganic Chemistry*. 5^{ta} edición. Editorial Prentice Hall, Nueva Jersey.

⁵ Brown, K.M.; Arthur, J.R. (2001). *Selenium, selenoproteins and human health: A review*. *Public Health Nutrition*. Volume 4, Issue 2B, p. 593-599.

⁶ Brigelius-Flohé, R. (2008). *Selenium Compounds and Selenoproteins in Cancer*. *Chemistry & Biodiversity*. Volume 5, Issue 3, p. 389–395.

⁷ Rayman, M.P.; Infante, H.G.; Sargent, M. (2008). *Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation*. *British Journal of Nutrition*. Volume 100, Issue 2, p. 238-253.

⁸ Levander, O.A. (1987). *A Global View of Human Selenium Nutrition*. *Annual Review of Nutrition*. Volume 7, p. 227-250.

⁹ Coplen, T.B.; Böhlke, J.K.; De Bièvre, P.; Ding, T.; Holden, N.E.; Hopple, J.A.; Krouse, H.R.; Lamberty, A.; Peiser, H.S.; Revesz, K.; Rieder, S.E.; Rosman, K.J.R.; Roth, E.; Taylor, P.D.P.; Vocke Jr., R.D.; Xiao, Y.K. (2002). *Isotope-abundance variations of selected elements (IUPAC Technical Report)*. *Pure and Applied Chemistry*. Volume 74, Issue 10, p. 1987-2017.

¹⁰ House, J. (2012). *Inorganic Chemistry*. 2^{da} edición. Editorial Academic Press, Nueva York.

- ¹¹ Burriel Martí, F.; Lucena Conde, F.; Arribas Jimeno, S.; Hernández Méndez, J. (2003). *Química Analítica Cuantitativa*. 18^{va} edición. Editorial Paraninfo, Madrid.
- ¹² Emsley, J. (2011). *Nature's building blocks: An A-Z guide to the elements. New Edition*. 2^{da} edición. Oxford University Press, New York.
- ¹³ Wright, J. (2003). *Routledge introductions to environment: Environmental chemistry*. Editorial Routledge, Taylor & Francis Group, Londres.
- ¹⁴ Kim, D.; Park, J.S.; Yen, T.F. (2012). *Feasibility study on cross-linked biopolymeric concrete encapsulating selenium glass wastes*. Journal of the Air & Waste Management Association. Volume 62, Issue 8, p. 898-904.
- ¹⁵ Giancoli, D.C. (2006). *Física: Principios con aplicaciones*. 6^{ta} edición. Editorial Pearson Educación, México.
- ¹⁶ Kavlak, G.; Graedel, T.E. (2013). *Global anthropogenic selenium cycles for 1940–2010*. Resources, Conservation and Recycling. Volume 73, p. 17-22.
- ¹⁷ Gennaro, A.R. (2003). Remington Farmacia, Volumen 1. 20^{ma} edición. Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires.
- ¹⁸ Companioni, B.; Medrano, J.; Torres, J.A.; Flores, A.; Rodríguez, E.; Benavides, A. (2011). *Protective action of sodium selenite against fusarium wilt in tomato: Total protein contents, levels of phenolic compounds and changes in antioxidant potential*. ISHS Acta Horticulturae 947: II International Symposium on Soilless Culture and Hydroponics. Volume 1, Article number 41, p. 321-327.
- ¹⁹ Claramunt Vallespí, R.M.; Cornago Ramírez, P.; Esteban Santos, S.; Farrán Morales, A.; Pérez Torralba, M.; Sanz del Castillo, D. (2013). Principales compuestos químicos. Editorial UNED.
- ²⁰ Kronenberg, H.M.; Melmed, S.; Polonsky, K.S.; Larsen, P.R. (2009). *Williams Tratado de Endocrinología*. 11^{va} edición. Editorial Elsevier España S.L., Barcelona.
- ²¹ Fernández-Martínez, A.; Charlet, L. (2009). *Selenium environmental cycling and bioavailability: A structural chemist point of view*. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. Volume 8, Issue 1, p. 81–110.

- ²² Thompson-Eagle, E.T.; Frankenberger Jr., W.T.; Karlson U. (1989). *Volatilization of Selenium by Alternaria alternata*. Applied and Environmental Microbiology. Volume 55, Issue 6, p. 1406-1413.
- ²³ Cutter, G.A. (1985). *Determination of selenium speciation in biogenic particles and sediments*. Analytical Chemistry. Volume 57, Issue 14, p. 2951-2955.
- ²⁴ Hashimoto, Y.; Hwang, J.Y.; Yanagisawa S. (1970). Possible source of atmospheric pollution of selenium. Environmental Science & Technology. Volume 4, Issue 2, p. 157-158.
- ²⁵ Muños Olivas, R.; Donard, O.F.X.; Cámara, C.; Quevauviller, P. (1994). *Analytical techniques applied to the speciation of selenium in environmental matrices*. Analytica Chimica Acta. Volume 286, Issue 3, p. 357-370.
- ²⁶ De Gregori, I.; Lobos, M.G.; Pinochet, H. (2002). *Selenium and its redox speciation in rainwater from sites of Valparaíso region in Chile, impacted by mining activities of copper ores*. Water Research. Volume 36, Issue 1, p. 115-122.
- ²⁷ D'Ulivo, A. (1997). *Critical Review. Determination of Selenium and Tellurium in Environmental Samples*. Analyst. Volume 122, Issue 12, p. 117R-144R.
- ²⁸ Séby, F; Potin-Gautier, M.; Lespés, G.; Astruc, M. (1997) *Selenium speciation in soils after alkaline extraction*. Science of the Total Environment. Volume 207, Issues 2-3, p. 81-90.
- ²⁹ Wu, L. (1994). *Selenium in the Environment*. Editorial Marcel Dekker Inc., Nueva York.
- ³⁰ Hamilton, S.J. (2004). *Review of selenium toxicity in the aquatic food chain*. Science of the Total Environment. Volume 326, Issues 1-3, p. 1-31.
- ³¹ Bruland, K.W. (1983). *Chemical oceanography: Trace elements in seawater*. 2^{da} edición. Editorial Academic Press London, Londres.
- ³² Oremland, R.S. (1994). *Selenium in the Environment*. Editorial Marcel Dekker Inc., Nueva York.

- ³³ Luoma, S.N.; Presser T.S. (2009). *Emerging Opportunities in Management of Selenium Contamination*. Environmental Science & Technology. Volume 43, Issue 22, p. 8483-8487.
- ³⁴ Winkel, L.H.E.; Annette Johnson, C.; Lenz, M.; Grundl, T.; Leupin, O.X. Amini, M.; Charlet, L. (2012). *Environmental Selenium Research: From Microscopic Processes to Global Understanding*. Environmental Science & Technology. Volume 46, Issue 2, p. 571-579.
- ³⁵ Schwarz, K.; Foltz, C.M. (1957). *Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration*. Journal of the American Chemical Society. Volume 79, Issue 12, p. 3292-3293.
- ³⁶ Rotruck, J.T.; Pope, A.L.; Ganther, H.E.; Swanson, A.B.; Hafeman, D.G.; Hoekstra, W.G. (1973). *Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase*. Science. Volume 179, Issue 73, p. 588-590.
- ³⁷ Sancak, B.; Ünal, A.; Candan, S.; Coşkun, U.; Günel, N. (2003). *Association between oxidative stress and selenium levels in patients with breast cancer at different clinical stages*. The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine. Volume 16, Issues 2-3, p. 87-94.
- ³⁸ Chu, F.F.; Esworthy, R.S.; Doroshov, J.H. (2004). *Role of Se-dependent glutathione peroxidases in gastrointestinal inflammation and cancer*. Free Radical Biology and Medicine. Volume 36, Issue 12, p. 1481-1495.
- ³⁹ Clark, L.C.; Combs, G.F.; Turnbull, B.W.; Slate, E.H.; Chalker, D.K.; Chow, J.; Davis, L.S.; Glover, R.A.; Graham, G.F.; Gross, E.G.; Krongrad, A.; Leshner, J.L.; Park, H.K.; Sanders, B.B.; Smith, C.L.; Taylor, J.R. (1996). *Effects of Selenium Supplementation for Cancer Prevention in Patients With Carcinoma of the Skin A Randomized Controlled Trial*. The Journal of the American Medical Association. Volume 276, Issue 24, p. 1957-1963.
- ⁴⁰ Spallholz, J.E.; Palace, V.P.; Reid, T.W. (2004). *Methioninase and selenomethionine but not Se-methylselenocysteine generate methylselenol and superoxide in an in vitro chemiluminescent assay: implications for the nutritional carcinostatic activity of selenoamino acids*. Biochemical Pharmacology. Volume 67, Issue 3, p. 547-554.

- ⁴¹ Whanger, P.D. (2004). *Selenium and its relationship to cancer: an update*. British Journal of Nutrition. Volume 91, Issue 1, p. 11-28.
- ⁴² Corcoran, N.M.; Najdovska, M.; Costello, A.J. (2004). *Inorganic Selenium Retards Progression of Experimental Hormone Refractory Prostate Cancer*. Journal of Urology. Volume 171, Issue 2, Part 1, p. 907-910.
- ⁴³ Pérez Beriain, R.M.; García de Jalón Comet, A.; Escanero Marcén, J.F. (2001). *La enfermedad de Kashin-Beck*. Revista Española de Enfermedades Metabólicas Oseas. Volumen 10, Número 1, p. 1-2.
- ⁴⁴ Sappey, C.; Legrand-Poels, S.; Best-Belpomme, M.; Favier, A.; Rentier, B.; Piette, J. (1994). *Stimulation of Glutathione Peroxidase Activity Decreases HIV Type 1 Activation after Oxidative Stress*. AIDS Research and Human Retroviruses. Volume 10, Issue 11, p. 1451-1461.
- ⁴⁵ Kupka, R.; Msamanga, G.I.; Spiegelman, D.; Morris, S.; Mugusi, F.; Hunter, D.J.; Fawzi, W.W. (2004). *Selenium Status Is Associated with Accelerated HIV Disease Progression among HIV-1–Infected Pregnant Women in Tanzania*. The Journal of Nutrition. Volume 134, Issue 10, p. 2556-2560.
- ⁴⁶ Martínez-Blasco, A.; Bosch-Morell, F.; Trenor, C.; Romero, F.J. (1998). *Experimental diabetic neuropathy: Role of oxidative stress and mechanisms involved*. BioFactors. Volume 8, Issues 1-2, p. 41-43.
- ⁴⁷ Kipp, A.; Banning, A.; van Schothorst, E. M.; Méplan, C.; Schomburg, L.; Evelo, C.; Coort, S.; Gaj, S.; Keijer, J.; Hesketh, J.; Brigelius-Flohé, R. (2009). *Four selenoproteins, protein biosynthesis, and Wnt signalling are particularly sensitive to limited selenium intake in mouse colon*. Molecular Nutrition & Food Research. Volume 53, Issue 12, p. 1561-1572.
- ⁴⁸ Lyn, P. (1999). *Nutrients and HIV: Part one---Beta Carotene and Selenium*. Alternative Medicine Review. Volume 4, Issue 6, p. 403-413.
- ⁴⁹ Navarro Alarcón, M.; Gil Hernández, F.; Gil Hernández, A. (2010). *Selenio, manganeso, cromo, molibdeno, yodo y otros oligoelementos minoritarios*. Tratado de Nutrición Tomo I: Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la Nutrición. 2^{da} edición. Editorial Panamericana, Madrid.

- ⁵⁰ Arribas Jimeno, S. (1991). *La fascinante historia de la Alquimia descrita por un científico moderno*. Editorial Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo, Oviedo.
- ⁵¹ Moreno Grau, M.D. (2003). *Toxicología ambiental: Evaluación de riesgo para la salud humana*. Editorial McGraw-Hill Interamericana, Madrid.
- ⁵² Lee, D. S.; Nemitz, E.; Fowler, D.; Hill, P.; Clegg, S.; Kingdon, R.D. (2000). *Sources, Sinks and Levels of Atmospheric Mercury in the UK*. Defence Evaluation and Research Agency (DERA) Report for the Department of the Environment, Transport and the Regions, Farnborough. http://uk-air.defra.gov.uk/reports/empire/dera_hg1.pdf.
- ⁵³ Lovley, D.R. (2000). *Environmental microbe-metal interactions*. American Society for Microbiology, AMS Press. Washington, D.C.
- ⁵⁴ de Azevedo, F.A. (2003). *Toxicologia do mercúrio*. 1^{ra} edición. Editorial RIMA. São Carlos.
- ⁵⁵ Band, P.; Brusset, H.; Jousot-Dubien, J.; Lamure, J.; Pascal, P. (1962). *Nouveau Traité de Chimie Minerale*. Editorial Masson et Cie, Paris.
- ⁵⁶ The European Commission (2002). *Risk to health and the environment to the use of mercury products*. http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/files/studies/rpa-mercury_pdf.
- ⁵⁷ U.S. Geological Survey (2002). *Progress on geoenvironmental models for selected mineral deposit types*. <http://pubs.usgs.gov/of/2002/of02-195/OF-02-195-508-V5.pdf>.
- ⁵⁸ Eisler, R. (1987). *Mercury hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review*. U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report. 85, 1.10. http://www.pwrc.usgs.gov/eisler/CHR_10_Mercury.pdf.
- ⁵⁹ Sánchez Uría, J.E.; Sanz-Medel, A. (1998). *Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples*. Talanta. Volume 47, Issue 3, p. 509-524.
- ⁶⁰ Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA): Productos Químicos. (2007). *Evaluación mundial sobre el mercurio. Programa Interorganismos para la Gestión Racional de las Sustancias Químicas*. http://www.unep.org/PDF/AnnualReport/2007/UNEP_AR_2007_SP.pdf.

⁶¹ Boening, D.W. (2000). *Ecological effects, transport and fate of mercury: A general review*. Chemosphere. Volume 40, Issue 12, p. 1335-1351.

⁶² Seixas, S.; Bustamante, P.; Pierce, G. (2005). *Accumulation of mercury in the tissues of the common octopus *Octopus vulgaris* (L.) in two localities on the Portugues coast*. Science of the Total Environment. Volume 340, Issues 1-3, p. 113-122.

⁶³ Tchounwou, P.B.; Ayensu, W.K.; Ninashvili, N.; Sutton, D. (2003). *Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health*. Environmental Toxicology. Volume 18, Issue 3, p. 149-175.

⁶⁴ Clarkson, T.W.; Magos, L. (2006). *The toxicology of mercury and its chemical compounds*. Critical Reviews in Toxicology. Volume 36, Issue 8, p. 609-662.

⁶⁵ Gochfeld, M. (2003). *Cases of mercury exposure, bioavailability and absorption*. Ecotoxicology and Environmental Safety. Volume 56, Issue1, p. 174-179.

⁶⁶ Mergler, D.; Anderson, H.A.; Chan, L.H.M.; Mahaffey, K.R.; Murray, M.; Sakamoto, M.; Stern, A.H. (2007). *Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern*. AMBIO: A Journal of the Human Environment. Volume 36, Issue 1, p. 3-11.

⁶⁷ Stein, E.D.; Cohen, Y.; Winer, A.M. (1996). *Environmental distribution and transformation of mercury compounds*. Environmental Science & Technology. Volume 26, Issue 1, p. 1-43.

⁶⁸ Ullrich, S.M.; Tanton, T.W.; Abdrashitova, S.A. (2001). *Mercury in the aquatic environment: a review of factors affecting methylation*. Environmental Science & Technology. Volume 31, Issue 3, p. 241-293.

⁶⁹ Valentino, L.; Torregrossa, M.V.; Saliba, L.J. (1995). *Health effects of mercury ingested through consumption of seafood*. Water Science and Technology. Volume 32, Issues 9-10, p. 41-47.

⁷⁰ World Health Organization (2007). *Preventing disease through healthy environments. Exposure to mercury: a major public health concern*. World Health Organization Document Production Services, Geneva. <http://www.who.int/ipcs/features/mercury.pdf>.

⁷¹ Manahan, S.E. (2007). *Introducción a la química ambiental*. Editorial Reverté, S.A., Barcelona.

⁷² Rischer, J.F. (2003). *Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects*. Concise International Chemical Assessment Document 50. World Health Organization, Geneva. <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad50.pdf>.

⁷³ Rodrigues, A.R.; Souza, C.R.B.; Braga, A.M.; Rodrigues, P.S.S.; Silveira, A.T.; Damin, E.T.B.; Côrtes, M.I.T.; Castro, A.J.O.; Mello, G.A.; Vieira, J.L.F.; Pinheiro, M.C.N.; Ventura, D.F.; Silveira, L.C.L. (2007). *Mercury toxicity in the Amazon: contrast sensitivity and color discrimination of subjects exposed to mercury*. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. Volumen 40, Número 3, p. 415-424.

⁷⁴ Pilon-Smits, E.; Pilon, M. (2000). *Breeding mercury-breathing plants for environmental cleanup*. Trends in Plant Science. Volume 5, Issue 6, p. 235-236.

⁷⁵ Lehr, J.H. (2004). *Wiley's remediation technologies Handbook: Major contaminant chemicals and chemical groups*. Editorial Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey.

⁷⁶ Meagher, R.B. (2000). *Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants*. Current Opinion in Plant Biology. Volume 3, Issue 2, p. 153-162.

⁷⁷ Stratton, W.J.; Lindberg, S.E. (1995). *Use of a refluxing mist chamber for measurement of gas-phase mercury(II) species in the atmosphere*. Water, Air & Soil Pollution. Volume 80, Issues 1-4, p. 1269-1278.

⁷⁸ Tseng, C.M.; De Diego, A.; Martin, F.M.; Amouroux, D.; Donard, O.F.X. (1997). *Rapid Determination of inorganic mercury and methylmercury in biological reference materials by hydride generation, cryofocusing, atomic absorption spectrometry after open focused microwave-assisted alkaline digestion*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. Volume 12, Issue 7, p. 743-750.

⁷⁹ Bloom, N.; Fitzgerald, W.F. (1988). *Determination of volatile mercury species at the picogram level by low-temperature gas chromatography with an cold-*

vapor atomic fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*. Volume 208, p. 151–161.

⁸⁰ Schuster, E. (1991). *The behavior of mercury in the soil with special emphasis on complexation and adsorption processes. A review of the literature*. *Water, Air & Soil Pollution*. Volume 56, Issue 1, p. 667-680.

⁸¹ De Temmerman, L.; Waegeneers, N.; Claeys, N.; Roekens, E. (2009). *Comparison of concentrations of mercury in ambient air to its accumulation by leaf vegetables: An important step in terrestrial food chain analysis*. *Environmental Pollution*. Volume 157, Issue 4, p. 1337-1341.

⁸² Figueruelo Alejano, J.E.; Marino Dávila, M. (2004). *Química Física del Ambiente y de los Procesos Medioambientales*. Editorial Reverté, S.A., Barcelona.

⁸³ World Health Organization (2008). *Guidelines for drinking-water quality*. Third edition. Incorporating the first and second addenda. Volume 1, Recommendations. Geneva.
http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/fulltext.pdf.

⁸⁴ Código Alimentario Argentino (2007). http://w.w.w.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_XII.pdf.

⁸⁵ Secretaría de recursos hídricos de la República Argentina (1991). *Decreto N° 831/1993. Decreto Reglamentario de la Ley 24.051 sobre régimen de desechos peligrosos*. Sancionada el 23/04/1993. Boletín Oficial 03/05/1993.

⁸⁶ Li, P.; Feng, X.B.; Qiu, G.L.; Shang, L.H.; Li, Z.G. (2009). *Mercury pollution in Asia: A review of the contaminated sites*. *Journal of Hazardous Materials*. Volume 168, Issues 2-3, p. 591-601.

⁸⁷ Watras, C.J.; Morrison, K.A.; Rubsam, J.L.; Rodger, B. (2009). *Atmospheric mercury cycles in northern Wisconsin*. *Atmospheric Environment*. Volume 43, Issue 26, p. 4070-4077.

⁸⁸ Nelson, S.J.; Johnson, K.B.; Weathers, K.C.; Loftin, C.S.; Fernandez, I.J.; Kahl, J.S.; Krabbenhoft, D.P. (2008). *A comparison of winter mercury accumulation at forested and no-canopy sites measured with different snow sampling techniques*. *Applied Geochemistry*. Volume 23, Issue 3, p. 384-398.

- ⁸⁹ Barbosa, A.C.; de Souza, J.; Dórea, J.G.; Jardim, W.F.; Fadini, P.S. (2003). *Mercury Biomagnification in a Tropical Black Water, Rio Negro, Brazil*. Archives Environmental Contamination and Toxicology. Volume 45, Issue 2, p. 235-246.
- ⁹⁰ Gaioli, M.; Amoedo, D.; González, D. (2012). *Impacto del mercurio sobre la salud humana y el ambiente*. Archivos Argentinos de Pediatría. Volumen 110, Número 3, p. 259-264.
- ⁹¹ Millán, R.; Gamarra, R.; Schmid, T.; Sierra, M.J.; Quejido, A.J.; Sánchez, D.M.; Cardona, A.I.; Fernández, M.; Vera, R. (2006). *Mercury content in vegetation and soils of the Almadén mining area (Spain)*. Science of the Total Environment. Volume 368, Issue 1, p. 79-87.
- ⁹² Organización Mundial de la Salud (2013). *El mercurio y la salud*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs361/es/>.
- ⁹³ Kark, P. (1979). *Clinical and neurochemical aspects of inorganic mercury intoxication*. Handbook of Clinical Neurology. Volume 36. Elsevier, Amsterdam.
- ⁹⁴ Nichols, J.W.; Ambrose, J.R.B.; Cubbison, C.; Fairbrother, A.; Keating, M.H.; Mahaffey, K.R. (1997). *Mercury study report to Congress Volume VI: an ecological assessment for anthropogenic mercury emissions in the United States*. Office of Air Quality Planning and Standards/Office of Research and Development/U.S. Environmental Protection Agency. EPA-452/R-97-008. Washington D.C.
- ⁹⁵ Wang, S.; Jia, Y.; Wang, S.; Wang, X.; Wang, H.; Zhao, Z.; Liu, B. (2009). *Total mercury and monomethylmercury in water, sediments, and hydrophytes from the rivers, estuary, and bay along the Bohai Sea coast, northeastern China*. Applied Geochemistry. Volume 24, Issue 9, p. 1702-1711.
- ⁹⁶ Wang, S.; Wai, C.M. (1996). *Supercritical Fluid Extraction of Bioaccumulated Mercury from Aquatic Plants*. Environmental Science & Technology. Volume 30, Issue 10, p. 3111–3114.
- ⁹⁷ Posada, M.I.; Arroyave, M.P. (2006). *Efectos del mercurio sobre algunas plantas acuáticas tropicales*. Revista EIA (Escuela de Ingeniería de Antioquia). Número 6, p. 57-67.

**“Si buscas resultados distintos, no
hagas siempre lo mismo”.**

-Albert Einstein

CAPÍTULO III

CAPITULO III

3.1. *Espectrofotometría*

Desde hace muchos años se ha usado el color como ayuda para cuali y cuantificar sustancias y compuestos; al reemplazar el ojo humano por otros detectores de radiación se ha estudiado la absorción de radiación, no solamente en la zona del espectro visible, sino también en ultravioleta e infrarrojo.

La interacción de la radiación con la materia da origen a la espectrometría; cuyo fundamento se basa en la medición de la cantidad de radiación que producen o absorben las especies moleculares o atómicas de interés¹; es la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe o emite un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación.

La teoría ondulatoria de la luz propone la idea de que un haz de luz es un flujo de cuantos de energía llamados fotones; la luz de una cierta longitud de onda está asociada con los fotones, cada uno de los cuales posee una cantidad definida de energía, que interactúa de modo específico con las diferentes sustancias sometidas a análisis físico-químico.

3.2. *Espectrofotometría en Fase Sólida*

La Espectrofotometría en Fase Sólida (EFS o SPS – Solid Phase Spectrophotometry^{2,3}) es una técnica basada en la pre concentración de un analito, formando un compuesto generalmente cromogénico, sobre un sustrato sólido y medición de la absorbancia del compuesto directamente sobre la fase sólida (resinas de intercambio o adsorción). Este proceso permite obtener mayor sensibilidad y precisión que los métodos de absorción molecular en solución⁴.

La EFS es una metodología relativamente nueva que es aplicada a una gran variedad de analitos orgánicos^{3,5,6} e inorgánicos^{7,8,9}. Los métodos basados en esta técnica ofrecen una alta sensibilidad y selectividad^{10,11,12} utilizando una instrumentación de bajo costo y sencilla, presentando además alta aplicabilidad

en el análisis de muestras reales. El analito, al que generalmente se ha sometido a un proceso de derivatización, es previamente fijado en un soporte sólido adecuado (generalmente una resina), que posteriormente se introducirá en el interior de una cubeta (1 mm de paso óptico) donde se producirá la detección directa del compuesto retenido en el soporte. Una gran ventaja de la EFS respecto de la convencional Espectrofotometría de Absorción Molecular en Solución (EFAM), radica en el notable incremento de sensibilidad que ofrece la primera con el aumento del volumen de muestra a analizar⁹. Con volúmenes de muestras de 1L, que son de frecuente empleo en EFS⁷, se pueden alcanzar coeficientes de absortividad molar aparente del orden de 10^8 L mol⁻¹ cm⁻¹ lo que supone una sensibilidad del orden de 10^3 a 10^4 veces mayores⁸ con la EFS que con la EFAM, pudiendo cuantificarse niveles de concentración inferiores a 0,1 ng mL⁻¹. Se ofrece así la posibilidad de determinación de elementos en muy bajas concentraciones sin que sea obligado el empleo de otra preconcentración del analito (que no sea la del método), tal y como se requiere en la EFAM.

