



Optimización de un método analítico para la determinación de mercurio en muestras ambientales por espectrometría UV-Visible

Xiomara Piña¹, Lué-Merú Marcó P^{2*}, Germán Poleo³, Jesús Rojas², Gosmyr Torres²

¹ Universidad Politécnica Territorial Andrés Eloy Blanco. Barquisimeto. Estado Lara, Venezuela.

² Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Decanato de Agronomía, Dpto. Química y Suelos. Tarabana, Cabudare, Estado Lara. Venezuela.

³ Estación de Piscicultura. Decanato de Agronomía. Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Decanato de Agronomía, Dpto. Química y Suelos. Tarabana, Cabudare, Estado Lara. Venezuela

(*) mparra@ucla.edu.ve

Recibido: 14/06/2012

Revisado: 19/10/2012

Aceptado: 22/10/2012

Resumen

El método colorimétrico de la ditizona fue modificado y cuasi miniaturizado para la determinación de mercurio en agua y en tejido de *Lemna minor* y *Piaractus brachyomus*. El límite de detección ($4-22\mu\text{g.L}^{-1}$) fue satisfactorio para estudios ambientales. Para la evaluación de la exactitud en agua se analizaron patrones SPEX CERTIPREP sin diferencias significativas y para la biota digerida se obtuvieron porcentajes de recuperación en el rango de 85-120%. La precisión fue menor al 10% de desviación estándar relativa en todos los casos. El método es adecuado para la determinación de mercurio en agua, tejido de cachama y *Lemna minor*.

Palabras clave: cachama blanca; mercurio; ditizona; agua; *Lemna minor*

Abstract

Dithizone's colorimetric method was modified and quasi miniaturized for mercury determination in water and *Lemna minor* and *Piaractus brachyomus* tissue. Detection limit ($4-22\mu\text{g.L}^{-1}$) was adequate for environmental studies. Evaluation of the accuracy in water was achieved by analyzing SPEX CERTIPREP standard samples with no significant differences. 85-120% recovery percentages for digested biota were obtained. The precision was less than 10% of relative standard deviation in all the cases. The method is reliable for mercury determination in water, red-bellied and *Lemna minor* tissue.

Keywords: Red-bellied pacu; Mercury; Dithizone; Water; *Lemna minor*

Introducción

De toda el agua que hay en el planeta tierra, el 97% del agua superficial corresponde a mares y océanos, el 2% se encuentra en glaciares y zonas polares, 0,54% corresponde a agua subterránea y sólo el 0,06% se encuentra en ríos y lagos¹.

Hacia el año 2025, aproximadamente 48 países, más de 2800 millones de habitantes, se verán afectados por la escasez de agua. Más allá del impacto del crecimiento mismo de la población, el consumo de agua dulce ha estado aumentando en respuesta al desarrollo industrial y agrícola, por lo que la demanda creciente de la población se ha triplicado y de esa manera la extracción de agua se ha visto sobreexplotada. Además, el suministro de agua dulce del que dispone la humanidad se está reduciendo a raíz de una constante contaminación de los recursos hídricos, por la constante descarga de aguas residuales a

cuerpos de agua superficiales y la infiltración de agroquímicos a acuíferos².

Es bien conocido que la utilización de las cuencas hídricas como receptores de descargas antrópicas representa un riesgo para la salud humana. Particularmente importante es la contaminación provocada por las altas concentraciones de algunos metales pesados y su incremento en los efectos adversos causados por la persistencia y el fenómeno de biomagnificación^{3,4}.

El mercurio es considerado uno de los venenos ambientales más peligrosos entre los metales pesados, cuya presencia en el cuerpo humano resulta tóxica a partir de ciertos umbrales críticos que dependen, fundamentalmente, de un conocimiento de las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta. Asimismo, depende del conocimiento de las variaciones en la exposición, absorción, metabolización y excreción en cualquier situación dada^{4,5}. Entre las fuentes de

contaminación de mercurio más importantes se cuentan la explotación minera y metalúrgica, la combustión del carbón y las plantas de cloro-soda con celdas de mercurio⁶. En el conjunto de propiedades fisicoquímicas del mercurio se encuentra la formación de amalgamas con otros metales, y su aplicabilidad particularmente en los tratamientos odontológicos, con posibles consecuencias que deben ser monitoreadas y determinadas^{7,8}. Por otra parte el oro como metal de obvia importancia para el hombre también involucra el uso del mercurio. Esta propiedad le ha valido al mercurio su extensa utilización en la práctica de la actividad minera en varios países del mundo^{9,10}. En el caso particular de Venezuela, la cuenca del Río Caroní sufre, desde aproximadamente 12 años, una desmesurada explotación de oro con un porcentaje alarmante de minería informal, donde no se contemplan rigurosamente las normas de control ambiental requeridas por dicha actividad¹¹. Debido a la ubicación en esta cuenca de zonas de alta densidad poblacional, lo cual representa potencialmente un grave problema de salud pública, se hace necesario la implementación de medidas y campañas normativas que regulen la utilización de mercurio en la actividad minera^{11,12}. Las actividades antropogénicas han incrementado significativamente las concentraciones de mercurio en el ambiente. Cada segundo se vierten 120 mil litros de aguas negras a ríos, lagos y mares en Venezuela y la descarga de aguas de origen doméstico se evidencia en todo el territorio nacional¹³. La contaminación acuática por mercurio, generada por el proceso de industrialización o por procesos naturales, constituye uno de los problemas ambientales más críticos en la actualidad, debido a su alta toxicidad, persistencia y capacidad de bioacumulación y bioconcentración (también conocida como biomagnificación). En los ambientes contaminados por metales pesados se altera la capacidad de supervivencia de los organismos, lo que afecta la dinámica poblacional de las especies y, por tanto, la estructura y función ecosistémica¹⁴. El mercurio sufre procesos de liberación desde sedimentos y suelos contaminados a ríos, lagos y otras fuentes de agua¹⁵, procesos que pueden estar incrementando esta liberación como consecuencia del calentamiento global¹⁶.

