

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



PONTIFICIA
**UNIVERSIDAD
CATÓLICA**
DEL PERÚ

DISEÑO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS PARA CINC (II) Y MERCURIO (II) EN MUESTRAS ACUOSAS

Tesis para optar el Título de Licenciado en Química, que presenta la bachiller:

Betty Mercedes Flores Mariños

ASESORA: Nadia Rosa Gamboa Fuentes

Lima, noviembre del 2011

RESUMEN

Se diseñó un método confiable de análisis para cinc (II) y mercurio (II) en muestras acuosas como una alternativa viable a dichos análisis en el laboratorio de investigación. La técnica analítica se desarrolló por espectroscopía de absorción molecular UV/VIS debido a su fácil manejo, la rapidez del análisis y su fácil acceso dentro de la Sección Química.

Para la detección de estos analitos se empleó ditizona, un reactivo orgánico de común uso en análisis cualitativo y cuantitativo de metales pesados. La reacción de la ditizona y los analitos 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 metal y ditizona fue trabajada en bajos volúmenes, lo que contribuye con ahorro económico y de disposición de residuos.

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, veracidad, rango lineal, límite de detección, límite de cuantificación e incertidumbre. Asimismo, el análisis de mercurio fue contrastado por CV-AAS, basada en la norma EPA Method 245.1 en el Instituto de Corrosión y Protección de la Pontificia Universidad del Perú, que es un laboratorio acreditado internacionalmente.

El rango lineal obtenido fue de 0,1 a 0,8 mg.L⁻¹ y 0,1 a 1,2 mg.L⁻¹ para el cinc y el mercurio respectivamente. El límite de de detección fue 0,04 mg.L⁻¹ para ambos analitos, mientras que el límite de cuantificación fue 0,08 mg.L⁻¹ y 0,1 mg.L⁻¹ para cinc y mercurio. La desviación estándar relativa para cuatro réplicas fue de 0,22 a 0,84 % y de 0,7 a 3,9 % para cinc y mercurio. Por último, la incertidumbre estándar expandida del método fue $\pm 0,0139$ mg.L⁻¹ para el cinc y $\pm 0,0052$ mg.L⁻¹ para el mercurio.

Se concluyó que el método desarrollado es una interesante alternativa analítica para la determinación de mercurio (II) y cinc (II) en disolución acuosa, pues los resultados del test de *t*-Student demostraron que las medias obtenidas mediante este método y la técnica de absorción atómica fueron estadísticamente iguales. Finalmente, se determinó que el método no es aplicable para muestras cuyo pH sea menor a 2, debido a que a partir de este valor la amortiguación del buffer se ve afectada, o mayores a 8 pues existe el riesgo de precipitar los hidróxidos metálicos.

FACULTAD DE
CIENCIAS E
INGENIERÍA



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ

TEMA DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUIMICA

TÍTULO : Diseño y validación de un método de análisis por espectrofotometría UV-VIS para cinc (II) y mercurio (II) en muestras acuosas.

ÁREA : Química Analítica

ASESOR : Dra. Nadia Gamboa Fuentes

ALUMNO : Betty Mercedes Flores Marifios

CÓDIGO : 2001.0539.412

FECHA : 13 de setiembre de 2011

NUMERO : 173



DESCRIPCIÓN Y OBJETIVOS:

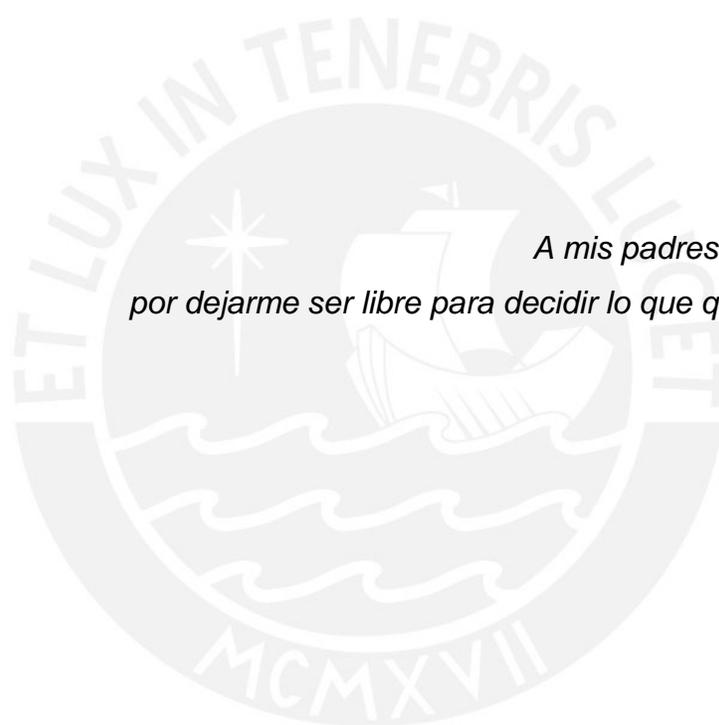
El análisis químico es la herramienta básica para la investigación científica y el control en procesos productivos. En particular, se muestra una tendencia a instrumentalizar los métodos analíticos olvidando la rigurosidad que es demandada al momento de aplicar nuevos métodos. Analitos como cinc y mercurio cobran gran importancia en la actualidad debido a su potencial peligro tóxico y ecotóxico. Estos elementos son determinados por metodología instrumental de manera tal que si no se cuenta con estos instrumentos, su determinación o estudio queda imposibilitada o encarecida.

Por estas razones, y con la meta de tener un procedimiento de análisis alternativo disponible y confiable, se busca desarrollar un método analítico sencillo, rápido y confiable para la determinación de cinc y mercurio en las condiciones reales del laboratorio. El método debe quedar optimizado y validado para su uso en el estudio de muestras acuosas. Los resultados serán analizados con herramientas estadísticas para garantizar rangos, confianza, condiciones de trabajo adecuadas, incertidumbres, límites de detección y de cuantificación, entre otros.

Máximo: 100 páginas

FIRMA DEL ASESOR:

FIRMA DEL COORDINADOR:



*A mis padres, Manuel y Betty,
por dejarme ser libre para decidir lo que quiero ser y hacer*



*A mis hermanos, Manuel, Luis, Leia y Padmé,
por hacerme reír y por cuidarme siempre como a una reina*



*A mi madrina, Gladys,
por su cariño y su apoyo sincero*

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Nadia Gamboa, por depositar su confianza en mí, por sus consejos, su paciencia, por darme ánimos y serenidad cuando era necesario, y por su valiosa amistad.

Al Dr. Juan Carlos Cedrón, un especial agradecimiento por su valioso apoyo en una etapa trascendental para la culminación de este proyecto 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.

Al Ing. Arturo Calderón, por el tiempo que compartió amablemente conmigo, incluso durante sus vacaciones, para responder a todas mis preguntas durante la última etapa de interpretación estadística de los resultados y por sus aportes para enriquecer este documento final de la tesis.

Al Instituto de Corrosión y Protección de la PUCP por apoyarme con el procesamiento de las muestras de mercurio. En especial, al Dr. Santiago Flores, por los permisos concedidos, a la Sra. Ilse Acosta, por su apoyo en el análisis de las muestras de mercurio, por su amistad, consejos y recomendaciones, y al Sr. Pablo Cárdenas por sus apreciadas y valiosas sugerencias.

A la Dirección de Gestión de la Investigación de la PUCP por el apoyo brindado a través del PAIN, Programa de Apoyo a la Investigación, el que resultó en un fortalecimiento de mis habilidades en los trabajos de campo y con el que se financió parte de esta investigación.

A mi familia por el amor que a diario me brindan, por engreírme, por apoyarme incondicionalmente, por ser la fuente de mis alegrías y por impulsarme a seguir adelante.

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.

LISTA DE ABREVIATURAS

APHA	Asociación de salud pública americana
CAEAL	Asociación canadiense para laboratorios analíticos y ambientales.
CPE	Extracción en el punto de nube
CV-AAS	Espectroscopía de absorción atómica con vapor frío
DER	Desviación estándar relativa
EPA	Agencia de protección ambiental
H ₂ Dz	Molécula de ditizona
HSAB	Ácidos y bases blandas y duras
ICP-OES	Espectroscopía óptica de emisión con plasma acoplado inductivamente
IUPAC	Unión internacional de química pura y aplicada.
JCGM	Comité para las guías de metrología
K _{ps}	Constante del producto de solubilidad
LDC	Límite de cuantificación
LDD	Límite de detección
NIOSH	Instituto nacional para la salud y seguridad ocupacional
OMS	Organización mundial de la salud
ppb	partes por billón
ppm	partes por millón
UV/VIS	Ultravioleta visible

CONTENIDO

1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Principios de la espectrofotometría de absorción molecular UV/VIS	4
1.2 Ley de Beer-Lambert	7
1.3 Equipos espectrofotométricos de absorción atómica y molecular UV-VIS	10
1.4 Propiedades del cinc y el mercurio	14
1.4.1 Cinc	14
1.4.2 Mercurio	16
1.5 Agentes cromóforo y surfactante	19
1.5.1 Ditizona o difeniltiocarbazona	19
1.5.2 Surfactante Tritón X-100	23
2. OBJETIVOS	27
2.1 General	27
2.2 Específicos	27
3. PARTE EXPERIMENTAL	28
3.1 Equipos e instrumentos	28
3.2 Reactivos y preparación de las disoluciones	29
3.2.1 Reactivos	29
3.2.2 Preparación de las disoluciones	30
3.3 Desarrollo de la metodología	33
3.3.1 Determinación de cinc	33
3.3.1.1 Ensayos preliminares	33
3.3.1.2 Validación del método	36
3.3.2 Determinación de mercurio	40
3.3.2.1 Ensayos preliminares	40
3.3.2.2 Validación del método	41

3.4 Aplicación del método a muestras reales	41
3.4.1 Cinc	41
3.4.2 Mercurio	48
3.5 Tratamiento de los residuos	48
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
4.1 Cinc	50
4.1.1 Ensayos preliminares	50
4.1.2 Validación del método	62
4.1.3 Aplicación del método	71
4.2 Mercurio	78
4.2.1 Ensayos preliminares	78
4.2.2 Validación del método	80
4.2.3 Aplicación del método	88
4.3 Discusión integral del método	90
4.4 Discusión final	92
5. CONCLUSIONES	96
6. RECOMENDACIONES	97
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Relaciones jerárquicas entre una técnica, los métodos que utilizan esta técnica y los procedimientos y protocolos para un método	2
Figura 2.	Transiciones electrónicas típicas de cada región del espectro electromagnético	5
Figura 3.	Niveles de energía de una molécula	6
Figura 4.	Radiación que pasa a través de una disolución contenida en una celda	7
Figura 5.	Curva de calibración en el análisis instrumental.	9
Figura 6.	Esquema de las partes de un espectrofotómetro de absorción atómica de flama	10
Figura 7.	Esquema de las partes de un espectrofotómetro ultravioleta visible	10
Figura 8.	Lectura de la absorbancia en una muestra y en el solvente	11
Figura 9.	Espectrofotómetro AAS de flama. Sección Química-PUCP	12
Figura 10.	Esquema de un sistema de inyección de flujo utilizado en la determinación de mercurio	13
Figura 11.	Espectrofotómetro AAS acoplado a un sistema de inyección de flujo	13
Figura 12.	Gráfico de la fracción f de Zn(II) presente en la forma de $Zn^{2+}_{(ac)}$, $Zn(OH)^+_{(ac)}$, $Zn(OH)_{2(ac)}$, $Zn(OH)^-_{3(ac)}$, y $Zn(OH)^{2-}_{4(ac)}$	15
Figura 13.	Estructura molecular de la ditizona	19
Figura 14.	Equilibrio tautomérico de la ditizona en solución	20
Figura 15.	Producto de la oxidación de la ditizona	21
Figura 16.	Estructura molecular de los ditizonatos metálicos	22
Figura 17.	Estructura molecular del surfactante Tritón X-100	24
Figura 18.	Representación esquemática de una micela del Tritón X-100. Modelo propuesto por Robson y Dennis	24
Figura 19.	Procedimiento de preparación de las disoluciones utilizadas en la determinación de los ditizonatos de cinc y mercurio	32
Figura 20.	Etiqueta del suplemento nutricional de cinc	42
Figura 21.	Área de la toma de muestra M3. Jardín de la Sección Física	43
Figura 22.	Acercamiento al área de muestreo M3	43
Figura 23.	Área de la toma de muestra M4. Jardín frente a la Cafetería Central	44
Figura 24.	Acercamiento al área de muestreo M4	44

Figura 25.	Área de la toma de muestra M5. Sección Ingeniería Electrónica	45
Figura 26.	Acercamiento al área de muestreo M5	45
Figura 27.	Tamizador ASTM N° 100	46
Figura 28.	Tamización de la muestra de suelo	46
Figura 29.	Muestra de suelo después de triturada y tamizada	47
Figura 30.	Espectro de absorción del complejo $Zn(HDz)_2$	50
Figura 31.	Curva de calibración de los complejos metálicos amortiguados en buffer fosfato	51
Figura 32.	Curva de calibración de los complejos metálicos amortiguados en buffer McIlvaine	52
Figura 33.	Curva de calibración de los complejos metálicos amortiguados en buffer ftalato	52
Figura 34.	Complejos de $Zn(HDz)_2$ cuando el volumen de ditizona es 3 mL	54
Figura 35.	Absorbancia de los complejos de cinc cuando se agregó 3 mL de ditizona al medio de reacción	55
Figura 36.	Complejos de $Zn(HDz)_2$ cuando el volumen de ditizona es 5 mL	55
Figura 37.	Absorción de los complejos de cinc cuando se agrega 5 mL de la disolución saturada de ditizona	56
Figura 38.	Complejos de $Zn(HDz)_2$ cuando el volumen de ditizona es 7 mL	57
Figura 39.	Bandas de absorbancia de las disoluciones de ditizona. Condiciones: masa disuelta de ditizona: 3 mg; tiempo de agitación: 10 minutos. Cuatro réplicas	59
Figura 40.	Bandas de absorbancia de las soluciones de ditizona. Condiciones: masa disuelta de ditizona: 3 mg; tiempo de agitación: 20 minutos. Cuatro réplicas	59
Figura 41.	Bandas de absorbancia de las soluciones de ditizona. Condiciones: masa disuelta de ditizona: 5,0 mg; tiempo de agitación: 10 minutos. Tres réplicas	60
Figura 42.	Bandas de absorbancia de las soluciones de ditizona. Condiciones: masa disuelta de ditizona: 5,0 mg; tiempo de agitación: 20 minutos. Cuatro réplicas	60
Figura 43.	Curva calibración del complejo $Zn(HDz)_2$. Rango de concentraciones de 0,124 ppm a 1,24 ppm	64

Figura 44.	Curva calibración del complejo $Zn(HDz)_2$. Rango de concentraciones de 0,124 ppm a 0,824 ppm	65
Figura 45.	Espectro de absorción del complejo $Hg(HDz)_2$	78
Figura 46.	Curva de calibración de los complejos metálicos amortiguados con la disolución A (KCl/HCl)	80
Figura 47.	Curva de calibración de los complejos metálicos amortiguados en el buffer B (KH_2PO_4/H_3PO_4)	80
Figura 48.	Curva calibración del complejo $Hg(HDz)_2$. Rango de concentraciones de 0,12 ppm a 1,2 ppm	82
Figura 49	Reporte de los resultados obtenidos mediante CV-AAS	84



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Nomenclatura de los términos utilizados en la ley de Beer-Lambert	8
Tabla 2.	Lista de reactivos empleados	29
Tabla 3.	Preparación de las disoluciones estándar de cinc	30
Tabla 4.	Preparación de las disoluciones estándar de mercurio	31
Tabla 5.	Preparación de los complejos de cinc y ditizona solubilizados en medio micelar amortiguados a pH 5. Volumen final: 10 mL	34
Tabla 6.	Preparación de los complejos de cinc y ditizona solubilizados en medio micelar amortiguados con el buffer fosfato a pH 5. Volumen final: 10 mL	35
Tabla 7.	Absorción de los complejos metálicos en diferentes medios amortiguadores	53
Tabla 8.	Absorbancia de los complejos metálicos según volumen de ditizona	54
Tabla 9.	Resultados de las mediciones de los blancos del método	63
Tabla 10.	Limites de detección y de cuantificación calculados	63
Tabla 11.	Evaluación de la precisión del método. Repetitividad de los resultados	66
Tabla 12.	Resultados de la reproducibilidad de los resultados	66
Tabla 13.	Comparación de los resultados obtenidos por este método y por absorción atómica	67
Tabla 14.	Test de t para las muestras analizadas por ambos métodos	67
Tabla 15.	Estimación de la incertidumbre estándar de la precisión	68
Tabla 16.	Estimación de la incertidumbre estándar de la veracidad	68
Tabla 17.	Estimación de la incertidumbre estándar del método	69
Tabla 18.	Parámetros analíticos obtenidos del proceso de optimización de los ensayos para determinar cinc	70
Tabla 19.	Resultados del análisis de las dos muestras, M1 y M2, mediante el método propuesto. Se muestra la desviación estándar de cuatro medidas realizadas	71
Tabla 20.	Resultados del análisis de cinc mediante el método propuesto y mediante AAS	71
Tabla 21.	Comparación de los resultados de ambos métodos	72
Tabla 22.	Parámetros analíticos modificados del método para determinar cinc	76
Tabla 23.	Resultados de la absorción de los complejos metálicos en diferentes medios amortiguadores	79

Tabla 24.	Resultados de las mediciones de los blancos del método	81
Tabla 25.	Limites de detección y de cuantificación calculados	81
Tabla 26.	Valores de absorbancia de los complejos de mercurio	82
Tabla 27.	Evaluación de la precisión del método. Repetitividad de los resultados	83
Tabla 28.	Resultados de la reproducibilidad de resultados	83
Tabla 29.	Comparación de los resultados obtenidos por este método y por absorción atómica	85
Tabla 30.	Comparación de los resultados de ambos métodos	85
Tabla 31.	Estimación de la incertidumbre estándar de la precisión	86
Tabla 32.	Estimación de la incertidumbre estándar de la veracidad	86
Tabla 33.	Estimación de la incertidumbre estándar del método	86
Tabla 34.	Parámetros analíticos obtenidos del proceso de optimización de los ensayos para determinar mercurio	87
Tabla 35.	Resultados del análisis de la muestra mediante el método propuesto	88
Tabla 36.	Resultados del análisis de mercurio mediante el método propuesto y mediante AAS	89
Tabla 37.	Comparación de los resultados de ambos métodos	89

1. MARCO TEÓRICO

El análisis químico puede definirse como el desarrollo de un análisis de rutina a una muestra conocida. La química analítica, sin embargo, es la aplicación del conocimiento químico y se encarga del perfeccionamiento de los métodos establecidos, de extender la aplicación de métodos existentes a nuevos tipos de muestras, y del desarrollo de nuevos métodos para la medición de los fenómenos químicos. (Harvey, 2000)

La metodología analítica puede dividirse en cuatro niveles o conceptos. Estos conceptos son los siguientes: técnica, método, procedimiento y protocolo. Una técnica es cualquier principio físico o químico que se utiliza para estudiar un analito; mientras que, un método es la aplicación de una técnica para la determinación específica de un analito en una matriz determinada. Un procedimiento es definido como la suma de directrices dónde se describe cómo aplicar un método a una muestra en particular. Y el protocolo es una serie de indicaciones, especificadas por escrito, que describen el procedimiento que debe seguirse rigurosamente de manera que la agencia que detalla dicho protocolo pueda aceptarlo como válido. (Harvey, 2000)

La **Figura 1** muestra las relaciones jerárquicas entre técnicas, métodos procedimientos y protocolos. En el ejemplo, para determinar la concentración de mercurio inorgánico (II) en aguas superficiales y en sangre, se debe utilizar dos métodos distintos, donde los procedimientos para cada análisis se pueden obtener de, por ejemplo, la ASTM, el cual es un organismo de normalización de los Estados Unidos de América o de la APHA (Asociación de Salud Pública Americana). Por otra parte, si los resultados deben ser utilizados en políticas públicas, estos deben responder a controles más estrictos; por lo que, para su validez deben cumplir protocolos dictados por las agencias reguladoras correspondientes, como la EPA en este ejemplo.

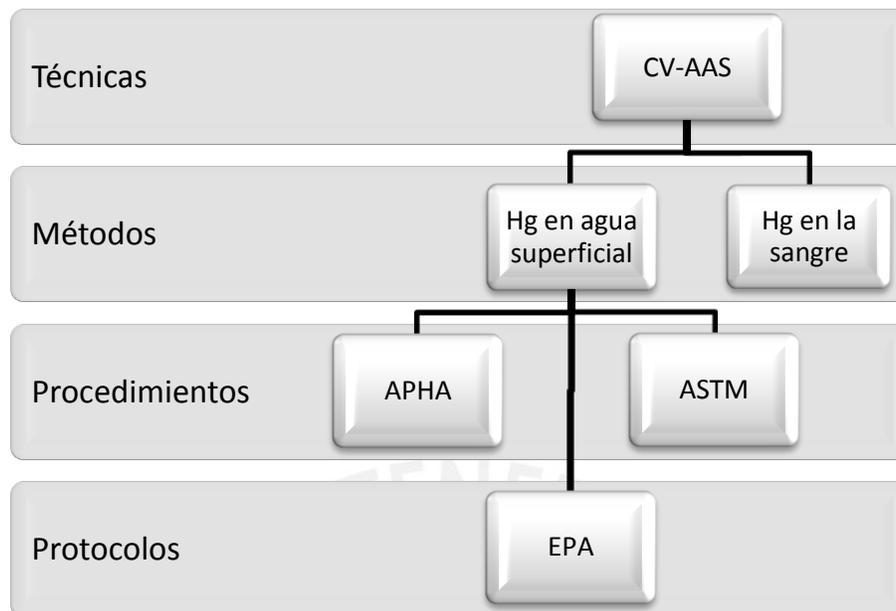


Figura 1. Relaciones jerárquicas entre una técnica, los métodos que utilizan esta técnica, y los procedimientos y protocolos para un método.

En el ámbito educativo, se puede trabajar con diversas técnicas, métodos y procedimientos. Las técnicas analíticas empleadas en los laboratorios de investigación se clasifican generalmente en dos: las clásicas o químicas y las instrumentales o fisicoquímicas. Las primeras se basan en reacciones químicas conocidas, mientras que las otras se basan en la interacción energía-materia.

Las técnicas clásicas precedieron a las instrumentales y la mayoría de los análisis consisten en la separación del componente de interés o del analito de una muestra por precipitación, extracción o destilación. La determinación cualitativa del analito separado se realiza mediante una reacción entre este y un reactivo específico. El producto obtenido se reconoce por su color, punto de fusión, solubilidad en una serie de solventes, entre otros. Para el análisis cuantitativo del analito se utilizan métodos gravimétricos y volumétricos. (Skoog, 2007)

El análisis gravimétrico se basa en medidas de masa, de las cuales, bien de forma directa, bien en forma indirecta, se calcula la cantidad de analito. Esta determinación puede hacerse mediante volatilización o por precipitación (Marín, 1995). Por otra parte, el

análisis volumétrico utiliza un volumen exactamente medido de un reactivo estándar a una disolución desconocida que contiene al analito. Este volumen utilizado sirve para hallar la cantidad de analito presente en dicha muestra por estequiometría.

Fue a comienzos del siglo XX que se comenzaron a utilizar fenómenos distintos de los utilizados por las técnicas clásicas para resolver los problemas analíticos. Así, para el análisis cuantitativo de analitos inorgánicos, orgánicos y bioquímicos se empezaron a utilizar las medidas de sus propiedades físicas como la conductividad, absorción o emisión de luz, relación masa/carga y la fluorescencia. Además, las técnicas cromatográficas y electroforéticas empezaron a reemplazar a la destilación, extracción y precipitación. (Skoog, 2007)

La instrumentación proporciona alta precisión y límites de detección más bajos que las técnicas clásicas. Incluso permite el análisis de grandes cantidades de muestras y, en ocasiones, la automatización (Skoog, Holler, & Nieman, 1992). En efecto, esto permite su aplicación a diferentes tipos de muestras. Por ejemplo, las ambientales, que contienen concentraciones muy bajas de sustancias contaminantes, las farmacéuticas y alimenticias, que demandan el aseguramiento de un nivel de calidad elevado, exento de sustancias nocivas para la salud.

El análisis de metales en aguas naturales, de consumo y residuales puede determinarse satisfactoriamente mediante espectrofotometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), espectrofotometría de absorción atómica con llama o sin llama (AAS), espectrofotometría de absorción molecular UV/VIS, o mediante técnicas colorimétricas. Los límites de detección de las dos primeras técnicas espectroscópicas son aproximadamente del mismo orden de magnitud, partes por billón (ppb), mientras que las dos últimas tienen límites de detección más altos. (Marín, 1995)

La adquisición de un instrumento óptico atómico versátil y de costo asequible puede llevar en primera instancia al AAS. Las ventajas del AAS frente al ICP son los bajos costos de adquisición, de mantenimiento y uso. Sin embargo, con respecto a la sensibilidad, los límites de detección y la capacidad de análisis en simultáneo de varios analitos, el ICP supera al AAS. Finalmente, la decisión dependerá del analito, la matriz, la

infraestructura física y humana disponible, si el análisis es rutinario o eventual, o si el análisis es multi-elemental o de unos cuantos elementos (Tyler, 1991).

Las limitaciones que surgen en los laboratorios de investigación, debida a la falta de instrumentación, se pueden superar cuando el químico analítico desarrolla métodos alternativos para realizar los análisis. De esta manera, se puede utilizar una técnica instrumental cuyo costo sea aceptable y aplicarla a la determinación de la concentración de un analito, gracias a algunos cambios en su procedimiento. Generalmente, se hace empleo de sustancias químicas que reaccionen selectivamente con el analito en estudio, ya sea para concentrarlo o mejorar la sensibilidad del análisis.

Durante el desarrollo de nuevos métodos de análisis, se investiga también la reducción del volumen de los residuos y de su toxicidad. En ocasiones, esto repercute en mejores selectividad y sensibilidad, y se alcanzan menores límites de detección. El desarrollo de métodos alternativos de análisis trae como principal beneficio el estudio de un mayor número de sustancias pues, en ocasiones, la falta de instrumentación impide el análisis de determinados analitos que, debido a su naturaleza, requieren de técnicas más complejas y costosas que las usuales.

1.1 Principios de la espectrofotetría de absorción molecular UV/VIS

La región ultravioleta del espectro se encuentra en el rango de 200 a 400 nm y la región visible de 400 a 800 nm. Las energías relacionadas a estas regiones son de 150 a 72 Kcal/mol y de 72 a 36 Kcal/mol respectivamente. Estas magnitudes normalmente corresponden a la diferencia de energía existente entre dos estados energéticos moleculares. Las transiciones electrónicas en las moléculas ocurren cuando energía de esta magnitud es absorbida por la molécula. Asimismo, la longitud de onda y la cantidad de energía que un compuesto absorbe depende de la estructura molecular y de la concentración del compuesto en mención respectivamente.