3.3. Soportes Sólidos

El término “soporte sólido” parece indicar que las reacciones tienen lugar en la superficie de un soporte, aunque en realidad las reacciones se producen sobre las partículas, por lo que la etiqueta “soporte sólido” describe más bien la insolubilidad del polímero. Las propiedades físicas del soporte sólido, así como las aplicaciones que se le pueden dar, varían según el material con el que está hecho. Las características de un soporte sólido eficaz son¹³:

- Ser físicamente estable y el tamaño de partícula debe ser lo suficientemente grande como para permitir que el líquido circule libremente.
- Ser inerte a todos los reactivos y disolventes usados en la EFS.
- Tener buena capacidad de expansión en los disolventes para facilitar la penetración de los reactivos y productos.
- Debe ser mecánicamente resistente al flujo continuo (no debe producirse la ruptura de las partículas o la aparición de huecos).

- Debe ser además, resistente al efecto de “barrido”.
- Utilizadas como portador.
- Debe ser de un material compatible con la técnica integrada de detección.
- El proceso de retención/elución debe ser suficientemente rápido.

3.3.1. Tipos de Soportes Sólidos

Un intercambiador iónico o un material de intercambio iónico puede ser definido como una matriz insoluble conteniendo iones lábiles capaces de intercambiarse con otros iones del medio, sin ningún otro cambio físico que el de ocupar un lugar en esta estructura¹⁴. A estos polímeros también se los denominan resinas y son los polímeros reactivos sintetizados más antiguos.

Una reacción de intercambio iónico es aquella en la cual un átomo o una molécula que han ganado o perdido un electrón y que por lo tanto adquiere una carga positiva o negativa, se intercambia por otra partícula de igual signo pero de naturaleza diferente. Esta última partícula inicialmente está ligada a la superficie de un cuerpo sólido inerte y pasa a solución y su lugar es ocupado por otra partícula que queda retenida (temporalmente) en la superficie del polímero o soporte.

Los intercambiadores iónicos o las denominadas resinas sintéticas de intercambio iónico son las de uso más generalizado tanto en el laboratorio como en la tecnología química y pueden ser preparados en el laboratorio (sintetizados) y también están al alcance comercialmente, tienen capacidad de adsorción alta y son de gran interés en el laboratorio e industrialmente¹⁵.

Las resinas sintéticas de intercambio iónico consisten en un polímero reticulado por la acción de agentes entrecruzantes adecuados y con un cierto número de grupos funcionales. Los requerimientos de una resina son¹⁵:

- Estar lo suficientemente reticulada para ser insoluble en agua y otros líquidos y tener unas buenas propiedades térmicas y mecánicas.
- Ya sea de tipo gel o porosa, debe ser suficientemente hidrofílica para posibilitar la difusión de los iones a través de su estructura a una velocidad aceptable.

- Debe tener un número adecuado de lugares de intercambio iónico accesibles para permitir una alta capacidad de intercambio.
- Debe ser estable químicamente para evitar su degradación durante el uso.
- En su estado hinchado debe ser más densa que el agua.

Para la clasificación de los intercambiadores iónicos hay que referirse a los productos que son utilizados en EFS, los que se pueden clasificar en:

3.3.1.1. Intercambiadores Derivados del Estireno

El estireno: C_8H_8 , es el material más utilizado en intercambiadores de tipo fuertemente ácido y fuertemente básico, producidos a gran escala. El estireno es polimerizado con él mismo y en presencia de divinilbenceno (DVB) se obtiene un polímero insoluble (tipo Dowex 1, Dowex 50W, etc.) (Figura N° 3.1.).

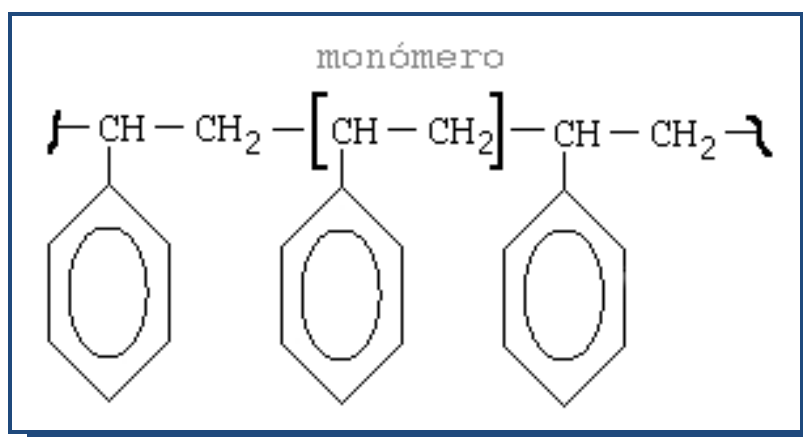


Fig. N°3.1.: Estructura del Esqueleto de Poliestireno.

El monómero utilizado como base es el estireno (vinilbenceno): $C_6H_5\text{—CH=CH}_2$

La característica fundamental es que este polímero, microscópicamente constituye una red homogénea de naturaleza elástica y que contiene al disolvente del proceso de síntesis. Se los conoce como resina tipo gel al ser matrices poliméricas que no contienen poros. Una resina tipo gel tiene la estructura de una red que se produce durante el proceso de polimerización. Las propiedades de tales polímeros o matrices pueden variar al cambiar las proporciones de los monómeros individuales utilizados durante la síntesis. El

factor más importante a tener en cuenta es la influencia de la cantidad de agente entrecruzante (*cross linked*) usado durante la polimerización, ya que es un factor que afecta directamente la propiedad de hinchado del polímero (*swelling*). En disolución acuosa, un intercambiador iónico tipo gel cuya matriz contenga baja proporción de divinilbenceno se hinchará mucho, abriendo su estructura ampliamente, con lo cual permitirá que los iones con valores altos de radio iónico penetren en la estructura de forma fácil y a una velocidad relativamente rápida. Por el contrario, los intercambiadores con una alta proporción de agente entrecruzante (mayor al 10%), se hincharán en disolución acuosa en menor grado. Las estructura de los polímeros tipo gel no tienen una porosidad apreciable hasta que son hinchados en un medio adecuado. Otra propiedad que depende del grado de entrecruzamiento, es la resistencia mecánica que decrece al bajar la proporción de divinilbenceno, por lo tanto, un mayor entrecruzamiento provoca una mayor resistencia mecánica en el polímero¹⁵.

3.3.1.2. Intercambiadores Derivados del Dextrano

Los dextranos son polisacáridos, formados por la unión de unidades de D-glucosa: $C_6H_{12}O_6$ (**Figura N° 3.2.**). Estos forman una cadena lineal de gran longitud, con pequeñas ramificaciones que representan el 5% del total de la estructura¹⁶.

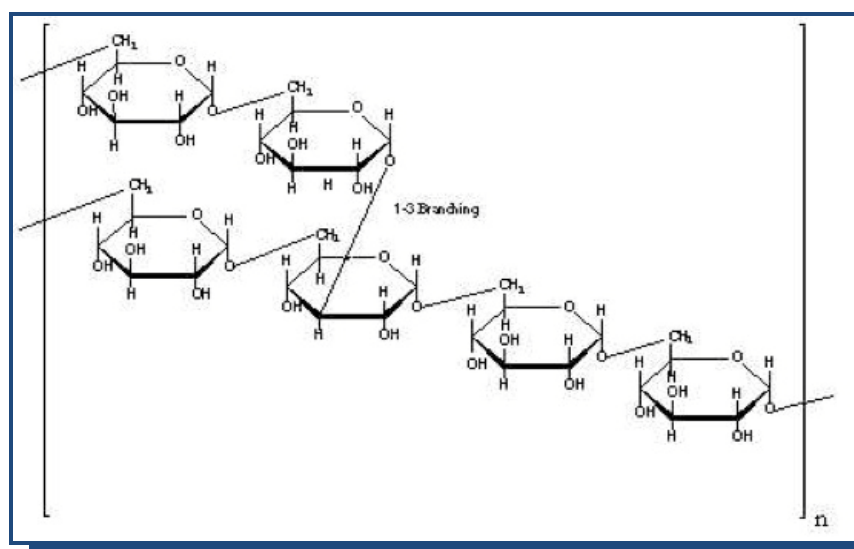


Fig. N°3.2.: Estructura de un Fragmento de Dextrano

El polisacárido dextrano, consiste en moléculas fibrosas que pueden hacerse reaccionar con epíclorhidrina: C_3H_5ClO y como resultado de este entrecruzamiento, las mismas pueden ser transformadas en polímeros de estructura tridimensional. Estos dextranos pueden ser obtenidos como perlas a partir de proceso de polimerización por suspensión. Son útiles como filtros moleculares en filtración por gel y en separaciones cromatográficas basada en el peso molecular. Se los consigue en la forma estándar con el nombre comercial de Sephadex.

Son absorbentes polares con grupos no iónicos. Pueden introducirse grupos funcionales iónicos obteniéndose cambiadores, cuya utilidad dependerá del pH: cambiadores iónicos con carácter ácido fuerte (Sephadex SE y SP) y ácido débil (Sephadex CM), base fuerte (Sephadex GE, TEAE, QAE) y base débil (Sephadex DEAE, AE, ECTEOLA).

3.3.1.3. Otros Tipos de Soportes: Resinas Adsorbentes

Los adsorbentes son materiales naturales o sintéticos de estructura amorfa y micro cristalina constituidas por cadenas de poliestireno entrecruzadas mediante moléculas de DVB y carentes de grupos funcionales cambiadores de iones^{17,18}.

Estas resinas son materiales porosos capaces de retener gran cantidad de reactivos aromáticos por absorción; de este modo algunos de los grupos activos de dichos reactivos quedarían disponibles directa o indirectamente.

La adsorción es la transferencia selectiva de uno o más solutos (adsorbato) de una fase fluida a una de partículas sólidas (adsorbente). La selectividad común de un sorbente entre el soluto y el fluido portador o entre varios solutos, hace posible la separación de ciertos componentes presentes en el fluido. En general, la adsorción incluye la acumulación de moléculas de soluto en una interfase. La acumulación es por unidad de área; por consiguiente se prefieren los sólidos altamente porosos con áreas internas muy grandes por unidad de volumen para conseguir mayor rendimiento. Generalmente las superficies son irregulares y las energías de enlace corresponden a las fuerzas de *Van der Waals*¹⁹.

En forma general, el proceso de la adsorción ocurre en tres pasos. Tomando como absorbente al carbón activado, podemos describir el procedimiento de la siguiente manera:

- Macro transporte: el movimiento del material orgánico a través del sistema de los macro-poros del carbón activo (macro-poros > 50 nm).
- Micro Transporte: el movimiento del material orgánico a través del sistema de los micro-poros del carbón activo (microporo < 2 nm; mesoporo entre 2 - 50 nm).
- Absorción: el acceso físico del material orgánico en la superficie del carbón activo en los mesoporos y micro-poros del carbón activo.
- Debe ser estable químicamente para evitar su degradación durante el uso.
- En su estado hinchado debe ser más densa que el agua.

3.4. Desarrollo de Color en el Soporte Sólido

Se pueden distinguir tres formas de desarrollar el color en el soporte sólido que dependerá de la naturaleza del analito, del reactivo cromogénico, del pH y de otros factores:

1) Fijación del analito sobre el soporte sólido desde la disolución seguida por la reacción de éste último con el agente cromogénico. Como ejemplo: la determinación de cinc con zincón monosódico: $C_2OH_{15}N_4NaO_6S$. Este procedimiento puede aplicarse para reacciones con selectividad baja.

2) Fijación del reactivo en el soporte sólido seguida por la reacción con el analito; aplicada en los casos en que la especie compleja coloreada no puede ser fijada directamente sobre el soporte sólido. La fijación del reactivo sobre el soporte debe ser irreversible, comportándose éste último como una resina quelante; como en el caso de la determinación de níquel con 1-(2-piridilazo)-1-naftol (PAN): $C_{15}H_{11}N_3O$ y cobre con zincón monosódico: $C_2OH_{15}N_4NaO_6S$.

3) La reacción entre analito y reactivo tiene lugar en la disolución y posteriormente el producto de la reacción se fija sobre el soporte sólido. Requiere que el complejo formado pueda fijarse sobre la fase sólida. Un

ejemplo es la determinación de cromato con difenilcarbazida: $C_{13}H_{14}N_4O$ y vanadio con PAN: $C_{15}H_{11}N_3O$.

3.5. Medidas de la Absorbancia en EFS

La absorbancia total de la especie fijada al soporte sólido, a una longitud de onda determinada, es suma de varias contribuciones²⁰.

$$A_T = A_E + A_{sol} + A_{res} + A_{reac}$$

Donde: A_E : es la Absorbancia de la especie fijada en la resina.

A_{sol} : es la Absorbancia de la disolución intersticial que queda entre los granos de la resina.

A_{res} : es la Absorbancia de fondo debido a la resina.

A_{reac} : es la Absorbancia de los reactivos fijados a la resina (en el caso que éstos absorban a la misma longitud de onda de la especie bajo estudio).

Normalmente el valor de A_{sol} es despreciable cuando los coeficientes de distribución de los componentes de las muestras son muy altos; los demás valores de absorbancias se ven afectados por el empaquetamiento de la resina (granos) en la celda espectrofotométrica. Por esto es que el *valor de la absorbancia de la especie fijada en la resina*, no puede ser obtenido por medida de la absorbancia a la longitud de onda del máximo de absorción frente a un blanco de resina preparado en iguales condiciones pero exento del analito.

No obstante, si la medida de la absorbancia se realiza a dos longitudes de onda, correspondiente una al máximo de la especie λ_E y otra situada en una región en la que sólo absorbe la resina λ_R (700 - 800 nm), la diferencia entre estas absorbancias, $\Delta A = A_{\lambda E} - A_{\lambda R}$ se mantendrá constante bajo las condiciones de empaquetamiento similares.

La absorbancia del blanco está dada por:

$$A_B = A_{Bsol} + A_{Bres} + A_{B\text{ reac}}$$

Si se mide a estas dos mismas longitudes de onda λ_E y λ_R , la diferencia de absorbancia $\Delta A_B = A_{\lambda_{EB}} - A_{\lambda_{RB}}$ se mantendrá igualmente constante bajo similares condiciones de empaquetamiento. Por lo tanto, la absorbancia neta de la especie, A_{neta} puede obtenerse de la siguiente ecuación:

$$\Delta A - \Delta A_B = [A_E + (A_R + A_{Reac}) - (A'_R + A'_{Reac})] - [A_{BResE} + A_{BReac} - (A'_{BRes} + A'_{BReac})] = A_{neta}$$

Donde A'_x son las correspondientes a las longitudes de onda λ_R donde no absorbe el complejo²¹ (Figura N°3.4.):

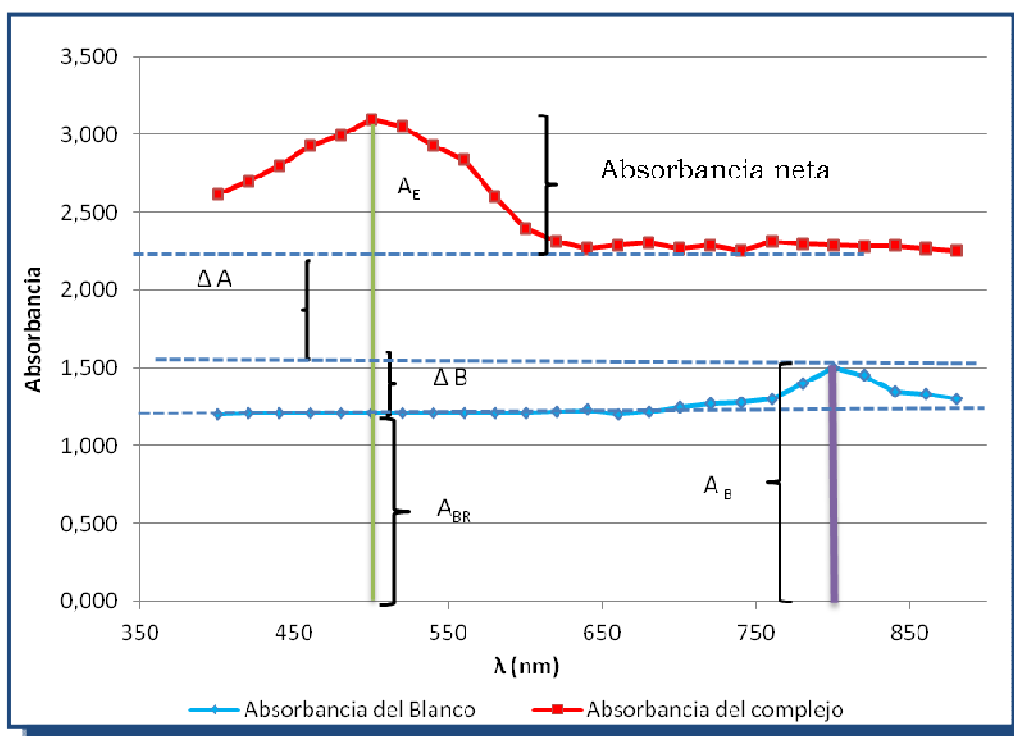


Fig. N°3.4.: Diferentes Contribuciones a la Absorbancia de un Sistema de Espectrofotometría de Absorción Molecular en Fase Sólida

3.6. Ventajas y Usos de la EFS

3.6.1. Metodología Discontinua (Batch, en Lote)

Las ventajas de la EFS sobre otros métodos analíticos de laboratorio son varias: rápida, precisa, versátil, sencilla y de bajo costo. Los espectrofotómetros utilizados son los convencionales que han mejorado en precisión y versatilidad en los últimos años con los avances de tecnología y hoy son indispensables en un laboratorio de análisis químicos.

La espectrofotometría se usa para múltiples aplicaciones, como: análisis cuantitativo y cualitativo en un laboratorio de investigación, laboratorios de control de calidad industriales además en detección de niveles de contaminación en aire, aguas y suelos y determinación de trazas de impurezas en alimentos y en reactivos.

3.6.2. Análisis por Inyección en Flujo (FIA)

Es una modalidad del análisis en flujo continuo (CFA). Se trata de un apartado de los Métodos Automáticos de Análisis, pero que presenta una diferencia importante en relación con el conjunto de los mismos, la cual consiste en su diseño para el análisis de muestras inyectadas manualmente.

En la primera edición de su conocida monografía "Análisis por Inyección en Flujo" (FIA), publicada en 1981, Ruzicka y Hansen²² definieron FIA como "Un método basado en la inyección de una muestra líquida dentro de una corriente continua no segmentada en movimiento, de un líquido adecuado". La muestra inyectada forma una zona, la cual es luego transportada hacia el detector que continuamente reconoce absorbancias, potencial de electrodo o cualquier otro parámetro físico. Actualmente se considera una técnica de análisis de flujo no-cromatográfica para análisis cuantitativo, que se realiza por el manipuleo reproducible de zonas de muestra y reactivo en una corriente de flujo, bajo condiciones de no-equilibrio termodinámico".

Los rasgos esenciales del FIA son los siguientes:

➤ El flujo no está segmentado por burbujas de aire, lo que constituye la diferencia fundamental con los métodos clásicos de CFA.

➤ La muestra líquida es inyectada o insertada directamente en el flujo en lugar de ser aspirada en el mismo.

➤ Se realiza un transporte del "trozo" inyectado a través del sistema. Puede también tener lugar un proceso físico-químico adicional al transporte (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.).

➤ La dispersión o dilución parcial del analito en este transporte puede ser perfectamente manipulada mediante un control de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.

➤ Un sistema de detección continua proporciona una señal transitoria, que es convenientemente registrada.

➤ En el momento de la detección de la señal no se ha alcanzado el equilibrio físico (que supondría la homogeneización de una porción del flujo) ni el equilibrio químico (reacción completa). Por ello las técnicas FIA pueden considerarse dentro de los Métodos Cinéticos de Análisis y en su modalidad de medida a tiempo fijo.

➤ El tiempo de operación debe de ser reproducible pues las medidas se realizan en condiciones de no estabilidad y por tanto pequeñas variaciones del mismo pueden producir graves alteraciones de los resultados.

Un sistema FIA elemental ha de estar formado por una serie de componentes esenciales: a) Un sistema propulsor de la corriente portadora a lo largo de las diferentes unidades elementales, que debe suministrar un flujo constante y regular en el sistema, ausente de impulsos y perfectamente reproducible; b) Un sistema de inyección dentro de la corriente portadora de volúmenes de muestra muy precisos, reproducibles y variables dentro de un amplio rango; c) Un sistema de transporte de la disolución que tiene como misiones fundamentales conectar entre sí los diferentes elementos y conseguir en el transcurso de los fluidos a su través un adecuado grado de dispersión o mezcla de la muestra con la corriente portadora; d) Un sistema de detección, que permita la medida continua de una propiedad de la muestra o de su

producto de reacción proporcionando información cualitativa y cuantitativa sobre la misma.

Los méritos generales resumidos más abajo son válidos, independientes de los principios de separación y preconcentración, y equipamiento involucrado:

➤ Gran cantidad de muestras tratadas, 1 a 2 órdenes de magnitud más que en procedimientos discontinuos, con un tiempo corto de operación, generalmente en el rango de 10 - 200 segundos por determinación.

➤ Eficiencia de enriquecimiento grande para sistemas de preconcentración, típicamente un factor de 5 - 50 mayor que en procedimientos en discontinuo.

➤ Bajo consumo de muestra, 1 - 2 órdenes de magnitud menores que en procedimientos discontinuos. Esto es particularmente importante para muestras "valiosas", tales como sangre o muestras que tienen que ser transportadas al laboratorio desde sitios de colección distantes.

➤ Bajo consumo de reactivos, 1 - 2 órdenes de magnitud menores que en procedimientos en discontinuo. Este es un factor importante cuando se emplean reactivos costosos.

➤ Alta reproducibilidad, el rango de la desviación estándar relativa porcentual, generalmente es del orden del 1 - 3 %.

➤ Operación automatizada simple, la cual siempre se implementa con sistemas de monitoreo continuo y uso de un proceso de control.

➤ Bajo riesgo de contaminación, debido al uso de sistemas de operación inertes y cerrados, un factor muy importante para análisis de vestigios.

➤ Requiere instrumental y espacios en el laboratorio muy reducidos.

Un factor que puede ser considerado como una desventaja en procedimientos de separación por inyección en flujo, es la incompleta transferencia de masa entre fases, la cual es usualmente inaceptable en métodos de separación discontinua. Sin embargo, el método instrumental por inyección en flujo es básicamente una técnica para el monitoreo reproducible de señales analíticas bajo condiciones termodinámicas de no equilibrio. Esto no deteriora la precisión o sensibilidad de un sistema por inyección en flujo. Este

factor de transferencia incompleto tiene que ser tenido en cuenta en el diseño y optimización en un sistema de separación por inyección en flujo, y puede ser una fuente importante de error en el análisis de muestras reales cuando las condiciones de equilibrio idénticas pueden no ser alcanzadas tanto para los patrones y la muestra.

¹ Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. (2005). *Fundamentos de Química Analítica*. 8^{va} Edición. Editorial Thomson-Paraninfo. Madrid.

² Yoshimura, K.; Waki, H.; Ohashi, S. (1976). *Ion-exchange colorimetry-I: Microdetermination of chromium, iron, copper and cobalt in water*. *Talanta*, Volume 23; Issue 6, p. 449-454.

³ Capitán-Vallvey, L.F.; Navas Iglesias, N.; de Orbe-Payá, I.; Avidad Castañeda, R. (1996). *Simultaneous determination of quinoline yellow and brilliant blue FCF in cosmetics by solid-phase spectrophotometry*. *Talanta*, Volume 43; Issue 9, p. 1457-1463.

⁴ Narin, I.; Soyak, M. (2003). *The uses of 1-(2-pyridylazo) 2-naphthol (PAN) impregnated Amborsorb 563 resin on the solid phase extraction of traces heavy metal ions and their determinations by atomic absorption spectrometry*. *Talanta*, Volume 60, Issue 1, p. 215-221.

⁵ Capitán, F.; Capitán-Vallvey, L.F.; Fernández, M.D.; De Orbe, I.; Avidad R. (1996). *Determination of colorant matters mixtures in foods by solid-phase spectrophotometry*. *Analytica Chimica Acta*, Volume 331; Issues 1-2, p. 141-148.

⁶ Ortega-Barrales, P.; Fernández-de Córdova, M. L.; Molina-Díaz, A. (1998). *A selective optosensor for UV spectrophotometric determination of thiamine the presence of other vitamins B*. *Analytica Chimica Acta*. Volume 376; Issue 2, p. 227-233.

⁷ Yoshimura, K.; Waki, H. (1985). *Ion-exchanger phase absorptiometry for trace analysis*. *Talanta*, Volume 32, Issue 5, p. 345-352.