La contaminación mercurial puede entonces alcanzar la biota (algas, plantas acuáticas, peces) y entrar en la cadena trófica con consecuencias sobre la biota e incluso la salud pública cuando el elemento se bioacumula y biomagnifica en especies comerciales como podrían ser especies como la cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). La lemna (*Lemna minor*), planta acuática que cuenta con una capacidad de absorción de metales pesados entre ellos el mercurio, surge como una posible solución para aliviar los altos contenidos de este elemento en lagos y ríos^{17,18}.

Considerando esta problemática, han surgido iniciativas en el ámbito ambiental para proteger la calidad del agua con

la creación e implementación de normativas que establecen concentraciones máximas permisibles para el mercurio. En Venezuela esta concentración es el equivalente a $0,01\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para mercurio total¹⁹. Este valor es relativamente bajo, por lo que surge la necesidad de que existan métodos analíticos con características que permitan cumplir con estos requisitos.

La determinación de mercurio en muestras ambientales se realiza mayoritariamente por la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica de Vapor Frio (CV-AAS), por su alta sensibilidad, exactitud y adecuada precisión²⁰. Sin embargo, esta técnica es disponible en laboratorios especializados. Para el trabajo en campo o lugares alejados de laboratorios especializados sería más adecuado contar con métodos instrumentalmente más sencillos como la espectrometría de absorción molecular UV-visible²¹⁻²³, siendo el método de la ditizona uno de los más adecuados y establecidos, aunque presenta la desventaja del uso de grandes volúmenes de reactivos, algunos de los cuales pueden no ser de fácil acceso y adicionalmente los procedimientos de preparación pueden ser complejos. En tal sentido Khan *et al.*²⁴, presentaron un método espectrofotométrico simple, ultrasensible, y selectivo para la determinación rápida de mercurio (II) a niveles de ultratrazas utilizando 1,5-difenilditiocarbazona como un reactivo micelar, a una longitud de onda de 490nm en una solución ligeramente ácida ($0,07\text{-}0,17\text{M}$ de H_2SO_4).

La presencia del sistema micelar evita los procedimientos previos de extracción con solvente y reduce los costos y los riesgos por toxicidad mientras refuerza la sensibilidad, selectividad y la absorptividad molar. La reacción es instantánea y la absorbancia permanece estable por 24 h. El coeficiente de absorptividad molar promedio y de sensibilidad de Sandell fueron $5,02\times 10^4\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ y $10\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ de Hg, respectivamente. El rango lineal de calibración fue de $0,05\text{-}10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Hg. La composición estequiométrica del quelato fue 1:2 de mercurio-ditizona. El límite de detección fue de $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Hg. Un exceso importante de 60 cationes, aniones y agentes acomplejantes (EDTA, tartrato, oxalato, citrato, fosfato, tiourea, azida, tiocianato) no interfiere en la determinación. El método se aplicó exitosamente en muestras ambientales de agua (potable y contaminada), muestras biológicas (sangre humana y orina; leche y pescado); suelos; soluciones conteniendo tanto mercurio (I) como mercurio (II), como también mezclas sintéticas complejas. El método tiene una precisión y exactitud adecuadas.

En este trabajo, para la determinación de mercurio en muestras de agua y biota se desarrolló y validó una metodología analítica por espectrometría UV-visible, basada en el procedimiento descrito por Khan *et al.*²⁴. El diseño involucró importantes modificaciones al procedi-

miento, se sustituyeron reactivos en función de otros más disponibles en los laboratorios. El procedimiento descrito utiliza un sistema de suspensión micelar del complejo coloreado de mercurio(II)-ditizona-alcohol isoamílico en agua. Se sustituyó el alcohol isoamílico por el reactivo diclorometano, más accesible, aunque de mayor toxicidad. No se realizó la medición a una emulsión del complejo coloreado de mercurio-ditizona-diclorometano. En su lugar se tomó la fase orgánica contentiva del complejo con mercurio (II) y se midió directamente en las celdas de cuarzo, tanto para patrones como blancos y muestras. La conversión del mercurio a mercurio (II) y la extracción a la fase orgánica se realizó en volúmenes ostensiblemente menores a los señalados en la literatura, con un re-escalamiento de las cantidades para trabajar con mililitros de muestra. La decoloración del exceso de permanganato se realizó con oxalato de sodio, en sustitución de la hidroxilamina, y el ajuste de pH se llevó a cabo con una solución de hidróxido de sodio. La concentración de ditizona en diclorometano también fue ajustada hasta un valor inferior al mencionado en la literatura.

Parte experimental

Equipos

En la preparación de los reactivos se realizaron pesadas mediante una balanza analítica (OHAUS) con una precisión de $\pm 0,0001\text{g}$ y medición de volúmenes con una micropipeta marca Eppendorf con una escala de 100 a 1000 μL , pipetas volumétricas de 1 ($\pm 0,006$)mL, 3 ($\pm 0,01$) mL y 10 ($\pm 0,02$)mL. En la digestión de soluciones patrón y muestras se usó un baño de María con una escala de temperatura de 0 a 100°C; para lograr una efectiva extracción del metal una vez agregado el medio extractante se agitaron los tubos de ensayo con un vortex, utilizando pipetas Pasteur se separaron la capa orgánica de la acuosa y al finalizar la marcha analítica se midió la absorbancia a la solución correspondiente a la capa orgánica con un espectrofotómetro UV visible Genesys 10uv Thermo Scientifics a 490nm.