Por ejemplo, sistemas de enlaces simples tienden a exhibir transiciones electrónicas desde orbitales sigma enlazantes a sigma antienlazantes ($\sigma \rightarrow \sigma^*$) y ocasionalmente transiciones de electrones no enlazantes a orbitales sigma antienlazantes ($n \rightarrow \sigma^*$), siempre que estos electrones puedan verse involucrados. En la región UV/VIS

son comunes las transiciones de orbitales pi a orbitales pi antienlazantes ($\pi \rightarrow \pi^*$) y transiciones de electrones no enlazantes a orbitales pi antienlazantes ($n \rightarrow \pi^*$). (Settle, 1997)

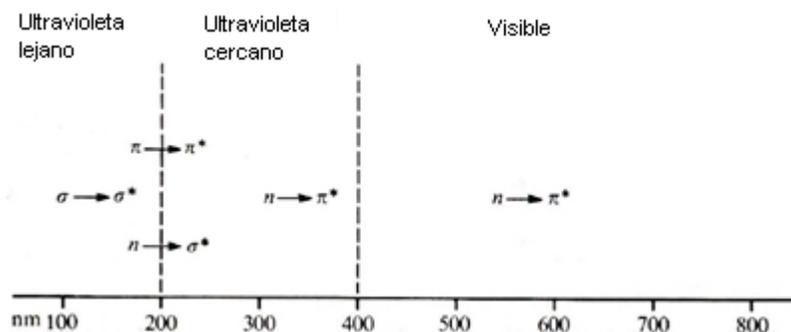


Figura 2. Transiciones electrónicas típicas de cada región del espectro electromagnético. (Settle, 1997)

Un cromóforo es un grupo funcional que exhibe una absorción característica en la región ultravioleta y visible del espectro. Los compuestos que poseen grupos cromóforos en su estructura son ampliamente utilizados en la espectrofotometría UV/VIS. En la **Figura 2** se observa que en estos cromóforos pueden ocurrir transiciones de tres tipos cuando absorben radiación electromagnética: las del tipo $\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \sigma^*$. (Settle, 1997)

Por lo tanto, en la estructura de estos compuestos debe haber presencia de enlaces dobles (como en los etilenos, acetilenos y carbonilos); pares de electrones libres de heteroátomos asociados a enlaces dobles (grupos carbonilos, nitro y azo) y enlaces simples junto a heteroátomos con pares de electrones libres (alcoholes, amidas y agua) respectivamente. Existen otros grupos llamados auxócromos; estos son grupos que no exhiben absorción por sí mismos, pero sí pueden afectar la longitud de onda o la intensidad de la banda de absorción del cromóforo.

La función básica de un espectrofotómetro UV/VIS es la de medir la absorbancia o transmitancia. Los espectros de una molécula que contiene cromóforos son complejos, debido a que se superponen las transiciones rotacionales y vibracionales con las transiciones electrónicas, dando como resultado líneas superpuestas (**Figura 3**). Finalmente, estas aparecen como una banda continua de absorción. (Settle, 1997)

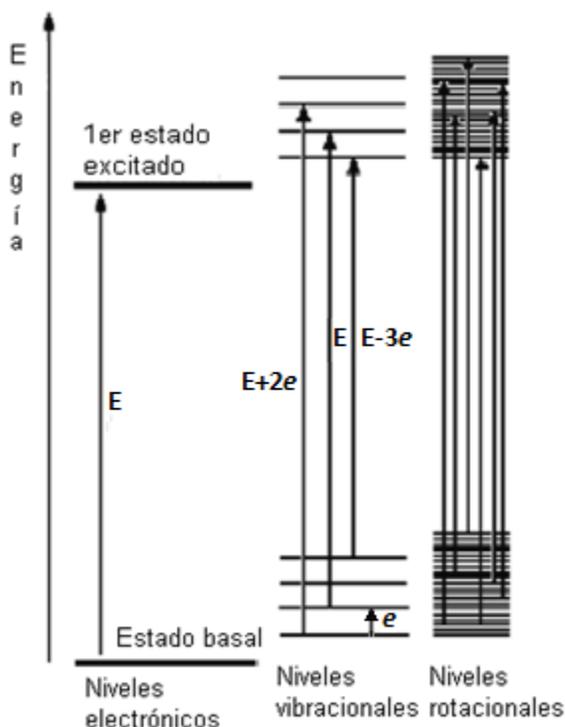


Figura 3. Niveles de energía de una molécula, donde E es la diferencia de energía de una transición electrónica y e la correspondiente a una transición vibracional. (ThermoSpectronic, 2001)

Los metales de transición tienen orbitales d incompletos y normalmente exhiben bandas de absorción en la región UV/VIS. La longitud de onda de las transiciones $d-d$ dependen del metal involucrado (número de electrones d inicialmente presentes), el número de grupos coordinados, la basicidad de los átomos donadores de electrones en el ligando y de la geometría de los grupos coordinados. (Settle, 1997)

Adicionalmente, la habilidad de los metales de formar complejos, en especial los elementos de transición, con moléculas orgánicas e inorgánicas que absorben en la región visible, proporciona la base para el análisis espectrofotométrico cuantitativo. Las absorciones se deben al movimiento de electrones entre los niveles de energía del complejo metal-ligando. Los ligandos más utilizados en estas determinaciones han sido la ditizona, compuestos azo, ditiocarbamato y tiocianato. (ThermoSpectronic, 2001)

El análisis espectrofotométrico cuantitativo se realiza mediante la aplicación de la ley de Beer-Lambert. Este consiste en relacionar la absorbancia de energía realizada por

una sustancia con la concentración de dicha sustancia en solución. Los detalles son explicados en la sección siguiente.

1.2 Ley de Beer-Lambert

La ley de Beer Lambert sostiene que la concentración de una sustancia en solución es proporcional a la absorbancia, A , de la disolución. Cuando una radiación monocromática pasa a través de una disolución homogénea en una celda, la intensidad de la radiación emitida depende de la longitud de la celda (l) y de la concentración (c) de la disolución.

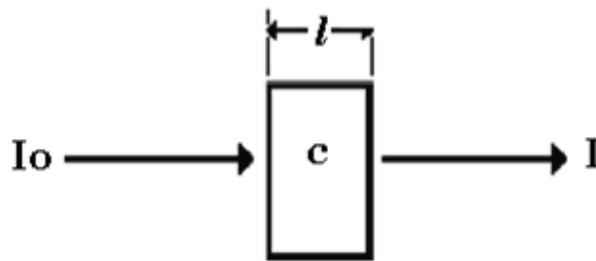


Figura 4. Radiación que pasa a través de una disolución contenida en una celda (ThermoSpectronic, 2001)

En la **Figura 4**, I_0 es la intensidad de la radiación incidente, mientras que, la intensidad de la radiación transmitida es I . La relación I/I_0 es conocida como la transmitancia. Matemáticamente, la absorbancia se relaciona con la transmitancia mediante la siguiente ecuación:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot C \cdot l \quad \text{Ecuación 1}$$

donde l es el camino que recorre la radiación al atravesar la muestra (normalmente es 10 mm), C es la concentración de las moléculas que absorben en ese camino óptico y ε es la constante de absorptividad molar, depende de la naturaleza de la molécula y la longitud de onda de la radiación.

En la literatura aparecen diversos símbolos y términos alternativos para la absorbancia. En la IUPAC no existe una convención para los símbolos utilizados en la

espectrofotometría de absorción molecular. Por tal razón, en la **Tabla 1** se presenta una lista de nombres comúnmente utilizados en la literatura y que se emplearon en este trabajo (Clark, Frost, & Russell, 1993).

Tabla 1. Nomenclatura de los términos utilizados en la ley de Beer-Lambert

Símbolo aceptado	Significado	Nombre aceptado	Sinónimos (*)	
			Abreviación o símbolo	Nombre
T	$\frac{I}{I_0}$	Transmitancia	-	Transmisión
A	$\log\left(\frac{I_0}{I}\right)$	Absorbancia	OD, D, E	Densidad óptica
a	$\frac{A}{bc}$	Absorptividad	<i>k</i>	Coefficiente de extinción
ϵ	$\frac{A}{bM}$	Absorptividad molar; M=mol.L	-	Coefficiente de extinción molar
b	Longitud que recorre la radiación a través de la muestra	Camino óptico	<i>l, d</i>	-

(*) Utilizados ocasionalmente en la literatura.

La **Ecuación 1** es una expresión de la ley de Beer-Lambert y sirve como base para el análisis cuantitativo mediante medidas de absorbancia. Esta medida de la absorbancia se realiza a la longitud de onda correspondiente al pico de máxima absorción. En el análisis cuantitativo espectrofotométrico se prepara una curva de calibración que relaciona la absorbancia con la concentración de varias disoluciones estándar de concentraciones conocidas (ver **Figura 5**).

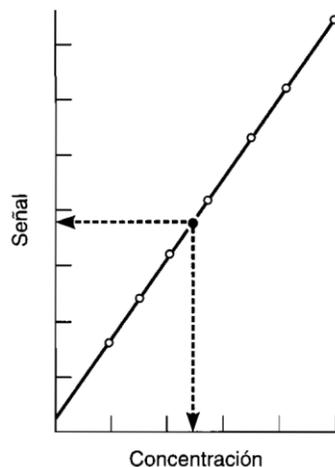


Figura 5. Curva de calibración en el análisis instrumental. Interpolación de la señal obtenida por el instrumento para hallar la concentración del analito en la muestra problema. (Miller, 1993)

Las soluciones estándar se miden en el espectrofotómetro bajo las mismas condiciones que las utilizadas posteriormente para las muestras desconocidas. Una vez graficada la curva de calibración, la concentración del analito se obtiene por interpolación, tal como se muestra en la **Figura 5**. Para asegurar la fiabilidad de los resultados, estos pueden acompañarse de un análisis estadístico que cuantifica los errores asociados a cada punto de la recta, a la pendiente y ordenada en el origen de la recta.

Al proceso de establecer, tanto de manera cualitativa como cuantitativa, los errores y la incertidumbre de la medición se le denomina **proceso de validación del método analítico**. Gracias a este proceso se asegura que cada determinación de la concentración del analito en estudio es la mejor estimación del valor 'real', y que esta se encuentra dentro de ciertos límites de confianza, establecidos experimentalmente a través de la interpretación analítica y de las herramientas estadísticas.

Los parámetros y características del proceso de validación se explican en la sección experimental de este trabajo. En la siguiente sección, **1.3**, se describe las características de dos equipos espectrofotométricos, el de absorción atómica y el de absorción molecular UV/VIS, y su aplicación en la determinación de metales.

1.3 Equipos espectrofotométricos de absorción atómica y molecular UV-VIS

Los instrumentos espectroscópicos característicos constan de: (1) una fuente estable de energía radiante como por ejemplo una lámpara de cátodo hueco en la absorción atómica (**Figura 6**) o una lámpara de deuterio y wolframio en la absorción molecular (**Figura 7**), (2) un recipiente transparente para contener la muestra, (3) un monocromador, que es un dispositivo que aísla una región restringida del espectro para la medida, (4) un detector de radiación, que convierte la energía radiante en una señal utilizable, (5) un sistema de procesamiento y lectura de la señal, que visualice la señal detectada en una escala de medida, en una pantalla de osciloscopio, en un medidor digital o en un registrador. (Skoog, Holler, & Nieman, 1992)

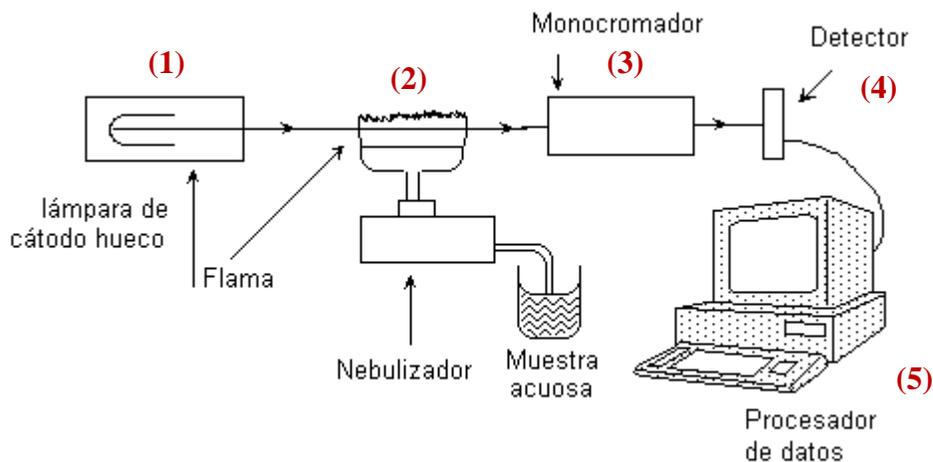


Figura 6. Esquema de las partes de un espectrofotómetro de absorción atómica de flama (NMSU, 2006).

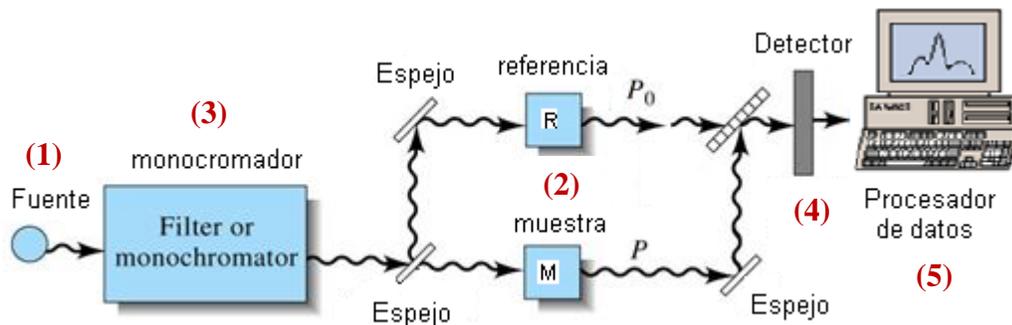


Figura 7. Esquema de las partes de un espectrofotómetro de absorción molecular ultravioleta visible. (Harris, 2003)

La espectrofotometría de absorción molecular es un método basado en la medición de la absorbancia de radiación en la región visible o ultravioleta del espectro electromagnético de sustancias en solución. Generalmente, las disoluciones se encuentran en medio acuoso y las especies son moléculas o iones, mas no átomos. A diferencia de la espectrofotometría de absorción molecular, la absorción atómica consiste en la atomización del analito de una muestra acuosa. Este vapor atómico es posteriormente atravesado por un haz de luz a determinada longitud de onda. La longitud de onda elegida es característica del elemento que se analiza.

En la **Figura 7** se muestra el esquema de un espectrofotómetro de absorción molecular UV/VIS de doble haz, donde se aprecian sus componentes básicos. El procedimiento para obtener el espectro de absorción es sencillo. Primero, en el recipiente R (referencia) se coloca el solvente, que no contiene al analito; segundo, se coloca la disolución que contiene al analito en el recipiente M (muestra), se encienden las lámparas, el monocromador selecciona la longitud de onda deseada y este haz de luz se hace incidir en ambas celdas con ayuda de un juego de espejos. Finalmente, el registro de la absorbancia del analito es visualizado en la computadora.

En la práctica, las medidas de absorbancia, en este tipo de espectrofotómetros, son relativas, pues lo que interesa medir es la diferencia de intensidad transmitida cuando la radiación monocromática atraviesa una solución de referencia, o blanco, con respecto de intensidad transmitida cuando la misma radiación atraviesa a la muestra o analito. En la **Figura 8** se representa este proceso.

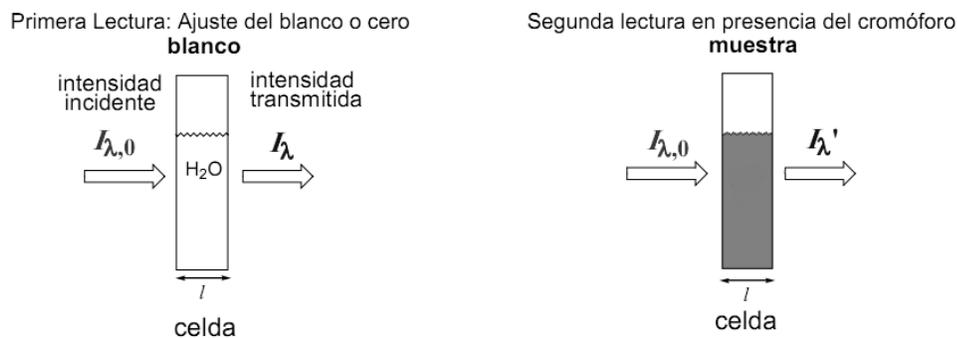


Figura 8. Lectura de la absorbancia en una muestra y el solvente. (Settle, 1997)

Asimismo, el proceso de medición de la absorbancia requiere del uso de recipientes transparentes para que estos no interfieran en la medición. En consecuencia, el material de la celda de trabajo debe ser seleccionado según el rango del espectro electromagnético estudiado. El material apropiado para trabajar en el rango ultravioleta y visible es el cuarzo. (Settle, 1997)

Por otro lado, en la **Figura 9** se muestra el equipo de absorción atómica de flama utilizado para analizar cinc, las partes del espectrofotómetro son las mismas a las descritas en la **Figura 6**, pero además se puede apreciar el sistema atomizador en la parte delantera del equipo, este consiste en un nebulizador, una cámara de spray y premezcla, y un quemador.



**Figura 9. Espectrofotómetro AAS de flama. Sección Química-PUCP.
(Perkin Elmer modelo 3100)**

En cambio, para detectar mercurio, el espectrofotómetro debe acoplarse a un sistema de inyección de flujo. Este sistema permite agregar cantidades discretas del analito mediante válvulas de inyección, dentro de un flujo continuo de solución portadora (Rangel, 2007). Esta solución portadora contiene la disolución ácida y la disolución del agente reductor (NaBH_4 o SnCl_2). Posteriormente, ambas se mezclan con la disolución del ion metálico, en un serpentín de reacción, de donde son arrastrados mediante un gas inerte, N_2 o Ar , hacia un separador de fases gas/líquido. Finalmente, el mercurio

elemental, en estado gaseoso, es transportado hasta la celda de cuarzo, ubicada en el paso de luz del espectrofotómetro. (Ver **Figura 10** y **Figura 11**)

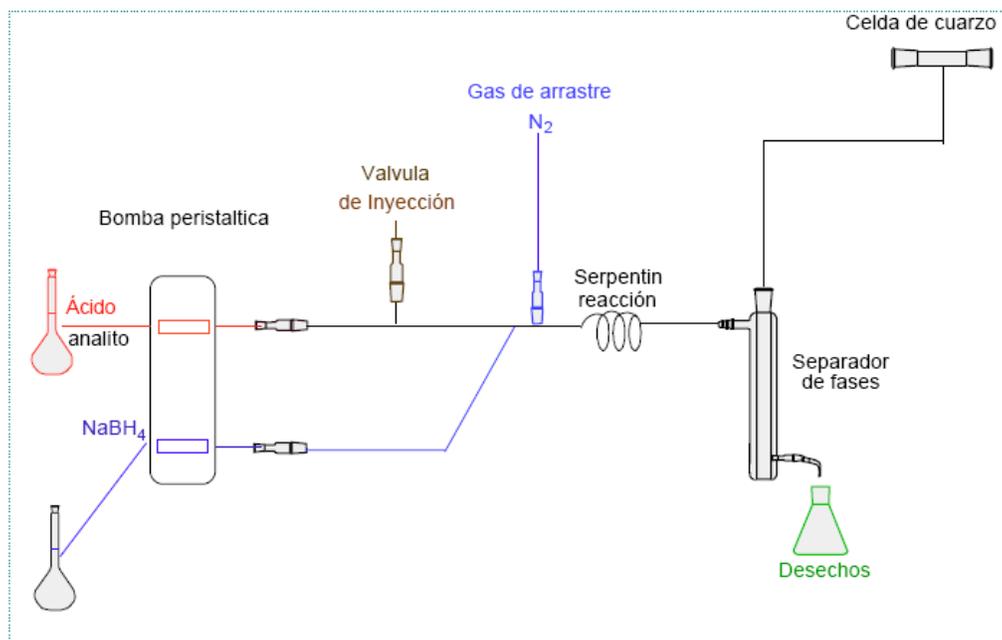


Figura 10. Esquema de un sistema de inyección de flujo utilizado en la determinación de mercurio. (Rangel, 2007)



Figura 11. Espectrofotómetro AAS, Perkin Elmer modelo 3110, acoplado a un sistema de inyección de flujo, Perkin Elmer modelo FIAS 100. Técnica CV-AAS (Instituto de Corrosión y Protección-PUCP)

Actualmente, la Sección Química de la PUCP cuenta tanto con un espectrofotómetro de absorción atómica, como uno de absorción molecular UV/VIS, mas

no con un sistema de inyección de flujo. En consecuencia, el desarrollo de métodos cuyo analito en estudio es el mercurio (II) se ha visto impedido por mucho tiempo.

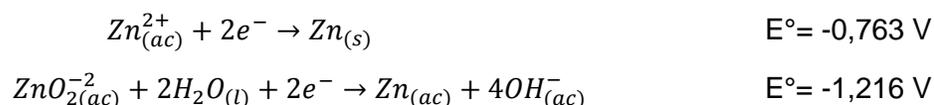
Ante esta problemática, se decidió utilizar el espectrofotómetro de absorción molecular UV/VIS para cuantificar mercurio y cinc mediante la formación de sus ditizonatos. El espectrofotómetro de absorción atómica fue utilizado como método de referencia para la detección de cinc, en el proceso de validación, pero no fue utilizado para la detección de mercurio. Para validar el método de mercurio, los resultados obtenidos por este método fueron comparados con los obtenidos por el laboratorio del Instituto de Corrosión de la PUCP, el cual, a la fecha, está acreditado por El Servicio Nacional de Acreditación de INDECOPI y por el Standards Council of Canada, SCC-Canadá, para el caso de mercurio total en aguas

1.4 Propiedades del cinc y el mercurio

1.4.1 Cinc

El cinc es el primer elemento del grupo 12, un metal de transición d^{10} , aunque estrictamente no lo sea. El metal es maleable, dúctil y de color blanco azulado, su número atómico es 30 y su masa atómica es de 65,37 umas. Funde a 419,5 °C y ebulle 907 °C (Safety, 2008). Su configuración electrónica externa es $3d^{10} 4s^2$ y sus principales estados de oxidación son el 0 y +2. Tiene comportamiento anfotérico, por lo que reacciona tanto con ácidos como con bases.

Algunos potenciales de reducción del ion Zn^{2+} se presentan a continuación (Weast, 1972):



El metal reacciona con ácidos no oxidantes para formar sales en su forma de Zn^{2+} , con la consecuente liberación de gas hidrógeno. Se disuelve en soluciones alcalinas para formar iones de tetrahidroxocincatos $Zn(OH)_4^{2-}$ y $Zn(OH)_3^{-}_{(ac)}$ según el pH de la disolución (**Figura 12**) (Randy A. Reichle, 1975). El Zn^{2+} forma compuestos de coordinación,

generalmente rodeado de cuatro grupos coordinados dispuestos en las esquinas de un tetraedro regular.

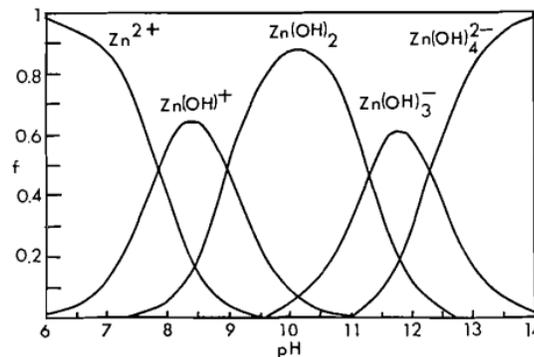


Figura 12. Gráfico de la fracción f de Zn(II) presente en la forma de Zn^{2+} , $Zn(OH)^+$, $Zn(OH)_2$, $Zn(OH)_3^-$, y $Zn(OH)_4^{2-}$ en un rango de pH de 6 a 14 a 25 °C. (Reichle, 1975)

Tiene una elevada reactividad, por lo cual no se encuentra libre en la naturaleza. Los minerales más importantes que forma son la blenda o esfalerita (ZnS), smithsonita ($ZnCO_3$), cincita (ZnO) y cincocita ($ZnSO_4$). Su contenido promedio total en los suelos ha sido estimado en 1-300 mg/kg. En aguas superficiales naturales, la concentración de cinc es generalmente inferior a 10 mg/L y en aguas subterráneas está a concentraciones entre 10-40 mg/L. En el agua potable puede tener una concentración mayor debido a la lixiviación del cinc de las tuberías y de los accesorios de estas (WHO, 1996).

Las fuentes de emisión de cinc son naturales y antropogénicas. Entre las primeras pueden mencionarse los incendios forestales, las erupciones volcánicas, la lixiviación natural de suelos y rocas. Por otra parte, las fuentes antropogénicas son la producción de acero, recubrimiento de metales por galvanización, las aguas residuales industriales, fertilizantes, insecticidas, fungicidas (carbamato de cinc), cosméticos y pinturas (óxido de cinc). (WHO, 1996)

El cinc imparte un indeseable sabor astringente al agua. Estudios de la OMS han revelado que el 5% de la población puede distinguir entre agua libre de cinc y agua con cinc a niveles de 4mg/L (en la forma de sulfato de cinc). Otras sales de cinc tienen límites de detección mayores. Las aguas que contienen cinc a concentraciones en el rango 3-5 mg/L tienden a aparecer opalescentes y desarrollan una película de grasa al momento de hervir el agua. (WHO, 1996)

El cinc es un elemento esencial, ya que interviene en el metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos. Según su abundancia en el organismo se le clasifica como oligoelemento. Cada oligoelemento tiene un rango de concentraciones considerado óptimo para el funcionamiento del organismo. Por lo que tanto su déficit como una concentración por encima de sus valores normales pueden ser perjudiciales para el organismo. En el caso de los hombres adultos, el consumo recomendado es de 15 mg/día, para mujeres adultas es de 12 mg/día y para los niños pre-adolescentes de 10 mg/día (WHO, 1996).