- ⁸ Fernández-de Córdoba, M.L.; Ruíz Medina, A.; Molina-Díaz, A. (1997). *Solid-phase spectrophotometric microdetermination of iron with ascorbic acid and ferrozine*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, Volume 357, Issue 1, p. 44-49.
- ⁹ Ortega-Barrales, P.; Molina-Díaz, A.; Pascual-Reguera, M.I.; Capitán-Vallvey, L.F. (1997). *Solid-phase spectrophotometric determination of trace amounts of hydrazine at sub-ng ml⁻¹ level*. Analytica Chimica Acta. Volume 353, Issue 1, p. 115-122.
- ¹⁰ Fernández-de Córdoba, M.L.; Molina-Díaz, A.; Pascual-Reguera, M.I.; Capitán-Vallvey, L.F. (1995). *Solid-phase spectrophotometric determination of trace amounts of vanadium at sub-ng/ml level with 4-(2-pyridylazo)resorcinol*. Talanta, Volume 42, Issue 8, p. 1057-1065.
- ¹¹ Fernández-de Córdoba, M.L.; Molina-Díaz, A.; Pascual-Reguera, M.I.; Capitán-Vallvey, L.F. (1994). *Determination of trace amounts of copper with 4-(2-pyridylazo)resorcinol by solid phase spectrophotometry*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, Volume 349, Issues 10-11, p. 722-727.
- ¹² Richter, P.; Luque de Castro, M.D.; Valcárcel, M. (1992). *Integrated retention/spectrophotometric detection method for the determination of formaldehyde*. Analytical Letters, Volume 25, Issue 12, p. 2279-2288.
- ¹³ Kates, S.A.; Albericio, F. (2000). *Solid-Phase Synthesis: A Practical Guide*. 1^{ra} Edición. Editorial Marcel Dekker, Inc. New York.
- ¹⁴ BDH Chemicals Ltd. (1981). *Ion exchange resins*. 6^{ta} edición. Editorial Poole. Reino Unido.
- ¹⁵ Díez Salvador, S. (1994). *Estudio, desarrollo y caracterización de resinas quelantes de iones metálicos: aplicación en sistemas de impacto ambiental y en el diseño de nuevos métodos cromatográficos*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Química, Bellaterra.
- ¹⁶ Farmacosmos. (2001). *Dextran chemistry*. <http://www.dextran.net/dextran-properties.html>.
- ¹⁷ Lodge Jr., J.P. (1998). *Methods of air sampling and analysis*. 3^{ra} edición. Editorial Lewis Publishers, Inc. USA.

¹⁸ Keith, L.H. (1996). *Principles of environmental sampling*. 2^{da} edición. Editorial American Chemical Society. Washington.

¹⁹ Metcalf & Eddy. (1998). *Ingeniería de aguas residuales. tratamiento, vertido y reutilización*. 3^{ra} edición. Editorial McGraw Hill. Madrid.

²⁰ Molina-Díaz, A.; Herrador-Mariscal, J.M.; Pascual-Reguera, M.I.; Capitan-Vallvey, L.F. (1993). *Determination of traces of aluminium with chrome azurol S by solid-phase spectrophotometry*. Talanta, Volume 40, Issue 7, p. 1059- 1066.

²¹ Pellerano, R.G. (2006). *Especiación de algunos elementos contaminantes, Cd y Pb, en aguas del río Paraná*. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas naturales y Agrimensura. Universidad Nacional del Nordeste.

²² Ruzicka, J.; Hansen, E.H. (1981). *Flow Injection Analysis*. 2da edición. Editorial J. Wiley & Sons, Interscience. New York.

“La Ciencia sirve para darnos una idea de cuán vasta es nuestra ignorancia”.

-Robert de Lamennais

CAPÍTULO IV

CAPITULO IV

4.1. Introducción

En los últimos años, las herramientas quimiométricas han sido con frecuencia aplicadas a la optimización de métodos analíticos, teniendo en cuenta sus ventajas tales como una reducción en el número de experimentos que necesitan ser ejecutados, bajo consumo de reactivos y menos trabajo en el laboratorio. Además, estos métodos permiten el desarrollo de modelos matemáticos que proporcionan una evaluación de la pertinencia, ofrecen estadísticas importantes de los efectos de los factores en estudio, así como una evaluación de los efectos de la interacción entre los factores.

Se eligen los esquemas de optimización de diseños multivariados ya que analizan los niveles de todas las variables simultáneamente, lo que concede una ventaja destacable con respecto a los diseños univariados que puede fallar debido a que el efecto de una variable puede ser dependiente del nivel de los otros implicados en la optimización.

El primer paso de optimización multivariable es la elección de los factores estudiados (factorial completo o fraccional) con el fin de obtener los efectos significativos del sistema analítico. Posteriormente, las condiciones de operación óptimas se consiguen mediante el uso de diseños experimentales complejos, tales como el método de matriz Doehlert (DM), diseños centrales compuestos (CCD) y de tres niveles, tales como el diseño de Box-Behnken (BBD)^{1,2}.

4.2. Factores y Respuestas en la Optimización Multivariable

Durante el procedimiento de optimización multivariable, hay dos tipos de variables: las respuestas y los factores. Las respuestas son las variables dependientes. Sus valores dependen de los niveles de los factores, que pueden ser clasificados como cualitativo o cuantitativo.

Si uno conoce las naturalezas de las relaciones entre las respuestas y los factores, es decir, las superficies de respuesta, los valores óptimos de los

factores pueden ser determinados. La optimización se puede realizar de dos maneras. Se pueden generar superficies de respuesta para cada respuesta y estas superficies pueden ser analizadas simultáneamente. O partir de un modelo para una sola función compuesta que tiene en cuenta las tres respuestas para obtener una sola de superficie de respuesta.

Durante la optimización de un procedimiento analítico que implica una técnica con varios elementos generalmente la respuesta compuesta resultante será de varias respuestas individuales con efectos similares. Este aspecto debe ser considerado durante el establecimiento de una estrategia de optimización apropiada.

Una forma cada vez más popular para el tratamiento de múltiples respuestas hace uso de una función de deseabilidad (D) propuesta por Derringer y Suich en 1980³. Para cada respuesta se determinan superficies de respuesta individuales. Los valores predichos obtenidos de cada superficie de respuesta se transforman a una escala de la función de deseabilidad (d_i), la cual toma valores entre $d = 0$ (para un valor de respuesta que no es aceptable) hasta $d = 1$ (para una completamente deseable).

D se calcula combinando los valores de deseabilidad individuales:

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m)^{1/m}$$

A continuación se aplica un algoritmo a la función de D con el fin de determinar el conjunto de variables que poseen los valores máximos. Esta función ha sido frecuentemente utilizada durante la optimización de sistemas analíticos que implican varias respuestas⁴.

4.3. Superficies de Respuesta para Dos Factores de Tratamiento

El objetivo de todos los experimentos realizados incluye describir la respuesta a los factores de tratamiento. La ecuación de regresión cuadrática

estimada se puede graficar como una superficie en la que se pueden visualizar las respuestas a todos los niveles de los factores en el experimento⁵.

La ecuación de respuesta cuadrática se representa como una superficie sólida en tres dimensiones o también puede representarse como curvas de nivel⁶, donde las líneas con valores de respuesta iguales son similares a las elevaciones mostradas en un mapa topográfico.

La superficie de respuesta permite que el operador inspeccione, de manera visual, el área experimental para cierta zona de los niveles de los factores de interés y evaluar su sensibilidad a los factores de tratamiento.

4.4. Modelos Polinomiales Aproximados

El diseño de superficies de respuesta supone que la media de la variable de respuesta μ_y está en función de los niveles de los factores cuantitativos representados por las variables x_1, x_2, \dots, x_k . Los modelos polinomiales se usan como aproximaciones prácticas a la función de respuesta verdadera o real. En general, la función real se desconoce, entonces las funciones polinomiales proporcionan aproximaciones en zonas relativamente pequeñas de los factores cuantitativos.

Los modelos polinomiales comúnmente usados para el análisis de superficies de respuesta son el modelo lineal (primer orden) y el modelo cuadrático (segundo orden). El modelo de primer orden para dos factores es:

$$\mu_y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2$$

y el modelo de segundo orden es:

$$\mu_y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{12} x_1 x_2$$

Las gráficas de las curvas de nivel para los modelos de primer orden tienen una serie de líneas paralelas que representan los niveles de los factores.

Para los modelos cuadráticos las gráficas son más complejas y tienen varios patrones de curvas posibles.

4.5. Experimentos Secuenciales para el Análisis de Respuesta

El uso de la experimentación secuencial con el propósito de obtener las condiciones operativas óptimas fue utilizada en un principio para procesos industriales⁷.

El enfoque general comienza con la identificación de las variables de tratamiento de mayor importancia que influyen en el proceso. Luego en experimentos subsecuentes se usan las combinaciones de tratamientos para localizar un área en el espacio del factor que tenga oportunidad de producir respuestas óptimas, y por último, se realiza la exploración de esta región en busca del punto óptimo.

4.6. Identificación de Variables Significativas con Análisis Factorial

Cuando la región de respuesta óptima se desconoce se usan diseños factoriales completos o fraccionarios para comenzar el análisis.

Los diseños factoriales completos (2^n) son diseños adecuados para estimar las respuestas medias para el modelo lineal, o de primer orden, y también se utilizan para saber cuál es el peso o significancia de la varianza de cada una de las variables independientes en la respuesta o variable dependiente.

Los diseños factoriales producen experimentos más eficientes, pues cada observación proporciona información sobre todos los factores (variables independientes), y es factible ver las respuestas de un factor en diferentes niveles de otro factor en el mismo experimento. La respuesta a cualquier factor observado en diferentes condiciones indica si los factores actúan en las unidades experimentales de manera independiente. La interacción entre factores ocurre cuando su actuación no es independiente.

La principal desventaja que presenta el diseño factorial completo es que al aumentar las variables independientes que se quieren estudiar, aumenta en forma significativa el número de experiencias que se deben realizar. Sin embargo generalmente para el diseño de sensores con espectrofotometría en fase sólida las variables químicas en estudio no son más de tres, por lo que éstos diseños resultan muy adecuados para los experimentos iniciales.

Para cuantificar la significancia de cada uno de los factores se realiza un análisis de la varianza de a un factor (ANOVA) y se utiliza al valor “ p ” como criterio.

Los resultados obtenidos mediante el ANOVA se presentan mediante un gráfico de los efectos principales de Pareto^{8,9}. Este es un gráfico de barras, que se analiza teniendo en cuenta que la longitud de cada barra representa la importancia relativa de cada uno de los factores.

4.7. Método de Box-Behnken

Box y Behnken¹⁰ sugirieron cómo seleccionar puntos de la disposición factorial de tres niveles, lo que permite la estimación de los coeficientes de primer y segundo orden del modelo matemático. Este diseño suele ser más eficiente en términos del número de corridas (requiere pocas combinaciones de factores), es rotatable (o casi rotatable) y se forma combinando factoriales 2^k con diseños de bloques incompletos.

El Diseño de Box-Behnken es esférico y no contiene puntos en los vértices de la región cúbica (no comprende las esquinas del cubo), sino que se trabaja en la parte central de las aristas del cubo. Los puntos experimentales son situados en una hiperesfera equidistante desde el punto central. Se interpreta geoméricamente marcando los puntos medios de las aristas de un cubo más un punto central (**Figura 4.1.a**) o como el intercalado de tres diseños factoriales de dos niveles más un punto central (**Figura 4.1.b**).

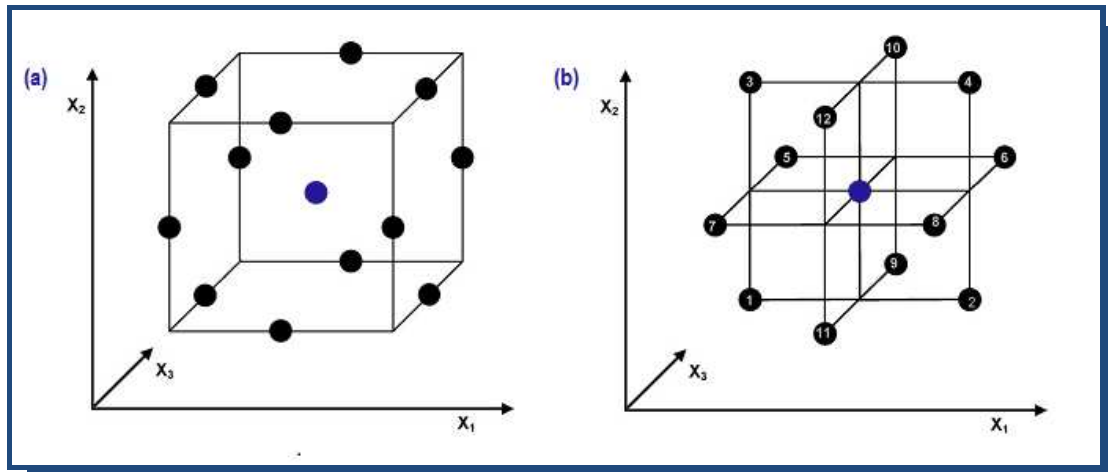


Fig. N°4.1.: Representaciones del Diseño de Box-Behnken para 3 Factores

El diseño de Box-Behnken permite:

- La estimación de los parámetros del modelo cuadrático.
- El desarrollo de diseños secuenciales.
- La detección de falta de ajuste del modelo.
- El uso de bloques.

Una comparación entre el diseño de Box-Behnken y otros diseños de superficie de respuesta (central compuesto, matriz Doehlert y diseño factorial completo de tres niveles) ha demostrado que el diseño de Box-Behnken y matriz Doehlert son ligeramente más eficiente que el diseño central compuesto pero mucho más eficiente que los diseños factoriales completos de tres niveles.

Las principales características de Box-Behnken son:

- Requiere un número experimento de acuerdo con $N = 2k(k-1) + c_0$ donde k es el número de factores y c_0 es el número de puntos centrales.
- Todos los factores tienen que ajustarse sólo a tres niveles (-1, 0, 1), con intervalos igualmente espaciados entre ellos. Los puntos se generan seleccionando los factores y perturbando en forma completa sus niveles. Esta estrategia se repite para todos los valores posibles. En la **Tabla 4.1.** se muestra la matriz del diseño para 3 variables.
- No contiene combinaciones para las cuales todos los factores se encuentran en su más altos o más bajos niveles, evitando de esta manera experimentos realizados en condiciones extremas.

Tabla 4.1. Diseño de Box-Behnken para 3 Variables

Experimento	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	1	-1
11	0	-1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

Si se requiere el diseño de Box-Behnken para más de 3 factores, estos pueden organizarse en bloques ortogonales.

4.8. Determinación del Punto Óptimo

Existen distintas herramientas o métodos para encontrar el punto óptimo, en este caso el correspondiente al máximo valor de absorbancia.

4.8.1. Inspección de la Superficie de Respuesta

Se pueden examinar visualmente los gráficos correspondientes a la superficie de respuesta o el gráfico de contornos para encontrar y aproximar los valores correspondientes a los picos o valores máximos. Se debe ser muy cuidadoso en esta tarea ya que el gráfico de la superficie de respuesta no corresponde a valores verdaderos, sino a los resultados de la regresión realizada en los pasos anteriores. Además si se consideran más de tres variables para poder realizar los gráficos algunos de ellos tuvo que haberse dejado constante.

4.8.2. Análisis Canónico

El análisis de correlación canónica puede verse como una extensión lógica de un análisis de regresión múltiple. Recordando que el análisis de regresión múltiple implica una única variable dependiente y varias variables independientes.

Con el análisis canónico el objetivo es correlacionar simultáneamente varias variables dependientes y varias variables independientes. Mientras que la regresión múltiple implica una única variable dependiente, la correlación canónica implica múltiples variables dependientes.

El principio subyacente es desarrollar una combinación lineal de cada conjunto de variables (tanto independientes como dependientes) para maximizar la correlación entre los dos conjuntos. O dicho de otra forma, el procedimiento implica obtener un conjunto de ponderaciones para las variables dependientes e independientes que proporcione la correlación única máxima entre el conjunto de variables dependientes y el conjunto de variables independientes

Este tipo de cálculo corresponde al cálculo matemático para encontrar puntos estacionarios en las funciones polinómicas.

4.9. Caracterización de la Superficie de Respuesta

Una vez encontrado el punto estacionario, hay que caracterizar la superficie de respuesta, es decir determinar si se trata de un punto de respuesta máximo, mínimo o silla. La forma directa de hacer esto es mediante la gráfica de contornos del modelo ajustado, sin embargo es útil un análisis más formal.

La forma canónica de una ecuación cuadrática es eficaz para visualizar la superficie y determinar la sensibilidad relativa de las variables de respuesta a cada factor. Es difícil visualizar la superficie mediante el examen de los coeficientes estimados para la forma normal de la ecuación de respuesta cuadrática. De la misma manera, es difícil determinar los cambios necesarios en los niveles de los factores para producir un cambio específico en la respuesta.

El análisis canónico gira los ejes de las variables x , a un nuevo sistema de coordenadas y el centro de este nuevo sistema se coloca en el punto de respuesta estacionario de la superficie. La forma canónica de la ecuación con dos variables es:

$$\hat{Y} = \hat{Y}_s + \lambda_1 Z_1^2 + \lambda_2 Z_2^2$$

donde Z_1 y Z_2 son las variables de los ejes rotados. Obsérvese que solo influyen los términos cuadráticos de las variables canónicas. Los λ_i son constantes y representan los autovalores de la matriz B .

La naturaleza de la superficie de respuesta se determina a partir del punto estacionario y el signo y magnitud de los λ_i . Si todos los λ_i son positivos entonces es un punto de respuesta mínimo, en cambio si son negativas, entonces es un punto de respuesta máximo, por último si tienen signos diferentes entonces es un punto de respuesta de silla.

Es muy importante recordar que tanto la respuesta estimada en forma original en la forma canónica solo es válida para la zona de los niveles de los factores incluida en el experimento. Cualquier intento para estimar la respuesta

fuera de los límites acotados por los niveles tenidos en cuenta para el cálculo de la región de estudio, será engañoso.

¹ Box, G.E.P.; Hunter, J.S.; Hunter, W.G. (2005). *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery*. 2^{da} edición. Editorial John Wiley & Sons, Inc. New York.

² Bruns, R.E.; Scarminio, I.S.; De Barros Neto, B. (2006). *Statistical Design-Chemometrics*. Volumen 25 de Data Handling in Science and Technology. Editorial Elsevier. Amsterdam.

³ Derringer, G.; Suich, R. (1980). *Simultaneous optimization of several response variables*. Journal of Quality Technology. Volume 25, p. 199-204.

⁴ Jimidar, M.; Bourguignon, B.; Massart, D.L. (1996). *Application of Derringer's desirability function for the selection of optimum separation conditions in capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography A. Volume 740, Issue 1, p. 109-117.

⁵ Khuri, A.I.; Cornell, J.A. (1996). *Response surfaces: Design and analysis*. 2^{da} edición. Editorial Marcel Dekker, Inc. New York.

⁶ Lundstedt, T.; Seifert, E.; Abramo, L.; Thelin, B.; Nystrom, A.; Pettersen, J.; Bergman, R. (1998). *Experimental design and optimization*. Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems. Volume 42, Issues 1-2, p. 3-40.

⁷ Box, G.E.P.; Wilson, K.G. (1951). *On the experimental attainment of optimum conditions*. Journal of the Royal Statistical Society, Series B. Volume 13, Issue 1, p. 1-45.

⁸ Bermejo-Barrera, P.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, A. (2000). *Factorial designs for Cd, Cr, Hg, Pb and Se ultrasound-assisted acid leaching from human hair followed by atomic absorption spectrometric determination*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry, Volume 15, Issue 2, p. 121-130.

⁹ Bermejo-Barrera, P.; Muñiz-Naveiro, O.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, A. (2001). *The multivariate optimisation of ultrasonic bath-induced acid leaching*

for the determination of trace elements in seafood products by atomic absorption spectrometry. Analytica Chimica Acta. Volume 439, Issue 2, p. 211-227.

¹⁰ Box, G.E.; Behnken, D.W. (1960). *Some new three level designs for the study of quantitative variables.* Technometrics. Volume 2, Issue 4, p. 455-475.

“Un científico tiene la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de buscar cualquier evidencia, de corregir errores”.

-Robert Oppenheimer

CAPITULO V

5.1. Selenio y Mercurio. Reactivos Utilizados

En todos los casos se utilizaron reactivos de alta calidad analítica y las soluciones acuosas fueron preparadas con agua de elevada pureza, bidestilada, desionizada.

5.1.1. Solución de Rodamina B (Reactivo Cromogénico)

Se preparó una solución acuosa stock de la rodamina B (RB) de concentración 2×10^{-3} M.

Esta solución rojo violácea almacenada en botella oscura y refrigerada permanece estable durante 1 semana.

El cloruro de [9-(2-carboxifenil)-6-dietilamino-3-xanteniliden]-dietilamonio, conocido como Rodamina B, es un compuesto orgánico, cuya fórmula química es $C_{28}H_{31}N_2O_3Cl$ y posee una masa molar de $479,02 \text{ g mol}^{-1}$. Sus soluciones, por lo general, se preparan al 0,5% en alcohol y se adsorben en los plásticos, por lo que deben mantenerse en recipientes de vidrio¹.

La Rodamina B presenta dos principales formas en solución: la primera en forma de lactona y la segunda en forma de sal las cuales se muestran en la **Figura N° 5.1. (a)** y **Figura N° 5.1. (b)**². En solventes polares tales como acetona, alcohol o agua el anillo lactónico de la forma tiende a abrirse, dando lugar a una separación de cargas formando un zwitterion el cual se observa en la **Figura N° 5.1. (c)**. También se ha encontrado que la molécula de Rodamina B en fase gaseosa y en solución, puede presentar otras formas en equilibrio influenciadas por el medio en el que se encuentra (si la acidez del medio aumenta los protones podrían ser adicionados a los nitrógenos de los grupos amino)^{3,4}.

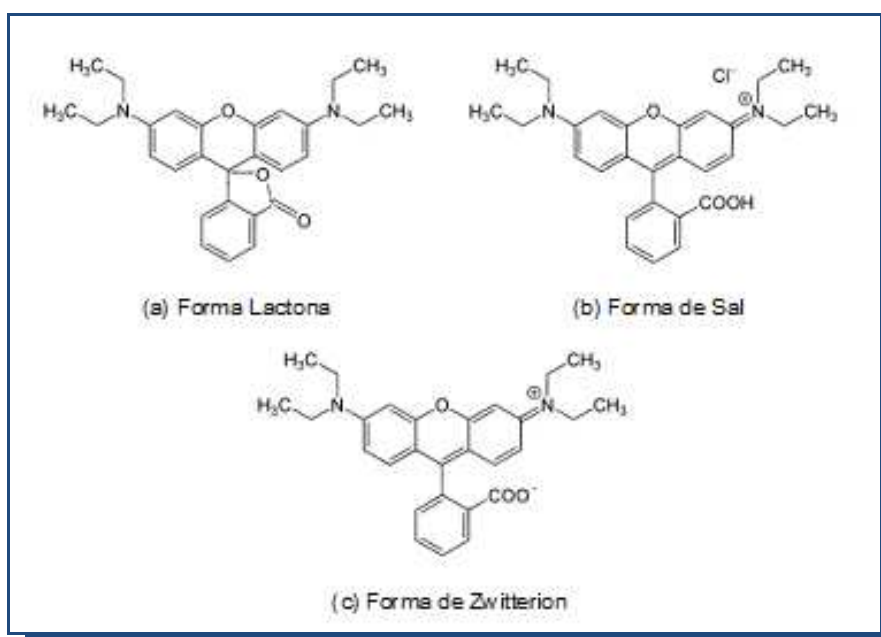


Fig. N°5.1.: Estructuras de la Rodamina B

5.1.2. Solución Estándar de Selenio

Las soluciones de diferentes concentraciones fueron preparadas, al momento de su uso, a partir de una solución patrón de 1,0 g por litro (Selenium Atomic Spectroscopy Standard, Sigma-Aldrich) como SeO_{2(s)} en ácido nítrico. Las soluciones de trabajo se obtuvieron por dilución con una solución de HNO₃ hasta que se obtuvo un 6,3% de HNO_{3(ac)}.

5.1.3. Solución de Yoduro de Potasio 1 M

Se pesó 16,60 g de KI_(s) y se disolvió en agua destilada hasta alcanzar un volumen final de 100 mL.

5.1.4. Solución de Difenilcarbazida (Reactivo Cromogénico)

Se preparó una solución stock de la 1,5-difenilcarbazida (DFC) de concentración 5 mg mL⁻¹ disolviendo la masa de reactivo en acetona.

La disolución es transparente al momento de prepararla, después toma un color amarillo claro. Debe almacenarse en frascos de color ámbar, conservarse en heladera y descartarse cuando comienza a decolorarse.

DFC es un compuesto orgánico, cuya fórmula química es $((C_6H_5)NHNH)_2CO$ y posee una masa molar de $242,28 \text{ g mol}^{-1}$. Es difícilmente soluble en agua, por lo cual sus soluciones se preparan disolviendo el compuesto en solventes orgánicos.

La 1,5-difenilcarbazona y la difenilcarbazona reaccionan con los compuestos inorgánicos de mercurio originando productos finales de color violeta. La especificidad de esta reacción depende del valor de pH en el que se desarrolle la misma: a pH ligeramente ácido o neutro estos reactivos reaccionan además con cobre, cobalto y hierro^{5,6}.

5.1.5. Solución Estándar de Mercurio

Las soluciones de diferentes concentraciones fueron preparadas, al momento de su uso, a partir de una solución patrón de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ (Mercury Atomic Spectroscopy Standard, Sigma-Aldrich).

