UNIVERSIDAD
DE LOS ANDES
Mérida - Venezuela

ISSN: 1856-5301

Avances en Química

Volumen 21
Número 2
Mayo - agosto, 2026

Dialnet
DOAJ DIRECTORY OF OPEN ACCESS JOURNALS
redalyc
latindex
REVENCYT
Scopus

Avances en Química

Contenido

Volumen 21, número 2, Cuatrimestre mayo-agosto, Año 2026

Página

Artículos científicos

Síntesis y estructura cristalina del complejo octaédrico 1-metil-hidantoína-cobalto(II) tetrahidratado .. **19**

G Rodríguez, AJ Mora, J Cisterna, G Márquez, GE Delgado* **Chile/Perú/Venezuela**

Desarrollo y aplicación de un método HPLC para la cuantificación de ácido shikímico en frutos de Cotoneaster pannosus: una fuente alternativa de precursores farmacéuticos ……. **25**

MJ Güiza Luna, DS Sánchez Camacho, EE León Ávila* **Colombia**

Interacciones electrónicas entre beauvericina y residuos cuticulares de Leptinotarsa decemlineata: un análisis cuántico basado en el coeficiente de transferencia de electrones ……..... **35**

JA Olguín Rojas, M González Pérez* **México**

Artículos de revisión

Determinación de mercurio total mediante espectroscopia de absorción molecular UV/Vis: revisión de métodos ……..…… **43**

MA Gallignani*, MR Brunetto, C Ayala **Ecuador/Venezuela**

www.saber.ula.ve/avancesenquimica
Avances en Química, 21(2), 19-24 (2026)
Artículo científico

Síntesis y estructura cristalina del complejo octaédrico 1-metil-hidantoína-cobalto(II) tetrahidratado

Greiliz Rodríguez[1], Asiloé J. Mora[1], Jontahan Cisterna[2], Gerson Márquez[3], Gerzon E. Delgado[1]*

[1)] Laboratorio de Cristalografía, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida 5101, Venezuela

[2)] Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Católica del Norte, Sede Casa Central, Avenida Angamos 0610, 1270709, Antofagasta, Chile

[3)] Instituto de Energías Renovables, Universidad Tecnológica del Perú, Arequipa 04001, Perú

(*) gerzon@ula.ve

Recibido: 09/04/2026 **Revisado**: 23/06/2026 **Aceptado**: 24/08/2026

Resumen

En este trabajo se presenta la síntesis y caracterización estructural del complejo 1-metil-hidantoína-cobalto(II) tetrahidratado. El cristal obtenido fue caracterizado mediante difracción de rayos-X en muestras policristalinas y difracción de rayos-X de monocristal. El patrón de difracción de polvo confirma la formación de un nuevo compuesto respecto al ligando puro. La estructura cristalina se determinó por métodos directos y refinó por mínimos cuadrados utilizando los programas SHELXS y SHELXL. El complejo cristaliza en el sistema monoclínico con grupo espacial $P2_1/c$ (N° 14), Z = 2, con parámetros de celda a = 6,9048(5) Å, b = 12,1800(9) Å, c = 8,0251(6) Å, β = 97,003(7)°, V = 669,88(9) Å³. El ión Co(II) presenta coordinación octaédrica de tipo $CoN_2(H_2O)_4$. El empaquetamiento cristalino está gobernado por cuatro interacciones de enlace de hidrógeno del tipo O–H···O, descritas mediante los grafos de enlace $S(6)$, $C(6)$ y $R^2_2(24)$, que generan una densa red tridimensional con un índice de empaquetamiento de 74,9 %.

Palabras clave: Hidantoínas, complejos de cobalto(II), difracción de rayos-X, enlace de hidrógeno, cristalografía.

Abstract

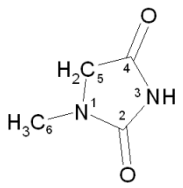
Synthesis and structural characterization of the octahedral 1-methyl-hydantoin-cobalt(II) tetrahydrate complex. The synthesis and characterization of the 1-methyl-hydantoin-cobalt(II) tetrahydrate complex are reported. The crystalline material was characterized by powder X-ray diffraction and single-crystal X-ray diffraction. The powder diffraction pattern confirms the formation of a new compound with respect to the pure ligand. The crystal structure was solved by direct methods and refined by full-matrix least-squares using SHELXS and SHELXL. The complex crystallizes in the monoclinic system with space group $P2^1/c$ (No. 14), Z = 2, with cell parameters a = 6.9048(5) Å, b = 12.1800(9) Å, c = 8.0251(6) Å, β = 97.003(7)°, V = 669.88(9) Å³. The Co(II) ion displays octahedral coordination of type $CoN_2(H_2O)_4$. The crystal packing is governed by four O–H···O hydrogen-bond interactions described by the graph-set descriptors $S(6)$, $C(6)$, and $R^2_2(24)$, producing an efficient three-dimensional network with a packing index of 74.9%.

Keywords: Hydantoins, cobalt(II) complexes, X-ray diffraction, hydrogen bonding, crystallography.

Introducción

Las hidantoínas, conocidas sistemáticamente como imidazolidina-2,4-dionas, constituyen una clase relevante de compuestos heterocíclicos de cinco miembros que contienen dos átomos de nitrógeno y dos grupos carbonilo. Su interés radica en la versatilidad estructural derivada de sus múltiples posiciones de sustitución, lo que permite modular sus propiedades fisicoquímicas y biológicas (Meusel & Gütschow, 2004; Konnert *et al*., 2017). Como resultado, estos compuestos han encontrado aplicaciones en ámbitos como la medicina, la industria y la cosmética, destacándose particularmente por su amplio espectro de actividades biológicas, que incluyen efectos anticonvulsivantes, antitumorales, antiinflamatorios y antivirales (Gawas *et al*., 2021; Palkhede *et al*., 2026; Shinde *et al*., 2026).

En este contexto, un derivado natural de particular interés es la 1-metil-hidantoína (ver esquema 1), que presenta un grupo metilo en la posición N1 y ha sido identificada como el componente activo del *Oviductus Ranae*, un producto de la medicina tradicional china empleado por sus propiedades antiasmáticas, antitusígenas y antidepresivas (Wang *et al*., 2017; Zhang *et al*., 2019; Xu *et al*., 2019).



Esquema. 1: Representación esquemática de la 1-metil-hidantoína.

Desde una perspectiva estructural, la 1-metil-hidantoína presenta un notable comportamiento polimórfico, siendo capaz de cristalizar en tres formas distintas. El polimorfo I cristaliza en el sistema monoclínico con grupo espacial $P2_1/c$ (Nogueira *et al*., 2014), mientras que los polimorfos II y III adoptan sistemas ortorrómbicos, pertenecientes a los grupos espaciales $Pna2_1$ (Nogueira *et al*., 2017) y $P2_12_12_1$ (Nogueira *et al*., 2020), respectivamente. Estas variaciones estructurales se originan en diferentes modos de empaquetamiento molecular y en la reorganización de las redes de enlaces de hidrógeno, lo que repercute de manera significativa en las propiedades fisicoquímicas del sólido. En consecuencia, cada polimorfo presenta patrones de difracción de polvo característicos (Delgado *et al*., 2015; 2022).

En paralelo, la química de coordinación de derivados hidantoínicos ha adquirido un creciente interés, particularmente por su capacidad para actuar como ligandos en complejos metálicos con potencial relevancia en química medicinal. Estos sistemas pueden integrarse en arquitecturas más complejas, incluyendo farmacóforos híbridos, donde la coordinación metálica modula o potencia las propiedades del ligando original (Akpan *et al*., 2023). En este contexto, se ha establecido que las hidantoínas coordinan preferentemente a través del átomo de nitrógeno N3 en su forma desprotonada. Los metales de la primera serie de transición suelen generar complejos con geometrías octaédricas distorsionadas o entornos tetragonales, cuya estabilidad estructural está frecuentemente reforzada por redes extendidas de enlaces de hidrógeno (Puszyńska-Tuszkanow *et al*., 2010; 2011; Daszkiewicz *et al*., 2018).

El estudio de este tipo de derivados requiere una caracterización estructural rigurosa, donde la determinación de la estructura cristalina constituye una herramienta clave para elucidar la geometría molecular, la coordinación metálica y la red de interacciones intermoleculares responsables del empaquetamiento cristalino. En este contexto, el presente trabajo aborda la síntesis y el análisis cristalográfico de un nuevo derivado de cobalto de la 1-metil-hidantoína, en el marco de una línea de investigación orientada a la caracterización estructural de compuestos hidantoínicos (Delgado *et al*., 2013; 2016; 2022; Márquez *et al*., 2021; Fonseca *et al*., 2023; Rodríguez *et al*., 2025).

Parte experimental

Síntesis del complejo

La 1-metil-hidantoína utilizada fue adquirida comercialmente (Sigma-Aldrich, 97 %) y corresponde al polimorfo I (Nogueira *et al*., 2014; Delgado *et al*., 2015). La síntesis del complejo se realizó disolviendo 0,5 mmol del ligando 1-metil-hidantoína junto con 0,25 mmol de acetato de cobalto(II) tetrahidratado (Merck 99 %) en 5 mL de metanol (Sigma-Aldrich 99,8%). La disolución se ajustó a un de pH=8 manteniendo una temperatura constante de 60 ºC y agitación continua. El envase conteniendo la disolución se selló con papel parafinado y se dejó en reposo a temperatura ambiente para la evaporación lenta del disolvente hasta la aparición de cristales del producto obtenido. Los cristales de color violeta claro presentaron un tamaño adecuado para el estudio por difractometría de rayos-X de monocristal.

Técnicas de caracterización

Las temperaturas de fusión se midieron en un aparato Electrothermal modelo 9300. Los datos de difracción de rayos-X en muestra policristalina se midieron, utilizando un difractómetro Siemens D-5005 con radiación de CuKα (λ= 1.5418 Å), en el rango de 5-70° en 2θ, con un tamaño de paso de 0.02° y un tiempo de conteo de 10s por paso. Se utilizó silicio como estándar externo. Para la determinación de la estructura cristalina se seleccionó un cristal en forma de lámina rómbica bajo un microscopio óptico Nikon provisto de un accesorio de luz polarizada. La toma de datos de intensidad se realizó a temperatura ambiente (293 K) en un difractómetro Rigaku Pilatus 200K utilizando radiación de MoKα (λ = 0,71075 Å). Se midieron 5843 reflexiones, con índices máximos *h, k, l* de 8, 15 y 10 respectivamente, y 2θmax = 53,69°. La determinación estructural se llevó a cabo mediante métodos directos con el programa SHELXS (Sheldrick, 2008) y el refinamiento por mínimos cuadrados de matriz completa se realizó con SHELXL (Sheldrick, 2015). El análisis geométrico se efectuó con el programa PLATON (Spek, 2003) y las representaciones gráficas se generaron con el programa DIAMOND (Bergerhoff *et al*., 1996).

Resultados y discusión

Temperaturas de fusión

La temperatura de fusión de la 1-metil-hidantoína, 156-157 ºC, confirma que se trata del polimorfo I (Delgado *et al*., 2015). El complejo funde con descomposición en 239-241 °C. Estas diferencias indican la posible formación del complejo de cobalto.

Difracción de rayos-X en muestra policristalina

La comparación del patrón de difracción de polvo del complejo con el del ligando puro confirma la formación de un nuevo compuesto, evidenciado por cambios significativos en la posición e intensidad de las reflexiones (ver figura 1). Además, no se detecta la presencia de reactivos de partida en el difractograma del complejo. El indexado del patrón, realizado con el programa Dicvlo04 (Boultif & Louër, 2004), proporcionó una solución única en una celda monoclínica con parámetros de celda *a*= 6,904 Å, *b*= 12,179 Å, *c*= 8,024 Å, β= 97,00º, los cuales coinciden con los obtenidos por difractometría de monocristal.

Estructura cristalina del complejo

El complejo 1-metil-hidantoína-cobalto(II) tetrahidratado, de fórmula molecular $C_8H_{18}CoN_4O_8$ y peso fórmula 357,19 uma, cristaliza en el sistema monoclínico con grupo espacial $P2_1/c$ (N° 14). Los datos cristalográficos se presentan en la tabla 1 y se depositaron en la base de datos CSD (2554028) (Groom *et al*., 2016).