La ingesta promedio de cinc es de 150-450 mg/día, por lo que una ingesta mayor a la recomendada puede provocar efectos adversos sobre la salud como los vómitos, diarreas, dolor abdominal y pérdida de apetito. La alta ingesta de cinc se asocia también a una deficiencia de cobre y hierro. En contraste, su deficiencia puede provocar retraso en el crecimiento, dermatitis, anorexia, pérdida de la memoria, alopecia, entre otros. (National Institute of Health, 2011)

1.4.2 Mercurio

El mercurio es el último elemento del grupo 12. Su número atómico es 80 y su masa atómica es 200,6 umas. El metal es líquido a temperatura ambiente, de color blanco plateado. Forma aleaciones con algunos metales, entre estos, el oro y la plata. Sus vapores son tóxicos y corrosivos, y son más pesados que el aire; se desprenden cuando su temperatura se eleva por encima de 40 °C. Su temperatura de fusión normal es -38,4 °C y la de ebullición es 357 °C. (Baker, 2008)

Sus potenciales de reducción se detallan a continuación (Weast, 1972):



El mercurio se encuentra naturalmente en la corteza terrestre, alrededor de 80µg/kg. 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 compuestos. (Risher, 2003)

Estas fuentes de emisión antropogénicas son las siguientes: 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. Una tercera fuente también es la remoción de fuentes históricas de mercurio, por ejemplo, en suelos, sedimentos, agua, y residuos no tratados. (WHO, 2007)

El mercurio es transportado en el medio ambiente a través del aire, agua y por organismos biológicos de la cadena trófica. 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 peces. (Risher, 2003)

En el ambiente, el mercurio elemental puede combinarse con cloro, azufre y otros elementos para formar compuestos inorgánicos. Los compuestos naturales de mercurio más comunes son el cloruro de mercurio (I) y (II), y el sulfuro de mercurio, además del mercurio elemental. La biotransformación del mercurio inorgánico a metilmercurio por microorganismos acuáticos es la responsable de la bioacumulación del metilmercurio. (WHO, 2007)

Niveles muy altos de mercurio metálico pueden causar daños al sistema nervioso central y periférico. La exposición al mercurio puede causar daño incluso antes que se presenten síntomas, incluso si se trata de niveles muy bajos. El envenenamiento por mercurio se manifiesta por debilidad, insomnio, nerviosismo, dificultad con la memoria, cambios en la visión y audición, dolor de cabeza, irritabilidad, y en algunos casos, se presenta el síndrome llamado acrodinia, caracterizado por sarpullido, comezón, hinchazón y extremada sensibilidad en las plantas de los pies y manos. (EPA, 2009)

El mercurio inorgánico, en la forma de sales de mercurio, puede ser corrosivo a la piel, los ojos y al tracto gastrointestinal si es inhalado. Si es ingerido puede producir un

daño severo a los riñones. Por su parte, la exposición al metilmercurio de una mujer embarazada puede generar problemas en el desarrollo neurológico del feto en gestación, ya que al atravesar la placenta expone al cerebro del feto, aún muy sensible. (WHO, 2007)

Los principales síntomas de un recién nacido, cuya madre tuvo una exposición crónica al mercurio, son retardo mental, retraso en el crecimiento, desorden del lenguaje y pérdida de la memoria. (WHO, 2007). Incluso la leche materna puede estar contaminada con metilmercurio y, en menor grado, con mercurio inorgánico. Un estudio de la OMS, encontró una concentración promedio de $8\mu\text{g/L}$ de metilmercurio en leche materna de personas expuestas a especies marinas contaminadas. (Risher, 2003)

El mercurio no solo afecta el sistema nervioso del individuo, sino también las funciones cerebrales, daña al ADN y los cromosomas, produce reacciones alérgicas, irritación de la piel, efectos negativos en la reproducción, daño en el esperma, defectos de nacimiento, abortos, entre otros. El daño al cerebro, en consecuencia, puede causar cambios en la personalidad, disminución de la habilidad para aprender, incoordinación de músculos y pérdida de la memoria. (EPA, 2009)

La toxicidad del mercurio depende de su estado químico. El mercurio inorgánico tiene gran afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas, por lo que se acumula en los riñones, mientras que el mercurio orgánico, de carácter lipofílico, tiene una gran afinidad por el cerebro. La habilidad de los organismos vivos de convertir el mercurio inorgánico en orgánico, el cual es más tóxico y se acumula en mayor grado, aumenta el riesgo de la exposición al mercurio, incluso cuando esta es mínima. (EPA, 2009)

En el aspecto médico, el mercurio y el cinc, tienen consecuencias diferentes sobre la salud de los seres humanos. Mientras que el cinc es necesario para diversas funciones biológicas del cuerpo, el mercurio es un metal muy peligroso que ataca principalmente el cerebro, el sistema nervioso central y los riñones, dependiendo de la forma química a la que se esté expuesto. Por el contrario, presentan comportamientos similares en algunas reacciones de formación de complejos. Esta similitud permitió presumir, y más tarde confirmar, que ambos metales presentarían un comportamiento similar al reaccionar con la ditizona.

La elección de la ditizona como agente acomplejante fue debido a su habilidad para formar complejos quelatos con muchos iones metálicos. Estos metales representan un grupo de la tabla periódica, donde la mayoría de sus iones en disolución acuosa forman sulfuros insolubles. Entre estos están el Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Pd, Ag, Cd, Hg, Pb, entre otros.

En la siguiente sección se da una revisión de las propiedades físicas y químicas de la ditizona. Asimismo, se incluye información acerca del surfactante Tritón X-100, reactivo que fue utilizado para solubilizar la ditizona y los complejos que esta formaba con el mercurio y cinc. Gracias a este no fue necesario el uso de solventes orgánicos clorados de gran toxicidad como el cloroformo y tetracloruro de carbono, los cuales fueron el medio comúnmente utilizado para disolver a la ditizona, en los años 60, debido a su insolubilidad en agua.

1.5 Agentes cromóforo y surfactante

1.5.1 Ditizona o difeniltiocarbazona

La ditizona es un reactivo orgánico cuya fórmula molecular es $C_{12}H_{10}N_2S$, generalmente se le abrevia como H_2Dz . Tiene una masa molecular de 256,33 umas y tiene la apariencia de cristales color púrpura oscuro. Es inodoro y tiene punto de fusión de $168^{\circ}C$ (ScienceLab.com, 2010). Su estructura molecular es la mostrada en la **Figura 13** (Karchmer J. H., 1971).

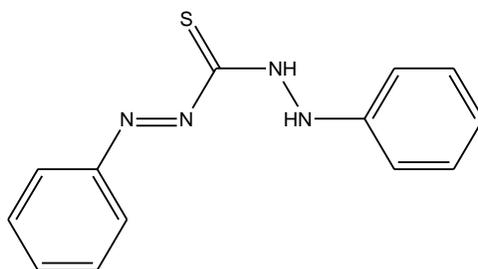
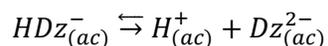
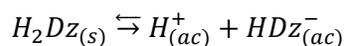


Figura 13. Estructura molecular de la ditizona

Es un ácido débil, en solución acuosa se comporta como un ácido diprótico y se disocia en dos etapas (Karchmer J. H., 1971):



Para propósitos analíticos se comporta generalmente como ácido monoprótico. Además, solo la primera constante de ionización ha podido ser medida. Se ha encontrado un pK_{a1} igual a $4,46 \pm 0,02$ (Karchmer J. H., 1971). Se disuelve en hidrocarburos clorados como tetracloruro de carbono y cloroformo, además de alcoholes, acetona e hidrocarburos. En medio acuoso se disuelve alrededor de 20 g/L en pH alcalino, pero a bajos valores de pH es prácticamente insoluble ($5,0 - 7,2 \times 10^{-5}$ g/L) (Paradkar, Williams, & Ron, 1994) El compuesto disuelto presenta un equilibrio tautomérico mostrado en la **Figura 14**.

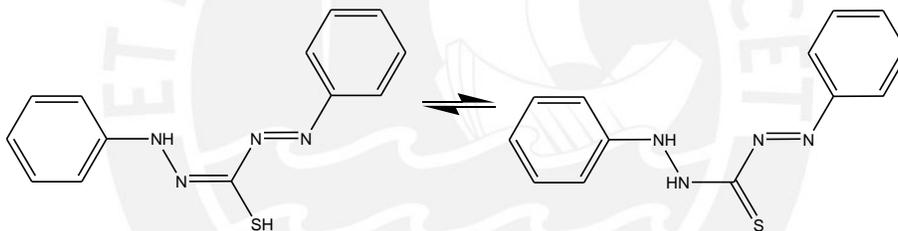


Figura 14. Equilibrio tautomérico de la ditizona en solución

La ditizona expuesta a la luz solar es oxidada, el producto de oxidación presenta una coloración amarilla. La estructura mostrada en la **Figura 15** corresponde al compuesto difeniltiocarbodiazona (Karchmer J. H., 1972). Igualmente, las sustancias muy oxidantes, en el medio donde se encuentra disuelta, también pueden oxidarla. Por ejemplo, en la literatura se mencionan algunos agentes oxidantes de la ditizona, como el hierro (II), el yodo y el talio (III). Los potenciales redox de estos sistemas son Fe^{3+}/Fe^{1+} , 737 mV en ácido perclórico 2M; I_2/I^- , 628 mV en ácido sulfúrico 0,5 M y Tl^{3+}/Tl^{1+} , 770 mV en ácido clorhídrico 0,5 -1,0 M; respectivamente. (Servant, 1973)

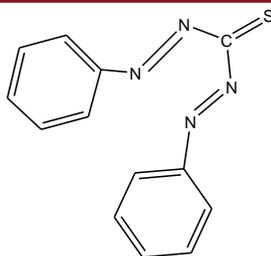


Figura 15. Producto de la oxidación de la ditizona

La ditizona es un reactivo utilizado en la determinación de metales debido a que forma complejos coloreados con muchos de ellos. Tradicionalmente, el procedimiento para medir la absorbancia de los complejos de ditizona implicaba la extracción del complejo en un solvente orgánico como cloroformo o tetracloruro de carbono (Snell F. , 1967), (Morrison, 1957), (P.R. Subbaraman, 1969), (Cooper & Sullivan, 1951), (Hibbard, 1937), (White, 1936). No obstante, dicho procedimiento resulta tedioso, consume tiempo y no es selectivo. Adicionalmente, el cloroformo y el tetracloruro de carbono se encuentran en la lista de solventes declarados por la EPA como cancerígenos (EPA, 1980).

La estructura de los ditizonatos metálicos ha sido determinada mediante el análisis de rayos X de los cristales de estos complejos (Sandell & Onishi, 1978), (Meriwether & Breither, 1965). Dichos estudios demostraron que la molécula está conformada por dos ligandos bidentados de ditizona coordinados tetraédricamente al ion metálico. Esta unión se realiza mediante un átomo de azufre y uno de nitrógeno de cada residuo de ditizona, tal como se aprecia en la **Figura 16**. La geometría de estos complejos metálicos es similar en el caso del mercurio, cobre y cinc.

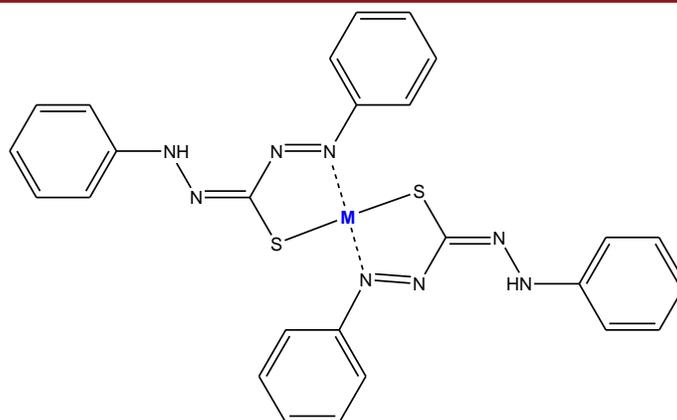


Figura 16. Ditizonato metálico (M = Hg (II), Zn (II) y Cu (II))

Algunos autores señalan la existencia de complejos primarios y secundarios entre algunos metales y la ditizona. Los primarios son aquellos donde el complejo se forma a partir de la primera ionización de la ditizona, y los secundarios son aquellos donde la ditizona libera sus dos iones hidronio. La formación de este segundo tipo de complejo se da a valores altos de pH y ante la deficiencia de ligando, donde el segundo protón es reemplazado. Los metales que pueden formar este tipo de complejo son: Cu(I), Cu (II), Ag, Au(I), Bi, Pd y Hg(II). De estos, el ditizonato primario de mercurio es color amarillo-naranja, mientras que el secundario es morado (Morrison, 1957).

Estudios acerca de los complejos de mercurio, cinc, plata, plomo y cobre revelan datos importantes acerca de sus espectros infrarrojos. Se han reportado bandas características en las siguientes regiones: 3170-3300 cm^{-1} (estiramiento N-H), 1515-1545 cm^{-1} (flexión N-H), 1260-1360 cm^{-1} (estiramiento N-fenil), y 1130-1240 cm^{-1} (estiramiento N-C-S), dichas bandas corresponden a los complejos primarios de los metales mencionados. Adicionalmente, se encontró similitud entre los espectros de los ditizonatos de mercurio, cinc y cadmio, por lo que fueron agrupados como complejos de similar estructura. (Meriwether & Breither, 1965)

Los espectros de la región visible de los complejos metálicos de ditizona muestran una sola banda en la región 450-550 nm, típica de los derivados de grupo azobenceno. La alta absortividad de cada una de estas bandas y su relativa independencia de la naturaleza del metal, así como las dos bandas intensas de la absorción de la ditizona

libre, sugieren que estas transiciones son principalmente asociadas al sistema electrónico deslocalizado del ligando.

Generalmente, los complejos planares pueden presentar varias bandas intensas en el visible, mientras que los sistemas octaédricos y tetraédricos presentan una sola banda. Estas transiciones adicionales en los sistemas planares resultan de la interacción de los electrones- π de los ligandos coplanares hacia el átomo central metálico, lo que no ocurre en los complejos 1:1 ni en los sistemas octaédricos o tetraédricos. (Meriwether & Breither, 1965)

Diversos estudios han reportado la baja estabilidad de la ditizona en Tritón X-100. Sin embargo, según Paradkar y Williams (1994), esta inestabilidad de la ditizona no interfiere con el análisis de los ditizonatos, puesto que la disolución de ditizona se mantiene estable durante al menos 60 minutos, por lo que el análisis espectrofotométrico puede culminarse satisfactoriamente durante este período de tiempo. Adicionalmente, los estudios realizados por Meriwether *et al.* (1965) señalan que la formación del complejo metálico tiene un efecto estabilizante sobre la tolerancia del ligando a la luz.

1.5.2 Surfactante Tritón X-100

Durante los últimos años, los surfactantes han empezado a utilizarse como disolventes alternativos en el análisis espectrofotométrico (Khan & Ahmed, 2005); Song, *et al* (2006); García, A. *et al* (1986), Bhajan S. *et al* (1989). Estas moléculas anfifílicas tienen la ventaja de ser ópticamente transparentes, su uso es permitido, son relativamente no tóxicos y estables (Medel, 1986).

Los surfactantes son moléculas que consisten de una cadena hidrofóbica unida a una cabeza polar hidrofílica. Dicha cabeza polar puede ser catiónica, aniónica o no iónica. El surfactante Tritón X-100, polioxietilen-*tert*-octilfenol, es un surfactante de tipo no iónico y su estructura es la mostrada en la **Figura 17**.

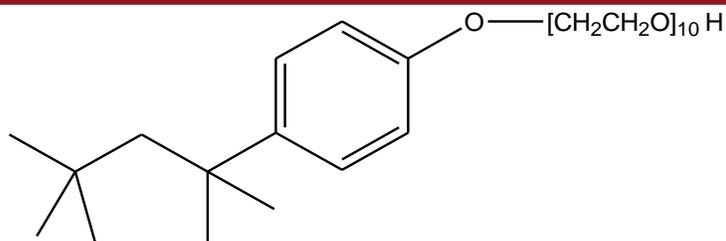


Figura 17. Estructura del Tritón X-100

Los surfactantes disueltos en agua forman agregados llamados micelas luego de haber alcanzado una concentración mínima denominada concentración micelar crítica (cmc). Las micelas 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 y así se forma un microambiente no polar, como el representado en la **Figura 18**.

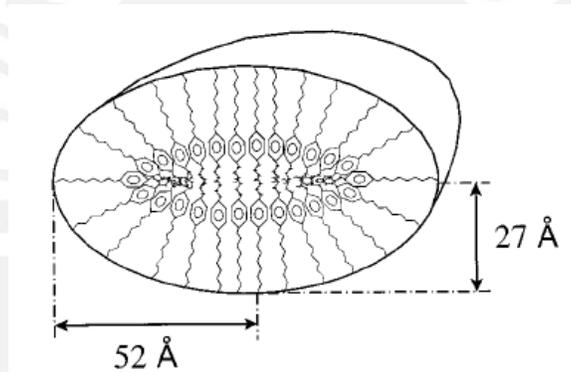


Figura 18. Representación esquemática de una micela del Tritón X-100. Modelo propuesto por Robson y Dennis (Jensen, 1999)

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.

El Tritón X-100 ha sido empleado en la solubilización de la ditizona y los ditizonatos que esta forma. Asimismo, se ha evaluado la aplicación de diversos surfactantes neutros en la técnica de extracción y pre-concentración en el punto de turbidez o niebla (CPE, por sus siglas en inglés) (M. Garrido, 2004); (Yu, 2005). Los resultados obtenidos por estas técnicas indican que dichos métodos son convenientes, selectivos y menos complicados que las técnicas de extracción líquido-líquido.

Como se ha mencionado previamente, los metales estudiados en este trabajo fueron el cinc y el mercurio. Generalmente, estos son evaluados mediante espectrofotometría de absorción atómica. La determinación del cinc es sencilla (NIOSH, 1994), pues tanto los reactivos como el procedimiento son accesibles para cualquier laboratorio de investigación, pero no ocurre lo mismo con el mercurio.

Debido a la naturaleza química del mercurio, este se analiza espectrofotométricamente con la técnica de vapor frío (NIOSH, 1994), aplicable solo a la medición de este metal debido a su alta presión de vapor. Para la realización de este procedimiento se necesita de un sistema de inyección de flujo, de agentes reductores y se intercambia el quemador de llama por una celda de cuarzo (Skoog, Holler, & Nieman, 1992).

Si bien la adquisición de un sistema de inyección de flujo permite una mayor versatilidad en el análisis (Scientific, 2004), solamente el mercurio puede analizarse mediante la técnica de vapor frío. En consecuencia, puede resultar poco práctica la adquisición de un sistema que será empleado para el análisis de un solo elemento. Lamentablemente, esto conlleva a no realizar estudios que involucren a este metal, lo cual limita los proyectos de investigación.

Ante esta problemática se propuso el desarrollo de un método alternativo para detectar y cuantificar mercurio en una muestra acuosa a través de un método sencillo, rápido, y asequible dentro del laboratorio de investigación de la Sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú. Debido a la toxicidad de este metal, fue necesario diseñar y probar el método con un metal de características químicas similares y luego replicarlo en el mercurio. El metal elegido fue el cinc, ubicado en el mismo grupo de la tabla periódica que el mercurio (McGraw-Hill, 2003).

La técnica analítica elegida fue la espectrofotometría de absorción molecular UV/VIS. Se hizo empleo de un reactivo cromóforo para formar un complejo coloreado con el ion metálico y, al igual que en otras técnicas ópticas, se hizo empleo de la ley de Beer-Lambert para la cuantificación del analito. Los resultados obtenidos mediante el método

desarrollado fueron corroborados con aquellos obtenidos por la técnica de absorción atómica.

En este sentido, a continuación se presenta los objetivos generales y específicos del presente trabajo.



2. OBJETIVOS

2.1 General

- Desarrollar un método analítico sencillo, rápido y confiable para la determinación de cinc y mercurio en las condiciones reales del laboratorio que sirva como alternativa a métodos instrumentales más costosos y/o no disponibles.

2.2 Específicos

- Desarrollar un método analítico sencillo, rápido y confiable para la determinación cuantitativa de cinc y mercurio en muestras acuosas, usando sistemas micelares.
- Optimizar las variables químicas del método para alcanzar los mejores niveles de sensibilidad en las condiciones reales del laboratorio.
- Validar el método para asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos.
- Aplicar el método a muestras reales.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Equipos e instrumentos

- Las absorbancias de las soluciones de los complejos de cinc-ditizona y mercurio-ditizona fueron medidas con el espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2, que usa el programa UV Winlab de Perkin Elmer. Se utilizaron celdas de cuarzo de 1cm de longitud (Celda UV VIS 10,00 mm, Perkin Elmer Instruments). El rango cubierto de los espectros fue el visible, de 400 a 700 nm.
- Las medidas de absorción atómica se realizaron en el espectrofotómetro Perkin Elmer (modelo 3100). La lámpara de cátodo hueco de cinc fue Perkin Elmer™ Lumina Lamp.
- Las mediciones de pH se realizaron con el pH-metro portátil Thermo Orion (modelo 230A plus) y un electrodo Thermo Orion Triode (rango de medición: -2,00 a 19,99). Fue calibrado diariamente las disoluciones de calibración comerciales de pH 4 y 7 adquiridas para tal fin (ver **Tabla 2**).
- La balanza analítica digital utilizada fue Ohaus Adventurer (máxima capacidad 210 g y sensibilidad de 0,0001 g).
- El agua ultra pura se obtuvo del sistema de purificación de agua Millipore (modelo Milli-Q Plus), se almacenó en una botella de vidrio de 4 L. Resistividad 18,2 MΩ.
- Los datos estadísticos se procesaron con ayuda de Microsoft Office® Office Excel 2007 © 2006, Microsoft Corporation.
- Las estructuras químicas fueron dibujadas con el programa CS ChemDraw Ultra® version 7.0.1 2002, Cambridge Soft Corporation.

3.2 Reactivos y preparación de las disoluciones

3.2.1 Reactivos

A continuación se presenta una lista de los reactivos empleados durante el desarrollo de este trabajo. Tanto el surfactante, Tritón® X-100, como los estándares metálicos de cinc y mercurio fueron comprados; el resto de reactivos fueron entregados del almacén de la Sección Química con vigencia y en buenas condiciones de almacenamiento, y utilizados sin previa purificación.

Tabla 2. Lista de reactivos empleados.

Nombre	Fórmula molecular	CAS	Marca	Grado
Tritón® X-100	$C_8H_{17}C_6H_4(OCH_2CH_2)_{9-10}OH$	9036-19-5	Merck	p.a.
5-difenilcarbazona (ditizona)	$C_{13}H_{12}N_4S$ (s)	60-10-6	Riedel de Haën	p.a.
Cinc granulado	Zn (s)	7440-66-6	Mallinckrodt	≥ 99,0 %
Cloruro de mercurio (II) anhidro	$HgCl_2$ (s)	7487-94-7	Merck	p.a.
Ácido nítrico fumante	HNO_3 (cc)	7697-37-2	Merck	68 - 70 %
Ácido clorhídrico fumante	HCl (cc)	7647-01-0	Merck	37%
Hidróxido de sodio	NaOH (s)	1310-73-2	J.T.Baker	≥ 98,0 %
Ftalato ácido de potasio	$KHC_8H_4O_4$ (s)	877-24-7	Mallinckrodt	p.a.
Acido fosfórico	H_3PO_4 (cc)	7664-38-2	Merck	85 %
Fosfato dihidrógeno de potasio	KH_2PO_4 (s)	7778-77-0	Merck	p.a.
Fosfato ácido disódico anhidro	Na_2HPO_4 (s)	7558-79-4	J.T.Baker	p.a.
Acido cítrico anhidro	$C_6H_8O_7$ (s)	77-92-9	Riedel de Haën	≥ 98,0 %
Solución calibración pH 4	$KHC_8H_4O_4(ac)$	-	Merck	-
Solución calibración pH 7	$Na_2HPO_4(ac) / KH_2PO_4(ac)$	-	Merck	-
Estándar de zinc 1000ppm	$Zn(NO_3)_2(ac)$	-	Scharlau	-
Estándar de mercurio 1000ppm	$Hg(NO_3)_2(ac)$	-	Merck	-

3.2.2 Preparación de las disoluciones

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y la preparación de las disoluciones se realizó con agua ultra pura. La limpieza del material de vidrio se realizó minuciosamente, todas las piezas fueron sumergidas en un baño de ácido nítrico 10 % v/v durante la noche, luego de haber sido lavadas con agua y detergente. Al retirarlas fueron enjuagadas con abundante agua destilada y finalmente con agua ultra pura.

Soluciones estándar de cinc. La disolución patrón de 20,6 ppm fue preparada por disolución de 10,3 mg de cinc metálico en 0,5 mL de ácido clorhídrico concentrado, se enrasó con agua ultrapura en una fiola de 500 mL. Las disoluciones estándar se prepararon por dilución de 3 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL y 30 mL de la disolución patrón en fiolas de 50 mL. Las concentraciones finales fueron las siguientes: 1,24 ppm; 2,06 ppm; 4,12 ppm; 6,18 ppm; 8,24 ppm; 10,30 ppm y 12,36 ppm (**Tabla 3**).

Tabla 3. Preparación de las disoluciones estándar de cinc

Concentración de la disolución patrón de cinc: 20,6 ppm		
Volumen de la disolución patrón a diluir (mL)	Volumen final de las disoluciones (mL)	Concentración final de Zn ²⁺ (mg/L)
3	50	1,24
5	50	2,06
10	50	4,12
15	50	6,18
20	50	8,24
25	50	10,30
30	50	12,36

Soluciones estándar de mercurio. La disolución patrón de 20 ppm fue preparada por disolución de 13,60 g de cloruro de mercurio (II) en 50 mL de una disolución de ácido nítrico 1M, se enrasó con agua ultrapura en una fiola de 0,5 L. Las disoluciones estándar se prepararon por dilución de 1 mL, 3 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL, 20 mL, 25 mL y 30 mL de la solución patrón. Las concentraciones fueron las siguientes: 0,4 ppm; 1,2 ppm; 2,0 ppm; 4,0 ppm; 6,0 ppm; 8,0 ppm; 10,0 ppm; 12,0 ppm (**Tabla 4**).

Tabla 4. Preparación de las disoluciones estándar de mercurio

Concentración de la disolución patrón de mercurio: 20 ppm		
Volumen de la disolución patrón a diluir (mL)	Volumen final de las disoluciones (mL)	Concentración final de Hg ²⁺ (mg/L)
1	50	0,4
3	50	1,2
5	50	2,0
10	50	4,0
15	50	6,0
20	50	8,0
25	50	10,0
30	50	12,0

Buffer fosfato (pH=5) (Christian, 1986). La disolución de 200 mL se preparó por disolución de 5,168 g de KH₂PO₄ y 0,0858 g de Na₂HPO₄ en agua ultra pura y se enrasó hasta alcanzar el volumen final.

Buffer McIlvaine (pH=5) (McIlvaine, 1921). Se mezcló 51,5 mL de fosfato ácido de sodio Na₂HPO₄ 0,2M y 48,5 mL de ácido cítrico 0,1M, C₆H₈O₇.

Buffer ftalato (pH=5) (Science Teachers' Association). La disolución de 1 L se preparó por disolución de 10,21 g de ftalato ácido de potasio, KHC₈H₄O₄, en 226 mL de hidróxido de sodio 0,1 M y se enrasó hasta completar el volumen final.

Buffer A: HCl-KCl (pH=2). Se mezcló 50 mL de cloruro de potasio 0,2 M y 13 mL de ácido clorhídrico 0,2 M, esta mezcla se enrasó a 200 mL con agua ultra pura.

Buffer B: fosfato (pH=2) (Christian, 1986). Se preparó al disolver 5,440 g de KH₂PO₄ en agua ultra pura y se mezcló con 0,5 mL de ácido fosfórico H₃PO₄ al 85%. La mezcla se enrasó a 200 mL.

Tritón X-100 5% v/v (pH=5)/buffer fosfato. La disolución de 100 mL se preparó por dilución de 5 mL de Tritón® X-100 en el buffer fosfato de pH 5. Se enrasó con dicho buffer hasta completar el volumen final. De forma similar, se utilizaron las otras disoluciones buffer para preparar las disoluciones del surfactante amortiguadas a pH 5 y 2. A manera

de ejemplo, en la **Figura 19** se muestra la forma de preparación de las disoluciones utilizadas en la determinación de los ditizonatos de cinc.