Reactivos

Solución patrón o stock de mercurio de 1000mg.L⁻¹ Titrisol (Merck, Darmstadt, Alemania). Soluciones patrones de trabajo preparadas por triplicado (de 0,01mg.L⁻¹ a 10mg.L⁻¹); muestras certificadas de mercurio Arcal RLA/010 codificadas 010 y 015, elaboradas por la empresa SPEX CERTIPREP^{24,25}. EDTA 0,1 %, hidróxido de sodio (NaOH) 2M y 6M, oxalato de sodio (Na₂C₂O₂) 3% (p/V), ditizona 0,0003% (p/V), Diclorometano (CH₂Cl₂), ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1M, permanganato de potasio (KMnO₄) 5% (p/V), ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado, ácido nítrico (HNO₃) concentrado y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) 30%. Todos los reactivos, con excepción de las muestras certificadas, fueron suplidos por Merck (Darmstadt, Alemania), grado pro-

análisis. Las soluciones fueron preparadas siempre con agua destilada y desionizada.

Soluciones certificadas de mercurio SPEX CERTIPREP y muestras de biota para la determinación de porcentaje de recuperación.

El procedimiento en este caso, consiste en preparar las soluciones certificadas del proyecto ARCAL RLA/010^{25,26}, por separado mediante la relación 1:100 con agua desionizada y HNO₃ 10% (V/V). Estas muestras fueron nuevamente diluidas por triplicado cada una x10, para analizarse en el rango lineal de calibración de la técnica.

Para la verificación de exactitud de las muestras de agua, la dilución se realizó con agua destilada y desionizada. Para la verificación de exactitud en muestras de tejido de *Lemna minor* y cachama se realizó la dilución x10 con poles de extractos digeridos de tejido foliar, muscular y hepático, sin mercurio detectable, respectivamente, para determinar el porcentaje de recuperación en cada una de estas matrices.

Muestras reales de agua

El muestreo de agua se ejecutó en el río Turbio en la cercanía de la Ciudad de Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela, de acuerdo a lo establecido en el manual de protocolos del proyecto ARCAL RLA 010¹. También fueron analizadas muestras procedentes de pozos profundos destinados a lagunas para producción de cachamas, en la zona de Tucacas, Estado Falcón (ver figura 1). Éstas fueron tomadas a la salida de las bombas de agua de cada pozo, en botellas plásticas. Se aplicaron las recomendaciones y lineamientos del Manual de Protocolos armonizados y evaluados para la toma de muestra y el análisis de agua y sedimentos para la Región de Latinoamérica y del Caribe, manual que surge como propuesta del proyecto ARCAL RLA/10/10; que se refiere a: "Mejora de la Gestión de la Contaminación de Masas de Aguas Superficiales Contaminadas con Metales"¹.

El muestreo se realizó en periodo húmedo en el mes de junio de 2010 para el Río Turbio y en el mes de febrero de 2011 (periodo seco) para los pozos destinados a lagunas de producción de cachamas. La captación de las muestras de agua se ejecutó de manera instantánea y por triplicado en cada pozo, en el río se tomaron dos muestras correspondientes a ambas márgenes y la tercera tomada en el centro del cuerpo de agua, se utilizaron envases plásticos con una capacidad de 2 litros lavados con ácido nítrico (HNO₃) al 10% v/v y agua destilada y desionizada. Para el muestreo en el Turbio se seleccionaron seis (6) puntos estratégicos, sobre la base de antecedentes de estudios, descargas de aguas residuales y domésticas y fácil acceso del lugar entre otros (ver figura 1). Los sectores son Puente Las Damas, Matadero, Bosque Titicare, Guardagallo, Buena Vista y Santa Rosa²⁷.



Fig. 1: Puntos de muestreo: 1. Buena Vista, 2. Bosque Titicare, 3. Macuto, 4. Puente Las Damas, 5. Río Claro, 6. Santa Rosa, 7. Guardagallo, 8. Matadero, 9. Estación de Piscicultura, 10. Estación Torrellero, 11. Pozos Tucacas, 12. Río Apure, San Fernando, 13. Río Orinoco, Caicara del Orinoco, 14. Finca La Montalva.

Muestras de cachama

Se tomaron muestras de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) (ver tabla 1 y figura 1) de dos tipos: provenientes de estaciones de producción piscícola y provenientes de los Ríos Orinoco (Zona de Caicara del Orinoco), Apure (San Fernando de Apure) y una unidad de producción con lagunas ubicada en el estado Portuguesa (Finca La Montalva). Como muestras control se utilizaron cachamas cultivadas en la estación Torrellero (Lara) y estación de piscicultura en Yaritagua, Estado Yaracuy. En estos centros de producción, el cultivo se lleva a cabo en tanques o lagunas bajo condiciones controladas que

minimizan las posibilidades de contaminación con mercurio. Se tomaron individuos con longitud promedio de 25 cm; 20 individuos provenientes de los tanques de la estación de piscicultura y 10 individuos provenientes de la estación Torrellero. Se realizó la disección e igual procedimiento de preparación de muestras y almacenamiento, como a las muestras provenientes de río. A cada individuo se le realizó la disección para extraer tejido muscular, tejido graso e hígado. Las muestras se lavaron con agua destilada y desionizada y se guardaron en bolsas de polietileno selladas hasta su preparación a una temperatura de -10°C .

