

UCH-FC
Doc-Q
0881
C. 1



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias
Programa de Doctorado en Química

**DESARROLLO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA
DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE MERCURIO
MEDIANTE ESPECTROFLUORIMETRÍA EN FASE SÓLIDA.**

Tesis

Entregada a la Universidad De Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de

Doctora en Química

Facultad de Ciencias

Por

Romina Mackarena Otipka Álvarez

Director de Tesis: María Inés Toral Ponce

Marzo, 2017.

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS**

**INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA**

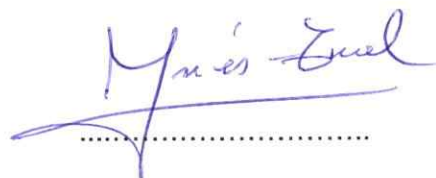
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

ROMINA MACKARENNA OTIPKA ÁLVAREZ

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 27 de octubre del 2016.

Director de Tesis:

Dra. María Inés Toral Ponce



Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Pablo Richter (Presidente)



Dra. Inés Ahumada



Dra. Verónica Arancibia



Dr. Manuel Bravo



"No desistas. Generalmente es la última llave

del llavero la que abre la puerta"

RESUMEN BIBLIOGRÁFICO



Romina Otipka Álvarez nació en Santiago de Chile el 6 de noviembre de 1986. Se graduó de cuarto medio en el año 2004 del Colegio Los Nogales. En el año 2006 ingresó a la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, donde obtuvo el grado académico de Licenciada en Ciencias con Mención en Química en el año 2010. En el año 2011 ingresa al Programa de Doctorado en Química de la Universidad de Chile, desarrollando su tesis doctoral en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias bajo la dirección de la Profesora María Inés Toral Ponce. Durante este periodo la candidata a Doctor en Química se realizó tanto profesional como personalmente, contrayendo matrimonio en el año 2014 y concibiendo a su pequeña hija a fines del mismo, Maite Silva Otipka. En el año 2017 terminó con éxito su Tesis Doctoral y se gradúa de Doctor en Química.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera comenzar agradeciendo a mi madre, Erika, una mujer de una fuerza y bondad envidiable, que supo superar las barreras que la vida le iba colocando, entregándome todos los valores que me hacen la mujer que soy ahora. Me enseñó lo que es el respeto, la perseverancia, a ser estudiosa y por sobre todo que con esfuerzo todo se puede lograr. Gracias por su amor y apoyo incondicional, sobre todo al momento de ser mamá. A mi abuela, Raquel, que, aunque ya no está conmigo, siempre me cuida y protege. Me enseñó a ser una persona leal y honesta, la extraño y recuerdo todos los días de mi vida, gracias por todo. A mi Tía Lily y prima Nayra, por su preocupación y apoyo en todo momento.

A mi esposo, Raúl, por siempre apoyarme en perseguir mis sueños y conseguir mis metas, por aconsejarme y entregarme todo el amor que tiene. Por la familia que hemos formado y sobre todo, por hacerme feliz. A mi hija, Maite, por alegrarme todos los días, por esa capacidad de hacerme olvidar los problemas con una simple sonrisa, por enseñarme lo que es el amor incondicional. Eres mi vida, el motor que me guía en todo lo que hago, eres la personita que le da luz a mi vida. Gracias por entregarme el amor más noble y puro que alguien puede conocer.

A mi suegra, Mónica, a mi suegro, Raúl, mis cuñados Javier, Daniel y Mónica y mi sobrina Alexandra. Gracias por apoyarme en esta etapa tan importante, por sus palabras y sobre todo por el amor que le entregan a mi Maite. Gracias a los que ya no están conmigo para compartir este momento en persona, pero estarán a mi lado dándome el coraje necesario para culminar esta tarea; Tío Ramiro, Tata Julio, Abuelita Flor, Tata Raúl y a mi viejita Raquel.

A mis amigos de la universidad y del laboratorio, por sus risas, sus abrazos, sus consejos y su apoyo. Por hacer del trabajo un mejor lugar, al cual da gusto llegar y comenzar a trabajar.

A mi profesora tutora, Profe Meme, por enseñarme el amor a la Química Analítica y por guiarme en cómo ser un mejor científico. Como olvidar el electivo de Trazabilidad, los viernes por la tarde, que hicieron que me encantara de esta rama de la Química. Por acogerme en su laboratorio desde que estaba en pregrado, por escucharme, apoyarme, aconsejarme, por su confianza y por estar siempre que la necesite. Por la amistad que hemos forjado a lo largo de los años, que tengo la seguridad durará para toda la vida.

A los profesores que formaron mi educación en el pregrado, entregándome todas las herramientas para lograr llegar donde estoy. Por su colaboración en esta tesis, a la Profesora Sylvia Copaja y Ernesto Clavijo.

A los profesores de la comisión evaluadora de mi tesis doctoral, por ser un aporte con sus críticas constructivas y guiarme en este proceso. Por contribuir de manera sustancial a mi formación como Doctor en Química.

A CONICYT por otorgarme las Becas Nacional de Doctorado en Chile y la beca de Gastos Operacionales.

Finalmente, agradecer a todas las personas que estuvieron apoyándome en esta etapa importante de mi vida y a Dios.

PUBLICACIONES

- ◆ M.I.Toral*, C. Soto, D. Contreras, R. Otipka, D. Pino, J. Yañez. *Determination and co-estimate of the chlormadinone acetate and 17 α -ethinylestradiol in pharmaceutical formulation and drinking water samples by digital derivative spectrophotometry.* J. Chil. Chem. Soc., 59, N° 2, 2485-2489 (2014).
- ◆ M.I. Toral*, F. Nacaratte, F. Nova, R. Otipka. *Parallel determination of desogestrel and 17-ethinylestradiol in pharmaceutical formulation by derivative spectrophotometry.* J. Chil. Chem. Soc., 58, N° 2, 1779-1788 (2013).
- ◆ M.I.Toral*, C. Soto, D. Contreras, R. Otipka. *Co-determination of two antiparasitics drugs by derivative spectrophotometry and its photodegradation studies.* J. Chil. Chem. Soc., 58, N° 3, 1824-1829 (2013).

PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

- 2015 Development of an analytical method for the determination of Hg (II) and CH₃Hg⁺ at the state of complex by spectrofluorimetry. R.Otipka, M.I. Toral. EUROANALYSIS 2015 Conference, 6 al 10 de Septiembre 2015, Bordeaux, France.
- 2014 Determination of Hg(II) and CH₃Hg⁺ in solid phase by spectrofluorimetry. M.I. Toral, C. Melendez, R.Otipka. SCIX 2014, 28 Septiembre al 3 Octubre, Reno, NV.
- 2014 Determinación y cuantificación de Hg(II) y CH₃Hg⁺ al estado de complejo en fase sólida. R.Otipka, C. Meléndez, M.I. Toral. VII Congreso Iberoamericano de Física y Química Ambiental- XII Encuentro de Química Analítica y Ambiental, 6 al 10 de Octubre del 2014, Viña del Mar, Chile
- 2013 Estudios preliminares para el desarrollo de un nuevo método analítico basado en la complejación de Hg(II) y CH₃Hg⁺ a través del 2,5-dimercapto-1,3,4-tiodiazol en fase sólida por espectrofluorimetría. R. Otipka, C. Soto, M.I. Toral. VII CAQA, 1 al 4 de octubre, Mendoza, Argentina.
- 2013 Retención y determinación de Hg(II) al estado de complejo a través del 2,5-dimercapto-1,3,4-tiodiazol en fase sólida mediante espectrofluorimetría. Autores: M.I. Toral, R. Otipka. XXX Jornadas Chilenas de Química, 12 al 15 de noviembre, 2013, Pucón, Chile.
- 2012 Estudios preliminares para la determinación y cuantificación de mercurio (II) en fase sólida. Autores: R. Otipka, C. Soto, M.I. Toral. XI Encuentro de Química Analítica y Ambiental, 12 al 16 de noviembre del 2012, Antofagasta, Chile.

2011 Ensayos preliminares de la extracción de florfenicol para su posterior determinación en fase sólida. R. Otipka, M.I. Toral, P. Richter. XXIX Jornadas Chilenas de Química, 8 al 11 de noviembre del 2011, Linares, Chile.

2010 Determinación simultanea de praziquantel y fenbendazol en formulaciones farmacéuticas veterinarias por espectrofotometría derivada de segundo orden. C. Soto, M.I.Toral, R. Otipka, S. Orellana . X Encuentro de Química Analítica y Ambiental, 14 al 17 de noviembre, Viña del Mar, Chile.

2010 Determination of praziquantel and fenbendazole by second derivative spectrophotometry. C. Soto, M.I.Toral, R. Otipka, S. Orellana 37th FACSS, 17 al 21 de octubre del 2010, Raleigh, Estados Unidos.

2009 Caracterización de compuestos de inclusión de alfa-ciclodextrinas con tioles mediante H-RMN de monocristales. P. Jara, E. Lang, V. Bernales, R. Otipka, M. Díaz, N. Yutronic. XXVIII Jornada Chilena de Química, 3 al 6 de noviembre del 2009, Chillan, Chile.

INDICE GENERAL

INDICE TABLAS.....	xiii
INDICE FIGURAS.....	xiv
ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMEN.....	xix
SUMMARY.....	xxii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Espectrofluorimetría.....	4
1.3. Preconcentración.....	6
1.4. Ligantes.....	10
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	14
2.1. Hipótesis.....	14
2.2. Objetivos.....	14
2.2.1. Objetivo General.....	14
2.2.2. Objetivos específicos.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.1. Materiales.....	16
3.2. Reactivos.....	16
3.3. Aparatos e instrumentos.....	17

3.4. Metodología	18
3.4.1. Preparación de soluciones estándar	18
3.4.2. Efecto del pH sobre la conducta espectral de los ligantes mediante espectrofotometría UV-Vis	18
3.4.3. Efecto del pH en la formación de los complejos mediante espectrofotometría UV-Vis	19
3.4.4. Curvas de calibración en solución acuosa mediante espectrofotometría UV-Vis	20
3.4.5. Determinación de la estequiometría de los complejos mediante el método de Job.....	20
3.4.6. Selección del intercambiador aniónico	22
3.4.7. Selección de la longitud de onda de excitación y $slit_{exc/em}$	22
3.4.8. Optimización de las variables químicas en las preconcentración.....	23
3.4.9. Optimización de las variables de preconcentración	25
3.4.10. Caracterización de los complejos.....	29
3.4.11. Muestreo Reserva nacional Río Clarillo	30
3.4.12. Validación de los métodos analíticos	31
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1. Efecto del pH sobre la conducta espectral de los ligantes mediante espectrofotometría UV-Vis.....	35
4.2. Efecto del pH en la formación de los complejos mediante espectrofotometría UV-Vis.....	38
4.2.1. Efecto del pH en la formación del complejo de Hg (II).....	38
4.2.2. Efecto del pH en la formación del complejo de CH_3Hg^+	41
4.3. Curvas de calibración de los complejos en solución acuosa mediante espectrofotometría UV-Vis.....	43
4.3.1. Curva de calibración en solución acuosa del complejo Hg (II)-DMTD	

mediante espectrofotometría UV-Vis	44
4.3.2. Curvas de calibración en solución acuosa del complejo CH_3Hg^+ - DMTD mediante espectrofotometría UV-Vis	44
4.4. Determinación de la estequiometría de los complejos.....	47
4.4.1. Estequiometría del complejo de Hg (II) con DMTD.....	47
4.4.2. Estequiometría del complejo de CH_3Hg^+ con DMTD	50
4.4.3. Determinación de la constante de formación condicional K_f	52
4.5. Selección del intercambiador aniónico.....	56
4.6. Selección de la longitud de onda de excitación, λ_{exc} , y $Slit_{exc/em}$	57
4.7. Optimización de las variables químicas y de preconcentración.....	61
4.7.1. Efecto de la concentración de DMTD.....	61
4.7.2. Efecto de la concentración del amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9	62
4.7.3. Efecto de la masa de resina DEAE Sephadex A25	63
4.7.4. Efecto del tiempo de agitación	65
4.7.5. Efecto del volumen de la solución.....	65
4.8. Caracterización de los complejos	67
4.8.1. Espectroscopía Infrarroja, FT-IR.....	67
4.8.2. Microscopía electrónica de barrido, SEM.....	70
4.8.3. Energía de dispersión de rayos X, EDX.....	73
4.9. Validación del método.....	81
4.9.1. Linealidad del sistema.....	81
4.9.2. Linealidad del método	82
4.9.3. Selectividad.....	86
4.9.4. Precisión y exactitud	91
4.10. Aplicación	92

5. CONCLUSIONES	94
6. BIBLIOGRAFÍA	96

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Volúmenes utilizados de ligante y metal para determinar la estequiometría del complejo mediante el Método de Job.	21
Tabla 2. Parámetros analíticos de los complejos en solución acuosa mediante espectrofotometría UV-Vis.	46
Tabla 3. Constante de formación condicional y coeficiente de absortividad molar de los complejos.	55
Tabla 4. Parámetros analíticos del sistema obtenidos para el complejo Hg(II)-DMTD y CH ₃ Hg-DMTD retenidos en el intercambiador DEAE Sephadex A25 mediante espectrofluorimetría.	82
Tabla 5. Parámetros Fisicoquímicos medidos <i>in situ</i> en la toma de muestras de la Reserva Nacional del Río Clarillo.	83
Tabla 6. Parámetros analíticos en la matriz del agua del Río Clarillo.	85
Tabla 7. Estudios de interferentes para evaluar la selectividad del método.	86
Tabla 8. Límites de tolerancia obtenidos al en presencia de EDTA y etilendiamina (EN).	91
Tabla 9. Resultados de precisión y exactitud para el complejo Hg(II)-DMTD retenido en DEAE Sephadex A25 mediante espectrofluorimetría.	91
Tabla 10. Resultados de precisión y exactitud para el complejo CH ₃ Hg ⁺ -DMTD retenido en DEAE Sephadex A25 mediante espectrofluorimetría.	92
Tabla 11. Aplicación del método en muestras enriquecidas.	93

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del mercurio.	2
Figura 2. Diagrama de Jablonski.	5
Figura 3. Mecanismo de intercambio aniónico.	8
Figura 4. Estructura química Sephadex.	9
Figura 5. Estructura química de los ligantes.	10
Figura 6. Distribución de especies de acuerdo al pH del ligante DMTD.	11
Figura 7. Distribución de especies de acuerdo al pH del ligante MBT.	11
Figura 8. Distribución de especies de acuerdo al pH del ligante MBI.	12
Figura 9. Mapa satelital Reserva Nacional del Río Clarillo zona Peumo B.	30
Figura 10. Mapa interno Reserva Nacional del Río Clarillo.	31
Figura 11. Espectros de absorción de los ligantes (a) DMTD (b) MBT (c) MBI a distintos valores de pH. Concentración 1,5 mg/L.	35
Figura 12. Gráficos de pH en función de la absorbancia de la señal analítica mediante espectrofotometría UV-Vis de los ligantes (a) DMTD (b) MBT y (c) MBI.	37
Figura 13. Espectros de absorción de los complejos en solución a distintos valores de pH (a) DMTD-Hg (II) (b) MBI-Hg (II) (c) MBT-Hg (II).	39
Figura 14. Espectros de absorción de los complejos en solución a distintos valores de pH (a) CH ₃ Hg ⁺ -DMTD (b) CH ₃ Hg ⁺ -MBI (c) CH ₃ Hg ⁺ -MBT.	41
Figura 15. (a) Espectros de absorción clásicos para la curva de calibración de Hg (II)-DMTD en solución (b) Gráfica obtenida de la curva de calibración de Hg (II)-DMTD en solución.	44
Figura 16. (a) Espectros de absorción clásicos para la curva de calibración de CH ₃ Hg ⁺ -DMTD en solución (b) Gráfica obtenida de la curva de calibración de CH ₃ Hg ⁺ -DMTD en solución.	45
Figura 17. Espectros de absorción de Hg (II) en disolución acuosa.	48
Figura 18. Gráfica de Job para la formación del complejo Hg(II)-DMTD. Buffer H ₃ BO ₃ /H ₂ BO ₃ Na 0,1 M pH 9, λ= 347,5 nm.	49
Figura 19. Espectros de absorción de CH ₃ Hg ⁺ en disolución acuosa.	50

Figura 20. Gráfica de Job para la formación del complejo CH_3Hg^+ -DMTD. Buffer $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3\text{Na}$ 0,1 M pH 9, $\lambda = 280$ nm.	51
Figura 21. Espectros de fluorescencia de las resinas aniónicas.	56
Figura 22. Espectros de absorción de DMTD, DMTD pH 9, Hg (II)-DMTD en solución y en el intercambiador Sephadex A25	57
Figura 23. Gráfico 3D para el complejo Hg(II)-DMTD	58
Figura 24. Gráfico 3D CH_3Hg^+ -DMTD.	59
Figura 25. Espectros de fluorescencia de la resina DEAE Sephadex A25 y los complejos en el intercambiador. $\lambda_{\text{exc}} = 314$ nm $\text{slit}_{\text{exc/em}} = 10/20$	60
Figura 26. Gráfico del efecto de la concentración de DMTD sobre la señal analítica de los complejos retenidos en el intercambiador. (a) CH_3Hg^+ -DMTD (b) Hg (II)-DMTD. CH_3Hg^+ 13 ug/L, Hg (II) 12 ug/L, 8 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9, 70 mg de DEAE Sephadex A25, 30 min de agitación.	62
Figura 27. Gráfico del efecto del volumen de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9 sobre la señal analítica de los complejos retenidos en el intercambiador. (a) CH_3Hg^+ -DMTD (b) Hg (II)-DMTD. CH_3Hg^+ 13 ug/L, Hg (II) 12 ug/L, 70 mg de DEAE Sephadex A25, 30 min de agitación, 11 mg/L de DMTD.	63
Figura 28. Gráfico del efecto de la masa de resina DEAE Sephadex A25 sobre la señal analítica de los complejos retenidos en el intercambiador. (a) CH_3Hg^+ -DMTD (b) Hg (II)-DMTD. CH_3Hg^+ 13 ug/L, Hg (II) 12 ug/L, 8 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9, 30 min de agitación y 11 mg/L de DMTD.	64
Figura 29. Gráfico del efecto del tiempo de agitación sobre la señal analítica de los complejos retenidos en el intercambiador. (a) CH_3Hg^+ -DMTD (b) Hg (II)-DMTD. CH_3Hg^+ 13 ug/L, Hg (II) 12 ug/L, 8 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9, 70 mg de DEAE Sephadex A25, 11 mg/L de DMTD.	65
Figura 30. Efecto en el volumen de la solución sobre la señal analítica de los complejos retenidos en el intercambiador. (a) CH_3Hg^+ -DMTD (b) Hg (II)-DMTD. CH_3Hg^+ 13 ug/L, Hg (II) 12 ug/L, 8 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M	66

pH 9, 70 mg de DEAE Sephadex A25, 11 mg/L de DMTD, 30 minutos de agitación.

Figura 31. Variables optimizadas de los complejos de Hg (II)-DMTD y CH_3Hg^+ -DMTD, retenidos en el intercambiador DEAE Sephadex A25.	67
Figura 32. Espectro FT-IR del blanco DEAE Sephadex A25.	68
Figura 33. Espectro FT-IR del complejo Hg(II)-DMTD retenido en DEAE Sephadex A25.	68
Figura 34. Espectro FT-IR del complejo CH_3Hg^+ -DMTD retenidos en DEAE Sephadex A25.	69
Figura 35. Imágenes SEM de una muestra blanco en el intercambiador DEAE Sephadex A25.	71
Figura 36. Imágenes SEM de DEAE Sephadex A25 con el complejo Hg (II)-DMTD.	71
Figura 37. Imágenes SEM de DEAE Sephadex A25 con el complejo CH_3Hg^+ -DMTD.	72
Figura 38. Gráfico de la proporción relativa de los componentes del blanco DEAE Sephadex A25.	73
Figura 39. Proporción relativa del complejo Hg(II)-DMTD.	74
Figura 40. Proporción relativa del complejo CH_3Hg^+ -DMTD.	74
Figura 41. Mapeo EDX del complejo CH_3Hg^+ -DMTD.	76
Figura 42. Mapeo EDX del complejo Hg (II)-DMTD.	77
Figura 43. Estructura propuesta para el complejo Hg(II)-DMTD en 2D y 3D.	79
Figura 44. Estructura propuesta para el complejo CH_3Hg^+ - DMTD en 2D y 3D	79
Figura 45. Estructura DEAE Sephadex A25.	80
Figura 46. (a) Espectros de fluorescencia de Hg(II)-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25. (b) Curva de calibración de Hg(II)-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25.	81
Figura 47. (a) Espectros de fluorescencia de CH_3Hg^+ -DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25. (b) Curva de calibración de CH_3Hg^+ -DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25.	81

Figura 48. (a) Espectros de fluorescencia de Hg(II)-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25, utilizando como blanco de matriz agua del Río Clarillo. (b) Curva de calibración de Hg(II)-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25.	84
Figura 49. (a) Espectros de fluorescencia de CH ₃ Hg ⁺ -DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25, utilizando como blanco de matriz agua del Río Clarillo. (b) Curva de calibración de CH ₃ Hg ⁺ -DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25.	84
Figura 50. Espectros de fluorescencia del complejo Hg(II)-DMTD retenido en DEAE Sephadex A25 con interferente, EDTA y EN.	88
Figura 51. Espectros de fluorescencia del complejo CH ₃ Hg ⁺ -DMTD retenido en DEAE Sephadex A25 con interferente, EDTA y EN.	89
Figura 52. Espectros de fluorescencia del complejo Hg(II)-DMTD retenido en DEAE Sephadex A25 con interferente, EDTA y EN.	90
Figura 53. Espectros de fluorescencia del complejo CH ₃ Hg ⁺ -DMTD retenido en DEAE Sephadex A25 con interferente, EDTA y EN.	90

ABREVIATURAS

OMS	:Organización Mundial de la Salud.
INN	:Instituto Nacional de Normalización.
GC-CV-AFS	:Cromatografía gaseosa de vapor frío acoplada a espectrometría atómica de fluorescencia.
CV-AFS	:Espectrometría atómica de fluorescencia de vapor frío.
ICP-MS	:Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente.
ICP-AES	:Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente.
GC-AAS	:Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de absorción atómica.
UV-Vis.	:Espectrofotometría ultravioleta-visible.
SPE	:Extracción en fase sólida.
DMTD	:2,5-dimercapto-1,3,4-tiodiazol.
MBT	:2-mercaptobenzotiazol.
MBI	:2-mercaptobenzoimidazol.
DEAE	:Dietilaminoetil.
SEM	:Microscopía electrónica de barrido.
LC	:Límite de cuantificación.
LD	:Límite de detección.
EDTA	:Ácido etilendiaminotetraacético.
EN	:Etilendiamina.
DER	:Desviación estándar relativa.
LLE	:Extracción líquido-líquido.

RESUMEN

Esta investigación se enfocó en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación y cuantificación de dos especies de mercurio, Hg (II) y CH₃Hg⁺, mediante la formación de un complejo aniónico con el ligante 2,5-dimercapto-1,3,4-tiodiazol (DMTD), retenido en una resina de intercambio aniónico DEAE Sephadex A25, donde la medición instrumental se realizó a través de espectrofluorimetría, sin una etapa previa de elución, sino que medido directamente en fase sólida.

En primera instancia se seleccionaron tres ligantes para desarrollar los métodos: (2-mercaptobenzotiazol (MBT), 2,5-dimercapto-1,3,4-tiodiazol (DMTD) y 2-mercaptobenzimidazol (MBI)). Se seleccionó el ligante DMTD y se trabajó a pH 9, ya que a ese valor de pH existe el predominio de la especie desprotonada, que podría formar con Hg (II) y CH₃Hg⁺ complejos aniónicos estables permitiendo su retención en una resina de intercambio aniónico. Los ligantes MBI y MBT fueron descartados como agente complejante, debido a la precipitación de estos a pH básico. Se seleccionó como amortiguador H₃BO₃/NaH₂BO₃ 0,1 M pH 9.

Se determinó la estequiometría de los complejos mediante el Método de Job, siendo 1:2 para el complejo Hg (II)-DMTD y 1:1 para el complejo CH₃Hg⁺-DMTD. También se determinó la constante de formación condicional (K_f') de los complejos, obteniéndose $1,29 \times 10^6$ y $3,26 \times 10^6$ para el complejo con Hg (II) y para el de CH₃Hg⁺, respectivamente.

Se estudiaron dos tipos de intercambiadores aniónicos mediante espectrofluorimetría: BioRAD AG2X8 y DEAE Sephadex A25. Se seleccionó DEAE Sephadex A25, ya que presenta señales definidas, además esta resina presenta gránulos regulares, favoreciendo el empaquetamiento de ésta en la celda de fluorescencia. Se seleccionaron

las longitudes de onda de excitación y $\lambda_{exc/em}$ de los complejos en fase sólida mediante espectrofluorimetría, obteniéndose, 314 nm y un $\lambda_{exc/em} = 10/20$, respectivamente. Se optimizaron las variables químicas y de preconcentración mediante espectrofluorimetría para ambos complejos. Las condiciones optimizadas para el complejo Hg (II)-DMTD fueron: 11 mg/L DMTD, 6 mL de amortiguador H_3BO_3/NaH_2BO_3 0,1 M pH 9, 70 mg de resina DEAE Sephadex A25, 30 min de agitación, 100 mL de volumen final de solución. Para el caso del complejo CH_3Hg^+ -DMTD fueron: 11 mg/L DMTD, 7 mL de amortiguador H_3BO_3/NaH_2BO_3 0,1 M pH 9, 70 mg de resina DEAE Sephadex A25, 30 min de agitación, 100 mL de volumen final de solución.

Posteriormente se caracterizaron los complejos mediante FT-IR, SEM y EDX. A través de los resultados obtenidos mediante FT-IR no se pudo caracterizar cuantitativamente la muestra, debido a que los anchos de banda son muy grandes. Con respecto a SEM y EDX se logró verificar la retención de los analitos en la resina al estado de complejo y además corroborar la estequiometría obtenida mediante el Método de Job. Siendo 1:1,95 para el complejo Hg (II)-DMTD y 1:0,82 para el complejo CH_3Hg^+ -DMTD.

Se realizó la validación de los métodos desarrollados. En primera instancia se evaluó la linealidad del sistema y del método. Para este último se utilizó como blanco de matriz una muestra de agua del Rio Clarillo, tomada en la zona más alta del río, con el fin de ser considerado como punto limpio, libre de mercurio y sus especies. Se determinaron los LC y LD llegando a 16,1 ng/L y 48,6 ng/L para Hg (II), y 12,7 ng/L y 41,9 ng/L para CH_3Hg^+ , respectivamente. Y una DER menor a 3%. Se evaluó la selectividad del método, realizando un estudio de interferentes aniónicos y catiónicos, en donde se estimó que existen 3 posibles interferencias: Ag (I), Cu (II) y Zn (II), en donde, Ag (I) y Zn (II) fue

eliminada mediante la adición de EDTA 0,1 M. Con respecto al Cu (II), esta se pudo eliminar a través de EN.

Finalmente se aplicó el método en muestras de agua potable y agua de río fortificadas con los analitos en estudio, permitiendo la cuantificación y detección de las especies de mercurio al estado de complejo retenidos en la resina de intercambio aniónico a niveles de concentración del ng/L.

SUMMARY

This research focused on the development of analytical methods for the determination and quantification of two mercury species, Hg (II) and CH₃Hg⁺, by the formation of an anionic complex with the 2,5-dimercapto-1,3,4-thiodiazole (DMTD), retained on an anion exchange resin DEAE Sephadex A25, where instrumental measurement was performed through spectrofluorimetry, without a previous elution step, but measured directly in the solid phase.

In the first instance, three ligands were selected for the method development: (2-mercaptobenzothiazole (MBT), 2,5-dimercapto-1,3,4-thiodiazole (DMTD) and 2-mercaptobenzoimidazole (MBI)). DMTD was selected at pH 9, since at that pH value there is the predominance of the deprotonated species, which could form with Hg (II) and CH₃Hg⁺ stable anionic complexes allowing its retention in an anion exchange resin. The MBI and MBT ligands were discarded as a complexing agent due to the precipitation of these at basic pH. H₃BO₃/NaH₂BO₃ 0.1 M pH 9 was selected as a buffer.

The stoichiometry of the complexes was determined by the Job Method, with 1:2 for the Hg (II)-DMTD complex and 1:1 for the CH₃Hg⁺-DMTD complex. Also the conditional formation constant (K'_f) of the complexes was determined, obtaining 1.29×10^6 and 3.26×10^6 for the complex with Hg (II) and for that of CH₃Hg⁺, respectively.

Two types of anion exchange resin were studied by spectrofluorimetry: BioRAD AG2X8 and DEAE Sephadex A25. DEAE Sephadex A25 was selected, since it has defined signals, besides this resin presents regular granules, favoring the packaging of this one in the cell of fluorescence. The excitation wavelengths and $\text{slit}_{\text{ext/em}}$ of the solid phase complexes were selected by spectrofluorimetry, obtaining, 314 nm and $\text{slit}_{\text{ext/em}} = 10/20$,

respectively. The chemical and preconcentration variables were optimized by spectrofluorimetry for both complexes. The optimized conditions for the Hg(II)-DMTD complex were: 11 mg/L DMTD, 6 mL of buffer $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0.1M pH 9, 70 mg of DEAE Sephadex A25, 30 min stirring, 100 mL of final volume of solution. For the case of the CH_3Hg^+ -DMTD complex were: 11 mg/L DMTD, 7 mL of buffer $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0.1 M pH 9, 70 mg DEAE Sephadex A25 resin, 30 min stirring, 100 mL final solution volume.

Subsequently the complexes were characterized by FT-IR, SEM and EDX. Through the results obtained by FT-IR, it was not possible to characterize the sample quantitatively, because the bandwidths are very large. With regard to SEM and EDX, it was possible to verify the retention of the analytes in the resin to the state of complex and also corroborate the stoichiometry obtained by the Job Method. Being 1: 1.95 for the Hg (II) -DMTD complex and 1: 0.82 for the CH_3Hg^+ -DMTD complex.

Validation of the developed methods was carried out. In the first instance, the linearity of the system and method was evaluated. For the latter it was used as a matrix blank a sample of water from the Clarillo River, taken in the highest part of the river, in order to be considered as a clean, mercury-free point and its species. LC and LD were calculated being 16.1 ng/L and 48.6 ng/L for Hg (II), and 12.7 ng/L and 41.9 ng/L for CH_3Hg^+ , respectively. And a RSD of less than 3%. The selectivity of the method was evaluated by a study of anionic and cationic interferences, where it was estimated that there are three possible interferences: Ag(I), Cu(II) and Zn(II), where, Ag (I) and Zn (II) ions was eliminated by the addition of EDTA 0.1 M. With regard to Cu (II) it was possible to remove it with EN.