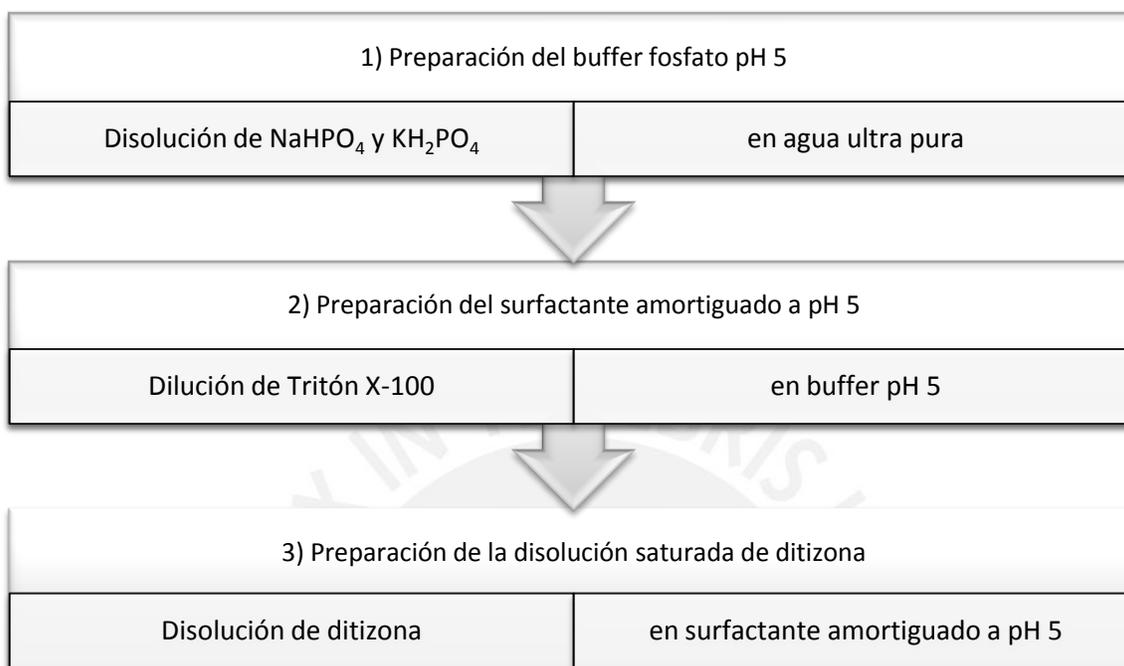


Figura 19. Procedimiento de preparación de las disoluciones utilizadas en la determinación de los ditizonatos de cinc y mercurio.

Tritón X-100 5% v/v (pH=5)/buffer McIlvaine. La disolución de 100 mL se preparó por dilución de 5 mL de Tritón X-100 en el buffer McIlvaine de pH 5 y se enrasó con dicho mismo buffer hasta completar el volumen final.

Tritón X-100 5% v/v (pH=5)/buffer ftalato. La disolución de 100 mL se preparó por dilución de 5 mL de Tritón X-100 en el buffer ftalato de pH 5 y se enrasó con dicho buffer hasta completar el volumen final.

Tritón X-100 5% v/v (pH=2)/buffer A. La disolución de 100 mL se preparó por dilución de 5 mL de Tritón X-100 en el buffer A y se enrasó con dicho buffer hasta completar el volumen final.

Tritón X-100 5% v/v (pH=2)/buffer B. La disolución de 100 mL se preparó por dilución de 5 mL de Tritón X-100 en el buffer B y se enrasó con dicho buffer hasta completar volumen final.

Disolución saturada de ditizona. Se preparó una disolución fresca de ditizona para cada ensayo. La disolución de 100 mL se preparó al disolver 25,0 mg de ditizona, $C_{13}H_{12}N_4S$, en la disolución de Tritón 5% preparada previamente. Con ayuda de un agitador magnético, se agitó por 20 minutos y filtró con papel Whatman® N° 42 para remover el sólido no disuelto.

3.3 Desarrollo de la metodología

La metodología empleada para el desarrollo, la optimización y la validación de los dos métodos espectrofotométricos estudiados fue similar. El método para determinar cinc sirvió como modelo para el desarrollo del método para la detección de mercurio. A continuación, se describen las etapas de desarrollo, optimización, validación y posterior aplicación del método a una muestra acuosa.

3.3.1 Determinación de cinc

Inicialmente se utilizaron las condiciones de preparación del complejo metálico según fue descrito por Williams y Paradkar (1994). Posteriormente, se modificaron algunos parámetros en la búsqueda de la optimización de las condiciones de trabajo reales.

3.3.1.1 Ensayos preliminares

Para el desarrollo del método con la ditizona se trabajó primero en la correcta formación del complejo metálico. Para ello, se prepararon disoluciones del complejo metálico con la finalidad de determinar la longitud de onda experimental de mayor absorbancia. Se emplearon las disoluciones estándar de cinc (1,24 - 12,36 ppm) para preparar los complejos.

La preparación de los complejos se realizó como se detalla a continuación. En una fiola de 10 mL se agregó 1 mL de las disoluciones del ion metálico y 7 mL de la disolución de ditizona saturada, solubilizada en el surfactante Tritón X-100 al 5%. Estas fiolas se enrasaron con la disolución de Tritón X-100 al 5%. Se analizaron las disoluciones de los

complejos formados frente a un blanco preparado con igual cantidad de ditizona y tritón (**Tabla 5**).

Tabla 5. Preparación de los complejos de cinc y ditizona solubilizados en medio micelar amortiguados a pH 5. Volumen final: 10 mL

Nombre	Alícuota de ditizona solubilizada en medio micelar (mL)	Zn ²⁺ , ppm, de cada alícuota metálica (Volumen alícuota = 1 mL)	Zn ²⁺ en fiola 10 mL (ppm)
Blanco del método	7,0	-	-
1-complejo Zn(HDtz) ₂ /triton pH 5	7,0	1,24	0,1
2-complejo Zn(HDtz) ₂ /triton pH 5	7,0	2,06	0,2
3-complejo Zn(HDtz) ₂ /triton pH 5	7,0	4,12	0,4
4-complejo Zn(HDtz) ₂ /triton pH 5	7,0	6,18	0,6
5-complejo Zn(HDtz) ₂ /triton pH 5	7,0	8,24	0,8

Una vez conocida la longitud de onda a la cual se producía la máxima absorbancia del complejo de cinc, se procedió a optimizar las variables químicas que influían en la formación de los complejos de cinc. Tanto el control del pH del medio amortiguado mediante la elección adecuada de una disolución buffer, como la cantidad de ditizona agregada fueron las variables estudiadas.

Regulación del pH - elección del buffer

Se prepararon tres disoluciones amortiguadoras denominadas buffer fosfato, ftalato y McIlvaine. Cada serie de ensayos comprendía la preparación de cinco disoluciones que contenían al complejo de cinc en concentraciones diferentes (ver **Tabla 6**). El parámetro que varió en cada serie de ensayos fue el solvente con el que se preparó la disolución del surfactante. Los tres buffers de pH 5, preparados según la sección **3.2**, sirvieron como solvente para la preparación de tres diferentes disoluciones de Tritón al 5% (el procedimiento para la preparación de las disoluciones del surfactante fue mostrado en la **Figura 19**).

Tabla 6. Preparación de los complejos de cinc y ditizona solubilizados en medio micelar amortiguados con el buffer fosfato a pH 5. Volumen final: 10 mL

Nombre	Alicuota de ditizona solubilizada en medio micelar (mL)	Zn ²⁺ , ppm, de cada alicuota metálica (Volumen alicuota = 1 mL)	Zn ²⁺ en fiola 10 mL (ppm)
Blanco del método	7,0	-	-
1-complejo Zn(HDtz) ₂ /triton buffer fosfato pH 5	7,0	1,24	0,1
2-complejo Zn(HDtz) ₂ /triton buffer fosfato pH 5	7,0	2,06	0,2
3-complejo Zn(HDtz) ₂ /triton buffer fosfato pH 5	7,0	4,12	0,4
4-complejo Zn(HDtz) ₂ /triton buffer fosfato pH 5	7,0	6,18	0,6
5-complejo Zn(HDtz) ₂ /triton buffer fosfato pH 5	7,0	8,24	0,8

Los complejos de cinc se prepararon en fiolas de 10 mL, mediante la mezcla de 1 mL del ion metálico en un rango de concentraciones de 0,124 a 0,824 ppm. A estas se les agregó igual cantidad de ditizona y se enrasaron con la disolución del surfactante hasta completar el volumen final (**Tabla 6**). Se elaboraron las curvas de calibración para cada ensayo y se seleccionó aquella donde la relación entre la señal analítica (absorbancia a la longitud de onda característica) y la concentración del ion metálico seguía siendo lineal.

Cantidad óptima de ditizona

Una vez seleccionado el buffer apropiado para la reacción entre la ditizona y el ion metálico, se varió la cantidad de disolución de ditizona saturada agregada a cada serie de pruebas de calibración. Se preparó cinco disoluciones con ditizonato de cinc en un rango de concentraciones de 0,124 a 0,824 ppm. La cantidad de ditizona agregada en cada serie de ensayos fue la siguiente: 3, 5 y 7 mL; el volumen final fue 10 mL, con la adición de la disolución del surfactante. De igual manera, se evaluó la conservación de la linealidad en dicho rango de trabajo.

3.3.1.2 Validación del método

Una vez realizados los ensayos preliminares, se procedió a la validación del método analítico desarrollado. Este es un procedimiento que asegura la confiabilidad de los resultados obtenidos mediante el método analítico implementado. Se logra con una serie de estudios en el laboratorio, en los cuales se evalúan las características representativas del mismo para verificar si cumple con las especificaciones para las que ha sido elaborado.

En este sentido, se deben definir los parámetros de validación que aseguren la correcta respuesta del método al problema analítico. Para el presente estudio, se establece la precisión, la veracidad, la linealidad, los límites de detección, de cuantificación e incertidumbre.

Límite de detección (LDD) y de cuantificación (LDC)

El límite de detección es la medición más pequeña que puede ser detectada con certeza razonable para un proceso analítico dado (M. Nic, 2009). En cambio, el límite de cuantificación es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel de aceptable de precisión de repetitividad y de veracidad.

En consideración a lo anterior, se prepararon 10 disoluciones del blanco del método, independientes una de la otra. Estas fueron analizadas según el método establecido para detectar cinc. Se midieron una vez cada una, se calculó el promedio, \bar{x}_{bl} , y la desviación estándar, s_{bl} , del grupo de medidas. Se repitió el ensayo y se obtuvo el promedio de los valores para determinar el LDD y LDC.

La preparación de los blancos del método se realizó con la medida óptima de ditizona determinada en los ensayos preliminares y las disoluciones fueron enrasadas con el surfactante hasta un volumen final de 10 mL. Finalmente, el cálculo de los límites de detección y cuantificación se obtuvo mediante la aplicación de las siguientes ecuaciones (IUPAC Goldbook, 1997):

$$LDD: x_L = \bar{x}_{bl} + k s_{bl}$$

Ecuación 2

$$LDC = \bar{x}_{bl} + 10 s_{bl}$$

Ecuación 3

donde:

\bar{x}_{bl} : es la media de las mediciones del blanco, valor positivo o cero.

s_{bl} : es la desviación estándar de las mediciones del blanco.

k : es un factor numérico elegido de acuerdo al nivel de confianza.

Es usual aproximar el valor de $k = 3$ para un intervalo de confianza al 99%.

Rango de linealidad

Para evaluar el rango de trabajo en el que es aplicable la ley de Beer-Lambert, se prepararon los complejos metálicos en las que se variaba la concentración final del ion metálico. Se realizaron siete disoluciones, donde el rango de concentraciones del complejo metálico fue de 0,124 ppm a 1,24 ppm. A partir de los datos obtenidos se determinó la concentración del ion metálico más elevada para la cual la relación entre la absorción y la cantidad de metal se mantenía lineal.

Precisión

La precisión se refiere a la distribución de los valores obtenidos de mediciones repetidas alrededor de un valor. La precisión es mayor cuanto menor sea la dispersión de los valores obtenidos. Generalmente, se expresa matemáticamente como el coeficiente de variación o la desviación estándar relativa, DER, esta es 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.

$$\%DER = \frac{s}{\bar{x}} * 100\%$$

Ecuación 4

Para medir la precisión del método se trabajaron dos muestras que contenían cinco cuyas concentraciones se encontraban dentro del rango de trabajo. Las concentraciones de estas disoluciones S1A y S2A fueron 0,30 y 0,25 ppm, fueron preparadas a partir de la

solución madre certificada. Cada disolución se utilizó para preparar los complejos metálicos por cuadruplicado. Se midieron una vez cada una, se calculó el promedio, \bar{x} , y la desviación estándar, s , del grupo de medidas. Se repitieron los ensayos en tres fechas diferentes.

Veracidad

La veracidad indica cuán cerca se encuentra el valor promedio medido de una serie de resultados de prueba de un valor de referencia aceptado, conocido comúnmente como valor verdadero. La medida de la veracidad se expresa por lo general en términos de sesgo, que es la diferencia entre el valor experimental y el verdadero. La veracidad es buena cuando la diferencia entre el valor medido y el de referencia es pequeña, es decir, cuando el sesgo es menor.

Para evaluar la veracidad se trabajó con las dos disoluciones de cinc rotuladas como S1A y S2A. Cada disolución se empleó para preparar los complejos metálicos por cuadruplicado y su evaluación según el método aquí desarrollado. Se midieron una vez cada una, se calculó el promedio, \bar{x} , y la desviación estándar, s , del grupo de medidas. De igual manera, se evaluaron dichas soluciones mediante absorción atómica. Para cada serie de resultados, se calculó el sesgo.

Test de t-Student para medias

Previamente a la aplicación del modelo para determinar la incertidumbre del método, se debe asegurar la trazabilidad y homogeneidad en las medias obtenidas a través del método analítico. Para ello se empleó la prueba estadística test de t-Student.

Incertidumbre

El resultado de la medición de una magnitud no corresponde a un solo valor, sino a un grupo de valores alrededor del resultado. La incertidumbre de una medición equivale a cuantificar la variabilidad de esa medida, de manera que sea posible apreciar la confiabilidad de los resultados. La incertidumbre se expresa como una desviación

estándar (incertidumbre estándar) o por un intervalo de confianza (incertidumbre expandida) en el cual estos valores pueden ser atribuidos a la magnitud que se mide.

El cálculo de la variabilidad de un método puede estimarse mediante diversos procedimientos. El método aplicado a este trabajo se basó en un análisis estadístico de una serie de mediciones. El modelo que sugiere la Asociación Canadiense para Laboratorios Ambientales y Analíticos (CAEAL, por sus siglas en inglés) consiste en calcular la incertidumbre estándar a partir de la contribución a la variabilidad de ciertos parámetros de desempeño del método como son la exactitud, la precisión y el sesgo (CAEAL Uncertainty Policy). Las expresiones matemáticas fueron obtenidas de la “Guía para la expresión de la incertidumbre en la medición” del Comité para las guías de metrología (JCGM, por sus siglas en inglés).

La evaluación de la incertidumbre estándar combinada, μ_{DE} , se calcula a partir de la siguiente expresión:

$$\mu_{DE} = \sqrt{\mu_{precisión}^2 + \mu_{veracidad}^2 + sesgo^2} \quad \text{Ecuación 5}$$

La incertidumbre de la precisión se calcula de la división de la desviación estándar de una serie de puntos en la curva, entre la raíz del valor de n , siendo n el número de réplicas por experimento. En este caso, el valor de n equivale a 4.

$$\mu_{precisión} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 6}$$

La incertidumbre de la veracidad se calcula como la raíz cuadrada de la suma de las varianzas de los 2 métodos comparados.

$$\mu_{veracidad} = \sqrt{s_{AAS}^2 + s_{UVVIS}^2} \quad \text{Ecuación 7}$$

Finalmente, la incertidumbre expandida se calcula a partir del valor anterior multiplicado por un factor de cobertura, k . El factor de cobertura para un nivel de confianza del 95% para tres grados de libertad es igual a 3,31.

$$U = \mu_{DE} * k$$

Ecuación 8

Sensibilidad

Es el cambio de respuesta del sistema de medición con respecto al cambio de estímulo; en este caso, con respecto al cambio de concentración del analito. Generalmente, se evalúa mediante la pendiente de la curva de calibración, si la respuesta es lineal con respecto a la concentración, entonces puede considerarse un parámetro útil para emplearse en la cuantificación del analito.

3.3.2 Determinación de mercurio

La implementación del método para detectar mercurio siguió el modelo descrito para el cinc. Los parámetros evaluados se describen en la siguiente sección.

3.3.2.1 Ensayos preliminares

De la misma manera que con el complejo de cinc, se estudió la correcta formación del complejo mercuríco. Se obtuvo los espectros de absorción de los complejos frente a un blanco preparado con igual cantidad de ditizona y tritón. Luego de identificar la longitud de onda de máxima absorción se procedió a optimizar el control del pH mediante el uso de una disolución buffer.

Regulación del pH - elección del buffer

El valor del pH del complejo entre la ditizona y el mercurio (Paradkar, Williams, & Ron, 1994) es igual a 2. Para el control del pH de la reacción, se prepararon dos disoluciones amortiguadoras, denominadas buffer A y B, por el método descrito en la sección 2.2. Cada una fue utilizada como solvente del surfactante para la elaboración de dos disoluciones micelares independientes de Tritón al 5%. A su vez, estas se utilizaron en los ensayos de preparación de los complejos de mercurio.

Todos los ensayos fueron ejecutados empleando la mezcla de 1 mL del ion metálico en un rango de concentraciones de 0,12 a 1,2 mg.L⁻¹; se les agregó igual

cantidad de ditizona y se enrasó con la disolución del surfactante, siempre en un volumen final de 10 mL. Se elaboró las curvas de calibración para ambos casos y se seleccionó aquella donde la relación entre la señal analítica y la concentración del ion metálico seguía siendo lineal.

3.3.2.2 Validación del método

Para la validación del método aplicado al mercurio se evaluó los siguientes parámetros: precisión, veracidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación e incertidumbre. El procedimiento de evaluación fue similar al mostrado en el acápite 3.3.1.2 para el cinc.

Para evaluar el rango de linealidad se preparó soluciones en el rango de trabajo comprendido entre 0,12 y 1,2 ppm. Para la evaluación de la veracidad se preparó tres disoluciones metálicas a partir de la disolución madre certificada, sus concentraciones fueron 2, 4 y 10 ppm. Estas disoluciones fueron también analizadas mediante absorción atómica (Instituto de Corrosión y Protección de la PUCP). Estos resultados fueron comparados con los obtenidos por el presente método y se utilizaron para calcular el sesgo y realizar el test de t.

3.4 Aplicación del método a muestras reales

3.4.1 Cinc

Para la aplicación del método de determinación de cinc se trabajó con cinco muestras. La muestra 1 fue un comprimido farmacéutico de la marca GNC adquirido en el mercado local (lote N° 3419GH2539, fecha de expiración: 08/11), un suplemento nutricional para mejorar la función inmunológica del cuerpo. La muestra 2 fue agua potable obtenida del grifo del Laboratorio 2 de Investigación de la Sección Química (tomada el 18 de abril del 2011). Las muestras 3, 4 y 5 fueron una porción de suelo obtenido de los jardines de la universidad.

La **Figura 20** muestra la etiqueta del suplemento nutricional. Cada tableta contiene 50 mg de gluconato de cinc, $(C_6H_{11}O_7)_2Zn$. Por lo tanto, la cantidad estequiométrica de

cinc, Zn^{2+} , en cada tableta es de 7,17 mg. Para el análisis de la muestra, se utilizó una tableta, se pesó en la balanza analítica, con ayuda de un mortero y pilón se le trituró y molió. El peso registrado de la tableta antes de ser triturada fue de 0,4815 g.

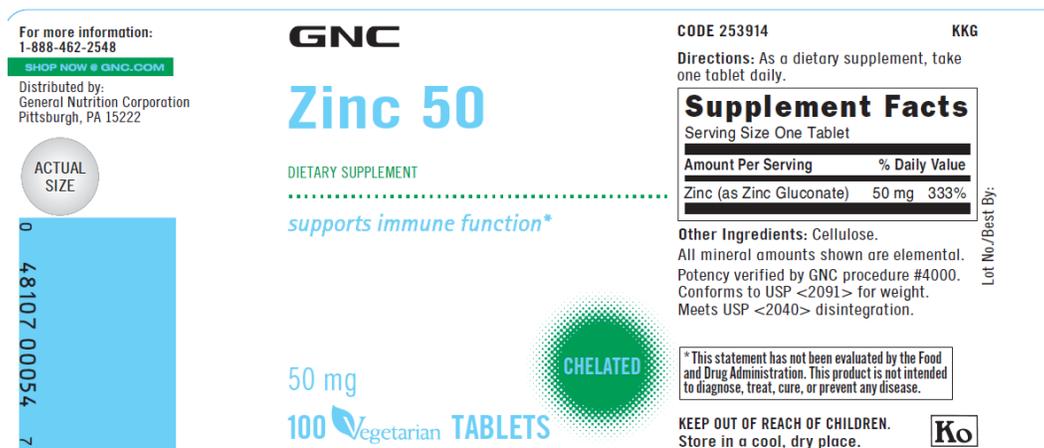


Figura 20. Etiqueta del suplemento nutricional de cinc. Muestra M1

La muestra 1 se preparó de la siguiente manera. Se pesó 0,024 g del polvo de la pastilla, se disolvió en agua ultra pura, se le agregó unas gotas de HCl 0,1 M, para mejorar la solubilidad, y se enrasó a un volumen de 100 mL. Esta muestra se analizó con el método propuesto y con AAS según las especificaciones del manual del equipo de absorción atómica. Teóricamente, la disolución preparada tenía una concentración de Zn^{2+} de 3,58 mg/L.

La muestra 2 fue agua potable del grifo del Laboratorio 2 de la Sección Química. El agua se colectó en una botella de plástico de 500 mL con tapa. Se abrió el caño, se dejó correr el agua por unos dos minutos y luego, sin cortar el flujo, se enjuagó la botella 3 veces con esta agua; finalmente, se llenó la botella y se cerró. La muestra fue analizada el mismo día mediante el método propuesto y mediante AAS.

La muestra 3 fue recogida del jardín de la Sección Física de la universidad el día 16 de marzo del 2011 a las 9 am. El jardín se encontraba seco, según información del personal de jardines de la PUCP, el regado se había realizado el día 14 del mismo mes. Se utilizó una bolsa de plástico hermética nueva y limpia para realizar la recolección. La superficie del terreno del lugar se limpió de hojas, residuos orgánicos y restos de plantas.

De manera similar se eligió otros dos puntos dentro de la universidad, el jardín frente a la Cafetería Central y la Sección de Ingeniería Electrónica, muestras 4 y 5 respectivamente.



Figura 21. Área de la toma de muestra. Jardín de la Sección Física de la PUCP. Muestra M3



Figura 22. Acercamiento al área de muestreo M3



Figura 23. Área de la toma de muestra. Jardín frente a la Cafetería Central. Muestra M4



Figura 24. Acercamiento al área de muestreo M4



Figura 25. Área de la toma de muestra. Sección Ingeniería Electrónica. Muestra M5



Figura 26. Acercamiento al área de muestreo M5

En los tres casos, muestras 3, 4 y 5, se retiró una porción de suelo a una profundidad de 1 a 2 centímetros. La muestra fue depositada directamente en la bolsa de plástico y se llevó al laboratorio. Cada una se colocó en una placa petri de unos 15 cm de diámetro y 2 cm de altura, y se dejó secar al aire. Posteriormente, las partículas grandes fueron trituradas en un mortero y se utilizó un tamiz de bronce ASTM N° 100 para homogeneizarlas (**Figura 27** y **Figura 28**). Las muestras fueron conservadas en el desecador hasta el día siguiente para el proceso de digestión de las mismas, tapadas con otra placa petri (**Figura 29**).



Figura 27. Tamizador ASTM



Figura 28. Proceso de tamización de la muestra de suelo



Figura 29. Muestra de suelo después de triturada y tamizada

El proceso de digestión se realizó como se detalla a continuación. Se pesó 2,0 g de cada muestra de suelos en un matraz de 250 mL de vidrio y se le agregó 10 mL de una mezcla de $\text{HCl}_{(\text{cc})}/\text{HNO}_{3(\text{cc})}$ (3:1). Se tapó y se calentó la mezcla con ayuda de una placa calefactora durante 2 horas a una temperatura aproximadamente de 100 °C. Los residuos no disueltos fueron filtrados con papel Whatman #42. El filtrado se enrasó en una fiola de 25 mL con agua ultra pura, a esta se le nombró M3, M4 y M5 según correspondía. Las disoluciones formadas tenían una coloración amarilla.

Las disoluciones preparadas fueron analizadas mediante el método aquí desarrollado y con AAS. Algunas dificultades durante la detección de cinc, mediante este método, ocasionaron la repetición del análisis. En consecuencia, se realizó tres diferentes ensayos para cada caso. En el primer ensayo se tomó alícuotas de 1 mL directamente de la fiola M3 y se le hizo reaccionar. En el segundo ensayo, realizado en otra fecha, se tomó una alícuota de 3 mL, de M3, y se neutralizó con NaOH, se formó un precipitado naranja pardo. Después de filtrarlo se enrasó con agua ultra pura en una fiola de 10 mL, se le nombró M3-2. En el tercer ensayo se tomó una alícuota de 3 mL, y se diluyó con agua ultra pura hasta enrasar en una fiola de 10 mL, se le nombró M3-3. Para las muestras M4 y M5 se repitió los ensayos mencionados.

En los tres diferentes ensayos realizados con la muestras 3, 4 y 5, se preparó los complejos, según el procedimiento aquí desarrollado. En cada ensayo, la preparación de los complejos de cinc se realizó con cuatro réplicas.

3.4.2 Mercurio

Para la aplicación del método de determinación de mercurio se trabajó con una muestra del laboratorio. La muestra elegida fue un recipiente de residuos inorgánicos de mercurio. El análisis se realizó mediante el método propuesto y mediante CV-AAS. El análisis de absorción atómica fue realizado en el Instituto de Corrosión y Protección de la Pontificia Universidad Católica del Perú (Método de análisis: ICP-Lab 3.34, Método para la determinación de mercurio total en aguas mediante la técnica de vapor frío, basado en la norma EPA Método 245.1. “Determinación de mercurio en aguas mediante espectroscopía de absorción atómica con vapor frío.” (1994) Rev.3.0).

La muestra de mercurio se preparó de la siguiente manera. Se pesó 25 mg de una sal de mercurio de composición desconocida. Esta se disolvió en unos mililitros de una mezcla de $\text{HCl}_{(cc)}/\text{HNO}_{3(cc)}$ (3:1) hasta disolución completa. Luego se enrasó con agua ultra pura hasta un volumen de 50 mL. Luego, esta disolución se diluyó a razón de 1:100 para ser analizada mediante el método propuesto. Esta disolución fue llevada al Instituto de Corrosión y Protección para su análisis.

Las muestras sólidas recolectadas de los jardines de la PUCP no fueron empleadas para la aplicación de método a la cuantificación de mercurio, puesto que se presume que en estas no puede haber presencia del analito, debido a que no hay una potencial fuente de contaminación en la universidad.

3.5 Tratamiento de los residuos

La disposición de los residuos químicos generados durante la implementación del método analítico en el laboratorio de investigación se realizó según su grado de peligrosidad. Para comenzar, se revisó las hojas de seguridad de los reactivos empleados y en base a esta información se tomó las medidas de seguridad respectivas. Las acciones realizadas se detallan a continuación.

Los residuos líquidos fueron de dos tipos, acuosos y micelares, y en ambos casos, se evitó mezclar los residuos con mercurio con las demás sustancias. En este sentido, las soluciones acuosas de calibración de mercurio fueron almacenadas en recipientes de vidrio ámbar con tapa hermética y colocadas en un ambiente oscuro y cerrado.

Por otro lado, las soluciones acuosas de calibración de cinc fueron concentradas y luego basificadas ligeramente para precipitar el hidróxido. A continuación, se neutralizó las soluciones para eliminarlas como soluciones salinas de pH neutro. El precipitado recuperado se dejó secar en un desecador y luego se descartó como residuo sólido.

Los residuos micelares de complejos de cinc y ditizona fueron depositados en recipientes de vidrio ámbar con tapa hermética y debidamente rotulados. De igual manera, la disposición de los residuos micelares de mercurio se almacenaron en recipientes ámbar con tapa hermética.