Tabla 1: Individuos de Cachama utilizados en el ensayo

Procedencia	Longitud promedio (cm)	Número de Individuos
Estaciones Torrellero (Edo. Lara) y Piscicultura Guaremal (Edo. Yaracuy)	25 ± 1	30
Río Orinoco (Caicara del Orinoco, Edo. Bolívar)	30 ± 2	5
Río Apure (San Fernando de Apure, Edo. Apure)	28 ± 1	5
Lagunas Finca La Montalba (Edo. Portuguesa)	25 ± 1	14

Muestras de Lemna minor

Las hojas frescas provenientes de un ensayo de biorremediación con mercurio¹⁸, se lavaron con abundante agua destilada y un poco de detergente, enseguida se enjuagaron con agua destilada para remover todo el detergente y posteriormente se colocaron en papel absorbente. Se secaron las muestras en la estufa de circulación forzada a 85°C, colocándose en sacos de papel perforado. Para la molienda se utilizó un molino de acero inoxidable, pasando las muestras por malla de 1mm. Se acondicionó la muestra triturada en frascos de vidrio con tapa plástica y se identificaron y almacenaron hasta su análisis¹⁸.

Procedimiento analítico:

Preparación previa de las muestras: las muestras de agua fueron analizadas directamente. Las muestras de biota fueron secadas a 80°C hasta peso constante, luego se digirieron con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno, a 80°C, se filtraron y aforaron a 10mL (hígado) y 25mL (tejido muscular y tejido foliar). El mercurio fue determinado por medio del método de la ditizona, optimizado para alcanzar límites de detección menores a 0,022 mg/L en los licores de las muestras digeridas.

Procedimiento de digestión con ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno: se pesó 1g de material vegetal ó 2g de tejido de cachama y se transfirió a un vaso de precipitado. Se adicionaron 5mL de H₂SO₄ concentrado al 98 % y se dejó en reposo por 15 minutos. Se colocó en una plancha de calentamiento fría y se elevó la temperatura gradualmente hasta 80°C aproximadamente. Después de la aparición de un líquido de color oscuro se retiró el vaso, se dejó enfriar y se adicionó 5ml de H₂SO₄ al 98% y 5 gotas de H₂O₂ 30%. Posteriormente, se calentó nuevamente este extracto hasta que quedó incoloro. Se filtró y transfirió a un balón de 10 ó 25mL y se aforó.

Procedimiento colorimétrico: todo el mercurio presente en las muestras de agua y los extractos, después de una digestión ácida con ácido sulfúrico y permanganato de potasio, en un baño de María por 30 minutos, es convertido

a mercurio (II). Luego de ajustar el pH y eliminar el exceso de permanganato se procede a llevar el mercurio (II) a una fase orgánica.

La ditizona en un disolvente orgánico (CH₂Cl₂, CHCl₃, CCl₄, entre otros) al reaccionar con los iones de mercurio (II) proporciona coloración a la solución; esta particularidad es aprovechada para la determinación de mercurio (II) que presenta un complejo de coloración naranja en diclorometano.

El complejo formado por el mercurio (II) y la ditizona (ditizonato de mercurio) proporciona un color poco estable en el tiempo, razón por la cual la determinación deberá llevarse a cabo con rapidez y a un pH menor de 3 que corresponde a la máxima cantidad de mercurio que es particionada de una fase acuosa a una fase orgánica, sin la interferencia de otros metales²⁸.

Preparación y análisis de curvas de calibración y de muestras de agua: la marcha analítica comenzó con la adición en un tubo de ensayo de 2mL de cada una de las soluciones patrón (Se prepararon las soluciones de trabajo de mercurio en un rango de 0,05-0,8mg.L⁻¹ Hg), las muestras certificadas, muestras de agua y los blancos, siempre por triplicado. Se acidificó con 1mL ácido sulfúrico 1M y se adicionó 1-3 gotas de permanganato de potasio (KMnO₄) 5% (p/V); luego se colocaron todas las soluciones en el baño de maría por 30min., a una temperatura de 70°C. Este proceso facilitó la oxidación de mercurio a mercurio (II).

Una vez cumplido el proceso de digestión, se realizó una titulación en caliente para eliminar el exceso de permanganato de potasio (y la coloración rosada) de las soluciones con aproximadamente 4 gotas de solución de oxalato de sodio 3% (p/V). Al alcanzarse la temperatura ambiente se ajustó el pH a un valor menor a 3 con 6 gotas de hidróxido de sodio 2M, luego se añadió 1mL de EDTA y finalmente 3mL de ditizona preparada en una dilución 10:100 en diclorometano a partir de una solución 0,003% (p/V) de ditizona. Se agitó cada tubo en un *vórtex* para promover la extracción del mercurio, se separaron la capa acuosa de la orgánica (ditizonato de mercurio) y esta última se colocó en la celda de cuarzo. Se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 490nm. De manera similar, se repitió el experimento con volúmenes mayores (3, 4, 5 y 6mL respectivamente) de soluciones patrón, muestras certificadas, muestras de agua y los blancos.