Finally, the method was applied to samples of drinking water and river water enriched with the analyzed analytes, allowing the quantification and detection of the mercury

species at the state of complex retained in the anion exchange resin at concentration levels of ng/L.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Los metales pesados han sido por décadas uno de los principales contaminantes a nivel medio ambiental, siendo reconocidos por su elevada toxicidad, alto impacto ecológico y en la salud humana. Dentro de los principales se tiene: Arsénico (As), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Cromo (Cr), Cobre (Cu), Mercurio (Hg), Níquel (Ni), Plomo (Pb), Estaño (Sn) y Zinc (Zn).

Mercurio y sus especies son reconocidos por su elevada toxicidad, movilidad y su prolongada resistencia a través del tiempo, siendo identificadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un contaminante global que posee un alto riesgo a la salud humana. Al ser persistentes en el medio ambiente, recorren amplias distancias a través de la atmósfera y los medios acuáticos. Las especies organometálicas son muchos más tóxicas que las especies inorgánicas de mercurio, ya que debido a la presencia del grupo metilo se produce un aumento en la capacidad de ésta molécula de atravesar membranas celulares. CH_3Hg^+ , es considerada como la especie de mercurio más tóxica, debido a su carácter hidrofílico y lipofílico, y su potencial bioacumulación y biomagnificación en sistemas acuáticos¹.

La dispersión y distribución del mercurio en el medio ambiente depende de diferentes factores, entre ellos agentes antropogénicos, así como también los efectos climáticos y medioambientales. El mercurio inicia su ciclo ingresando a la corteza terrestre, de ésta pasará al aire, al agua y los suelos, desde donde llegará a los diferentes organismos vivos, y por último al hombre por medio de la cadena alimentaria. El principal mecanismo de transformación en la atmósfera es la oxidación

del Hg (0) por el ozono (O_3). En los sistemas acuáticos se produce la reducción de Hg(II) a Hg (0) por medio de la reducción abiótica en presencia de sustancias húmicas, y la reducción biótica en presencia de enzimas del tipo *mer A* y B.

Los procesos de metilación se producen en las aguas naturales y en los sedimentos, una gran parte del CH_3Hg^+ que se produce en el medio acuático es mediante la metilación directa producida por el fitoplancton y algas, así como también, las bacterias sulfato-reductoras (SRB) son las principales agentes de metilación de mercurio. El CH_3Hg^+ puede volver a convertirse en Hg (II) en un medio aeróbico por medio de una enzima de tipo *mer B*, mediante la ruptura del enlace C-Hg. Finalmente, la bioacumulación en el ser humano del mercurio se produce a través de la cadena alimentaria. En la Figura 1 se describe el ciclo biogeoquímico del mercurio.

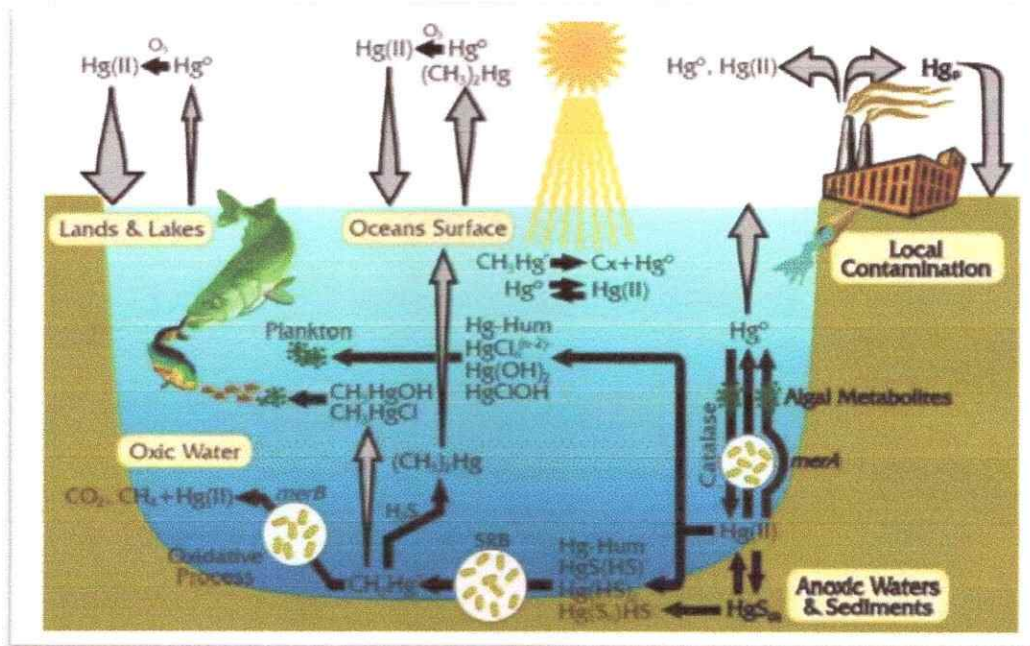


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del mercurio^{2,3}.

En nuestro país, la entidad que se preocupa de regular las cantidades máximas permitidas de mercurio a nivel medio ambiental es el Instituto Nacional de Normalización-INN, el cual menciona que la cantidad de mercurio máxima permitida en agua potable es de 0,001 mg/L (NCh 409/1 Of.2005)⁴, en cambio la Organización Mundial de la Salud (OMS), tiene como parámetro máximo 0,006 mg/L de mercurio en agua potable⁵.

Es sabido que la mayor parte de las emanaciones de mercurio al medio, provenientes de fuentes naturales y antropogénicas, son mayormente en su estado fundamental, Hg^0 , pero debido a las transformaciones biogeoquímicas este mercurio se transforma a especies con estados de oxidación +1 y +2. La existencia de las distintas especies de mercurio en el ambiente acuático, dependen principalmente de su estado de oxidación. En el caso del $Hg(I)$, es escasamente soluble en agua y está presente principalmente en sedimentos y suelo. $Hg(II)$, puede estar presente en todas sus formas inorgánicas ($HgCl_x^{2-x}$, HgS , $Hg-DOC^{+2}$), éste reside muy poco tiempo en el aire (minutos), por ende, casi un 90% de éste se encuentra en la superficie del agua a través del depósito atmosférico. Este mercurio puede experimentar reacciones de biometilación, transformándose en monometilmercurio y dimetilmercurio. Cabe destacar que esta biometilación es reversible bajo la acción de microorganismos y/o descomposición fotolítica. Para el caso de aguas naturales, específicamente en agua dulce el mercurio elemental representa 10-30% del mercurio total en agua dulce, y las formas orgánicas de mercurio representan el 30%⁶.

Varias técnicas han sido utilizadas para la detección de las distintas especies de mercurio, entre ellas tenemos; GC-CV-AFS⁷, CV-AFS⁸, ICP-MS⁹, ICP-AES¹⁰, GC-AAS¹¹, UV-Vis¹², Espectrofluorimetría¹³, entre otras.

Es importante destacar que la incorporación de una etapa de preconcentración previa a la medición instrumental hace que los métodos sean altamente sensibles, especialmente aquellos que involucran la especiación de sus elementos.

Es por ello que este proyecto tiene como objetivo el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de Hg (II) y CH₃Hg⁺, a través de la complejación del analito por medio de un ligante, incorporando una etapa de preconcentración sobre una resina de intercambio iónico, previa a la medición experimental. Con el fin de incrementar aún más la sensibilidad en relación a otra técnica como la espectrofotometría molecular, la señal analítica se evaluará directamente sobre la fase sólida por medio de espectrofluorimetría. Esta técnica tiene una serie de ventajas que incluyen bajos límites de detección, sensibilidad, selectividad y rapidez¹⁴.

1.2. Espectrofluorimetría

La espectrofluorimetría es una técnica ampliamente utilizada en el desarrollo de métodos para la determinación de metales. Ésta se basa en el fenómeno de la fotoluminiscencia, que ocurre cuando una especie química es excitada por medio de radiación electromagnética y como consecuencia la especie pierde la energía adquirida remitiendo ésta en forma parcial o total. Es decir, parte de la energía adquirida por la especie química se remite en forma de choques moleculares y parte en forma de energía luminosa o el total de la energía adquirida se remite en forma de radiación. Los procesos fotoluminiscentes involucrados se ilustran en el diagrama de Jablonsky¹⁵ (Figura 2). Este diagrama se utiliza para conocer los distintos procesos asociados a la absorción y emisión de luz.

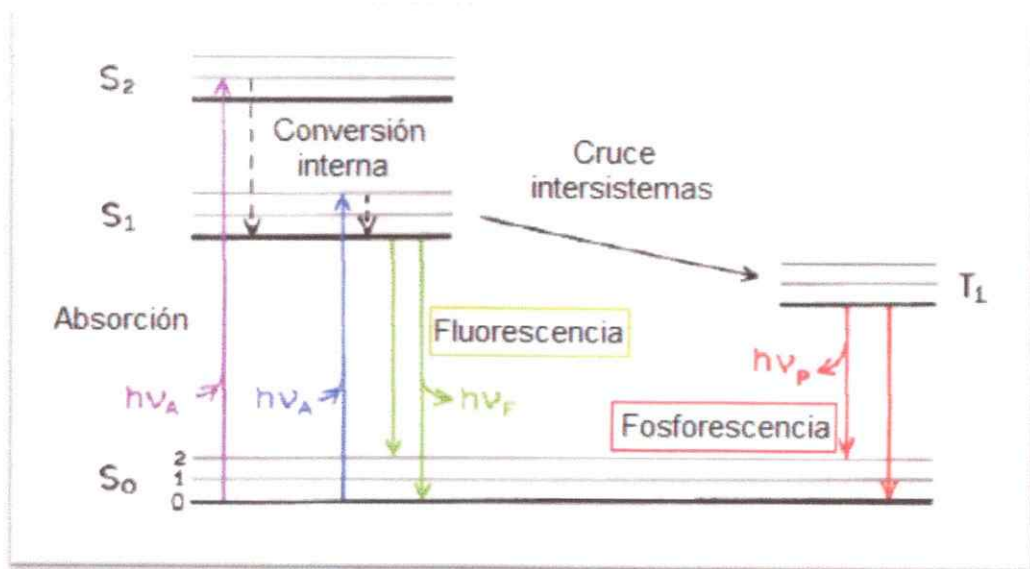


Figura 2. Diagrama de Jablonski.

En la Figura 2 se pueden observar los fenómenos luminiscentes asociados a la fluorescencia y fosforescencia. S_0 , S_1 y S_2 corresponden a los estados electrónicos singulete basal, primario y secundario. En cada uno de estos estados electrónicos las especies fluoróforas pueden existir en un número determinado de niveles electrónicos vibracionales representados por 0,1,2, etc. Las transiciones electrónicas entre los estados están representadas por líneas verticales.

Después de la absorción de la luz, las especies fluoróforas pasan a un estado excitado vibracional de mayor energía, en donde la emisión de esa energía puede ocurrir mediante dos formas principalmente: Fluorescencia y fosforescencia.

La fluorescencia y la fosforescencia son dos manifestaciones diferentes del fenómeno fotoluminiscente. Estos dos efectos difieren entre sí en el mecanismo a través del cual son producidos, además del tiempo de duración de la fotoluminiscencia una vez

que ha cesado de excitarse la muestra con radiación electromagnética. La fluorescencia cesa casi inmediatamente después de que a la muestra se le suspende la radiación ($<10^{-6}$ s), donde la absorción y emisión de energía ocurre entre estados de igual multiplicidad. La fosforescencia puede durar varios segundos o minutos, donde la absorción y emisión de energía ocurre entre estados de distinta multiplicidad.

La fluorescencia no está restringida a un estado físico determinado de la materia, ésta puede existir en: gases, sólidos o líquidos.

Uno de los aspectos más atractivos de la fluorescencia es su sensibilidad inherente, con límites de detección que son a menudo tres órdenes de magnitud más pequeños que los encontrados en la espectroscopía de absorción molecular. Los límites de detección típicos son del orden de partes por billón^{16, 17}.

En química analítica la aplicación de estos fenómenos está restringida a la espectrofluorimetría, que consiste en la cuantificación de la radiación emitida por fluorescencia de una especie química que posee estas características y que es directamente proporcional a su concentración. Como toda técnica analítica tiene factores que influyen en ella haciendo disminuir la intensidad de fluorescencia, estos factores son: estructura química, temperatura, naturaleza del solvente, pH y oxígeno disuelto.

1.3. Preconcentración

La necesidad de preconcentrar elementos traza para su posterior determinación, se debe principalmente a que en numerosas muestras los analitos en estudio frecuentemente se encuentran en baja concentración, como en el caso de las muestras de agua. Adicionalmente, se debe tener en consideración que los analitos se encuentran

en las matrices acompañados de diversos componentes, siendo necesario además realizar alguna etapa previa de separación.

La extracción líquido-líquido, LLE, es un método clásico tanto para la preconcentración de metales como la remoción de estos de la matriz.

La extracción en fase sólida, SPE, también posee esta propiedad; no obstante, a diferencia de la anterior presenta importantes beneficios: reduce el uso de solventes, por tanto, la exposición a éstos; además, disminuye costos y tiempo de extracción para la preparación de las muestras. Es por esta razón que la preconcentración en fase sólida ha sido empleada satisfactoriamente para la separación y determinación de iones metálicos, principalmente en muestras de agua, por el grado de sensibilidad que proporciona.

El mecanismo de retención depende de la naturaleza del adsorbente y del adsorbato, pudiendo suceder adsorción química o física, quelación o intercambio iónico^{18,19}. Siendo ésta última de interés para el desarrollo de este proyecto.

Las resinas de intercambio iónico son particularmente adecuadas para la preconcentración de elementos, ya que poseen una alta capacidad para retener iones que se encuentran en bajas concentraciones, son estables, se regeneran fácilmente y los efectos de la temperatura son en su mayoría insignificantes.

La mayor parte de los materiales utilizados para síntesis de las resinas de intercambio iónico se fabrican mediante un proceso de polimerización de estireno y divinilbenceno, en donde la esfera formada necesita ser químicamente activada para funcionar como material de intercambio iónico. Cada grupo activo posee una carga eléctrica fija, la cual es balanceada por un número equivalente de iones de carga

opuesta, los cuales tienen la libertad de intercambiarse con otros iones de la misma carga. Existen cuatro tipos de resinas: resinas catiónicas de ácido fuerte, contienen grupos sulfónicos como sitio de intercambio, y débil, contienen grupos carboxílicos como sitios de intercambio; resinas aniónicas de base fuerte, contienen amonios cuaternarios como sitios de intercambio, y débil, contienen grupos de poliamina como sitios de intercambio²⁰. El mecanismo de intercambio aniónico se puede observar en la Figura 3.

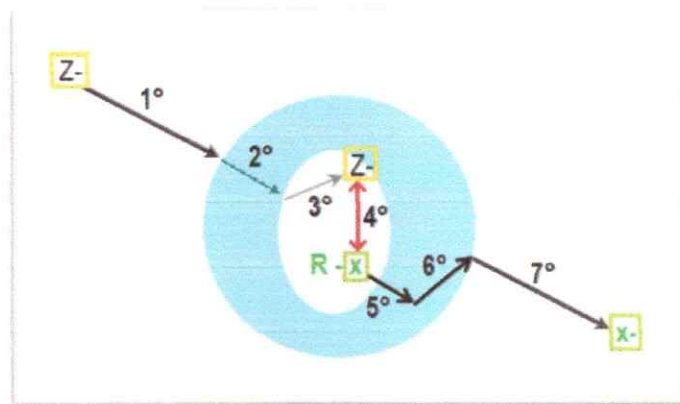


Figura 3. Mecanismo de intercambio aniónico.

En la Figura 3 se puede observar el mecanismo de retención e intercambio de un anión, mediante una resina de intercambio aniónico. En primera instancia se produce la difusión del anión, Z^- , hasta la resina a través de la solución y posteriormente a través de la capa estacionaria ($10^{-2} \text{ cm} \leq \text{capa estacionaria} \leq 10^{-3} \text{ cm}$). Luego ocurre la difusión de Z^- en el interior de la resina hasta encontrar el grupo ionogénico. El cuarto paso es el intercambio iónico entre Z^- y X^- . En el quinto paso ocurre la difusión desde el interior de la resina hacia la solución de X^- , a través de la capa estacionaria y finalmente hacia la solución.

La resina de intercambio aniónico utilizada en este trabajo es la DEAE Sephadex A25, que se caracteriza por ser una matriz entrecruzada de unidades de dextrano (Figura 4), de gránulos regulares, que utiliza como grupo ionogénico al dietilaminoetil y como contra ión al anión cloruro.

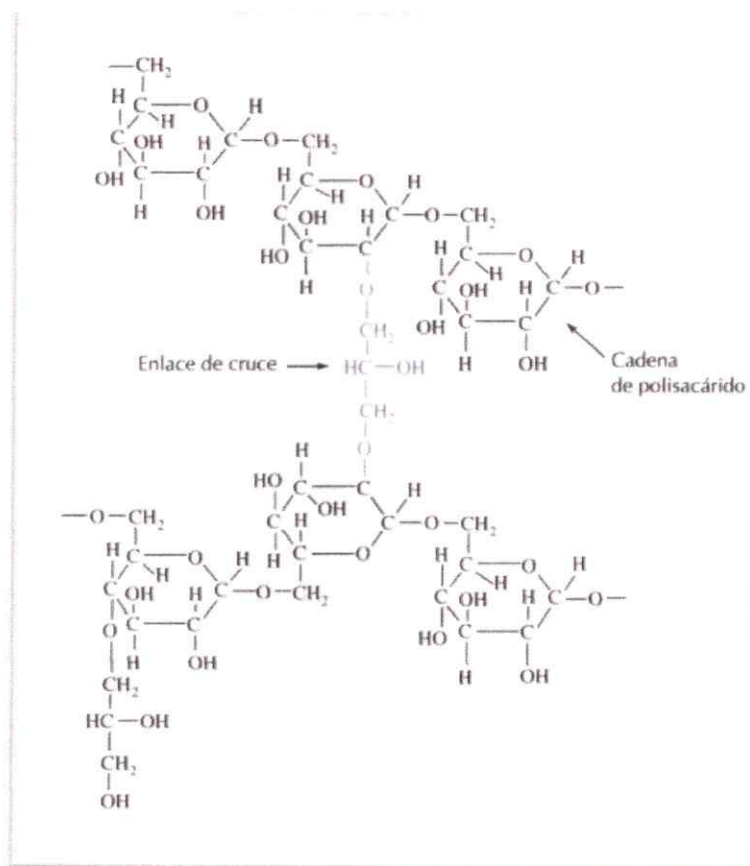


Figura 4. Estructura química Sephadex.

1.4. Ligantes

Los compuestos investigados en este proyecto corresponden a ligantes de tipo mercaptoimidazol, es decir, compuestos que presentan dentro de su estructura química como grupo funcional un -tiol (-SH) con anillos aromáticos de tipo imidazol.

Los ligantes seleccionados fueron: 2,5-dimercapto-1,3,4-tiodiazol (DMTD), 2-mercaptobenzotiazol (MBT), 2-mercaptobenzimidazol (MBI). En la Figura 5, se presentan sus estructuras químicas, con su respectiva masa molar y logP.

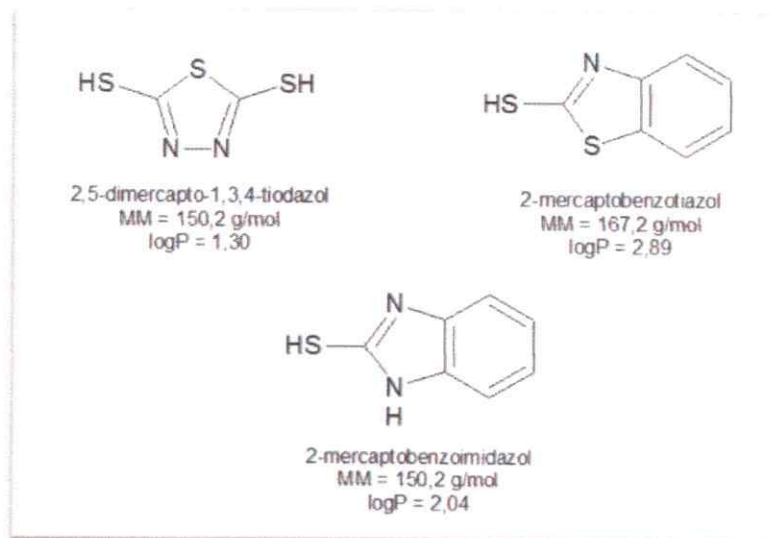


Figura 5. Estructura química de los ligantes.

De la Figura 5 es posible observar que los ligantes presentan masa molar similar y un logP entre 1 y 3, lo que indica que son compuestos de polaridad intermedia, relativamente solubles en agua.

En la Figura 6, 7 y 8 se observan las constantes de disociación (pKa) y las especies predominantes de los ligantes a distintos valores de pH.

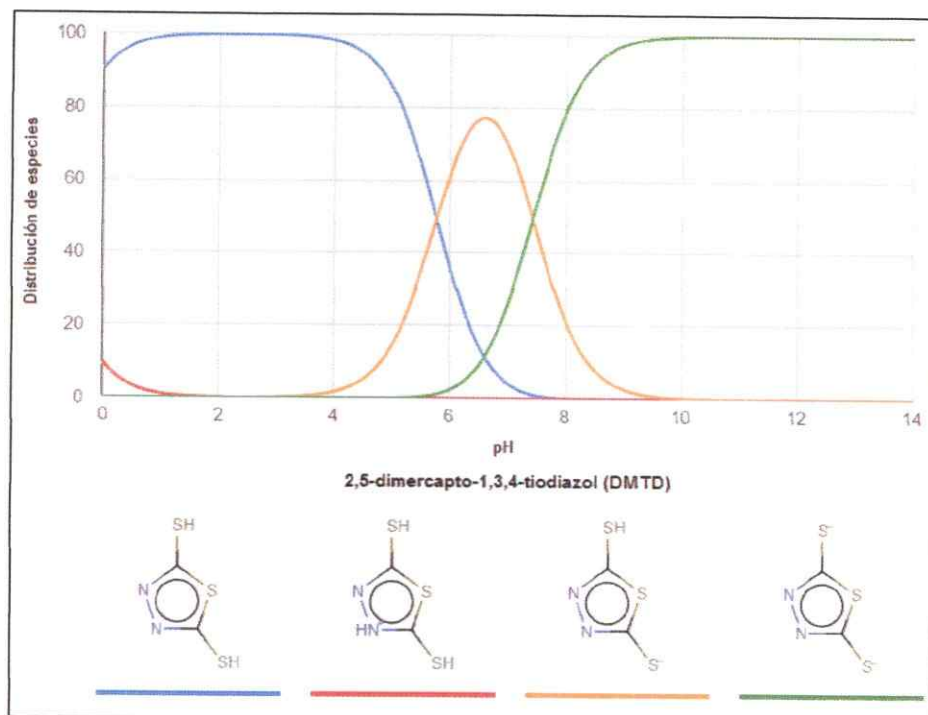


Figura 6. Distribución de especies de acuerdo al pH del ligante DMTD.

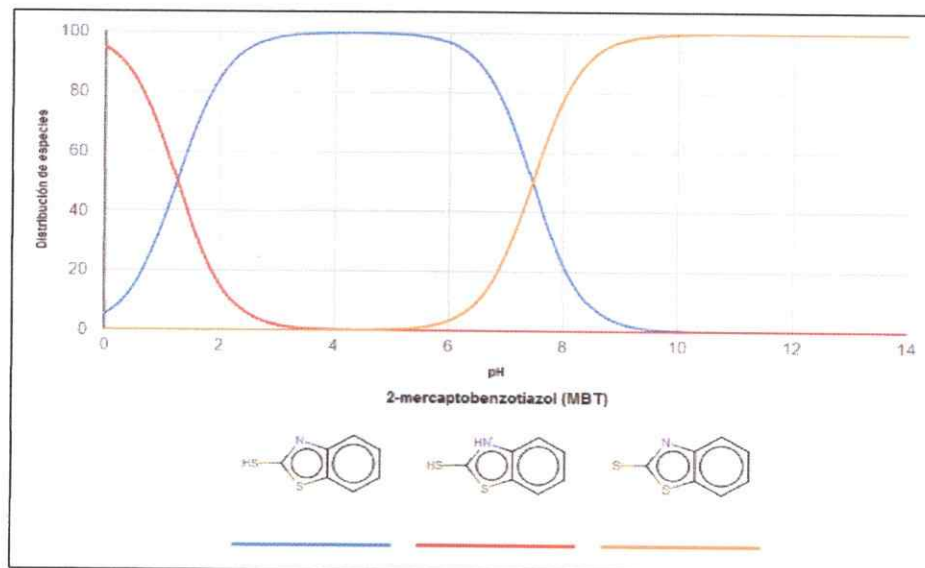


Figura 7. Distribución de especies de acuerdo al pH del ligante MBT.

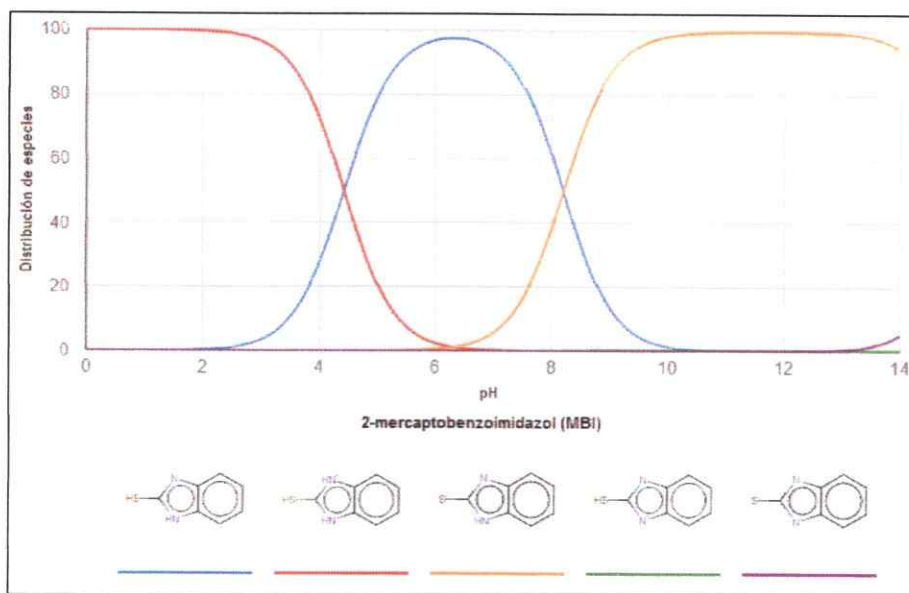


Figura 8. Distribución de especies de acuerdo al pH del ligante MBI.

De acuerdo a las Figuras 6, 7 y 8 se obtienen los siguientes valores de pKa: DMTD 7,43-5,77-0,98, MBI 4,42-8,20-15,25 y MBT 1,26-7,46.

R.G. Pearson propuso que los ácidos y bases de Lewis podían ser clasificados como duros y blandos, demostrando que una reacción procede en la dirección en que el ácido más blando reacciona con la base más blanda y por otro lado, el ácido más duro reacciona con la base más dura²¹. De acuerdo a esto es posible predecir que nuestros analitos, ácidos blandos, Hg (II) y CH₃Hg⁺, forman complejos con átomos dadores, bases blandas, como azufre, fósforo y nitrógeno, formando complejos con geometría de coordinación tipo tetraédrica, cuadrado plana, octaédrica distorsionada y lineal.

Ligantes que contienen estos tipos de átomos, han sido ampliamente utilizados en química analítica para determinar estos analitos^{22,23}. Éstos muchas veces pueden llegar a determinar cantidades muy pequeñas, traza o ultratrazas, de analito, lo que conlleva al desarrollo de métodos altamente sensibles, los cuales utilizando la técnica correcta

pueden llegar a límites de detección y cuantificación del orden del pg/L. Sin embargo, además de aumentar la sensibilidad de un método es importante que estos ligantes sean selectivos, para así poder evitar futuras interferencias con otros cationes o aniones al momento de aplicar el método en muestras reales. Es importante agregar que éstos deben ser estables y poseer un alto coeficiente de absorptividad molar (ϵ).

Con respecto a la formación del complejo, el ligante es añadido directamente a la solución que contiene el analito a determinar. La retención del complejo en la fase sólida puede ser de distintas maneras^{24,25,26}, en este caso, se parte de la premisa en la cual el analito y el ligante son añadidos a la solución, lo que implica la formación del complejo cargado, quedando posteriormente retenido en la fase sólida.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Los complejos formados entre las especies de mercurio, Hg (II) y CH₃Hg⁺, con ligantes mercapto pueden ser preconcentrados en una resina de intercambio iónico, de modo que se podrían desarrollar métodos altamente sensibles y selectivos para la determinación de éstos por espectrofluorimetría en fase sólida.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo General

Desarrollar nuevos métodos analíticos para la determinación de especies de mercurio, Hg (II) y CH₃Hg⁺, por espectrofluorimetría en fase sólida. Y su aplicación en diferentes tipos de agua. Caracterizar las interacciones establecidas del complejo con la fase sólida.

2.2.2. Objetivos específicos

- Realizar estudios preliminares de la conducta espectral de los ligantes DMTD, MBT y MBI.
- Estudiar la formación de complejos de Hg (II) y CH₃Hg⁺ con los ligantes propuestos. Selección del ligante para la determinación de los analitos.
- Optimizar las condiciones para la formación de los complejos de Hg (II) y/o CH₃Hg⁺ con él o los ligantes seleccionados.
- Seleccionar las fases sólidas en el proceso de preconcentración.

- Optimizar la formación y retención de los complejos formados en la fase sólida seleccionada: concentración de ligante, concentración de amortiguador, masa de intercambiador, tiempo de agitación y factor de dilución.
- Establecer la interacción que se produce entre el complejo y la resina.
- Determinar los parámetros analíticos: límites de detección y cuantificación, intervalo lineal de determinación y desviación estándar relativa.
- Estudiar los posibles interferentes catiónicos y aniónicos.
- Validar los métodos.
- Aplicar el método en distintos tipos de aguas: agua potable y aguas naturales fortificadas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

- Vasos de precipitado de 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Pipetas totales 5, 10 y 25 mL.
- Matraces de aforo 25, 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Celdas de cuarzo 1 mm de paso óptico.
- Celdas de cuarzo 1 cm de paso óptico.
- Celdas de cuarzo Starna 18-F/Q/10, 2 mm de paso óptico.
- Micro pipetas [10 - 100 uL, 100 - 1000 uL, 0,1-5 mL, 1-10 mL].
- Barras magnéticas 4 x 6 cm.
- Puntas para micro pipeta.
- Tubos *Eppendorf*.
- Agua destilada 0,01 $\mu\text{S/cm}$.

3.2. Reactivos

- 2,5-dimercapto-1,3,4-tiadiazol, 98 %, Merck p.a.
- 2-mercaptobenzotiazol, 97 %, Hopkin & Williams p.a.
- 2-mercaptobenzimidazol, 98 %, Merck p.a.
- CertiPUR, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 2 mol/L, 1000 mg/L, Merck p.a.
- CH_3HgCl , 99,9 %, Merck p.a.
- Metanol, Merck p.a.
- Etanol, Merck p.a.
- Resina DEAE Sephadex A25, 40-125 μm , 3-4 meq/g, Sigma-Aldrich.
- Ácido clorhídrico 37%, Merck p.a.