5.1.6. Solución Reguladora de Hidróxido de Sodio/Dihidrógeno Fosfato de Potasio

Se mezclaron 100 mL de solución de KH_2PO_4 0,1 M con 58,2 mL de $NaOH_{(ac)}$ 0,1 M, para obtener la solución buffer de pH adecuado. Posteriormente se diluyó con agua bidestilada y se llevó a volumen en matraz aforado de 200 mL.

5.1.7. Solución de Tritón X-100 al 5% v/v

La solución de trabajo se preparó diluyendo 5 mL de Tritón X-100 (eter octilfenol poli (etilenglicol); Octylphenoxypolyethoxyethanol; Éter de glicol de polietileno actilfenilo; Polietilenglicol mono [4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil] éter)) con agua bidestilada y llevando a un volumen final de 100 mL.

Durante los últimos años, los surfactantes han empezado a utilizarse como disolventes alternativos en el análisis espectrofotométrico^{7,8,9,10} ya que poseen la ventaja de ser ópticamente transparentes, relativamente no tóxicos y estables¹¹.

Los surfactantes disueltos en agua forman agregados llamados micelas que se organizan de manera que la cabeza polar esté en contacto con la solución acuosa, mientras que las cadenas hidrófobas se encuentran dentro de las micelas formando un microambiente no polar. Las micelas son bastante pequeñas (diámetro de 3 a 6 nm) por lo que las propiedades macroscópicas de sus disoluciones se aproximan a las de una disolución homogénea. Estas micelas permiten la solubilidad de compuestos de baja polaridad gracias al medio apolar que proveen sus cadenas hidrocarbonadas.

5.1.8. Soluciones de Ácido Clorhídrico 0,1 M, 4 M y 6 M

Se tomaron 2,08 mL; 83,33 mL y 125 mL de $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 12 M y se llevaron a un volumen final de 250 mL con agua bidestilada, para concentraciones de 0,1 M, 4 M y 6 M respectivamente.

5.1.9. Solución de Hidróxido de Sodio 0,1 M

Se disolvió 1,0 g de $\text{NaOH}_{(\text{s})}$ en 250 mL de agua bidestilada, con la ayuda de un agitador magnético.

5.1.10. Resina Aniónica Dowex 1X8

Para el desarrollo de los sensores de Se y Hg(II) se utilizó la resina aniónica marca Dowex 1X8 de 200/400 mallas en forma clorulada marca Fluka de densidad de $0,71 \text{ g cm}^{-3}$. Ésta es una resina del tipo aniónica fuerte con grupos de intercambio amonio cuaternario (NH_4^+).

La resina se purificó y regeneró previo a su uso. Para ello se tomó una masa de resina a purificar y se la suspendió en un volumen de agua equivalente. Se agitó el sistema y se lo dejó reposar por 24 horas. Luego se lavó repetidas veces, separando el sobrenadante mediante centrifugación. Este ciclo se repitió al menos 10 veces. Posteriormente, se suspendió la fase sólida 2 horas en una solución de $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 4 M para regenerar su forma clorulada. Por último se la lavó con agua destilada repetidas veces hasta alcanzar un valor neutro de pH. En todos los pasos se utilizó agua de elevada pureza, libre de iones. Finalmente se colocó en estufa para eliminar la humedad (110°C).

5.2. Instrumental y Materiales

5.2.1. Medidas Absorciométricas

Para las medidas absorciométricas y trazado de curvas espectrales en UV-Visible se utilizó un Espectrofotómetro UV-Visible haz simple (200 – 1100 nm), marca METROLAB 1700, controlado desde PC, utilizando el programa METROLAB® SF170.

Las celdas fueron de cuarzo y el paso óptico en todos los casos fue de 10 mm para las mediciones en solución. Para las mediciones en fase sólida se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico y volumen útil de 0,240 mL, con adaptador para portacubetas.

5.2.2. Medidas y Ajustes de pH

Se utilizó un pH-metro digital Orion modelo 701-A provisto de electrodo combinado de vidrio, con referencia interna de Ag-AgCl, marca ALTRONIX® TPX.

5.2.3. Tratamiento de Muestras

Se recurrió a una Centrifuga marca CAVOUR® VT-32165-DC 0 – 3500 rpm, un agitador mecánico rotativo 0 – 200 rpm y balanza analítica capaz de discriminar $\pm 0,1$ mg como mínimo.

5.2.4. Diseño Experimental

Se realizó con el programa Design-Expert versión 7.0.0., utilizando el diseño de Box-Behnken para la superficie de respuesta.

5.3. Selenio

5.3.1. Parámetros que Afectan la Formación del Complejo

El Se(IV) oxida en medio fuertemente ácido al anión yoduro, obteniéndose el complejo triyoduro en solución acuosa, el cual posteriormente forma un complejo iónico coloreado, menos soluble, con la Rodamina B (Figura N°5.2.) .

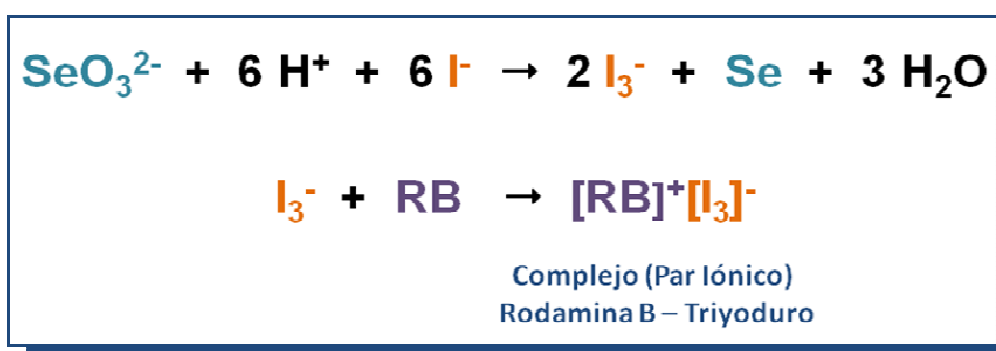


Fig. N°5.2.: Reacción de Caracterización

El complejo Triyoduro-Rodamina B resultante se determinó espectrofotométricamente a 560 nm.

En este caso se hizo necesario la incorporación de un agente tensoactivo que permitiera mantener como un sistema homogéneo al quelato formado y al exceso de reactivo necesario, y que a la vez produjera un aumento en la sensibilidad.

5.3.2. Influencia del pH

El estudio se realizó en solución, dado que la formación del complejo se produce en la fase líquida previo a su fijación en la fase sólida (resina).

Trabajos anteriores han demostrado que el par iónico se produce en medio fuertemente ácido^{12,13,14,15}. Se tomaron 50 mL de muestra conteniendo 10 mg L⁻¹ de Se(IV), se le adicionaron 2 mL de KI_(ac) 1 mol L⁻¹ y se dejó reposar por 15 minutos, antes del agregado de 0,5 mL Tritón X-100 (5% v/v). Para establecer el ácido que brinda las condiciones más favorables para la reacción,

se realizaron las experiencias con ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido acético. Finalmente se agregaron 0,5 mL de solución de RB 2×10^{-3} mol L⁻¹.

El ácido clorhídrico es el que más favorece la reacción de formación del complejo; dando lugar al valor más alto de absorbancia y de mayor estabilidad del compuesto de coordinación.

Usando diferentes concentraciones de soluciones de ácido clorhídrico, los datos experimentales indicaron que el pH óptimo para la formación y la fijación de las especies del complejo se produce en el rango de 1,60 a 2,10 unidades de pH (Figura N° 5.3.), por lo cual, todos los estudios posteriores se realizaron a pH 1,70.

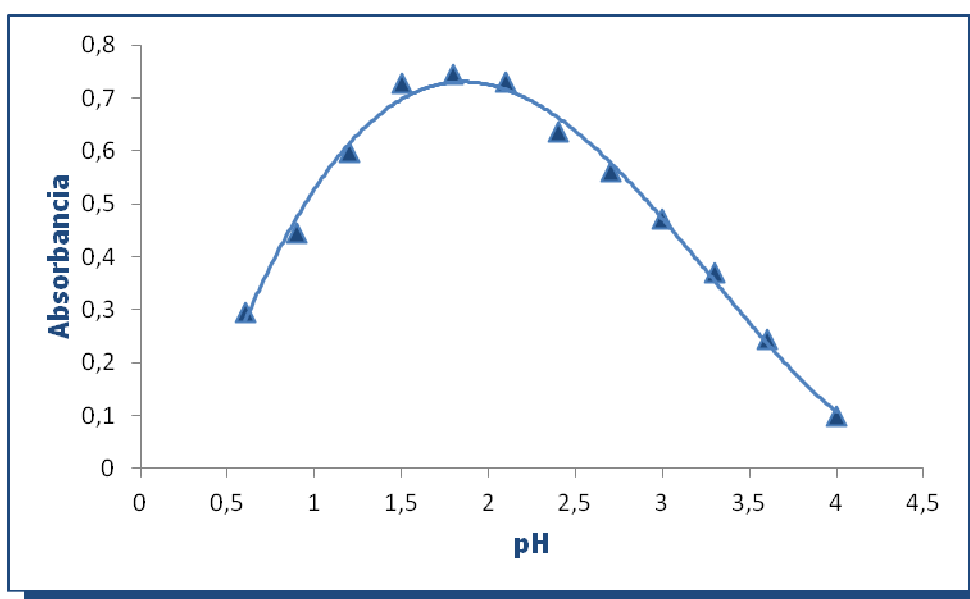


Fig. N°5.3.: Determinación del pH Óptimo

5.3.3. Selección de la Resina

Se efectuaron varios ensayos cualitativos de fijación del compuesto con diferentes resinas, llevándose a cabo en una placa de toque, realizando simultáneamente un ensayo en blanco para cada uno.

De los ensayos se observó que el par iónico no se fija sobre intercambiadores aniónicos Sephadex DEAE o QAE, intercambiador catiónico Sephadex SP o adsorbente hidrofílico Sephadex G-25. Sin embargo, fue

fuertemente fijado en la resina aniónica tipo poliestireno divinilbenceno (Dowex 1X8) cuyas características se describen en la **Tabla 5.1**.

Tabla 5.1. Características de la Dowex 1X8 de Trabajo

Tipo	Intercambiador Aniónico Fuertemente Básico
Grupo Activo	Trimetilbencilamonio
Matriz	Estireno-DVB (Gel microporoso)
% de Entrecruzamiento del DVB	8
Forma Iónica	Cl ⁻
Rango de pH Efectivo	0 – 14
Forma Física	Esferas
Tamaño de Malla	200 – 400

Dowex 1X8 fue seleccionada por su alta estabilidad en medio fuertemente ácido, por poseer una vida útil prolongada y ser casi incolora.

5.3.4. Orden de Adición de los Reactivos

El estudio se realizó en solución previo a la fijación del complejo en la resina. Se tomaron 50 mL de muestra conteniendo al menos 50 ppb de Se(IV) y se le adicionaron a continuación los siguientes reactivos: 1 mL HCl_(ac) 6 mol L⁻¹ y 2 mL de KI_(ac) 1 mol L⁻¹. Se dejó reposar por 15 minutos y se agregaron 0,5 mL Tritón X-100 (5% v/v) y 0,5 mL de solución de RB 2x10⁻³ mol L⁻¹.

Al variar el orden de los reactivos se observó que en algunos casos llevaba mucho más tiempo la formación del complejo, por lo que se eligió la siguiente disposición:



5.3.5. Estudio de la Influencia de las Variables Químicas

Una vez seleccionado el pH, composición y concentración del buffer y el orden de agregado de los reactivos, para obtener el resultado óptimo para la determinación de Se por EFS, se plantea tener en cuenta el efecto de tres variables que afectan su cuantificación. Concentración del reactivo RB, volumen del tensoactivo no iónico Tritón X-100 y volumen del reactivo yoduro de potasio (necesario para la formación del par iónico $[RB]^+[I_3^-]$):

A la vez se consideran tres niveles de intensidad diferentes para cada uno de estos efectos. Por tal motivo se elige el diseño de Box-Behnken.

Para estudiar la influencia de cada uno de estas tres variables sobre la respuesta (Absorbancia máxima) se realiza un estudio inicial tipo de mapeo o screening. Es importante aclarar que todas las experiencias se realizaron por triplicado y las absorbancias utilizadas son el promedio de respuestas obtenidas.

Luego, con los datos obtenidos, se realiza un Análisis de la Varianza para cada una de las variables, con el objeto de determinar su influencia en la varianza de la respuesta. Dicho análisis tipo ANOVA se basa en un diseño factorial totalmente aleatorizado para tres niveles de cada una de las tres variables. Los resultados de dicho análisis pueden verse en la **Tabla 5.2**.

Tabla 5.2. ANOVA para las variables químicas

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor F	Valor P
A: RB	1,84	1	110,75	0,0001
B: Tr X-100	0,032	1	1,94	0,2219
C:KI	3,24	1	194,65	< 0,0001
AA	4,96	1	297,78	< 0,0001
AB	0,014	1	0,86	0,3951
AC	0,030	1	1,83	0,2342

BB	3,38	1	203,23	< 0,0001
CC	1,57	1	94,43	0,0002
Residual	0,083	5	0,017	
Falta de Ajuste	0,068	3	2,87	0,2691
Error	0,016	2		
R ²	0,9940		DS	0,13
Ajuste R ²	0,9833		CV%	6,06
Predicción R ²	0,9200			

El modelo muestra un valor F-valor de 92,51 lo que implica que es significativo.

Al aplicar un intervalo de confianza del 95%, de acuerdo al criterio de la estadística de prueba, para todos los factores e interacciones cuyo valor P sea menor o igual a 0,05 como resultado de aplicar ANOVA se consideran significativos. Así vemos que la concentración de RB y el volumen de KI son significativos estadísticamente, al igual que las interacciones entre ellas.

Que la falta de ajuste posea un valor F de 2,87 implica la misma no es significativa en relación con el error (podría ocurrir debido al ruido).

Finalmente se puede observar que el valor predicho de R² de 0,9200 está en concordancia con el valor de R² ajustado de 0,9833.

Por todo lo expuesto puede decirse que este modelo se puede utilizar para la optimización.

5.3.6. Superficie de Respuesta y Optimización por el Método de Box- Behnken

El gráfico de superficie de respuesta permite visualizar en tres dimensiones el comportamiento de la variable de respuesta y señalar claramente la combinación de niveles de factores que la llevan a un valor máximo.

El diseño propuesto se encuentra centrado en el punto $[RB] = 2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 0,5 mL de Tritón X-100 al 5% v/v y 1 mL de $KI_{(ac)} 1 \text{ mol L}^{-1}$.

El punto central se replica por lo menos tres veces para poder evaluar la curvatura de la superficie. Todas las experiencias se realizaron por triplicado. Los niveles asignados para cada variable y los resultados obtenidos para la Absorbancia neta para cada experiencia figuran en la **Tabla 5.3**.

Tabla 5.3. Diseño Basado en el Modelo de Box- Behnken

Corridas	A:RB [$\times 10^{-3} \text{ mol/L}$]	B: Tritón X-100 5% v/v (mL)	C: KI 1 mol/L (mL)	Abs Neta
1	1,00	0,01	1,00	0,112
2	3,00	0,01	1,00	0,185
3	1,00	1,00	1,00	0,099
4	3,00	1,00	1,00	0,198
5	1,00	0,51	0,50	0,078
6	3,00	0,51	0,50	0,165
7	1,00	0,51	1,50	0,176
8	3,00	0,51	1,50	0,299
9	2,00	0,01	0,50	0,145
10	2,00	1,00	0,50	0,115
11	2,00	0,01	1,50	0,278
12	2,00	1,00	1,50	0,260
13	2,00	0,51	1,00	0,368
14	2,00	0,51	1,00	0,351
15	2,00	0,51	1,00	0,363

El modelo calculado a partir del diseño de experimentos se optimiza para encontrar el nivel de los factores sobre el intervalo evaluado. En la **Tabla 5.4.** se muestran los valores encontrados.

Tabla 5.4. Valores Óptimos para la Determinación de Se

Factor	Nivel Superior	Nivel Inferior	Nivel Óptimo
A:RB	3,00	1,00	2,08
B:Tritón X-100	1,00	0,01	0,47
C:KI	1,00	3,00	2,18

La superficie de respuesta para este modelo aparece representada en forma tridimensional en la **Figura 5.4.** y como gráfica de contornos de superficie en la **Figura 5.5.**

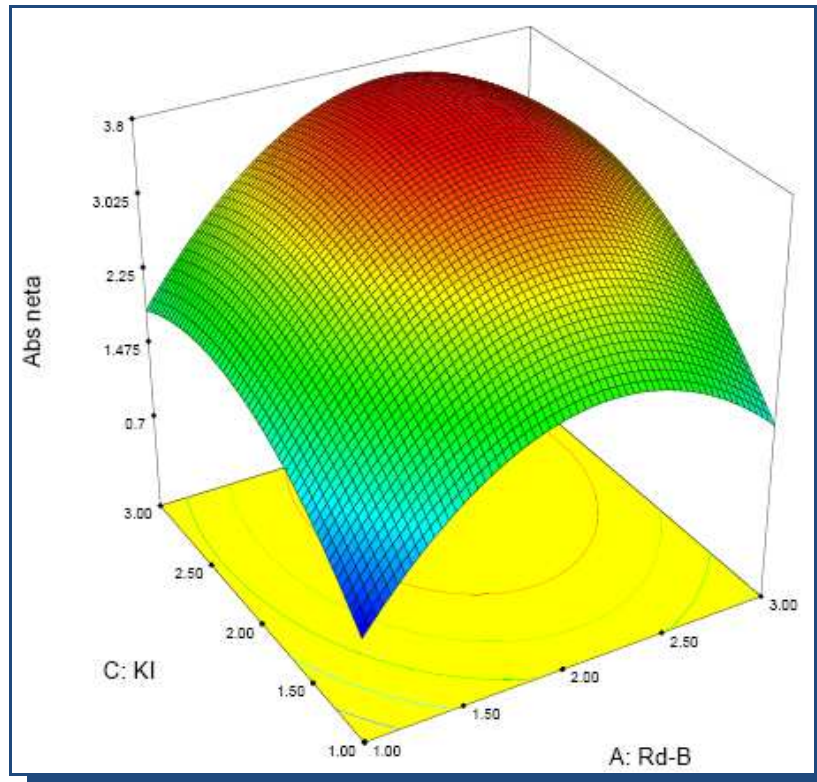


Fig. N°5.4.: Superficie de Respuesta

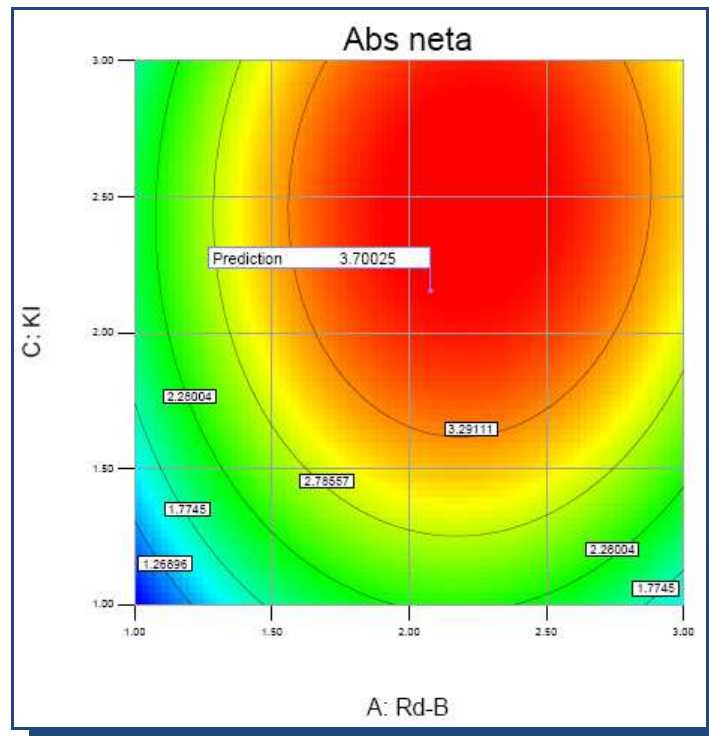


Fig. N°5.5.: Diagrama de Contornos de la Superfície de Respuesta

La **Figura 5.6.** de residuales nos valida la experimentación debido a que no se observa ninguna tendencia lógica y eso significa que se logró la independencia entre los experimentos.

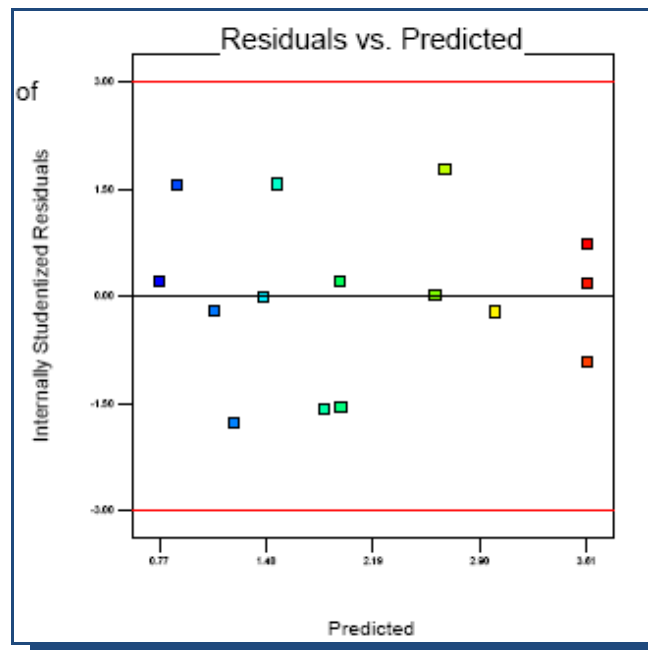


Fig. N°5.6.: Gráfica de Residuos

5.3.7. Influencia de la Cantidad de Resina

En todo sistema heterogéneo, una disminución en el volumen o masa de las fases trae como consecuencia el aumento de la concentración de soluto en el equilibrio en dicha fase.

Se realizó esta experiencia para determinar la influencia que en el valor de la absorbancia ejerce la cantidad de resina utilizada y determinar a la vez, la mínima cantidad de ésta, que sin aumentar en gran medida el tiempo de agitación, produzca una absorbancia máxima.

En tubos de centrífuga plásticos con tapa a rosca, se colocaron 50 µg de Se(IV) y 1 mL HCl_(ac) 6 mol L⁻¹. Luego de 15 minutos, se adicionaron 2 mL de KI_(ac) 1 mol L⁻¹, 0,5 mL Tritón X-100 (5% v/v) y 0,5 mL de solución de RB 2×10⁻³ mol L⁻¹. Se llevó a volumen final de 50 mL en matraz aforado y seguidamente se agregaron cantidades crecientes de resina, agitando 20 minutos. Se empaquetó la resina en las cubetas, midiendo la absorbancia tanto de las muestras como la de sus respectivos blancos (Figura N°5.7.) .

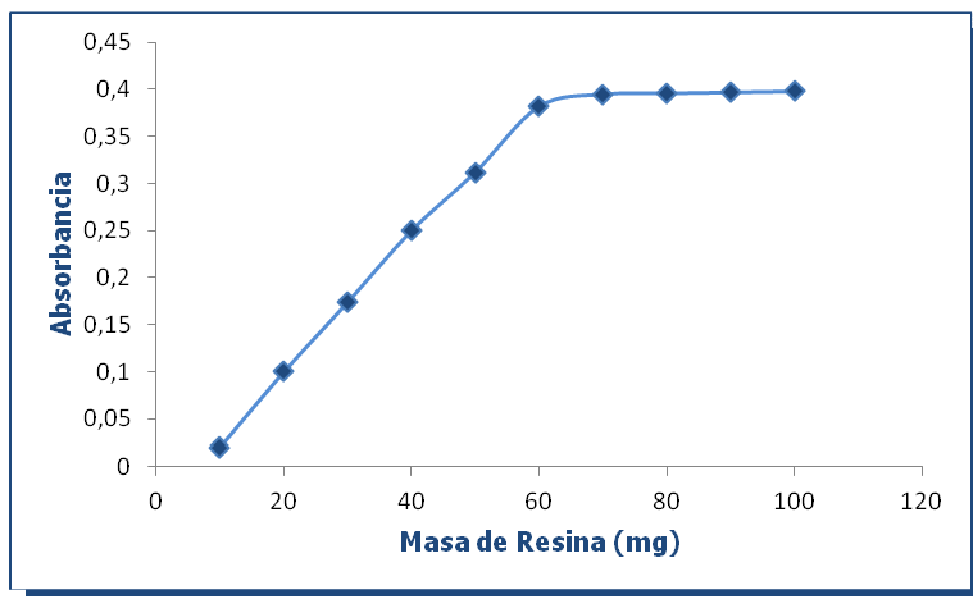


Fig. N°5.7.: Influencia de la Masa de Resina

Se observó que con 70 mg de resina se obtiene la máxima absorbancia. Esta masa es suficiente para cubrir el paso óptico del haz de luz en las

lecturas, siendo una cantidad fácilmente transferible a la cubeta de trabajo al momento de empaquetar la resina.