Determinación en los extractos: se adicionó 1-4mL de las muestras digeridas, extractos o blancos de reactivos, en un tubo de ensayo; se añadió igual proporción de agua. Se digirieron en el tubo de ensayo con 1mL de H₂SO₄ 1M y gotas de KMnO₄ (5%) hasta coloración rosada de la solución (para los extractos de muestras de tejido de cachama se requiere en algunos casos una cantidad significativamente

superior de permanganato de potasio, para alcanzar la persistencia de coloración rosada). Posteriormente se colocó en baño de maría 30 min a 70 °C. Inmediatamente se adicionaron gotas de Na₂C₂O₂ 3% (p/V) hasta decolorar el exceso de permanganato, 1-3mL de NaOH 6M para ajustar el pH a un valor entre 1,8 y 3; 1mL de EDTA 1% y 3mL de ditizona en diclorometano 0,0003%. Se agitó con *vortex* por aproximadamente un minuto. Se separó la fase acuosa de la fase orgánica con una pipeta Pasteur. Se midió a 490nm la absorbancia del complejo coloreado de ditizonato de mercurio de la fase orgánica.

Evaluación estadística de los datos

Para la evaluación de la linealidad de las curvas de calibración utilizando diferentes volúmenes y distintos rangos se siguieron los criterios establecidos por Rodríguez *et al.*²⁹. La evaluación de la exactitud utilizando patrones certificados se realizó siguiendo los criterios establecidos para el proyecto ARCAL RLA 010, por Muñoz²⁵. Se utilizó el programa SPSS para los cálculos respectivos³⁰.

Resultados y discusión

Los parámetros evaluados durante el proceso de optimización fueron: la linealidad, límite de detección y de cuantificación, precisión y exactitud. El procedimiento analítico optimizado fue aplicado en muestras reales, como se presenta a

Tabla 2: Figuras de mérito y exactitud para diferentes volúmenes de muestra. N=5

Volumen muestra (mL)	Límite de detección (µg.L ⁻¹)	*Concentración (mg.L ⁻¹) de Muestra de referencia 10 (5,00 ± 0,10mg.L ⁻¹), diluida x10	*Concentración (mg.L ⁻¹) de Muestra de referencia 15 (2,25 ± 0,04mg.L ⁻¹) diluida x10	Pendiente	Rango Lineal
2	22	0,50± 0,02	0,22 ± 0,01	0,08	0,1-1
3	19	0,50±0,02	0,28 ± 0,02	0,114	0,1-1
4	12	0,48 ± 0,02	0,25± 0,02	0,126	0,05-0,5
5	9	0,47 ± 0,02	0,23 ± 0,02	0,367	0,05-0,5
6	4	0,48 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,399	0,01-0,5

*Ver referencias 24 y 25

De acuerdo a lo observado en la tabla 3 para cada volumen de mercurio estudiado se obtienen valores de %CV de la pendiente inferiores al 6%, además las varianzas de las pendientes en todos los casos son relativamente pequeñas lo que permite afirmar que cumple con el criterio de linealidad en el intervalo de concentración de 0,05 a 1,00mg.L⁻¹.

Por otra parte, en cuanto a la proporcionalidad los intervalos de confianza del intercepto de las rectas correspondientes a cada volumen de mercurio incluyen al cero, por lo se infiere que el estudio realizado al aspecto mencionado anteriormente no presenta sesgo.

continuación, para su completa evaluación, escapando del marco de este trabajo lo referente a discusiones más profundas sobre los resultados desde el punto de vista ambiental.

Muestras de agua

Límite de detección: el límite de detección se determinó de acuerdo al criterio IUPAC a partir de relación matemática: LD = 3S/m, donde S es la desviación estándar para 10 blancos y m es la sensibilidad que corresponde a la constante de proporcionalidad entre la señal y la concentración.

A fin de optimizar una metodología aplicable a muestras tanto con concentraciones mayores al nivel máximo permitido (0,010mg/L) como aquellas de concentraciones mayores, se varió el volumen de muestra a extraer entre 2-6mL para un volumen constante de extractante orgánico de ditizona en diclorometano de 3mL. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Linealidad y proporcionalidad: como criterios para la linealidad del sistema se consideraron los siguientes:

- Coeficiente de variación de los factores de respuesta (CVf) menor del 5%.
- Prueba de linealidad de la pendiente a.

Exactitud: la exactitud del método se determinó a través de las muestras certificadas de agua del proyecto ARCAL RLA 010 y 015, elaborada por la empresa SPEX CERTIPREP. Los valores reportados para estas muestras son de 5,00 ± 0,10mg.L⁻¹ y 2,25 ± 0,04mg.L⁻¹ respectivamente, los resultados obtenidos por el procedimiento experimental se muestran en la tabla 2. La prueba de t-Student (95%) dio como resultado para la muestra RLA 010 t-calculado de 4,04 y el tabulado de 6,31; comparativamente el primero menor al segundo. De manera similar para la muestra RLA 015 la t calculada es 4,06 que comparada con la t tabulada es inferior, por tanto se considera el método adecuado para el propósito planteado.

Tabla 3: Resultados del estudio de la linealidad.

Volumen (mL)	La recta y su correlación	Promedio, DE y CV	Varianza muestral e IC de la pendiente	Varianza del intercepto, IC
2	Y =0,084x +0,006 R=0,9985	\bar{a} =0,084 DE=0,0023 CV _a = 2,75%	S _a =0,002 a± Sa*t 0,084±0,006 tcal=0,075 ttab=2,92	S ² _b =0,003 b± Sb*t 0,006±0,009
	Y =0,204x +0,007 R=0,9990	\bar{a} =0,204 DE=0,005 CV _a = 2,19%	S _a =0,0004 a± Sa*t 0,204±0,001 tcal=2,075 ttab=2,92	S ² _b =0,0006 b± Sb*t 0,007±0,002
4	Y =0,230x -0,004 R=0,9990	\bar{a} =0,230 DE=0,0073 CV _a = 3,17%	S _a =0,005 a± Sa*t 0,230±0,014 tcal=1,30 ttab=2,92	S ² _b =0,00005 b± Sb*t 0,004±0,00001

a: pendiente de la recta; b: intercepto de la recta

IC: intervalo de confianza. DE desviación estándar. CV Coeficiente de varianza. Tcal t Student calculada. Ttab t Student tabulada. S_a y S_b desviaciones estándar de la pendiente e intercepto. S²_b varianza del intercepto.