- Hidróxido de Sodio, Merck p.a.
- Ácido bórico, Merck p.a.
- Ácido nítrico *suprapur*®, Merck p.a.
- Agua destilada, 00,0 uS/cm.

3.3. Aparatos e instrumentos.

- Espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-2700. Software PIN: 4J14110.
- Centrifuga Merck 5430.
- Espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu, UV-1603. Software Shimadzu, versión 3,7 (P/N 206-60570-04).
- Balanza analítica Sartorius R200D.
- Sonificador Branson 2210.
- Placas calefactoras y agitadoras Stuart CB-162.
- pH metro Hanna HI 111.
- Estufa de secado Memmert.
- Vortex Mixer KMC-1300V.
- Agitadores magnéticos 4 x 6 cm.
- Liofilizador iShin® Freeze Dryer.
- Maleta portátil WTW Multi 340i.

3.4. Metodología

3.4.1. Preparación de soluciones estándar.

En el caso de estándar de Hg(II) se midió una alícuota de 100 μ L de la solución CertiPUR, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ en HNO_3 1000 mg/L y se llevó a un volumen final de 100 mL con agua desionizada. Para el estándar de CH_3Hg^+ se masaron 10 mg de CH_3HgCl , 99,9 % y se llevaron a un volumen final de 100 mL. De esta solución se midió una alícuota de 1 mL y se llevó a un volumen final de 100 mL para obtener la concentración final. A partir de estas soluciones se tomaron las alícuotas para preparar las muestras y desarrollar el método.

Con respecto a los ligantes DMTD, MBT y MBI se masaron 50 mg y se llevaron a un volumen final de 500 mL, respectivamente.

Para la preparación del amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9 se masaron 6,18 g de H_3BO_3 y se disolvieron en 500 mL de agua desionizada. Se ajusta el pH con una solución de NaOH 0,1 M hasta pH 9 y se afora con agua desionizada hasta un volumen final de 1000 mL.

3.4.2. Efecto del pH sobre la conducta espectral de los ligantes mediante espectrofotometría UV-Vis.

A partir de una solución 1,5 mg/L de cada uno de los ligantes DMTD, MBT y MBI, se estudió la influencia del pH sobre su conducta espectral en un rango de pH de 2-12, utilizando como disolvente agua destilada. La variación en el rango de pH se realizó adicionando alícuotas de NaOH o HCl 0,1 M a la solución de cada ligante hasta alcanzar el pH requerido, con el fin de evitar cualquier interferencia que pudiese existir con los componentes de un amortiguador. El pH se registró con un pH metro.

Las soluciones fueron medidas en el espectrofotómetro, en celdas de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico, contra un blanco de reactivo, efectuando un barrido de longitud de onda entre 190 y 800 nm.

3.4.3. Efecto del pH en la formación de los complejos mediante espectrofotometría UV-Vis.

3.4.3.1. Efecto del pH en la formación del complejo de Hg (II).

Para estudiar el efecto del pH sobre la formación de los complejos con cada uno de los ligantes, en un matraz de 25 mL se agregó una alícuota de 400 uL de Hg (II) 100 mg/L, 6 mL de ligante 100 mg/L, se agregaron las alícuotas necesarias de NaOH o HCl a de acuerdo al pH deseado. Este mismo procedimiento se realizó para cada ligante, en un rango de pH de 2,0-10. El pH se registró con un pH metro.

Las soluciones fueron medidas en el espectrofotómetro, en celdas de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico, contra un blanco de reactivo, efectuando un barrido de longitud de onda entre 190 y 800 nm.

3.4.3.2. Efecto del pH en la formación del complejo de CH_3Hg^+ .

Para estudiar el efecto del pH sobre la formación de los complejos con cada uno de los ligantes, en un matraz de 25 mL se agregó una alícuota de 430 uL de CH_3Hg^+ 100 mg/L, 4 mL de ligante 100 mg/L, se aforó con agua ácida o básica de acuerdo al pH deseado. Este mismo procedimiento se realizó para cada ligante, en un rango de pH de 2,0-10. El pH se registró con un pH metro.

Las soluciones fueron medidas en el espectrofotómetro, en celdas de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico, contra un blanco de reactivo, efectuando un barrido de longitud de onda entre 190 y 800 nm.

3.4.4. Curvas de calibración en solución acuosa mediante espectrofotometría UV-Vis.

3.4.4.1. Curvas de calibración en solución acuosa de Hg(II)-DMTD.

En matraces de 10 mL se agregaron alícuotas entre 200 y 1000 uL de Hg (II) 20 mg/L, para obtener un rango de concentración de 0,4 a 2 mg/L. Posteriormente se agregó 1 mL de DMTD 150 mg/L, 2,0 mL de amortiguador H_3BO_3/H_2BO_3Na 0,1 M a pH 9 y se aforó con agua desionizada.

Se registraron los espectros de absorción en el espectrofotómetro, en celdas de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico, contra un blanco de reactivo, efectuando un barrido de longitud de onda entre 190 y 800 nm.

3.4.4.2. Curvas de calibración en solución acuosa de CH_3Hg^+ -DMTD.

En matraces de 10 mL se agregaron alícuotas entre 200 y 1200 uL de CH_3Hg^+ 215 mg/L, para obtener un rango de concentración de 4,3 a 25 mg/L. Posteriormente se agregó 2 mL de DMTD 150 mg/L, 2,0 mL de amortiguador H_3BO_3/H_2BO_3Na 0,1 M a pH 9 y se aforó con agua desionizada.

Se registraron los espectros de absorción en el espectrofotómetro, en celdas de cuarzo de 1,0 cm de paso óptico, contra un blanco de reactivo, efectuando un barrido de longitud de onda entre 190 y 800 nm.

3.4.5. Determinación de la estequiometría de los complejos mediante el método de Job.

La determinación de la estequiometría de cada complejo se llevó a cabo mediante el Método de Job.

Se utilizaron soluciones stock $1,0 \times 10^{-3}$ M de ambos analitos y de ligante. A partir de estas soluciones, se realizaron 11 soluciones en medio amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3\text{Na}$ 0,1 M a pH 9, tomando las siguientes alícuotas de la solución estándar de manera que la concentración total de ligante y metal se mantengan constante²⁷. Las alícuotas utilizadas se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Volúmenes utilizados de ligante y metal para determinar la estequiometría del complejo mediante el Método de Job.

Volumen DMTD [mL]	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	1,2	1,4	1,6	1,8	2,0
Volumen metal [mL]	2,0	1,8	1,6	1,4	1,2	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,0

Las soluciones fueron llevadas a un volumen final de 5,0 mL con amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3\text{Na}$ 0,1 M a pH 9, utilizando como blanco el ligante y el amortiguador en la misma concentración y volumen que en la formación del complejo.

Como las medidas deben llevarse a cabo a una longitud de onda en donde se tenga la certeza que el complejo es la única especie que absorbe, se prepararon soluciones de metal y ligante bajo las mismas condiciones. Para dicho efecto, se prepararon 11 soluciones de metal aforadas con amortiguador leídas contra un blanco de amortiguador.

Las medidas se realizaron en el espectrofotómetro, utilizando celdas de 1,0 cm de paso óptico en un rango de longitud de onda de 190-800 nm.

A continuación, se presenta el procedimiento experimental para la selección de las variables químicas y espectrales mediante espectrofluorimetría.

3.4.6. Selección del intercambiador aniónico.

Se estudiaron dos posibles intercambiadores aniónicos: BioRAD AG 2-X8 y DEAE Sephadex A25. Estas resinas fueron estudiadas mediante espectrofotometría UV-Vis. y espectrofluorimetría.

En un vaso de precipitado de 250 mL se agregó 10 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3\text{Na}$ 0,1 M a pH 9, 4,0 mL de DMTD 150 mg/L y se homogenizó la solución. Luego se agregó una alícuota de 200 μL de Hg (II) 20 mg/L. Posteriormente la solución se llevó a un volumen final de 100 mL, se homogenizó y se agregaron 100 mg de resina para el caso de DEAE Sephadex A25. Paralelamente se realizó el mismo procedimiento anterior, pero esta vez utilizando 200 mg de BIO RAD AG 2-X8. Lo mismo se realizó para el complejo entre CH_3Hg^+ -DMTD. Luego de un periodo de agitación de 30 minutos, cada solución se empaqueta en celdas de cuarzo de 1,0 mm de paso óptico, y se obtiene su espectro de absorción en un rango de 190-800 nm.

Utilizando el mismo procedimiento anterior se procedió a realizar la medición mediante espectrofluorimetría. El empaquetamiento del complejo retenido en el intercambiador se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 2,0 mm de paso óptico, y se midió la intensidad de fluorescencia en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm. Se utilizó como $\lambda_{\text{exc}} = 314 \text{ nm}$ y un $\text{slit}_{\text{exc/em}} = 10/20$.

3.4.7. Selección de la longitud de onda de excitación y $\text{slit}_{\text{exc/em}}$.

Con el fin de conocer cuál es la longitud de onda de excitación apropiada para el desarrollo del método analítico, se procedió a la excitación de una muestra de complejo

de los analitos en estudio. Para ello en un vaso de precipitado de 250 mL se procedió a agregar 10 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3\text{Na}$ 0,1 M pH 9, 4,0 mL de DMTD 150 mg/L, y se homogenizó la solución. Luego se agregó una alícuota de 200 μL de Hg (II) 20 mg/L Hg (II). Posteriormente la solución se lleva a un volumen final de 100 mL, se homogeniza y se agregan 100 mg de resina para el caso de DEAE Sephadex A25. El mismo procedimiento se realizó para el complejo de CH_3Hg^+ . El empaquetamiento de los complejos retenidos en el intercambiador DEAE Sephadex A25 se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 2,0 mm de paso óptico, y se midió la intensidad de fluorescencia en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm.

Las longitudes de onda de excitación seleccionadas fueron en base a los máximos de absorción de las especies los cuales corresponden a: 262, 257, 314, 326 y 347 nm. Cada uno medido a un $\text{slit}_{exc/em}$ 10/10, 10/20, 20/20.

Paralelo a esto, y para complementar el estudio realizado anteriormente, se realizó un análisis 3D de las muestras mencionadas anteriormente. Para ello se utilizó un rango de excitación de 220 a 400 nm, con un intervalo de muestreo de excitación de 5 nm. Un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 600 nm, con un intervalo de muestreo de emisión de 2 nm y un $\text{slit}_{exc/em} = 10/20$ nm.

3.4.8. Optimización de las variables químicas en las preconcentración.

3.4.8.1. Optimización de las variables químicas para el complejo de Hg(II)-DMTD.

3.4.8.1.1. Estudio del efecto de la concentración de ligante DMTD.

En diferentes vasos de precipitado de 250 mL se agregaron 50 mL de agua desionizada, 1,2 mL de Hg (II) 1,0 mg/L y 5,0 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1

M pH 9. A cada vaso se agregó alícuotas entre 2,0 y 14 mL de DMTD 100 mg/L, para obtener un rango de concentración de 2,0 a 14 mg/L. Luego cada vaso se llevó a un volumen final de 100mL con agua desionizada y se agregó 70 mg de resina DEAE Sephadex A25. Cada solución se agitó homogéneamente por 30 min.

El empaquetamiento del complejo Hg (II)-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25 se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 2,0 mm de paso óptico, y se midió la intensidad de fluorescencia en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm. Se utilizó como $\lambda_{exc} = 314$ nm y un $slit_{exc/em} = 10/20$ nm.

3.4.8.1.2. Estudio del efecto de la concentración de amortiguador H_3BO_3/NaH_2BO_3 0,1 M pH 9.

En diferentes vasos de precipitado de 250 mL se agregaron 50 mL de agua desionizada, 1,2 mL de Hg (II) 1,0 mg/L y 5,4 mL de DMTD 100 mg/L. A cada vaso se agregó alícuotas entre 1,0 a 14 mL de amortiguador H_3BO_3/NaH_2BO_3 0,1 M pH 9. Luego cada vaso se llevó a un volumen final de 100mL con agua desionizada y se agregó 70 mg de resina DEAE Sephadex A25. Cada solución se agitó homogéneamente por 30 min.

El empaquetamiento del complejo Hg(II)-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25 se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 2,0 mm de paso óptico, y se midió la intensidad de fluorescencia en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm. Se utilizó como $\lambda_{exc} = 314$ nm y un $slit_{exc/em} = 10/20$ nm.

3.4.8.2. Optimización de las variables químicas para el complejo de CH_3Hg^+ -DMTD.

3.4.8.2.1. Estudio del efecto de la concentración de ligante DMTD.

En diferentes vasos de precipitado de 250 mL se agregaron 50 mL de agua desionizada, 1,3 mL de CH_3Hg^+ 1,0 mg/L y 5,0 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9. A cada vaso se agregó alícuotas entre 2,0 y 14 mL de DMTD 100 mg/L, para obtener un rango de concentración de 2,0 a 14 mg/L. Luego cada vaso se llevó a un volumen final de 100mL con agua desionizada y se agregó 70 mg de resina DEAE Sephadex A25. Cada solución se agitó homogéneamente por 30 min.

El empaquetamiento del complejo CH_3Hg^+ -DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25 se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 2,0 mm de paso óptico, y se midió la intensidad de fluorescencia en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm. Se utilizó como $\lambda_{\text{exc}} = 314$ nm y un $\text{slit}_{\text{exc/em}} = 10/20$ nm.

3.4.8.2.2. Estudio del efecto de la concentración de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9.

En diferentes vasos de precipitado de 250 mL se agregaron 50 mL de agua desionizada, 1,3 mL de CH_3Hg^+ 1,0 mg/L y 6,0 mL de DMTD 100 mg/L. A cada vaso se agregó alícuotas entre 1,0 a 14 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9,0. Luego cada vaso se llevó a un volumen final de 100mL con agua desionizada y se agregó 70 mg de resina DEAE Sephadex A25. Cada solución se agitó homogéneamente por 30 min.

El empaquetamiento del complejo CH_3Hg^+ -DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25 se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 2,0 mm de paso óptico, y se midió la intensidad de fluorescencia en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm. Se utilizó como $\lambda_{\text{exc}} = 314$ nm y un $\text{slit}_{\text{exc/em}} = 10/20$ nm.

3.4.9. Optimización de las variables de preconcentración.

3.4.9.1. Optimización de las variables de preconcentración para el complejo Hg (II)-DMTD.

3.4.9.1.1. Estudio del efecto de la masa de intercambiador en la preconcentración.

En diferentes vasos de precipitado de 250 mL se agregaron 50 mL de agua desionizada, 1,2 mL de Hg(II) 1,0 mg/L, 5,0 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9,0 y 5,4 mL de DMTD 100 mg/L. Cada solución se llevó a un volumen final de 100 mL con agua desionizada, y se agregó a cada uno de ellos: 60, 80, 100, 150 y 200 mg de DEAE Sephadex A25. Cada solución se agitó homogéneamente por 30 min.

El empaquetamiento del complejo Hg(II)-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25 se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 2,0 mm de paso óptico, y se midió la intensidad de fluorescencia en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm. Se utilizó como $\lambda_{\text{exc}} = 314$ nm y un $\text{slit}_{\text{exc/em}} = 10/20$ nm.

3.4.9.1.2. Estudio del efecto del tiempo en la preconcentración del complejo.

En diferentes vasos de precipitado de 250 mL se agregaron 50 mL de agua desionizada, 1,2 mL de Hg(II) 1,0 mg/L, 5,0 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9,0 y 5,4 mL de DMTD 100 mg/L. Cada solución se llevó a un volumen final de 100 mL con agua desionizada, y se agregó 70 mg de resina DEAE Sephadex A25. Cada solución se agitó homogéneamente en un rango de 5 a 50 min.

El empaquetamiento del complejo Hg(II)-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25 se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 2,0 mm de paso óptico, y se midió la intensidad de fluorescencia en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm. Se utilizó como $\lambda_{\text{exc}} = 314$ nm y un $\text{slit}_{\text{exc/em}} = 10/20$ nm.

3.4.9.1.3. Estudio del efecto de la dilución en la preconcentración.

En vasos de precipitado de 200 a 500 mL se agregaron 50 mL de agua desionizada, 1,2 mL de Hg(II) 1,0 mg/L y 5,4 mL de DMTD 100 mg/L. Cada solución se llevó a un volumen final de 100, 150, 200, 300 y 400 mL. Se agregó 5,0, 7,5, 10, 15 y 20 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9,0 respectivamente. Posteriormente a cada vaso se agregó 70 mg de resina DEAE Sephadex A25. Cada solución se agitó homogéneamente durante 30 min.

El empaquetamiento del complejo Hg(II)-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25 se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 2,0 mm de paso óptico, y se midió la intensidad de fluorescencia en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm. Se utilizó como $\lambda_{\text{exc}} = 314$ nm y un $\text{slit}_{\text{exc/em}} = 10/20$ nm.

3.4.9.2. Optimización de las variables de preconcentración para el complejo de CH_3Hg^+ - DMTD.

3.4.9.2.1. Estudio del efecto de la masa del intercambiador en la preconcentración.

En diferentes vasos de precipitado de 250 mL se agregaron 50 mL de agua desionizada, 1,3 mL de CH_3Hg^+ 1,0 mg/L, 5,0 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9,0 y 6,0 mL de DMTD 100 mg/L. Cada solución se llevó a un volumen final de 100 mL con agua desionizada, y se agregó a cada uno de ellos: 60, 80, 100, 150 y 200 mg de DEAE Sephadex A25. Cada solución se agitó homogéneamente por 30 min.

El empaquetamiento del complejo CH_3Hg^+ -DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25 se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 2,0 mm de paso óptico,

y se midió la intensidad de fluorescencia en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm. Se utilizó como $\lambda_{exc} = 314$ nm y un $slit_{exc/em} = 10/20$ nm.

3.4.9.2.2. Estudio del efecto del tiempo en la preconcentración del complejo.

En diferentes vasos de precipitado de 250 mL se agregaron 50 mL de agua desionizada, 1,3 mL de CH_3Hg^+ 1,0 mg/L, 5,0 mL de amortiguador H_3BO_3/NaH_2BO_3 0,1 M pH 9,0 y 6,0 mL de DMTD 100 mg/L. Cada solución se llevó a un volumen final de 100 mL con agua desionizada, y se agregó 70 mg de resina DEAE Sephadex A25. Cada solución se agitó homogéneamente en un rango de 5 a 50 min.

El empaquetamiento del complejo CH_3Hg^+ -DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25 se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 2,0 mm de paso óptico, y se midió la intensidad de fluorescencia en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm. Se utilizó como $\lambda_{exc} = 314$ nm y un $slit_{exc/em} = 10/20$ nm.

3.4.9.2.3. Estudio del efecto de la dilución en la preconcentración.

En vasos de precipitado de 200 a 500 mL se agregaron 50 mL de agua desionizada, 1,3 mL de CH_3Hg^+ 1,0 mg/L y 6,0 mL de DMTD 100 mg/L. Cada vaso se llevó a un volumen final de 100, 150, 200, 300 y 400 mL. Se agregó 5,0, 7,5, 10, 15 y 20 mL de amortiguador H_3BO_3/NaH_2BO_3 0,1 M pH 9,0 respectivamente. Posteriormente a cada vaso se agregó 70 mg de resina DEAE Sephadex A25. Cada solución se agitó homogéneamente durante 30 min.

El empaquetamiento del complejo CH_3Hg^+ -DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25 se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 2,0 mm de paso óptico, y se midió la intensidad de fluorescencia en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm. Se utilizó como $\lambda_{exc} = 314$ nm y un $slit_{exc/em} = 10/20$ nm.

3.4.10. Caracterización de los complejos.

3.4.10.1. Microscopía electrónica de barrido, SEM.

Para realizar la caracterización de los complejos retenidos en el intercambiador DEAE Sephadex A25 las muestras se prepararon en una estequiometría 1:2 para el complejo de Hg (II)-DMTD y 1:1 para el complejo CH₃Hg⁺-DMTD.

Para el complejo Hg(II)-DMTD se utilizó una concentración de $1,0 \times 10^{-5}$ M de Hg (II) y $2,0 \times 10^{-5}$ M de DMTD, 5 mL de amortiguador H₃BO₃/NaH₂BO₃ 0,1 M pH 9 y 100 mg de resina DEAE Sephadex A25. Se llevó a un volumen final de 100 mL con agua desionizada y se agitó por 30 min.

Para el complejo CH₃Hg⁺-DMTD se utilizó una concentración de $4,0 \times 10^{-5}$ M de CH₃Hg⁺ y $4,0 \times 10^{-5}$ M de DMTD, 5 mL de amortiguador H₃BO₃/NaH₂BO₃ 0,1 M pH 9 y 100 mg de resina DEAE Sephadex A25. Se llevó a un volumen final de 100 mL con agua desionizada y se agitó por 30 min.

El sólido se depositó en un tubo *ependorf*, se congeló con nitrógeno líquido y luego se liofilizó por 24 horas a -49 ° C y una presión de 5 mTorr.

Las muestras se pegaron con una cinta doble faz de carbono en un portamuestra cilíndrico de Cu-Zn. Se soplaron con un compresor de aire seco para sacar cualquier polvo en suspensión que pueda contaminar la muestra, y se colocaron en el equipo para realizar la medición en el microscopio Vega 3 Tescan.

3.4.10.2. Espectroscopía Infrarroja, IR.

Para la caracterización IR se utilizó el mismo procedimiento señalado en la sección 3.4.3.1. Luego del proceso de liofilización las muestras se midieron en sólido

como una pastilla de KBr. La cual se elaboró mezclando 1-1,5 mg de analito en 100 mg de KBr de grado espectroscópico, se molieron y mezclaron en un mortero de ágata y se formaron las pastillas aplicando presión de 7-9 ton/in². Las pastillas se midieron con un espectrofotómetro FT-IR Perkin –Elmer System 2000.

3.4.11. Muestreo Reserva nacional Río Clarillo.

Se realizó un muestreo en la zona del Peumo B (33°43' 37' S, 70°28'25' W), en la Reserva Nacional del Río Clarillo, con el fin de utilizarlo como blanco de matriz. La ubicación y mapa de zona se pueden observar en la Figura 9 y 10.

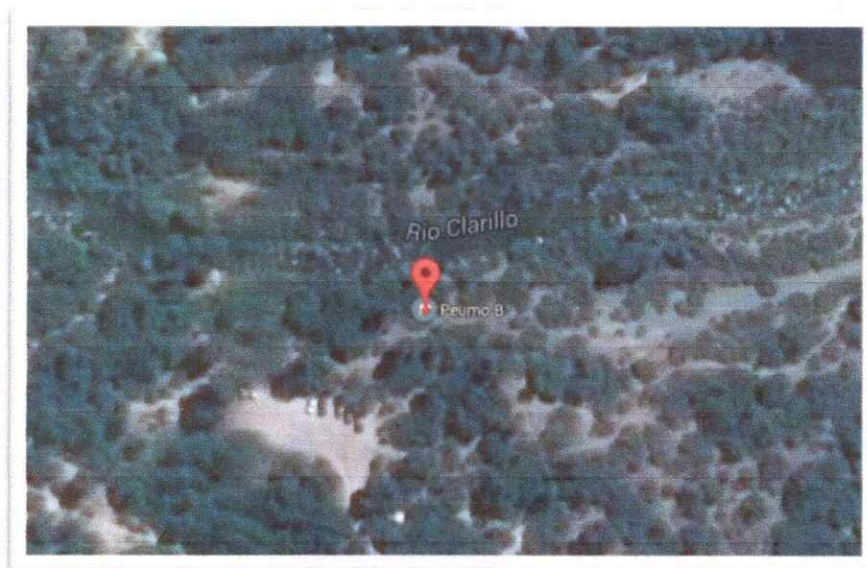


Figura 9. Mapa satelital Reserva Nacional del Río Clarillo zona Peumo B.



Figura 10. Mapa interno Reserva Nacional del Río Clarillo.

Las muestras se colectaron en frascos de plástico de 1000 mL previamente lavados y secados según la norma (NCh 411/10). Se filtraron utilizando una membrana de filtración de nitrato de celulosa de un diámetro de poro de 0,2 μm y se acidificaron con ácido nítrico concentrado de calidad ultra puro, hasta alcanzar un pH 2. Se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su utilización.

3.4.12. Validación de los métodos analíticos.

Los parámetros analíticos se definieron según la terminología utilizada en la guía *EuraChem, Second Edition* (2014). Los parámetros que se utilizaron para la validación de los resultados obtenidos en esta tesis se presentan a continuación.

3.4.12.1. Linealidad del sistema.

Para conocer la linealidad del sistema se realizó una curva de calibración de estándares de los analitos al estado de complejo retenidos en el intercambiador en agua destilada, formando los complejos para ambos analitos. Para ello se midieron alícuotas equivalentes a 5 niveles de concentración con 3 réplicas. Con el programa OriginPro 8 se realizó la regresión lineal, determinándose la ecuación de la recta.

3.4.12.2. Linealidad del método.

Para conocer la linealidad del método, se utilizaron muestras de aguas naturales del Río Clarillo, consideradas como blanco. Se enriquecieron con los analitos en estudio y se realizó una curva de calibración con los complejos retenidos en el intercambiador. Se midieron alícuotas equivalentes a 5 niveles de concentración con 3 réplicas. Mediante el programa OriginPro 8 se realizó la regresión lineal.

3.4.12.3. Selectividad.

La selectividad del método se evaluó agregando distintas relaciones analito/interferente (catiónico u aniónico). Se midió su espectro en el espectrofluorímetro, y se tomó como criterio que la señal con interferente no se viera alterada en más de un 8% de límite de tolerancia, con respecto a la señal sin interferente.

Experimentalmente, a vasos de precipitado de 250 mL se agregaron 50 mL de agua desionizada, 100 μL de Hg(II) 1,0 mg/L, 5,0 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9, 5,4 mL de DMTD 100 mg/L, y un volumen definido de interferente catiónico en una relación conocida metal/interferente. Cada solución se llevó a un volumen final de 100 mL con agua desionizada, y se agregó 70 mg de resina DEAE Sephadex A25. Cada solución se agitó homogéneamente por 30 min. El mismo procedimiento se realizó para interferentes aniónicos.

El empaquetamiento del complejo Interferente/ Hg(II) -DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25 se llevó a cabo en una celda de cuarzo de 2,0 mm de paso óptico, y se midió la intensidad de fluorescencia en un rango de longitud de onda de 220 a 800 nm. Se utilizó como $\lambda_{\text{exc}} = 314$ nm y un $\text{slit}_{\text{exc/em}} = 10/20$ nm.

3.4.12.4. Límite de cuantificación (LC) y detección (LD).

Con el fin de conocer cuál es la concentración más baja de analito que se puede detectar bajo las condiciones experimentales desarrolladas en el método, se calculó el límite de detección (LD) y se define como: $LD = 3 \times DS / S^{28}$. El límite de cuantificación (LC) es la mínima concentración que se puede cuantificar y se define como: $LC = 10 \times DS/S$, donde "DS" es la desviación estándar de 11 blancos y "S" la sensibilidad, es decir, pendiente de la curva de calibración. También se calculó el rango de determinación, se define como el LC y el más alto se define como la concentración a la cual en donde se distinguen anomalías significantes en la sensibilidad, es decir, en donde existe una pérdida de la linealidad.

3.4.12.5. Precisión y exactitud.

La precisión se evaluó midiendo el grado de dispersión entre muestras medidas el mismo día "Repetibilidad", o en días diferentes "Reproducibilidad". Para el caso de repetibilidad se utilizaron 5 muestras en 3 niveles de concentración; bajo, medio y alto. Para ello en un vaso de precipitado de 250 mL se agregaron 5,0 mL de amortiguador H_3BO_3/NaH_2BO_3 0,1 M pH 9, 100 μ L de Hg (II) 1,0 mg/L, 5,4 mL de DMTD 100 mg/L. Esto se llevó a un volumen final de 100 mL de agua de Río Clarillo y se agregó 70 mg de resina DEAE Sephadex A25. La solución se agitó homogéneamente por 30 min. El mismo procedimiento se realizó para alícuotas de 500 y 900 μ L de Hg (II) 1 mg/L. Para medir el grado de dispersión, reproducibilidad, se utilizaron 5 muestras en 3 niveles de concentración; bajo, medio y alto, en 5 días distintos. Para ello en un vaso de precipitado de 250 mL se agregaron 5,0 mL de amortiguador H_3BO_3/NaH_2BO_3 0,1 M pH 9, 100 μ L de Hg (II) 1 mg/L, 5,4 mL de DMTD 100 mg/L. Esto se llevó a un volumen final de 100 mL de agua de Río Clarillo y se agregó 70 mg de resina DEAE Sephadex A25. La solución se agitó homogéneamente por 30 min. El mismo procedimiento se realizó para

alícuotas de 500 y 900 μL de Hg (II) 1,0 mg/L. Para el complejo formado con CH_3Hg^+ , se realizó el mismo procedimiento anterior.

Con el fin de conocer la exactitud, se calculó el porcentaje de recuperación de las muestras.

3.4.13. Aplicación del método en muestras reales.

Se tomaron muestras del Río Copiapó y agua potable de la misma región. Las muestras fueron enviadas para su análisis a un laboratorio externo Metalab, donde fueron analizadas mediante ICP-AES. Al no obtener resultados concluyentes del laboratorio externo, el método se aplicó en muestras de aguas naturales y potable fortificadas con Hg (II) y CH_3Hg^+ .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Efecto del pH sobre la conducta espectral de los ligantes mediante espectrofotometría UV-Vis.

Con el fin de conocer el comportamiento espectral de los ligantes DMTD, MBT y MBI se procedió a estudiar el efecto del pH sobre éstos en solución acuosa en un rango de 2 a 12, de acuerdo al procedimiento experimental 3.4.2. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 11.