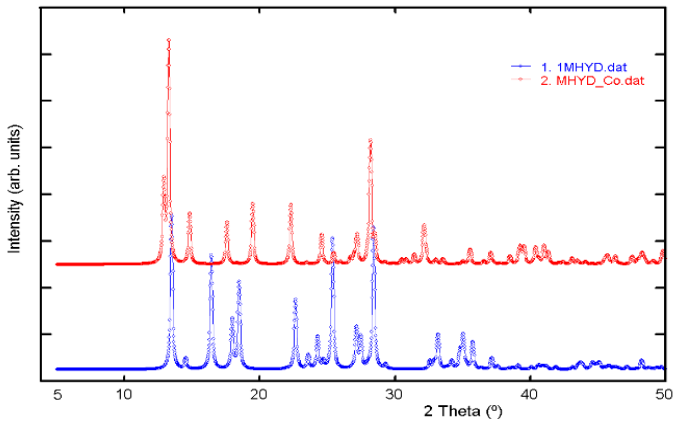


Fig. 1: Comparación entre los patrones de difracción de polvo de la 1-metil-hidantoína y el complejo.

Tabla 1. Datos cristalográficos y condiciones de la toma de datos para el complejo de cobalto(II).

Sistema cristalino	**Monoclínico**	**Radiación/λ (Å)**	**MoKα/0,71075**
Grupo espacial	*P2₁/c (N° 14)*	T (K)	293
a (Å)	6,9048(5)	2θmin – 2θmax (°)	3,1 – 26,8
b (Å)	12,1800(9)	Reflexiones totales	5843
c (Å)	8,0251(6)	Reflexiones únicas	1417
β (°)	97,003(7)	R_{int}	0,057
V (Å³)	669,88(9)	R_1 [I > 2σ(I)]	0,0496
Z	2	wR_2	0,1199
ρ_{calc} (g·cm^{-3})	1,771	S (GoF)	1,05
μ (mm^{-1})	1,329	$\Delta\rho_{min}/\Delta\rho_{max}$ (e·Å^{-3})	–0,958/0,655

Geometría del ligando 1-metilhidantoína

La figura 2 muestra la molécula del complejo y en la tabla 2 se comparan las distancias y ángulos de enlace en el ligando libre y en el complejo. El anillo hidantoínico en el complejo es esencialmente plano como en el ligando libre (Nogueira *et al*., 2014). Las distancias de enlace C=O de los dos grupos carbonilo son prácticamente idénticas dentro del error experimental: O4–C4 = 1,240(4) Å y O2–C2 = 1,237(3) Å. Esta igualdad se debe a que la coordinación dativa del nitrógeno N3 al cobalto impide la deslocalización resonante asimétrica observada en la 1-metil-hidantoína libre, donde la resonancia hace que la distancia C2–O2 sea algo mayor que C4–O4. El acortamiento de la distancia N3–C4 en ~0,02 Å respecto al ligando libre refleja la atracción de la nube electrónica del carbono vecino provocada por la coordinación del N3 al metal.

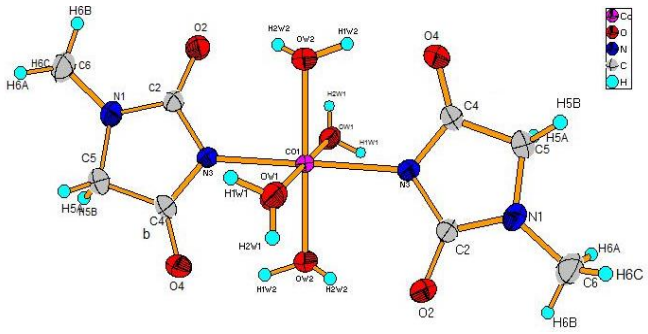


Fig. 2: Complejo 1-metil-hidantoína-cobalto(II) tetrahidratado.

Las distancias C–N en el anillo (N1–C2 = 1,338(3) Å; N3–C2 = 1,390(4) Å; N3–C4 = 1,338(3) Å; N1–C6 = 1,444(4) Å) son menores que el valor de referencia para enlace C–N sencillo (1,47 Å) (Allen *et al*., 1987), indicativo del carácter parcialmente doble conferido por la deslocalización electrónica. Los ángulos de enlace internos del anillo de cinco miembros se desvían de los valores ideales para hibridación sp^2 (120°), como es característico de los anillos tensionados de tipo hidantoico.

Tabla 2. Comparación de distancias y ángulos de enlace del ligando 1-metil-hidantoína libre[9] y coordinada al complejo de cobalto(II).

Enlace / Ángulo	**Ligando libre (Å / °)**	**Complejo (Å / °)**
N1–C6	1,444(2)	1,436(2)
N1–C2	1,332(2)	1,338(4)
C2–O2	1,223(2)	1,237(3)
N3–C2	1,392(2)	1,390(4)
N3–C4	1,360(2)	1,338(3)
C4–O4	1,211(2)	1,240(2)
N3–C4–O4 (°)	124,9(2)	125,9(2)
N1–C2–O2 (°)	127,5(2)	124,7(3)
N1–C2–N3 (°)	107,9(2)	111,2(2)

Esfera de coordinación del cobalto(II)

El ión Co(II) presenta una coordinación de tipo $CoN_2(H_2O)_4$, adoptando una geometría octaédrica (figura 3). El átomo de cobalto ocupa una posición especial de Wyckoff, que corresponde a un centro de inversión, a través del cual se completa la esfera de coordinación generando la segunda mitad del complejo. La unidad asimétrica contiene, por tanto, un átomo de Co, un ligando 1-metilhidantoína y dos moléculas de agua, de modo que el complejo completo se describe como $[Co(H_2O)_4(1\text{-MHYD})_2]$. Los ángulos de enlace N3–Co1–N3 = 180,00°, Ow1–Co1–Ow2 = 90,63(9)° y Ow2–Co1–N3 = 90,17(9)° confirman la coordinación octaédrica. La distorsión del octaedro es mínima, con valores de elongación cuadrática de 1,001 Å^3 y varianza angular de 1,6°, frente a 1,000 Å^3 y 0° para el octaedro ideal. La distancia de coordinación Co1–N3 = 2,120(2) Å es comparable a la reportada para otros complejos de Co(II) con ligandos hidantoicos, encontrados en la base de datos CSD (ConQuest, versión 6.1 mayo 2026) (Groom *et al*., 2016), en el rango 1,957–2,12 Å. La simetría del grupo puntual de la molécula $[Co(H_2O)_4(MHYD)_2]$ es C*i*, lo que refleja la presencia exclusiva del centro de inversión sobre el átomo metálico.

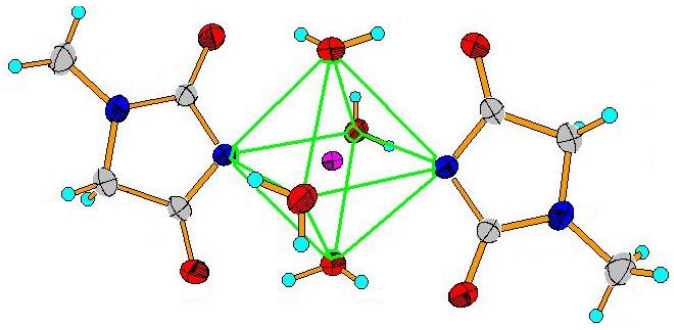


Fig. 3: Vista de la geometría octaédrica alrededor del átomo central de cobalto en el complejo.

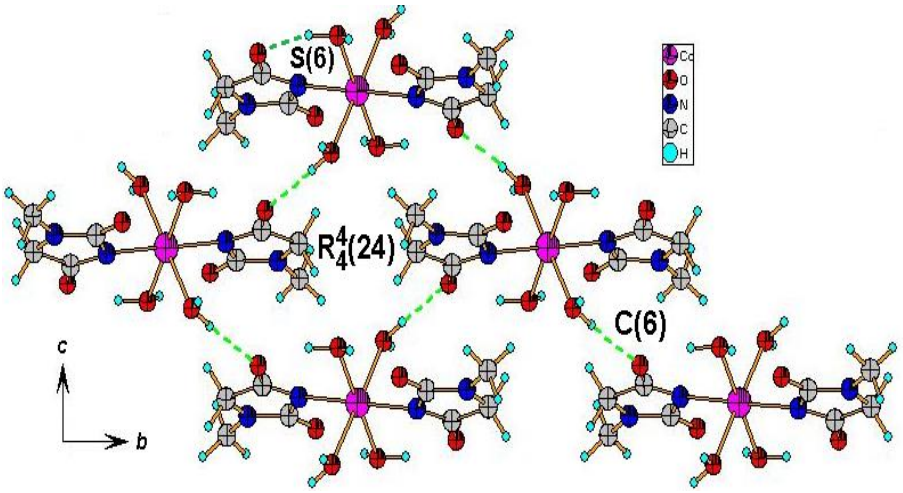


Fig. 4: Vista de los enlaces de hidrógeno formados, con sus respectivos grafos, en la estructura de 1-metil-hidantoína-cobalto(II) tetrahidratado.

Tabla 3. Geometría de los enlaces de hidrógeno en el empaquetamiento cristalino del complejo.

D–H···A	D–H (Å)	H···A (Å)	D···A (Å)	D–H···A (°)	Operación de simetría
Ow1–H1W1···O4	0,85(4)	1,92(4)	2,770(3)	174(4)	1–x, –½+y, ½–z
Ow1–H2W1···O2	0,73(4)	2,05(4)	2,770(3)	167(4)	2–x, 1–y, –z
Ow2–H2W2···O2	0,70(4)	2,02(4)	2,676(3)	155(5)	1–x, 1–y, –z
Ow2–H1W2···O4	0,91(5)	1,81(5)	2,665(3)	155(4)	(posición molecular)
C6–H6B···O2	0,96(2)	2,541(17)	2,886(4)	101,3(14)	(intramolecular)

El complejo es isoestructural con el análogo de níquel [Ni(H_2O)$_4$(1-MHYD$_2$] reportado (Puszyńska-Tuszkanow *et al*., 2011) en la CSD, cuyo grupo espacial es igualmente $P2_1/c$. Esta isoestructuralidad corrobora la regularidad con que los metales de la primera serie de transición del mismo periodo adoptan geometrías octaédricas equivalentes con ligandos hidantoínicos (Akpan *et al*., 2023).

Empaquetamiento cristalino y enlaces de hidrógeno

El empaquetamiento cristalino del complejo está controlado por cuatro interacciones fuertes de enlace de hidrógeno del tipo O–H···O, que involucran las cuatro moléculas de agua coordinadas y los grupos carbonilo de las hidantoínas (tabla 3). La naturaleza de donadores y aceptores es la siguiente: (i) La molécula de agua Ow2, ubicada en posición ecuatorial, forma dos enlaces de hidrógeno intramoleculares descritos por el grafo (*graph-set*) de primer orden *S*(6) (Etter *et al*., 1990), generando un ciclo de seis átomos que estabiliza la coordinación ecuatorial al metal. Dado que Ow2 y su equivalente por el centro de inversión participan en estas interacciones, se generan cuatro enlaces de hidrógeno intramoleculares equivalentes en la molécula. En la figura 4 se pueden apreciar estos enlaces de hidrógeno. (ii) La molécula de agua Ow1, en posición axial, forma dos enlaces de hidrógeno intermoleculares. El enlace Ow1–H1W1···O4 genera una cadena extendida de 6 átomos descrita por el grafo *C*(6). Esta cadena, a su vez, define un macrociclo formado por cuatro unidades del complejo y 24 átomos, descrito por el grafo $R^4_4(24)$.

Adicionalmente, se identifica un enlace de hidrógeno no convencional e intramolecular del tipo C6–H6B···O2, con una distancia H···A de 2,541(17) Å, más débil que los anteriores pero que contribuye a la estabilización del empaquetamiento.

La comparación con los grafos de enlace de hidrógeno reportados para complejos de Co(II) con ligandos hidantoicos en la CSD revela que los grafos S(6), que describe el enlace intramolecular entre el agua ecuatorial y el carbonilo del ligando, y el grafo C(6) son recurrentes en las ocho estructuras análogas encontradas. Esta interacción parece ser un motivo estructural conservado que contribuye a estabilizar la coordinación octaédrica en este tipo de complejos.