Tabla 4: Valores de concentración para muestras de agua. N=3

	Concentración (µg.L ⁻¹)	% DER	Volumen de muestra (mL)	Límite de detección (µg.L ⁻¹)	Valor permitido (µg.L ⁻¹)
Buena Vista	75	6	4	12	10
Titicare	92	2	4	12	10
Damas	195	4	4	12	10
Santa Rosa	108	3	4	12	10
Guardagallo	29	2	4	12	10
Pozos 1, 2, 3	< 4	---	6	4	10

ND: No detectable, menor 0,010 mg.L⁻¹; LP: límite permitido

Precisión: para la precisión en condiciones de repetitividad, se evaluó por el coeficiente de variación a través del tratamiento de muestras de agua tomadas de cinco puntos del río Turbio; Titicare, Santa Rosa, Guardagallo, Damas, Buena Vista y Matadero (tabla 4). Los resultados obtenidos de coeficiente de variación revelan que los sectores Titicare con 2%, Santa Rosa con 3% y los patrones certificados 010 y 015 fueron de 3% y 2% respectivamente. Estos valores son menores que el 5% que es el criterio de aceptación para la precisión por réplicas de las muestras y los patrones certificados. Esto indica una precisión adecuada del método analítico, en el rango de lo reportado para el método de la ditizona^{24,31} y en concordancia con los resultados obtenidos en cuanto a linealidad, precisión, exactitud y límite de detección en el trabajo original de partida, presentado por Khan *et al.*²⁴.

Concentración de mercurio en muestras de agua: la concentración en las muestras de agua en las estaciones Matadero resultó no detectable. En la estación Buena Vista

con un valor inferior al establecido por la normativa, y para el resto de sitios las concentraciones de mercurio son mayores al límite permisible de acuerdo a la norma¹⁹ que es de 0,01mg.L⁻¹ de Hg. Las muestras de agua de Pozo profundo para lagunas de producción de cachamas presentaron niveles del elemento no detectables, menores al nivel máximo permitido.

Muestras de biota digeridas

Límite de Detección en muestras de biota: el límite de detección fue evaluado de acuerdo a los lineamientos de la IUPAC con el criterio de 3 veces la desviación estándar para 10 valores del blanco, que en este caso incluye los reactivos utilizados para la digestión. A partir del valor obtenido se determinó el límite de cuantificación en las muestras digeridas (ver tabla 5). Estos valores son adecuados para el monitoreo ya que son inferiores a los máximos establecidos³² para el caso de tejido de cachama.

En lo que respecta a las muestras de tejido foliar de lemna, el valor resulta adecuado para el monitoreo de un ensayo de biorremediación de mercurio utilizando la planta.

Determinación de la exactitud y precisión del método en muestras de biota: la exactitud en las muestras de biota digeridas usando curvas acuosas de calibración fue verificada mediante la determinación del porcentaje de recuperación en la matriz de las muestras digeridas, para lo cual se utilizaron poles de muestras control (sin mercurio detectable) enriquecidas con los patrones certificados. Como se muestra en la tabla 5, los porcentajes de recuperación indican una calidad analítica adecuada para el

procedimiento. La precisión para muestras de biota fue menor al 5% de desviación estándar relativa en todos los casos, para alícuotas de la misma muestra independiente.

Concentración de mercurio en muestras de biota: muestras de *Lemna minor*: como se muestra en la tabla 5, el método permitió la determinación del elemento en muestras de tejido foliar de *Lemna minor* en un ensayo de biorremediación. La concentración de mercurio para muestras foliares secas, al día 21 del ensayo de biorremediación fue de $40\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (tabla 6). Para las muestras de cachama en general no se detectó el elemento.

Tabla 5: Resultados Analíticos. N=5

Muestra	Límite de detección (mgL^{-1})	Límite de cuantificación (mgkg^{-1})	% de recuperación	Nivel máximo permitido OMS/FAO ³² (mgkg^{-1})
Tejido foliar de Lemna minor.	26	0,6	120 ± 26	
Tejido hepático de cachama	19	0,2	89 ± 5	0,5
Tejido muscular de cachama	19	0,25	92 ± 10	

Se encontró la presencia de trazas de mercurio en el límite de cuantificación en dos muestras provenientes de las lagunas de la finca La Montalba, ubicada en el estado Portuguesa.

Tabla 6: Concentración de mercurio en muestras de Biota.

Muestra	Concentración (mgKg^{-1})
Tejido foliar de Lemna minor. N=5	$*40 \pm 6$
Tejido hepático de cachama. N=54	$< 0,2$
Tejido muscular de cachama. N=54	$< 0,25$

*Desviación estándar correspondiente a la variabilidad biológica en réplicas independientes del ensayo.

Conclusiones

Se demostró la capacidad del método para determinar resultados linealmente proporcionales dentro del rango de $0,05$ a $1,00\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para volúmenes de 2, 3y 4mL y de $0,01$ - $1\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para volúmenes de muestra de 5 y 6mL.