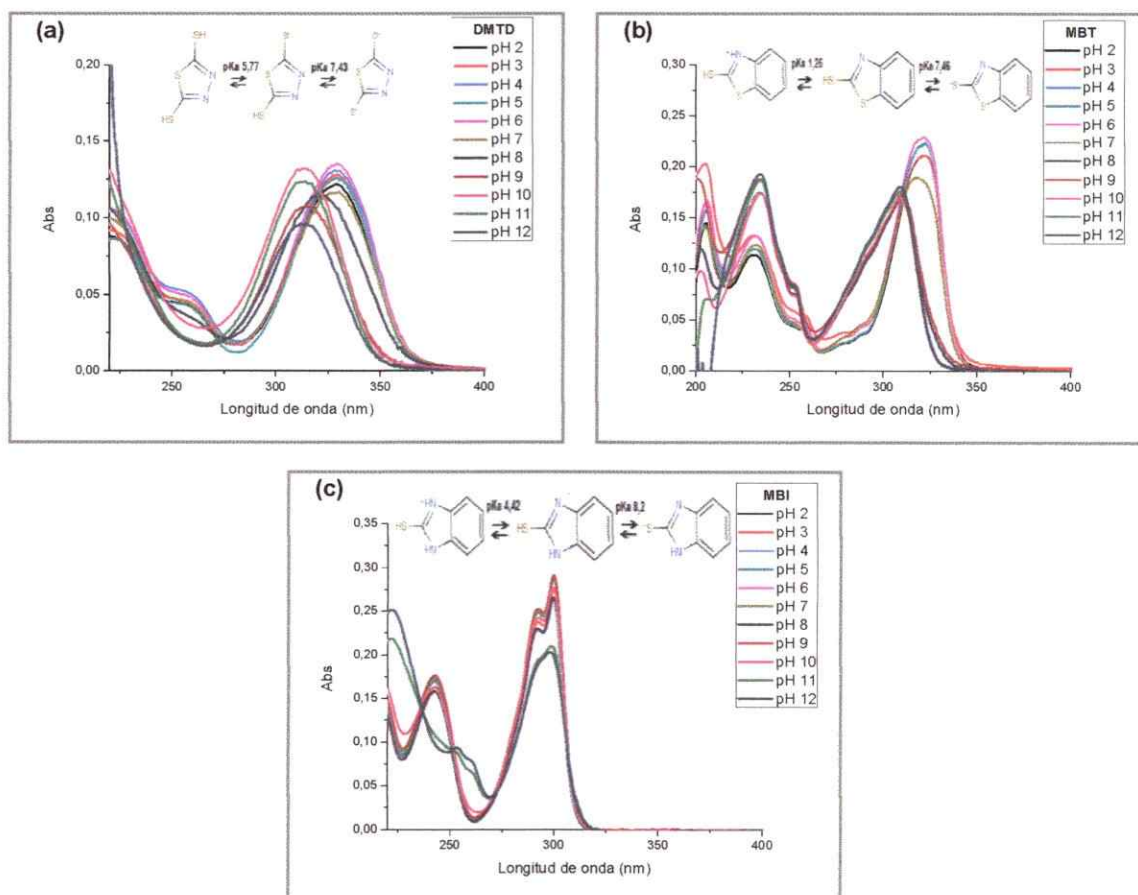


Figura 11. Espectros de absorción de los ligantes (a) DMTD (b) MBT (c) MBI a distintos valores de pH. Concentración 1,5 mg/L.

Como se puede observar en la Figura 11, las bandas espectrales que tiene cada ligante son dependientes de los valores de pH a los cuales son expuestos. Los valores de pKa encontrados en la literatura son: DMTD 7,43-5,77-0,98, MBI 4,42-8,20-15,25 y MBT 1,26-7,46. Estos valores de pKa fueron calculados mediante cálculos empíricos en base a las cargas parciales de las especies. Para ello a cada molécula se le asignaron los sitios de ionización, generando las microespecies, luego se realiza el cálculo de la distribución de carga parcial, se ajustan las interacciones de los enlaces de hidrógeno, se calcula el radio de las microespecies y luego el valor de pKa. Todo esto a través del programa ChemAxon's Marvin and JChemsoftware versión 3.4^{29,30}.

Para el caso de (a) DMTD, a pH 3 se puede inferir la presencia cuantitativa de la especie molecular, a pH cercano a 8 comienza la desaparición de la banda entre 250-270 nm lo que se explica a través de la desprotonación del grupo -SH ubicado en la posición 5, y cercano a pH 9 se produce la desprotonación de los dos grupos tiol, lo que genera la formación de la especie aniónica, ditiona, que presenta la mayor factibilidad de formar el complejo cargado negativamente con Hg(II) y CH₃Hg⁺.

En el caso de (b) MBT en zonas ácidas existen dos bandas principales; a 231 y 320 nm las cuales a medida que el pH va aumentando, existe un corrimiento hipsocrómico de la banda a 320 nm, debido a la desprotonación de la especie -SH.

Con respecto a (c) MBI éste presenta dos bandas principales, una cercana a los 240 nm y otra a los 300 nm. A medida que el pH aumenta, en pH sobre 10, aparecen dos nuevas bandas, concordantes con la desprotonación del grupo -SH.

Con los resultados obtenidos de la Figura 11 se realizó un gráfico de pH en función de la absorbancia con el propósito de verificar si los valores de pKa coinciden con los informados en la literatura. Estos resultados se observan en la Figura 12.

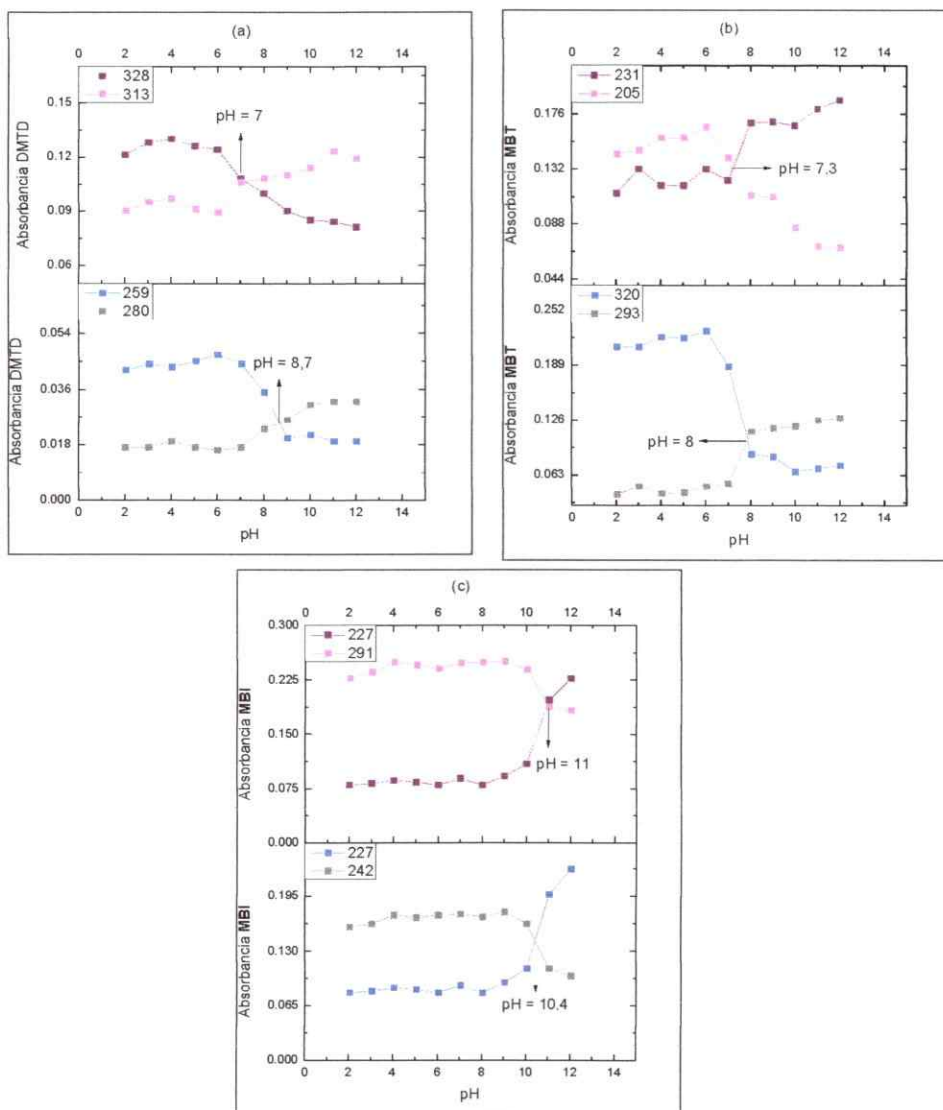


Figura 12. Gráficos de pH en función de la absorbancia de la señal analítica mediante espectrofotometría UV-Vis de los ligantes (a) DMTD (b) MBT y (c) MBI.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Figura 12 fue posible observar que existe una diferencia entre los valores de pKa informados en la literatura con los obtenidos experimentalmente, los cuales serán designados como pKa' (pKa condicionales). Para el caso del ligante DMTD presenta teóricamente dos valores de pKa, 5,8 y 7,4, y experimentalmente se obtuvieron valores de 7,0 y 8,7. Con respecto a los otros ligantes el comportamiento es similar, es decir, los valores obtenidos experimentalmente se alejan de los valores de pKa teóricos.

Tomando en consideración los resultados obtenidos, se seleccionó el ligante DMTD y se trabajó a pH 9, ya que a ese valor de pH existe el predominio de la especie desprotonada, el cual podría formar con Hg (II) y CH_3Hg^+ complejos aniónicos estables y desplazar el equilibrio hacia la formación de productos permitiendo su retención en una resina de intercambio aniónico. Los ligantes MBI y MBT fueron descartados como agente complejante, debido a la precipitación de éstos a pH básico.

4.2. Efecto del pH en la formación de los complejos mediante espectrofotometría UV-Vis.

Se procedió a estudiar el efecto del pH en un rango de 2-10, con el fin de observar en solución acuosa el comportamiento espectral de los complejos con Hg (II) y CH_3Hg^+ . Se utilizó este rango de pH porque a valores de pH mayores a 10, no existe mayor aporte, de acuerdo a los resultados observados anteriormente, por ello se optó por acotar el rango de pH hasta 10. Cabe destacar, como se mencionó anteriormente, el rango de barrido fue de 190-800 nm, pero con el fin de observar más claramente los espectros, se informará en un rango de 220-400 nm.

4.2.1. Efecto del pH en la formación del complejo de Hg (II).

De acuerdo al procedimiento experimental 3.4.3.1 se llevó a cabo el estudio del efecto del pH en la formación de los complejos con los ligantes propuestos. Los resultados se presentan en la Figura 13.

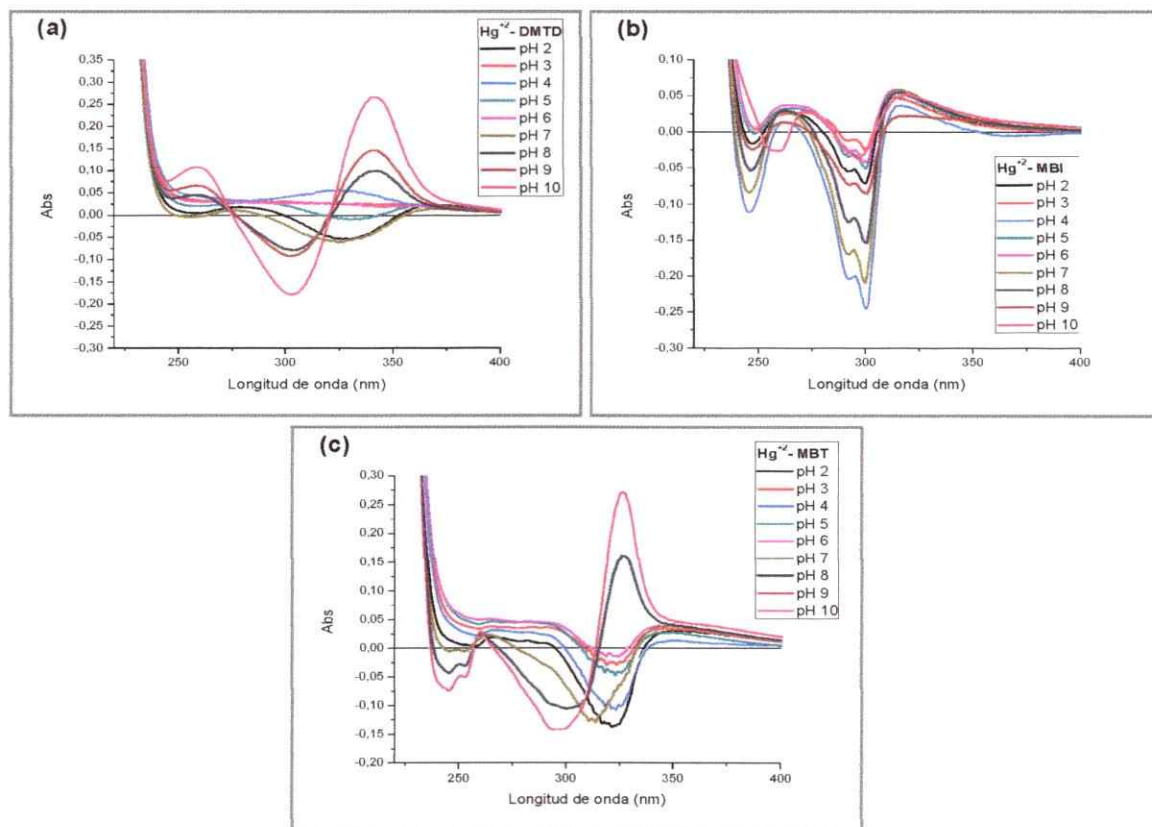


Figura 13. Espectros de absorción de los complejos en solución a distintos valores de pH (a) DMTD-Hg (II) (b) MBI-Hg (II) (c) MBT-Hg (II).

Desde un punto de vista espectral se puede observar que Hg (II), presenta un comportamiento diferente con cada ligante, existiendo cambio espectral según el pH.

En la Figura 13 (a), es posible observar la formación de complejo entre DMTD y Hg (II), manteniendo sus bandas en un rango de pH 2-7. Sin embargo, a partir del pH 8, existe un cambio espectral en las bandas, presentándose una banda bien definida del

complejo, aumentando la absorbancia a medida que aumenta el pH. Este comportamiento permite inferir que no se forman especies hidroxiladas de Hg (II), problema frecuente cuando se trabaja en rangos de pH altamente básicos, lo que implica que la estabilidad del complejo es lo suficientemente grande como para desplazar el equilibrio hacia su formación. Esta dependencia del pH en la forma e intensidad de las bandas es atribuible a las variaciones de absorbancia propias del complejo, y a las distintas especies de DMTD generadas a esos valores de pH de acuerdo a sus valores de pKa.

En la Figura 13 (b), se observa la formación de bandas mal definidas en todo el rango de pH estudiado y el comportamiento aleatorio de éstas. Lo que puede ser atribuido a la precipitación del complejo, donde se observa de forma evidente a pH 5. Por esta razón, éste ligante no es el adecuado para la formación del complejo con Hg (II), por lo que se descarta su uso.

Con respecto a la Figura 13 (c), es posible observar que hasta pH 7 las bandas espectrales del complejo se mantienen constantes. A partir de un rango básico de pH, existe un cambio espectral atribuible a la precipitación del complejo. Considerando la estructura de DMTD, a valores básicos de pH existe la desprotonación del grupo -SH, generando una carga negativa en éste, carga que puede neutralizarse con la carga del Hg (II), provocando su precipitación en medio acuoso. Por las razones mencionadas anteriormente, se descarta el uso de éste ya que el desarrollo del método pretende la formación de complejos cargados que puedan ser retenidos en una resina de intercambio iónico.

Tomando en consideración los resultados mencionados anteriormente, así como también la estructura del ligante, y el posible complejo que podría formar con Hg (II), el

ligante escogido para el desarrollo del método de determinación de Hg (II) es el DMTD a un pH de trabajo de 9, ya que a ese valor de pH existe el predominio de la especie aniónica que formaría con Hg (II), ya que a ese pH la estabilidad del complejo es lo suficientemente alta para desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo.

4.2.2. Efecto del pH en la formación del complejo de CH_3Hg^+ .

De acuerdo al procedimiento experimental 3.4.3.2. se llevó a cabo el estudio del efecto del pH en la formación de los complejos con los ligantes propuestos. Los resultados se observan en la Figura 14.

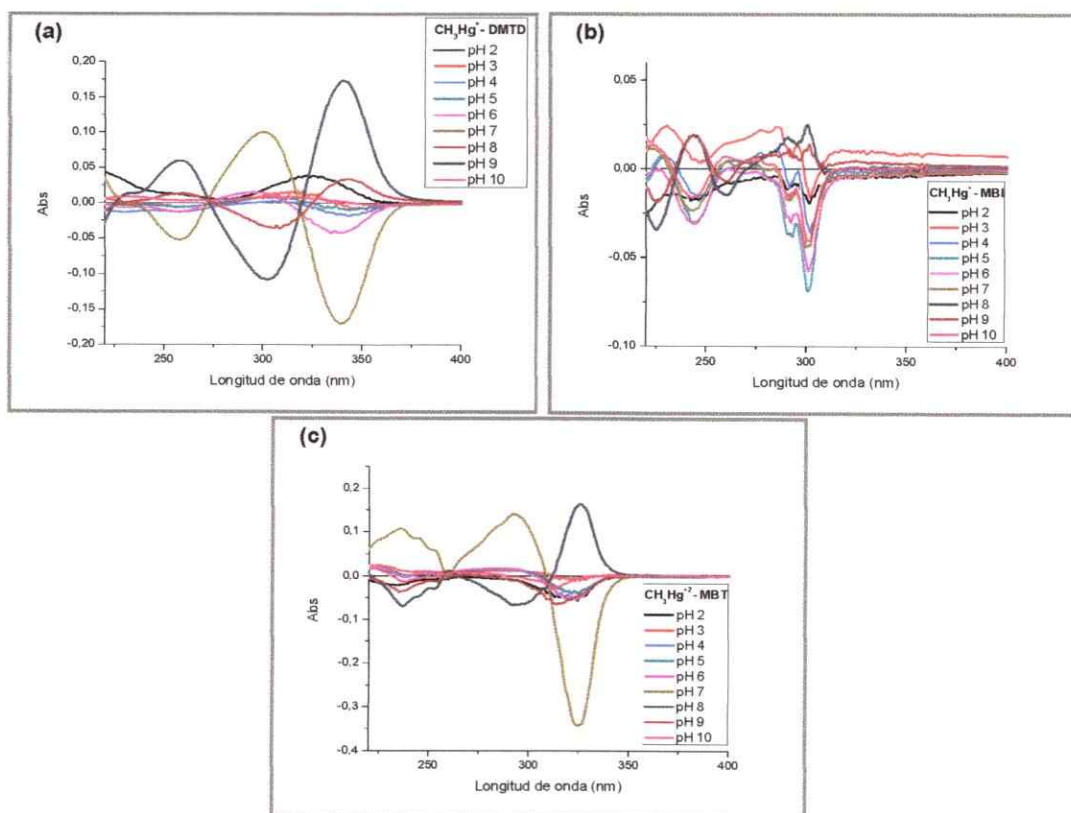


Figura 14. Espectros de absorción de los complejos en solución a distintos valores de pH (a)

CH_3Hg^+ -DMTD (b) CH_3Hg^+ -MBI (c) CH_3Hg^+ -MBT.

En la Figura 14 (a) es posible observar la formación de distintos complejos de acuerdo al rango de pH. El primer complejo formado es a bajos valores de pH entre 2 y 6, el cual presenta una baja intensidad en sus bandas. A valores de pH mayores se observa un cambio espectral en el complejo a distintos valores de pH, no existiendo una correlación entre ellos, como sucede en el caso del Hg (II) con este ligante. Esto se puede explicar considerando la estructura del ligante, así como también la química de coordinación del CH_3Hg^+ . Este catión presenta la capacidad de formar complejos en la naturaleza y sistemas biológicos con ligandos que presentan tanto azufre como nitrógeno en su fórmula química^{31,32}, lo que hace posible la conexión de dichos ligandos con los propuestos en esta investigación. Como se mencionó anteriormente de acuerdo a los valores de pKa que presenta DMTD es la especie que se tendrá en solución. A pH 7 y 8 existe una mezcla de especies, la especie neutra y la desprotonada en el azufre en posición dos, lo que podría explicar la formación de dos posibles complejos, unidos mediante enlaces de coordinación dativos por parte de los nitrógenos y el azufre. En el caso de los pH 9 y 10, se tiene la certeza de que existe en solución la especie ditona, que tendría mayor afinidad por el CH_3Hg^+ , ya que no sólo involucra la afinidad de blando con blando como lo describe Pearson, sino también estamos frente a una posible interacción electrostática entre $\text{S}^{--}\text{HgCH}_3^+$, que posibilitaría la formación de un complejo cargado negativamente.

En el caso de la Figura 14 (b), los espectros obtenidos a distintos valores de pH son muy ruidosos, y no siguen ninguna relación entre sí de acuerdo a los valores de pH estudiados. Esto se debe a que la solución presentó turbidez. Una investigación realizada con Hg (II) y ligantes tionas heterocíclicas³³, denotan la formación de un complejo neutro tipo lineal 1:2 con este ligante, en donde a través de análisis de H-RMN

e IR, queda demostrado que la unión de este complejo es a través de los átomos de azufre, provocando la neutralización del complejo y por ende su precipitación en solución acuosa.

Con respecto al efecto del pH del complejo CH_3Hg^+ -MBT, Figura 14 (c), es posible observar bandas del complejo muy parecidas a las del complejo con DMTD, solo que en este último caso se encuentran ubicadas hacia longitud de onda mayor. Estas bandas aparecen a los mismos valores de pH, lo que podría inferir que la unión del complejo es a través de los mismos grupos funcionales. Además, estos espectros son ruidosos y de menor intensidad de absorbancia.

De todos los ligantes mencionados anteriormente el elegido es DMTD a pH 9, ya que el objetivo principal de este proyecto es el desarrollo de un método que permita determinar Hg (II) y CH_3Hg^+ . Además, este ligante presenta bandas definidas con ambos analitos.

Con el objeto de mantener el pH constante fue necesario utilizar un amortiguador, para lo cual se seleccionó $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3\text{Na}$ 0,1 M, debido a que no se alteran las bandas espectrales del ligante y del complejo Hg (II)-DMTD. Para el caso de CH_3Hg^+ existe un leve corrimiento. Por otro lado, se puede asegurar su capacidad amortiguadora ya que su valor de pKa es 9,24, muy cercano al valor de pH utilizado y proporciona una fuerza iónica constante ya que, al ser un ácido débil, su base conjugada débil es relativamente fuerte debido a su valor de pKa'.

4.3. Curvas de calibración de los complejos en solución acuosa mediante espectrofotometría UV-Vis.

4.3.1. Curva de calibración en solución acuosa del complejo Hg (II)-DMTD mediante espectrofotometría UV-Vis.

De acuerdo al procedimiento 3.4.4.1 se realizó la curva de calibración en solución acuosa del complejo Hg (II)-DMTD, donde la lectura de la señal analítica se realizó mediante espectrofotometría UV-Vis. Los resultados se presentan en la Figura 15.

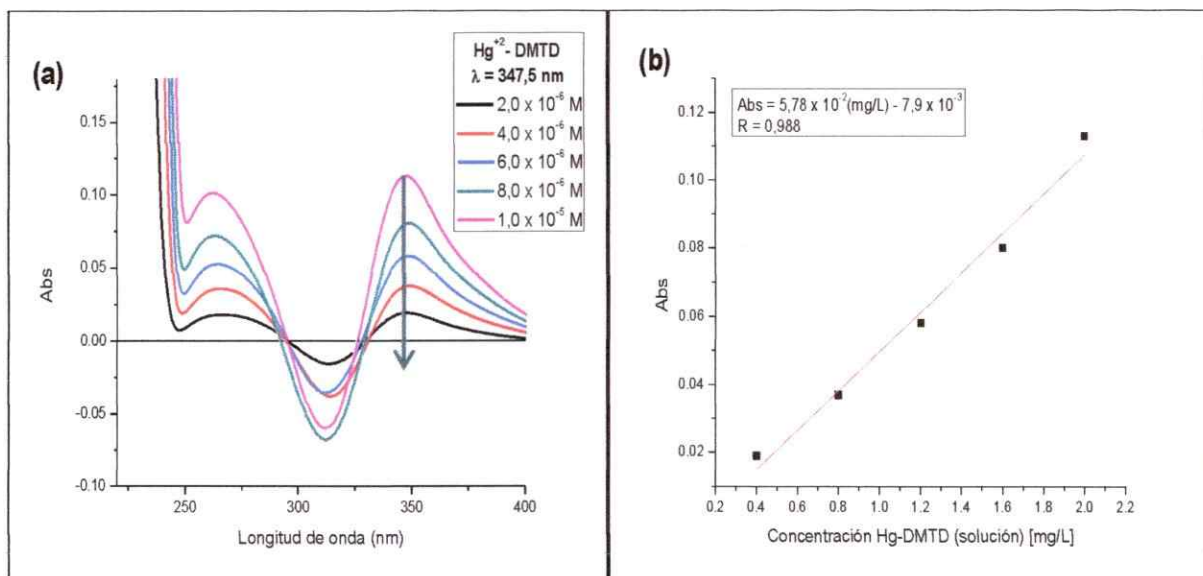


Figura 15. (a) Espectros de absorción clásicos para la curva de calibración de Hg (II)-DMTD en solución (b) Gráfica obtenida de la curva de calibración de Hg (II)-DMTD en solución. * La flecha negra indica la longitud de onda en la cual se cuantificó la curva de calibración.

Como se observa en la Figura 15, existe una proporcionalidad entre la concentración del complejo y la absorbancia, satisfaciendo la Ley de Lambert-Beer. La longitud de onda analítica es 347,5 nm, ya que a esa longitud de onda se encuentra una mayor absorbancia, aumentando la sensibilidad del método.

4.3.2. Curvas de calibración en solución acuosa del complejo CH₃Hg⁺-DMTD mediante espectrofotometría UV-Vis.

De acuerdo al procedimiento 3.4.4.2 se realizó la curva de calibración en solución acuosa del complejo CH_3Hg^+ -DMTD, donde la lectura de la señal analítica se realizó mediante espectrofotometría UV-Vis. Los resultados se presentan en la Figura 16.

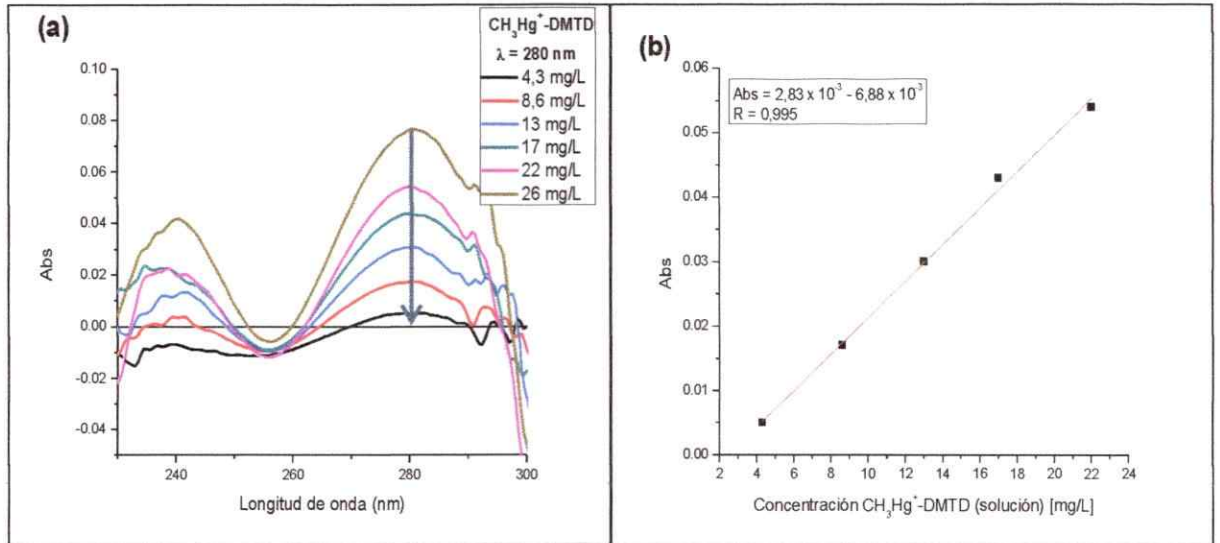


Figura 16. (a) Espectros de absorción clásicos para la curva de calibración de CH_3Hg^+ -DMTD en solución (b) Gráfica obtenida de la curva de calibración de CH_3Hg^+ -DMTD en solución. * La flecha negra indica la longitud de onda en la cual se cuantificó la curva de calibración.

Como se observa en la Figura 11, existe una proporcionalidad entre la concentración del complejo y la absorbancia. Su máximo de longitud de onda analítica es a 280 nm, donde se obtienen los datos para realizar la curva de calibración.

Con los resultados obtenidos anteriormente en los puntos 4.3.1 y 4.3.2 se calcularon los parámetros analíticos utilizando como criterio los presentados en el punto 3.4.12.4. Los parámetros obtenidos se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Parámetros analíticos de los complejos en solución acuosa mediante espectrofotometría UV-Vis.

	Hg (II) – DMTD	CH ₃ Hg ⁺ - DMTD
Longitud de onda analítica (nm)	347,5	280
Ecuación de la recta de la curva de calibración	Abs=5,78 x 10 ⁻² (mg/L) – 7,90 x 10 ⁻³	Abs=2,83 x 10 ⁻³ (mg/L) – 6,88 x 10 ⁻³
Coefficiente de correlación (r)	0,988	0,998
Límite de detección (mg/L)	0,15	2,09
Límite de cuantificación (mg/L)	0,49	6,95
Intervalo de determinación (mg/L)	0,49 – 40	6,95 – 40

Como se puede observar en la Tabla 2, es posible determinar Hg (II) con una mayor sensibilidad que CH₃Hg⁺, ya que los LD y LC obtenidos son menores alrededor de un orden de magnitud. Si se comparan estos límites con los obtenidos en la literatura, es posible observar una gran similitud entre ellos, ya que en un estudio en donde determinan Hg (II) mediante cloruro de benzalconio utilizando como técnica instrumental la espectrofotometría UV-Vis, se llegan a determinar cantidades del orden 0,218 mg/L en muestras sintéticas y del orden a la 2 ug/L en muestras reales³⁴. Ahora si estos límites son comparados con aquellos en los cuales se incorpora una etapa previa de extracción en fase sólida (SPE), los límites obtenidos bajan considerablemente. Por ejemplo, para Hg (II) se encontraron límites de detección de 0,12 ug/L utilizando una etapa de SPE previa y como técnica de medida UV-Vis de reflectancia difusa, hasta límites con un valor de 1,5 ng/L utilizando GC-MS³⁵. Para CH₃Hg⁺ se encontraron límites de detección de 1,5 ng/L utilizando como CV-AAS como técnica instrumental, con una etapa previa de preconcentración sobre una resina³⁶.

Estos resultados muestran el aumento de la sensibilidad cuando se utiliza una etapa de extracción en fase sólida previa a la medición instrumental, permitiendo

disminuir tanto los límites de detección como cuantificación. Por otra parte, si se utiliza como técnica de evaluación de la señal analítica la espectrofluorimetría, se podrían llegar a límites cercanos a los obtenidos con técnicas tan sensibles como las mencionadas anteriormente.

4.4. Determinación de la estequiometría de los complejos.

La determinación de la estequiometría de los complejos se llevó a cabo mediante el Método de Job. Este método implica medir la absorbancia del complejo a una longitud de onda donde el complejo sea la única especie responsable de la absorción. La reacción de formación del complejo puede escribirse como la Ecuación 1:



donde M es el ión metálico, X el ligante y n el índice o número de coordinación.