5.3.8. Influencia del Tiempo de Agitación

Para determinar el tiempo mínimo a partir del cual se alcanza la señal máxima, se repitió la determinación de Se(IV) en muestras de igual concentración pero sometidas a diferentes tiempos de agitación.

Para este estudio se colocaron en tubos plásticos de centrifuga con tapa a rosca 50 μg de Se(IV), 1 mL $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 6 mol L^{-1} , 2 mL de $\text{KI}_{(\text{ac})}$ 1 mol L^{-1} , y se dejó reposar el sistema por 15 minutos. Luego se adicionaron 0,5 mL Tritón X-100 (5% v/v) y 0,5 mL de solución de RB 2×10^{-3} mol L^{-1} . Se llevó a volumen final de 50 mL en matraz aforado y seguidamente se añadieron 70 mg de resina. Se agitaron los tubos según los distintos tiempos ensayados, por último se midió la absorbancia frente al blanco respectivo, una vez empaquetada la resina. Los valores obtenidos se representan gráficamente en la **Figura N°5.8.**

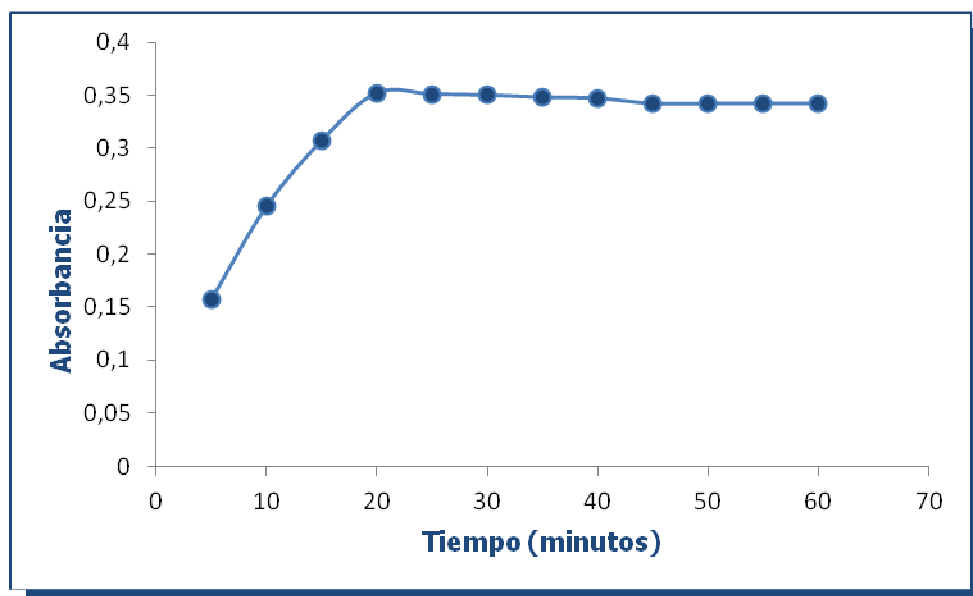


Fig. N°5.8.: Influencia del Tiempo de Agitación

A partir de la gráfica se deduce que un tiempo de agitación de 20 minutos es suficiente para alcanzar el máximo de absorbancia. Este tiempo será utilizado sucesivamente para las demás experiencias.

5.3.9. Estabilidad del Complejo

Para conocer cuál es la estabilidad del complejo una vez formado y fijado en la resina, en un tubo de plástico para centrifuga, se tomaron 50 mL de solución conteniendo 50 μg de Se(IV) y se le adicionaron en el orden siguiente: 1 mL $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 6 mol L^{-1} , 2 mL de $\text{KI}_{(\text{ac})}$ 1 mol L^{-1} . Pasados 15 minutos se agregaron 0,5 mL Tritón X-100 (5% v/v) y 0,5 mL de solución de RB 2×10^{-3} mol L^{-1} . Seguidamente se añadieron 70 mg de resina, se agitó durante 20 minutos, luego se empaquetó en la celda la resina y se midió la absorbancia neta a distintos tiempos, frente al blanco, a las longitudes de onda seleccionadas (Figura N°5.9.).

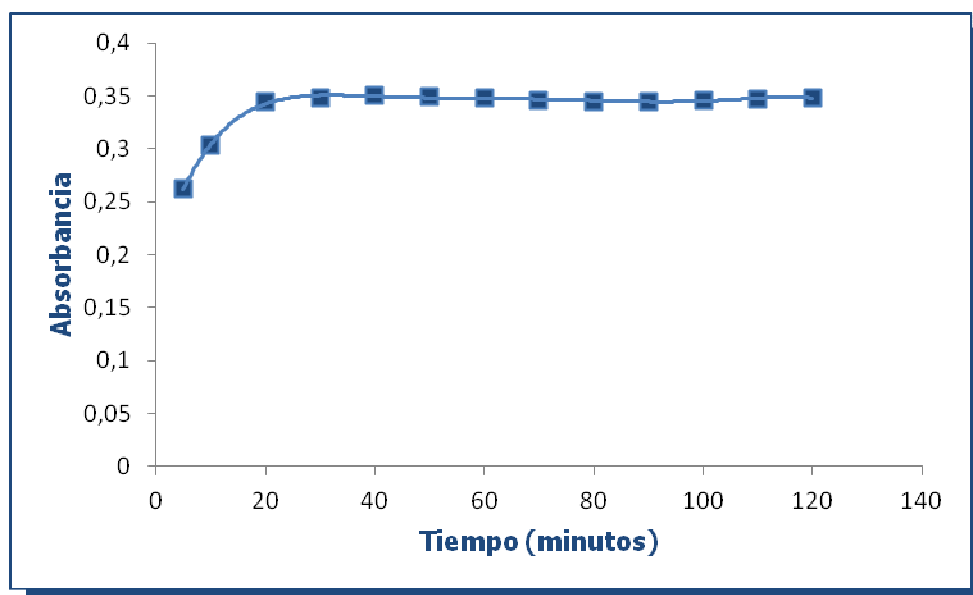


Fig. N°5.9.: Estabilidad del Complejo

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede afirmar que el compuesto fijado en la fase sólida es estable (al menos durante 2 horas), tiempo suficiente para realizar todas las operaciones correspondientes a la EFS.

5.3.10. Selección de Longitud de Onda del Complejo

Para este estudio se colocaron en tubos plásticos de centrifuga con tapa a rosca 50 μg de Se(IV), 1 mL $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 6 mol L^{-1} , 2 mL de $\text{KI}_{(\text{ac})}$ 1 mol L^{-1} . Se dejó

reposar durante 15 minutos y a continuación se agregaron 0,5 mL Tritón X-100 (5% v/v) y 0,5 mL de solución de RB 2×10^{-3} mol L⁻¹. Se llevó a volumen final de 50 mL en matraz aforado y seguidamente se añadió 70 mg de resina. El mismo procedimiento se aplicó al blanco de reactivo, sin el agregado de la solución de selenio.

Con un tiempo de reacción de 20 minutos (desarrollo), se realizó el barrido espectral detectándose el máximo de absorbancia a una longitud de onda de 560 nm, siguiendo la metodología utilizada para la medición de absorbancias en fase sólida¹⁶ (Figura 5.10.).

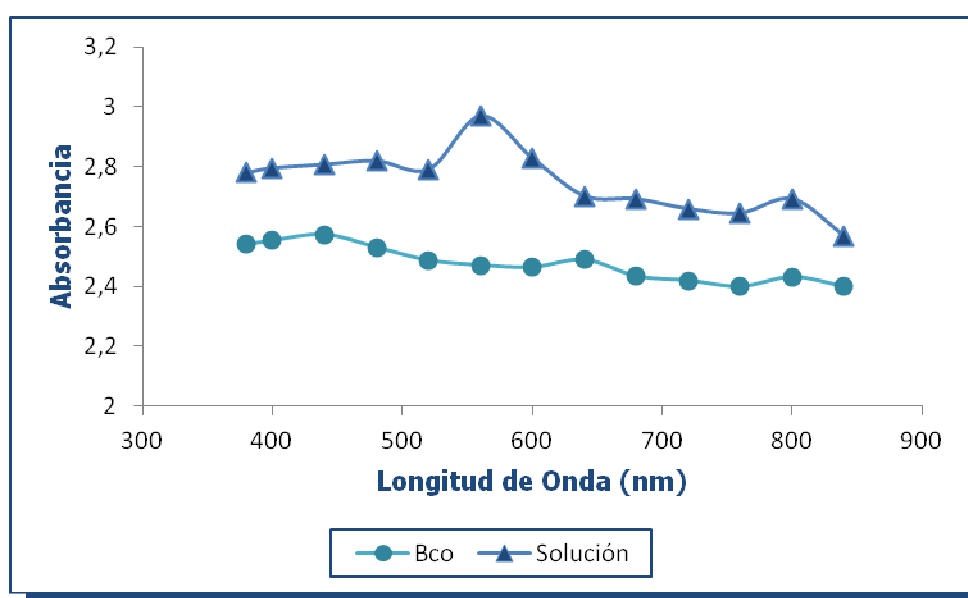


Fig. N°5.10.: Espectro del Blanco de Reactivos y de la Solución Conteniendo el Analito

5.3.11. Curva de Calibración

Se realizó una curva de calibración con diferentes patrones a la longitud de onda seleccionada tal como revela la Figura 5.11. Para ello, se trabajó con concentraciones de Se de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (ppb) en tubos plásticos de 50 mL con tapón. A cada tubo se le adicionó 1 mL HCl_(ac) 6 mol L⁻¹, 2 mL de KI_(ac) 1 mol L⁻¹. Pasados 15 minutos se agregaron 0,5 mL Tritón X-100 (5% v/v) y 0,5 mL de solución de RB 2×10^{-3} mol L⁻¹. Se llevaron a volumen final de 50 mL con agua bidestilada y seguidamente se añadieron 70 mg de resina. Las mezclas se agitaron mecánicamente durante 20 minutos, se

centrifugaron luego de 1 minuto, separando el sobrenadante con ayuda de un cuentagotas. Finalmente se empaquetó la resina con el complejo coloreado en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico y se leyó la absorbancia utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a 560 nm. El mismo procedimiento se aplicó al blanco de reactivo, sin el agregado de la solución de selenio.

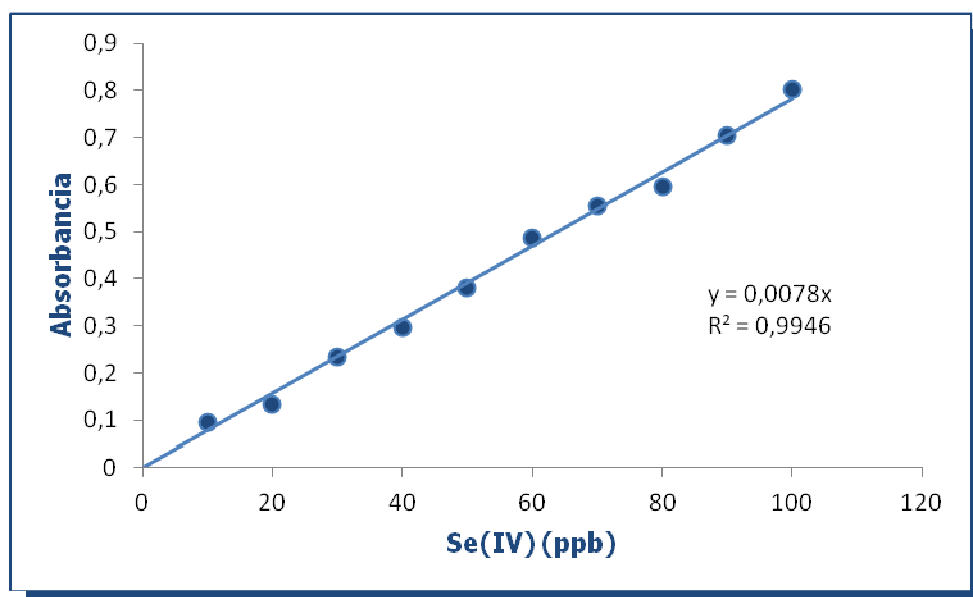


Fig. N°5.11.: Curva de Calibración

Los parámetros analíticos obtenidos pueden observarse en la [Tabla 5.5](#).

Tabla 5.5. Parámetros Analíticos para la Determinación de Se(IV)

Pendiente ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,0078
Rango Lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,00 – 100,00
Coefficiente de Correlación (r)	0,9946

5.3.12. Resumen de las Condiciones Seleccionadas para la Determinación de Se(IV)

A continuación se describen las condiciones óptimas para la determinación de Se(IV) por EFS ([Tabla 5.6](#)).

Tabla 5.6. Condiciones para la Determinación de Se(IV) por EFS

λ (nm)	560
Volumen de Muestra (mL)	50
Soporte Sólido	Dowex 1X8
Masa de Resina (mg)	70
Rango de pH	1,6 – 2,1
Ácido Seleccionado	HCl
Tiempo de Agitación (minutos)	20
Volumen de Tritón X-100 (mL)	0,5

5.3.13. Resumen del Método Propuesto

Se colocan en tubos plásticos de centrifuga con tapa a rosca la solución de Se(IV) a determinar, y se adicionan en orden: 1 mL $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 6 mol L^{-1} (para ajustar el pH a 1,70) y 2 mL de $\text{KI}_{(\text{ac})}$ 1 mol L^{-1} . Se deja reposar 15 minutos y a continuación se agregan 0,5 mL Tritón X-100 (5% v/v) y 0,5 mL de solución de RB 2×10^{-3} mol L^{-1} . Se lleva a volumen final de 50 mL en matraz aforado y seguidamente se añade 70 mg de resina.

La mezcla se agita mecánicamente durante 20 minutos, se centrifuga luego de 1 minuto, separando el sobrenadante con ayuda de un cuentagotas. Finalmente se empaqueta la resina con el complejo coloreado en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico y se lee utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a 560 nm.

5.4. Mercurio

5.4.1. Parámetros que Afectan la Formación del Complejo Mercurio - Difenilcarbazida(Hg-DFC)

El Hg(II) a partir de sus soluciones acuosas, reacciona con la difenilcarbazida, en presencia de un tensoactivo no-iónico (Tritón X-100), para formar un complejo de color azul violáceo (**Figura N° 5.12.**) que se desarrolla completamente luego de 20 minutos de promovida la reacción en medio débilmente ácido o neutro.

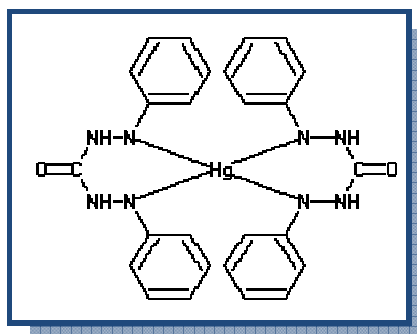


Fig. N°5.12.: Complejo Formado entre la DFC y el Hg(II)

Las soluciones de difenilcarbazida se realizaron utilizando acetona como disolvente, dada su insolubilidad en agua.

5.4.2. Selección de la Resina

Se efectuaron varios ensayos cualitativos de fijación del compuesto con resinas de adsorción (Sílica Gel, Amberlite XAD 4, XAD 7 y XAD 16) y resinas iónicas (Dowex 1X8 y Sephadex C-50). Los mismos se llevaron a cabo en placa de toque, realizando simultáneamente un ensayo en blanco para cada uno.

Se eligió la resina de intercambio aniónica Dowex 1X8, dada su capacidad para fijar al ligando en el medio adecuado para la reacción del mismo con el analito. Con el resto de los soportes sólidos la fijación no era completa o presentaban una elevada opacidad al paso de la luz a las longitudes de onda de trabajo.

5.4.3. Influencia de la Concentración de Difenilcarbazida (DFC)

Para estudiar la concentración óptima de reactivo DFC, una masa fija de resina (1 g) se puso en contacto con soluciones acetónicas de concentraciones crecientes de reactivo DFC, para mantener la solubilidad del reactivo cromogénico. Se los dejó en contacto por al menos 2 horas y con agitación. Una vez seca la resina funcionalizada, se pesaron 100 mg de ésta y se le adicionó 50 mL de solución problema. Se realizó en un blanco de reactivos y paralelamente en soluciones conteniendo 60 ppb de Hg(II), por último se midió las absorbancias netas correspondientes para cada caso. Los valores estudiados y las respuestas obtenidas puede observarse en la **Tabla 5.7**.

Tabla 5.7. Influencia de la Concentración de Difenilcarbazida

[DFC] mg mL ⁻¹	Abs _{Bco}			Abs _{Hg(II)}			Abs _{Neta}
	λ_{540}	λ_{800}	$\lambda_{540-800}$	λ_{540}	λ_{800}	$\lambda_{540-800}$	
3	2,438	2,296	0,142	2,977	2,765	0,212	0,070
5	2,375	2,163	0,212	2,805	2,222	0,583	0,371
7	2,015	1,985	0,030	2,168	2,101	0,067	0,037

La concentración de la solución de difenilcarbazida óptima fue de 0,5 mg mL⁻¹. Concentraciones mayores hicieron imposible su lectura espectral debido a la fuerte intensidad del color del complejo formado, mientras que concentraciones menores repercutieron en la formación del complejo. Por otro lado se hizo necesario agregar un tensoactivo no iónico (Trirón X-100) a la solución para mejorar el contacto entre fases.

5.4.4. Funcionalización de la Resina

Para fijar el reactivo complejante a la resina, una vez realizados los estudios de la concentración óptima de DFC a utilizar, se tomaron 5 g de resina purificada y se adicionaron 100 mL de solución de difenilcarbazida en acetona, dejando en reposo al sistema por un período de 24 horas como mínimo. En una

etapa posterior, se separó el soporte sólido por centrifugación y se lavó con agua desionizada, varias veces. Por último se secó en estufa a 40 °C y se conservó en frascos color caramelo en ausencia de la luz a temperatura ambiente.

5.4.5. Influencia del pH

Los ensayos se efectuaron sobre la resina funcionalizada (R-DFC) a la que se la hizo reaccionar con una solución diluida de mercurio y pequeñas cantidades de tensoactivo. Los distintos valores de pH fueron ajustados con soluciones de $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 0,1 mol L⁻¹ e $\text{NaOH}_{(\text{ac})}$ 0,1 mol L⁻¹, dejándose constantes la cantidad de resina y concentración de Hg(II) para cada una de las pruebas.

De los ensayos realizados se registró un valor máximo de absorbancia para un valor de pH cercano a 7. Por encima o por debajo de dicho valor de pH el desarrollo del color del complejo es muy débil o inexistente, con lo que puede inferirse que no se produce la reacción deseada. Los resultados se muestran en la **Figura 5.12**.

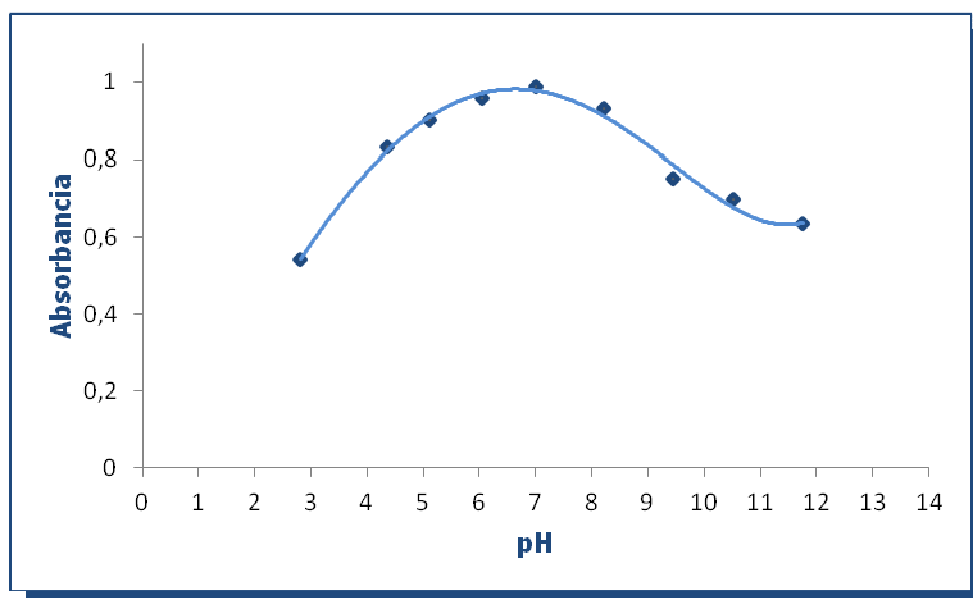


Fig. N°5.12.: Determinación del pH Óptimo

5.4.6. Influencia del Volumen de Tensoactivo

Se realizó siguiendo la metodología: se toman 50 mL de solución estándar de 60 ppb de Hg(II), a la que se le agregan diferentes concentraciones de Tritón X-100, seguidos de 1 mL de solución buffer y por último 80 mg de R-DFC. Todas las muestras se agitan durante 20 minutos y luego se mide su absorbancia neta. Los resultados obtenidos se grafican en la **Figura 5.13.**

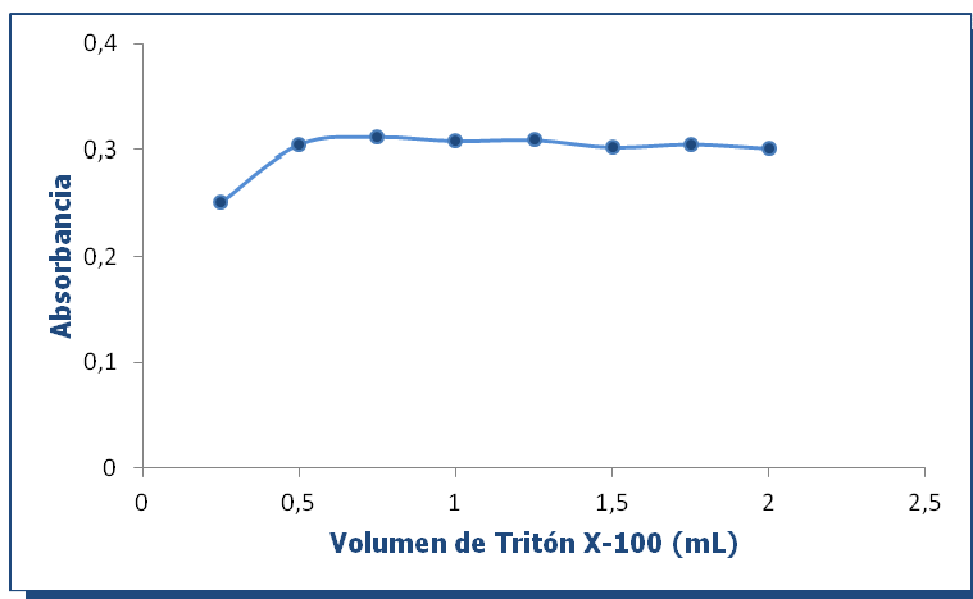


Fig. N°5.13.: Influencia de la Concentración de Tensoactivo Tritón X-100

Finalmente de la observación de la gráfica se elige el volumen de 0,5 mL de solución de Tritón X-100 al 5% v/v, correspondiente a 0,1% v/v de concentración final, como óptimo.

5.4.7. Orden de Adición de los Reactivos

Se realizó el estudio sobre muestras con iguales concentraciones de 50 ppb Hg(II), a las que se les agregaron volúmenes fijos de solución 5% v/v de tensoactivo Tritón X-100 y 80 mg de R-DFC, en diferentes ordenes de adición. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Las variaciones en la absorbancia observadas al alterar el orden de agregado de los reactivos fueron inferiores al 5%, exceptuando el caso en el

que la solución buffer se agregaba en primer orden. Se eligió finalmente el siguiente orden de agregado de reactivos para el resto del trabajo:

Tritón X-100 + Buffer ($\text{KHPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) + R-DFC

5.4.8. Influencia de la Cantidad de Resina

En tubos de centrífuga plásticos con tapa a rosca, se colocó solución estándar, conteniendo al menos 50 ppb de Hg(II), se le adicionaron a continuación los siguientes reactivos: 0,5 mL de Tritón X-100 5% v/v y 1 mL de buffer, llevándose a un volumen final de 50 mL. Seguidamente se agregaron cantidades crecientes de R-DFC, agitando 20 minutos. Se empaquetó la resina en las cubetas, midiendo la absorbancia tanto de las muestras como la de sus respectivos blancos. En la gráfica se representan los valores obtenidos que pueden observarse en la **Figura 5.14**.