El método tiene una exactitud analíticamente aceptable tanto para muestras certificadas de agua con mercurio como muestras de biota enriquecidas. El límite de detección obtenido por el método es similar al valor máximo establecido por la normativa para volúmenes de muestra de agua hasta 4mL, lo que permite inferir una respuesta analíticamente satisfactoria, pero que debe ser mejorada para

muestras con niveles de mercurio menores utilizando volúmenes de muestra de 5 y 6mL que permiten alcanzar límites de detección menores a $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En muestras de biota, el método permite obtener límites de detección que se ajustan a los requerimientos, en el caso de tejido foliar de *Lemna minor*, en ensayos de biorremediación ($0,6\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y para tejido de cachama menores a $0,25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. La precisión por repetitividad, en muestras de agua y certificadas aplicando el criterio del porcentaje de coeficiente de variación menor a 5%, es adecuada en la mayor parte de los puntos de muestreo.

Para las muestras de biota la precisión es menor al 10%. En general, el método analítico cumple con el propósito planteado de la determinación de mercurio en aguas y biota. El río Turbio presentó niveles ligeramente superiores al máximo permitido en cinco de las seis estaciones muestreadas, todas anteriores al punto de convergencia con el Guardagallo, lo cual indica la presencia de fuentes antrópicas y no antrópicas de contaminación que deben ser analizadas en un estudio detallado. Las muestras de Pozos de agua profunda de la zona de Tucacas, presentan niveles menores al establecido por la normativa venezolana ($10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). El agua, por tanto, es adecuada para uso en piscicultura y cultivo de cachama en lo que respecta a este elemento. Los niveles de mercurio en las muestras de tejido de cachama, tanto de estaciones piscícolas cerradas como de los ríos Orinoco y Apure son menores al valor máximo permitido por la

Organización Mundial de la Salud ($0,5\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) y no fueron detectados en el ensayo. La presencia de trazas en el límite de cuantificación en dos muestras de lagunas abiertas exige un estudio más exhaustivo sobre los niveles de mercurio en el centro de producción involucrado.

Agradecimientos

Al proyecto ARCAL RLA 010 del IAEA (RLA/1/010 “Mejora de la gestión de las masas de agua que están contaminadas con metales”) y los proyectos RAG-001-2007 (Evaluación de la contaminación por metales de la Cuenca del río Turbio, Estado Lara) y 001-AG-2007 (Determinación de las concentraciones de Hg, As, Pb y Cr en tejido hepático y muscular de cachamas cultivadas y cachamas silvestres) del CDCHT-UCLA por el financiamiento de la investigación.

Referencias

1. N Alberro, P Bedregal, R Crubelatti, S Stegen. Manual de protocolos armonizados y evaluados para la toma de muestra y el análisis de agua y sedimentos para la región de América Latina y el Caribe. Proyecto ARCAL RLA/1/010 Mejora de la gestión de la contaminación de masas de aguas superficiales contaminadas con metales, Editorial Litho y Arte SAC, Lima (2011).
2. M Anaya-Garduño, J Martínez. Manual sobre Sistemas de Captación y Aprovechamiento del Agua de Lluvia para Uso Doméstico y Consumo Humano. Cap 1. Problemática del agua en el mundo (2007).
Disponible en <http://www.pnuma.org/recnat/esp/documentos/cap1.pdf>. Revisado 04/09/2012.
3. M Topalián, P Castañé, M Rovedatti, A Salibián. Principal component analysis of dissolved heavy metals in water of the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** **63**, 484-490 (1999).
4. S Español Cano. Toxicología del mercurio. Actuaciones preventivas en Sanidad Laboral y Ambiental. Jornada Internacional sobre el impacto ambiental del mercurio utilizado por la minería aurífera artesanal en Iberoamérica. Lima, Perú (2001).
Disponible en <http://www.gama-peru.org/jornada-hg/espanol.pdf>. Revisado: 04/09/2012.
5. M Veiga y J Hinton. Mercury Bioaccumulation by Aquatic Biota in Hydroelectric Reservoirs: Review and Consideration of the Mechanism. Paper presented at the 1st International Forum on Mercury Problem in Hydroelectric Reservoirs: The Guri Case, Bolivar State, Venezuela, Org. IAMOT/UNEG, Ciudad Bolivar, Venezuela (2001).
Disponible en <http://www.globalmercuryproject.org/documents/documents.htm>. Revisado: 04/09/2012.
6. S Marrero, J Richani, G Rojas, M Querales, S González. Exposición ambiental al mercurio y valores en orina de los habitantes de la comunidad Boca de Yaracuy, ubicada en la costa centro norte de Venezuela. **Gac Méd Caracas**, **119(4)**, 315-320 (2011).
7. B Melo, B Cortes, J Mujica de G, M Acosta, C Cortez, R D´Bourg, B Coll. Exposición mercurial y estado de salud del personal que labora en el Servicio de Odontología del IPASME Barquisimeto. **Acta Odontol. Venez.**, **38(3)**, s/p (2000).
8. R Morales-Fuentes, R Reyes-Gil, J Alvarado, J Domínguez, R Mijares. Diagnóstico de la contaminación por mercurio en el personal de una unidad odontológica de Caracas, Venezuela. **Acta Odontol. Venez.**, **45(3)**, s/p (2007).
9. A Carrasquero-Durán, M Adams. Fraccionamiento de mercurio en suelos de áreas contaminadas de El Callao, Estado Bolívar-Venezuela. **Agronomía Trop.**, **53(3)**, 331-346 (2003).
10. A Carrasquero-Durán, M Adams. Comparación de métodos para el análisis de mercurio en suelos procedentes de El Callao, estado Bolívar, Venezuela. **INCL**, **27(4)**, 191-194(2002).
11. N Herrero, G Antonelli, P Giménez. Diagnóstico de contaminación mercurial en la comunidad de Santa María del Vapor, Municipio Sifontes, Estado Bolívar. **GEOMINAS**, **32(35)**, 59-64 (2004).
12. M Silva, I Arredondo, S Arriojas, N Chadi, A Loreto, E Molina. Determinación de factores epidemiológicos y clínicos en personas expuestas al mercurio en dos poblaciones del Bajo Caroní, Estado Bolívar, Venezuela. **GEOMINAS**, **32(34)**, 19-22 (2004).
13. MARNR. Revista Ambiente XX años. Año 20, No. 54. Fundación de Educación Ambiental, Fundambiente, MARN. Caracas (1997).
14. D Pirela, C Casler. Concentraciones de mercurio en tejidos de aves acuáticas, en el norte del sistema del lago de Maracaibo, occidente de Venezuela. **Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas**, **39(2)**, 108-127 (2005).
15. E Galán-Huertos, A Romero-Baena. Contaminación de Suelos por Metales Pesados. **MACLA. Revista de la Sociedad Española de Mineralogía**, **10**, 48-60 (2008).
16. L Metcalf, T Eddy. Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento, vertido y reutilización. McGraw-Hill/ interamericana de España S.A. Madrid (1995).
17. M Castillo, A Padilla, J Suniaga, A Betancourt, E Marcano. Análisis de la *Lemna sp.* del lago de Maracaibo para su eventual utilización en la alimentación de rumiantes. **Agricultura Andina**, **10**, 3-8 (2005).
18. A Arenas, L Marcó, G Torres. Evaluación de la planta *Lemna minor* como biorremediadora de aguas contaminadas con mercurio. **Avances en Ciencias e Ingeniería**, **2(3)**, 1-11 (2011).
19. Decreto N° 883. Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos. Gaceta Oficial de la República de Venezuela N° 5.021 (extraordinario) de fecha 18 de diciembre (1995).
20. R Baker, P Blanchfield, M Paterson, R Flett, L Wesson. Evaluation of Nonlethal Methods for the Analysis of Mercury in