El porcentaje de ocupación del espacio en la estructura, conocido también como índice de empaquetamiento, es de 74,9 % lo cual indica que la red tridimensional de enlaces de hidrógeno genera una estructura particularmente densa, sin cavidades ni canales disponibles para la inclusión de moléculas de disolvente adicional.

Conclusiones

Se sintetizó el complejo 1-metil-hidantoína-cobalto(II) tetrahidratado [Co(H_2O)$_4$(1-MHYD) $_2$], a partir de acetato de cobalto(II) y el ligando 1-metilhidantoína en metanol como disol vente a pH 8. El indexado del patrón de difracción de polvo confirma la formación de un nuevo compuesto en una celda monoclínica. La estructura cristalina, resuelta y refinada por métodos directos y mínimos cuadrados, revela que el complejo cristaliza en el grupo espacial $P2_1/c$ (N° 14) con Z = 2 y una geometría octaédrica para el Co(II) con coordinación

$CoN_2(H_2O)_4$ y distorsión mínima respecto al octaedro ideal. El empaquetamiento cristalino está gobernado por cuatro interacciones O–H···O entre las moléculas de agua coordinadas y los grupos carbonilo del ligando, descritas mediante los grafos $S(6)$, $C(6)$ y $R^2_2(24)$, que generan una red tridimensional con un índice de empaquetamiento de 74,9 %. El complejo es isoestructural con el análogo de níquel reportado en la CSD, lo que evidencia una regularidad estructural en esta familia de complejos de metales de transición con 1-metilhidantoína. Este estudio reporta la síntesis y caracterización estructural de un nuevo derivado metálico de hidantoínas, resaltando el papel de la estructura cristalina en la comprensión de sus propiedades y su potencial interés en química medicinal.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CDCHTA-ULA (Proyecto C-2012-26-08-B) de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, al Núcleo de Materiales Funcionales No. 8 UCN-VRIDT 076/2020, a la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo Tecnológico (VRIDT-UCN) y a la Dirección de Investigación y Análisis de la Producción Científica (DIAPC-UCN) de la Universidad Católica del Norte, Chile, por el apoyo científico.

Referencias

Akpan, E. D., Dagdag, O., & Ebenso, E. E. (2023). Progress on the coordination chemistry and application of hydantoins and its derivatives as anticorrosive materials for steel: A review. *Coordination Chemistry Reviews*, *489*, 215207. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2023.215207

Allen, F. H., Kennard, O., Watson, D. G., Brammer, L., Orpen, A. G., & Taylor, R. (1987). Tables of bond lengths determined by X-ray and neutron diffraction. Part 1. Bond lengths in organic compounds. *Journal of the Chemical Society, Perkin Trans. 2*, (12), S1-S19. https://doi.org/10.1039/P298700000S1

Bergerhoff, G., Berndt, M., & Brandenburg, K. (1996). Evaluation of crystallographic data with the program DIAMOND. *Journal of research of the National Institute of Standards and Technology*, *101*(3), 221. https://doi.org/10.6028/jres.101.023

Boultif, A., & Louër, D. (2004). Powder pattern indexing with the dichotomy method. *Journal of Applied Crystallography*, *37*(5), 724-731. https://doi.org/10.1107/S0021889804014876

Daszkiewicz, M., Puszyńska-Tuszkanow, M., Staszak, Z., Chojnacka, I., Fałtynowicz, H., & Cieślak-Golonka, M. (2018). Single crystal-to-single crystal transformations induced by ammonia–water equilibrium changes. *CrystEngComm*, *20*(21), 2907-2911. https://doi.org/10.1039/C8CE00401C

Delgado, G. E., Chacón, C., Marroquin, G., Cisterna, J., & Brito, I. (2022). X-ray powder diffraction data for the two new polymorphs of 1-methylhydantoin. *Powder Diffraction*, *37*(2), 108-114. https://doi.org/10.1017/S0885715622000136

Delgado, G. E., Mora, A. J., Contreras, J. E., & Chacón, C. (2015). X-ray powder diffraction data for 1-methylhydantoin, an antiasthmatic and antidepressive hydantoin compound. *Powder Diffraction*, *30*(2), 178-181. https://doi.org/10.1017/S0885715615000081

Delgado, G. E., Mora, A. J., Contreras, J. E., Bruno-Colmenárez, J., & Atencio, R. (2013). Synthesis, crystal and molecular structure, and hydrogen-bonding patterns in hydantoin-L-aspartic acid. *Avances en Química*, *8*(2), 59-63. https://doi.org/10.53766/AVANQUIM/2011.08.02.01

Delgado, G. E., Mora, A. J., Narea, P., Chacón, C., Marroquin, G., Hernández, B., Cisterna, J., & Brito, I. (2022). Synthesis, crystal structure, hydrogen bond patterns and Hirshfeld surface analysis of (S)-5-(4-hydroxybenzyl)-imidazolidine-2,4-dione. *Journal of Molecular Structure*, *1250*, 131757. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131757

Delgado, G. E., Rodríguez, J. A., Mora, A. J., Bruno-Colmenárez, J., Uzcátegui, J., & Chacón, C. (2016). Supramolecular structure of 5-methyl-5-phenyl hydantoin and hydrogen-bonding patterns in 5,5′-substituted hydantoins. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, *629*(1), 96-104. https://doi.org/10.1080/15421406.2015.1107745

Etter, M. C., MacDonald, J. C., Bernstein, J. (1990). Graph-set analysis of hydrogen-bond patterns in organic crystals. *Acta Crystallographica B*, *46*(2) 256-262. https://doi.org/10.1107/S0108768189012929

Fonseca, J., Mora, A., & Delgado, G. E. (2023). Caracterización estructural por métodos espectroscópicos y difracción de rayos-X de un nuevo compuesto hidantoina. *Avances en Química*, *18*(2), 61-66. https://doi.org/10.53766/AVANQUIM/2023.18.02.02

Gawas, P. P., Ramakrishna, B., Veeraiah, N., & Nutalapati, V. (2021). Multifunctional hydantoins: Recent advances in optoelectronics and medicinal drugs from Academia to the chemical industry. *Journal of Materials Chemistry C*, *9*(46), 16341-16377. https://doi.org/10.1039/D1TC04090A

Groom, C. R., Bruno, I. J., Lightfoot, M. P., & Ward, S. C. (2016). The Cambridge structural database. *Acta Crystallographica B*, 72(2), 171-179. https://doi.org/10.1107/S2052520616003954

Konnert, L., Lamaty, F., Martinez, J., & Colacino, E. (2017). Recent advances in the synthesis of hydantoins: The state of the art of a valuable scaffold. *Chemical Reviews*, *117*(23), 13757-13809. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00067

Márquez, R., Belandria, L., Guillén, M., González, T., Mora, A., & Delgado, G. E. (2021). Síntesis y caracterización estructural del compuesto hidantoína de D, L-valina. *Avances en Química*, *16*(3), 49-55. https://doi.org/10.53766/AVANQUIM/2011.08.02.01

Meusel, M., & Gütschow, M. (2004). Recent developments in hydantoin chemistry. A review. *Organic preparations and procedures international*, *36*(5), 391-443. https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00067

Nogueira, B. A., Ildiz, G. O., Canotilho, J., Eusébio, M. E. S., & Fausto, R. (2014). Molecular structure, infrared spectra, photochemistry, and thermal properties of 1-methylhydantoin. *The Journal of Physical Chemistry A*, *118*(31), 5994-6008. https://doi.org/10.1021/jp505335c

Nogueira, B. A., Ildiz, G. O., Henriques, M. S. C., Paixão, J. A., & Fausto, R. (2017). Structural and spectroscopic characterization of the second polymorph of 1-methylhydantoin. *Journal of Molecular Structure*, *1148*, 111-118. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.07.028

Nogueira, B. A., Milani, A., Ildiz, G. O., Paixão, J. A., Castiglioni, C., & Fausto, R. (2020). Polymorphism in 1-methylhydantoin: Investiga-

tion by periodic DFT calculations and characterization of the third polymorph. *CrystEngComm*, *22*(38), 6347-6359. https://doi.org/10.1039/D0CE01016B

Palkhede, J. D., Park, E.-J., Darlami, O., & Shin, D. (2026). Recent applications of hydantoins in drug discovery: Updates (2019~Present). Molecules, 31, 477. https://doi.org/10.3390/molecules31050779

Puszyńska-Tuszkanow, M., Daszkiewicz, M., Maciejewska, G., & Adach, A. (2010). Interaction of hydantoins with transition metal ions: Synthesis, structural, spectroscopic, thermal and magnetic properties of $[M(H_2O)_4$(pheny-toinate)2] M = Ni(II), Co(II). *Structural Chemistry*, *21*(2), 315-321. https://doi.org/10.1007/s11224-009-9533-x

Puszyńska-Tuszkanow, M., Daszkiewicz, M., Maciejewska, G., Staszak, Z., Wietrzyk, J., Filip, B., & Cieślak-Golonka, M. (2011). HSAB principle and nickel(II) ion reactivity towards 1-methyhydantoin. *Polyhedron*, *30*(12), 2016-2025. https://doi.org/10.1016/j.poly.2011.05.004

Rodríguez, J. A., Rojas, J. M., Márquez, G., & Delgado, G. E. (2025). Síntesis y caracterización estructural de un complejo de cobre(II) con imidazol y 5-metil-5-fenil-hidantoína. *Avances en Química*, *20*(3), 97-102.

Sheldrick, G. M. (2008). A short history of SHELX. *Acta Crystallographica A*, *64*(1), 112-122. https://doi.org/10.1107/S0108767307043930

Sheldrick, G. M. (2015). Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica C*,*71*(1), 3-8. https://doi.org/10.1107/S2053229614024218

Shinde, N. V., Patole, V. P., Kumbhare, M. R., Narkhede, H., Satalkar, A. T., Thube, A. V., & Bhosale, S. K. (2026). Recent pharmacological applications of (thio) hydantoins. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, *12*, 13. https://doi.org/10.1186/s43094-025-00918-z

Spek, A. L. (2003). Single-crystal structure validation with the program PLATON. *Journal of Applied Crystallography*, *36*(1), 7-13. https://doi.org/10.1107/S0021889802022112

Wang, S.-H., Jin, X.-Q., Xu, Y., Hu, X.-Y., Lv, Z.-Y., & Wang, Y.-S. (2017). Studies on pharmacokinetic, body distribution, plasma protein binding rate and excretion of 1-methyl hydantoin in rats in vivo. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, *40*(10), 493-498. https://doi.org/10.1080/10826076.2017.1287725

Xu, Y., Wang, F., Guo, H., Wang, S., Ni, S., Zhou, Y., Wang, Z., Bao, H., & Wang, Y. (2019). Antitussive and anti-inflammatory dual-active agents developed from natural product lead compound 1-methylhydantoin. *Molecules*, *24*(13), 2355. https://doi.org/10.3390/molecules24132355

Zhang, Y., Wang, Y., Li, M., Liu, S., Yu, J., Yan, Z., & Zhou, H. (2019). Traditional uses, bioactive constituents, biological functions, and safety properties of Oviductus ranae as functional foods in China. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2019*, 4739450. https://doi.org/10.1155/2019/4739450

www.saber.ula.ve/avancesenquimica
Avances en Química, 21(2), 25-34 (2026)
Artículo científico

Desarrollo y aplicación de un método HPLC para la cuantificación de ácido shikímico en frutos de *Cotoneaster pannosus*: una fuente alternativa de precursores farmacéuticos

María José Güiza Luna, Danna Sofía Sánchez Camacho, Emerson Eliecer León Ávila*

Facultad de Ciencias, Programa de Química Farmacéutica, Universidad El Bosque.
Grupo de Investigación en Química Aplicada (INQA), Bogotá, Colombia..

(*) leonemerson@unbosque.edu.co

Recibido: 27/01/2026 **Revisado**: 03/03/2026 **Aceptado**: 19/08/2026

Resumen

El ácido shikímico (AS) es el precursor biosintético fundamental para la producción del fármaco antiviral oseltamivir, debido a la necesidad de diversificar sus fuentes naturales, se evaluó el fruto de *Cotoneaster pannosus* como una alternativa de suministro. Se desarrolló y aplicó un método por HPLC-UV para su cuantificación, empleando una columna ReproSil–Pur Basic-C8, la fase móvil compuesta por agua (HCOOH 1%, pH 2,67) y acetonitrilo en elución por gradiente. La extracción se optimizó mediante ultrasonido a 50 °C, logrando una recuperación eficiente del analito. El método demostró ser lineal (R^2: 0,998), exacto (100,1% ± 3,6%) y preciso (CV < 3%), con límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de 1,24 ppm y 3,76 ppm, respectivamente. Se determinó una concentración de 50,4 ppm de AS en la muestra fresca. Aunque este contenido es menor al de fuentes tradicionales, la amplia disponibilidad geográfica y la baja complejidad de extracción lo pueden considerar como una fuente natural complementaria de interés para la industria farmacéutica.