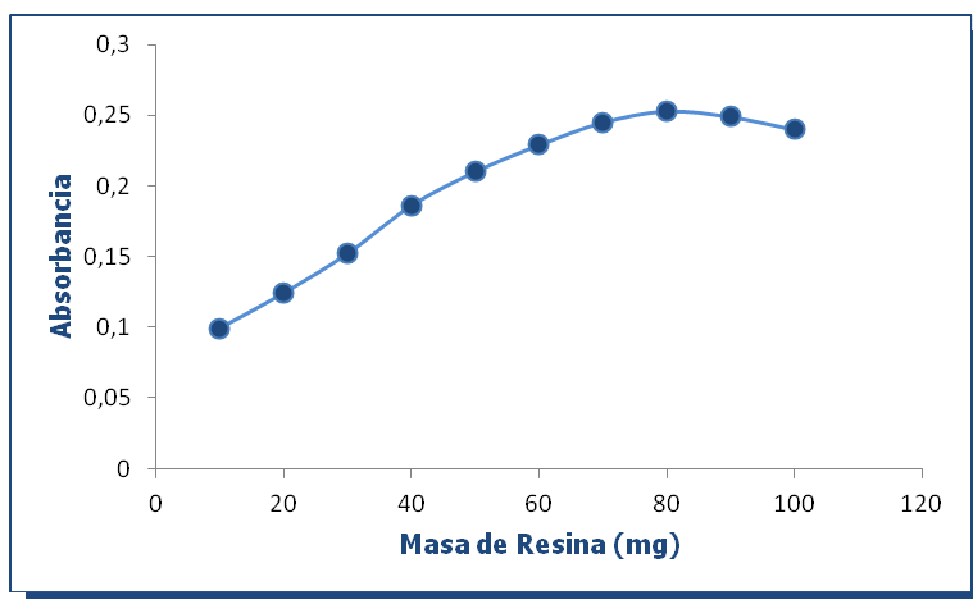


Fig. N°5.14.: Influencia de la Masa de Resina

De la gráfica se desprende que con 80 mg de resina se produce la máxima absorbancia. Esta masa contiene una concentración de ligando

suficiente para fijar completamente el analito presente en solución y a la vez cubrir el paso óptico del haz de luz.

5.4.9. Influencia del Tiempo de Agitación

Para determinar el tiempo mínimo a partir del cual se alcanza la señal máxima, se repitió la determinación de Hg(II) en muestras de igual concentración pero sometidas a diferentes tiempos de agitación.

Para este estudio se colocaron en tubos plásticos de centrifuga con tapa a rosca, volumen necesario de solución estándar de Hg(II) para alcanzar 50 ppb Hg(II), a cada uno de los tubos se les adicionó a continuación 0,5 mL de Tritón X-100 5% v/v y 1 mL de solución buffer y se llevó a un volumen final de 50 mL con agua bidestilada. Finalmente se añadieron 80 mg de R-DFC, y se agitaron según los distintos tiempos ensayados, por último se midió la absorbancia frente al blanco respectivo, una vez empaquetada la resina. Los valores obtenidos se representan gráficamente en la **Figura 5.15**.

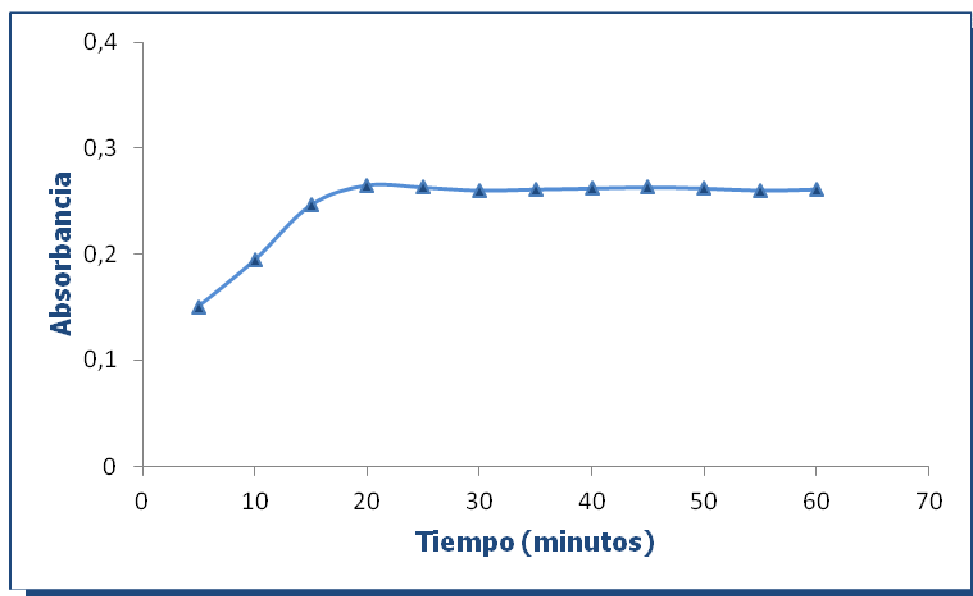


Fig. N°5.15.: Influencia del Tiempo de Agitación

Los resultados obtenidos son similares a los correspondientes a la determinación de Se(IV) con RB, por lo que se puede afirmar que para que se

forme correctamente el complejo del Hg(II) con DFC fijado a la resina Dowex 1X8, se necesita agitar al menos por 20 minutos en agitador rotatorio.

5.4.10. Estabilidad del Complejo

En todos los ensayos en un tubo de plástico para centrifuga, se tomaron 50 mL de solución conteniendo 50 ppb de Hg(II) y se le adicionaron en el orden siguiente: 0,5 mL Tritón X-100 5% v/v y 1 mL de buffer. Seguidamente se añadieron 80 mg de R-DFC, se agitó durante 20 minutos, luego se empaquetó en la celda la resina y se midió la absorbancia neta a distintos tiempos, frente al blanco, a la longitud de onda seleccionada (**Figura 5.16.**).

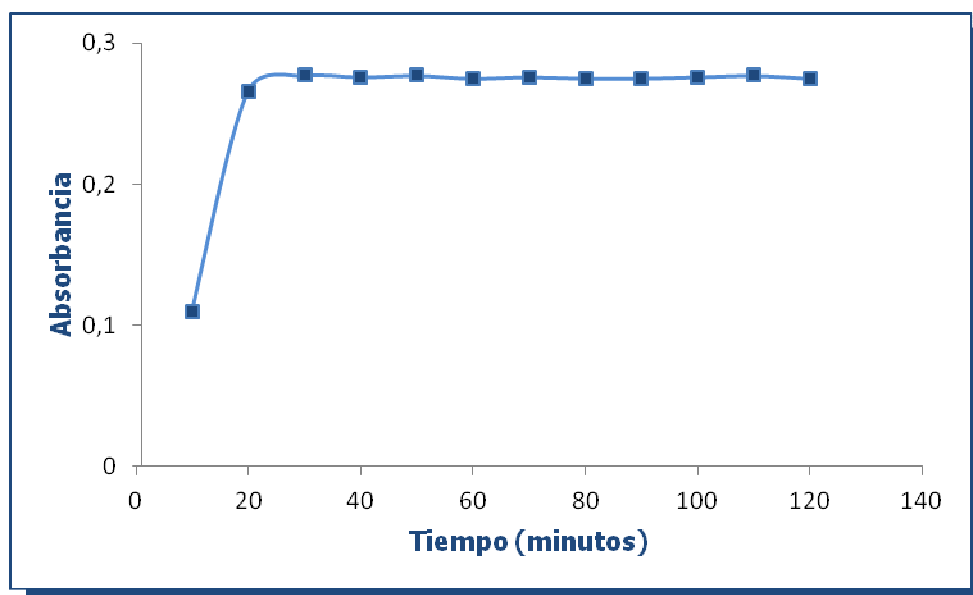


Fig. N°5.16.: Estabilidad del Complejo

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede afirmar que el complejo alcanza la estabilidad máxima a los 20 minutos y continua siendo estable (al menos durante 2 horas), lo cual representa una gran ventaja a la hora de realizar las mediciones de absorbancia neta.

5.4.11. Selección de Longitud de Onda del Complejo

Para este estudio se colocaron en tubos plásticos de centrifuga con tapa a rosca 50 ppb de Hg(II), a cada uno de los tubos se les adicionó a

continuación 0,5 mL de Tritón X-100 5% v/v y 1 mL de solución buffer y se llevó a un volumen final de 50 mL con agua bidestilada. Finalmente se añadieron 80 mg de R-DFC. El mismo procedimiento se realizó para el blanco de reactivo sin el agregado de la solución estándar de mercurio.

Al cabo de un tiempo de reacción de 20 minutos (desarrollo), se realizó el barrido espectral detectándose el máximo de absorbancia a una longitud de onda de 540 nm, siguiendo la metodología utilizada para la medición de absorbancias en fase sólida¹⁶ (Figura 5.17.).

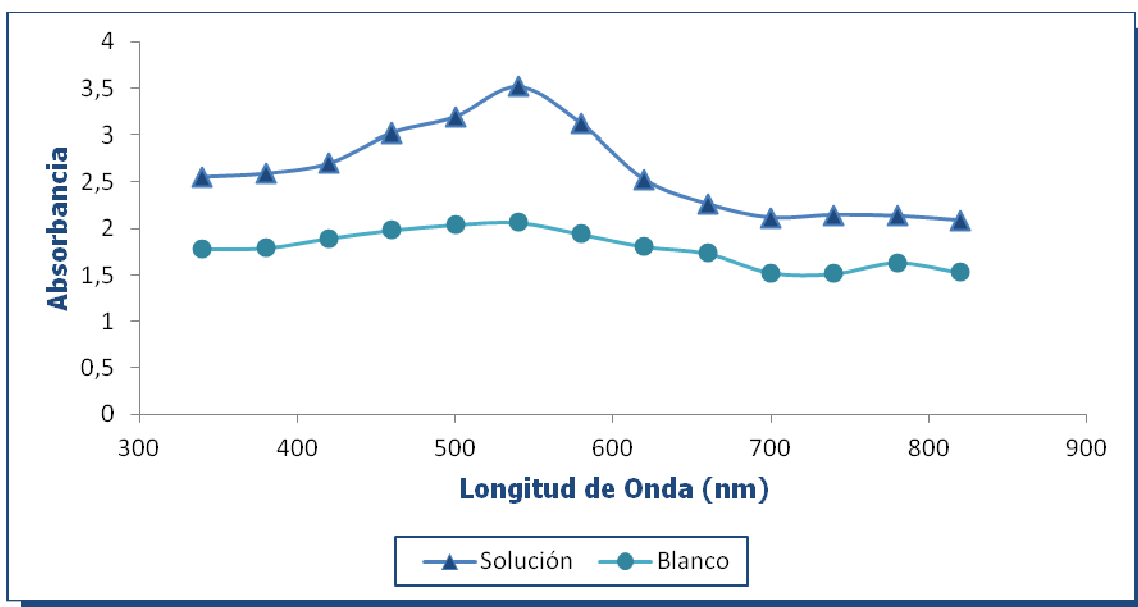


Fig. N°5.17.: Espectro del Blanco de Reactivos y de la Solución Conteniendo el Analito

5.4.12. Curva de Calibración

La resina funcionalizada se hizo reaccionar con soluciones que contenían distintas concentraciones de mercurio y 0,5 mL de Tritón X-100 5% v/v, manteniendo el pH apropiado para la formación del complejo con un buffer $\text{KHPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$. Las mezclas se agitaron mecánicamente durante 20 minutos, se centrifugaron luego de 1 minuto, separando el sobrenadante con ayuda de un cuentagotas. Finalmente se empaquetó la resina con el complejo coloreado en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico y se leyó utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a 540 nm. El mismo procedimiento se aplicó al blanco de reactivo, sin el agregado de la solución de mercurio.

Se realizó una curva de calibración, a la longitud de onda seleccionada tal como revela la **Figura 5.18**.

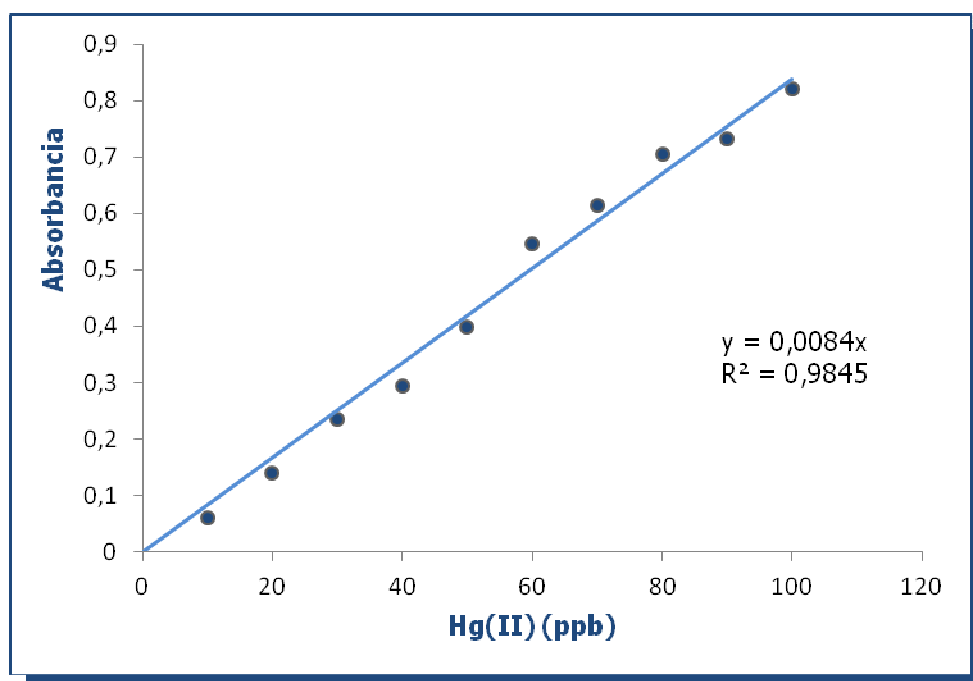


Fig. N°5.18.: Curva de Calibración

Los parámetros analíticos obtenidos pueden observarse en la **Tabla 5.8**.

Tabla 5.8. Parámetros Analíticos para la Determinación de Hg(II)

Pendiente ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,0084
Rango Lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	5,00 – 100,00
Coefficiente de Correlación (r)	0,9845

5.4.13. Resumen de las Condiciones Seleccionadas para la Determinación de Hg(II)

A continuación se describen las condiciones óptimas para la determinación de Hg(II) (**Tabla 5.9**).

Tabla 5.9. Condiciones para la Determinación de Hg(II) por EFS

λ (nm)	540
Volumen de Muestra (mL)	50
Soporte Sólido	Dowex 1X8
Masa de Resina (mg)	80
pH de Trabajo	7
Buffer Seleccionado	KHPO ₄ /KH ₂ PO ₄
Tiempo de Agitación (minutos)	20
Volumen de Tritón X-100 (mL)	0,5

5.4.14. Resumen del Método Propuesto

Se colocan en tubos plásticos de centrifuga con tapa a rosca la solución de Hg(II) a determinar, y se adicionan en orden: 0,5 mL de Tritón X-100 5% v/v y 1 mL de solución buffer KHPO₄/KH₂PO₄. Se lleva a volumen final de 50 mL en matraz aforado y seguidamente se añade 80 mg de resina funcionalizada con el reactivo Rodamina B.

La mezcla se agita mecánicamente durante 20 minutos, se centrifuga luego de 1 minuto, separando el sobrenadante con ayuda de un cuentagotas. Finalmente se empaqueta la resina con el complejo coloreado en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico y se lee utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a 540 nm.

5.4.15. Colorimetría Visual (Semicuantitativa) de Hg(II)

El hecho de disponer de técnicas sencillas y confiables para la cuantificación de Hg(II) en diversas matrices, es importante a la hora de proponer y diseñar sistemas de monitoreo (frecuentemente in-situ) en regiones que por su situación geográfica o política se encuentran distantes de los centros o laboratorios de referencia. En este contexto adquieren relevancia las

técnicas colorimétricas semi-cuantitativas que pueden realizarse en ausencia de instrumental por la simple observación de productos coloreados a ojo desnudo (*naked-eye techniques*)^{17,18,19,20}, que a pesar de su baja sensibilidad brindan información relevante e inmediata sobre la situación al momento de ser realizados los ensayos químicos.

El procedimiento aplicado es el mismo que para la espectrofotometría.

Como puede observarse en la **Figura 5.19.**, la intensidad del color de la resina funcionalizada depende de la concentración de Hg(II) en las soluciones de la muestra (concentración del complejo ad/absorbido).

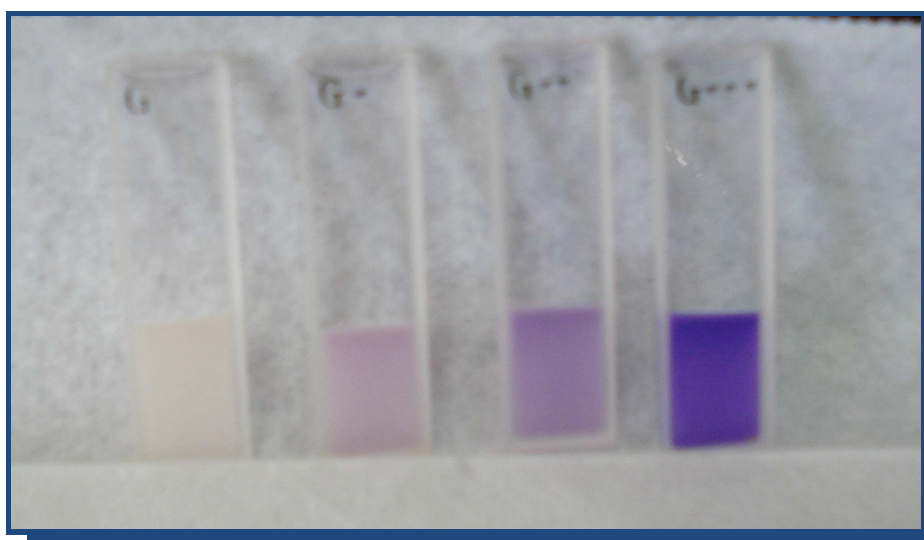


Fig. N°5.19.: Complejo Hg(II)-DFC absorbido. De izquierda a derecha: blanco de reactivo, concentración de Hg de 30, 60 y 100 ppb, respectivamente

Esto cobra importancia a la hora de realizar el análisis semi-cuantitativo rápido o simplemente cuando no se posee los insumos necesarios para la determinación espectrofotométrica. En estos casos puede recurrirse a las técnicas "*naked eyes*", las cuales han tomado relevancia en los últimos tiempos^{21,22,23}, proporcionándose así un método de bajo costo de detección simple y veloz.

- ¹ Plata Bedman, A.; Araguás Araguás, L. (2002). *Detection and the Prevention of Leaks from Dams*. CRC Press. Madrid.
- ² Ramette, R.W.; Sandell, E.B. (1956). *Rhodamine B equilibria*. Journal of the American Chemical Society. Volume 78, Issue 19, p. 4872-4878.
- ³ Greisch, J.F.; Harding, M.E.; Kordel, M.; Klopper, W.; Kappes, M.M.; Schooss, D. (2013). *Intrinsic fluorescence properties of rhodamine cations in gas-phase: triplet lifetimes and dispersed fluorescence spectra*. Physical Chemistry Chemical Physics. Volume 15, Issue 21, p. 8162-8170.
- ⁴ Greisch, J.F.; Harding, M.E.; Klopper, W.; Kappes, M.M.; Schooss, D.. (2014). *Effect of Proton Substitution by Alkali Ions on the Fluorescence Emission of Rhodamine B Cations in the Gas Phase*. The Journal of Physical Chemistry A. Volume 118, Issue 21, p. 3787-3794.
- ⁵ Cheng, K.L.; Ueno, K.; Imamura, T. (1992). Handbook of Organic Analytical Reagents. 2da edición. Editorial CRC Press. Florida.
- ⁶ Martínez Rodríguez, R.; Gragera Martínez, R.R. (2008). Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica. Editorial CSIC - CSIC Press.
- ⁷ Khan, H.; Ahmed J. (2005). *A simple spectrophotometric determination of trace level mercury using 1,5-dyphenylthiocarbazone solubilized in micelle*. Analytical Sciences. Volume 21, Issue 5, p. 507- 512.
- ⁸ Song, J.Y.; Hou, M.; Zhang, L.X. (2006). *Determination of mercury at trace level in natural water samples by hydride generation atomic absorption spectrophotometry after cloud point extraction preconcentration*. Chinese Chemical Letters. Volume 17, Issue 9, p. 1217-1220.
- ⁹ García Alvarez-Coque, M.C.; Villanueva Camañas, R.M.; Martínez Vaya, M.C.; Ramis Ramos, G. (1986). *Spectrophotometric determination of mercury (II) and silver (II) with copper (II) and diethyldithiocarbamate in the presence of Triton X- 100*. Talanta. Volume 33, Issue 8, p. 697-699.
- ¹⁰ Singh, H.B.; Kumar, B.; Sharma, R.L.; Katyal, M. (1989). *Direct spectrophotometric determination of trace amounts of mercury (II) in aqueous media as its dithizonate complex in the presence of a neutral surfactant*. Analyst. Volume 114, Issue 7, p. 853-855.

¹¹ Medel, M.G. (1986). *Dye surfactant interactions: a review*. Talanta. Volume 33, Issue 3, p. 255 - 264.

¹² Portmann, J.E.; Riley, J.P. (1966). *The determination of antimony in natural waters with particular reference to sea water*. Analytica Chimica Acta. Volume 35, p. 35-41.

¹³ Shaopu, L.; Guangming, Z.; & Zhigui, H. (1990). *A highly sensitive colour reaction for Se (IV) with the iodide-rhodamine B-PVA system: Spectrophotometric determination of trace amounts of selenium in water*. Talanta. Volume 37, Issue 7, p. 749-752.

¹⁴ Palanivelu, K.; Balasubramanian, N.; Ramakrishna, T.V. (1992). *A chemical enhancement method for the spectrophotometric determination of trace amounts of arsenic*. Talanta. Volume 39, Issue 5, p. 555-561.

¹⁵ Mulhern, K.R.; Detty, M.R.; Watson, D.F. (2013). *Effects of surface-anchoring mode and aggregation state on electron injection from chalcogenorhodamine dyes to titanium dioxide*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. Volume 264, p. 18-25.

¹⁶ Pellerano, R.G.; Romero, C.H.; Acevedo, A.H.; Vázquez, F.A. (2007). *Un método de bajo costo para la determinación de cobre a nivel de vestigios en matrices de interés ambiental por espectrofotometría en fase sólida (EFS)*. Química Nova. Volumen 30, Número 8, p. 2020-2024.

¹⁷ Ren, W.X.; Bhuniya, S.; Zhang, J.F.; Lee, Y.H.; Lee, S.J.; Kim, J.S. (2010). *A new fluorogenic chemodosimetric system for mercury ion recognition*. Tetrahedron Letters. Volume 51, Issue 44, p. 5784-5786.

¹⁸ Tan, J.; Yan, X.P. (2008). *2,1,3-Benzoxadiazole-based selective chromogenic chemosensor for rapid naked-eye detection of Hg²⁺ and Cu²⁺*. Talanta. Volume 76, Issue 1, p. 9-14.

¹⁹ Wanichacheva, N.; Siriprumpoonthum, M.; Kamkaew, A.; Grudpan, K. (2009). *Dual optical detection of a novel selective mercury sensor based on 7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazolyl subunits*. Tetrahedron Letters. Volume 50, Issue 16, p. 1783-1786.

²⁰ Yang, H.; Qian, J.; Li, L.; Zhou, Z.; Li, D.; Wu, H.; Yang, S. (2010). *A selective phosphorescent chemodosimeter for mercury ion*. *Inorganica Chimica Acta*. Volume 363, Issue 8, p. 1755-1759.

²¹ Del Campo, O.; Carbayo, A.; Cuevas, J.V.; Muñoz, A.; García-Herbosa, G.; Moreno, D.; Ballesteros, E.; Basurto, S.; Gómez, T.; Torroba, T. (2008). *An organopalladium chromogenic chemodosimeter for the selective naked-eye detection of Hg²⁺ and MeHg⁺ in water-ethanol 1:1 mixture*. *Chemical communications*. Issue 38, p. 4576-4578.

²² He, S.; Li, D.; Zhu, C.; Song, S.; Wang, L.; Long, Y.; Fan, C. (2008). *Design of a gold nanoprobe for rapid and portable mercury detection with the naked eye*. *Chemical communications*. Issue 40, p. 4885-4887.

²³ Wu, D.; Huang, W.; Lin, Z.; Duan, C.; He, C.; Wu, S.; Wang, D. (2008). *Highly sensitive multiresponsive chemosensor for selective detection of Hg²⁺ in natural water and different monitoring environments*. *Inorganic Chemistry*. Volume 47, Issue 16, p. 7190-7201.

**“Incluso un camino sinuoso,
difícil, nos puede conducir a la
meta si no lo abandonamos
hasta el final”.**

-Paulo Coelho, Maktub

CAPÍTULO VI

CAPITULO VI

6.1. Validación

Un procedimiento debe ser validado en mayor o menor extensión cuando:

- Se desarrolla un método nuevo para resolver un problema particular.
- Un método establecido se modifica para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema.
- El control de calidad indica que un método establecido está cambiando con el tiempo.
- Un método establecido se usa en un laboratorio diferente, o con diferentes analistas o instrumentación.
- Se pretende demostrar la equivalencia entre dos métodos, uno nuevo y uno estándar¹.

6.2. Parámetros Analíticos para la Determinación de Se(IV)

6.2.1. Linealidad

Se define como la relación lineal entre la señal y la concentración del analito. Para los métodos cuantitativos es necesario conocer el rango de concentraciones del analito o valores de la propiedad en que se basa el método sobre el cual el mismo puede ser aplicado.

Para determinar el intervalo de concentraciones en el que se cumple la Ley de Beer, se construyó la curva de calibración (**Figura 6.1.**) a partir de una serie de soluciones patrones de distintas concentraciones de Se. El ensayo se realizó por triplicado.

Como puede observarse en el gráfico la linealidad se mantiene hasta una concentración aproximada de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Se. Con un valor de $r > 0,99$ y una pendiente de $0,0078 \mu\text{g L}^{-1}$, se puede decir que el método es aceptable y con buena sensibilidad en éstas concentraciones.