Las soluciones fueron preparadas de acuerdo al procedimiento 3.4.5, leídas a la longitud de onda donde la absorbancia del complejo es máxima. Con los datos de absorbancia obtenidos, se grafica la fracción molar de DMTD como variable dependiente y variable independiente los valores de absorbancia del complejo. La curva depende de la constante del complejo, si dicha constante es muy alta, y todo el metal se encuentra formando complejo la forma de la curva sería un triángulo con vértice f_L (fracción molar del ligante). El valor de n pudo ser determinado a través del reemplazo del valor de fracción molar obtenido en el vértice de acuerdo a la Ecuación 2:

$$n = f_L / (1 - f_L) \quad (2)$$

4.4.1. Estequiometría del complejo de Hg (II) con DMTD.

Como se mencionó anteriormente, la longitud de onda elegida para medir la absorbancia del complejo, debe ser en un punto donde la única especie responsable de esa absorbancia sea el complejo, por ello, se midió la absorbancia de Hg (II) en solución acuosa, en la misma proporción que se encuentra cuando se calcula su estequiometría (Tabla 1). En la Figura 12, se presentan los espectros obtenidos de Hg (II) en disolución acuosa.

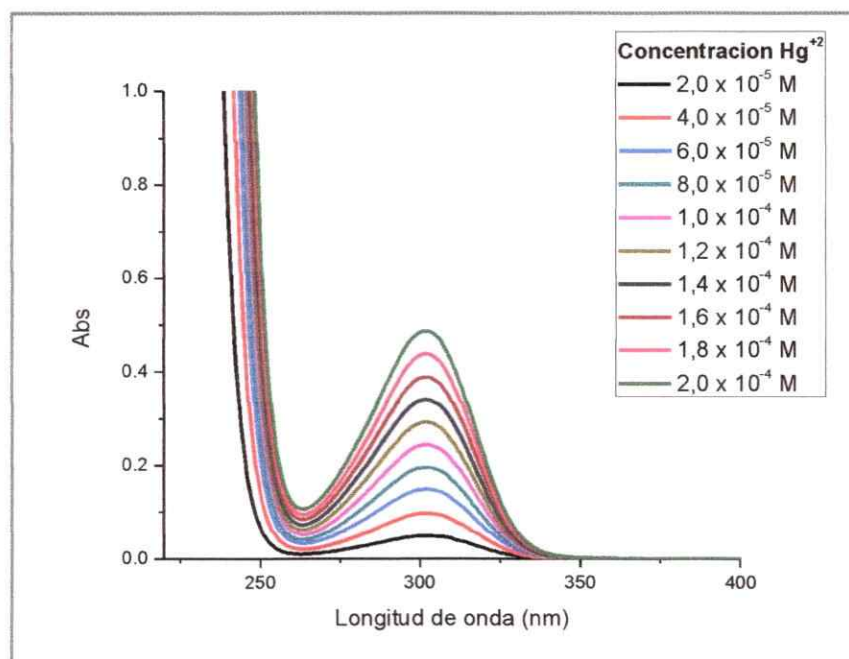


Figura 17. Espectros de absorción de Hg (II) en disolución acuosa.

Como se puede observar en la Figura 17, el espectro de Hg (II) presenta una banda de absorción ancha que comprende una región del espectro desde 260-330 nm. Esta banda no dificulta la determinación de la estequiometría del complejo ya que el máximo de absorbancia del complejo se ubica a 347,5 nm. Por lo que la existencia de bandas a mayor longitud de onda se puede atribuir netamente al complejo formado entre ion metálico y el ligante. Además, como el blanco de reactivo contiene ligante en la

misma proporción que cuando se mide el complejo para cada punto del método, éste no genera un aporte en la absorción del complejo ya que es restado previamente, en la medición instrumental. En la Figura 18, se muestra la gráfica obtenida según el método de Job

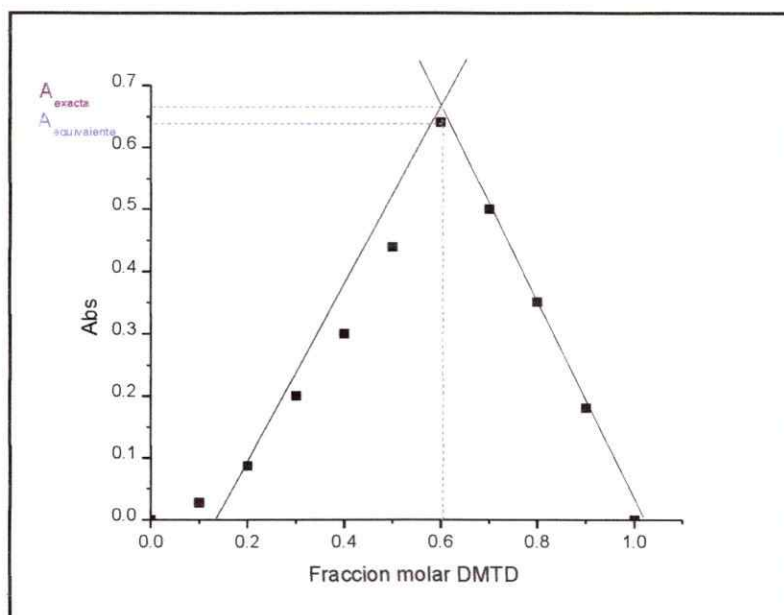


Figura 18. Gráfica de Job para la formación del complejo Hg(II)-DMTD. Buffer H_3BO_3/H_2BO_3Na 0,1 M pH 9, $\lambda = 347,5$ nm.

La forma de la curva depende de la constante del complejo. Cuando la constante es muy alta, y todo el metal se encuentra formando complejo la curva sería un triángulo con vértice en la fracción molar del ligante. Con la absorbancia, la fracción molar y la concentración total del complejo es posible obtener el coeficiente de absorptividad molar del complejo.

$$A_{exacta} = \epsilon_{Complejo} \times b \times C_{Complejo} = \epsilon_{Complejo} \times b \times \frac{C_T}{(n+1)} \quad (3)$$

$$C_T = C_{Hg(II)} + C_{DMTD} \quad (4)$$

$$\epsilon_{\text{Complejo}} = 9,99 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$$

Bajo el contexto mencionado anteriormente se logró obtener la estequiometría del complejo Hg (II)-DMTD, llegando a la conclusión que la relación estequiométrica del complejo es 1:2.

4.4.2. Estequiometría del complejo de CH_3Hg^+ con DMTD.

Como se mencionó anteriormente, la longitud de onda elegida para medir la absorbancia del complejo, debe ser en un punto donde la única especie responsable de esa absorbancia sea el complejo, por ello, se midió la absorbancia de CH_3Hg^+ en solución acuosa, en la misma proporción que se encuentra cuando se calcula su estequiometría (Tabla 1). Estos espectros se pueden ver en la Figura 19.

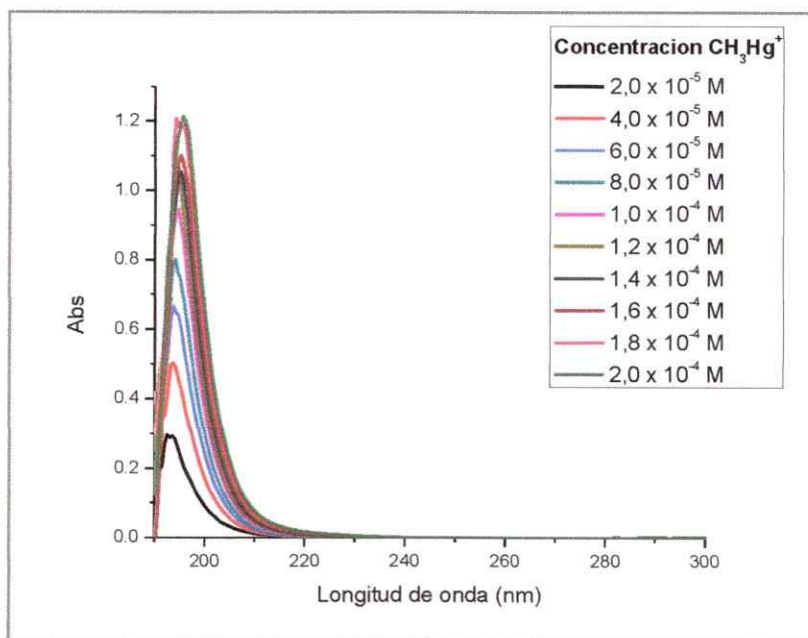


Figura 19. Espectros de absorción de CH_3Hg^+ en disolución acuosa.

Como se puede observar en la Figura 19, existe un máximo de absorción entre 190 y 220 nm, perteneciente solamente a la especie catiónica CH_3Hg^+ , lo que no dificultaría la determinación de la estequiometría mediante el método de Job ya que el máximo de absorción del complejo en solución es de 280 nm. A continuación, se tiene la gráfica obtenida mediante el método de variaciones continuas en la Figura 20.

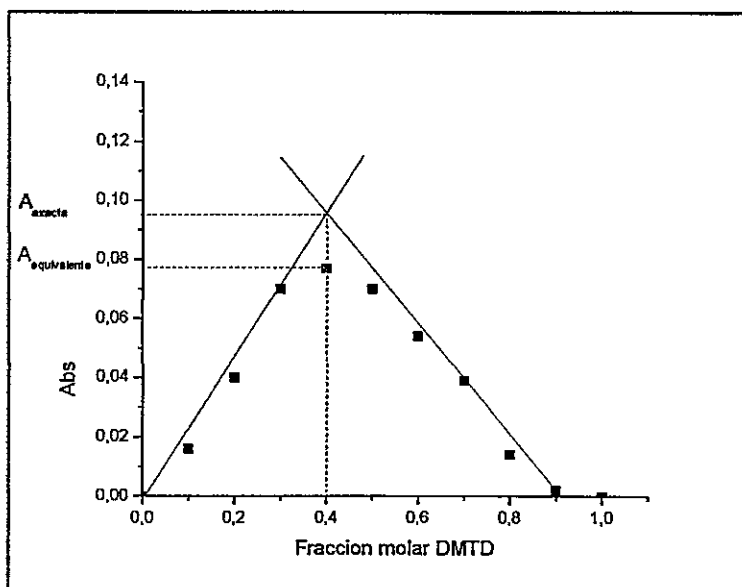


Figura 20. Gráfica de Job para la formación del complejo CH_3Hg^+ -DMTD. Buffer $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{H}_2\text{BO}_3\text{Na}$ 0,1 M pH 9, $\lambda = 280$ nm.

De acuerdo a la gráfica que se muestra en la Figura 20, es posible observar que el vértice del triángulo formado equivale a la fracción molar 0,4 de DMTD. Reemplazando este valor en la ecuación 4, se obtiene un valor de $n = 0,67$, por lo tanto, la estequiometría obtenida para el complejo es de 1:1.

La forma de la curva depende de la constante del complejo. Cuando la constante es muy alta, y todo el metal se encuentra formando complejo la curva sería un triángulo con vértice en la fracción molar del ligante. Con la absorbancia, la fracción molar y la

concentración total del complejo es posible obtener el coeficiente de absortividad molar del complejo.

$$A_{exacta} = \varepsilon_{Complejo} \times b \times C_{Complejo} = \varepsilon_{Complejo} \times b \times \frac{C_T}{(n+1)} \quad (5)$$

$$C_T = C_{CH_3Hg^+} + C_{DMTD} \quad (6)$$

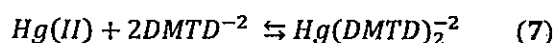
$$\varepsilon_{Complejo} = 9,54 \times 10^2 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$$

4.4.3. Determinación de la constante de formación condicional K'_f .

A partir de la estequiometría de los complejos determinada en la sección anterior, es posible determinar la constante de formación de los complejos, Hg (II)-(DMTD)₂ y CH₃Hg⁺-DMTD.

En el punto 4.4.1 y 4.4.2 se determinó el coeficiente de absortividad molar de los dos complejos formados, de Hg (II) y CH₃Hg⁺, lo que permite obtener las concentraciones reales de todas las especies en cada punto de la curva obtenida mediante el método de Job. Como se quiere calcular la constante de formación del complejo, se determinarán las concentraciones de las especies involucradas en el punto donde se obtiene la estequiometría del complejo.

En primera instancia se tiene el complejo formado con Hg(DMTD)₂, en el cual se considera el siguiente equilibrio.



Por lo tanto, la constante de formación condicional está dada por la siguiente ecuación:

$$K'_f = \frac{[Hg(DMTD)_2^{-2}]}{[Hg(II)][DMTD^{-2}]^2} \quad (8)$$

Realizando el balance de masa;

$$[Hg(II)]_t = [Hg(II)] + [Hg(DMTD)_2^{-2}] \quad (9)$$

$$[DMTD]_t = [DMTD] + 2[Hg(DMTD)_2^{-2}] \quad (10)$$

Despejando los balances de masas obtenidos y reemplazando en la Ecuación 8, se obtiene:

$$K'_f = \frac{[Hg(DMTD)_2^{-2}]}{\{[Hg(II)]_t - [Hg(DMTD)_2^{-2}]\} \{ [DMTD]_t - 2[Hg(DMTD)_2^{-2}] \}} \quad (11)$$

En dónde;

$$[Hg(DMTD)_2^{-2}] = \frac{A_{equivalente} \times C_T}{A_{exacta} (n + 1)} = 6,41 \times 10^{-5} M$$

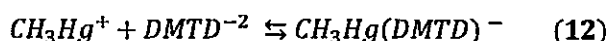
$$[Hg(II)] = [Hg(II)]_t - [Hg(DMTD)_2^{-2}] = C_T f_{Hg(II)} - [Hg(DMTD)_2^{-2}] = 1,59 \times 10^{-5} M$$

$$\begin{aligned} [DMTD] &= [DMTD]_t - 2[Hg(DMTD)_2^{-2}] = C_T (1 - f_{Hg(II)}) - [Hg(DMTD)_2^{-2}] \\ &= 5,59 \times 10^{-5} M \end{aligned}$$

Reemplazando estos valores en K'_f :

$$K'_f = \frac{[6,41 \times 10^{-5} M]}{[1,59 \times 10^{-5} M][5,59 \times 10^{-5} M]^2} = 1,29 \times 10^6$$

De forma análoga se realizó la determinación de la constante para el complejo formado con CH_3Hg^+ y DMTD, sólo que debido a que el complejo formado lo hace en una proporción 1:1, se plantea la siguiente K'_f :



Por lo tanto, la constante de formación condicional está dada por la siguiente ecuación:

$$K'_f = \frac{[CH_3Hg(DMTD)^-]}{[CH_3Hg^+][DMTD^{-2}]} \quad (13)$$

Realizando el balance de masa;

$$[CH_3Hg^+]_t = [CH_3Hg^+] + [CH_3Hg(DMTD)^-] \quad (14)$$

$$[DMTD]_t = [DMTD] + [CH_3Hg(DMTD)^-] \quad (15)$$

Despejando los balances de masas obtenidos y reemplazando en la Ecuación 13, se obtiene:

$$K'_f = \frac{[CH_3Hg(DMTD)^-]}{([CH_3Hg^+]_t - [CH_3Hg(DMTD)^-]) \{ [DMTD]_t - [CH_3Hg(DMTD)^-] \}} \quad (16)$$

En dónde;

$$[CH_3Hg(DMTD)^-] = \frac{A_{equivalente} \times C_T}{A_{exacta} (n + 1)} = 7,94 \times 10^{-5} M$$

$$\begin{aligned} [CH_3Hg^+] &= [CH_3Hg^+]_t - [CH_3Hg(DMTD)^-] = C_T f_{CH_3Hg^+} - [CH_3Hg(DMTD)^-] \\ &= 4,06 \times 10^{-5} M \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} [DMTD] &= [DMTD]_t - [CH_3Hg(DMTD)^-] = C_T (1 - f_{CH_3Hg^+}) - [CH_3Hg(DMTD)^-] \\ &= 6,00 \times 10^{-7} M \end{aligned}$$

Reemplazando estos valores en K'_f :

$$K'_f = \frac{[7,94 \times 10^{-5} M]}{[4,06 \times 10^{-5} M][6,00 \times 10^{-7} M]} = 3,26 \times 10^6$$

Basándose en lo anterior se determinaron las constantes de formación condicional para los complejos, las cuales son presentadas en la Tabla 3.

Tabla 3. Constante de formación condicional y coeficiente de absortividad molar de los complejos.

	K_f	ϵ [L mol ⁻¹ cm ⁻¹]
Hg(II)-DMTD ₂	$1,29 \times 10^6$	$9,90 \times 10^3$
CH ₃ Hg(II) -DMTD	$3,26 \times 10^6$	$9,54 \times 10^2$

Como es sabido la constante de formación condicional describe la reacción entre un ligando y el metal, a cierto valor de pH, es decir, es la constante de equilibrio del complejo a un pH definido. Por lo tanto, el pH es un parámetro importante al momento de la formación de los complejos. El pH utilizado para ambos complejos es 9, un pH bastante básico para este tipo de complejos, ya que se caracterizan por formar especies hidroxiladas y óxidos, cuando se habla de concentraciones 0,01M, a pH mayores a 2,4. Estas son especies insolubles, de color amarillo o rojizo de acuerdo al tipo de especie que se encuentre en el precipitado. Cabe destacar que, aunque las condiciones de formación de estos complejos fueron en medios básicos, no se formaron estas especies, ya que no se formó ningún tipo de precipitado a lo largo del estudio. Lo que implica que la formación del complejo estabiliza a los iones catiónicos en solución, evitando su descomposición a especies hidroxiladas que dificultarían la formación del complejo, evitando su precipitación.

Tomando en consideración que los resultados obtenidos por espectrofotometría UV-Vis. no son los suficiente sensibles para ser aplicados en las muestras de estudio se desarrollará el método analítico mediante espectrofluorimetría.

A continuación, se procederá a la selección de las variables tanto químicas como espectrales para comenzar el desarrollo del método analítico mediante espectrofluorimetría.

4.5. Selección del intercambiador aniónico.

En cuanto a la selección del intercambiador se estudiaron dos tipos de intercambiadores aniónicos: BioRAD AG2X8 y DEAE Sephadex A25.

Al evaluar ambas fases sólidas se seleccionó DEAE Sephadex A25, ya que presenta señales definidas, además ésta resina presenta gránulos regulares, favoreciendo el empaquetamiento de ésta en la celda utilizada en fluorescencia.

Por otro lado, BioRad presenta una banda ancha en la zona de 190-400 nm lo que dificulta la lectura de la señal analítica de los complejos, debido a que a ese rango de longitud de onda absorben ambos complejos. Los espectros de fluorescencia de las resinas mencionadas anteriormente se observan en la Figura 21.

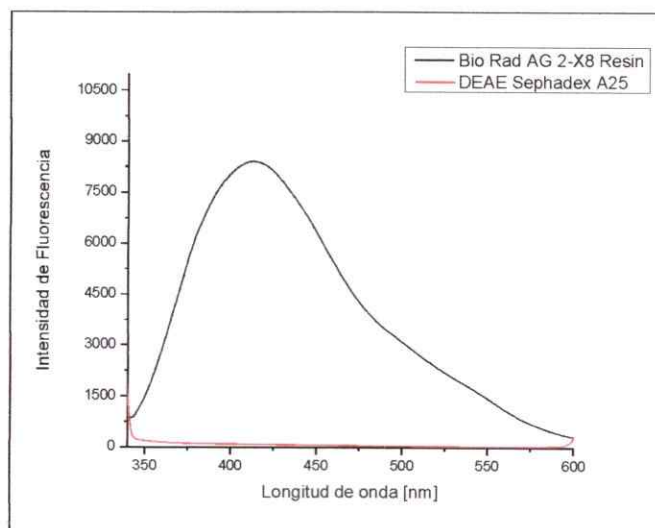


Figura 21. Espectros de fluorescencia de las resinas aniónicas.

4.6. Selección de la longitud de onda de excitación, λ_{exc} , y λ_{em} .

Para comenzar el desarrollo del método analítico mediante espectrofluorimetría, es necesario conocer la longitud de onda de excitación óptima del complejo. Para ello se evaluó la señal analítica del ligante DMTD en solución, del ligante DMTD a pH 9 y además la del complejo a ese mismo pH en fase sólida. Estos espectros se pueden observar en la Figura 22.

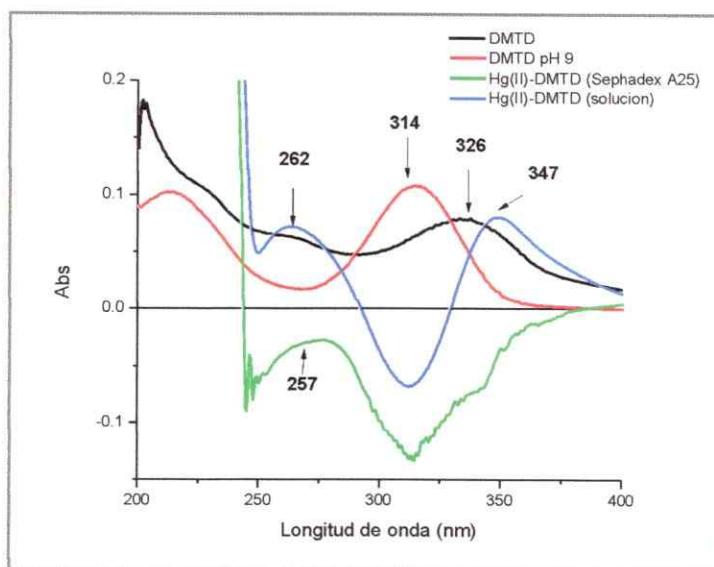


Figura 22. Espectros de absorción de DMTD, DMTD pH 9, Hg (II)-DMTD en solución y en el intercambiador Sephadex A25.

Dentro de los estudios preliminares realizados por espectrofluorimetría, se seleccionaron las longitudes de onda de excitación de los complejos en fase sólida. Para ello se evaluó la señal analítica del ligante DMTD a pH 9 y además la del complejo retenido en fase sólida a ese mismo pH y se midieron los espectros UV-Vis., obteniendo los siguientes máximos de absorción: 262, 314, 326 y 347 nm. Utilizando la espectrofluorimetría, se realizó la excitación de los complejos en fase sólida a dichas

longitudes de onda, con el fin de conocer el comportamiento espectral de éstos retenidos en el intercambiador. Se seleccionó como longitud de onda de excitación (λ_{exc}) óptima 314 nm, ya que a esa longitud de onda los espectros de emisión están más resueltos y con alta intensidad de fluorescencia, lo que aumentaría la sensibilidad del método a desarrollar.

Para complementar este estudio se realizó un análisis 3D a los analitos retenidos en el intercambiador. Para ello se utilizó un rango de excitación de 220 a 400 nm, con un intervalo de muestreo de excitación de 5 nm. Un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 600 nm, con un intervalo de muestreo de emisión de 2 nm y un $slit_{exc/em} = 10/20$ nm. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 23 y 24.

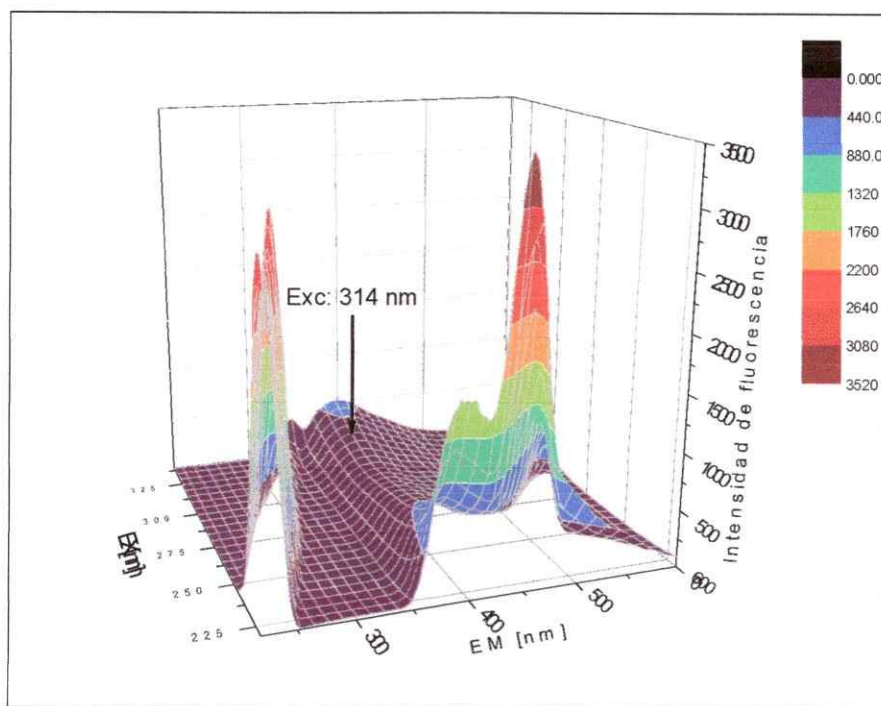


Figura 23. Gráfico 3D para el complejo Hg(II)-DMTD.

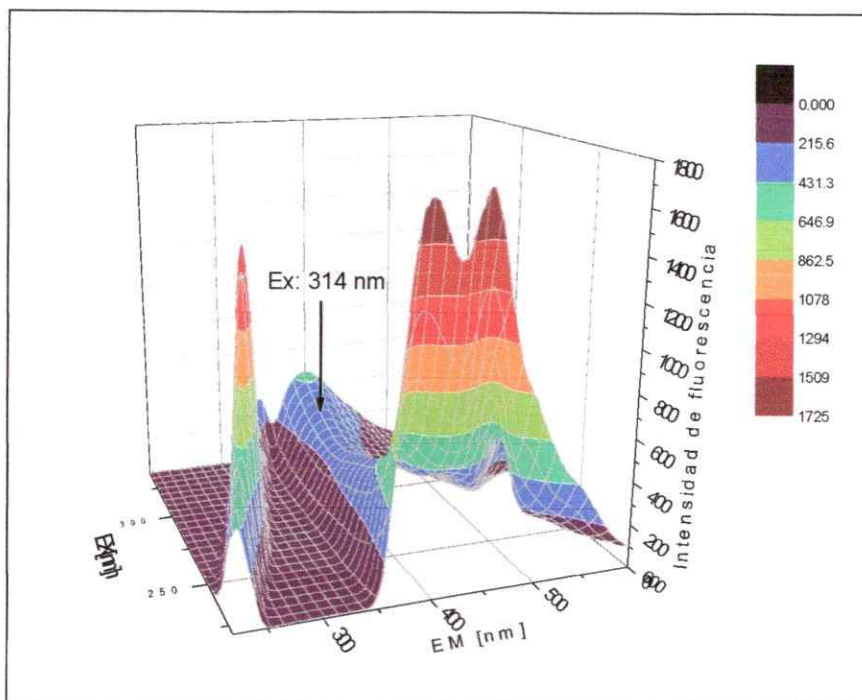


Figura 24. Gráfico 3D CH₃Hg⁺-DMTD.

Por otro lado con el fin de optimizar al máximo la intensidad de señal, se probaron con distintos *slits* de excitación y emisión, dando a conocer que a medida que el *slit* aumenta también lo hace la intensidad, pero a su vez la señal que se obtiene a un mayor *slit* es más ruidosa. Cuando lo que se necesita es resolver bandas de emisión estrechas, es necesario ocupar un *slit* pequeño, pero éste a su vez disminuye la potencia radiante sobre la muestra, por lo que se recomienda que para realizar análisis cuantitativos sobre una muestra utilizar un ancho de ranura mayor, ya que permite obtener un detalle espectral mucho mayor. Por lo tanto, para no sacrificar la sensibilidad del método en cuanto a la relación señal/ ruido el *slit* de excitación y emisión elegido es 10/20.

Con la longitud de onda de excitación elegida y el *slit* de excitación y emisión adecuado, se procedió a realizar una medición en donde se viera el efecto que tienen

estos factores sobre la resina Sephadex A25, con el fin de conocer, si ésta al ser excitada a cierta longitud de onda interfiere en los resultados. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura 25.

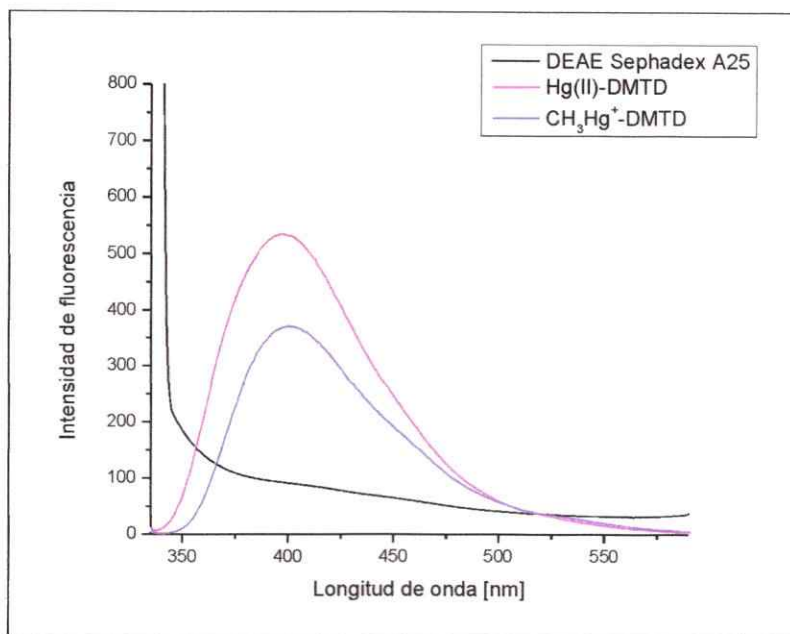


Figura 25. Espectros de fluorescencia de la resina DEAE Sephadex A25 y los complejos en el intercambiador. $\lambda_{exc} = 314 \text{ nm}$ $slit_{exc/em} = 10/20$.

En la Figura 20 se puede observar que a pesar que la intensidad de fluorescencia de la resina es significativa, el efecto de ésta se elimina al realizar la resta del blanco en el tratamiento de datos, y minimizar su interferencia en los resultados.

Por otro parte, es sabido que uno de los factores que influyen en la fluorescencia es la rigidez, al tener compuestos rígidos, la intensidad de fluorescencia es mayor, y una forma de aumentar la rigidez es formando complejos, ya que se disminuyen las vibraciones internas de los compuestos, minimizando el cruce intersistemas al estado triplete y la degradación térmica debido a los choques moleculares. Esto explica el

aumento en la intensidad de fluorescencia al medir el complejo y compararlo con el ligante solo y el intercambiador DEAD Sephadex A25.

4.7. Optimización de las variables químicas y de preconcentración.

Con el fin de conocer cuáles son las condiciones químicas óptimas para lograr la formación de los complejos y su retención cuantitativa en la resina de intercambio aniónico, se estudió el efecto que tiene la concentración de ligante DMTD y la concentración de amortiguador en la formación de los complejos con los analitos en estudio. La señal analítica se evaluó mediante espectrofluorimetría.