Palabras clave: ácido shikímico; Holly liso; *Cotoneaster pannosus*; cuantificación; cromatografía líquida de alta resolución

Abstract

Development and application of an HPLC method for the quantification of shikimic acid in *Cotoneaster pannosus* fruit: an alternative source of pharmaceutical precursors. Shikimic acid (SA) is the fundamental biosynthetic precursor to produce the antiviral drug oseltamivir, due to the need to diversify its natural sources, the fruit of *Cotoneaster pannosus* was evaluated as an alternative supply. An HPLC-UV method was developed and applied by for its quantification, using a ReproSil–Pur Basic-C8 column and a mobile phase consisting of water (1% HCOOH, pH 2,67) and acetonitrile in gradient elution. Extraction was optimized via ultrasound at 50 °C, achieving an efficient recovery of the analyte. The method proved to be linear (R^2: 0,998), accurate (100,1% ± 3,6%), and precise (CV< 3%), with limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of 1,24 ppm and 3.76 ppm, respectively. A concentration of 50,4 ppm of SA was determined in the fruit fresh sample. Although this content is lower than that of traditional sources, its wide geographical availability and low extraction complexity make it a valuable complementary natural source of interest to the pharmaceutical industry.

Keywords: Shikimic acid; Holly liso; *Cotoneaster pannosus*; Quantification; High Performance Liquid Chromatography

Introducción

La influenza es una infección respiratoria viral aguda que afecta a todos los grupos de edad y se asocia con una alta mortalidad durante pandemias, epidemias y brotes esporádicos, que afecta a casi el 10% de la población mundial anualmente, causando alrededor de medio millón de muertes cada año (Saxena et al., 2014; Borah, 2015; Les et al., 2017)[1-3]. Actualmente, la industria farmacéutica cuenta con 4 principios activos aprobados por las agencias regulatorias para el uso en la quimioprofilaxis y el tratamiento de la influenza; el oseltamivir, zanamivir, peramivir y baloxavil marboxil (Javanian et al., 2021)[4]. Particularmente, desde hace algunos años se ha evidenciado que la demanda del oseltamivir ha aumentado de manera considerable y la industria farmacéutica requiere más fuentes de obtención de AS (figura 1).

En la actualidad, este compuesto se obtiene del anís estrellado

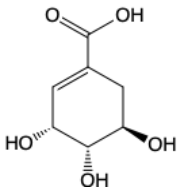


Fig. 1: Estructura química del ácido shikímico.

chino *(Illicium verum)*, sin embargo al revisar la literatura, se identificó que una de las posibles alternativas para la extracción de AS a partir de fuentes naturales se encuentra en el fruto del arbusto *Cotoneaster pannosus*, el cual, según diferentes estudios, presenta un alto contenido en polifenoles y demás metabolitos secundarios, entre los cuales se encuentran el ácido shikímico, ácido gálico, catequina, epicatequina, ácido 3-o-cafeoilquínico, ácido 5-o-cafeoilquínico, rutina, hiperósido, ácido cinámico y naringina (ICH, 2023)[5].

Por tal motivo, en el presente trabajo se realiza el desarrollo y aplicación de un método analítico para la separación y cuantificación de AS por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), empleando el fruto del *Cotoneaster pannosus* obtenido en la ciudad de Bogotá, Colombia, con el objetivo de presentar una posible fuente alternativa de obtención de AS, para la síntesis de oseltamivir.

Parte experimental

Materiales

Equipos: el análisis se realizó en un cromatógrafo líquido Shimadzu® i-Series Advanced LC-2030C, equipado con un detector UV/vis, una bomba de elución en gradiente con dispositivo de desgasificación, un inyector automático de enfriamiento y un horno de columna. La separación cromatográfica se logró utilizando la columna ReproSil–Pur Basic-C8 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) y los datos se adquirieron a través del software Manuals Lab Solution 20A 2030. Adicionalmente, para el proceso de extracción se utilizó una balanza analítica Ohaus, un baño ultrasónico Branson ultrasonics, una plancha de calentamiento Ohaus, un sonicador digital Qsonica, un espectrofotómetro UV-VIS Thermo Genesys y un pHmetro STARTER 3100M Ohaus.

Estándares y reactivos: estándar de ácido shikímico ≥99% (SIGMA-ALDRICH LOTE: SLCJ2778; N° CAS: 138-59-0), ácido fórmico (Merck), Ácido Fosfórico (Merck), acetonitrilo (Merck), nitrato de amonio (Merck) y agua grado HPLC.

Material vegetal: se recolectaron las muestras del fruto del arbusto *Cotoneaster pannosus* presente en zonas aledañas a la Universidad El Bosque de Bogotá, Colombia, el día 31 de Julio del 2023. Las coordenadas de la zona urbana donde se realizó la recolección fueron -74,03165 longitud (O) y 4,71195 latitud (N). La temperatura en esta zona el día de la recolección osciló entre los 11-15°C, con una humedad relativa del 82%. Posterior a la recolección, el Departamento de Biología de la Universidad El Bosque llevó a cabo la caracterización botánica del material vegetal y proporcionó el certificado de identificación taxonómica. La extracción del ácido shikímico del fruto del arbusto *Cotoneaster pannosus* se realizó sobre la totalidad del fruto, utilizando el material vegetal fresco para evitar la pérdida del analito de interés, considerando su alta solubilidad en agua y la posible concentración de este en el fruto. Esta decisión se fundamentó en la observación de los distintos estados de maduración del fruto, el cual exhibe un color verde durante su fase de crecimiento y un llamativo tono rojo-anaranjado brillante cuando está fresco, el cual se vuelve opaco a medida que madura.

Métodos

Método de extracción: la extracción del AS del fruto del *Cotoneaster pannosus* se basó en un diseño de estudio ortogonal L16 (45) realizado por Cai et al. (2014)[6]. En este estudio, se investigaron los efectos de diversas variables, como la potencia aplicada, la proporción de disolvente a material y el tiempo de extracción, sobre el rendimiento de dos tecnologías diferentes. Adicionalmente, se evaluaron diferentes solventes orgánicos para llevar a cabo la extracción. De esta manera, inicialmente se tomó una muestra de 25 gramos del fruto, la cual se maceró en un mortero con la adición de 250 mL de agua, metanol y acetona para obtener tres extractos diferentes. Posteriormente, estos extractos se sometieron a ultrasonido utilizando dos equipos diferentes: uno a través de un baño ultrasónico durante una hora, y el otro mediante una sonda ultrasónica a 50 Hz durante 10 minutos, con intervalos de 2 minutos. Finalmente, se dejaron en reposo durante 24 horas, se filtraron y se almacenaron en frascos ámbar.

Pre-tratamiento de las muestras: una vez realizada la extracción por ultrasonido, se realizó un pretratamiento de la muestra mediante una extracción líquido-líquido con éter de petróleo para eliminar algunos compuestos apolares de la matriz, esta fracción fue eliminada del extracto de interés. Posteriormente se filtraron utilizando un filtro jeringa hidrofílico de politetrafluoroetileno con un diámetro de 25 mm y un tamaño de poro de 0,45 µm. Finalmente, se desgasifican utilizando un baño ultrasónico, donde cada muestra se deja en el equipo durante 3 minutos antes de ser inyectada en el equipo de cromatografía liquida de alta eficiencia.

Condiciones cromatográficas: el AS fue separado y cuantificado mediante un sistema de HPLC de fase reversa con detección UV, empleando una columna ReproSil–Pur Basic-C8 (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) a una temperatura de 20°C, una mezcla de ácido fórmico al 1,0% en agua (pH 2,67) y acetonitrilo como fase móvil con un sistema de elución en gradiente (tabla 1), un caudal de 0,4 mL/min durante 0-4,5 min y de 0,8 mL/min durante 4,5-15 min, un volumen de inyección de 5µL y detección UV a 230-250 nm. Donde se evidenció que a mayor concentración de acetonitrilo mayor el tiempo de retención.

Método de validación: se establecieron los parámetros de validación siguiendo las directrices recomendadas por la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) 43, categoría I. De esta manera, el método fue evaluado en términos de linealidad, exactitud, precisión, límite de detección, el límite de cuantificación y la robustez del método (Reed et al., 2002)[7].

Preparación de la solución stock: se trabajo con una solución madre de 3000 ppm, la cual se empleó para el desarrollo de la validación parcial enfocada en los parámetros críticos de desempeño analítico necesarios para garantizar la confiabilidad de la cuantificación.

Resultados y discusión

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de la implementación de la metodología de extracción, las condiciones de análisis cromatográfico y la determinación de las características analíticas de desempeño del método utilizado para separar y cuantificar el AS contenido en el fruto del *Cotoneaster pannosus*.

Desarrollo de las condiciones del método de extracción

Inicialmente se replicó las condiciones cromatográficas descri-

tas por Les et al. en su investigación del arbusto *Cotoneaster pannosus.* Sin embargo, no se contaba con una columna de la misma longitud y además este estudio no se limitaba a la separación únicamente del AS. De modo que, se plantearon de manera secuencial y lógica nuevas condiciones cromatográficas encontradas en la literatura.

Selección del solvente de extracción

Para la selección del solvente de extracción, se evaluó el perfil cromatográfico del ácido shikímico (AS) empleando agua, metanol y acetona. El agua fue seleccionada como el solvente óptimo, ya que proporcionó un pico sensible y simétrico con alta resolución en un tiempo de retención apropiado, como se muestra en la figura 2. En contraste, el metanol mostró baja sensibilidad y pobre resolución, mientras que con la acetona el analito no fue detectable, descartando ambos solventes para el proceso de extracción. De igual forma, el agua es considerada una excelente alternativa en el marco de la química verde. Su uso como disolvente universal disminuye el impacto ambiental y los costos operativos asociados a la gestión de residuos peligrosos.

Selección del método de extracción

Con el fin de optimizar la eficiencia de la extracción del ácido shikímico (AS), se compararon dos técnicas asistidas por ultrasonido utilizando agua como solvente (figura 3): baño ultrasónico (A) y sonda ultrasónica (B) permiten la recuperación del analito.

Para estas primeras corridas cromatográficas en específico, se emplearon las condiciones descritas en las referencias bibliográficas, en donde se utilizó una fase móvil compuesta por Agua (H-COOH 0,1%): Metanol 95:5, un flujo de 0,7 mL/min, un volumen de inyección de 5 µL y una temperatura de 30 °C. Como resultado de la inyección de los tres extractos del *Cotoneaster pannosus* mencionados anteriormente, se evidenció que el pico correspondiente al AS tenía una intensidad significativamente mayor en el extracto acuoso en comparación con los demás solventes, lo cual puede atribuirse a la alta solubilidad del AS en agua (National Library of Medicine, 2024)[8], que alcanza los 150 mg/mL a 21 °C. Por tal motivo, se seleccionó el agua como solvente de la extracción.