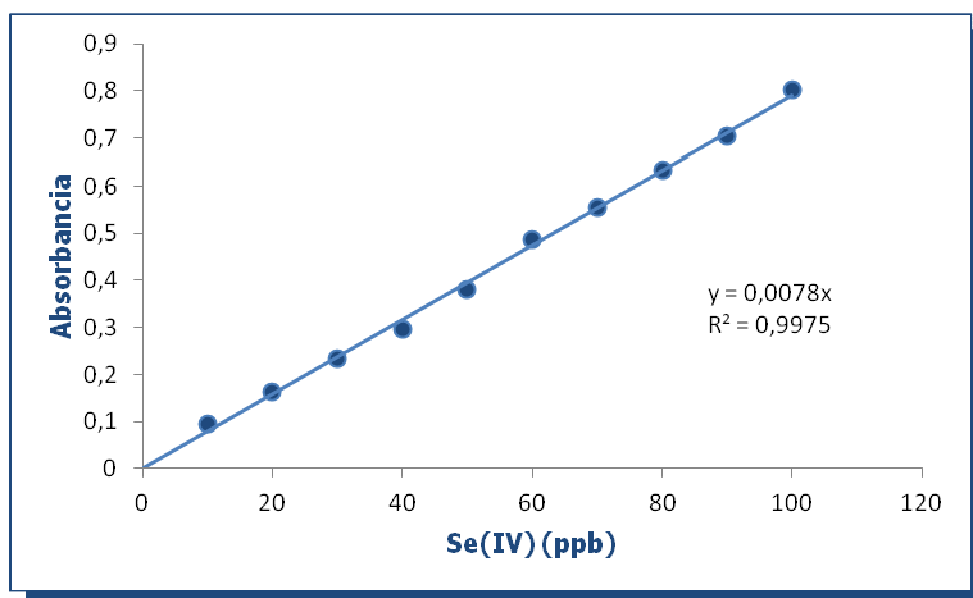


Fig. N°6.1.: Curva de Calibración

6.2.2. Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Para el cálculo del límite de detección y cuantificación se prepararon tres curvas de calibración, obteniéndose la desviación estándar y el promedio de las pendientes^{2,3}.

La posibilidad de detectar un cierto parámetro en una muestra depende del método recomendado, la calibración del método y del equipo verificado.

Se define al *límite de detección* como la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada por una única medición, con un nivel de confianza determinado; pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. Se la expresa como concentración del analito y se determina mediante análisis de muestras con cantidades o concentraciones conocidas del analito⁴.

Aunque se trata de un término muy polémico y existen diversas denominaciones para el mismo: ISO "*mínima concentración neta detectable*", IUPAC "*mínimo detectable valor verdadero*", para los fines de la validación es suficiente una indicación del nivel a partir del cual la detección se vuelve problemática, para ello el valor del "blanco + 3,3 s" es una medida apropiada¹.

El *límite de detección para una magnitud*, es el *valor mínimo de la misma que puede afirmarse que es distinto de cero*. En nuestro caso la magnitud medida es la absorbancia neta del analito, A. Denominaremos A_L al límite de

detección de esta magnitud, al cual corresponda la incertidumbre sobre el valor de A cuando esta tiende a cero. Según el caso A_L es igual: a) al límite de sensibilidad del aparato de medida; b) a la incertidumbre sobre los errores sistemáticos; o c) a la incertidumbre sobre la precisión de los resultados.

Cuando A es igual a A_L , es decir cuando el error absoluto sobre la medida se iguala a la magnitud a determinar, entonces el valor obtenido cumple:

$$0 \leq A \leq A_b + 3,3 \sigma$$

A_b : absorbancia media obtenida para el blanco.

σ : desviación estándar para el blanco.

Se admite entonces como límite de detección el valor:

$$A_L = A_b + 3,3 \sigma$$

El límite de detección en términos de concentración, c_L , se obtendrá usando la función de calibrado:

$$c_L = (A_L - A_b) / m = 3,3 \sigma / m$$

Donde m es la pendiente de la recta de calibrado.

Conforme la señal medida (en nuestro caso la absorbancia neta, A) crece por encima del límite de detección, crece la concentración aparente del analito. Como corolario, la región de cuantificación debe estar claramente por encima del límite de detección.

El *límite de cuantificación* es la *mínima cantidad del analito en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con exactitud*

aceptable⁵. Otras convenciones lo definen como la concentración de analito correspondiente a un valor del blanco + 5, 6 ó 10 desviaciones estándar de la media del blanco. Se denomina a veces también *límite de determinación*¹.

Es un parámetro del análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra y se usa particularmente para la determinación de concentración del analito. Se expresa como concentración del analito.

Se admite así la siguiente definición:

$$A_Q = A_b + 10 \sigma$$

A_Q : absorbancia correspondiente al límite de cuantificación.

A_b : absorbancia del blanco.

σ : desviación estándar para el blanco.

El límite de cuantificación en términos de concentración, c_Q , se obtendrá a partir de la función de calibrado:

$$c_Q = (A_Q - A_b) / m = 10 \sigma / m$$

Donde m es la pendiente de la recta de calibrado.

Los valores obtenidos pueden observarse en la **Tabla 6.1**.

Tabla 6.1. LD y LC para la Determinación de Se(IV)

Pendiente ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,0078
Desviación Estándar	0,005
Límite de Detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,9
Límite de Cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6,4

6.2.3. Precisión

Para la evaluación de la precisión del método se calculó el porcentaje de la desviación estándar relativa de la estimación de las medias de dos muestras replicadas 3 veces (Tabla 6.2.).

La *precisión* hace referencia a la distribución de los valores obtenidos de mediciones repetidas alrededor de un valor. Es el grado de concordancia entre ensayos independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas⁶. Mayor será la *precisión* cuanto menor sea la *dispersión* de los valores obtenidos. Se expresa matemáticamente como la desviación estándar relativa (RSD) expresada en porcentaje, y es una relación entre la desviación estándar y la media. Sus unidades son las mismas que las de la magnitud a medir.

$$\%RSD = (s / \bar{x}) * 100$$

Tabla 6.2. Precisión del Método. Repetitividad de Resultados

Día	Soluciones	Réplicas (Absorbancia)			\bar{x}	s	%RSD
		1	2	3			
1	S1 [20 µg L ⁻¹ Se (IV)]	0,135	0,134	0,136	0,135	1,00·10 ⁻³	0,7
	S2 [100 µg L ⁻¹ Se (IV)]	0,799	0,803	0,798	0,800	2,65·10 ⁻³	0,3
2	S1 [20 µg L ⁻¹ Se (IV)]	0,134	0,135	0,133	0,134	1,00·10 ⁻³	0,7
	S2 [100 µg L ⁻¹ Se (IV)]	0,800	0,805	0,802	0,802	2,52·10 ⁻³	0,3
3	S1 [20 µg L ⁻¹ Se (IV)]	0,136	0,137	0,138	0,137	1,00·10 ⁻³	0,7
	S2 [100 µg L ⁻¹ Se (IV)]	0,797	0,799	0,803	0,800	3,06·10 ⁻³	0,4

6.2.4. Reproducibilidad y Repetitividad

La precisión evalúa la dispersión de los resultados de una muestra analizada bajo las mismas condiciones, y esta puede estudiarse con diferentes parámetros, como reproducibilidad⁷ y repetitividad⁸.

Según ISO la *repetitividad* es la *dispersión de resultados de ensayos mutuamente independientes* utilizando *el mismo método aplicado a alícuotas de la misma muestra* en el mismo laboratorio, por el mismo operario, usando el mismo equipamiento en un intervalo corto de tiempo⁹.

La comparación de la dispersión de los resultados obtenidos durante un mismo día, bajo condiciones similares, permite hablar de la repetitividad. Esta es aceptable para ambas muestras, pues la desviación estándar relativa en todos los casos es pequeña (**Tabla 6.2.**).

Reproducibilidad es el *grado de concordancia entre los resultados de mediciones del mismo mensurando efectuadas bajo condiciones de medición modificadas*. Es el caso que se presenta al realizar diversas réplicas en diversos días cambiando instrumento, analista e incluso el laboratorio¹.

La *comparación de la dispersión de los resultados obtenidos en diferentes fechas* sobre la misma muestra *permite hablar de reproducibilidad*. La **Tabla 6.3.** muestra que los resultados obtenidos se reproducen con baja dispersión.

Tabla 6.3. Reproducibilidad de Resultados

Soluciones	Días			\bar{x}	s	%RSD
	1	2	3			
S1 [20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se (IV)]	0,1350	0,1340	0,1370	0,135	$1,53 \cdot 10^{-3}$	1,1
S2 [100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Se (IV)]	0,8000	0,8023	0,7997	0,801	$1,42 \cdot 10^{-3}$	0,2

6.2.5. Estudio de Interferencias

La selectividad suele ser el término más apropiado para definir el grado en que un procedimiento puede determinar un analito en particular dentro de una mezcla compleja sin interferencia de los otros componentes de la mezcla⁵. La selectividad se evalúa de forma práctica estudiando las interferencias de mayor potencialidad a partir del conocimiento de la composición promedio de la

matriz de las muestras a analizar, las referencias al respecto y la propia experiencia del analista.

Una vez realizados los estudios necesarios para establecer las condiciones óptimas para la determinación del Se(IV), basados en la fijación y medición directa de la absorbancia en la fase sólida del complejo, se realiza el estudio de las posibles interferencias producidas por la presencia de distintas concentraciones de iones extraños. Se seleccionaron como posibles interferentes, aquellas especies que frecuentemente reaccionan con el reactivo cromogénico.

Para este estudio se tomaron 50 mL de solución estándar de 10 mg L^{-1} de Se(IV) y luego se trabajó en las condiciones óptimas previamente determinadas en presencia de los iones extraños. Para ello, se añadieron cantidades variables de ion extraño cuyo efecto se quiere ensayar. Se acepta como *límite de tolerancia para la especie extraña*, la concentración de ésta que origina un error relativo en la medida mayor al 5%. No se consideran por tanto interferentes, aquellas concentraciones de especie extraña que producen un error relativo igual o menor al mencionado límite. Los límites de tolerancia del analito para las diferentes especies ensayadas aparecen en la **Tabla 6.4**.

Tabla 6.4. Efectos de Iones Extraños en la Determinación de Se(IV) por EFS

Especie Extraña	Nivel de Tolerancia (mg L^{-1})
Na(I), K(I), Cl(I), NO_3^- (I)	10,0
Ca(II), PO_4^{3-} (III)	5,0
Ag(I), Pb(II), Cu(II), Hg(II)	1,0
As(III), Cr(III), Br(I)	0,9
Ni(II), IO_3^- (I)	0,5
Mn(II), Cd(II), Co(II), $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ (II)	0,2

6.3. Aplicación del Método

6.3.1. Obtención de Muestras

Se trabajó con hojas de 3 muestras foliares provistas por el Herbario de la Universidad Nacional de San Luis. Las mismas se identifican como: *Melissa officinalis* (UNSL - H # 830); *Tilia x moltkei* (UNSL - H # 832), y *Valeriana officinalis* (UNSL - H # 831).

6.3.2. Tratamiento de Muestras

Se procedió al lavado de las muestras, primero con agua corriente y posteriormente con agua desionizada. Se secó el vegetal con papel absorbente para eliminar el agua; se cortó en trozos pequeños y se secó en horno a 65°C. Se molió la muestra foliar y se tamizó tomando fracciones con tamaño de partícula menores a 100 µm.

Se pesó 1,0 g de muestra foliar molida y seca, se adicionó una mezcla ácida constituida por: 16 mL de HNO_{3(ac)} 65%, 2 mL de HClO_{4(ac)} 70% y 2 mL de H₂SO_{4(l)} 98% y se dejó reposar durante toda la noche a temperatura ambiente. Al siguiente día, la muestra fue calentada durante 3 horas primero a 120°C y elevándose luego la temperatura a 220°C hasta que el volumen de solución final fue de 3 mL. La muestra digerida se dejó enfriar durante toda la noche. Al siguiente día se adicionó 10 mL de HCl_(ac) 12% y la mezcla se calentó durante 20 minutos a 120°C, con la finalidad de reducir el Se(VI) a Se(IV). Se dejó enfriar y se filtró con papel de filtro Whatman 40. Por último, se transfirió a un matraz de 100 mL y se enrasó con agua bidestilada.

6.3.3. Procedimiento

En tubos plásticos de 50 mL con tapa a rosca se colocaron alícuotas del filtrado y a cada tubo se le adicionó 1 mL HCl_(ac) 6 mol L⁻¹, 2 mL de KI_(ac) 1 mol L⁻¹. Se dejaron reposar los tubos por 15 minutos y se agregó a cada uno 0,5 mL Tritón X-100 (5% v/v) y 0,5 mL de solución de RB 2×10⁻³ mol L⁻¹. Se llevaron a volumen final de 50 mL con agua bidestilada y seguidamente se

añadieron 70 mg de resina. Las mezclas se agitaron mecánicamente durante 20 minutos, posteriormente se centrifugaron a 2500 rpm por 1 minuto, separando el sobrenadante con ayuda de un cuentagotas. Finalmente se empaquetó la resina con el complejo coloreado en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico y se leyó utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a 560 nm. El mismo procedimiento se aplicó al blanco de reactivo, sin el agregado de la muestra. La cuantificación se realizó por comparación con respecto a una curva de calibrado con diferentes patrones a la longitud de onda seleccionada.

6.3.4. Determinación de Selenio

Con el objeto de validar los resultados obtenidos, se realizó el ensayo de recuperación de Se en distintas muestras de origen vegetal. Para las determinaciones se trabajó mediante la técnica de adición estándar^{10,11} para compensar los efectos de la matriz, dopando a las muestras con concentraciones conocidas de selenio.

La concentración de Se(IV) obtenida se tomó como valor base. Luego, se adicionaron a la muestra cantidades crecientes de Se(IV) y sus concentraciones fueron determinadas por el mismo método. Las recuperaciones van desde un 98% a 104% (n=5), mientras que no se encuentran interferencias presentes en la determinación de selenio. Los resultados se muestran en la **Tabla 6.5**.

Tabla 6.5. Aplicación Analítica del Método

Muestras	Valor Base [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Se(IV) Adicionado [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Se(IV) Encontrado [$\mu\text{g L}^{-1}$]	% Recuperación*
Tilia moltkei	52,6 \pm 0,1	0,0	52,6 \pm 0,1	100,0
	52,6	5,0	57,5 \pm 0,4	98,0
	52,6	20,0	73,0 \pm 0,5	102,0
Valeriana officinalis	20,2 \pm 0,2	0,0	20,2 \pm 0,2	100,0
	20,2	5,0	25,2 \pm 0,6	100,0

	20,2	20,0	41,0 ± 0,1	104,0
Melissa officinalis	63,1 ± 0,4	0,0	63,1 ± 0,4	100,0
	63,1	5,0	68,0 ± 0,3	98,0
	63,1	20,0	82,9 ± 0,8	99,0

* 100 x [(Se(IV) encontrado – Se(IV) base)/ Se(IV) adicionado]

Finalmente para determinar la fiabilidad del método, se realizó la determinación de la concentración de Se(IV) por EFS contrastando los valores con uno de los métodos estándar como es el plasma de acoplamiento inductivo junto a un espectrofotómetro de emisión óptico (ICP-OES). Los resultados de la **Tabla 6.6.** corresponden a valores promedios de 5 determinaciones.

Tabla 6.6. Comparación entre las Concentraciones de Se realizadas por EFS y ICP-OES

Muestras de Hojas	Concentración [$\mu\text{g g}^{-1}$]	
	EFS	ICP-OES
Tilia moltkei	0,5 ± 0,4	0,6 ± 0,2
Valeriana officinalis	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2
Melissa officinalis	0,6 ± 0,3	0,6 ± 0,4

Se puede observar que la concentración encontrada mediante este método no difiere mucho de la obtenida mediante el ICP-OES, con lo que el método propuesto puede considerarse aceptable para la determinación de selenio.

6.4. Parámetros Analíticos para la Determinación de Hg(II)

6.4.1. Linealidad

Se construyó la curva de calibración (**Figura 6.2.**) a partir de una serie de soluciones patrones de distintas concentraciones de Hg. El ensayo se realizó por triplicado.

Como puede observarse en el gráfico la linealidad se mantiene hasta una concentración aproximada de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Hg. Con una pendiente de $0,0084 \mu\text{g L}^{-1}$, se puede decir que el método posee buena sensibilidad en éstas concentraciones.

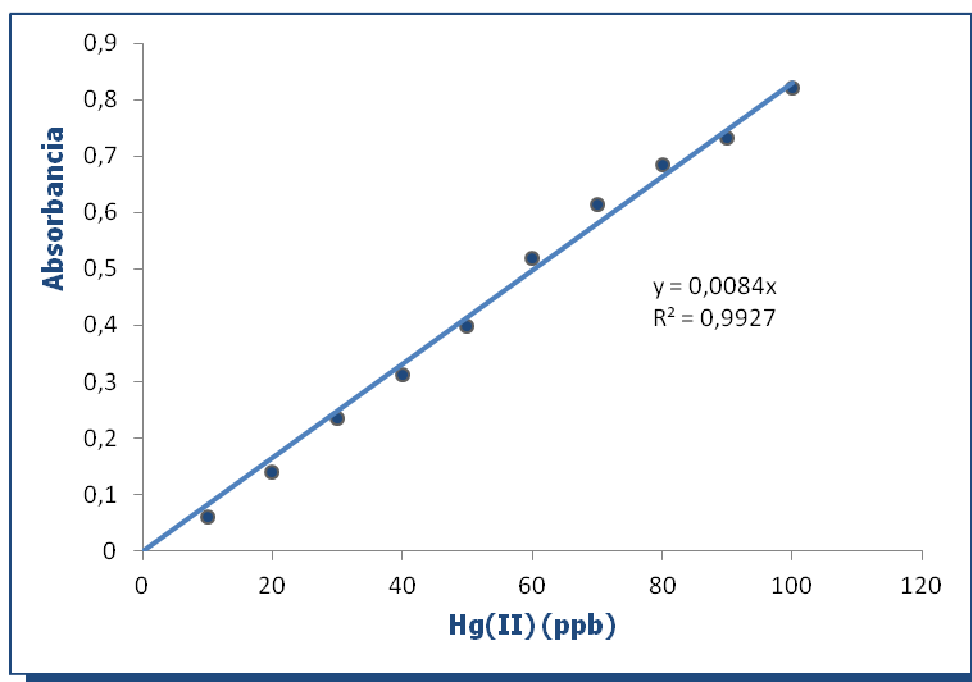


Fig. N°6.2.: Curva de Calibración

6.4.2. Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Mediante el análisis estadístico se calcularon el límite de detección y de cuantificación, siguiendo los criterios explicados en la determinación de Se(IV) (sección 6.2.2.).

Los valores obtenidos pueden observarse en la **Tabla 6.7.**

Tabla 6.7. LD y LC para la Determinación de Hg(II)

Pendiente ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,0084
Desviación Estándar	0,011
Límite de Detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,9
Límite de Cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	13,1

6.4.3. Precisión

En la **Tabla 6.8.** se aprecian los valores obtenidos para el análisis de 2 muestras que contenían mercurio y que fueron analizadas por triplicado en 3 fechas distintas. Los valores de desviación estándar relativa son bajos, por lo que la variabilidad de los resultados no es muy alta.

Tabla 6.8. Precisión del Método. Repetitividad de Resultados

Día	Soluciones	Réplicas (Absorbancia)			\bar{x}	s	%RSD
		1	2	3			
1	S1 [30 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg (II)]	0,289	0,290	0,291	0,290	$1,00 \cdot 10^{-4}$	0,3
	S2 [80 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg (II)]	0,695	0,693	0,696	0,694	$1,54 \cdot 10^{-3}$	0,2
2	S1 [30 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg (II)]	0,291	0,293	0,291	0,292	$1,16 \cdot 10^{-3}$	0,4
	S2 [80 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg (II)]	0,692	0,690	0,694	0,692	$2,00 \cdot 10^{-3}$	0,3
3	S1 [30 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg (II)]	0,292	0,290	0,291	0,291	$1,00 \cdot 10^{-3}$	0,3
	S2 [80 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg (II)]	0,692	0,695	0,696	0,694	$2,08 \cdot 10^{-3}$	0,3

6.4.4. Reproducibilidad y Repetitividad

Por otro lado, en la **Tabla 6.9.** se pueden apreciar los resultados de la evaluación de la reproducibilidad del método.

Al hacer esta comparación se observan valores de desviación estándar relativa menores a 5%. La desviación estándar relativa evalúa la relación entre la concordancia de los resultados y un nivel de concentración del analito. Se puede concluir que el método propuesto proporciona una adecuada repetitividad (**Tabla 6.9.**) y reproducibilidad en las medidas.

Tabla 6.9. Reproducibilidad de Resultados

Soluciones	Días			\bar{x}	s	%RSD
	1	2	3			
S1 [30 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg (II)]	0,2900	0,2917	0,2910	0,291	$8,54 \cdot 10^{-4}$	0,3
S2 [80 $\mu\text{g L}^{-1}$ Hg (II)]	0,6945	0,6920	0,6943	0,694	$1,39 \cdot 10^{-3}$	0,2

6.4.5. Estudio de Interferencias

Los analitos más importantes que pueden interferir, son iones tales como Cr(VI), Fe(III) y Pb(II). El cromo hexavalente prácticamente no reacciona para formar color con el reactivo al pH especificado. De hacerlo, la intensidad es mucho más baja que para el mercurio con lo cual es despreciable la interferencia que puede ocasionar. El hierro y el plomo pueden reaccionar con la resina funcionalizada, pero si se mide la absorbancia a la longitud de onda apropiada (540 nm), el error relativo introducido es inferior a $\pm 5\%$, con lo cual el efecto sobre la medida se considera despreciable.

6.5. Aplicación del Método

6.5.1. Recolección y Conservación de Muestras

Durante la pesquisa de metales pesados en el medio ambiente y para evitar contaminaciones y errores de matriz el proceso de la toma de muestra se requieren precauciones especiales para que la muestra mantenga las mismas características que tenía en su lugar de procedencia. Se deben emplear recipientes de polietileno y procedimientos adecuados evitando toda

contaminación accidental desde la obtención y el posterior transporte al laboratorio, siguiendo procedimientos de extracción y conservación en condiciones estandarizadas.

La toma del agua se realiza en recipientes de polietileno de alta densidad, lavados en el laboratorio con ácido nítrico diluido y tres veces con el agua objeto a muestrear^{12,13}. Las muestras de aguas empleadas en los distintos análisis han sido: agua corriente y aguas de perforaciones de Corrientes.

Una vez obtenidas las muestras se acidifican inmediatamente con 1,5 mL de HNO₃ por cada litro de muestra y se trasladan al laboratorio en conservadoras en frío (4°C) para su posterior análisis, con objeto de evitar posibles alteraciones químicas de las mismas durante el tiempo que transcurre entre la toma de muestra y su análisis. Una vez en el laboratorio se tratan con la inmediatez posible¹⁴.

6.5.2. Tratamiento de Muestras

Las muestras se filtraron al vacío con una membrana de 0,20 µm (Milipore) para eliminar las partículas en suspensión y posteriormente se conservaron en heladera a 4°C hasta su utilización.

6.5.3. Procedimiento

A una alícuota de la muestra se le adicionó 0,5 mL de Tritón X-100 5% v/v, manteniendo el pH apropiado para la formación del complejo con 1 mL de solución buffer KHPO₄/KH₂PO₄ y finalmente se agregó 80 mg de R-DFC. La mezcla se agitó mecánicamente durante 20 minutos, se centrifugó a 2500 rpm por 1 minuto, separando el sobrenadante con ayuda de un cuentagotas. Finalmente se empaquetó la resina con el complejo coloreado en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico y se leyó utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a 540 nm. El mismo procedimiento se aplicó al blanco de reactivo, sin el agregado de la muestra. La cuantificación se realizó por comparación con respecto a una curva de calibrado con diferentes patrones a la longitud de onda seleccionada.

6.5.4. Determinación de Mercurio

Para las determinaciones se trabajó mediante la técnica de adición estándar para compensar los efectos de la matriz, dopando a las muestras con concentraciones conocidas de mercurio.

Con el objeto de validar los resultados obtenidos, se tomaron 500 mL de muestra y se la dividió en 10 porciones iguales de 50 mL cada una. El método propuesto se aplicó a 5 alícuotas y la concentración de Hg(II) obtenida se tomó como valor base. Luego cantidades crecientes de Hg(II) fueron adicionadas a las otras alícuotas de la muestra y sus concentraciones determinadas por el mismo método.

Los resultados obtenidos pueden visualizarse en la **Tabla 6.10**. No se detectó la presencia de Hg(II) en el agua potable.

Tabla 6.10. Aplicación Analítica del Método

Alícuotas	Valor Base [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Hg(II) Adicionado [$\mu\text{g L}^{-1}$]	Hg(II) Encontrado [$\mu\text{g L}^{-1}$]	% Recuperación*
1	4,2 ± 0,1	0,0	4,2	100,0
2	4,2	6,0	10,1	98,3
3	4,2	10,0	14,1	99,0
4	4,2	20,0	24,3	100,5
5	4,2	30,0	34,0	99,3

* $100 \times [(\text{Hg(II) encontrado} - \text{Hg(II) base}) / \text{Hg(II) adicionado}]$

Finalmente para determinar la fiabilidad del método, se realizó la determinación de la concentración de Hg(II) por EFS y aplicando la espectroscopía de absorción atómica con vapor frío (CV-AAS).