Los residuos sólidos no peligrosos, como guantes, papel toalla, papel filtro y puntas de la micro-pipeta fueron dispuestos en bolsas negras plásticas rotuladas debidamente. De igual forma, el material de vidrio quebrado durante los ensayos se dispuso en un contenedor para vidrio roto.

Finalmente, las bolsas negras rotuladas y los envases de vidrio de los residuos sólidos y líquidos respectivamente fueron entregadas al responsable del almacén de la Sección Química para su disposición final, con la finalidad de que sea entregado a la entidad correspondiente a fines de año.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Cinc

4.1.1 Ensayos preliminares

Se encontró que el ditizonato de cinc absorbe a 522 nm (**Figura 30**), por lo que en adelante, las curvas de calibración de sus complejos fueron medidas a esta longitud de onda.

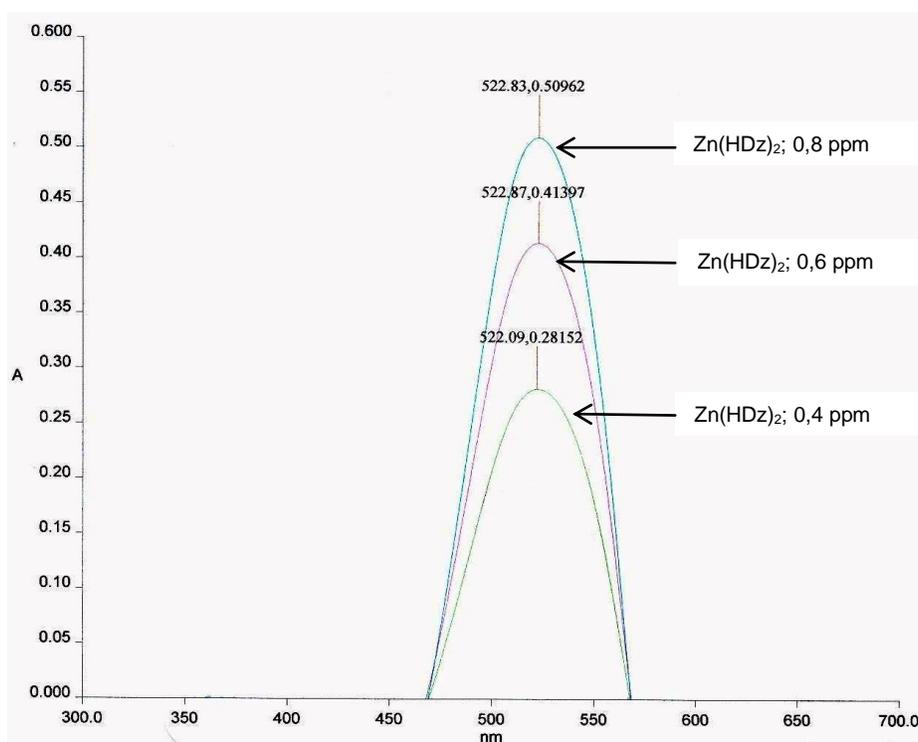


Figura 30. Espectro de absorción del complejo Zn(HDz)₂.

Efecto de la disolución amortiguadora

La primera fase del desarrollo de la metodología tuvo como objetivo la elección de una disolución buffer que regule el pH de la reacción sin interferir con el desarrollo de la misma y cuyos resultados fuesen reproducibles durante la aplicación del método.

Para demostrar que los buffers empleados no intervenían en la reacción entre la ditizona y el cinc se tabuló las absorbancias versus concentración de Zn^{2+} y se trazó las curvas de calibración. Sobre los puntos tabulados se trazó una recta de regresión de “Y” sobre “X”. El trazo de esta recta supone siempre que los errores residen en los valores de “Y”, absorbancia, y que las concentraciones de los patrones se encuentran libres de error. En cada gráfica, se incluye también su correspondiente ecuación de regresión y sus coeficientes de correlación, R.

Los puntos tabulados, cuando se emplea el buffer fosfato, se ajustan a una línea recta (**Figura 31**), el coeficiente de correlación estadísticamente significativo, R, es igual a 0,9993 ($p < 0,01$). En otras palabras, la absorbancia varía en forma lineal cuando las concentraciones se ajustan a los valores indicados, cuando se emplea el buffer fosfato como sistema amortiguador del pH de la reacción.

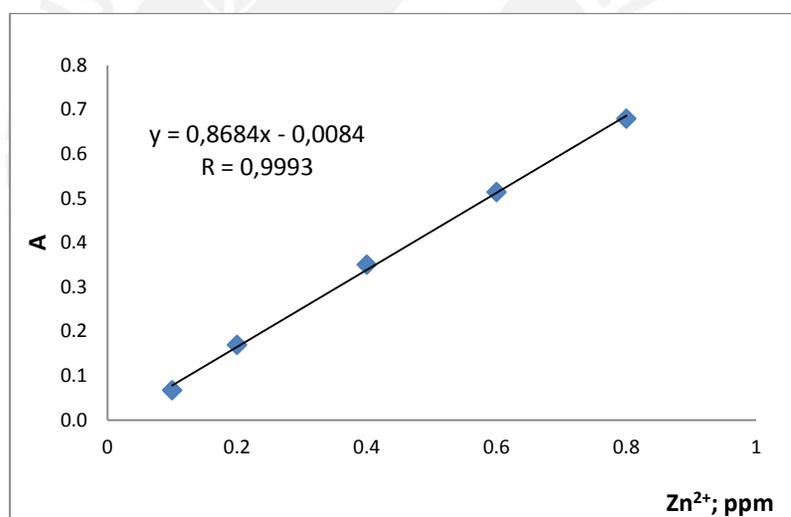


Figura 31. Curva de calibración de los complejos metálicos amortiguados en buffer fosfato.

Por otro lado, en **Figura 32** y **Figura 33**, se aprecia que los puntos experimentales tabulados no se ajustan a una recta. En efecto, los coeficientes de correlación, en ambos casos, son menores al obtenido en la primera curva, estos son 0,9968 y 0,9953 respectivamente ($p < 0,01$). En este sentido, las condiciones de preparación de los complejos de ditizona y cinc, cuando el pH del medio se regula con el buffer ftalato y McIlvaine, no son las adecuadas para que la absorbancia varíe linealmente cuando la concentración del cinc aumenta.

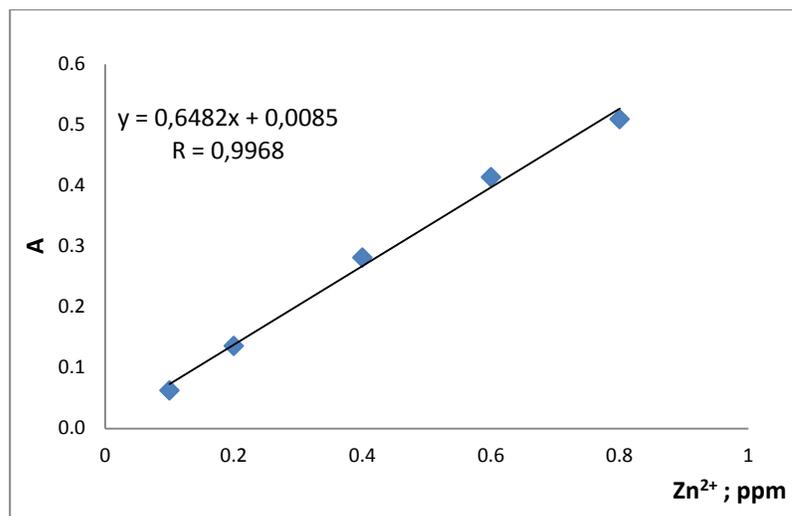


Figura 32. Curva de calibración de los complejos metálicos amortiguados en buffer Mcllvaine

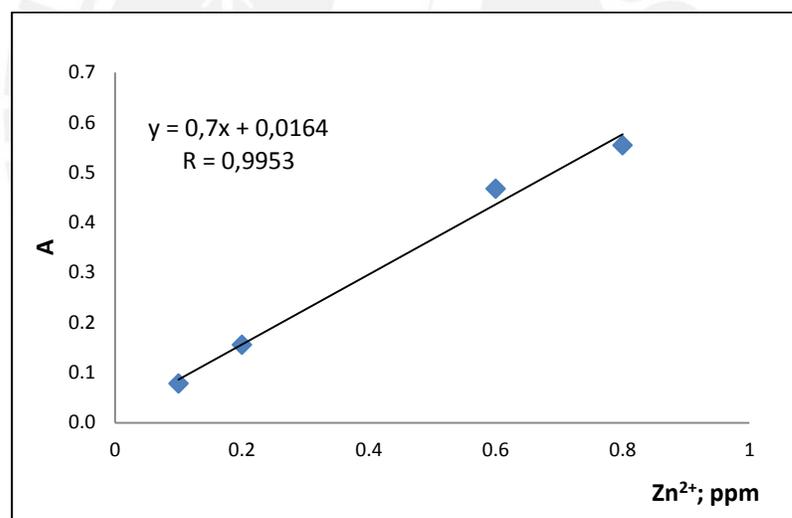


Figura 33. Curva de calibración de los complejos metálicos amortiguados en buffer ftalato

Los resultados mostrados en la **Tabla 7** muestran, en la mayoría de los casos, absorbancias mayores cuando se empleó el buffer fosfato en la reacción. La disminución de la absorbancia de los ditizonatos de cinc cuando se emplearon los otros buffers podría estar relacionada con la estructura de las especies que conforman dichos sistemas amortiguadores. En efecto, los grupos carboxílicos en el ácido cítrico y en el ftalato ácido

de potasio pueden acomplejar al metal. Para ver si esta afirmación es probable, se encontró las constantes de estabilidad de dichos complejos.

Tabla 7. Absorción de los complejos metálicos en diferentes medios amortiguadores

Zn ²⁺ ; mg/L	Absortividad		
	Buffer fosfato	Buffer McIlvaine	Buffer ftalato
0,1	0,06758	0,06255	0,07822
0,2	0,16969	0,13594	0,15564
0,4	0,35058	0,28152	-
0,6	0,51414	0,41397	0,46745
0,8	0,67962	0,50962	0,55440
Ecuación regresión	$y = 0,8684x - 0,0084$	$y = 0,6482x + 0,0085$	$y = 0,7x + 0,0164$
R	0,9993	0,9968	0,9953

El buffer McIlvaine está compuesto por ácido cítrico y fosfato ácido de disódico. La formación de quelatos ácido cítrico - cinc tiene una constante de estabilidad igual a $5,12 \times 10^4$ (Walco, 1997). El buffer ftalato está compuesto por el ftalato ácido de potasio y su base conjugada, $\text{HC}_8\text{H}_4\text{O}_4^- / \text{C}_8\text{H}_4\text{O}_4^{2-}$; ambas especies en equilibrio. La literatura reporta una constante de estabilidad del complejo ftalato de cinc, $[\text{ZnC}_8\text{H}_5\text{O}_4]^+$ igual a $3,98 \times 10^2$ (R.Singh, 1980). Termodinámicamente, la formación de los complejos entre el cinc y estas especies es posible, por lo que se cree que la formación del ditizonato de cinc se puede ver afectada en estos medios, dado que pueden ocurrir estas reacciones secundarias.

Sobre la base de estos resultados se eligió al buffer fosfato para amortiguar el medio de reacción entre la ditizona y el cinc a pH 5.

Cantidad óptima de ditizona

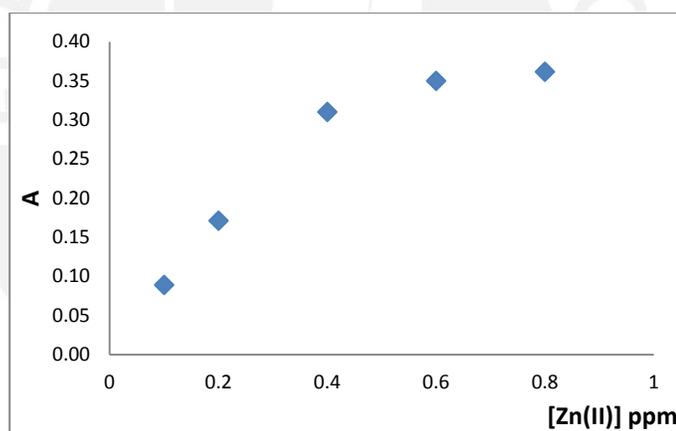
La **Tabla 8** muestra los valores de absorbancia de los complejos de cinc cuando se agregó 3, 5 y 7 mL de ditizona al medio de reacción. Con estos datos se elaboraron las curvas de calibración mostradas en **Figura 34**, **Figura 36** y **Figura 38** respectivamente.

Tabla 8. Absorbancia de los complejos metálicos según volumen de ditizona.

Zn ²⁺ ; mg/L	Absorbancia		
	Volumen agregado de la disolución saturada de ditizona		
	3 mL	5 mL	7 mL
0,1	0,0891	0,0676	0,0990
0,2	0,1712	0,1697	-
0,4	0,3103	0,3506	0,3542
0,6	0,3499	0,5141	0,5149
0,8	0,3617	0,6796	0,6802

(*) El volumen total de la mezcla fue 10 mL

Con los datos de la primera y segunda columnas de la **Tabla 8** se elaboró la curva de absorbancia versus concentración de cinc. La **Figura 34** muestra una tendencia lineal para bajas concentraciones del metal, pero cuando la concentración de cinc es mayor a 0,4 ppm se aprecia una desviación negativa de la ley de Beer-Lambert.


Figura 34. Complejos de Zn(HDz)₂ cuando volumen de ditizona es 3 mL

El espectro de absorción de los complejos de cinc se muestra en la **Figura 35**. Conforme aumenta la concentración del ion metálico no hay aumento de la absorbancia de los complejos ditizonato de cinc, por lo que la cantidad de ditizona presente en los 3 mL no es la suficiente para la formación del complejo.

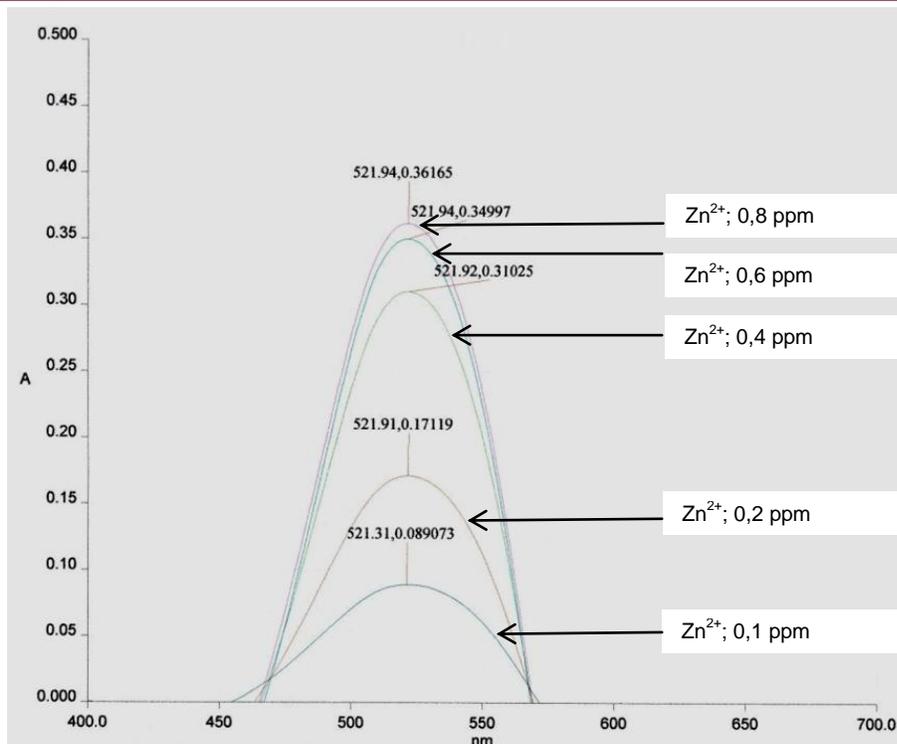


Figura 35. Absorbancia de los complejos de cinc cuando se agregó 3 mL de ditizona al medio de reacción

La gráfica de la **Figura 36** fue elaborada con los datos de la **Tabla 8**, se utilizó las columnas primera y tercera. A diferencia de la anterior, la linealidad se alcanza en todo el rango trabajado. Además el coeficiente de correlación estadísticamente significativo fue igual a 0,9993 ($p < 0,01$).

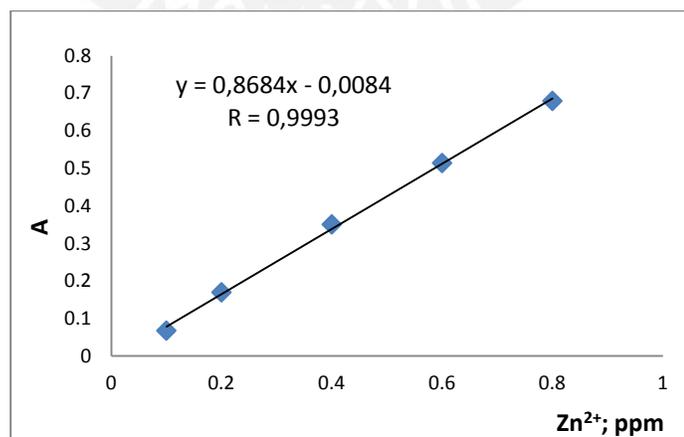


Figura 36. Complejos de Zn(HDz)₂ cuando el volumen de ditizona es 5 mL

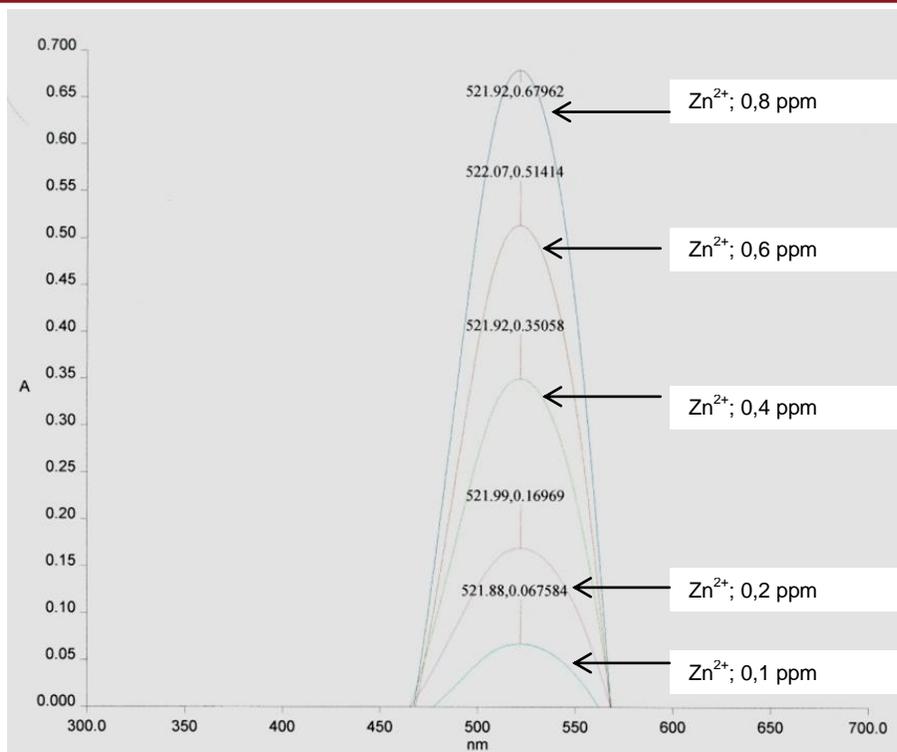


Figura 37. Absorción de los complejos de cinc cuando se agrega 5 mL de la disolución saturada de ditizona

A diferencia de los resultados observados en la **Figura 35**, en la **Figura 37** se observa que la formación de los complejos es proporcional al aumento de concentración del ion metálico agregado al medio de reacción, cuando la cantidad de ditizona se fija en 5 mL. Sobre la base de estos resultados, se concluye que este volumen de ditizona es el mínimo para que las moles de dicho reactivo se encuentren en relación estequiométrica con el ion metálico de 2:1.

De igual manera, se elaboró la **Figura 38** con los datos de la **Tabla 8**; en este caso se utilizó las columnas primera y última. Se observa que la ley de Beer-Lambert fue obedecida también dentro de este rango de trabajo. Además, se obtiene un coeficiente de correlación cercano a la unidad. Esto indica que las condiciones trabajadas en este ensayo son las apropiadas, y dan mejores resultados en el proceso de cuantificación del ion metálico.

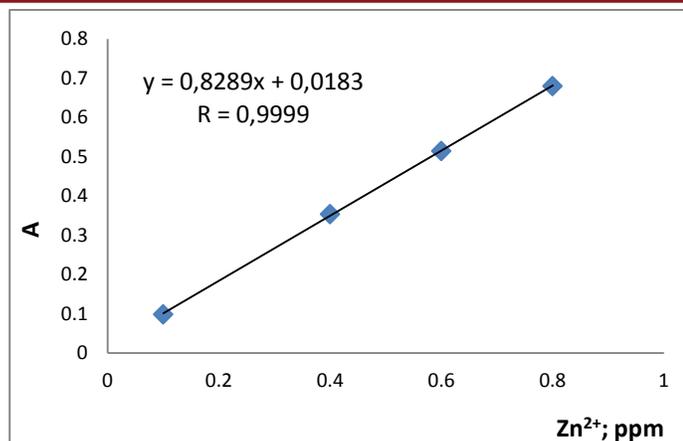


Figura 38. Complejos de $Zn(HDz)_2$ cuando el volumen de ditizona es 7 mL

De los resultados, se puede afirmar que la formación exitosa de los complejos metálicos se realizó cuando se agregaron 7 mL de la disolución saturada de ditizona (al trabajar con un volumen final de 10 mL), ya que al agregar 3 mL de la disolución de ditizona, la correlación, entre la concentración del complejo formado y la absorbancia del mismo, se perdía conforme aumentaba la concentración del ion metálico. Esto ocurre porque, a concentraciones altas de cinc, la cantidad de ditizona no se encuentra en la proporción estequiométrica adecuada, de 1:2 ($Zn(II)/H_2Dz$). (P. & Williams, 1994)

El resultado del incremento del volumen de la disolución de ditizona en la absorbancia de los complejos formados es que los puntos experimentales tabulados se ajustan mejor a una recta (**Figura 36** y **Figura 38**). Con un volumen de 5 mL de ditizona se alcanzó linealidad, y también al agregar 7 mL de ditizona. Según lo discutido, el volumen mínimo que se debe agregar de la disolución de ditizona saturada para acomplejar el metal es 5 mL, en dicho volumen se asume que están las moles necesarias para que la relación estequiométrica entre el ligando y el cinc sea de 2 a 1.

De la misma manera, el coeficiente de correlación, cuando se agrega 7 mL de la disolución de ditizona, es prácticamente 1. En este caso, las moles de ditizona son mayores a la del anterior ensayo y, según estos resultados, se puede concluir que el exceso de ditizona en el medio de reacción no interfiere negativamente en la formación del complejo, sino por el contrario, permite alcanzar una mejor linealidad ($R = 0,9999$, $p < 0,01$).

Sobre la base de estos resultados, se estableció que el volumen de la ditizona, para formar los complejos de cinc debía ser 7 mL para un volumen final de 10 mL. En adelante, fue así utilizado para la preparación de los ditizonatos de cinc en todos los experimentos.

Preparación de la disolución saturada de ditizona.

El procedimiento para la preparación de la disolución saturada de ditizona se detalló en la sección **3.2.2**. Dicho procedimiento se estableció luego de verificar que la cantidad de ditizona, en esa disolución saturada, fue siempre la misma luego de su preparación. Para asegurar que la cantidad de ditizona solubilizada fuese constante en cada análisis, se realizó una serie de ensayos adicionales donde se comprobó que la preparación de la disolución saturada era reproducible en todos los experimentos.

La preparación de la disolución saturada de ditizona consiste básicamente en la disolución de la misma en un volumen determinado de surfactante, se agita constantemente para ayudar al proceso de disolución e inmediatamente se filtra para remover los sólidos no disueltos. Es por esto que, se realizó ensayos donde se mantuvo constante la masa de ditizona agregada por cada 20 mL de surfactante, mientras el tiempo de agitación de la disolución se fijó, en un caso, en 10, y en el otro, en 20 minutos.

Finalmente, se obtuvo cuatro grupos de resultados que pueden ser observados en los espectros de las figuras **Figura 39 a 42**. Estos espectros muestran el perfil de la absorbancia de la ditizona en disolución, se tienen dos bandas de absorción debido a la presencia de las especies tautoméricas de la ditizona, mencionados en la sección **2.5**.