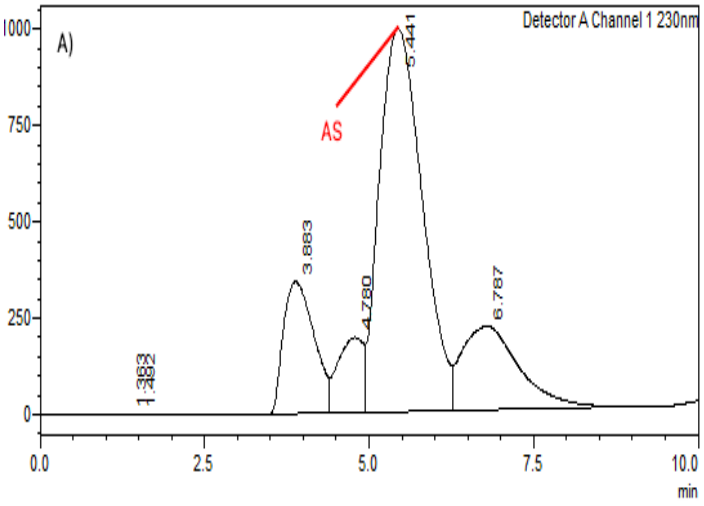


Fig. 2: Cromatograma del extracto de AS obtenido utilizando Agua para la extracción

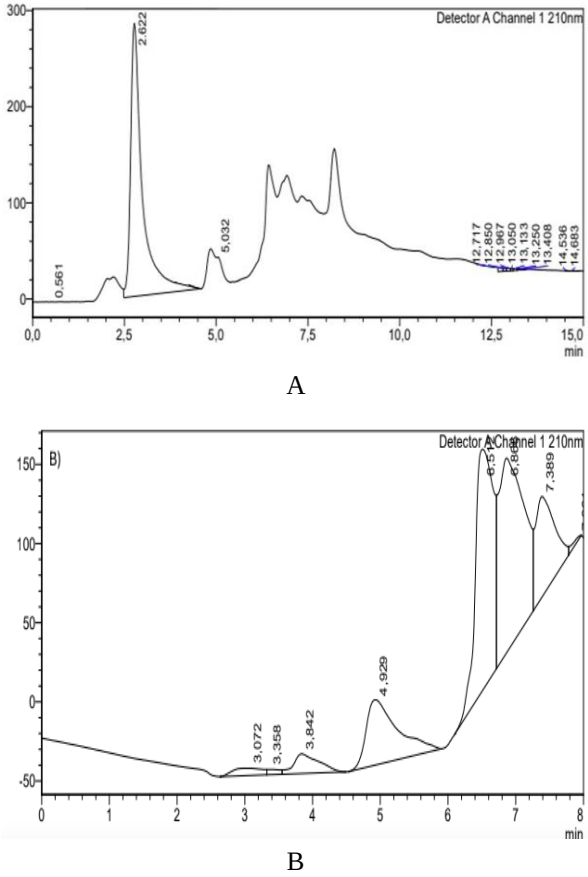


Fig. 3: Cromatogramas del extracto de AS obtenido mediante baño ultrasónico (A) y sonda ultrasónica (B) usando agua como disolvente.

No obstante, a pesar de la alta solubilidad del AS en agua, se evidenció que este solvente por sí solo era insuficiente para la extracción selectiva de este compuesto, lo cual estaba asociado directamente a la complejidad de la matriz del flujo, pues el AS se encuentra asociado a otras moléculas como terpenos, clorofila, lípidos y compuestos inorgánicos. Por lo tanto, se analizaron dos métodos de extracción complementarios asistidos por ultrasonido, uno mediante el uso de una sonda ultrasónica y el otro a través de un baño de ultrasonido. Como se observa en la figura 3, se obtuvieron mejores resultados al utilizar el baño ultrasónico, ya que se evidencia un pico de área cuantificable con una mayor resolución y simetría. Esto podría explicarse debido a que, aunque ambos equipos operan mediante los efectos destructivos de las ondas ultrasónicas para intensificar la transferencia de masa, el segundo aplica una intensidad ultrasónica más alta. En este caso, las ondas generan ciclos fluctuantes de alta presión en los líquidos, lo que genera la formación de burbujas de vapor. Estas burbujas aumentan de tamaño hasta alcanzar un volumen en el que ya no pueden absorber más energía, resultando en su colapso violento durante la implosión.

Este proceso produce temperaturas y presiones extremadamente elevadas que podrían ocasionar la ruptura de enlaces químicos del AS (Trapalis et al., 2004)[9]. Por esta razón, no se observa el pico característico del analito en el cromatograma cuando se emplea la sonda para la extracción (figura 3B).

Para la selección de los otros parámetros de extracción del AS, este trabajo se basó en un estudio ortogonal realizado por *Cai et al.*, en donde se investigaron los efectos de diversas variables, como la potencia aplicada, la proporción de disolvente y el tiempo de extracción, sobre el rendimiento de dos extracciones diferentes empleando ultrasonido. De acuerdo con esto, se observó que, a temperaturas elevadas, por debajo del punto de ebullición del AS, se incrementaba la solubilidad, la difusividad y la presión, lo que facilitaba la penetración de las ondas en el tejido del fruto, por lo cual se evidenció una mayor recuperación del extracto a una temperatura de 50°C. Asimismo, se evidenció que un aumento en el volumen de disolvente resultaba en un incremento lineal del rendimiento. Esto se debe a que un mayor volumen de disolvente acelera la velocidad de difusión del AS desde el interior del fruto hacia el exterior, ya que las moléculas tienen más espacio para moverse en el solvente, lo que facilita su migración desde regiones de mayor concentración (dentro del fruto) hacia regiones de menor concentración (en el disolvente): por lo que se optó por emplear un volumen de 250 mL.

Desarrollo de las condiciones del método cromatográfico

Inicialmente, se realizaron diferentes pruebas preliminares para seleccionar los solventes que formarán parte de la fase móvil, partiendo con una mezcla de agua: metanol. Sin embargo, a pesar de modificar las proporciones de estos solventes para tratar de mejorar la retención del analito, se observaron picos poco resueltos y mal definidos tanto en el patrón como en los extractos, esto puede atribuirse a la interacción del AS con la columna. En consecuencia, se optó por explorar una nueva combinación de fase móvil que incluyera un disolvente menos polar, como el acetonitrilo, con el objetivo de lograr una mayor retención del analito en la fase estacionaria y, de esa manera, obtener picos más separados. Aunque este ajuste mejoró la separación de los picos, se evidenció un aumento en el número de picos detectados en el extracto, lo cual sugiere una selectividad reducida de la mezcla para el analito de interés o una posible degradación de este. A partir de la suposición de la posible degradación de analito, se ajustó el pH de la fase móvil, pues se identificó la importancia de mantener un entorno ácido que estuviese por debajo del pKa del AS, ya que de esta manera se protonan los grupos ácidos del analito de interés, transformándolos en sus formas no ionizadas. Como resultado, la forma protonada se vuelve más hidrofóbica y, por ende, interactúa de manera más efectiva con la fase estacionaria apolar, facilitando su retención en la columna cromatográfica y permitiendo una mejor separación de otros compuestos en la muestra. Tras considerar estos factores y obtener mejores resultados, se determinó que la mezcla más adecuada consistía en agua acidificada con ácido fórmico al 1% (pH 2,67) y acetonitrilo.

Tabla 1. Condiciones de gradientes de flujo y fase móvil establecidos (Fuente: Elaboración propia).

	Ensayo sin gradiente C8	**Ensayo con gradientes C8**
Fase Móvil	Agua H-COOH (1%): Acetonitrilo	
Gradiente de fase móvil	No aplica	0 - 2,9 min: 100 : 0 2,9 - 3.7 min: 90 : 10 3,7 - 15 min: 80 : 20
Gradiente de flujo	No aplica	0 - 4,5 min: 0,4 mL/min 4,5 - 15 min: 0,8 mL/min
Tiempo de retención A.S	3,648	2,622
Tiempo de retención C.D	4,614	5,032
Factor de selectividad (*a*)	1,32	2,18

C.D = compuesto desconocido.

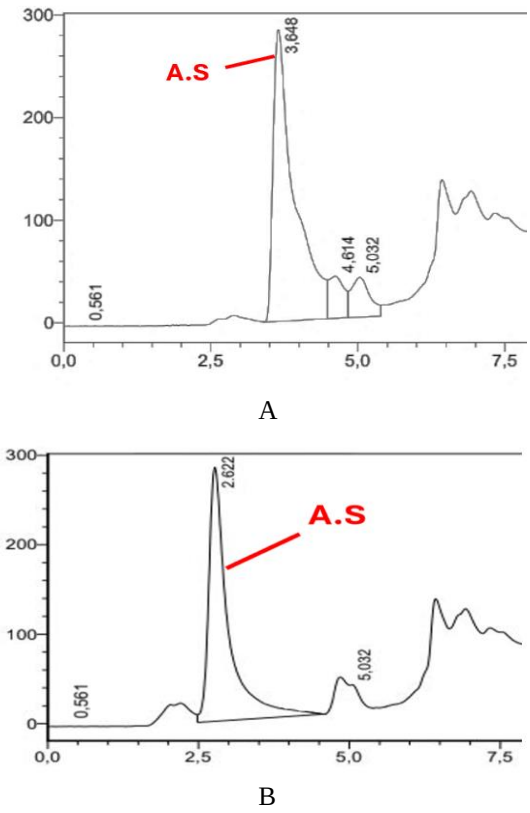


Fig. 4: A) Cromatograma con la columna C8 sin gradiente y B) Cromatograma con la columna C8 con gradiente.

Para la selección de la columna, los ensayos preliminares se realizaron utilizando una fase móvil de agua:ACN (80:20) en ambas columnas. Para la columna C8, se obtuvo un tiempo de retención de 3,648 min para el AS y de 4,614 min para el compuesto desconocido 1(figura 4), con un factor de selectividad de 1,32 y 1258 platos teóricos (tabla 1).

Selección de la modalidad de gradiente de flujo y fase móvil

La selección de la columna cromatográfica se basó en las propiedades fisicoquímicas del AS, principalmente en su solubilidad en agua y polaridad que es bastante alta, teniendo un log p de -1,7. De tal forma, teniendo en cuenta las propiedades del AS, se determinó que una columna C18 como opción para rea-

lizar el desarrollo del método debido a que poseen una combinación de propiedades fisicoquímicas favorables, como una larga cadena alquilo C18 que las hace altamente hidrofóbicas, grupos metilo terminales que les otorgan estabilidad química y una superficie de sílice modificada que las vuelve compatibles con solventes apolares, lo que permite retener compuestos de baja polaridad en la columna y lograr una mejor separación frente a los compuestos polares (Rubinson, 2000)[10]. Sin embargo, al comenzar a realizar las pruebas preliminares con el extracto del fruto del *Cotoneaster pannosus*, se presentó una gran dificultad al separar los picos presentados en el mismo tiempo de retención que el AS. Por lo tanto, a pesar de realizar pruebas con diferentes proporciones de fase móvil, flujos y temperaturas, se optó por realizar un cambio en la polaridad de la columna hacia una columna C8.

La determinación de trabajar con una columna C8 se debe a que en la literatura se describe que el extracto acuoso del fruto del *Cotoneaster pannosus* contiene una gran cantidad de polifenoles y compuestos polares, con estructuras y propiedades muy similares a las del AS. Por ende, al aumentar la polaridad de la columna, el coeficiente de partición que se genera entre el analito disuelto en la fase móvil y la fase estacionaria es mayor, lo que permite una mejor y más adecuada separación de compuestos polares que son muy similares (Quattrocchi et al., 1992)[11].

Sin embargo, a pesar de haber mejorado la resolución del pico del AS al realizar el cambio de columna, este se seguía encontrando solapado por los picos de otros compuestos con tiempos de retención similares. Por tal motivo, se optó por realizar una rampa de gradientes de fase móvil y de flujo con el objetivo de optimizar al máximo la separación del AS de los demás compuestos que se encontraban en la matriz compleja del *Cotoneaster pannosus*. Estas variaciones de la fase móvil y el flujo conforme se desarrollaba la corrida cromatográfica permitieron que durante los 0 minutos y 2,9 minutos, donde se utilizó una composición de fase móvil de 100% de agua acidificada, salieran los compuestos más polares de la matriz, entre ellos el AS. Posteriormente, se fue disminuyendo la fuerza del solvente, al aumentar la proporción del modificador orgánico acetonitrilo en la fase móvil, permitiendo así que los demás compuestos de polaridad intermedia y baja presenten tiempos de retención diferentes al tiempo de retención del AS. Por esta razón la fase móvil consistió en agua (HCOOH 1%, pH 2,67) y acetonitrilo (ACN) en elución por gradiente (0 –2,9 min, 100:0; 2,9–3,7 min, 90:10; 3,7–15 min, 80:20), como se demuestra en la tabla 1. El flujo se ajustó de forma programada: 0,4 mL/min durante los primeros 4,5 min y 0,8 mL/min hasta completar 15 min de corrida. Bajo estas condiciones, el tiempo de retención del ácido shikímico (AS) fue de 2,622 min.