4.7.1. Efecto de la concentración de DMTD.

Para conocer cuál es la concentración óptima de DMTD para la formación de los complejos, ésta se varió entre 2,0 y 14 mg/L. En la Figura 26, se puede observar que a concentraciones bajas de DMTD la formación de los complejos no es cuantitativa para ambos analitos. Considerando que la concentración utilizada de Hg (II) fue de 12 µg/L y de CH₃Hg⁺ fue de 13 µg/L, es posible establecer como relación DMTD: metal, que permite una formación cuantitativa de los complejos, de 58:1 y 70:1, respectivamente. Entre 9 y 14 mg/L la intensidad de fluorescencia fue máxima y constante, indicando que en ese intervalo de concentración la formación y retención de los complejos es cuantitativa para ambos analitos. Se seleccionó como concentración óptima 11 mg/L de DMTD, para la formación de ambos complejos.

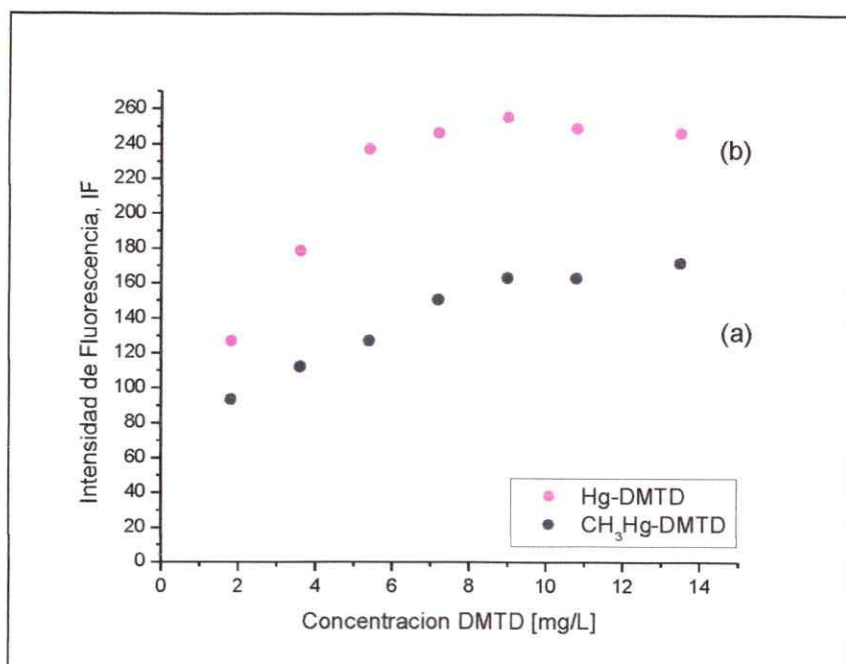


Figura 26. Efecto de la concentración de DMTD sobre la señal analítica de los complejos retenidos en el intercambiador. (a) CH_3Hg^+ -DMTD (b) $\text{Hg}(\text{II})$ -DMTD. CH_3Hg^+ 13 $\mu\text{g/L}$, $\text{Hg}(\text{II})$ 12 $\mu\text{g/L}$, 8 mL de amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9, 70 mg de DEAE Sephadex A25, 30 min de agitación.

4.7.2. Efecto de la concentración del amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9.

El efecto que tiene la concentración del amortiguador $\text{H}_3\text{BO}_3/\text{NaH}_2\text{BO}_3$ 0,1 M pH 9 en la solución se estudió variando el volumen de 1,0 a 14 mL. Como se observa en la Figura 27, un volumen inferior a 5,0 mL no proporciona el pH adecuado para la formación de los complejos impidiendo la formación cuantitativa de éstos, ya que al estar más diluido se pierde la capacidad amortiguadora. A partir de 5,0 mL de amortiguador, las señales comienzan a permanecer constantes para cada complejo, seleccionándose un volumen de 6 mL para el complejo de $\text{Hg}(\text{II})$ -DMTD y 7 mL para el complejo CH_3Hg^+ -DMTD. En estas condiciones, se satisface la retención cuantitativa de los analitos sin

ocupar sitios activos de la resina DEAE Sephadex A25 y se asegura tener un exceso de amortiguador para evitar fuentes de errores.

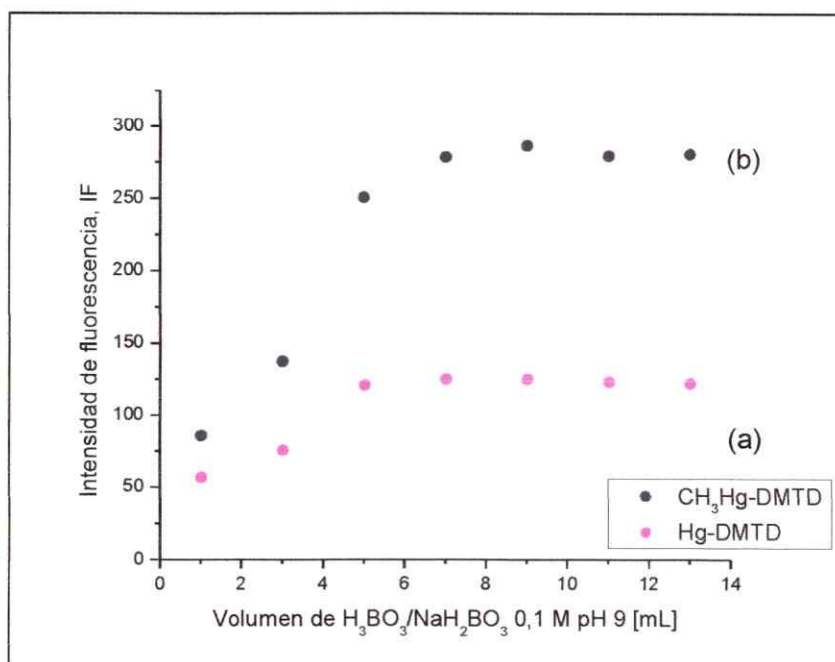


Figura 27. Efecto del volumen de amortiguador H₃BO₃/NaH₂BO₃ 0,1 M pH 9 sobre la señal analítica de los complejos retenidos en el intercambiador. (a) CH₃Hg⁺-DMTD (b) Hg(II)-DMTD. CH₃Hg⁺ 13 ug/L, Hg(II) 12 ug/L, 70 mg de DEAE Sephadex A25, 30 min de agitación, 11 mg/L de DMTD.

La optimización de las variables de preconcentración se llevó a cabo estudiando el efecto de la masa de la resina DEAE Sephadex A25, del tiempo de agitación y de la dilución de los complejos.

4.7.3. Efecto de la masa de resina DEAE Sephadex A25.

El efecto de la cantidad de masa de resina se estudió variando la masa de resina desde los 60 mg hasta los 200 mg. Como se observa en la Figura 28, cuando

la cantidad de resina es menor, la intensidad de fluorescencia es mayor. Este efecto se puede explicar ya que al haber una menor cantidad de resina se favorece una mayor preconcentración de los analitos, en cambio cuando la cantidad de resina es muy grande, la preconcentración se ve desfavorecida. Por lo tanto, se seleccionó 70 mg de masa de resina para ambos complejos. Como el efecto de la masa de resina es significativo, ésta debe ser exactamente medida para evitar errores al momento de comenzar la agitación, lo que conlleva a errores en los resultados.

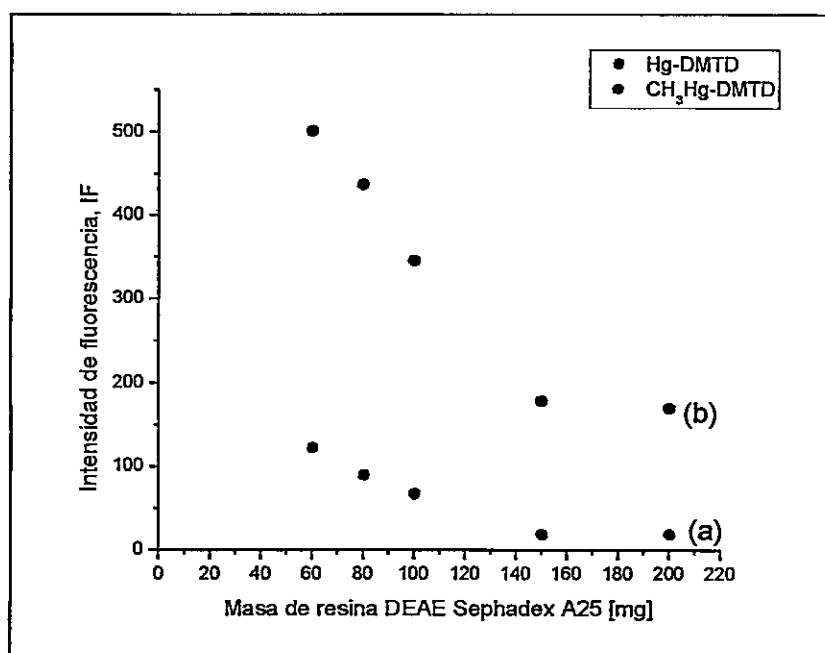


Figura 28. Efecto de la masa de resina DEAE Sephadex A25 sobre la señal analítica de los complejos retenidos en el intercambiador. (a) CH₃Hg⁺-DMTD (b) Hg (II)-DMTD. CH₃Hg⁺ 13 ug/L, Hg (II) 12 ug/L, 8 mL de amortiguador H₃BO₃/NaH₂BO₃ 0,1 M pH 9, 30 min de agitación y 11 mg/L de DMTD.

4.7.4. Efecto del tiempo de agitación.

El efecto del tiempo de agitación se midió en un rango de 5 a 50 min. En la Figura 29 se observa que sobre 20 min de agitación existe una constancia en la intensidad de fluorescencia para el complejo Hg(II)-DMTD, en cambio el complejo CH₃Hg⁺-DMTD necesita un tiempo mayor, comenzando una constancia en las señales de fluorescencia a 30 minutos de agitación.

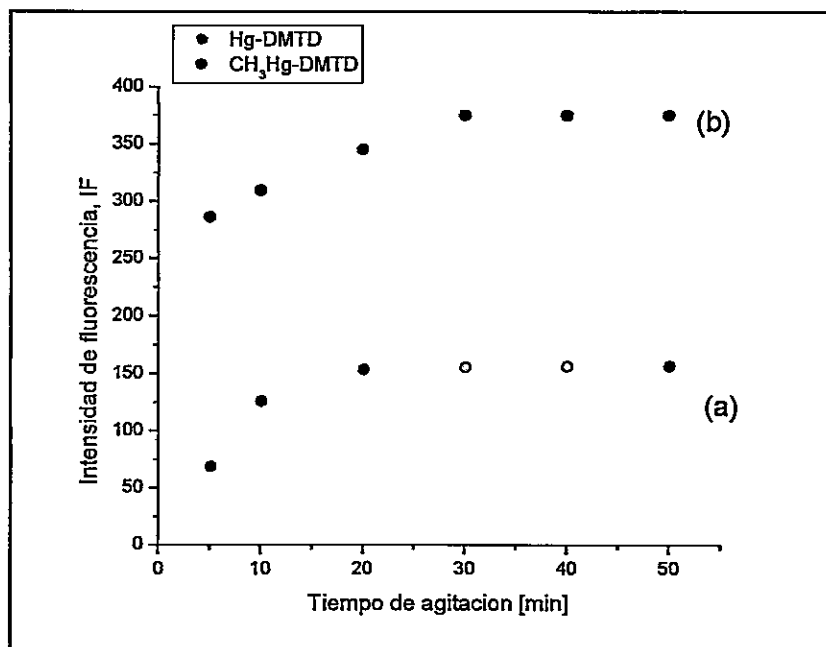


Figura 29. Efecto del tiempo de agitación sobre la señal analítica de los complejos retenidos en el intercambiador. (a) CH₃Hg⁺-DMTD (b) Hg (II)-DMTD. CH₃Hg⁺ 13 ug/L, Hg (II) 12 ug/L, 8 mL de amortiguador H₃BO₃/NaH₂BO₃ 0,1 M pH 9, 70 mg de DEAE Sephadex A25, 11 mg/L de DMTD.

4.7.5. Efecto del volumen de la solución.

Para conocer el efecto que produce el volumen final de la solución, se varió el volumen de la solución desde 100 a 400 mL. En la Figura 30, se observó una constancia de la intensidad de fluorescencia en todo el rango estudiado. Se seleccionó

como volumen de trabajo de 100 mL de solución, con el objeto de aumentar los choques efectivos entre la resina-complejo y favorecer la manipulación de la resina del vaso de precipitado.

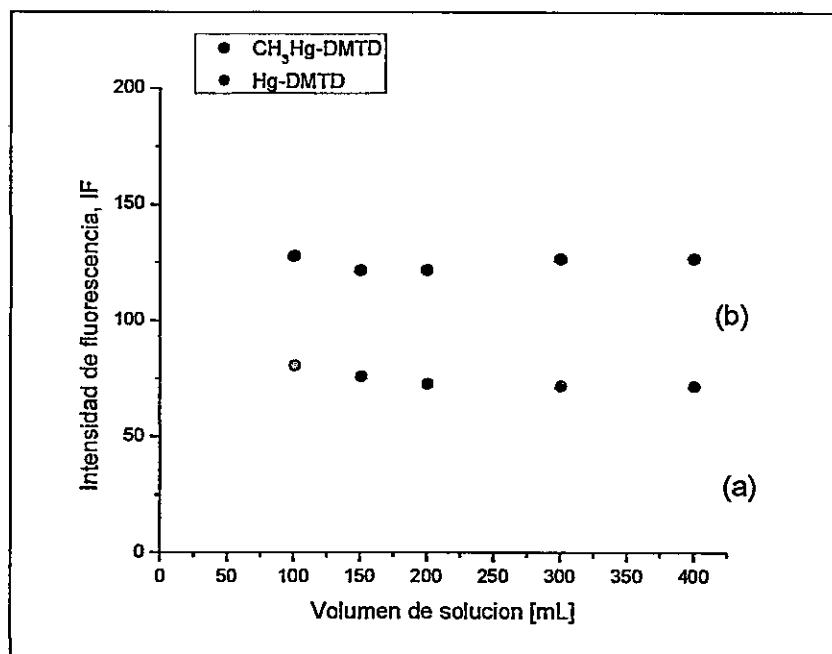


Figura 30. Efecto en el volumen de la solución sobre la señal analítica de los complejos retenidos en el intercambiador. (a) CH₃Hg⁺-DMTD (b) Hg (II)-DMTD. CH₃Hg⁺ 13 ug/L, Hg (II) 12 ug/L, 8 mL de amortiguador H₃BO₃/NaH₂BO₃ 0,1 M pH 9, 70 mg de DEAE Sephadex A25, 11 mg/L de DMTD, 30 minutos de agitación.

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, las variables químicas y de preconcentración optimizadas para la favorecer la formación de los complejos y con ello la retención cuantitativa en el intercambiador con los analitos estudiados se pueden observar en la Figura 31.

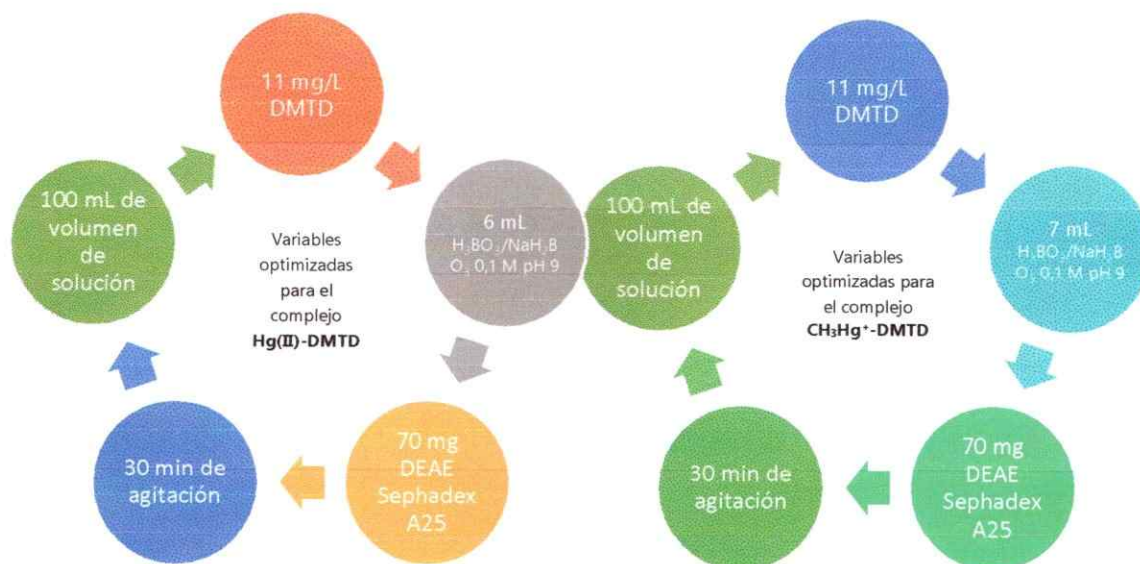


Figura 31. Variables optimizadas de los complejos de Hg (II)-DMTD y CH₃Hg⁺-DMTD, retenidos en el intercambiador DEAE Sephadex A25.

4.8. Caracterización de los complejos.

Con el fin de conocer el comportamiento de los complejos retenidos en la resina de intercambio aniónico DEAE Sephadex A25, una vez optimizadas todas las condiciones químicas y de preconcentración, se realizó la caracterización de éstos mediante tres técnicas: IR, SEM, y EDX.

4.8.1. Espectroscopía Infrarroja, FT-IR.

De acuerdo al procedimiento 3.4.10.1, las muestras se prepararon y fueron medidas mediante FT-IR. Los resultados se observan en la Figura 32, 33 y 34.

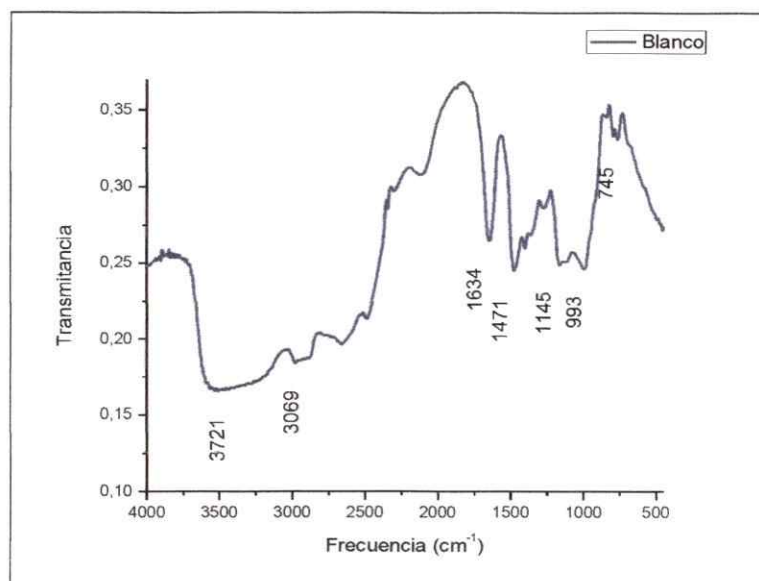


Figura 32. Espectro FT-IR del blanco DEAE Sephadex A25.

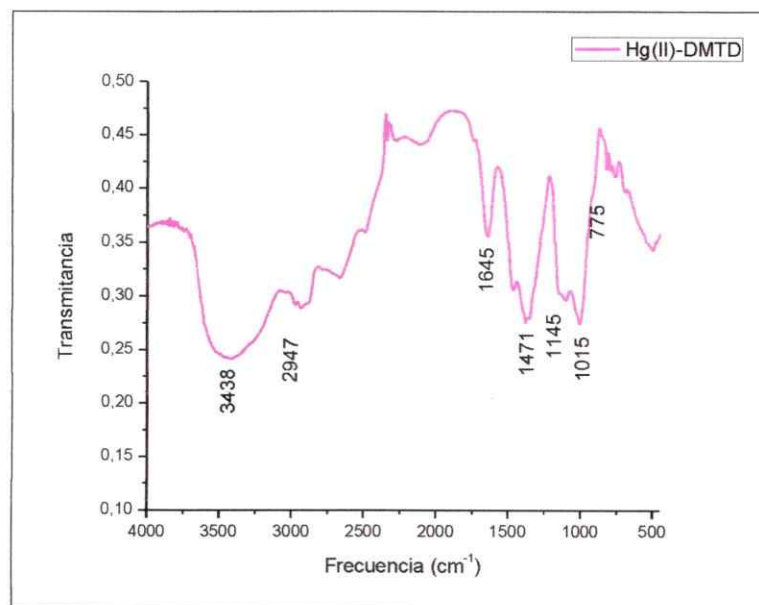


Figura 33. Espectro FT-IR del complejo Hg(II)-DMTD retenido en DEAE Sephadex A25.

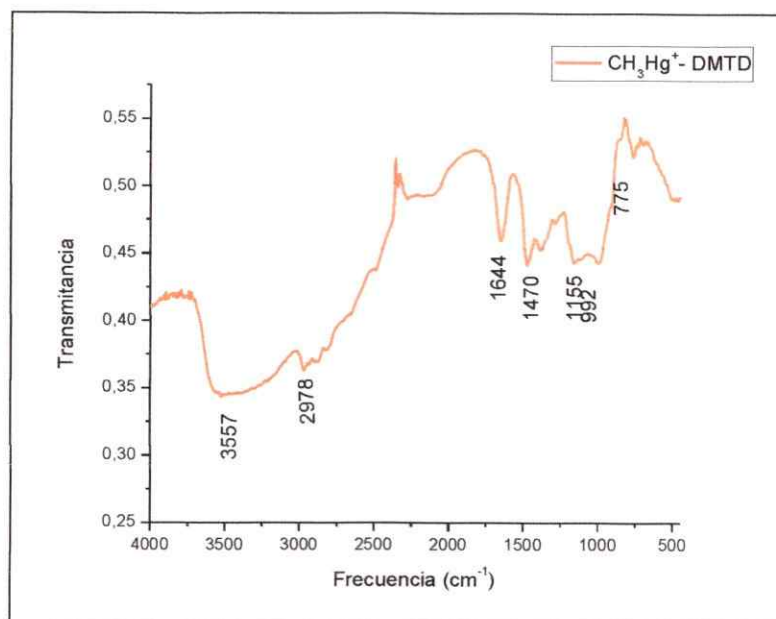


Figura 34. Espectro FT-IR del complejo CH_3Hg^+ -DMTD retenidos en DEAE Sephadex A25.

En las Figuras 32, 33 y 34 se muestran los espectros FT-IR de las muestras. Se puede observar que los anchos de banda son muy grandes, lo que hace imposible generar resultados cuantitativos por la característica de la matriz. La matriz es una cadena entrecruzada de unidades de dextrano³⁷, utilizando como ligando dietilaminoetil y como contra ion o grupo ionogénico al anión cloruro. Al ser una matriz tan grande, con numerosos grupos entrecruzados, el espectro de la matriz enmascara todas las posibles señales de los analitos en estudio, ya que para asignar señales éstas deben estar más resueltas y el porcentaje de la muestra no debe ser mayor a un 5%. Es por ello que los espectros obtenidos no pueden caracterizar de forma idónea las muestras y solo pueden ser representadas las bandas generales de la matriz.

De acuerdo a los espectros obtenidos (al no presentar diferencia alguna) se pueden asignar las siguientes señales: una banda intensa a los 3451 cm^{-1} característica

de los grupos $\text{-OH stretching}^{38}$ que se encuentran en la matriz de dextrano, sugiriendo que existe una interacción fuerte entre las cadenas del polisacárido. Las bandas a los 2935, 1481 y 1365 cm^{-1} pueden ser asignadas a los grupos $\text{-CH}_2\text{-}$ de la cadena entrecruzada de dextrano³⁹, y a los modos vibracionales -CH- respectivamente. Con respecto a la amina terciaria (ligando) ubicada en la resina no presenta absorciones del tipo -NH- que se puedan confundir con la banda intensa del grupo hidroxilo, por lo que sus señales pueden ser asignadas a las vibraciones -C-N- que aparecen entre los 1000-1200 cm^{-1} , que en nuestro espectro aparecen a los 1118 y 1014 cm^{-1} . En esta misma zona también es posible observar las bandas características de las vibraciones -C-C- y -C-O- , por lo que no es una zona útil para identificar aminas. La señal a los 1647 cm^{-1} puede ser asignada al éter aromático de la cadena entrecruzada de dextrano. Con respecto al grupo $\text{-CH}_2\text{-S-}$ presente en el ligante DMTD este se puede identificar como una señal débil a los 794 cm^{-1} , lo que indicaría que el grupo tiol se encuentra desprotonado, ya que el grupo -SH- presenta bandas débiles a los 2500 cm^{-1} , 1000-800 $\text{cm}^{-1(40)}$, bandas que no se ven en ninguno de los espectros analizados, lo que implicaría que el azufre se encuentra enlazado.

4.8.2. Microscopía electrónica de barrido, SEM.

De acuerdo al procedimiento experimental 3.4.10.1 se prepararon las muestras y fueron medidas mediante Microscopía electrónica de barrido, SEM. En la Figura 35, 36 y 37 se muestran los resultados obtenidos para una muestra blanco, es decir, una muestra de resina sin complejo, una muestra de resina con el complejo Hg (II)-DMTD y una muestra de resina con $\text{CH}_3\text{Hg}^+\text{-DMTD}$, respectivamente.

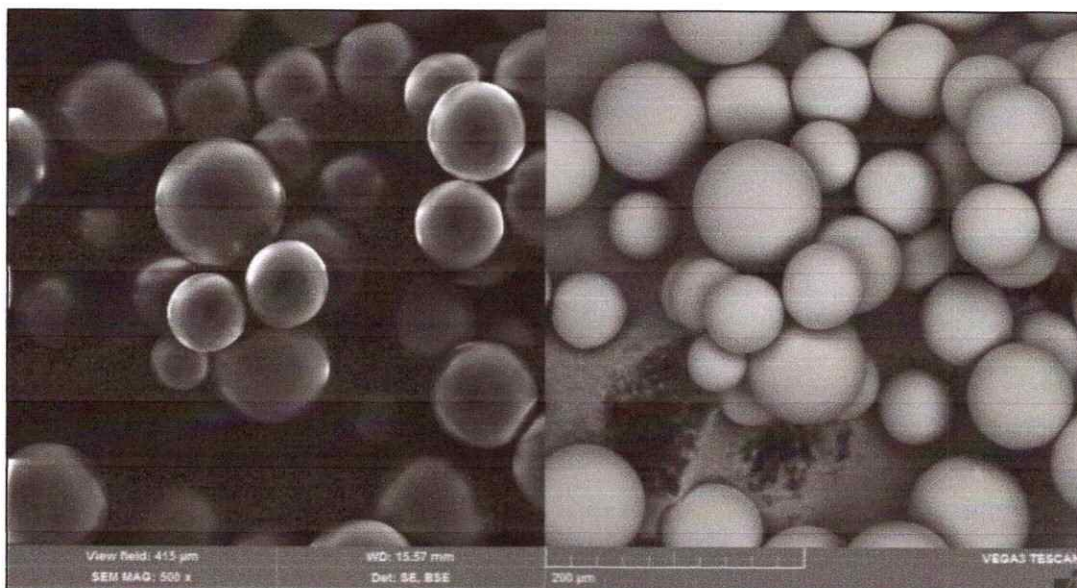


Figura 35. Imágenes SEM de una muestra blanco en el intercambiador DEAE Sephadex A25.

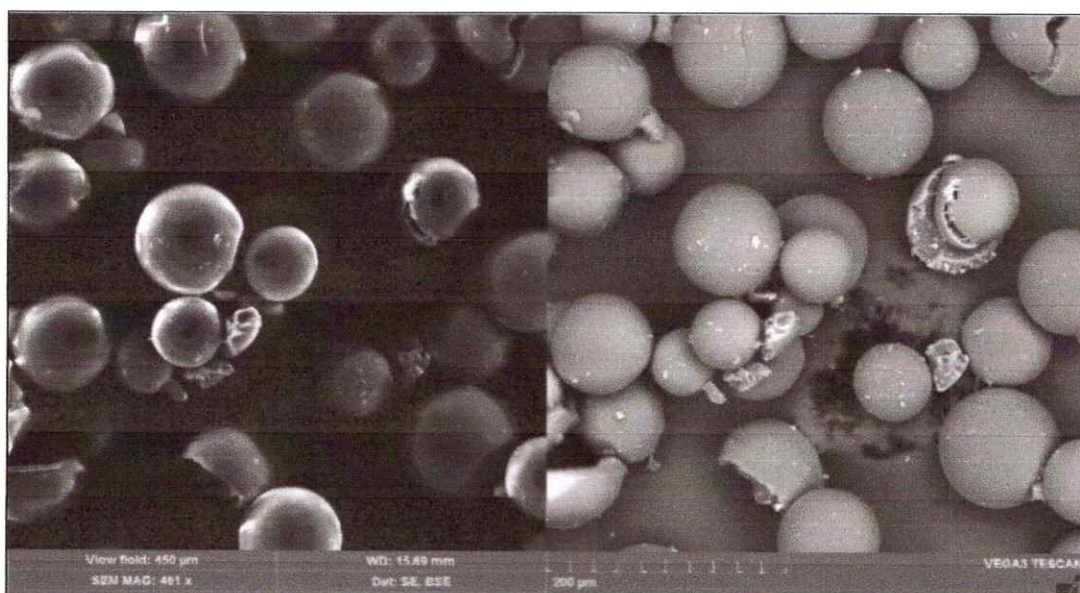


Figura 36. Imágenes SEM de DEAE Sephadex A25 con el complejo Hg (II)- DMTD.

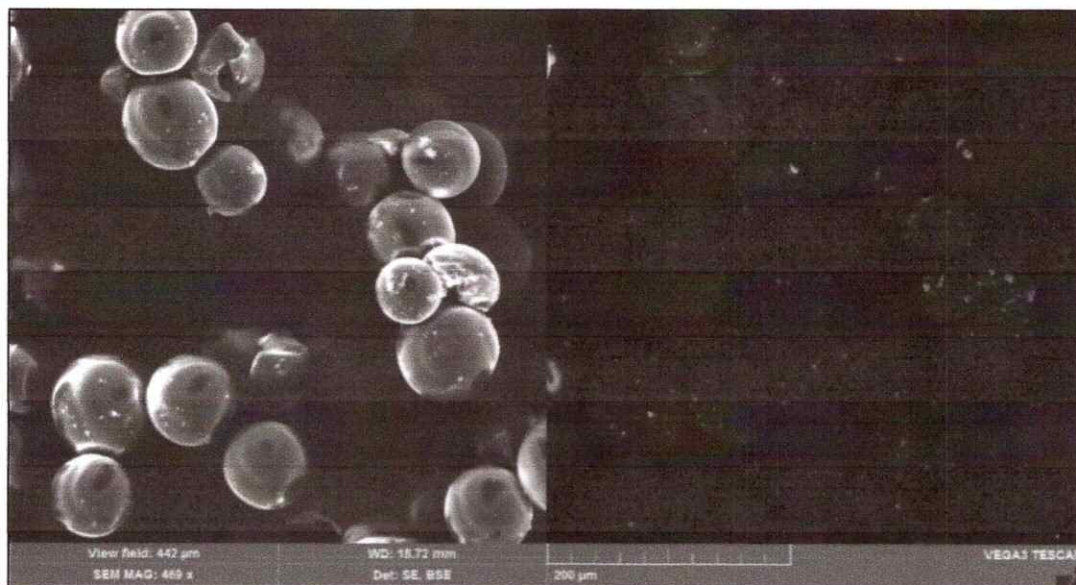


Figura 37. Imágenes SEM de DEAE Sephadex A25 con el complejo CH_3Hg^+ -DMTD.