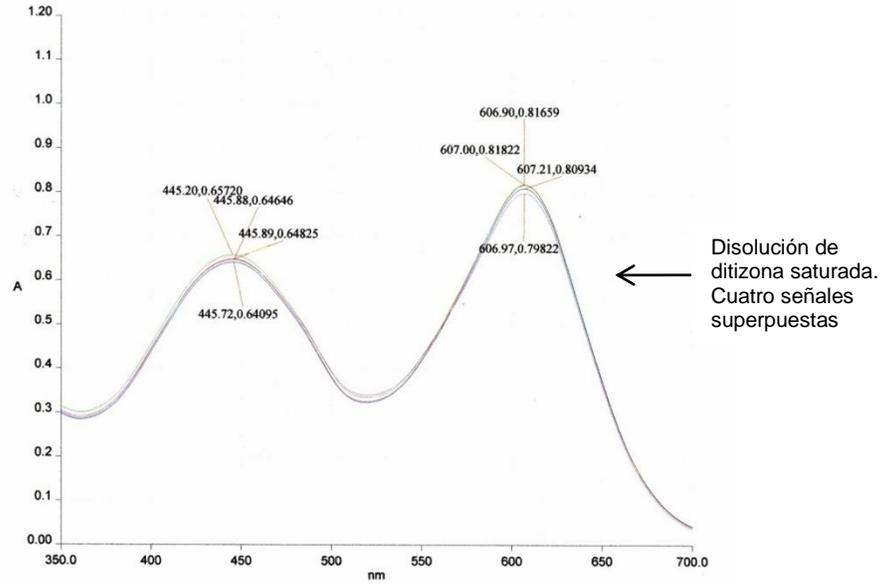


Figura 39. Bandas de absorbancia de las disoluciones de ditizona. Condiciones: masa disuelta de ditizona: 3 mg; tiempo de agitación: 10 minutos. Cuatro réplicas

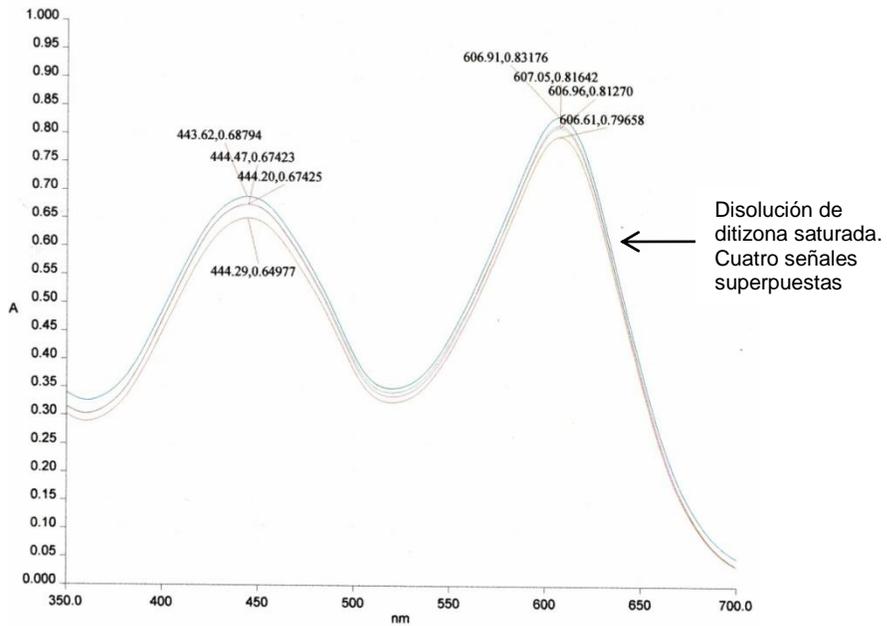


Figura 40. Bandas de absorbancia de las soluciones de ditizona. Condiciones: masa disuelta de ditizona: 3 mg; tiempo de agitación: 20 minutos. Cuatro réplicas

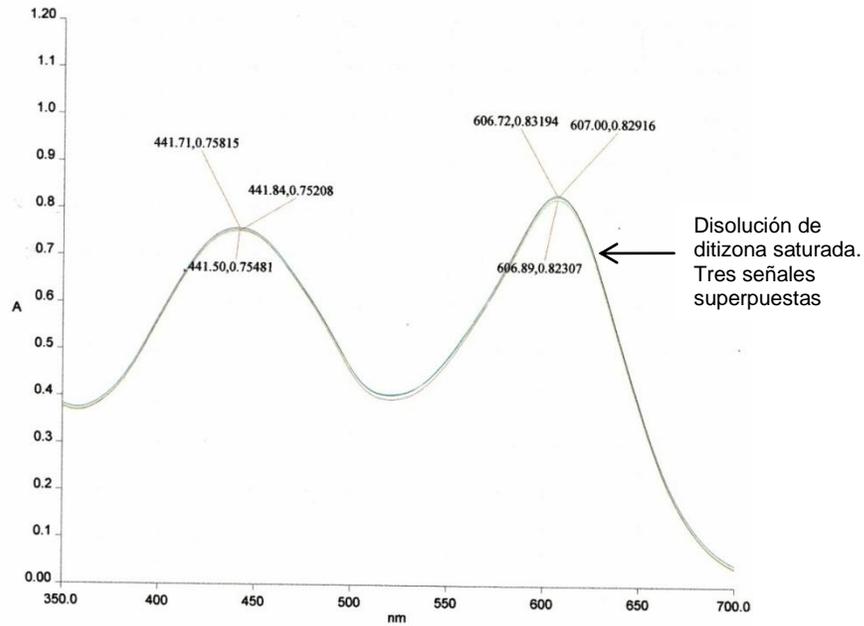


Figura 41. Bandas de absorbancia de las soluciones de ditizona. Condiciones: masa disuelta de ditizona: 5,0 mg; tiempo de agitación: 10 minutos. Tres réplicas

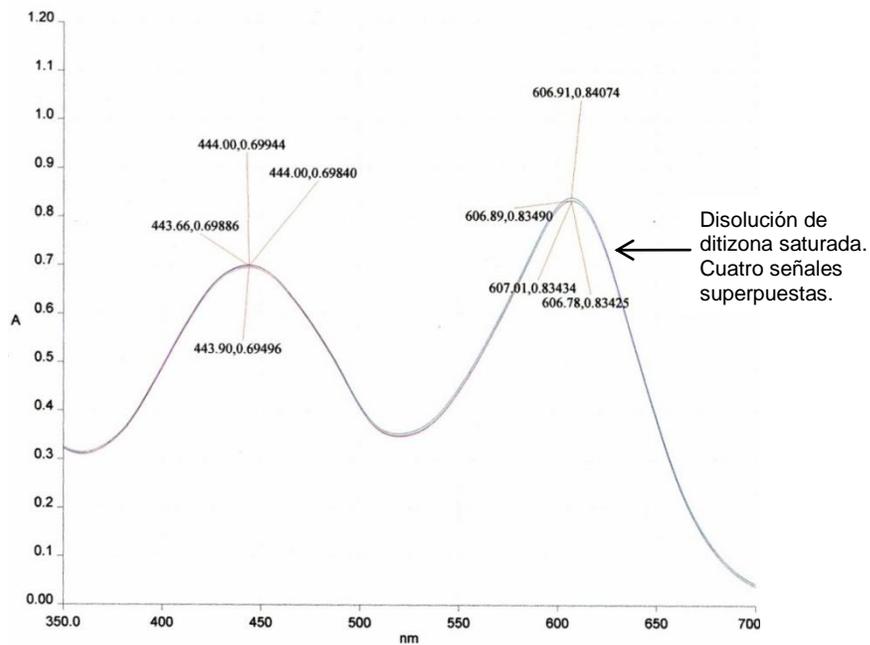


Figura 42. Bandas de absorbancia de las soluciones de ditizona. Condiciones: masa disuelta de ditizona: 5,0 mg; tiempo de agitación: 20 minutos. Cuatro réplicas

En estos espectros se aprecia que los valores de absorbancia cuando se disuelve 3 mg de ditizona por cada 20 mL de Tritón X-100 al 5% son similares luego de haber agitado la mezcla durante 10 ó 20 minutos (**Figura 39** y **Figura 40** respectivamente). De igual forma, la disolución de 5 mg de ditizona por cada 20 mL de Tritón X-100 obtuvo valores de absorbancia similares entre sí, luego de agitar durante 10 y 20 minutos, **Figura 41** y **Figura 42**.

Al comparar las absorbancias de las disoluciones que fueron agitadas durante 10 minutos, y dado que las moles de la ditizona son proporcionales a la absorbancia de las disoluciones correspondientes, se puede concluir que las moles solubilizadas cuando se agrega 3 ó 5 mg en 20 mL del surfactante son prácticamente las mismas. De igual forma, al agitar durante 20 minutos la mezcla, no se observan cambios significativos en las absorbancias, lo que indica que la cantidad de ditizona presente en las disoluciones preparadas de esa forma es igual.

La disolución de una cantidad mayor de ditizona y/o su agitación por un tiempo mayor no resulta en un aumento de la solubilidad de ditizona en el medio micelar, puesto que, bajo estas condiciones, las micelas se encuentran saturadas con este reactivo. Aparentemente, al agitar durante un mayor tiempo, 20 minutos, se tiene una mayor absorbancia (**Figura 39** versus **Figura 40**); sin embargo, esto se puede deber a un aumento en el ruido de fondo del instrumento o a un desplazamiento del equilibrio tautomérico hacia una de estas especies.

Adicionalmente, las moles de ditizona disuelta en el surfactante no dependen directamente del tiempo de agitación ni de la cantidad de ditizona que se agrega a un volumen determinado de Tritón X-100 al 5%, pues siempre se filtra el exceso de sólido no disuelto. Por el contrario, la cantidad de ditizona disuelta en el surfactante es proporcional a la concentración de las micelas del mismo (P. & Williams, 1994), por lo que la preparación de la disolución del surfactante también es un paso importante en el procedimiento del método.

Sobre la base de estos resultados se puede afirmar que, efectivamente, el surfactante Tritón X-100 al 5% solubiliza a la ditizona. La cantidad exacta solubilizada por las micelas del surfactante no se determinó experimentalmente, pero se ha demostrado

que, en los cuatro experimentos mencionados, la cantidad de ditizona disuelta es la misma y que esta depende solamente de la concentración del surfactante utilizado.

Finalmente, se estableció el procedimiento de la preparación de la disolución de la ditizona tal como fue detallado en la sección **2.5**, mediante la disolución de 5 mg de ditizona por cada 20 mL de surfactante al 5% y su agitación durante 20 minutos antes de ser filtrados los residuos sólidos no disueltos.

4.1.2 Validación del método

Límite de detección (LDD) y de cuantificación (LDC)

La **Tabla 9** resume los valores obtenidos de las mediciones del blanco, el promedio y su desviación estándar, de dos días diferentes. El límite de detección para el método de detección de cinc fue 0,0395 ppm (**Tabla 10**). Para cada día trabajado se calculó el LDD mediante el uso de la **Ecuación 1** de la sección **3.4.1.2**. Finalmente, el LDD del método se obtuvo del promedio de los dos valores obtenidos en las dos fechas trabajadas. Por otro lado, el límite de cuantificación hallado fue de 0,0763 ppm (**Tabla 10**).

Tabla 9. Resultados de las mediciones de los blancos del método

	Zn ²⁺ ; mg/L	
	Día1	Día2
B 1	0,0251	0,0187
B 2	0,0301	0,0239
B 3	0,0207	0,0165
B 4	0,0273	0,0188
B 5	0,0366	0,0131
B 6	0,0308	0,0233
B 7	0,0227	0,0147
B 8	0,0252	0,0207
B 9	0,0190	0,0293
B 10	0,0320	0,0251
Promedio	0,0270	0,0204
Desv. Est.	0,0055	0,0050
LDD	0,0434	0,0355
LDC	0,0818	0,0708

Tabla 10. Límites de detección y de cuantificación calculados

	Zn ²⁺ ; mg/L
LDD	0,0395
LDC	0,0763

Tal como se ha visto en los resultados de la **Tabla 9**, las disoluciones del blanco pueden contribuir aleatoriamente a la señal instrumental. Estas fluctuaciones pueden interferir con el proceso de medición, razón por la cual no es posible asegurar que los resultados obtenidos alrededor del valor promedio de medidas del blanco, sean efectivamente del analito en la muestra. Es por esto que a este valor promedio se le adiciona el valor de la desviación estándar multiplicada por el factor k , descrito en la sección **3.4.1.2**.

De igual manera, para minimizar la incertidumbre alrededor del LDD se utiliza el parámetro LDC. Este asegura que la detección del analito se reporta con un nivel aceptable de precisión, repetibilidad y veracidad, puesto que la incertidumbre asociada al proceso de medición del analito es menor alrededor del LDC. La incertidumbre asociada

al proceso de medición del analito alrededor del LDD y LDC guarda una relación de 10:3. Estadísticamente, esto se aprecia en la Ecuación 2, donde se multiplica el valor de 10 a la desviación estándar para obtener el LDC.

Con base en estos resultados se estableció el límite inferior del rango de trabajo igual al límite de cuantificación, 0,0763 mg/L. Puesto que, a partir de este valor se trabaja en una zona más segura de cuantificación.

Rango de linealidad

Los resultados obtenidos demostraron que a concentraciones mayores a 0,824 ppm la absorbancia no se relaciona linealmente con la concentración del ion metálico (**Figura 43**). Sin embargo, cuando se tienen concentraciones menores a 0,824 ppm los puntos sí se ajustan a una recta (**Figura 44**).

Como se determinó en la sección anterior, la cantidad de ditizona agregada es un parámetro importante para la formación del complejo. La situación más favorable es aquella en la que la ditizona se encuentra en exceso, **Figura 38** (Paradkar, Williams, & Ron, 1994). Los resultados de la **Figura 43** muestran una desviación negativa de la ley de Beer-Lambert cuando la concentración del ion metálico es alta; probablemente porque no se tiene la cantidad estequiométrica de ditizona necesaria para la reacción con el ion metálico. En consecuencia, a altas concentraciones de cinc, la cantidad de ditizona limita la formación del ditizonato metálico y la absorbancia, que es proporcional a la cantidad de complejo formado, disminuye.

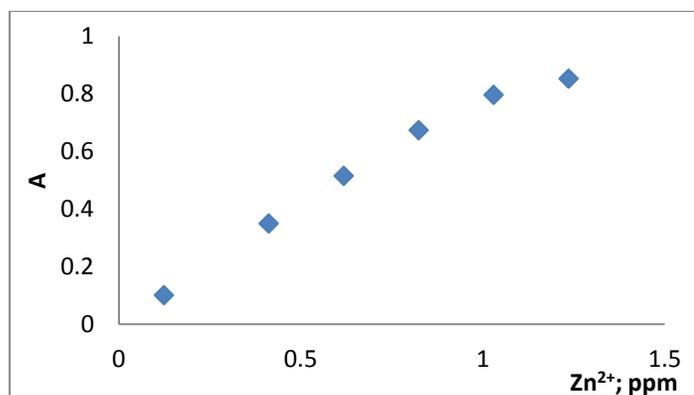


Figura 43. Curva calibración del complejo $Zn(HDz)_2$. Rango de concentraciones de 0,124 ppm a 1,24 ppm

La **Figura 44** muestra que la linealidad se alcanza en el rango de 0,12 ppm a 0,824 ppm, con un coeficiente de correlación igual a 0,9996. Se deduce que en este caso, la cantidad presente de ditizona, en los 7 mL que se agrega de esta, debe ser suficiente para la formación del complejo metálico cuando la concentración del ion metálico no sobrepasa 0,824 ppm.

Finalmente, el límite superior del rango de linealidad se igualó al valor más alto donde se mantenía la linealidad, obtenido de la calibración. Por otro lado, el límite inferior del rango de trabajo establecido en la sección anterior se igualó al LDC. Es decir, el intervalo lineal del método se encuentra entre 0,0763 ppm y 0,824 ppm.

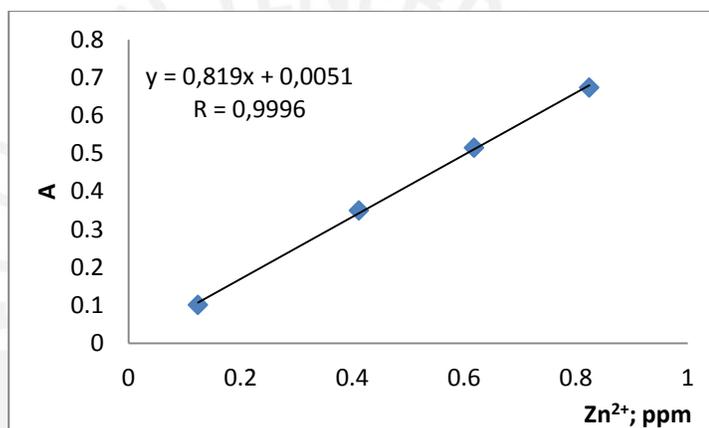


Figura 44. Curva calibración del complejo $Zn(HDz)_2$. Rango de concentraciones de 0,124 ppm a 0,824 ppm

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 las muestras S1A y S2A (**Tabla 11**). En la sección **3.3.1.2** se mencionó que la precisión evaluaba la dispersión de los resultados de una muestra analizada bajo las mismas condiciones, y esta puede estudiarse con diferentes parámetros, como reproducibilidad y repetitividad.

Tabla 11. Evaluación de la precisión del método. Repetitividad de los resultados

Muestras de cinc		Réplicas (mg/L de Zn ²⁺)				Rango (mg/L)	Concentración promedio (mg/L)	Desviación estándar (mg/L)	% RSD (mg/L)
		1	2	3	4				
16/09	S1A	0,3038	0,3005	0,2990	0,2992	0,0048	0,3006	0,0022	0,732
	S2A	0,2501	0,2524	0,2514	0,2561	0,0060	0,2525	0,0026	1,030
29/09	S1A	0,3063	0,3040	0,3048	0,3042	0,0023	0,3048	0,0010	0,328
	S2A	0,2563	0,2543	0,2559	0,2545	0,0020	0,2553	0,0010	0,392
05/10	S1A	0,3035	0,3051	0,3072	0,3038	0,0037	0,3049	0,0017	0,558
	S2A	0,2576	0,2508	0,2514	0,2559	0,0068	0,2539	0,0033	1,300

Los resultados obtenidos para la muestra S1A revelan que la dispersión de los resultados obtenidos no es muy amplia. Esto se puede corroborar por los valores de la desviación estándar y por el parámetro rango, pues este resulta de la diferencia entre el mayor y menor valor del grupo de resultados. De igual forma, la muestra S2A presenta pequeños valores de desviación estándar y el rango de resultados es un intervalo corto.

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. La comparación de la dispersión de los resultados obtenidos en diferentes fechas sobre la misma muestra permite hablar de reproducibilidad. La **Tabla 12** muestra que los resultados obtenidos se reproducen con baja dispersión.

Tabla 12. Resultados de la reproducibilidad de los resultados

	Zn ²⁺ ; mg/L			Promedio (mg/L)	Desviación estándar (mg/L)	%RSD (mg/L)
	16/09	29/09	05/10			
S1A	0,3006	0,3048	0,3049	0,3034	0,0025	0,8088
S2A	0,2525	0,2553	0,2539	0,2539	0,0014	0,5514

Veracidad

Para verificar la veracidad del método se compararon los resultados obtenidos mediante este método con los obtenidos por absorción atómica. Para lograr este objetivo

se realizó una curva de calibración con un material de referencia certificado y se evaluó las dos muestras utilizadas. La **Tabla 13** muestra los resultados obtenidos.

Tabla 13. Comparación de los resultados obtenidos por este método y por absorción atómica

	Zn ²⁺ ; ppm	
	AAS	UVVIS
S1A	0,3025	0,3035 ± 0,0024
S2A	0,2527	0,2532 ± 0,0026

Se puede observar que la concentración encontrada mediante este método no difiere mucho de la obtenida mediante el método espectrofotométrico de absorción atómica. Para corroborar esta afirmación se presenta en la **Tabla 14** los resultados del test de t realizado al grupo de resultados.

El test de t evalúa la diferencia de dos medias para probar que estas sean estadísticamente iguales. El test de t se realizó con un nivel de significancia igual a 0,05 y el resultado muestra un $t_{\text{experimental}}$ menor al $t_{\text{crítico}}$. De esta manera, se puede afirmar que los resultados obtenidos por el presente método están próximos al valor de referencia aceptado. Por lo cual, la determinación del cinc mediante este método demuestra ser veraz.

Tabla 14. Test de t para las muestras analizadas por ambos métodos

	S1A	S2A
$t_{\text{experimental}}$:	0,0412	0,2495
$t_{\text{crítico}}$:	2,0739	2,0739
H₀:	las medias son estadísticamente iguales	
H₁:	las medias son diferentes	

Incertidumbre

El cálculo de la incertidumbre estándar del método se realizó a partir de una serie de observaciones. Es decir, todos los ensayos realizados sirvieron para elaborar un

registro de datos al estimar Zn^{2+} . Estos datos sirvieron para aplicar la **Ecuación 4** y determinar de la incertidumbre del método. La incertidumbre del método combina los errores sistemáticos y aleatorios que se presentan durante el proceso de medición del analito.

El primer parámetro calculado fue la incertidumbre de la precisión. En la **Tabla 15** se aprecia que la incertidumbre estándar relacionada a la precisión del método es igual a 0,001. Este valor caracteriza la variabilidad asociada a la estimación de la magnitud sujeta a estimación, es decir la concentración del cinc Zn^{2+} .

Tabla 15. Estimación de la incertidumbre estándar de la precisión

Estadístico, mg/L	Valor
s	0,002
$\mu_{\text{precisión}}$	0,001

El segundo parámetro encontrado fue la incertidumbre de la veracidad. Este valor compara los resultados obtenidos por este método y los obtenidos por un método de referencia, en este caso AAS.

Tabla 16. Estimación de la incertidumbre estándar de la veracidad

Estadístico, mg/L	Valor
S AAS	0,0031
S UVVIS	0,0023
$\mu_{\text{veracidad}}$	0,0038

Por último, para el cálculo de la incertidumbre estándar del método se consideró al sesgo como otro componente de la incertidumbre (**Ecuación 4**). En la **Tabla 17** se observan los valores de las varianzas calculadas para la veracidad y la precisión, y el sesgo elevado al cuadrado. La incertidumbre estándar del método fue igual a 0,0042 y la incertidumbre estándar expandida fue igual a 0,0139 (**Ecuación 7**).

Tabla 17. Estimación de la incertidumbre estándar del método

Estadístico, mg/L	Valor
sesgo ²	$0,3 \times 10^{-5}$
μ^2 veracidad	$0,14 \times 10^{-5}$
μ^2 precisión	$0,1 \times 10^{-5}$
μ_{DE}	0,0042
U	0,0139

Los valores obtenidos indican que al estimar la concentración del cinc (II) de una muestra acuosa el intervalo realista de valores, dentro del cual está probablemente el valor “real” de la cantidad medida, es $\pm 0,0139$.

Condiciones de la reacción

Sobre la base de estos resultados, se estableció los parámetros analíticos obtenidos del proceso de optimización y validación del método aquí desarrollado. En la **Tabla 18** se resume estos parámetros.

Tabla 18. Parámetros analíticos obtenidos del proceso de optimización de los ensayos para determinar cinc.

Parámetro	Valor obtenido
Determinación analítica	Zn ²⁺
Longitud de onda	522 nm
pH reacción	5
Buffer	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄
Concentración del surfactante	5% v/v
Ditizona	Disolución saturada
Rango lineal	0,1 – 0,8 mg/L
Limite de detección	0,04 mg/L
Limite de cuantificación	0,08 mg/L
%DER	0,22 – 0,84 mg/L (n=4)
Incertidumbre estándar del método	0,0042 mg/L
Incertidumbre estándar expandida	± 0,0139 mg/L
Alcance del método	Muestras acuosas

A continuación, el producto final del proceso de optimización y validación del método propuesto para la determinación de cinc en una muestra acuosa es el siguiente.

Procedimiento para la detección de cinc

A una alícuota de 1 mL de muestra acuosa homogénea que contenga entre 0,0763 y 0,824 mg.L⁻¹ de cinc se le añade 7 mL de una disolución saturada de ditizona solubilizada en el surfactante Tritón X-100 al 5% amortiguado en un buffer fosfato a pH 5. Se enrasa en una fiola de 10 mL con la disolución del surfactante, de manera que el pH se mantenga igual a 5. Finalmente, se tapa la fiola y se agita suavemente para que se produzca la reacción del complejo y se mide inmediatamente la absorbancia a 522 nm. Se calcula la concentración de analito en la muestra a partir de la recta de calibrado preparada para tal efecto.

4.1.3 Aplicación del método

Los resultados del análisis de las muestras de cinc se resumen en la siguiente tabla. La muestra M1 es la correspondiente a la disolución realizada a partir de la pastilla y M2 corresponde a la muestra tomada del agua potable. Ambas muestras fueron analizadas cuatro veces. En la **Tabla 19** se muestra el valor promedio de las concentraciones encontradas para cada caso, la desviación estándar y la desviación estándar relativa. Los resultados de las muestras M3, M4 y M5 se discuten más adelante.

Para la determinación de la concentración de cinc en ambas muestras se obtuvo los resultados mostrados en la **Tabla 19**. La medición de estas concentraciones presenta una baja dispersión de los resultados alrededor de la media, pues la desviación estándar relativa calculada es menor al 1%. Sobre la base de estos valores se puede afirmar que la precisión del método para determinar la concentración de cinc en estas dos muestras es alta.

Tabla 19. Resultados del análisis de las dos muestras, M1 y M2, mediante el método propuesto. Se muestra la desviación estándar de cuatro medidas realizadas.

	Zn ²⁺ ; promedio (mg/L)	Desviación estándar (mg/L)	% DER (mg/L)
M1	3,3057	0,0166	0,50
M2	1,3511	0,0098	0,73

En la **Tabla 20** se presentan los valores obtenidos, mediante absorción atómica, de las concentraciones de cinc de ambas muestras. Estas se compararon con las concentraciones obtenidas mediante el método propuesto. El método propuesto tiene concentraciones similares a las de absorción atómica, pero son ligeramente menores. Para la comparación de los resultados se aplicó el test de t-Student) para 3 grados de libertad ($p=0,05$).

Tabla 20. Resultados del análisis de cinc mediante el método propuesto y mediante AAS.

	Zn ²⁺ ; mg/L	
	UV/VIS	AAS
M1	3,30 ± 0,02 (n=4)	3,51
M2	1,35 ± 0,01 (n=4)	1,39

Según la **Tabla 21**, el estadístico t , calculado a partir de los datos experimentales, es menor al $t_{\text{crítico}}$, en ambos casos. De esta información, se deduce que mediante el método propuesto se puede obtener resultados comparables a los de absorción atómica, pues la media de las concentraciones halladas es estadísticamente igual a la concentración de referencia, la que es hallada mediante absorción atómica.

Tabla 21. Comparación de los resultados de ambos métodos

	M1	M2
$t_{\text{experimental}}$:	3,1021	0,6909
$t_{\text{crítico}}$:	3,1824	3,1824
H₀:	No existe diferencia entre el valor observado y el de referencia	
H₁:	Son diferentes	

Adicionalmente, para la muestra M1, se compararon los resultados obtenidos por ambos métodos con el valor teórico calculado, según la información presentada en la etiqueta de dicho suplemento vitamínico. La disolución preparada a partir de la pastilla, tenía una concentración de 3,58 mg/L. La concentración encontrada mediante AAS fue 3,51 mg/L, mientras que, la concentración encontrada mediante este método fue de 3,30 mg/L.

Los porcentajes de error relativo entre los valores experimentales y el teórico son 2,0% y 7,8% para los resultados obtenidos mediante AAS y UV/VIS respectivamente. Instrumentalmente, la técnica de absorción atómica tiene una mejor selectividad que la absorción molecular. Puesto que, la presencia de otras sustancias durante la determinación del analito, no causa interferencias, o estas pueden minimizarse.

Mientras que, en la absorción molecular, la presencia de sustancias capaces de absorber luz a la longitud de onda de trabajo puede contribuir a la señal del analito o distorsionarla. Por tal razón, la espectrofotometría de absorción molecular es considerada una técnica de baja selectividad o especificidad. En este sentido, la muestra preparada a partir del comprimido farmacéutico tiene una mezcla de sustancias solubilizadas que formaban parte de este, las cuales cumplen funciones como las de relleno, de vehículo o como recubridores. Por lo que es probable que alguna de estas sustancias pueda haber interferido en cierto grado con la determinación de cinc mediante este método.

Otra de las causas probables para el error encontrado es la procedencia de la muestra. Por ejemplo, los productos manufacturados pueden tener variaciones pequeñas entre lote y lote de producción. En tal sentido, sería conveniente recoger muestras de diferentes lotes para confirmar esta afirmación. Incluso se pueden recolectar muestras de marcas diferentes a la utilizada en estos ensayos.

Los resultados obtenidos con esta muestra, M1, pueden servir de ejemplo para comprender la diferencia entre la incertidumbre y el error del método. El error es un valor individual, resultado de la diferencia entre un valor observado y un valor de referencia aceptado o “real”. En cambio, la incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza, mediante un rango, la dispersión de los valores que pueden ser razonablemente atribuidos a la cantidad sujeta a medida.

En este ejemplo, el porcentaje de error relativo es la diferencia, expresada en porcentaje, entre el resultado obtenido mediante este método y el valor teórico calculado a partir de los datos obtenidos de la etiqueta del suplemento vitamínico. Mientras que, la incertidumbre del método es el rango encontrado en el proceso de validación, incertidumbre expandida.

En el caso ideal, se esperaría que el valor de referencia debiera estar en el rango formado por la incertidumbre estándar expandida, calculada en el proceso de validación, alrededor del valor encontrado mediante este método. Sin embargo, esto no ocurre, puesto que la incertidumbre es un rango para un procedimiento aplicado a un tipo de muestra (Eurachem, 2000), y la muestra utilizada para el proceso de validación fue preparada a partir de una disolución estrictamente de iones Zn^{2+} . Muy diferente al caso de la tableta analizada, que estaba formada por una mezcla de sustancias en disolución.