A partir de este cambio, fue posible evidenciar una mayor separación del pico del AS frente al de otros compuestos, logrando así obtener una separación eficiente. Adicionalmente, al comparar los valores del factor de selectividad (a), se evidencia que este valor aumentó de 1,32 a 2,18 al implementar los gradientes en el método cromatográfico, cumpliendo así con el objetivo de optimizar al máximo la separación del AS bajo las condiciones descritas anteriormente. Para confirmar la especificidad bajo estas condiciones, se realizó un estudio de adición de estándar a la matriz del extracto, como se observa en la figura 5. Se observó que el área del pico correspondiente al AS aumentó proporcionalmente a la cantidad de estándar adicionado, mejorando y manteniendo la simetría, sin presentar hombros ni picos adicionales. Esto permitió verificar la ausencia de co-elución con otros metabolitos y asegurar la identificación inequívoca del analito en la muestra compleja.

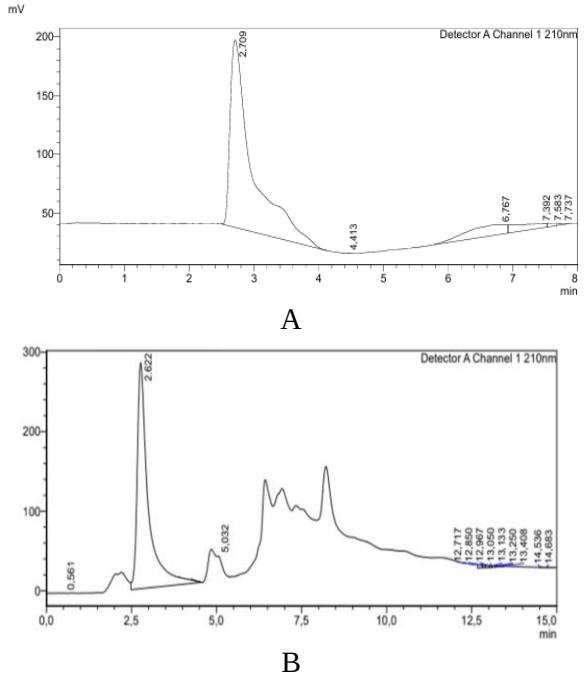


Fig. 5: Cromatogramas resultantes del uso de gradiente y adición patrón.

Evaluación del desempeño analítico del método

Linealidad: se realizó una curva de calibración por el método de estándar externo, para lo cual se prepararon ocho soluciones estándar de AS con concentraciones correspondientes a 0; 200; 400; 600; 800; 1200; 1500 y 1800 ppm a partir de la solución stock. Con los resultados arrojados se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados, como se muestra en la figura 6.

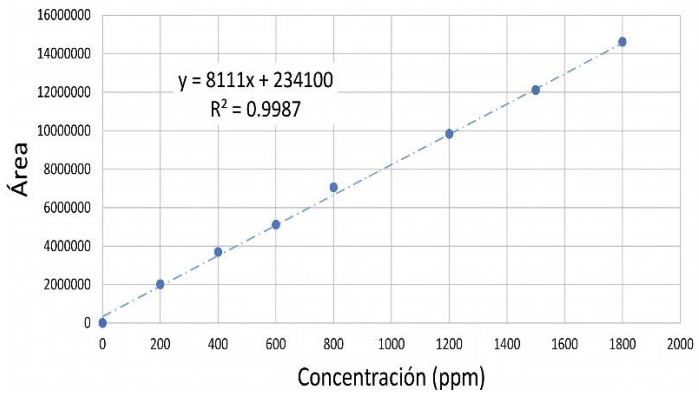


Fig. 6: Curva de calibración para la evaluación de la linealidad.

Se evaluó la linealidad del método mediante la curva de calibración, se observa una tendencia lineal entre las variables, en el intervalo de concentración comprendido entre 0 ppm y 1800 ppm (Ahumada et al., 2023)[12]. A partir de la gráfica se detecta un punto atípico en la regresión; no obstante, mediante la prueba de descarte de datos de Dixon se confirma que este valor no debe ser eliminado (tabla 2).

Tabla 2. Test de Dixon para el rechazo de puntos anómalos.

Recorrido	Divergencia	Q calculada	Q crítica[1]	Resultado
12608844	1942700	0,154	0,634	No se rechaza

[1] 99% de confianza

Dado que algunos autores consideran que el coeficiente de correlación no es el parámetro más apropiado para la determinación de linealidad, se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA), el cual permite validar que el modelo de regresión lineal se ajusta de manera significativa a los datos. Tras el análisis de los resultados (tabla 3), se observa que el valor p obtenido en la prueba fue inferior a 0,05; por lo que se rechaza Ho y se confirma una diferencia estadísticamente significativa entre el área y la concentración del patrón de AS, con un nivel de confianza del 95% (Sahu et al., 2028)[13].

Una vez demostrado que el modelo seleccionado es significativo y no hay desviaciones en la linealidad, se evaluó la significancia de la pendiente de la ecuación de la recta. Para tal fin, se usa una prueba t (tabla 4), mediante la cual se rechaza la hipótesis nula (Ho: 1 = 0), lo cual establece que la pendiente es significativamente diferente de cero, dado que t calculada > t crítica.

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA).

Fuente de error	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	$F_{calculado}$	$F_{crítico}$	Valor p
Entre las muestras	1,86E+14	1	1,86E+14	14,4	4,60	0,002
Dentro de las muestras	1,80E+14	14	1,29E+13			
Total	3,66E+14	15	-	-	-	-

Tabla 4. Prueba t de student de la pendiente.

Variable	*t* calculada	*t* crítica
Pendiente β_1	74,5	1,89

Exactitud

Se determinó el porcentaje de recuperación en tres niveles de concentración de 80%, 100% y 120% a partir de una solución estándar de 25 ppm (tabla 5).

La homogeneidad de varianzas se verificó mediante el test de Cochran, obteniendo un valor G calculado de 0,826, el cual es inferior al G crítico (0,871) para un nivel de confianza del 99%.

La recuperación hace referencia a la relación entre la cantidad medida de analito y la cantidad añadida de muestra, expresada como porcentaje. En otras palabras, la recuperación proporciona una estimación del error sistemático y puede tener valores superiores al 100% (errores positivos) o inferiores al 100% (errores negativos) (Sujata-Umakant et al., 2023)[14]. En este caso, el porcentaje de recuperación para el AS fue de 100,1% ± 3,6, con un valor de %RSD de 1,0% (tabla 5), el cual es significativamente inferior al criterio establecido (% RSD < 2). Este valor permite confirmar que el método analítico cumple con el parámetro de exactitud, ya que el porcentaje de recuperación se encuentra dentro del rango de especificación del 95,0% al 105,0%, establecido por la ICH Q2 (Raheem, 1998)[15]. Mediante el test de Cochran, se rechaza la hipótesis alternativa (Ha: $\sigma 12 \neq \sigma 22 \neq \sigma 32$) ya que G calculado < G crítico. Con esta evidencia estadística, se concluye que los niveles de concentración del 80%, 100%, y 120% no inciden en el porcentaje de recuperación del AS, manteniendo una variabilidad homogénea en el rango de concentraciones, evaluado con un nivel de confianza del 95% (Sabir et al., 2013)[16]. Estos resultados confirman que no existen diferencias significativas entre las varianzas de las muestras analizadas, cumpliendo así con el supuesto de homocedasticidad necesario para el análisis de regresión.

Tabla 5. Determinación del porcentaje de recuperación para 25 ppm.

Concentración (%)	% Recuperación			Media	SD	%RSD
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3			
80	105,7	102,0	103,1	103,6	1,9	1,8
100	93,5	94,8	94,4	94,2	0,7	0,7
120	102,0	102,2	103,0	102,4	0,5	0,5

Precisión

La precisión fue calculada con el coeficiente de variación a partir de la repetibilidad y la precisión intermedia.

Repetibilidad

Se preparó una solución estándar de AS de 75 ppm a partir de la solución stock y se inyectó en el cromatógrafo en el mismo día y por el mismo analista. A partir de los cromatogramas, se determinó el tiempo de retención y área, con el fin de calcular la media aritmética ($\bar{x}$), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) experimental. La repetibilidad del método se evaluó mediante cinco inyecciones consecutivas (n=5), obteniendo un tiempo de retención promedio de 2,622 min y un área promedio de 6,18 x 10^7 unidades de área con una precisión instrumental excelente, reflejada en un % CV de 0,22 %.

Precisión intermedia

Se preparó una solución estándar de 75 ppm a partir de la solución stock por dos analistas diferentes en dos días diferentes.

La precisión se expresa en términos de dispersión, generalmente por desviación estándar y desviación estándar relativa, y depende de las condiciones de repetibilidad y precisión intermedia en las que se ejecute el estudio (Dagron, 2014)[17].

Tabla 6. Datos primarios para determinar la precisión intermedia (Fuente: Elaboración propia).

Repetición	tR (min) (Analista 1)	Área (Analista 1)	tR (min) (Analista 2)	Área (Analista 2)
1	2,709	3713072	2,683	4101227
2	2,705	3779918	2,697	4137307
3	2,702	3773037	2,690	4081131
Promedio ($\bar{x}$)	2,705	3755342	2,690	4106555
Desviación (s)	0,004	36769	0,007	28464
% CV	0,130	0,979	0,260	0,693

La precisión en términos de repetibilidad hace referencia a la variación del método en condiciones donde los resultados de medición son obtenidos sobre muestras de ensayo idénticas. En este contexto, este parámetro fue evaluado el mismo día, en el mismo laboratorio, por el mismo analista y utilizando el mismo cromatógrafo.

De acuerdo con la guía ICH Q2, el CV no debe exceder el 3%, por lo que, al comparar los CV obtenidos con los valores reportados en la literatura, para los tiempos de retención y las áreas, es posible afirmar que, si bien el método es repetible en términos de áreas, no lo es en términos de tiempos de retención, debido a la presencia de un dato anómalo. En consecuencia, fue necesario efectuar el test de Dixon para el análisis de datos anómalos, con el cual se concluyó que el dato anómalo debía ser eliminado al ser Q calculada > Q crítica (tabla 7). Posterior a esta corrección, se obtuvieron resultados de CV para los tiempos de retención y las áreas de 0,212% y 0,224% respectivamente, cumpliendo así con los requerimientos dispuestos en la literatura, lo cual permite afirmar que el método cumple con los estándares de aceptabilidad normativos y es repetible en términos de áreas y tiempos de retención.

Tabla 7. Test de Dixon para el rechazo de puntos anómalos.

Parámetro	Recorrido	Divergencia	$Q_{calculada}$	$Q_{crítica}$[1]	Resultado
T. ret	1,07	1,06	0,9907	0,6980	Se rechaza
Área	1772251	12716	0,0072	0,6980	Se rechaza

[1]99% de confianza (Reed et al., 2002)[7]

Ahora bien, la precisión en condiciones intermedias evalúa la dispersión de los resultados utilizando el mismo método aplicado a la misma muestra, en el mismo laboratorio, pero bajo diferentes condiciones como distintos operadores, diferente equipamiento o distintos días (Torralvo, 2017)[18]. Por lo tanto, este parámetro hace referencia al grado de variación de los resultados dentro del mismo laboratorio, pero en días distintos y con analistas y equipos diferentes. En este contexto, este parámetro fue evaluado el mismo día, en el mismo laboratorio, utilizando el mismo cromatógrafo, pero por dos analistas diferentes.

Al igual que con la repetibilidad, se compararon los coeficientes de variación (CV) obtenidos por cada analista (tabla 6), los cuales fueron del 0,130% y 0,260%, demostrando ser ambos inferiores al límite establecido. Con el fin de verificar si existen diferencias significativas entre las medias de cada analista se empleó la prueba de Levene (tabla 8) al ser muestras independientes, con la cual se demostró que no existían diferencias entre las varianzas ya que F calculada < F crítico, por lo que no se rechaza la hipótesis nula (Ho: $\sigma 12 = \sigma 22$). Esto evidencia que, aunque pueden ocurrir pequeñas variaciones en las condiciones del método analítico, se puede lograr una cuantificación precisa.

Límite de detección (LD) y cuantificación (LQ)

Se realizó una curva de calibración por el método de estándar

Tabla 8. Prueba de Levene para análisis de varianzas.