Estas imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra, se obtienen usando un haz altamente concentrado de electrones primarios. Estos electrones entran a la superficie con una energía entre 0,5 y 30 kV, generando electrones secundarios de baja energía, en donde, la intensidad de estos electrones permite determinar la topografía de la superficie. Por lo tanto, la imagen obtenida está en función de la intensidad de estos electrones secundarios y la posición del haz de electrones primarios.

La intensidad de los electrones retro dispersados *backscattered* se puede correlacionar con el número atómico del elemento contenido en la muestra, permitiendo un análisis cualitativo de ésta.

En estas imágenes es posible observar las especies de mercurio retenidas como puntos brillantes, siendo los únicos metales presentes en las muestras el Hg (II) y CH_3Hg^+ al estado de complejo, se pueden atribuir a que éstos se encuentran retenidos

en la resina. Sin embargo, con el fin de obtener resultados más cuantitativos se realizó un EDX, Energía de Dispersión de Rayos X, a las mismas muestras.

4.8.3. Energía de dispersión de rayos X, EDX.

Para obtener un análisis cuantitativo de la muestra es necesario realizar un mapeo elemental EDX, que permite conocer la estequiometría de los elementos contenidos en la muestra, a través de la composición elemental de la muestra⁴¹. Los resultados se muestran en la Figura 38, 39 y 40.

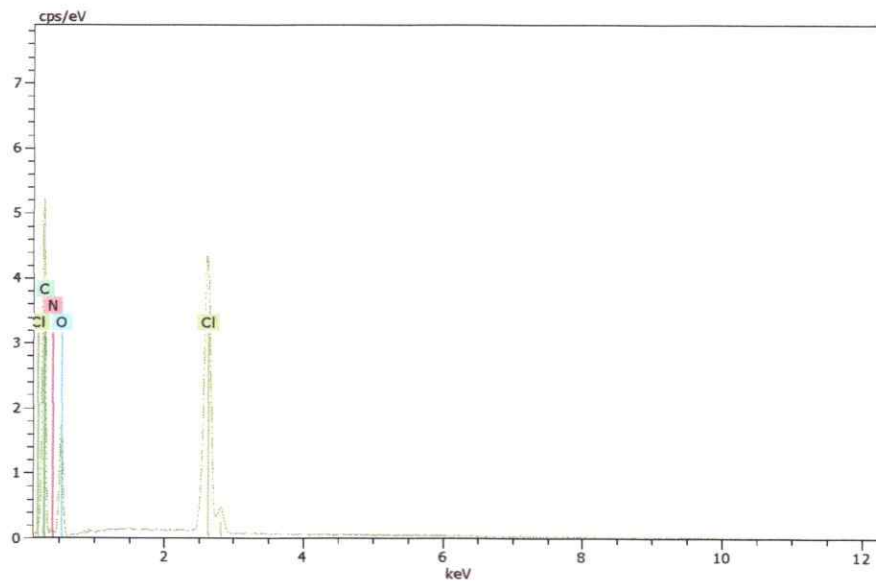


Figura 38. Proporción relativa de los componentes del blanco DEAE Sephadex A25.

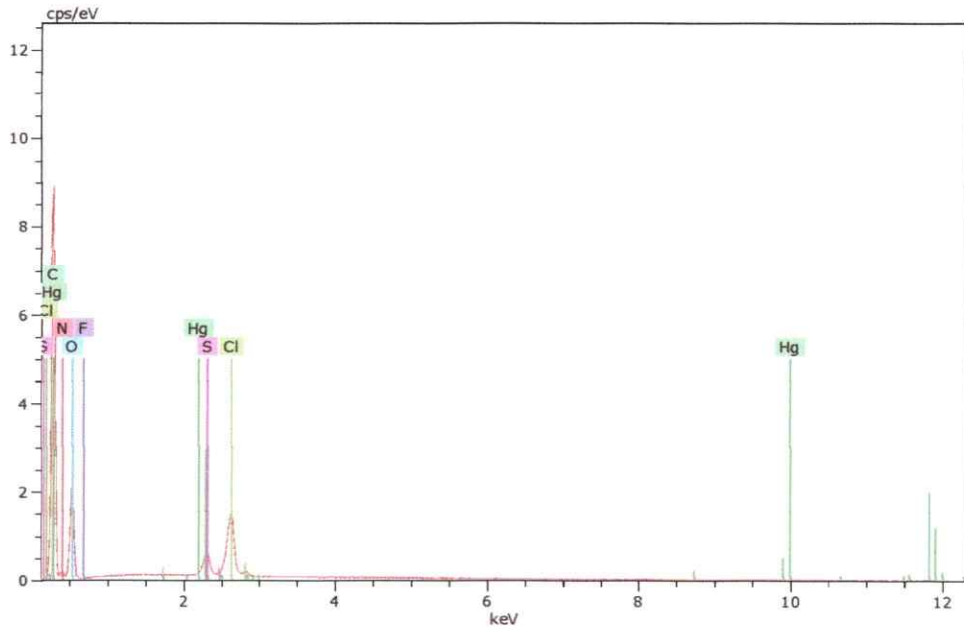


Figura 39. Proporción relativa del complejo Hg(II)-DMTD.

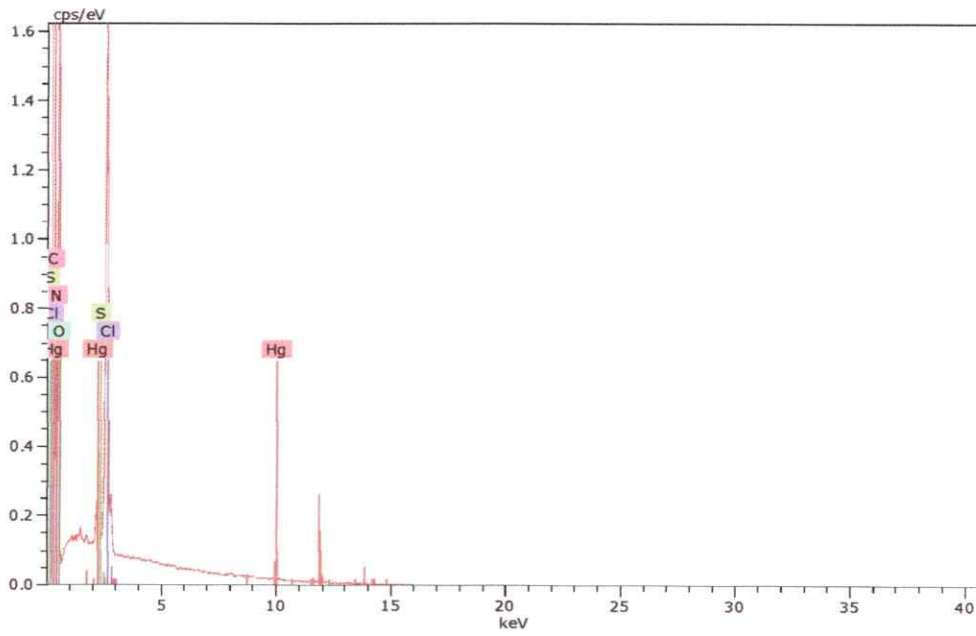


Figura 40. Proporción relativa del complejo CH₃Hg⁺-DMTD.

Con los resultados obtenidos del mapeo EDX, se realizó el cálculo de la estequiometría en la muestra, concordando con los resultados obtenidos mediante el método de Job. Para el complejo retenido de Hg(II)-DMTD se obtuvo mediante el método de Job una estequiometría de 1:2, es decir, por un átomo de Hg (II) se coordinan 2 moléculas de DMTD, y de acuerdo al EDX se obtuvo una estequiometría 1: 1,95. En el caso del complejo CH_3Hg^+ -DMTD se obtuvo mediante el método de Job una estequiometría 1:1, y mediante los resultados de EDX se obtuvo una estequiometría de 1: 0,82.

Otra información relevante de este estudio, es que, al hacer incidir el haz de electrones en una porción definida de la muestra, se puede observar la disposición espacial de cómo se encuentran dispersos los metales en la muestra. Los resultados se muestran en la Figura 41 y 42.

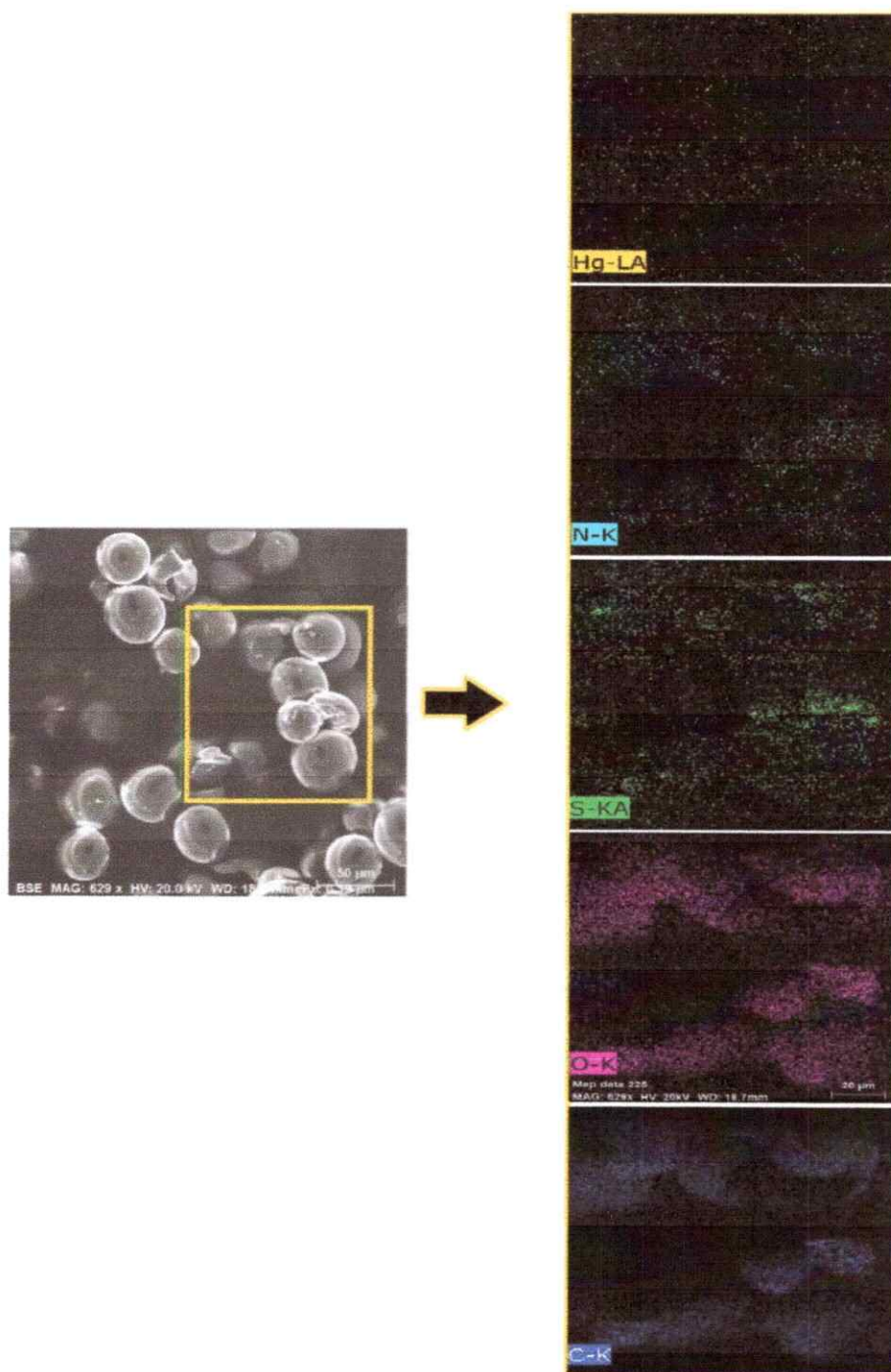


Figura 41. Mapeo EDX del complejo CH_3Hg^+ -DMTD.

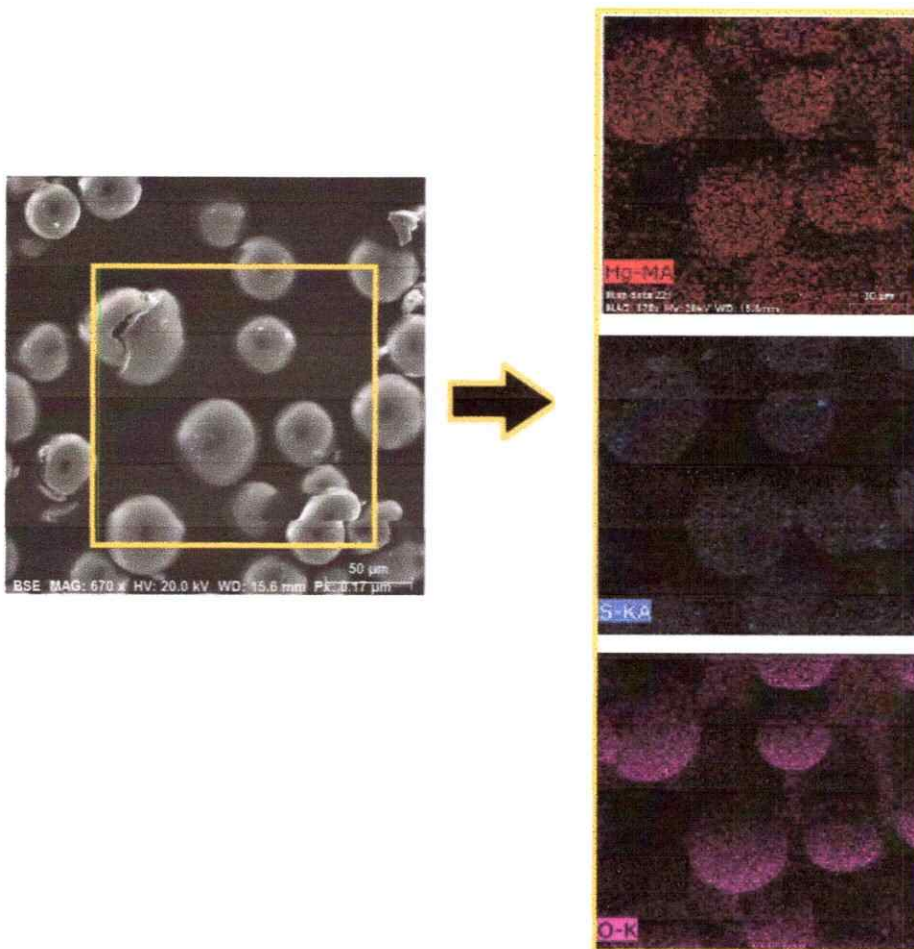


Figura 42. Mapeo EDX del complejo Hg (II)-DMTD.

En la Figura 41 y 42 es posible observar la distribución de Hg(II) y CH_3Hg^+ en el intercambiador aniónico y con ello comprobar la retención de los analitos en la resina. Es posible observar que la distribución del complejo Hg(II)-DMTD muestra una distribución más homogénea sobre el intercambiador que el complejo de CH_3Hg^+ -DMTD.

Esto se debe al tamaño del complejo formado por ambos iones. El radio iónico del Hg es de 1,10 Å, por lo que, al estar unido a un grupo metilo, como es el caso del CH_3Hg^+ , su radio aumenta, formando un complejo de mayor tamaño a que si estuviera coordinado sólo como es el caso del Hg (II). Lo que hace que se retenga de manera más uniforme en el intercambiador, ya que posee menor impedimento estérico.

Al ser un intercambiador aniónico, éste no retiene cationes como lo son el Hg (II) y el CH_3Hg^+ , por lo tanto, la única forma en la que se retengan en el intercambiador es a través de un complejo aniónico formado entre ellos y el ligante DMTD.

Utilizando como información complementaria el SEM y el EDX se puede verificar la formación del complejo, ya que se corroboró la estequiometría obtenida mediante el método de Job y además la presencia de Hg(II) y CH_3Hg^+ en las muestras.

De acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, es posible proponer una estructura para cada uno de los complejos. La química de coordinación de las especies de mercurio, presentan un carácter ácido, por lo cual, tiene la tendencia de formar enlaces covalentes con especies donoras de electrones como los son el S, N y P⁴².

Los complejos de Hg(II), tienen una preferencia por la geometría lineal o tetraédrica con respecto a su coordinación con ligantes bidentados, monodentados o de acuerdo al tipo de estequiometría que el complejo formado con alguna de estas especies posea. Los complejos de CH_3Hg^+ , tienden a formar con ligantes con grupos $-\text{S}^-$, estequiometrías 1:1, una geometría de tipo lineal y formando un enlace covalente. El orden de coordinación en orden decreciente es $\text{S} > \text{I} > \text{Br} > \text{Cl} > \text{N} > \text{O}$ ³¹.

Con todos estos antecedentes se puede proponer una estructura para Hg(II)-DMTD de tipo tetraédrica, actuando DMTD como ligante bidentado, y formando

finalmente un complejo de tipo aniónico. Con respecto a CH_3Hg^+ -DMTD formaría un complejo de tipo lineal y aniónico. Ambos complejos son retenidos en la resina DEAE Sephadex A25 mediante una interacción electrostática entre el complejo y el grupo ligando de la resina. En la Figura 43, 44 y 45 se observan las estructuras propuestas.

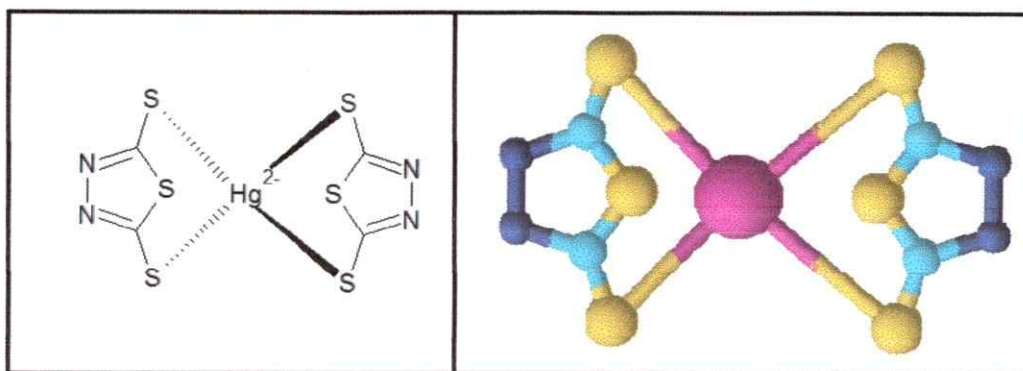


Figura 43. Estructura propuesta para el complejo Hg(II) -DMTD en 2D y 3D.

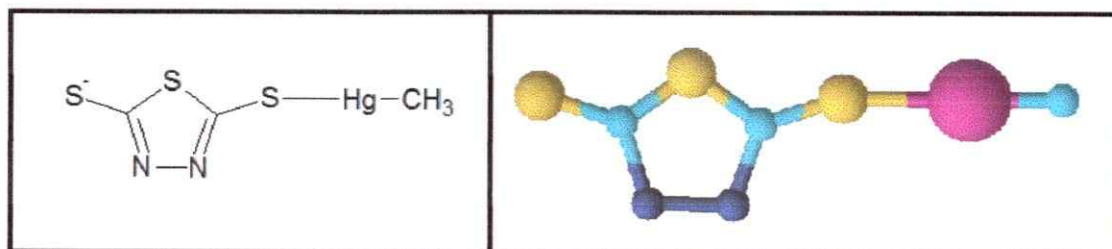


Figura 44. Estructura propuesta para el complejo CH_3Hg^+ -DMTD en 2D y 3D

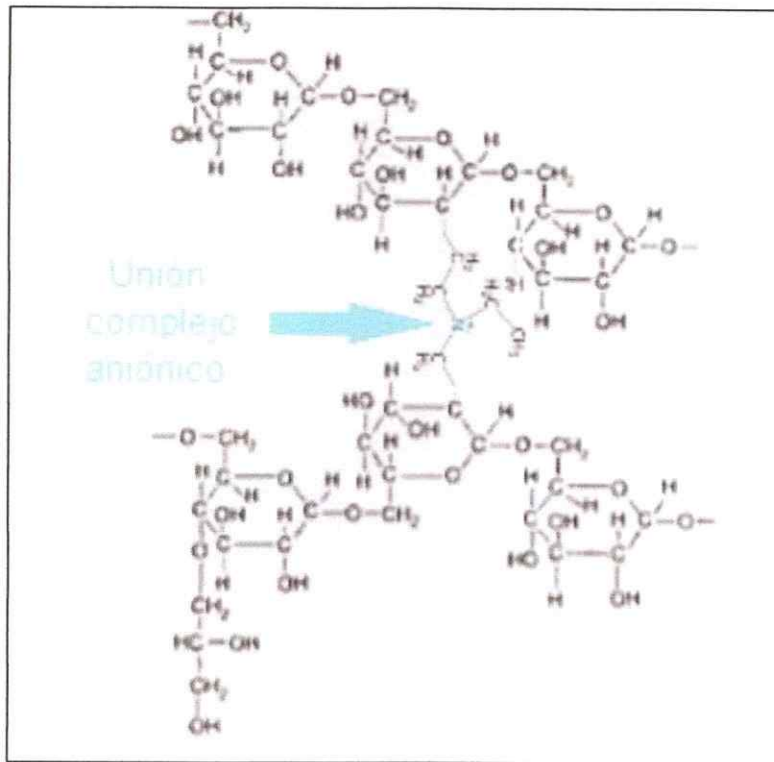


Figura 45. Estructura DEAE Sephadex A25.

4.9. Validación del método.

4.9.1. Linealidad del sistema.

Para desarrollar la validación del sistema se realizó una curva de calibración con estándares, y así poder observar, si existe una relación lineal entre la concentración y la intensidad de fluorescencia. Los resultados se presentan en la Figura 46 y 47 y Tabla 4.

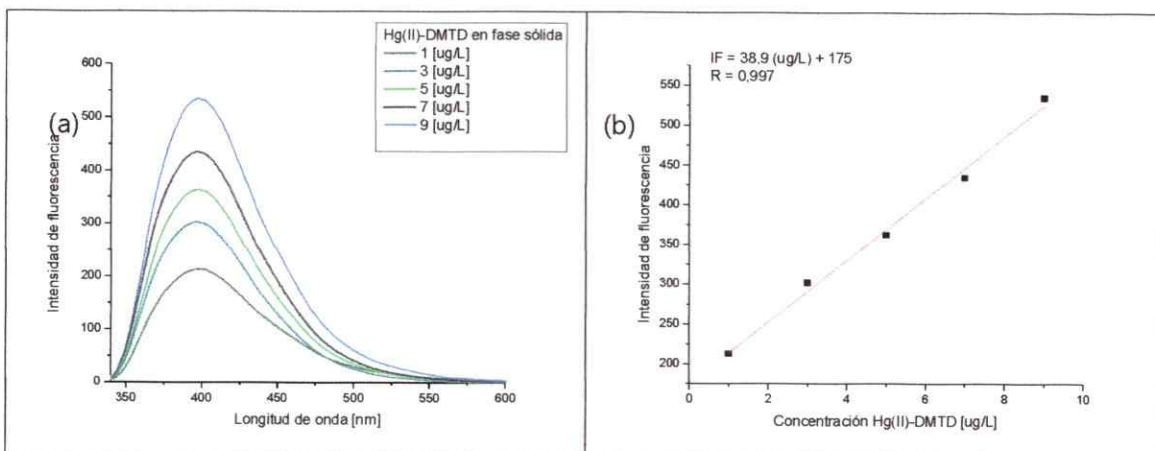


Figura 46. (a) Espectros de fluorescencia de Hg(II)-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25. (b) Curva de calibración de Hg(II)-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25.

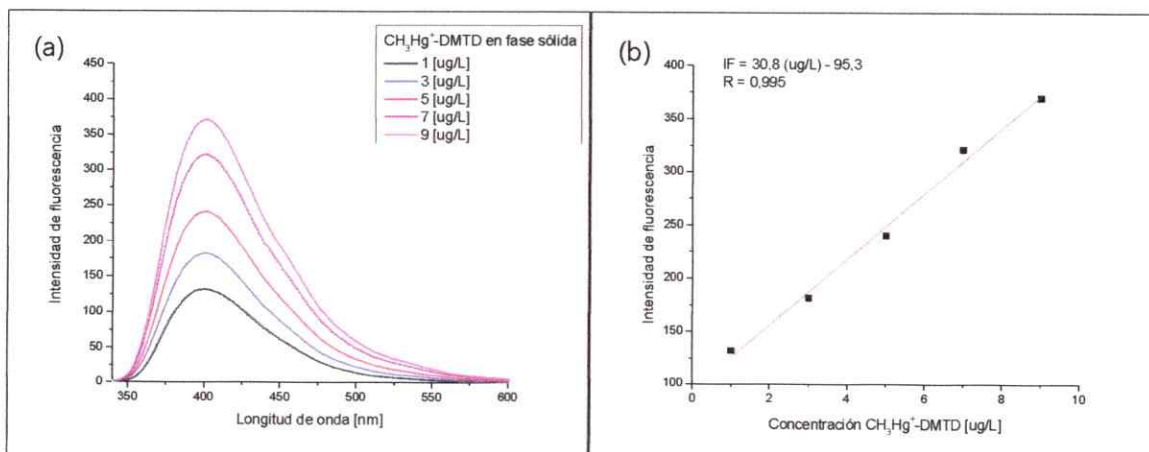


Figura 47. (a) Espectros de fluorescencia de CH₃Hg⁺-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25. (b) Curva de calibración de CH₃Hg⁺-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25.

Tabla 4. Parámetros analíticos del sistema obtenidos para el complejo Hg (II)-DMTD y CH₃Hg-DMTD retenidos en el intercambiador DEAE Sephadex A25 mediante espectrofluorimetría.

	Hg(II) – DMTD	CH ₃ Hg-DMTD
Longitud de onda de excitación (nm)	314	314
<i>Slit_{exc/em}</i>	10/20	10/20
Longitud de onda analítica (nm)	397	399
Ecuación de la recta de la curva de calibración	IF=38,9 (ug/L) +175	IF=30,8 (ug/L) – 95,3
Coefficiente de correlación (r)	0,997	0,995
Límite de detección (µg/L)	7,39 x 10 ⁻²	1,78 x 10 ⁻¹
Límite de cuantificación (µg/L)	2,24 x 10 ⁻¹	5,38 x 10 ⁻¹
Intervalo de determinación (ug/L)	2,24 x 10 ⁻¹ - 2,02	5,38 x 10 ⁻¹ -4,84
DER (%)	2,94	1,87

Los parámetros analíticos demuestran que existe una proporción lineal entre la concentración y la intensidad de fluorescencia entre los analitos al estado de complejo retenidos en el intercambiador. Llegando a límites de detección y cuantificación del orden del ug/L.

4.9.2. Linealidad del método.

Se evaluó la linealidad del método de acuerdo al procedimiento experimental 3.4.12.2, para ello se recolectó agua del Río Clarillo de acuerdo al procedimiento 3.4.11 y se obtuvieron los parámetros fisicoquímicos de la Tabla 5.

Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos medidos *in situ* en la toma de muestras de la Reserva Nacional del Río Clarillo.

Parámetro	Valor obtenido
Fecha/ Hora	28-10-2015 / 12:25 pm
Oxígeno disuelto [mg/L]	9,46
% de saturación de oxígeno	95,4 %
pH	7,05
Sólidos disueltos [mg/L]	54
Conductividad [μ S/cm]	108
Temperatura [°C]	12,1
Salinidad	0
Potencial Redox [mV]	747
Ubicación	Reserva nacional Rio Clarillo CONAF Peumo B Coordenadas: (Sexagesimales) 33°43' 37' S, 70°28'25' W (Decimales)-33,7272, -70,43371 (UTM) 19 S 363466,83 6267115,86

Para utilizar esta muestra como blanco de matriz, la muestra fue enviada a un laboratorio externo Metalab para ser analizada, encontrándose que los límites informados no son lo suficientemente sensibles para determinar los analitos en estudio, en relación al método desarrollado en esta tesis. Es por ello que, con el fin de verificar estos resultados, se compararon con soluciones estándares de los complejos retenidos en el intercambiador con una muestra en el blanco de matriz, para saber si existe algún corrimiento o alteraciones en la forma de la señal analítica. Los espectros se muestran en la Figura 48 y 49.

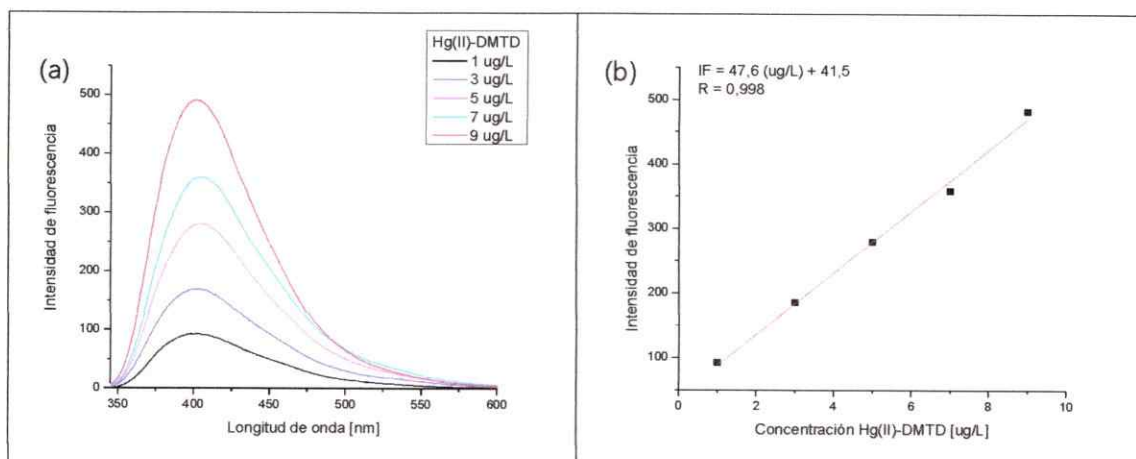


Figura 48. (a) Espectros de fluorescencia de Hg(II)-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25, utilizando como blanco de matriz agua del Río Clarillo. (b) Curva de calibración de Hg(II)-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25.