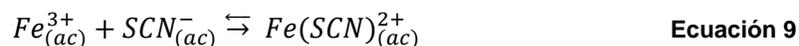
Sobre la base de estos resultados se puede afirmar que las diferencias entre los valores promedio encontrados mediante espectrofotometría UV/VIS y AAS no son muy grandes. Además, es probable que los errores en la medición se deban principalmente a errores aleatorios y no a sistemáticos pues, por un lado, la variabilidad de este método es pequeña (%DER < 1%) y, por otro, estadísticamente se probó que la media de los

resultados de este método es igual a la concentración de referencia obtenida mediante AAS.

Con respecto a las muestras M3, M4 y M5, (apartado **3.4.1**) se registraron los siguientes inconvenientes durante el procedimiento de determinación del cinc. Primero, el pH de la digestión de las muestras fue muy ácido, igual a cero, esto impidió la formación del complejo metálico, pues el pH de la reacción entre el cinc y la ditizona es 5. En efecto, el pH encontrado en las disoluciones de los complejos fue cero también. Lo que indica que la acidez es tan alta que el equilibrio del sistema buffer se pierde, por lo tanto se pierde la amortiguación del mismo.

Segundo, para aumentar el pH se optó por diluir la muestra antes de la formación de complejo. Sin embargo, la dilución de la muestra no fue suficiente para aumentar el pH, pues el volumen de agua destilada debía ser muy grande para lograr esto. En consecuencia, la concentración del ion metálico disminuía notablemente, impidiendo su detección mediante este método.

Tercero, además de la dilución, se optó por basificar la disolución para neutralizarla. Para conseguirlo se agregó hidróxido de sodio (M.Kamburova, 1993); sin embargo, se observó la formación de un precipitado color pardo oscuro, presuntamente hidróxido de hierro (III). El pH final registrado fue 8. Para corroborar la presencia de hierro (III) en la muestra se realizó el ensayo preliminar correspondiente. A una alícuota de la disolución M3, se le agregó tiocianato de potasio. Se formó una disolución de color rojo intenso, resultado de la formación del complejo $Fe(SCN)^{2+}$, según la ecuación 9 (Love, 1995).



Al parecer, tras la precipitación del hierro (III), también ocurría una coprecipitación del hidróxido de cinc, pues luego del análisis mediante este método, no había banda de absorbancia a 522 nm, característica del ditizonato de cinc, lo que indicaba pérdida del analito por co-precipitación, presuntamente por adsorción en la superficie del hidróxido de hierro (III). En efecto, para comprobar la disminución en la concentración del analito en la muestra, esta fue analizada mediante AAS, los resultados mostraron que la concentración del cinc fue menor al LDD del método aquí desarrollado; 0,022 mg.L⁻¹.

Además, según la información recabada en la introducción teórica de este trabajo, el Zn^{2+} empieza a precipitar cuando el pH sobrepasa el valor 6 de dicha escala. En consecuencia, la basificación del medio hace disminuir la concentración del ion metálico, Zn^{2+} , en solución, debido a la precipitación del mismo como hidróxido de cinc (II).

Estos resultados permitieron concluir que el método de determinación de cinc mediante espectrofotometría de absorción molecular no puede ser aplicado a muestras de suelos, puesto que la presencia de minerales, solubilizados durante la digestión de la muestra, interfieren en el proceso de detección. Además, el pH tan ácido, necesario para el proceso de digestión, impide el normal funcionamiento del método, puesto que la cantidad presente del buffer es insuficiente para amortiguar el cambio de pH.

Finalmente, la dilución o basificación de la muestra no es conveniente pues disminuye la concentración del analito en disolución debido a que el volumen de agua que debe agregarse es muy grande y porque puede co-precipitar con los hidróxidos metálicos de iones también solubilizados durante el proceso de digestión.

Sobre la base de esos resultados se modificó los parámetros analíticos de determinación de cinc (**Tabla 22**).

Tabla 22. Parámetros analíticos modificados del método para determinar cinc.

Parámetro	Valor obtenido
Determinación analítica	Zn ²⁺
Longitud de onda	522 nm
pH reacción	5
Buffer	Na ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄
Concentración del surfactante	5% v/v
Ditizona	Disolución saturada
Rango lineal	0,1 – 0,8 mg/L
Limite de detección	0,04 mg/L
Limite de cuantificación	0,08 mg/L
%DER	0,22 – 0,84 mg/L (n=4)
Incertidumbre estándar del método	0,0042 mg/L
Incertidumbre estándar expandida	± 0,0139 mg/L
Alcance del método	Muestras acuosas preparadas a partir de comprimidos farmacéuticos. Agua potable y filtrada.
No aplicable a	Muestras de suelo o disoluciones de pH muy ácidos o muy básicos. Muestras con un alto contenido de minerales
Interferencias	Altos contenidos de hierro (III)

A continuación se indica el procedimiento a seguir para la determinación de cinc en una muestra acuosa utilizando el método propuesto. Se incluye el procedimiento del pre tratamiento de la muestra farmacéutica.

Pre tratamiento de la muestra farmacéutica

A una tableta de un suplemento vitamínico que contenga gluconato de cinc se le pesa, luego se le tritura hasta obtener un polvo homogéneo. Se pesa entre 0,02 - 0,03 g del polvo obtenido y se disuelve en un mínimo volumen de agua ultra pura ligeramente acidificada. Se enrasa en una fiola de 100 mL con agua ultra pura. La muestra preparada contiene entre 3,4 – 5,7 mg.L⁻¹ de cinc. Se toma una alícuota de 1 mL para el análisis mediante el método aquí desarrollado.

Aplicación del método

A una alícuota de 1 mL de muestra acuosa homogénea que contenga entre 0,0763 y 0,824 mg.L⁻¹ de cinc se le añade 7 mL de una disolución saturada de ditizona solubilizada en el surfactante Tritón X-100 al 5% amortiguado en un buffer fosfato a pH 5. Se enrasa la fiola de 10 mL con la disolución del surfactante. Finalmente, se tapa la fiola y se agita suavemente para que se produzca la reacción del complejo y se mide inmediatamente la absorbancia a 522 nm. Se calcula la concentración de analito en la muestra a partir de la recta de calibrado preparada para tal efecto.

4.2 Mercurio

4.2.1 Ensayos preliminares

Se encontró que el ditizonato de mercurio absorbe a 502 nm (**Figura 45**), por lo que en adelante, las curvas de calibración de sus complejos fueron medidas a esta longitud de onda.

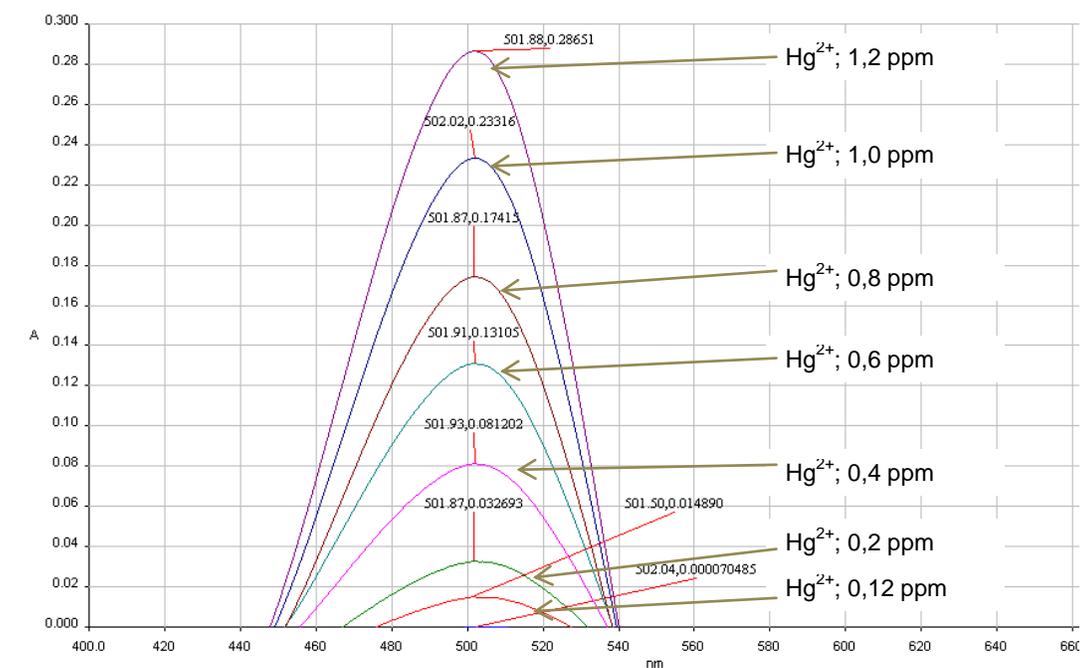


Figura 45. Espectro de absorción del complejo $\text{Hg}(\text{HDz})_2$

Efecto de la disolución amortiguadora

El proceso de optimización y validación del método elaborado para determinar cinc en muestras acuosas se utilizó como modelo para desarrollar el método de detección de mercurio. Alguno de los parámetros relacionados a la ditizona no fueron repetidos, puesto que para comparar la reactividad química de ambos metales, estos debían trabajarse bajo condiciones similares. Por ejemplo, la cantidad óptima de ditizona encontrada para la formación de los complejos de cinc, fue replicada en los ensayos con mercurio. Por ello se inició esta etapa con la evaluación del efecto de la disolución amortiguadora.

Los resultados obtenidos de la máxima absorbancia de los complejos de ditizona y mercurio han sido resumidos en la **Tabla 23**. Se incluye también sus ecuaciones de regresión y el coeficiente de correlación, R. Al comparar ambos coeficientes se aprecia que, en el caso del buffer B, es un valor cercano a la unidad, por lo cual se considera que el empleo de este buffer no interfiere con un comportamiento lineal del sistema.

Tabla 23. Resultados de la absorción de los complejos metálicos en diferentes medios amortiguadores

Hg ²⁺ ; mg/L	Absorbancia	
	Disolución A	Buffer B
0,12	0,0281	0,0282
0,2	0,0511	0,0503
0,8	0,1625	0,1899
1,0	0,2117	0,2416
1,2	0,2625	0,2845
Ecuación regresión	$y = 0,2096x + 0,004$	$y = 0,2374x + 0,0013$
R	0,9979	0,9998

Disolución A: HCl/KCl

Efectivamente, al observar la **Figura 46** y la **Figura 47**, se aprecia que en la primera, los puntos no se ajustan rigurosamente a una recta ($R = 0,9979$, $p < 0,01$). Por el contrario, en la segunda gráfica, el coeficiente de correlación fue cercano a la unidad, $R = 0,9998$ ($p < 0,01$). En este caso, se utilizó el buffer compuesto por el sistema $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$ para regular el pH a un valor de 2.

En base a estos resultados, se eligió el buffer B ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$) como el sistema amortiguador del pH de la reacción.

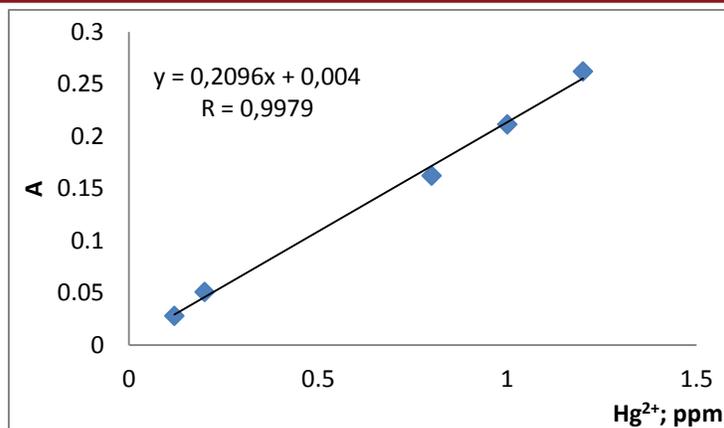


Figura 46. Curva de calibración de los complejos metálicos amortiguados con la disolución A (KCl/HCl)

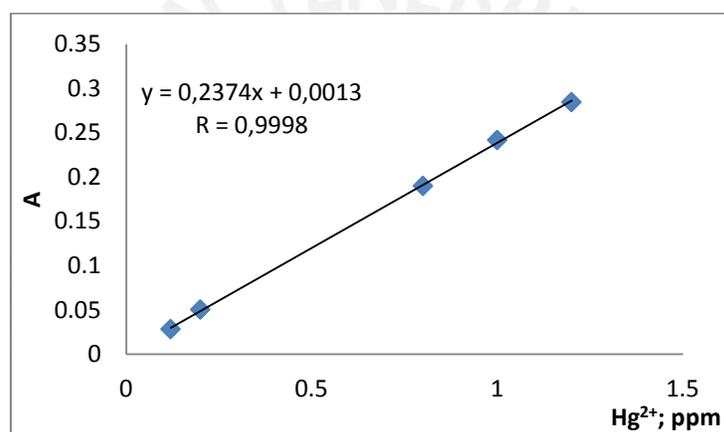


Figura 47. Curva de calibración de los complejos metálicos amortiguados en el buffer B (KH₂PO₄/H₃PO₄)

4.2.2 Validación del método

Límite de detección (LDD) y de cuantificación (LDC)

El resultado de la evaluación de los blancos del método se muestra en la **Tabla 24**. Los valores de LDD y LDC encontrados fueron 0,04 y 0,10 mg.L⁻¹ respectivamente (**Tabla 25**). Se estableció al LDC como el límite inferior del rango de trabajo.

Tabla 24. Resultados de las mediciones de los blancos del método

	Hg ²⁺ ; mg/L		
	Día 1	Día 2	Día 3
B1	0,009	-0,003	0,001
B2	0,018	0,017	0,018
B3	-0,001	0,009	-0,002
B4	0,018	0,007	0,018
B5	0,002	-0,011	0,002
B6	0,006	0,009	0,005
B7	0,003	0,023	0,003
B8	0,012	0,018	0,012
B9	-0,007	0,008	-0,010
B10	0,018	0,004	0,017
Promedio	0,008	0,008	0,006
Desviación Estándar	0,009	0,010	0,010
LDD	0,034	0,038	0,035
LDC	0,096	0,108	0,102

Los valores obtenidos para el mercurio son similares a los obtenidos para el cinc. La preparación de los blancos es similar; ambos contienen la disolución saturada de ditizona y son enrasados con la disolución del surfactante amortiguada con una disolución buffer de fosfatos.

Tabla 25. Límites de detección y de cuantificación calculados

	Hg ²⁺ ; mg/L
LDD	0,04
LDC	0,10

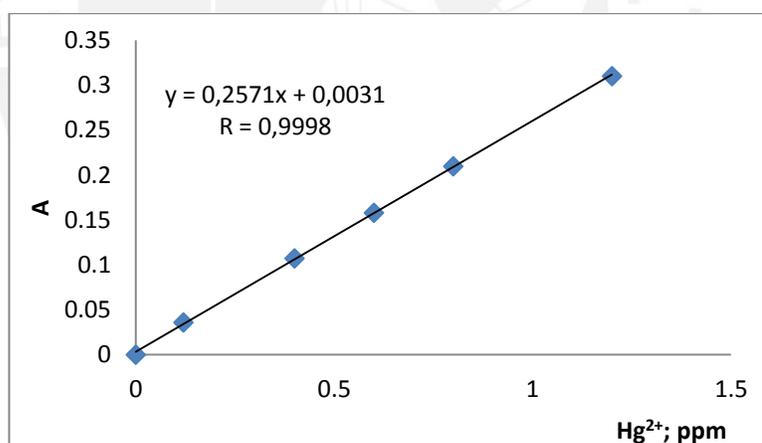
Rango de linealidad

De manera similar al cinc, se evaluó el rango de trabajo donde la ley de Beer era obedecida. Se encontró que, para el caso del mercurio, el intervalo lineal se mantiene a lo largo de la curva (**Figura 48**), aun a concentraciones iguales a 1,2 mg.L⁻¹ del ion metálico, con un coeficiente de correlación igual a 0,9998 (p<0,001).

Tabla 26. Valores de absorbancia de los complejos de mercurio

Hg ²⁺ ; mg/L	A
0	0
0,12	0,0359
0,4	0,1072
0,6	0,1580
0,8	0,2098
1,2	0,3101

La diferencia de comportamiento entre ambos metales se debe a la relación molar presente en las disoluciones preparadas. La molaridad del complejo de cinc en la disolución de concentración de 1,2 mg.L⁻¹ fue $1,8 \times 10^{-5}$ M, mientras que la de mercurio fue alrededor de $0,6 \times 10^{-5}$ M, valor tres veces menor. Se debe tener en cuenta que la cantidad de ditizona en ambos casos es la misma, pues en ambos se agrega 7 mL de la disolución saturada de este reactivo. Por ello las moles presentes de ditizona siguen en exceso respecto de las moles de mercurio, aun a una concentración de 1,2 ppm, lo que no sucede con el cinc.

Figura 48. Curva calibración del complejo Hg(HDz)₂. Rango de concentraciones de 0,12 ppm a 1,2 ppm

Sobre la base de estos resultados se delimitó el rango lineal entre los siguientes valores: 0,1 ppm y 1,2 ppm.

Precisión

En la **Tabla 27** se aprecian los valores obtenidos para el análisis de tres muestras que contenían mercurio y que fueron analizadas por cuadruplicado en tres fechas distintas. Los valores de desviación estándar relativa son bajos, por lo que la variabilidad de los resultados no es muy alta. Además, la diferencia entre el valor más bajo y el más alto de cada evaluación, de las cuatro réplicas, es pequeña, estos valores pueden apreciarse en la columna Rango.

Tabla 27. Evaluación de la precisión del método. Repetitividad de los resultados

Muestras mercurio	Concentración de cuatro réplicas (mg/L)				Rango	Concentración promedio	Desviación estándar	% RSD	
	1	2	3	4					
Día 1	M1	0,2147	0,2079	0,2119	0,2087	0,0068	0,2108	0,0031	1,4747
	M2	0,4126	0,4162	0,4026	0,4245	0,0119	0,4140	0,0091	2,1916
	M3	1,0370	1,0008	1,0227	1,0247	0,0362	1,0213	0,0151	1,4758
Día 2	M1	0,2165	0,2019	0,2103	0,2088	0,0146	0,2094	0,0060	2,8656
	M2	0,4088	0,4080	0,4046	0,4234	0,0153	0,4112	0,0083	2,0220
	M3	1,0372	1,0341	1,0165	1,0027	0,0031	1,0226	0,0161	1,5754
Día 3	M1	0,2134	0,1980	0,2138	0,2011	0,0158	0,2066	0,0082	3,9848
	M2	0,4137	0,4068	0,4095	0,4083	0,0069	0,4096	0,0030	0,7274
	M3	0,9942	1,0185	1,0197	1,0232	0,0289	1,0139	0,0133	1,3087

Por otro lado, en la **Tabla 28** se aprecian 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 y reproducibilidad en las medidas.

Tabla 28. Resultados de la reproducibilidad de resultados

	Hg ²⁺ ; mg/L			Concentración promedio (mg/L)	Desviación estándar (mg/L)	%RSD (mg/L)
	Día 1	Día 2	Día 3			
M1	0,2108	0,2094	0,2066	0,2089	0,0059	2,8016
M2	0,4140	0,4112	0,4096	0,4116	0,0069	1,6710
M3	1,0213	1,0226	1,0139	1,0193	0,0140	1,3764

Veracidad

La **Figura 49** muestra los resultados obtenidos por el Instituto de Corrosión y Protección del análisis de mercurio.

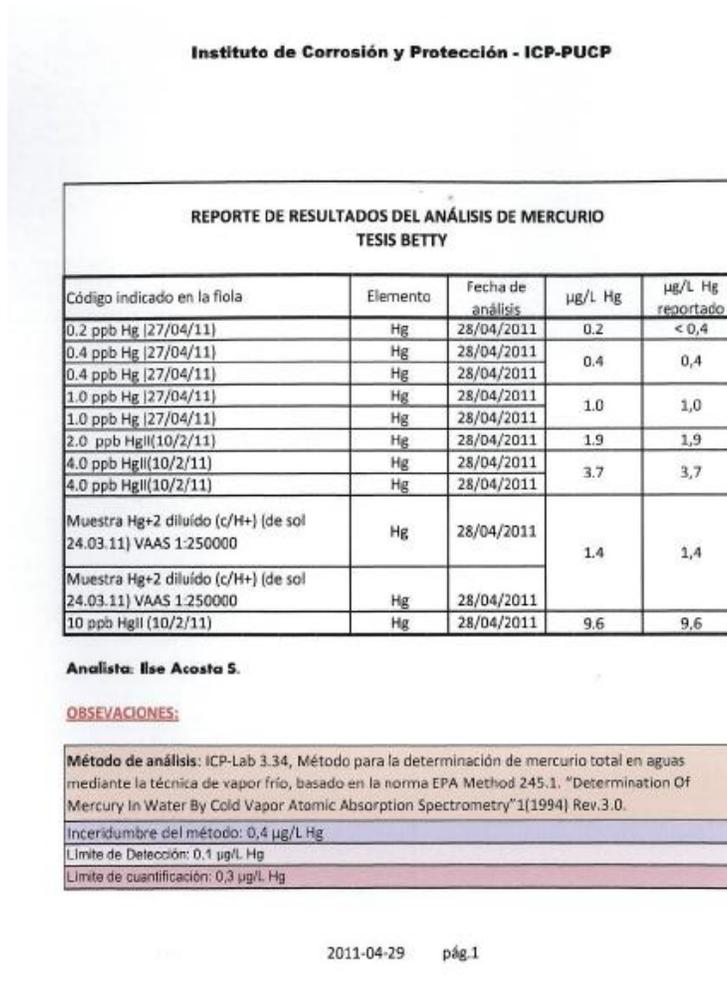


Figura 49. Reporte de los resultados obtenidos mediante CV-AAS

En la **Tabla 29** se presentan los resultados obtenidos mediante este método y los obtenidos mediante CV-AAS. Se puede afirmar que los resultados de las muestras preparadas en el laboratorio no difieren mucho de las obtenidas mediante CV-AAS. Para corroborar esta afirmación se presentan también los resultados del test de *t* para comparar la media de los resultados obtenidos por este método con los correspondientes hallados mediante CV-AAS.

Tabla 29. Comparación de los resultados obtenidos por este método y por absorción atómica

	Hg ²⁺ ; ppm	
	CV-AAS	UV/VIS
M1	0,2	0,2089 ± 0,0021
M2	0,4	0,4116 ± 0,0022
M3	1,0	1,0193 ± 0,0047

La **Tabla 30** muestra los resultados del cálculo del estadístico t . El test de t se realizó con una significancia de 0,05. En todos los casos, el $t_{\text{experimental}}$ es menor al $t_{\text{crítico}}$, por lo que se mantiene la hipótesis nula, H_0 , y se afirma que los resultados obtenidos mediante este método son estadísticamente iguales a los valores de referencia, es decir los obtenidos mediante CV-AAS. En suma, el método para determinar mercurio demuestra ser veraz.

Tabla 30. Comparación de los resultados de ambos métodos

	M1	M2	M3
$t_{\text{experimental}}$:	0,404	0,496	0,696
$t_{\text{crítico}}$:	2,201	2,201	2,201
H₀ :	No existe diferencia entre el valor observado y el de referencia		
H₁ :	Son diferentes		

Incertidumbre

El cálculo de la incertidumbre estándar del método para determinar mercurio se realizó a partir de los resultados obtenidos durante la implementación de dicho método. La incertidumbre de un resultado es un rango dentro del cual se espera que se encuentre dicha cantidad medida. Se establece este intervalo pues toda medición está sujeta a fuentes de error. En el método propuesto se eliminaron los errores sistemáticos, por lo que la variabilidad encontrada se debió a errores aleatorios, inevitables en cualquier proceso de medición.

Se aplicó la **Ecuación 5** para el cálculo de la incertidumbre de la precisión. En la **Tabla 31** se tienen los valores de la desviación estándar y la incertidumbre estándar del

método. La incertidumbre de la precisión representa la variabilidad al hallar la media de una serie de repeticiones de medidas, en este caso, la concentración del mercurio (II).

Tabla 31. Estimación de la incertidumbre estándar de la precisión

Estadístico, mg/L	Valor
s	0,014
$\mu_{\text{precisión}}$	0,007

De igual manera, se calculó la incertidumbre estándar de la veracidad. Este valor compara la variabilidad de ambos métodos cuando se realiza la medición de una magnitud en particular (**Tabla 32**).

Tabla 32. Estimación de la incertidumbre estándar de la veracidad

Estadístico, mg/L	Valor
S CV-AAS	0,036
S UV/VIS	0,009
$\mu_{\text{veracidad}}$	0,037

El cálculo de la incertidumbre estándar del método se realizó con la **Ecuación 5** de la sección **3.3.1.2**. En la **Tabla 33** se resumen los resultados del cálculo de las incertidumbres de la veracidad y la precisión, se agregó el componente del sesgo para tener una mejor evaluación de la variabilidad del método. La incertidumbre estándar del método fue igual a 0,0014 mg/L, mientras que la incertidumbre estándar expandida fue igual a 0,0047 mg/L.

Tabla 33. Estimación de la incertidumbre estándar del método

Estadístico, mg/L	Valor
sesgo ²	$1,8 \times 10^{-4}$
μ^2 veracidad	$1,3 \times 10^{-3}$
μ^2 precisión	$4,7 \times 10^{-5}$
μ_{DE}	$1,6 \times 10^{-3}$
U	$0,5 \times 10^{-2}$

Condiciones de la reacción

Sobre la base de estos resultados, se estableció los parámetros analíticos del método aquí desarrollado; estos se resumen en la **Tabla 34**.

Tabla 34. Parámetros analíticos obtenidos del proceso de optimización de los ensayos para determinar mercurio.

Parámetro	Valor obtenido
Determinación analítica	Hg ²⁺
Longitud de onda	502 nm
pH reacción	5
Buffer	H ₃ PO ₄ /KH ₂ PO ₄
Concentración del surfactante	5% v/v
Ditizona	Disolución saturada
Rango lineal	0,1 - 1,2 mg/L
Limite de detección	0,04 mg/L
Limite de cuantificación	0,10 mg/L
% DER	0,7 – 3,9 mg/L (n=4)
Incertidumbre estándar del método	0,0016 mg/L
Incertidumbre estándar expandida	0,0052 mg/L
Alcance del método	Muestras acuosas
Interferencias	No determinadas
Precauciones	El mercurio se absorbe por inhalación y por contacto con la piel. Vestir los implementos de seguridad necesarios.

A continuación, se presenta el producto final del proceso de optimización y validación del método para determinar mercurio en muestras acuosas.

Procedimiento para la detección de mercurio

A una alícuota de 1 mL de muestra acuosa y homogénea que contenga entre 0,01 y 1,2 mg.L⁻¹ de mercurio se le añade 7 mL de una disolución saturada de ditizona solubilizada en el surfactante Tritón X-100 al 5% amortiguado en un buffer fosfato a pH 2. Se enrasa la fiola de 10 mL con la disolución del surfactante. Finalmente, se tapa la fiola y se agita suavemente para que se produzca la reacción del complejo y se mide inmediatamente la absorbancia a 502 nm. Se calcula la concentración de analito en la muestra a partir de la recta de calibrado preparada para tal efecto.

4.2.3 Aplicación del método

Los resultados del análisis de la muestra de mercurio mediante el método propuesto se resumen en la siguiente tabla (**Tabla 35**). La muestra fue preparada según se indicó en la sección 3.4.2. El método validado se aplicó a la determinación de mercurio en la muestra problema. Los resultados mostrados corresponden al promedio de las cuatro medidas realizadas durante el análisis de las cuatro disoluciones de complejo preparadas, bajo las mismas condiciones, a partir de la disolución problema.