Analista	Varianza	F calculada	*F* crítica
1	0,000009	0,015	7,71
2	0,00004		

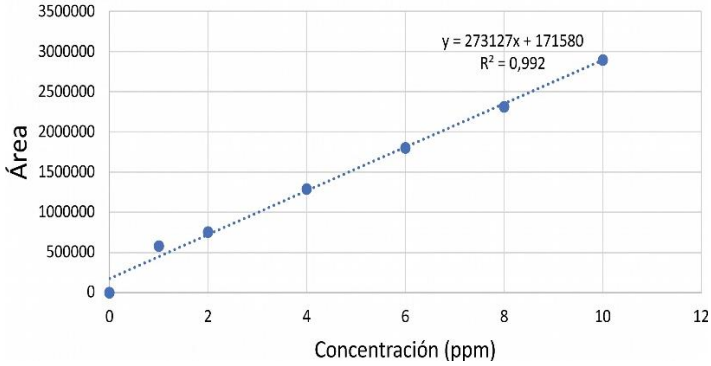


Fig. 7: Curva de calibración del límite de detección y cuantificación (Fuente: Elaboración propia).

externo, para lo cual se prepararon siete soluciones estándar de AS con concentraciones correspondientes a 0; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 y 10,0 ppm a partir de la solución stock. Con los resultados arrojados se realizó el análisis de regresión lineal por el método de mínimos cuadrados (figura 7).

Para la determinación de los limites se usó el error típico determinado con un valor de 102946,72

Eq.(1) límite de detección:

$$LD = \frac{3{,}3 \times \boldsymbol{Error\ típico}}{m} = \frac{3{,}3 \times 102946{,}72}{273127} = 1{,}24\ ppm \quad (1)$$

Eq. (2) límite de cuantificación:

$$LQ = \frac{10 \times \boldsymbol{Error\ típico}}{m} = \frac{10 \times 102946{,}72}{273127} = 3{,}76\ ppm \quad (2)$$

En un método que emplea detectores UV, garantizar la precisión en la detección de compuestos a concentraciones bajas supone un desafío debido a la disminución gradual de sensibilidad de las lámparas del detector con el tiempo, así como a las variaciones en el nivel de ruido según el fabricante del detector. Por tanto, es crucial establecer límites de detección y cuantificación que se puedan alcanzar con el método de prueba en todo momento (United States Pharmacopeial Convention (USP), 2020)[19].

Según la USP 43, el LOD se define como la menor concentración de una sustancia que puede ser detectada con certeza, pero

no necesariamente cuantificada bajo las condiciones del método. Por otro lado, el LOQ representa la mínima cantidad de analito que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud. Ambos parámetros se calcularon teóricamente teniendo en cuenta la pendiente, el intercepto y la desviación estándar residual obtenida en la regresión lineal de primer orden de la linealidad del sistema con un nivel de confianza del 95%, mediante las ecuaciones descritas en la sección anterior. De acuerdo con estos cálculos, se determinó que la concentración mínima detectable era de 1,24 ppm, indicando que el método no puede detectar el AS con precisión y exactitud por debajo de esta concentración. Por otro lado, la concentración mínima cuantificable fue de 3,76 ppm, que representa el valor mínimo que el método puede cuantificar de manera inequívoca. Estos valores LOD y LOQ junto con la pendiente de la curva de calibración, indican una notable sensibilidad del método analítico (figura 7). En consecuencia, se puede afirmar que es posible analizar el AS de forma exacta y precisa en muestras con concentraciones de este analito dentro del rango de linealidad establecido anteriormente (Ávila y Guevara-Pulido, 2020)[20].

Robustez

Se prepararon dos soluciones estándar de AS de 100 ppm a partir de la solución stock, y se inyectaron por triplicado al cromatógrafo en condiciones extremas, una con una fase móvil de nitrato de amonio 0,1 M a un pH de 8,74 y otra con una fase móvil de ácido fosfórico a un pH de 4,34; manteniendo constantes las demás condiciones cromatográficas definidas para el método (tabla 9).

Tabla 9. Datos primarios para determinar la robustez del método. (Fuente: Elaboración propia).

Ensayo	pH 4,34		pH 8,74	
	tR (min)	Área	tR (min)	Área
1	2,19	2003060	2,25	83538726
2	2,27	1994566	-	-
3	3,44	73204138	-	-

La robustez del método indica su capacidad para permanecer inalterado ante pequeñas pero deliberadas variaciones en ciertos parámetros, proporcionando una idea de la estabilidad del método. De tal modo, este parámetro indica qué tanto deben ser controlados los parámetros del método y permite detectar los factores que pueden conllevar a un método más reproducible.

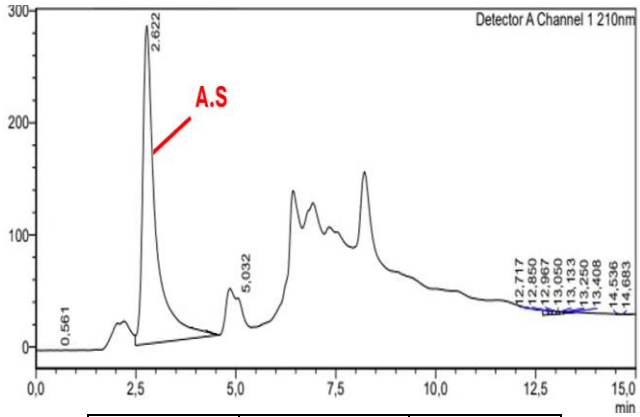
De acuerdo con lo anterior, se seleccionó el pH de la fase móvil como factor de ensayo para evaluar la robustez del método, debido a su capacidad para influir significativamente en la respuesta del sistema. Como se mencionó anteriormente, el pH de la fase móvil debe mantenerse por debajo del pka del AS (4,1) para garantizar la protonación de los grupos ácidos del compuesto, transformándolos en sus formas no ionizadas. Esto se debe a que la forma protonada (-COOH) los hace más hidrofóbicos, lo que facilita una interacción más efectiva con la fase estacionaria no polar. En este contexto, el método fue sometido a condiciones extremas en medios ácidos y básicos, con el fin de observar posibles interferencias del AS con los productos de degradación generados.

En medio ácido el pico del AS exhibe un tiempo de retención ligeramente prolongado (3,44 min) y una asimetría más notable. A pesar de tratarse de un medio ácido, el pH es mayor que el pKa del compuesto, lo que indica que el AS se encuentra parcialmente desprotonado y por lo tanto es más polar y propenso a interactuar con la fase estacionaria. Por otro lado, en medio básico se observa un incremento significativo en el tiempo de retención del AS (4,9 min) y un aumento en el ancho de base del pico. Esto se debe a que el AS es un ácido débil con grupos carboxílicos el cual puede ionizarse en un medio básico, adoptando una forma ionizada (-COO-). Además, este cambio puede alterar la solubilidad del analito en la fase móvil, resultando en una distribución desigual entre esta y la fase estacionaria, lo que afecta la forma del pico cromatográfico. Asimismo, puede generar interacciones adicionales con la columna, como la formación de puentes de hidrógeno o interacciones ión-dipolo, las cuales pueden modificar aún más la retención del analito y, en consecuencia, la forma del pico cromatográfico.

Se hace evidente que el pH no ejerce la misma influencia al aumentar o disminuir con respecto al valor nominal del método. Se observa que los parámetros cromatográficos se ven significativamente alterados en medio básico, lo que no permite determinar una separación y cuantificación del analito, como se observa en la tabla 9 donde no pudo cuantificarse de forma factible.

Cuantificación de AS en frutos de Cotoneaster pannosus por el método de estándar externo

La concentración de AS en el extracto del fruto se determinó analizando el área bajo la curva del pico en el cromatograma, como se muestra en la figura 8. Este análisis se basó en la ecuación de regresión lineal (Y = 7948,8X + 356956), derivada de la curva de calibración establecida durante la evaluación de la linealidad del método. Extrapolando el valor de la concentración de AS y resolviendo para x en la ecuación, se obtuvo una concentración de 50,4 ppm de AS.



tR (min)	Área	Altura
2,62	757956	43267

Fig. 8: Separación del AS presente en la matriz del fruto *Cotoneaster pannosus* (Fuente: Elaboración propia).

Aunque el pico del AS presentó un factor de asimetría cercano a 1.5 (figura 8), se garantizó la exactitud de la cuantificación mediante una integración uniforme de la línea base en todos los cromatogramas. El software LabSolutions® fue configurado con parámetros de detección de picos optimizados para asegurar que el área integrada fuera representativa y reproducible tanto en los patrones como en las muestras de *C. pannosus*, obteniendo así coeficientes de variación (CV) menores al 3%.

Al contrastar los niveles de ácido shikímico (AS) hallados en este estudio (50,4 ppm en el extracto) con la fuente convencional por excelencia, *Illicium verum* (anís estrellado), se evidencian marcadas diferencias cuantitativas. Autores como Cai *et al.* (2014) reportaron que el rendimiento de AS en *I. verum* mediante extracción asistida por ultrasonido oscila entre 70.000 ppm y 130.000 ppm en masa seca de fruto, valores sustancialmente superiores a los obtenidos en los frutos de *Cotoneaster pannosus*. Esta comparación directa confirma que *C. pannosus* presenta una concentración minoritaria del analito fitoquímico. No obstante, la consideración de esta especie como un recurso de interés para la demanda farmacéutica radica en su elevada disponibilidad geográfica, su carácter de especie abundante y la baja complejidad de su matriz de extracción. A diferencia de las fuentes convencionales, cuya compleja matriz de aceites esenciales y polifenoles suele requerir etapas de purificación exhaustivas, el extracto de *C. pannosus* presentó un perfil cromatográfico con baja interferencia de otros metabolitos. Esta característica, sumada a la optimización de una extracción asistida por ultrasonido a 50 °C, simplifica el rendimiento global del proceso analítico y de aislamiento. Por lo tanto, esta especie se puede considerar como una posible fuente alternativa viable, no por su densidad de analito, sino por la facilidad de su procesamiento y su amplia disponibilidad como recurso subutilizado.

Parámetros cromatográficos

Tiempo de retención y tiempo de retención corregido (tr′): el tiempo de retención corregido es el tiempo máximo que transcurre entre la inyección contemplada como el tiempo muerto, hasta la señal máxima o analizada dentro del cromatograma (Harris y Berenguer-Navarro, 2003)[21]. Se realizó la corrección del tiempo de retención del AS empleando como tiempo muerto el pico correspondiente al frente del solvente (figura 9), mediante la siguiente fórmula:

$$\boldsymbol{tr' = tr - tm}$$

$$\boldsymbol{tr' = 2,62\,min - 0,561\,min = 2,06\,min}$$

Factor de retención (k´): El factor de retención es una medida del tiempo de retención en unidades del tiempo muerto, que es el tiempo que precisa la fase móvil o un soluto no retenido para atravesar la columna. Se determinó el factor de capacidad por medio del cociente entre el tiempo de retención corregido y el frente del solvente, de la siguiente forma:

$$k' = \frac{tr'}{tm}$$

$$k' = \frac{2,06\,min}{0,561\,min} = 3,67$$

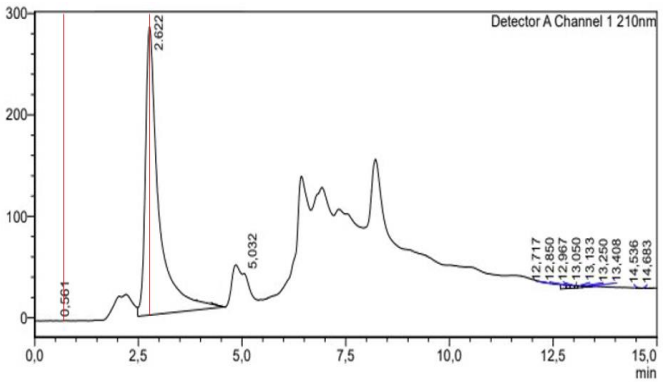


Fig. 9: Estimación del tiempo de retención corregido para el pico del extracto de AS.