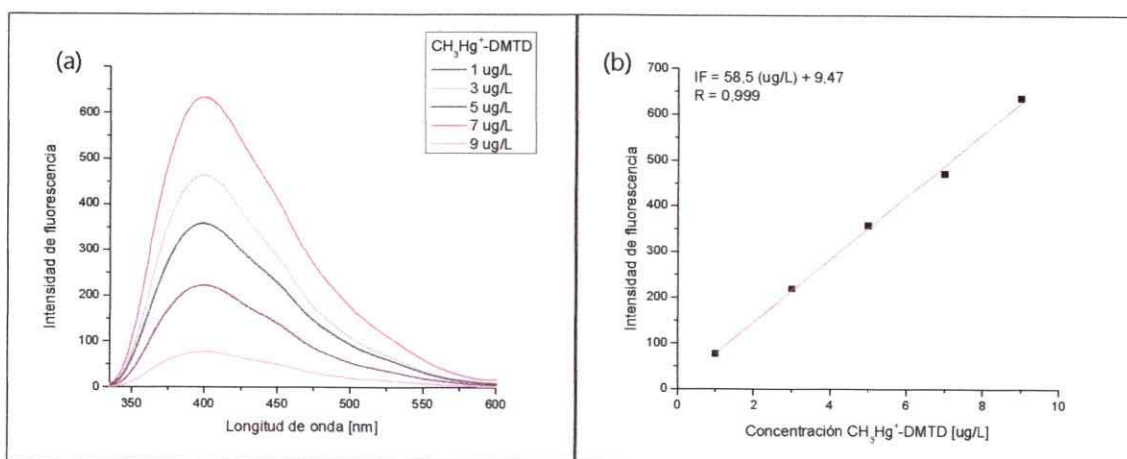


Figura 49. (a) Espectros de fluorescencia de CH₃Hg⁺-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25, utilizando como blanco de matriz agua del Río Clarillo. (b) Curva de calibración de CH₃Hg⁺-DMTD retenido en el intercambiador DEAE Sephadex A25.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Figura 48 y 49 se puede observar que existe una proporcionalidad de la concentración de los analitos retenidos en el intercambiador y la intensidad de fluorescencia. Además, cabe destacar que los máximos de cuantificación se mantuvieron en ambos analitos y no hubo cambio espectral con respecto a las curvas realizadas en agua desionizada. Esto se debe a que no tiene un efecto antropogénico significativo, ya que la zona en que se tomó la muestra fue en la zona más alta del río, por lo tanto, se puede considerar como punto limpio, libre de mercurio y sus especies. Los parámetros analíticos obtenidos se observan en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros analíticos obtenidos en la matriz agua del Río Clarillo.

	Complejo Hg(II)-DMTD	Complejo CH ₃ Hg ⁺ -DMTD
Longitud de onda de excitación [nm]	314	314
<i>Slit</i> excitación/emisión	10/20	10/20
Longitud de onda analítica [nm]	397	399
Ecuación de la recta de la curva de calibración	IF = 47,6 C(μg/L) + 41,5 R= 0,9978	IF = 58,5 C(μg/L) + 9,47 R= 0,9998
Límite de detección [ng/L]	16,1	12,7
Límite de cuantificación [ng/L]	48,6	41,9
Intervalo de determinación [ng/L]	48,6-437,4	41,9-377,1
DER (%)	2,04	1,93

Cabe destacar, que las pendientes obtenidas con estándares son diferentes a las obtenidas cuando se aplica el método en el agua del Río Clarillo. Esto se debe principalmente a un efecto matriz. Lo importante es que no ocurre algún corrimiento

espectral o cambio en la forma de los espectros de los analitos retenidos en el intercambiador que imposibiliten el uso de esta matriz para la validación del método.

4.9.3. Selectividad.

La selectividad del método se evaluó realizando un estudio de interferentes, aniónicos y catiónicos, que se encuentran presentes en las matrices que se aplicará el método desarrollado: aguas naturales y agua potable. Este estudio es necesario ya que permite saber si es posible determinar los analitos de interés en matrices que contienen otras especies químicas.

Este estudio se llevó a cabo mediante el procedimiento experimental 3.4.12.3, en donde las concentraciones de analito utilizadas para Hg(II) y CH₃Hg⁺ son de 1 µg/L. Los resultados se pueden observar en la Tabla 7.

Tabla 7. Estudio de interferentes para evaluar la selectividad del método.

Interferentes catiónicos y aniónicos	Límite de tolerancia Hg (II) [µg/L]	Límite de tolerancia CH ₃ Hg ⁺ [µg/L]
Mg ⁺²	100000	10000
Na ⁺	1000	10000
Ca ⁺²	10000	10000
K ⁺	10000	10000
SO ₄ ⁻²	150000	150000
NO ₃ ⁻	12000	12000
F ⁻	1500	1500
Zn ⁺²	20	10
Cd ⁺²	20	20
Cu ⁺²	5	7
Pb ⁺²	100	100
Ag ⁺	7,5	5
Fe ⁺³	10	10
Cr(VI)	1000	1000

Ni ⁺²	100	100
Cl ⁻	65	65
Se ⁺²	100	100
NO ₂ ⁻	25	25
PO ₄ ⁻³	50	50
Mn ⁺²	100	100
As(III)	1000	1000
Ba ⁺²	1000	1000

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 7, fue posible estimar que al momento de preconcentrar los analitos existen 3 posibles interferencias: Ag⁺, Cu⁺², y Zn⁺². Ésta interferencia se debe a la posible coordinación de estos cationes con el ligante, formando otro complejo que interfiera en la determinación de los analitos. En la bibliografía se ha informado la formación de dos complejos entre Cu⁺² y Zn⁺² con DMTD⁴³. Los complejos informados son neutros y no deberían ser retenidos en el intercambiador DEAE Sephadex A25 ya que esta está diseñada para captar especies aniónicas. Por lo tanto, la interferencia de estos dos cationes se puede deber a que como estos cationes se coordinan con el ligante, no permiten que los analitos en estudio, Hg(II) y CH₃Hg⁺, formen los respectivos complejos ya que no queda ligante por coordinar y no puedan ser retenidos en el intercambiador ^{44,45}.

La interferencia generada por los cationes Ag⁺ y Zn⁺² fue eliminada mediante la adición de ácido etilendiaminotetraacético, EDTA¹⁴. Este agente quelante presenta una constante condicional K' con estos cationes de 2,1 x 10⁷ y 3,2 x 10¹⁶, respectivamente⁴⁶.

Con respecto al Cu⁺² no fue posible eliminar esta interferencia mediante el uso de EDTA, a pesar que su constante condicional con este catión es alta, teniendo un valor de 6,3 x 10¹⁸, ya que el corrimiento espectral se mantenía, ya que éste forma un complejo

aniónico con EDTA, por lo tanto, se puede estimar que este nuevo complejo formado ocuparía sitios activos de la resina DEAE Sephadex A25, causando un solapamiento espectral.

Para eliminar la interferencia del Cu^{+2} se agregó otro agente quelante, la etilendiamina, EN. La etilendiamina, $\text{C}_2\text{H}_8\text{N}_2$, es un ligante bidentado que utiliza el par de electrones libres del átomo de cada nitrógeno para quelar iones metálicos. Este ligante ha sido utilizado para formar complejos con $\text{Cu}^{+2(47)}$, formando un complejo catiónico $\text{Cu}(\text{EN})_2^{+2}$, el cual quedaría en solución y no sería retenido por el intercambiador aniónico. En la Figura 50 y 51 se muestran los espectros de los complejos retenidos en el intercambiador aniónico, antes y después de agregar el EDTA y la EN.

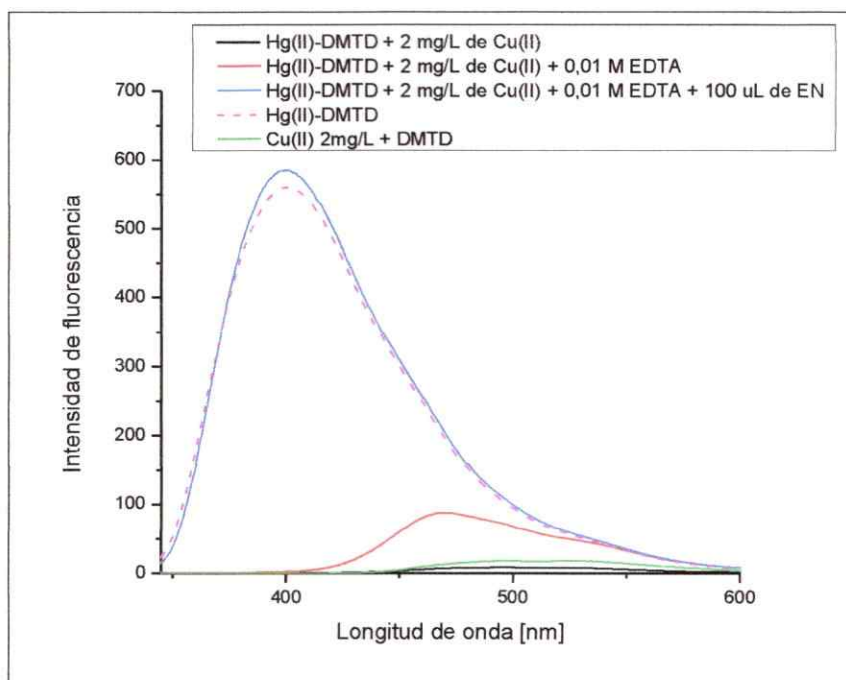


Figura 50. Espectros de fluorescencia del complejo Hg(II)-DMTD retenido en DEAE Sephadex A25 con interferente, EDTA y EN.

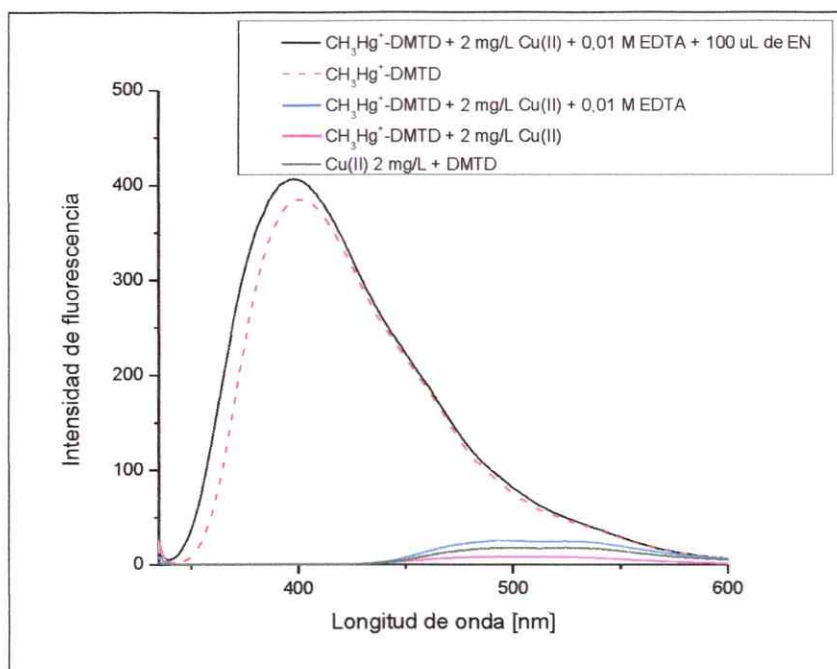


Figura 51. Espectros de fluorescencia del complejo $\text{CH}_3\text{Hg(II)-DMTD}$ retenido en DEAE Sephadex A25 con interferente, EDTA y EN.

Aunque la evidencia teórica muestra que los complejos Hg(II)-EDTA y $\text{CH}_3\text{Hg}^+\text{-DMTD}$ se ve favorecida con respecto los complejos formados con etilendiamina en cuanto a la formación de complejos con Cu^{+2} , la evidencia experimental representa otra cosa, ya que los espectros muestran que la EN favorece la formación del complejo en relación con el EDTA. Esto se puede observar en la Figura 52 y 53.

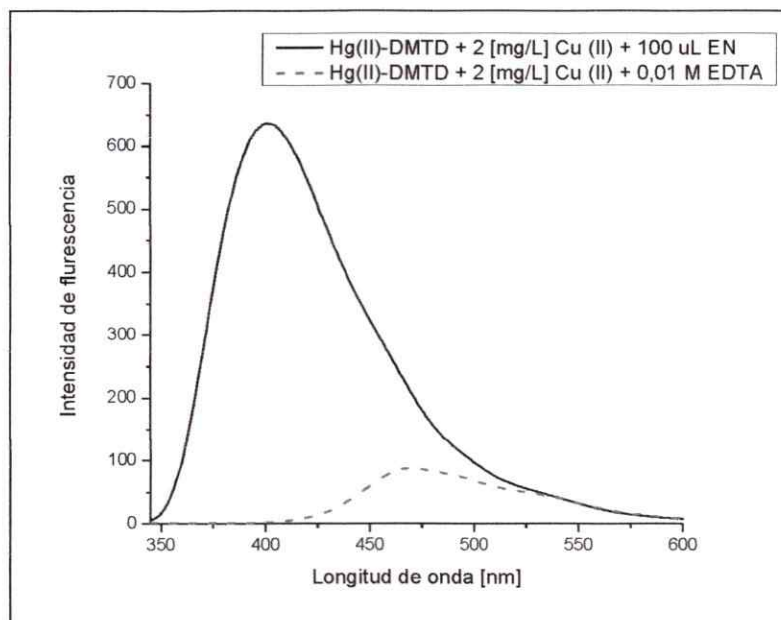


Figura 52. Espectros de fluorescencia del complejo Hg(II)-DMTD retenido en DEAE Sephadex A25 con interferente, EDTA y EN.

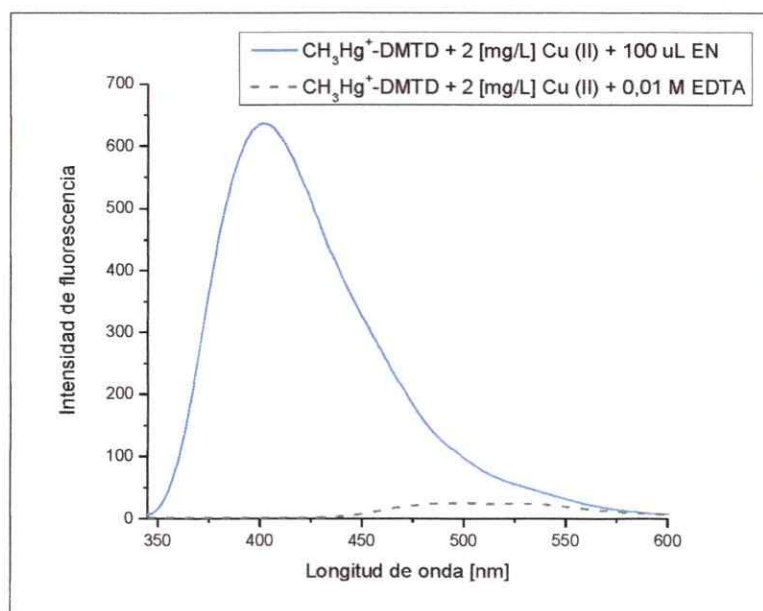


Figura 53. Espectros de fluorescencia del complejo CH₃Hg⁺-DMTD retenido en DEAE Sephadex A25 con interferente, EDTA y EN.

Es posible observar en las Figuras 52 y 53 que al agregar una mezcla de EDTA y EN se puede eliminar la interferencia de Cu^{+2} en ambos complejos. Los nuevos límites de tolerancia calculados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Límites de tolerancia obtenidos al en presencia de EDTA y etilendiamina (EN).

Interferentes catiónicos	Límite de tolerancia Hg (II) [$\mu\text{g/L}$]	Límite de tolerancia CH_3Hg^+ [$\mu\text{g/L}$]
Cu^{+2}	2000	2000
Zn^{+2}	3000	3000
Ag^+	2500	2500

4.9.4. Precisión y exactitud.

La precisión del método de evaluó aplicando el procedimiento experimental 3.4.6.5. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 9 y 10.

Tabla 9. Resultados de precisión y exactitud para el complejo Hg(II)-DMTD retenido en DEAE Sephadex A25 mediante espectrofluorimetría.

Hg(II)-DMTD			
Repetibilidad			
Concentración [$\mu\text{g/L}$]	Concentración encontrada [$\mu\text{g/L}$]	Recuperación (%)	DER (%)
1,00	1,02	101,6	1,8
5,00	4,96	99,2	1,3
9,00	9,13	101	2,6
Reproducibilidad			
Concentración [$\mu\text{g/L}$]	Concentración encontrada [$\mu\text{g/L}$]	Recuperación (%)	DER (%)
1,00	1,03	102,7	2,5
5,00	4,95	98,9	1,8
9,00	9,14	101,6	2,3

Tabla 10. Resultados de precisión y exactitud para el complejo CH_3Hg^+ -DMTD retenido en DEAE Sephadex A25 mediante espectrofluorimetría.

CH_3Hg^+-DMTD			
<i>Repetibilidad</i>			
Concentración [$\mu\text{g/L}$]	Concentración encontrada [$\mu\text{g/L}$]	Recuperación (%)	DER (%)
1,00	0,96	96,3	2,1
5,00	5,06	101,3	1,6
9,00	9,11	101,3	2,0
<i>Reproducibilidad</i>			
Concentración [$\mu\text{g/L}$]	Concentración encontrada [$\mu\text{g/L}$]	Recuperación (%)	DER (%)
1,00	0,98	97,66	2,8
5,00	5,06	101,2	2,0
9,00	9,12	101,4	2,6

En las Tablas 9 y 10 se analizaron distintos niveles de precisión del método desarrollado, encontrándose que los resultados en ambas condiciones hablan de un método preciso y exacto.

4.10. Aplicación.

Se tomaron muestras del Río Copiapó y agua potable de la misma región. Las muestras fueron enviadas para su análisis a un laboratorio externo Metalab, donde fueron analizadas mediante ICP-AES, Espectroscopia de Emisión Atómica de Plasma Acoplado por Inducción. Como los límites obtenidos mediante el análisis externo están por sobre los calculados por este método, no fue posible comparar los resultados obtenidos por el método desarrollado.

Es por ello que la aplicación del método se realizó en muestras fortificadas, con Hg(II) y CH_3Hg^+ , de agua potable de las Vizcachas y agua del Río Clarillo. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Aplicación del método en muestras fortificadas.

	**Hg (II) [ug/L]	% R (Hg(II))	**CH ₃ Hg ⁺ [ug/L]	% R (CH ₃ Hg ⁺)
Agua potable Las Vizcachas	0,99	99,7	1,03	103
Agua Río Clarillo	1,02	102	0,96	96,3

*+/- Desviación estándar en base n=5

** Muestras fortificadas con 1 [ug/L] de Hg(II) y CH₃Hg⁺ respectivamente.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 11, se puede observar que el método desarrollado y aplicado en muestras fortificadas, resultó ser preciso y exacto. Con límites de detección y cuantificación del orden de los ug/L, permitiendo la cuantificación de los analitos en matrices de aguas potable y naturales.

5. CONCLUSIONES

A partir a los estudios preliminares realizados, se seleccionó como ligante 2,5-dimercapto-1,3,4-tiadiazol (DMTD), para desarrollar la formación de los complejos el cual cumplió con la función formar complejos con Hg(II) y CH₃Hg⁺ a pH 9, logrando la formación y retención cuantitativa de los complejos en la resina de intercambio aniónico DEAE Sephadex A25, generando constantes de formación condicional altas que permiten la estabilidad de los complejos a un pH básico, sin que las posibles especies hidroxiladas interfieran en la determinación cuantitativa de éstos.

Se estudiaron distintas resinas de intercambio seleccionándose DEAE Sephadex A25, la cual al presentar gránulos bien regulares permite una buena empaquetación en la celda de fluorescencia, además de espectros de intensidad de fluorescencia bien definidos.

Se optimizaron las variables químicas y de preconcentración mediante espectrofluorimetría para ambos complejos. Las condiciones optimizadas para el complejo Hg (II)-DMTD fueron: 11 mg/L DMTD, 6 mL de amortiguador H₃BO₃/NaH₂BO₃ 0,1 M pH 9, 70 mg de resina DEAE Sephadex A25, 30 min de agitación, 100 mL de volumen final de solución. Para el caso del complejo CH₃Hg⁺-DMTD fueron: 11 mg/L DMTD, 7 mL de amortiguador H₃BO₃/NaH₂BO₃ 0,1 M pH 9, 70 mg de resina DEAE Sephadex A25, 30 min de agitación, 100 mL de volumen final de solución. Llegando a los resultados necesarios para la formación cuantitativa de éstos, permitiendo obtener excelentes resultados para realizar el desarrollo de los métodos mediante espectrofluorimetría.

Se logró la caracterización de los complejos retenidos en el intercambiador aniónico mediante SEM, EDX e IR. SEM y EDX permitieron corroborar la estequiometría obtenida

por medio del método de Job, siendo 1:2 para el complejo formado entre Hg(II) y DMTD y 1:1 para el complejo formado por CH₃Hg⁺. En cuanto a la interacción que se produce entre los complejos y la resina, se establece que es de tipo electroestática, ya que es posible la recuperación de ésta luego de su utilización.

Fue posible determinar los parámetros analíticos del método desarrollado. En cuanto a la aplicación, ésta se realizó en agua potable de las Vizcachas y agua de río Río Clarillo fortificadas con Hg (II) y CH₃Hg⁺, llegando a valores de límite de detección y cuantificación del ug/L para ambos analitos.

Con respecto a la selectividad del método, se estudiaron distintos interferentes aniónicos y catiónicos, siendo los más problemáticos Zn (II), Cu(II) y Ag(I). Estos fueron eliminados mediante el uso de los agentes quelantes EDTA y EN.

Finalmente, la utilización de la extracción en fase sólida en conjunto con la utilización del ligante DMTD, permitió la retención selectiva de los analitos en estudio, en diferentes matrices. Características que en conjunto con la espectrofluorimetría aumentaron la sensibilidad del método desarrollado, llegando a niveles ultra traza de determinación y cuantificación, con muy buenos porcentajes de recuperación, sin etapas previas sofisticadas y una alta frecuencia de muestro.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Reichelt-brushett, A. J., Stone, J., Howe, P., Thomas, B., Clark, M., Male, Y., Nanlohy, A., Butcher, P. Geochemistry and mercury contamination in receiving environments of artisanal mining wastes and identified concerns for food safety. *Environ. Res.* **152**, 407–418 (2017).
2. Barkay, T., Miller, S. M., Summers, A. O. Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 355–384 (2003).
3. Desarrollo de métodos analíticos para la especiación de mercurio y su aplicación a la comarca de almadén [en línea] < <https://ruidera.uclm.es/xmlui/bitstream/handle/10578/997/264%20Desarrollo%20de%20m%C3%A9todos%20anal%C3%ADticos.pdf?sequence=1> > [consulta 6 de noviembre 2016].
4. Norma chilena oficial NCh 409/1.Of 2005 [en línea] < <http://ciperchile.cl/pdfs/11-2013/norovirus/NCh409.pdf> > [consulta 15 julio 2016].
5. Acceso al agua potable y alcantarillado [en línea] <[http://www.mma.gob.cl/1304/articles-52016 Capitulo 5.pdf](http://www.mma.gob.cl/1304/articles-52016%20Capitulo%205.pdf)> [consulta 2 de marzo del 2016].
6. Leopold, K., Foulkes, M., Worsfold, P. Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters—A review. *Anal. Chim. Acta* **663**, 127–138 (2010).
7. Canário, J., Santos-echeandia, J., Padeiro, A., Amaro, E., Strass, V., Klaas, C., Laglera, L. M. Mercury and methylmercury in the Atlantic sector of the Southern

Ocean. *Deep. Res. Part II* 1–11 (2016).

8. Bowles, K. C., Apte, S. C. Determination of methylmercury in natural water samples by steam distillation and Gas Chromatography–Atomic Fluorescence Spectrometry. *Anal. Chem.* **70**, 395–399 (1998).
9. Li, L., Feiyue, W., Meng, B., Lemes, M., Feng, X., Jiang, G. Speciation of methylmercury in rice grown from a mercury mining area. *Environ. Pollut.* **158**, 3103–3107 (2010).
10. Vasimalai, N., Sheeba, G., John, S. A. Ultrasensitive fluorescence-quenched chemosensor for Hg(II) in aqueous solution based on mercaptothiadiazole capped silver nanoparticles. *J. Hazard. Mater.* **213–214**, 193–199 (2012).
11. Sanz-Medel, A. Trace element analytical speciation in biological systems: importance, challenges and trends. *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **53**, 197–211 (1998).
12. Yin, C., Iqbal, J., Hu, H., Liu, B., Zhang, L., Du, Y. Sensitive determination of trace mercury by UV-visible diffuse reflectance spectroscopy after complexation and membrane filtration-enrichment. *J. Hazard. Mater.* **233–234**, 207–212 (2012).
13. Vijayakumar, M., Ramakrishna, T. V., Aravamudan, G. Fluorimetric determination of trace quantities of mercury as an ion-association complex with rhodamine 6G in the presence of iodide. *Talanta* **27**, 911–913 (1980).
14. Vasimalai, N., John, S. A. Ultrasensitive and selective spectrofluorimetric determination of Hg(II) using a dimercaptothiadiazole fluorophore. *J. Lumin.* **131**, 2636–2641 (2011).

15. Lakowicz, J. R. (2006) *Principles of Fluorescence Spectroscopy, Third edition*. Baltimore, Maryland, USA., Springer.
16. Espectrofluorimetría [en línea] <<http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrofluorimetria.pdf>> [consulta 10 enero 2016].
17. Espectrometría de masas [en línea] <http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf> [consulta 15 de noviembre 2016].
18. Biziuk, M. Solid Phase Extraction Technique – Trends , Opportunities and Applications. *Polish J. Environ. Stud.* **15**, 677–690 (2006).
19. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochim. Acta Part B* **58**, 1177–1233 (2003).
20. Resinas intercambiadoras de iones [en línea] <<http://www2.udec.cl/~analitic/Interc-iones.pdf>> [consulta 15 de noviembre 2016].
21. Química Inorgánica Descriptiva, Segunda edición [en línea] <<https://es.scribd.com/doc/103276556/Quimica-Inorganica-Descriptiva-Segunda-Edicion-Geoff-Rayner-Canham>> [consulta 16 de noviembre 2016].
22. Lista, G., Palomeque, M., Fernández Band, B. Flow-injection fluorimetric determination of mercury(II) with calcein. *Talanta* **50**, 881–885 (1999).
23. Batista, R., Oliveira, E., Costa, S., Lodeiro, C., Raposo, M. Synthesis and ion sensing properties of new colorimetric and fluorimetric chemosensors based on chromophores. *Organ. letters* **9**, 3201-3204 (2007).

24. Sharma, R. K. Design, synthesis, and application of chelating polymers for separation and determination of trace and toxic metal ions. A green analytical method. *Pure Appl. Chem.* **73**, 181–186 (2001).
25. Preconcentration of some precious metals using debt impregnated resin [en línea] <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.632.6545&rep=rep1&type=pdf>> [consulta 15 de octubre 2016].
26. Guibal, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Sep. Purif. Technol.* **38**, 43–74 (2004).
27. Determinación de Constantes de Equilibrio de Complejación por el Método (de Job) de las Variaciones Continuas [en línea] <<http://catedras.quimica.unlp.edu.ar/qa3/guias/2008-TP-05-Constantes de complejacion por Espectrofotometria.pdf>> [consulta 15 de julio 2016].
28. Thomsen, V., Schatzlein, D., Mercurio, D. Limits of detection in spectroscopy. **18**, 112–114.
29. Szegezdi, J., Csizmadia, F. 27th ACS National Meeting, Anaheim, California, March 28-April 1, 2004.
30. Szegezdi, J., Csizmadia, F. American Chemical Society Spring meeting, March 25-29th, 2007.
31. Alderighi, L., Gans, P., Midollini, S., Vacca, A. Coordination chemistry of the methylmercury(II) ion in aqueous solution: a thermodynamic investigation. *Inorganica Chim. Acta* **356**, 8–18 (2003).
32. López-Torres, E., Mendiola, M. A., Pastor, C. J. Mercury and methylmercury

- complexes with a triazine-3-thione ligand. *Polyhedron* **25**, 1464–1470 (2006).
33. Giester, G. Mercury (II) Complexes with heterocyclic thiones: Preparation and characterization of the 1 : 1 and 1 : 2 mercury (II) complexes with benzo-1,3-imidazole-2-thione. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 171-180 (2002).
34. Park, S. M., Choi, H.-S. Sensitized spectrophotometric determination of trace Hg(II) in benzalkonium chloride media. *Anal. Chim. Acta* **459**, 75–81 (2002).
35. Das, D., Gupta, U., Das, A. K. Recent developments in solid phase extraction in elemental speciation of environmental samples with special reference to aqueous solutions. *TrAC Trends Anal. Chem.* **38**, 1–9 (2012).
36. Tuzen, M., Uluozlu, O. D., Karaman, I., Soylak, M. Mercury(II) and methyl mercury speciation on Streptococcus pyogenes loaded Dowex Optipore SD-2. *J. Hazard. Mater.* **169**, 345–350 (2009).
37. Instructions 71-7104-00 AD Ion Exchange [en línea] <https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314750913712/litdoc71710400AD_20110831025329.pdf> [consultado 1 mayo 2016].
38. Jia, X. Purification, structural characterization and anticancer activity of the novel polysaccharides from *Rhynchosia minima* root. *Carbohydr. Polym.* **132**, 67–71 (2015).
39. Cakmak, S., Cakmak, A. S. & Gumusderelioglu, M. PNIPAAm-grafted thermoresponsive microcarriers: Surface-initiated ATRP synthesis and characterization. *Mater. Sci. Eng. C* **33**, 3033–3040 (2013).

40. Kim, M. J., Sun, X. S. Correlation between Physical Properties and Shear Adhesion Strength of Enzymatically Modified Soy Protein-Based Adhesives. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society* **92**, 1689–1700 (2015).
41. Hafner, B. Energy Dispersive Spectroscopy on the SEM: A Primer. *Charact. Facil. Univ. Minnesota* 7–10 (2006).
42. Conry, R. Copper: Inorganic and coordination chemistry based in part on the article Copper: Inorganic and coordination chemistry by Rebecca R. Conry, Kenneth D. Karlin which appeared in the Encyclopedia of Inorganic Chemistry. *Encycl. Inorg. Chem.* 1–19 (2006).
43. Bharati, P. Synthesis, spectral and structural characterization of Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II) and Hg(II) complexes with 2-mercapto-5-methyl-1,3,4-thiadiazole: A Zn(II) complex acting as a new sensitive and selective fluorescent probe for the detection of Hg²⁺ in . *Polyhedron* **63**, 222–231 (2013).
44. Shi, J. Elemental sulfur amendment decreases bio-available Cr-VI in soils impacted by leather tanneries. *Environ. Pollut.* **212**, 57–64 (2016).
45. Kaiwar, S. P. Synthesis, characterization and dna interaction studies of Cr(III) products isolated from Cr(VI) reduction with -sh containing molecules. *Polyhedron* **15**, 765–774 (1996).
46. Skoog D., West D., Holler F.J., Crouch S., (2005), Fundamentos de química analítica 8^{va} edición, Madrid, España, Editorial International Thomson Editores. **17**, 469-471.
47. Terra, W. S. Evaluating the influence of the diamine unit (ethylenediamine,

piperazine and homopiperazine) on the molecular structure, physical chemical properties and superoxide dismutase activity of copper complexes. *Inorganica Chim. Acta* **450**, 353–363 (2016).