Tabla 35. Resultados del análisis de la muestra mediante el método propuesto

	Hg ²⁺ ; promedio (mg/L)	Desviación estándar (mg/L)	% DER (mg/L)
Hg	0,318	0,0099 (n=4)	3,11

Los resultados muestran una variabilidad pequeña alrededor de la media. Esta variabilidad fue expresada matemáticamente en términos de la desviación estándar relativa (n=4), la cual es menor al 5%, por lo que las concentraciones medidas por este método se realizaron con bastante precisión.

Los resultados obtenidos mediante este método fueron comparados con los obtenidos mediante absorción atómica. La concentración hallada mediante CV-AAS fue multiplicada por el factor de dilución correspondiente, el cual se indica en la **Tabla 36**. La muestra fue diluida pues el rango de trabajo de la técnica de absorción atómica tiene un límite de detección menor, del orden de las partes por billón.

Tabla 36. Resultados del análisis de mercurio mediante el método propuesto y mediante AAS

Zn ²⁺ ; mg/L		
	UV/VIS	AAS (*)
Hg	0,318 ± 0,0099 (n=4)	0,35

(*) Factor de dilución: 250

Para la comparación de ambos resultados se calculó el estadístico t , el $t_{\text{experimental}}$ hallado es menor al $t_{\text{crítico}}$. Por lo tanto, al comparar el promedio de los resultados experimentales con el valor obtenido mediante AAS se prueba la hipótesis nula, H_0 . Es decir, no hay diferencia entre el valor obtenido mediante este método y el obtenido por el de referencia, CV-AAS,

Tabla 37. Comparación de los resultados de ambos métodos

Hg	
$t_{\text{experimental}}$:	0,0015
$t_{\text{crítico}}$:	3,1824
H₀:	No existe diferencia entre el valor observado y el de referencia
H₁:	Son diferentes

Sobre la base de estos resultados, se puede afirmar que las diferencias entre los valores promedio encontrados mediante espectrofotometría UV/VIS y CV-AAS se debieron a errores aleatorios principalmente. La variabilidad en la determinación de mercurio es pequeña (%DER < 5%) y estadísticamente se probó que la media de los resultados de este método es igual a la concentración de referencia obtenida mediante CV-AAS.

4.3 Discusión integral del método

El proceso de validación del método se realizó haciendo uso de las herramientas estadísticas mencionadas. Durante la optimización del método se identificaron las magnitudes de influencia que contribuyeron a la variabilidad de los resultados cuando se estimaba la concentración del analito. Esto es de vital importancia puesto que no es correcto iniciar el proceso de validación mientras no se ha asegurado que el método está bajo control estadístico.

Se dice que un método está bajo control estadístico cuando existe una variabilidad natural. Es decir, los errores atribuibles a la estimación de la concentración del analito son aleatorios. Mientras que cuando las causas son asignables o existen errores sistemáticos durante la detección, el proceso se encuentra fuera de control. Ambos tipos de errores deben ser detectados y eliminados; incluso, aun sabiendo que los errores aleatorios siempre van a estar presentes, estos pueden ser minimizados. A continuación se detalla los cuidados que se tuvieron en cuenta para eliminar los errores sistemáticos del método.

1. Con respecto a la disolución de ditizona, se trabajó con disoluciones saturadas de este reactivo, puesto que se desconocía la concentración del mismo en el medio micelar. El problema se superó al agregar un volumen fijo, 7mL, de la disolución saturada, a todas las fiolas, como se revisó en la sección 4.1.1. De esta manera, se aseguró que la cantidad de ditizona fue la misma en todos los experimentos y, al mismo tiempo, se aseguró que las moles de ditizona disueltas estuvieron en exceso respecto del ion metálico en todos los experimentos.
2. La disolución de ditizona fue preparada diariamente, minutos antes de empezar el análisis de determinación del ion metálico. El tiempo que transcurría desde que se preparaba la disolución de este reactivo hasta el análisis espectrofotométrico era menor a una hora, por lo que no se tuvo problemas con la fotosensibilidad que esta presenta. Además, las referencias citadas en la introducción teórica de este trabajo aseveran que existe una mejor estabilidad de los ditizonatos metálicos formados en medio micelar que de la ditizona libre (Medel, 1986).

3. El registro de datos permitió observar que, la disolución saturada de ditizona, preparada como se indica en este trabajo, tiene una absorbancia constante en todos los ensayos. Esto quiere decir que, dado que la concentración de una disolución es proporcional a su absorbancia, la concentración de la ditizona fue siempre la misma en los ensayos trabajados. Adicionalmente, según lo citado por Williams y Paradkar, la inestabilidad de la ditizona frente a la luz no representa ningún inconveniente en la determinación del complejo metálico, puesto que siempre se agrega un exceso de ditizona a las disoluciones.
4. La preparación del Tritón X-100 al 5% se realizó mediante el empleo de la disolución buffer como solvente. Dicho buffer fue preparado en medio acuoso, por lo que las micelas solubilizadas en este medio acuoso fueron el sistema de solubilización de la ditizona y de sus ditizonatos metálicos. En otras palabras, la ditizona y los ditizonatos estuvieron solubilizados en un medio acuoso-micelar, a diferencia de los clásicos solventes orgánicos, como el cloroformo o tetracloruro de carbono, que son cancerígenos.
5. El procedimiento para preparar la disolución del Tritón X-100 al 5% se realizó de la manera en que se detalló en la **Tabla 3** de la sección **3.2**. Se realizó de esta manera para reducir pasos y tener una preparación menos tediosa de los ditizonatos metálicos. Dado que de esta manera no fue necesario evaluar el volumen de buffer que debía agregarse a la reacción, y esto lo convertía en un parámetro menos que evaluar; solo se evaluó la cantidad apropiada de ditizona para formar los ditizonatos de cinc.
6. A partir de la información vista en la sección **4.1.1**, la elección del surfactante fosfato (Na_2HPO_4 / KH_2PO_4) no interfiere en la formación del ditizonato de cinc, pues la linealidad no se ve afectada en ninguno de los puntos de la recta. Sobre la base de estos resultados experimentales se puede afirmar que los iones fosfato no coordinan al ion metálico (es decir, no existe un enlace covalente entre ambas especies). Por el contrario, un posible compuesto formado entre el cinc y el ion fosfato sería de naturaleza iónica, el compuesto en mención es el fosfato de cinc, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, el cual es insoluble en agua ($K_{ps}: 9,0 \cdot 10^{-33}$), por esto se descarta su interferencia en la determinación del ion metálico (Aires).

7. En el caso del mercurio ocurre algo similar, pues la curva de calibración al emplear el buffer fosfato fue lineal, lo que indica que la presencia de los iones fosfato del sistema amortiguador no influyen en la reacción de formación del complejo entre la ditizona y el mercurio. La literatura reporta una constante de solubilidad para el fosfato de mercurio (II), $\text{Hg}_3(\text{PO}_4)_2$, igual a $7,9 \cdot 10^{-46}$ (Wagh, Singh, & Jeong, 2000), por lo que, de formarse dicho compuesto, precipitaría rápidamente debido a la baja solubilidad de dicho compuesto y en la práctica esto no ocurre.
8. La calidad de los resultados tuvo una relación directa con la correcta limpieza del material de vidrio. Por ejemplo, la presencia de cinc en el material de trabajo ocasionaba una reacción con la ditizona antes de tiempo. Esto interfería con la determinación adecuada del metal, lo cual obligaba a detener el procedimiento y a empezar de nuevo. Por tal razón, se diseñó un procedimiento para el lavado del material de trabajo (vasos, fiolas, cucharillas de vidrio y agitadores magnéticos). Estos fueron lavados con agua y jabón, para luego ser remojado en ácido nítrico al 10 % durante 12 horas. Luego, fueron remojados en ácido nítrico al 10 % durante 12 horas. Posteriormente, fueron retirados, enjuagados con abundante agua destilada y finalmente con agua ultra pura.
9. Por último, el método aquí desarrollado es una propuesta alternativa para la determinación de metales como el mercurio y el cinc. Las ventajas del empleo de esta técnica son la rapidez y simpleza del análisis; el empleo de un medio acuoso para la solubilización de la ditizona y de los complejos metálicos; el empleo de las micelas del surfactante en reemplazo de otros disolventes de mayor toxicidad; y los volúmenes, relativamente pequeños, utilizados para la formación de los complejos.

4.4 Discusión final

Los complejos metálicos presentan una sola banda de absorción en la región 450 a 550 nm y su formación es dependiente del valor del pH del medio. La máxima absorbancia se produjo a longitudes de onda de 502 nm y 522 nm para el mercurio y el cinc respectivamente. A pesar de que estos metales no son considerados de transición, pues tienen sus orbitales *d* llenos y normalmente sus complejos son de color blanco,

ambos ditizonatos son coloreados, probablemente debido a transiciones electrónicas del ligando, tal como fue mencionado en la sección **2.5.1**.

El cinc y el mercurio son metales del mismo grupo de la tabla periódica, por lo que tienen una reactividad química similar. Los resultados obtenidos de la reacción de ambos metales con la ditizona son similares, se solubilizan en medio acuoso-micelar, la relación molar del metal/ligando es 1:2 y forman complejos coloreados con dicho ligando. El método de detección de ambos métodos dio resultados reproducibles y comparables a los obtenidos por un método de referencia, como es la absorción atómica.

La determinación del cinc no interfirió con la del mercurio, debido a que la formación de sus complejos se realizó a diferentes valores de pH. Se ha reportado que en una mezcla de ambos iones, mientras se forma el complejo de mercurio a pH 2, el cinc permanece en la disolución, pues este requiere un pH más alto para reaccionar. Luego de la determinación de mercurio, se puede alcalinizar la mezcla hasta pH 5, lo que resulta en la descomposición del complejo de mercurio y la combinación de la ditizona liberada con el otro ion metálico, el cinc. (P. & Williams, 1994)

Según la información de la literatura expuesta en la sección introductoria de este trabajo, la ditizona es un ligando bidentado. Coordina al metal por el átomo de azufre y de nitrógeno. La alta afinidad de la ditizona hacia estos metales se puede explicar con la teoría de ácidos y bases duros y blandos (HSAB, por sus siglas en inglés). Donde la regla general establece que los ácidos duros prefieren bases duras, mientras que las bases blandas prefieren ácidos blandos. (Pearson, 1963)

Según esta teoría, el ion Hg^{2+} , es un ácido de Lewis blando, mientras que el de cinc, Zn^{2+} , se encuentra en el límite de blando y duro. Por otro lado, los átomos por los que coordina la ditizona son azufre y nitrógeno. Donde el primero es una base blanda, mientras el nitrógeno es una base dura. De acuerdo a esto, la interacción del ligando y el cinc debe ser mayor o más fuerte, dado que los dos átomos del ligando tienen características similares de dureza, en el caso del enlace Zn-N, y de blandura, en el enlace Zn-S. En el caso del mercurio, la interacción más fuerte es hacia el átomo de azufre, mientras que con el nitrógeno debe de ser más débil.

El sitio donde solubilizarían los complejos metálicos es materia de estudio en la actualidad, pero se cree que debe ser dentro de la micela formada, donde se encuentran las cadenas hidrocarbonadas. El mecanismo probable para la formación de los complejos ditizona-metal es un equilibrio dinámico donde la ditizona disuelta pasa del microambiente en el interior de las micelas a la fase acuosa externa y viceversa. En este sentido, la ditizona puede combinarse con los iones metálicos presentes en la fase acuosa. El complejo formado, es extraído hacia el interior de la micela donde predomina el ambiente no polar. (P. & Williams, 1994)

Estudios sobre la cinética de la reacción de formación del complejo ditizonato de cinc señalan que la reacción se da en varios pasos. El paso determinante es el intercambio del agua coordinada al ion metálico por los ligandos de ditizona. El cinc, hexacoordinado inicialmente, cambia de número de coordinación de seis a cuatro cuando se forma el complejo. La razón de esto es que el intercambio de agua por la ditizona debe acompañarse de un menor impedimento estérico debido al mayor tamaño del ligando respecto del agua. Esto solo se logra cuando se pasa de la estructura octaédrica a la tetraédrica. (Freiser, 1964)

En el caso del mercurio, no se cuenta con estudios sobre el mecanismo de formación del complejo, pero se cree que el comportamiento es similar, dado que el ion Hg^{2+} en solución acuosa también se encuentra hexacoordinado al agua (Pehr-Ake Berstrom, 1992). Dicho enlace, en el cinc, es lábil, por lo que se espera que también lo sea para el mercurio dado que el agua es una base de Lewis dura, mientras que el mercurio es un ácido blando, de manera que la interacción entre el oxígeno del agua y el mercurio no es la preferente. Además, la estructura tetraédrica del complejo ditizonato de mercurio sí ha sido confirmada y ha sido mencionada en la introducción teórica de este trabajo.

La información investigada en la literatura sugiere que la formación de los complejos metálicos entre la ditizona y los iones Hg^{2+} y Zn^{2+} está favorecida no solo por aspectos termodinámicos, sino también cinéticos. Esto representa la base del método

aquí desarrollado. Finalmente, dado que los resultados obtenidos con el método del cinc y del mercurio son similares, se podría inducir que el método aplicado al cadmio debería desarrollarse de manera similar.



5. CONCLUSIONES

- Se implementó, optimizó y validó, satisfactoriamente, el método de detección de mercurio y de cinc mediante espectrofotometría de absorción molecular. El método propuesto es sencillo, rápido y confiable. El desarrollo del método se realizó íntegramente en la sección Química de la Pontificia Universidad Católica del Perú, con los materiales y reactivos aquí disponibles.
- El plan de validación del método fue aplicado satisfactoriamente y se evaluaron todos los parámetros establecidos. Los resultados obtenidos fueron la evidencia de la confiabilidad del método.
- El método desarrollado para la determinación cuantitativa de mercurio y cinc demostró resultados comparables a los obtenidos por otras técnicas instrumentales como la absorción atómica.
- El método de determinación de cinc fue aplicado satisfactoriamente a muestras acuosas; sin embargo, no fue posible su aplicación a muestras sólidas como suelos o sedimentos cuando su contenido en hierro es alto.
- El método de determinación de mercurio fue aplicado con éxito al análisis de una muestra de residuos de mercurio. Su aplicación a las muestras de suelos no fue realizada debido a la poca probabilidad de encontrar al metal en esta matriz.
- Se reemplazó los solventes clorados por el surfactante Tritón X-100, con el propósito de generar residuos de menor peligrosidad, solubilizar a la ditizona, a los ditizonatos de mercurio y de cinc; así como también, evitar los tediosos procesos de extracción líquido-líquido, donde suele haber un gasto de grandes volúmenes de reactivos.
- Se modificó el sistema amortiguador satisfactoriamente. El empleo de los buffers fosfato no afectó el desempeño de las reacciones químicas, puesto que no reacciona con los iones metálicos. Además, el procedimiento de preparación de las disoluciones y de la determinación de los complejos, aquí desarrollado, fue sencillo y permitió ahorrar tiempo.

6. RECOMENDACIONES

- Para trabajos futuros, se recomienda estudiar la influencia de otros iones presentes en el medio de la reacción, y establecer la concentración máxima aceptable de dichos iones, de manera que el desempeño de la reacción no se vea afectado. Asimismo, se puede realizar estudios al agregar enmascarantes al medio de la reacción, para evitar la interferencia de otros iones metálicos.
- El ligando ditizona puede ser reemplazado por otros reactivos, preferencialmente aquellos que tengan grupos sulfhidrilos en su estructura, dado que estos grupos son afines al mercurio y cinc. Es importante el estudio de otros ligandos, debido a que la sensibilidad puede mejorar notablemente mediante el uso de un ligando adecuado y, en consecuencia, se espera una disminución del límite de detección.
- La aplicación del método a la determinación de cinc en un comprimido farmacéutico podría complementarse al analizar diferentes marcas de estos suplementos nutricionales, así como también diferentes lotes de estos medicamentos. De este modo, se puede diseñar un plan de control de calidad.
- La formación de complejos metálicos de la ditizona no se limita al cinc y mercurio, pues existen otros iones metálicos que pueden reaccionar con esta. De ser posible, es necesario realizar estudios con otros metales y así implementar y validar nuevos métodos de detección en medio micelar.
- Se recomienda aprovechar otras propiedades del surfactante. Por ejemplo, el Tritón X-100 ha sido utilizado para realizar procedimientos de pre-concentración del analito, mediante el procedimiento de extracción en el punto de turbidez (CPE, por sus siglas en inglés), característico de los surfactantes no iónicos. Incluso se pueden realizar ensayos con otros surfactantes no iónicos de menos toxicidad que el Tritón.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arizona State University (s/a). *The nature of light*. Consulta: 12 de mayo de 2011.
<<http://www.public.asu.edu/~laserweb/woodbury/classes/chm467/bioanalytical/spectroscopy/absflr.html>>

BERGSTROEM, Pehr-Aake *et al.* (1992). Infrared Spectroscopic Study on the Hydration of Mercury (II), Cadmiun (II), and Zinc (II) in Aqueous Solution and in the Hexahydrated Perchlorate Salts. *Inorganic Chemistry* 1992, 31 (1), 150 -152.

BHAJAN, S., H. KUMAR, S. Lal y RATTAN (1989). Direct Spectrophotometric Determination of Trace Amounts of Mercury (II) in Aqueous Media as its Dithizone Complex in the Presence of a Neutral Surfactant. *Analyst*, 1989, 114, 853-855.

CAEAL P19 - CAEAL Policy on the Estimation of Uncertainty of Measurement in Environmental Testing. Revision 1.8. Consulta: 3 de noviembre de 2011
<http://www.caeal.ca/P19_CAEAL_Unce_Pol.pdf>

CÁRDENAS, P. e I. DÍAZ, (2008). *Química Analítica y Validación de Métodos de Ensayo*. Material de enseñanza. Lima: Instituto de Corrosión y Protección, PUCP.

CLARK, B. J., T. FROST y M. A. RUSSELL. (1993). *UV Spectroscopy, instrumentation, data handling*. London: Chapman & Hall.

COOPER, Stencil y M. L SULLIVAN (1951). Spectrophotometric Studies of Dithizone and some Dithizonates. *Analytical chemistry* 1951, 23 (4), 613-618.

DUGARTE, Luis (2007). *Determinación de Talio Mediante Generación de Hidruros por Espectroscopía de Absorción Atómica*. Tesis de Licenciatura en Química. Mérida: Universidad de los Andes.

Ediciones Científicas Argentinas. (s/a). *Equilibrium Constants*. Consulta: 23 de mayo de 2011.
<<http://www.q1.fcen.uba.ar/materias/qi1/Tablas/kps.pdf>>

ELLISON, S., M. ROSSLEIN y A. WILLIAMS, (2000). *EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. Second edition. Eurachem. ISBN 0 948926 15 5.

EPA. (1980). *Carcinogen Assessment Groups List Carcinogens*. Consulta: 17 de Octubre de 2010 <<http://nepis.epa.gov>>

EPA. (2009). *Mercury. Health effects*. Consulta: 15 de enero de 2011,
<<http://www.epa.gov/mercury/effects.htm>>

FISHER SCIENTIFIC (2004). *Equipos de Espectroscopía de Absorción Atómica*. Consulta: 11 de mayo de 2011.
<http://www.fishersci.com.mx/catalogo/Instru/Espectrof/espectro_buck.htm>

FREISER, B. &. (1964). Kinetics and Mechanism of Extraction of Zinc, Nickel, Cobalt, and Cadmium with Diphenylthiocarbazone, Di-*o*-Tolylthiocarbazone, and Di-*a*-Naphthylthiocarbazone. *Analytical Chemistry* 1964, 36 (12), 2262 - 2265.

G.A.LOVE, C. y C. COBB (1998). Iron (III) Thiocyanate revisited. A Physical Chemistry Equilibrium Lab Incorporating Ionic Strength Effects. *Journal of Chemical Education* 1998, 75 (1), 90-92.

CHRISTIAN, Gary D. (1986). *Analytical Chemistry*. Fourth edition. New York: Wiley.

GARCÍA, A., *et al.* (1986). Spectrophotometric Determination of Mercury (II) and Silver (II) with Copper (II) and Diethyldithiocarbamate in the Presence of Triton X-100. *Talanta* 1986, 33 (8), 697-699.

GARRIDO, M. (2004). Cloud Point Extraction/preconcentration on-line flow injection method for mercury determination. *Analytica Chimica Acta* 2004, 502 (2), 173 - 177.

HARRIS, Daniel (2003). *Quantitative Chemical Analysis*. Sixth Edition. New York. Freeman

HARVEY, D. (2000). *Modern Analytical Chemistry*. Second edition. Mc Graw.Hill. ISBN 0-07-237547-7

HIBBARD, P. L. (1937). A Dithizone Method for Measurement of Small Amounts of Zinc. *Industrial and Engineering Chemistry* 1937, 9 (3), 127-131.

IUPAC GOLDBOOK (2006). *Compendium of Chemical Terminology*. Second edition. Consulta: 28 de octubre de 2010.
<<http://goldbook.iupac.org/L03540.html>>

JCGM (2008) Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement. Consulta: 17 de noviembre de 2011.
http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf

J. T. BAKER (2008). Mercury MSDS. Consulta: 16 de mayo de 2011
<<http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/m1599.htm>>

J. T. BAKER (2008). Zinc MSDS. Consulta: 12 de mayo de 2011.
<<http://www.jtbaker.com/msds/englishhtml/z0858.htm>>

JENSEN, R. E. (1999). *Investigation of Waterborne Epoxies for E-Glass*. Tesis de doctorado en Philosophy in Chemistry. Virginia: Virginia Polytechnic Institute and State University. Consulta: 15 de mayo de 2011
<<http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-070799-133604/unrestricted/ROBJENSEN.PDF>>

KARCHMER, J. H. (1971). *The analytical chemistry of sulfur and its compounds*. Vol. 2. New York : Wiley-Interscience.

KHAN, H. y Ahmed J. (2005). A Simple Spectrophotometric Determination of Trace Level Mercury Using 1,5-Dyphenylthiocarbazone Solubilized in Micelle. *Analytical Sciences* 2005, 21 (5), 507- 512.

KAMBUROVA, M. (1993). Spectrophotometric Determination of Mercury in Soils with Trtriphenyltetrazolium Chloride. *Talanta* 1993, 40 (5), 719-723.

L. P., Yu (2005). Cloud Point Extraction Preconcentration Prior to High-Performance Liquid Chromatographic Coupled with Cold Vapor Generation Atomic Fluorescence Spectrometry for Speciation Analysis of Mercury in Fish Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005, 53 (25), 9656 - 9662.

MARÍN, Rafael (1995). *Análisis de aguas y ensayos de tratamiento: Principios y aplicaciones*. Barcelona: Gestión y promoción editorial.

McILVAINE, T. (1921). A Buffer Solution for Colorimetric Comparison. *Journal of Biological Chemistry* 1921, 49, 183-186.

MEDEL, M. G. (1986). Dye Surfactant Interactions: A Review. *Talanta* 1986, 33 (3), 255 - 264.

MERIWETHER, L., E. BREITHER & C. SLOAN (1965). The Photochromism of Metal Dithizonates. *Journal of the American Chemical Society* 1965, 87 (20), 4441-4448.

MILLER, J. C. (1993). *Estadística para Química Analítica*. Segunda edición. Wilmington: Addison Wesley.

MORRISON, G. (1957). *Solvent extraction in analytical chemistry*. New York: Wiley.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (2011). *Zinc. Dietary Supplement Fact Sheet*. Consulta: 16 de mayo de 2011 .
<<http://ods.od.nih.gov/factsheets/Zinc-HealthProfessional/>>

New Mexico State University (2006). *Atomic Absorption Spectroscopy (AAS)*. Consulta: 12 de mayo de 2011
<<http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/AAS1.html>>

NIOSH. (1994). *Mercury: Method 6009*. Consulta: 20 de enero de 2011.
<<http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/6009.pdf>>

NIOSH. (1994). *ZINC and compounds, as Zn: Method 7030*. Consulta: 20 de enero de 2011.
<<http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/7030.pdf>>

PARADKAR, Rajesh, y Ron R. WILLIAMS, (1994). Micellar Colorimetric Determination of Dithizone Metal Chelates. *Analytical Chemistry* 1994, 66 (17), 2752-2756.

PEARSON, R. G. (1963). Hard and Soft Acids and Bases. *Journal of the American Chemical Society* 1963, 85 (22), 3533 - 3539.

REICHLER, Randy (1975). Zinc Hydroxide: Solubility Product and Hydroxy-Complex Stability Constants from 12,5 to 75 °C. *Canadian Journal of Chemistry* 1975, 53 (24), 3841-3845.

RISHER, J. (2003). *Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects*. Consulta: 20 de abril de 2011 <<http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad50.pdf>>

SANDELL, E. B. y H.ONISHI (1978). *Photometric Determination of Traces of Metals*. New York: John Wiley and Sons.

SCIENCELAB.COM (2010). *Dithizone MSDS*. Consulta: 5 de enero de 2011. <<http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9923872>>

Science Teachers' Association (s/a). Preparation of buffer solutions. Consulta: 05 de mayo de 2010. <<http://www.bcscta.ca/resources/hebden/chem/Making%20Buffers.pdf>>

SERVANT, D. M. y J. J. COX. (1973). The Reaction of Gold and Dithizone. *Analytica Chimica Acta* 1973, 66 (1), 123-129.

SETTLE, F. (1997). *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. New Jersey: Prentice Hall .

SINGH, R. (1980). Stability constants of phthalate complexes of copper (II), nickel (II), zinc (II), cobalt (II), uranyl (II) and thorium (IV) by paper electrophoresis. *Chromatographia* 1980, 13 (11), 709-711.

SKOOG, H. C. (2007). *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*. Toronto: Thomsom Brooks/Cole.

SKOOG, H., HOLLER, y NIEMAN. (1992). *Principios de Análisis Instrumental*. Madrid: Mc Graw Hill.

SNELL, F. (1967). *Colorimetric methods of analysis: including photometric methods*. Toronto: D. Van Nostrand.

SONG, J. Y., Ming HOU y Li Xiang ZHANG (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* 2006, 17 (9), 1217-1220.

SUBBARAMAN, P.R. y M. CORDES. (1969). Effect of Auxiliary Complexing Agents on the Rate of Extraction of Zinc (II) and Nickel (II) with Diphenylthiocarbazone. *Analytical Chemistry* 1969, 41 (13), 1878-1880.

THERMO SPECTRONIC (2001). *Basic UV-Vis Theory: Concepts and Applications*. Consulta: 16 de mayo de 2011. <http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_12067.pdf>

TYLER, Geoff (1991). *AA or ICP – Which Do You Choose?*. Consulta: 10 de mayo de 2011.

<<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/ICPES003.pdf>>

VALLEE, B. L. (1948). An Improved Dithizone Method for the Determination of Small Quantities of Zinc in Blood and Tissue Samples. *The Journal of Biological Chemistry* 1948, 176, 435-443.

WAGH, A. S., D. SINGH, y A. S. JEONG (2000). *Mercury Stabilization in Chemically Bonded Phosphate Ceramics*. Department of Energy. Chicago

WALCO S.A. (1997). *Todo sobre los quelatos*. Consulta: 20 de mayo de 2011.

<http://www.drcalderonlabs.com/Publicaciones/Cartilla_Quelatos.pdf>

WEAST, R. (1972). *Handbook of Chemistry and Physics*. Ohio: CRC press.

WHITE, Wayne. (1936). Dithizone as an Analytical Reagent. *Journal of Chemical Education* 1936, 13 (8), 369-373.

WHO. (2007). *Exposure to Mercury: A Major Public Health Concern*. Geneva: WHO Document Production Services.

WHO. (1996). *Zinc in drinking-water*. Geneva: WHO Document Production Services.