- Fish Tissue. **Transactions of the American Fisheries Society**, **133**, 568–576 (2004).
21. A Goetzl, W Riepe. Mercury determination — SPME and colorimetric spot test. **Talanta**, **54**, 821–827 (2001).
22. M Jamaluddin-Ahmed, M Shah-Alam. A rapid spectrophotometric method for the determination of mercury in environmental, biological, soil and plant samples using diphenylthiocarbazone. **Spectroscopy**, **17**, 45–52 (2003).
23. A Hamza, A Bashammakh, A Al-Sibaai, H Al-Saidi, M El-Shahawi. Part 1. Spectrophotometric determination of trace mercury (II) in dental-unit wastewater and fertilizer samples using the novel reagent 6-hydroxy-3-(2-oxoindolin-3-ylideneamino)-2-thioxo-2H-1,3-thiazin-4(3H)-one and the dual-wavelength -correction spectrophotometry. **Journal of Hazardous Materials**, **178**, 287–292 (2010).
24. H Khan, A Jamaluddin, I Bhangar. A simple spectrophotometric determination of trace level mercury using 1,5-Diphenylthiocarbazone solubilized in micelle. **Analytical Sciences**, **21**, 507-512 (2005).
25. L Muñoz-Anrique. Informe del ensayo de aptitud regional en sedimento y agua. ARCAL RLA1/10 Mayo (2008).
Disponible en http://www.aguacal.com.ar/informeactitud_1.pdf.
Última consulta: 05/09/2012.
26. L Muñoz-Anrique. Informe del segundo ensayo de aptitud regional en sedimento y agua. ARCAL RLA1/10 Mayo (2009).
Disponible en http://www.aguacal.com.ar/informeactitud_2.pdf.
Última consulta: 05/09/2012.
27. F Chirinos. Calibración del modelo hidrodinámico (Programa WASP 7.4) y kit de acuicultor para la caracterización físico-química de las sub-cuencas media y baja del Río Turbio. Trabajo final de grado para obtener el título de ingeniero agrónomo. Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Venezuela(2010)
28. J Orozco, M Cañizares. Determinación de mercurio en formulaciones farmacéuticas utilizando un sistema de flujo continuo y ditizona en medio micelar. **Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas**, **41(1)**, 37-43 (2010).
29. A Rodríguez-Rodríguez, B Luna-Saucedo, L Martín-Chávez, J Mosquera-Sierra, M Zaldívar-Subirat. Validación de un método de determinación de Na, K, Cd, Pb y Hg por Espectrometría de Absorción Atómica en policosanol y extracto purificado de cera de caña. **Revista CENIC Ciencias Químicas**, **36(1)**, 9-14 (2005).
30. IBM. IBM SPSS statistics 19. Chicago: IBM (2007).
Disponible en <http://www.spss.com>. Accedido el: 20/05/2011.
31. M Hosseini, H Hashemi-Moghaddam. Flotation Spectrophotometric determination of mercury in water samples using iodide and ferroin. **Analytical Sciences**, **20**, 1449-1452 (2004).
32. F Álvarez, L Rojas. Contenido de mercurio total en peces de consumo habitual en los asentamientos indígenas El Plomo y El Casabe - Estado Bolívar. **Universidad Ciencia y Tecnología**, **13(51)**, 97-102 (2009).