Los resultados de la **Tabla 6.11** son el resultado de valores promedios de 5 determinaciones.

Tabla 6.11. Comparación entre las Concentraciones de Hg realizadas por EFS y CV-AAS

Muestras	Concentración [$\mu\text{g L}^{-1}$]	
	EFS	CV-AAS
1	$2,5 \pm 0,6$	$2,6 \pm 0,2$
2	$3,6 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,2$
3	$8,4 \pm 0,3$	$8,2 \pm 0,1$

Se puede observar que la concentración encontrada mediante este método no difiere mucho de la obtenida mediante el CV-AAS, con lo que el método propuesto puede considerarse aceptable para la determinación de mercurio.

¹ Crubellati, R.; Di Risio, C.D. (2009). *Aspectos prácticos de la validación e incertidumbre en medidas químicas*. 1^{ra} edición. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, CYTED. Buenos Aires.

². Currie, L.A. (1995). *Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations)*. Pure and Applied Chemistry. Volume 67, Issue 10, p. 1699-1723.

³ Mocák, J.; Janiga, I; Rábarová, E. (2009). *Evaluation of IUPAC limit of detection and iso minimum detectable value electrochemical determination of lead*. Nova Biotechnologica. Volume 9, Issue 1, p. 91-100.

⁴ Molina, G. (2010). *Validación de métodos analíticos físico-químicos. Guía Técnica*. CONACYT, p. 1-38. México.

⁵ CITAC/EURACHEM GUIDE. (2002). Guide to quality in analytical chemistry. Edition 2002.

⁶ Suarez, R.; Arévalo, E.; Linares, L.; Ustáriz, F.; Hernández, G. (2009). *Validación de un método analítico para la determinación de magnesio eritrocitario*. Avances en Química. Volumen 4, Número 2, p. 53-62.

⁷ Skoog, D.; West, D.; Holler, F.; Crouch, S. (2013). *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9^{na} edición. Editorial Cengage Learning. Boston.

⁸ European cooperation for accreditation of laboratories (EAL). (1997). *Validation of test methods. General principles and concepts*. Edition 1.

⁹ ISO 3534-1:1993. "Statistics - Vocabulary and symbols - Part 1: Probability and general statistical terms". Statistics, terminology.

¹⁰ Prichard, E.; Mackay, G.M.; Points, J. (1996). *Trace Analysis: a structures approach to obtaining reliable results*. Volumen 2: Valid Analytical Measurement Series. The Royal Society of Chemistry. Cambridge.

¹¹ Villegas Casares, W.A.; Acereto Escoffié, P.O.; Vargas Quiñones, M.E. (2006). *Análisis Ultravioleta- Visible. La teoría y la práctica en el ejercicio profesional*. Editorial Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida.

¹² Suess, M.J. (1982). *"Examination of water for pollution control: a reference handbook"*. Pergamon Press.

¹³ Bubb, J.M.; Lester, J.N. (1994). *Anthropogenic heavy metal inputs to lowland river systems, a case study. The River Stour, UK*. Water, Air, and Soil Pollution. Volume 78, Issues 3-4, p. 279-296.

¹⁴ Schalscha B.E.; Ahumada T.I. (1998). *"Heavy metals in rivers and soils of central Chile"*. Water science and technology. Volume 37, Issue 8, p. 251-255.

“El hombre nunca sabe de lo que es capaz hasta que lo intenta”.

-Charles Dickens

CAPÍTULO VII

CAPITULO VII

7.1. Propósitos

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos analíticos instrumentales para la determinación de selenio y mercurio en bajas concentraciones en muestras de interés ambiental presentan como principal desventaja el elevado costo.

Esto justifica la necesidad de contar con métodos analíticos sencillos y confiables para la determinación de estos elementos. La técnica de espectrofotometría en fase sólida asocia la sensibilidad de las reacciones, con la selectividad, la rapidez y confiabilidad para su aplicación a muestras de interés ambiental con bajo costo y fácil acceso.

7.2. Conclusiones

Del análisis de las metodologías desarrolladas en este trabajo de tesis, es posible llegar a una serie de aportes, detalles de las metodologías desarrolladas que han sido expuestos en las correspondientes secciones. A modo de resumen se exponen a continuación.

7.2.1. Determinación de Selenio por Espectrofotometría en Fase Sólida

El Se(IV) oxida en medio fuertemente ácido al anión yoduro, obteniéndose el complejo triyoduro en solución acuosa, el cual posteriormente forma un complejo iónico coloreado, menos soluble, con la Rodamina B, el cual se fija a la resina y se determina espectrofotométricamente a 560 nm.

El reactivo seleccionado para la determinación de Se(IV) fue la Rodamina B, atendiendo a la marcada sensibilidad que se logra, su fácil accesibilidad y que tanto sus soluciones como los complejos que forma presentan una marcada estabilidad.

Por ser la Rodamina B y el complejo formado, escasamente solubles en agua, se incorpora un agente tensoactivo. Los mejores resultados se

alcanzaron cuando se utilizó un tensoactivo no iónico, Tritón X-100, en una concentración del orden de 0,05% v/v.

Las mejores condiciones de acidez, se observaron en el intervalo comprendido para valores de pH entre 1,60 y 2,10. Se evaluaron diferentes ácidos que permitieron alcanzar el valor de pH mencionado. Los mejores resultados se obtuvieron con 1mL de ácido clorhídrico 6 mol L⁻¹.

El orden de adición de reactivos debe guardar la siguiente secuencia.



En la espectrofotometría en fase sólida el primer objetivo que se plantea es la elección del soporte adecuado sobre el que se fija el compuesto en estudio. Luego de ensayar diferentes soportes sólidos, se eligió el soporte aniónico Dowex 1X8, dado que se alcanzaron fijaciones rápidas y completas, del par iónico previamente formado.

Se optimizaron en forma simultánea, mediante la aplicación del método de Box-Behnken la concentración de Rodamina B, volumen de Tritón X-100 y solución de Yoduro de potasio. Los valores óptimos calculados son los siguientes: [RB] = $2,08 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, volumen de Tritón X-100 al 5% v/v = 0,47 mL y volumen de KI 1 mol L⁻¹. = 2,18 mL.

La cantidad de resina que proporciona una máxima absorbancia en este sensor es 0,0700 g, siendo una cantidad fácilmente transferible con gotero. Se estableció que un tiempo de agitación de 20 minutos es suficiente para alcanzar el máximo de absorbancia. La intensidad de la coloración de los complejos fijados a la resina no manifiesta modificaciones al menos durante 2 horas.

Luego se realiza la curva de calibración. La gráfica correspondiente a la curva de calibración fue lineal, con un coeficiente de correlación de 0,9946 y una sensibilidad de 0,0078 UAbs. La linealidad se mantuvo desde valores cercanos al límite de detección y hasta al menos 100 µg L⁻¹. el valor del límite

de detección obtenido para 50 mL de muestra de una solución de Se(IV) en las condiciones anteriormente especificadas fue de $1,92 \mu\text{g L}^{-1}$.

7.2.2. Validación y Aplicación del Método para la Determinación de Selenio

El método se aplicó a hojas de 3 muestras foliares: *Melissa officinalis*, *Tilia x moltkei*, y *Valeriana officinalis*.

Se recomienda el lavado de las muestras, primero con agua corriente y posteriormente con agua desionizada. Cortar la muestra vegetal en trozos pequeños y secar en horno a 65°C . Moler y pesar 1,0 g de muestra foliar y adicionar a continuación una mezcla ácida constituida por $\text{HNO}_{3(\text{ac})}$ 65%, $\text{HClO}_{4(\text{ac})}$ 70% y $\text{H}_2\text{SO}_{4(\text{l})}$ 98%. Dejar reposar durante toda la noche a temperatura ambiente. Calentar posteriormente la mezcla durante 3 horas a 220°C hasta que el volumen de solución final sea de 3 mL. Dejar enfriar la muestra digerida y adicionar $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 12% y calentar durante 20 minutos a 120°C , con la finalidad de reducir el Se(VI) a Se(IV). Enfriar, filtrar, transferir a un matraz de 100 mL y enrasar con agua bidestilada.

En tubos plásticos de 50 mL con tapa a rosca se colocan alícuotas del filtrado y a cada tubo se le adicionan 1 mL $\text{HCl}_{(\text{ac})}$ 6 mol L^{-1} , 2 mL de $\text{KI}_{(\text{ac})}$ 1 mol L^{-1} . Se dejan reposar los tubos durante 15 minutos y se agrega a cada uno 0,5 mL Tritón X-100 (5% v/v) y 0,5 mL de solución de RB $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Se llevan a volumen final de 50 mL con agua bidestilada y seguidamente se añaden 70 mg de resina. Las mezclas se agitan mecánicamente durante 20 minutos, se centrifugan a 2500 rpm 1 minuto y se separa el sobrenadante con ayuda de un cuentagotas. Finalmente se empaqueta la resina con el complejo coloreado en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico y se lee utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a 560 nm.

La técnica propuesta es selectiva y específica, presenta buena linealidad en el rango de concentraciones estudiadas. En los ensayos de repetitividad y reproducibilidad los resultados obtenidos muestran una baja dispersión, exhibiendo la precisión del método.

Se realizó el estudio de posibles interferencias, donde se pudo observar que la selectividad del método alcanzada para el Se(IV) es adecuada para su aplicación.

Finalmente para comprobar la fiabilidad del método propuesto se comparó el mismo con el ICP-OES, indicando los resultados un alto grado de correlación entre ambas determinaciones.

7.2.3. Determinación de Mercurio por Espectrofotometría en Fase Sólida

El Hg(II) a partir de sus soluciones acuosas, reacciona con una resina funcionalizada con difenilcarbazida, en presencia de un tensoactivo no-iónico (Tritón X-100), para formar un complejo de color azul violáceo que se desarrolla completamente luego de 20 minutos de promovida la reacción en medio débilmente ácido o neutro y se determina espectrofotométricamente a 540 nm.

El reactivo seleccionado para la determinación de Hg(II) fue la Difenilcarbazida, atendiendo a la marcada sensibilidad que se logra, su fácil accesibilidad y que tanto sus soluciones como los complejos que forma presentan una marcada estabilidad.

Las mejores condiciones de acidez, se observaron en el intervalo comprendido para valores de pH cercanos a 7. Se evaluaron diferentes soluciones reguladoras que permitieron alcanzar el valor de pH mencionado. Los mejores resultados se obtuvieron con la utilización de 1 mL del buffer $\text{KHPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.

Como en el caso del análisis del elemento selenio, luego de ensayar diferentes soportes sólidos, se eligió como soporte a la resina aniónica Dowex 1X8, dado que se alcanzaron fijaciones rápidas y completas del complejo.

Se hizo necesario modificar el proceso para la realización de la espectrofotometría en fase sólida. Se decidió fijar el reactivo a la resina (funcionalización de la resina) para luego ponerla en una etapa subsiguiente en contacto con soluciones que contengan el analito en una etapa subsiguiente. Para la funcionalización de la resina se siguieron los siguientes pasos: Para fijar el reactivo complejante a la resina, una vez realizados los estudios de la concentración óptima de difenilcarbazida a utilizar ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$), se toman 5 g

de resina Dowex 1X8 y se adicionan 100 mL de solución de difenilcarbazida en acetona y se deja reposar durante 24 horas. Se separa la fase sólida por centrifugación y se la lava con agua desionizada, varias veces. Por último se la deja secar en estufa a 40 °C y se la conserva en frascos de polietileno en ausencia de la luz a temperatura ambiente.

Para mejorar el contacto de las soluciones problemas con la resina funcionalizada se hizo necesario agregar una solución de tensoactivo. El tensoactivo seleccionado fue el Triton X-100 con una concentración optimizada del orden del 0,05% v/v.

La cantidad de resina a empaquetarse que proporciona una máxima absorbancia en este sensor es de 0,0800 g, que es una cantidad fácilmente transferible con gotero. Se estableció que un tiempo de agitación de 20 minutos es suficiente para alcanzar el máximo de absorbancia. La intensidad de la coloración de los complejos fijados a la resina no manifiesta modificaciones al menos durante 2 horas.

El orden de adición de reactivos para la determinación de Hg(II) debe guardar la siguiente secuencia:

Tritón X-100 + Buffer ($\text{KHPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) + R-DFC

Luego se realiza la curva de calibración. La gráfica obtenida de la curva de calibración fue lineal, con un coeficiente de correlación de 0,9845 y una sensibilidad de 0,0084 UAbs. La linealidad se mantuvo desde valores cercanos al límite de detección y hasta al menos 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. el valor del límite de detección obtenido para 50 mL de muestra de una solución de Se (IV) en las condiciones anteriormente especificadas fue de 3,93 $\mu\text{g L}^{-1}$.

7.2.4. Validación y Aplicación del Método para la Determinación de Mercurio

El método se aplicó a muestras de agua.

Se recomienda que las muestras sean filtradas, conservadas con un reactivo ácido adecuado y a una temperatura de 4°C.

A una alícuota de la muestra se le adiciona 0,5 mL de Tritón X-100 5% v/v, manteniendo el pH apropiado para la formación del complejo con 1 mL de solución buffer $\text{KHPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ y finalmente se agregan 80 mg de R-DFC. La mezcla se agita mecánicamente durante 20 minutos, se centrifuga por 1 minuto a 2500 rpm, separando el sobrenadante con ayuda de un cuentagotas. Finalmente se empaqueta la resina con el complejo coloreado en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico y se lee utilizando un espectrofotómetro UV-Vis a 540 nm.

La técnica propuesta es selectiva y específica, presenta buena linealidad en el rango de concentraciones estudiadas. En los ensayos de repetitividad y reproducibilidad los resultados obtenidos muestran una baja dispersión, exhibiendo la precisión del método.

Se realizó el estudio de posibles interferencias, donde se pudo observar que la selectividad del método alcanzada para el Hg(II) es adecuada para su aplicación.

Finalmente para comprobar la fiabilidad del método propuesto se comparó el mismo con la técnica CV-AAS, indicando los resultados un alto grado de correlación entre ambas determinaciones.

7.3. Conclusión Final

En este trabajo de tesis se consigue desarrollar métodos alternativos a los instrumentales sofisticados (AA; ICP; etc.), usando la espectrofotometría tradicional (UV_Visible) en la modalidad, fase sólida, para la cuantificación de selenio en muestras vegetales y mercurio en aguas, demostrando que es adecuada y confiable para bajas concentraciones, muy útil para laboratorios de baja complejidad.

Entre las principales ventajas de la metodología propuesta se encuentran la sencillez y el bajo costo de los equipos y reactivos requeridos (además de la adecuada sensibilidad), esto permite que sea de fácil aplicación para el control y distribución de elementos vestigios de importancia ambiental.



Universidad Nacional del Nordeste

**Facultad de Ciencia Exactas y Naturales y
Agrimensura**

Resumen de la Tesis:
**“Diseño de Metodologías para la
Determinación de Selenio y
Mercurio en Muestras de Interés
Ambiental Mediante
Espectrofotometría en Fase
Sólida”**

Trabajo de Tesis Presentado por:
Bioq. (Esp.) Cecilia Laura De Asmundis

Para Optar al Grado de:
Doctor Especialidad Química

Director: Dr. Francisco Antonio Vázquez

2014

RESUMEN

Se diseñaron métodos confiables de análisis para la cuantificación de selenio en muestras vegetales y mercurio en agua, como alternativas viables a dichos análisis en el laboratorio de investigación. Las técnicas analíticas se desarrollaron por espectrofotometría en fase sólida debido a su sencillez, la rapidez del análisis y el bajo costo de los equipos y reactivos requeridos (además de la adecuada sensibilidad), esto permite que sea de fácil aplicación para el control y distribución de elementos vestigios de importancia ambiental.

Para la detección de selenio se empleó como reactivo cromogénico la Rodamina B y la resina seleccionada fue Dowex 1X8. La reacción entre ambas especies se realizó en medio micelar con el surfactante no-iónico Tritón X-100. Se redujo el consumo de muestras y reactivos debido a que las reacciones entre el analito y la rodamina B fue trabajada en bajos volúmenes, lo que contribuye con ahorro económico y de disposición de residuos.

En este caso, la reacción entre analito y el reactivo tiene lugar en la disolución y posteriormente el producto de la reacción se fija sobre el soporte sólido. El fundamento de la reacción de caracterización es la oxidación del ión yoduro por el Se(IV) en medio fuertemente ácido (brindado por el ácido clorhídrico) para obtener el complejo triyoduro el cual luego forma un complejo iónico de color violeta con la rodamina B. El complejo triyoduro-rodamina B resultante se determinó espectrofotométricamente a 560 nm.

Las mejores condiciones de acidez, se observaron en el intervalo comprendido para valores de pH entre 1,60 y 2,10. Se evaluaron diferentes ácidos que permitieron alcanzar el valor de pH mencionado. Los mejores resultados se obtuvieron con 1 mL de ácido clorhídrico 6 mol L⁻¹.

Una vez seleccionado el pH y el orden de agregado de los reactivos, se planteó un modelo de optimización multivariable para el estudio tres de las variables que afectan la cuantificación del analito: concentración del reactivo RB, volumen del tensoactivo no iónico Tritón X-100 y volumen del reactivo

yoduro de potasio, realizando un análisis de la varianza (ANOVA) para cada una de las variables. El valor F obtenido fue de 92,51 implicando que el modelo desarrollado era significativo. El valor predicho de R^2 de 0,9200 estuvo en concordancia con el valor de R^2 ajustado de 0,9833.

El modelo calculado a partir del diseño de experimentos se optimizó aplicando el diseño de Box-Behnken para encontrar el nivel de los factores sobre el intervalo evaluado. De acuerdo al análisis realizado, el valor óptimo para la concentración de rodamina B fue de $2,08 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, utilizando un volumen de 0,47 mL de Tritón X-100 y 2,18 mL de la solución de yoduro de potasio 1 mol L⁻¹. Se realizó además la superficie de respuesta y el análisis de residuos.

Se determinó la cantidad mínima de resina, el tiempo mínimo de agitación y la estabilidad del complejo formado y fijado a la resina. La masa de resina a empaquetarse que proporcionó una máxima absorbancia en este sensor fue 0,0700 g. Se estableció que un tiempo de agitación de 20 minutos era suficiente para alcanzar la señal máxima. La intensidad de la coloración de los complejos fijados a la resina no manifestó modificaciones al menos durante 2 horas, intervalo suficiente para para realizar todas las operaciones correspondientes a la espectrofotometría en fase sólida.

La confiabilidad de los resultados entregados por este método se garantizó mediante un proceso de validación. Los parámetros empleados para expresar esta confiabilidad fueron precisión, rango lineal, límite de detección, y límite de cuantificación. El rango lineal obtenido fue de 1 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. El límite de de detección fue 1,92 $\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que el límite de cuantificación fue 6,41 $\mu\text{g L}^{-1}$. En los ensayos de repetitividad y reproducibilidad los resultados obtenidos mostraron una baja dispersión, exhibiendo la precisión del método.

Se realizó el estudio de posibles interferencias, donde se pudo observar que la selectividad del método alcanzada para la determinación del Se(IV) es adecuada para su aplicación.

Finalmente para comprobar la fiabilidad del método propuesto se contrastó con ICP-OES, indicando los resultados un alto grado de correlación entre ambas técnicas.

Para la detección de mercurio se empleó como reactivo cromogénico la Difenilcarbazida y la resina seleccionada fue Dowex 1X8. Al igual que para la determinación de selenio, la reacción se realizó en medio micelar con el surfactante no-iónico Tritón X-100.

Aquí se procede a la fijación irreversible del reactivo en el soporte sólido seguida por la reacción con el analito, como una resina quelante. El fundamento de la reacción de caracterización se basó en que el Hg(II), a partir de sus soluciones acuosas, reacciona con la difenilcarbazida, en presencia de un tensoactivo no-iónico (Tritón X-100), para formar un complejo de color azul violáceo que se desarrolla completamente luego de 20 minutos de promovida la reacción en medio débilmente ácido o neutro.

Para fijar el reactivo complejante a la resina, se determinó la concentración de la solución de difenilcarbazida óptima, que fue de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ y posteriormente se procedió a la funcionalización.

Las condiciones de pH se determinaron sobre la resina funcionalizada, observándose que la máxima señal se producía en valores de pH cercanos a 7. Se evaluaron entonces diferentes soluciones reguladoras obteniéndose los mejores resultados con la utilización de 1 mL del buffer $\text{KHPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.

La masa de resina a empaquetarse que proporcionó una máxima absorbancia en este sensor fue 0,0800 g. Los valores encontrados para el tiempo de agitación y estabilidad del complejo fueron los mismos recogidos para la determinación de selenio.

La confiabilidad de los resultados entregados por este método se garantizó mediante un proceso de validación. El rango lineal obtenido fue de 5 a $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. El límite de de detección fue $3,93 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, mientras que el límite de cuantificación fue $13,09 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. En los ensayos de repetitividad y

reproducibilidad los resultados obtenidos mostraron una baja dispersión, exhibiendo la precisión del método.

Se realizó el estudio de posibles interferencias, donde se pudo observar que la selectividad del método alcanzada para la determinación del Hg(II) es adecuada para su aplicación.

Finalmente para comprobar la fiabilidad del método propuesto se contrastó con CV-AAS, indicando los resultados un alto grado de correlación entre ambas técnicas.

Se concluyó que los métodos desarrollados son una interesante alternativa analítica para la determinación de selenio (IV) y mercurio (II) en muestras de interés ambiental.



Universidad Nacional del Nordeste

**Facultad de Ciencia Exactas y Naturales y
Agrimensura**

**Divulgación Científica de la Tesis:
“Diseño de Metodologías para la
Determinación de Selenio y
Mercurio en Muestras de Interés
Ambiental Mediante
Espectrofotometría en Fase
Sólida”**

**Trabajo de Tesis Presentado por:
Bioq. (Esp.) Cecilia Laura De Asmundis**

**Para Optar al Grado de:
Doctor Especialidad Química**

Director: Dr. Francisco Antonio Vázquez

2014

1. Publicaciones con referato

1.1. Cecilia De Asmundis, César H. Romero, Hugo A. Acevedo, Roberto G. Pellerano y Francisco A. Vázquez. "*Funcionalización de una resina de intercambio iónico para la preconcentración de Hg(II)*". Avances en Ciencias e Ingeniería. Vol. 2 (1): 63-70. 2011. ISSN: 0718-8706.

http://www.exeedu.com/publishing.cl/av_cienc_ing/2011/Vol2/Nro1/6-ACI1042-10-full.pdf.

1.2. Cecilia De Asmundis, Roberto G. Pellerano y Francisco A. Vázquez. "*Un método de bajo costo para la determinación de selenio a nivel de vestigios en matrices de interés ambiental por Espectrofotometría en Fase Sólida (EFS)*". Enviado para su aceptación a la revista Química Nova. Publicações da Sociedade Brasileira de Química. On-line version ISSN 1678-7064 Printed version ISSN 0100-4042.

2. Resúmenes expandidos publicados on-line, en Actas de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas

2.1. De Asmundis, Cecilia L., Ruiz Díaz, Juan J. J., Romero, César H., Acevedo, Hugo A., Vázquez, Francisco A. "*Estudio Preliminar para la Determinación de Selenio en Muestras de Interés Ambiental*". Sección Ciencias Exactas – Trabajo 072. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. (2008).

<http://www.unne.edu.ar/investigacion/com2008/E-072.pdf>.

2.2. De Asmundis, Cecilia L., Pellerano, Roberto G., Romero, César H., Acevedo, Hugo A., Vázquez, Francisco A. "*Condiciones Preliminares para la Detección de Mercurio a Nivel de Vestigios*". Sección Ciencias Exactas –

Trabajo 055. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. (2009).

<http://www.unne.edu.ar/investigacion/com2009/CE-055.pdf>.

2.3. De Asmundis, Cecilia L., Pellerano, Roberto G., Romero, César H., Acevedo, Hugo A., Vázquez, Francisco A. "*Estudio de la funcionalización de una resina aniónica con difenilcarbazida para la determinación de Hg(II) por EFS*". Sección Ciencias Exactas – Trabajo 012. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional del Nordeste. (2010).

http://www.unne.edu.ar/investigacion/com2010/CE_Web/wCE-012_012.pdf.

3. Resúmenes de trabajos presentados en Congresos

3.1. De Asmundis C., Pellerano, Roberto G., Romero, César H., Acevedo, Hugo A., Vázquez, Francisco A. "*Optimización de la Determinación de Mercurio (II) por Espectrofotometría UV-VIS en Fase Sólida*". Sección 1: Espectroscopía Analítica – P1-25. V Congreso Argentino de Química Analítica. Bahía Blanca, noviembre de 2009.

<http://www.aaqa.org.ar/pdfs/congresos-05-resumenes.pdf>.

3.2. De Asmundis C., Pellerano, Roberto G., Romero, César H., Acevedo, Hugo A., Vázquez, Francisco A. "*Funcionalización de una resina de intercambio iónico para la preconcentración de Hg(II)*". Sección Química Analítica. XXVIII Congreso Argentino de Química y 4to. Workshop de Química Medicinal. Lanús, septiembre de 2010.

<http://www.aqa2010.org.ar/docs/química%20analítica-007.pdf>.