Selectividad (α): el factor de selectividad es una medida del tiempo o el grado de separación entre los compuestos que tienen un tiempo de retención cercano al del analito (Ahuja y Dong, 2005)[22]. Este parámetro se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\alpha = \frac{tr'2}{tr'1} = \frac{5,030\,min - 0,561\,min}{2,622\,min - 0,561\,min} = 2,18$$

Número de platos teóricos (N): el número de platos teóricos e una medida cuantitativa de la eficiencia de la columna y está dado por la relación inversa entre el tiempo de retención del analito y la desviación estándar del ancho a la altura media del pico del analito (W0.5), como se ilustra en la figura 10. Este parámetro se determinó de la siguiente manera:

$$W0.5 = 0,14\,cm\ \frac{2,50\,min}{2,41\,cm} = 0,145\,min$$

$$N = 5,55 \times \left(\frac{t_R}{W0,5}\right)^2 = 5,55 \times \left(\frac{2,622\,min}{0,145\,min}\right)^2 = 1814,8$$

Resolución (R): teniendo presente que la resolución es el grado de separación de los componentes de una mezcla en un sistema cromatográfico[21]. Este parámetro se determinó de la siguiente manera:

$$R = \frac{1}{4} \times \sqrt{N} \times \left(\frac{(\alpha-1)}{\alpha} \times \frac{k'}{(k'+1)}\right)$$

$$R = \frac{1}{4} \times \sqrt{1814,8} \times \left(\frac{(2,17-1)}{2,17} \times \frac{3,67}{(3,67+1)}\right) = 4,51$$

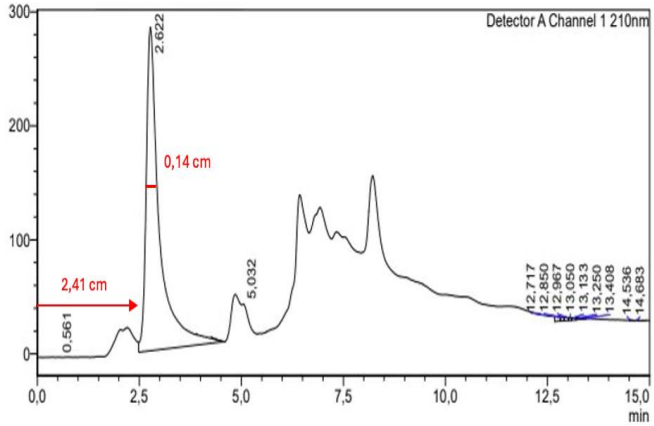


Fig. 10: Determinación del número de platos teóricos (Fuente: Elaboración propia)

Conclusiones

Se desarrolló y aplicó un método lineal, exacto, preciso y sensible para la detección y cuantificación de ácido shikímico presente en el extracto del fruto del arbusto *Cotoneaster pannosus* mediante cromatografía líquida de alta resolución, conforme a las directrices establecidas. Durante el proceso, se determinó que el agua es el solvente más eficaz para la extracción del ácido shikímico del fruto mediante el uso de ultrasonido, evidenciado por la gran intensidad del pico obtenido en el cromatograma del AS. Además, se establecieron las condiciones cromatográficas óptimas para separar eficientemente el ácido shikímico de la matriz vegetal compleja del fruto, superando algunos desafíos como la superposición de picos y la presencia del efecto de cola. Así mismo, se logró cuantificar el ácido shikímico en el fruto mediante el método de estándar externo, obteniendo una concentración de 50,4 ppm, lo que destaca el potencial del fruto como una fuente prometedora de dicho compuesto. Finalmente, debido a su selectividad, retención y alta resolución cromatográfica, este método se presenta como una alternativa eficiente y adecuada para futuros estudios de análisis del ácido shikímico en el fruto del *Cotoneaster pannosus*.

Agradecimientos

Se agradece al laboratorio de la Universidad El Bosque, Bogotá-Colombia por facilitar el equipamiento y los recursos técnicos necesarios para el análisis cromatográfico.

Referencias

Ahuja, S., & Dong, M. W. (2005). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC* (Vol. 6). Elsevier. https://doi.org/10.1016/S1571-5582(05)80050-9

Ahumada, D., Paredes, C., Abella, J., & González, I. (2023). *Validación de Métodos en Análisis Químico Cuantitativo* (Vol. 1). Colombia.

Ávila, E. L., & Guevara-Pulido, J. (2020). Development of a RP-HPLC Method for Separating and Quantifying Muscimol in *Amanita muscaria*. *Journal of Chemistry*, 2020, Artículo 8859998. https://doi.org/10.1155/2020/8859998

Borah, J. C. (2015). Shikimic acid: A highly prospective molecule in pharmaceutical industry. *Current Science*, 109(9), 1672–1679. https://doi.org/10.18520/v109/i9/1672-1679

Cai, M., Luo, Y., Chen, J., Liang, H., & Sun, P. (2014). Optimization and comparison of ultrasound-assisted extraction and microwave-assisted extraction of shikimic acid from Chinese star anise. *Separation and Purification Technology*, 133, 375–379. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2014.06.064

Dagron, S. (2014). Die International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). En *Handbuch Ethik und Recht der Forschung am Menschen* (pp. 541–545). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-35099-3_86

Harris, D. C., & Berenguer Navarro, V. (2003). *Análisis químico cuantitativo*. Reverté.

International Council for Harmonisation (ICH). (2023). *ICH Q2(R2) Guideline on validation of analytical procedures*. European Medicines Agency. https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures

Javanian, M., Barary, M., Ghebrehewet, S., Koppolu, V., Vasigala, V. K. R., & Ebrahimpour, S. (2021). A brief review of influenza virus infection. *Journal of Medical Virology*, 93(8), 4638–4646. https://doi.org/10.1002/jmv.26990

Les, F., Cásedas, G., Moliner, C., Valero, M. S., & López, V. (2017). Chemical constituents, radical scavenging activity and enzyme inhibitory capacity of fruits from *Cotoneaster pannosus* Franch. *Food & Function*, 8(5), 1775–1784. https://doi.org/10.1039/C7FO00330G

National Library of Medicine. (2024). *Shikimic acid | C7H10O5 | CID 8742 - PubChem*. PubChem. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Shikimic-acid

Quattrocchi, O., Abelaira, S., & Laba, R. F. (1992). *Introducción a la HPLC*. Artes Gráficas Farro.

Raheem, Z. (1998). Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry. *Choice Reviews Online*, 35(06), 35-3308. https://doi.org/10.5860/choice.35-3308

Reed, G. F., Lynn, F., & Meade, B. D. (2002). Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(6), 1235–1239. https://doi.org/10.1128/CDLI.9.6.1235-1239.2002

Rubinson, K. A. (2000). *Análisis instrumental*. Alhambra.

Sabir, A. M., Moloy, M., & Bhasin, P. S. (2013). HPLC Method Development and Validation: a Review. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(4), 39–46. https://doi.org/10.7897/2230-8407.04407

Sahu, P. K., Ramisetti, N. R., Cecchi, T., Swain, S., Patro, C. S., & Panda, J. (2018). An overview of experimental designs in HPLC method development and validation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 590–611. https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.006

Saxena, R. K., Tripathi, P., & Rawat, G. (2012). Pandemism of swine flu and its prospective drug therapy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(12), 3265–3279. https://doi.org/10.1007/s10096-012-1716-5

Sujata Umakant, M. V., & Darwin, R. (2023). QbD Approach to Analytical RP-HPLC Method Development and Validation of Erlotinib in Pharmaceutical Dosage Form. *Journal of Propulsion Technology*, 44(5), 5012–5020.

Torralvo, J. J. (2017). *Validación de un método químico analítico de HPLC en R* [Tesis de grado, Universidad de Sevilla].

Trapalis, C. C., Keivanidis, P., & Kordas, G. (2004). *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* (Vol. 5). Wiley. https://doi.org/10.1002/0471238961

United States Pharmacopeial Convention. (2020). *United States Pharmacopoeia, USP 43-NF 38*. Rockville.

www.saber.ula.ve/avancesenquimica
Avances en Química, 21(2), 35-42 (2026)
Artículo científico

Interacciones electrónicas entre beauvericina y residuos cuticulares de *Leptinotarsa decemlineata*: un análisis cuántico basado en el coeficiente de transferencia de electrones

José Arturo Olguín Rojas, Manuel González Pérez*

Universidad Tecnológica de Tecamachalco, Avenida Universidad Tecnológica 1, 75483 Tecamachalco, Puebla, México.

(*) m.gonzalez.perez@personal.uttecam.edu.mx

Recibido: 06/05/2026 **Revisado**: 24/06/2026 **Aceptado**: 31/08/2026

Resumen

La beauvericina (BVC) es una enniatina con actividad insecticida cuyo mecanismo molecular de interacción con proteínas cuticulares permanece insuficientemente caracterizado. En este estudio se aplicaron la química cuántica semi-empírica (PM3) y el coeficiente de transferencia de electrones (CTE) para evaluar la reactividad electrónica entre BVC y los residuos de aminoácidos (AA) de la proteína cuticular AYA50038 de *Leptinotarsa decemlineata*. El análisis de orbitales de frontera, de la banda prohibida y del potencial electrostático reveló que la BVC actúa predominantemente como aceptor de electrones frente a AA polares y cargados (Glu, Asp, Gln, Asn y Ser), generando pozos cuánticos profundos que favorecen la estabilización del complejo. Esta afinidad electrónica sugiere que la toxina se retiene preferentemente en microambientes cuticulares polares, lo que facilita su penetración y contribuye a su actividad insecticida. Los resultados proporcionan una base mecanística para el diseño de estrategias biotecnológicas orientadas al control de *L. decemlineata*.

Palabras clave: beauvericina; química cuántica; CTE; aminoácidos; *Leptinotarsa decemlineata*.

Abstract

Electronic interactions between beauvericin and cuticular residues of Leptinotarsa decemlineata: a quantum analysis based on the Electron Transfer Coefficient. Beauvericin (BVC) is an enniatin with insecticidal activity whose molecular mechanism of interaction with cuticular proteins remains insufficiently characterized. In this study, semi-empirical quantum chemistry (PM3) and the Electron Transfer Coefficient (ETC) were applied to evaluate the electronic reactivity between BVC and the amino acid (AA) residues of the cuticular protein AYA50038 from *Leptinotarsa decemlineata*. Frontier orbital analysis, band gap, and electrostatic potential revealed that BVC acts predominantly as an electron acceptor toward polar and charged AAs (Glu, Asp, Gln, Asn, and Ser), generating deep quantum wells that favor complex stabilization. This electronic affinity suggests that the toxin is preferentially retained in polar cuticular microenvironments, facilitating its penetration, and contributing to its insecticidal activity. These results provide a mechanistic basis for the design of biotechnological strategies to control *L. decemlineata*.

Keywords: Beauvericin, Quantum chemistry, ETC (Electron Transfer Coefficient), Amino acids, *Leptinotarsa decemlineata.*

Introducción

La beauvericina (BVC) es un metabolito secundario de gran relevancia en la micología y la biotecnología agrícola, producido principalmente por el hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana*, así como por diversas especies del género *Fusarium* (Caloni et al., 2020; Wang et al., 2021). Desde una perspectiva estructural, la BVC se clasifica como un hexadepsipéptido cíclico, cuya arquitectura molecular está definida por la alternancia sistemática de tres residuos de D-hidroxiisovalerilo y tres de N-metilfenilalanilo (Caloni et al., 2020; Ulusoy et al., 2026). Esta configuración química no solo le confiere una notable estabilidad, sino que también determina su carácter fuertemente lipofílico. Debido a su estructura flexible y su capacidad de autoensamblaje, la BVC actúa como un ionóforo eficaz. Este mecanismo le permite integrarse en las bicapas lipídicas de las membranas celulares, facilitando el transporte transmembrana de cationes monovalentes y bivalentes. Al actuar como transportador de carga, la BVC altera drásticamente la homeostasis iónica celular, provocando gradientes electroquímicos anómalos que comprometen la viabilidad de la célula objetivo (Caloni et al., 2020; Al Khoury et al., 2021).

El interés científico por la BVC ha crecido exponencialmente debido a su versatilidad biológica. Se ha documentado que posee propiedades insecticidas, antifúngicas y antivirales, así como una potente actividad anticancerígena (Caloni et al., 2020; Al Khoury et al., 2024). A nivel celular, su capacidad para inducir citotoxicidad se manifiesta mediante la activación de vías de muerte celular programada y la inducción de estrés oxidativo. Estudios recientes en modelos de cultivo neuronal humano han evidenciado estos efectos (Moyano-López et al., 2025), al igual que investigaciones en células epiteliales intestinales de peces, donde la integridad de la barrera mucosa se ve

comprometida (Dayeh et al., 2025). Además de su toxicidad directa, la BVC interfiere en procesos reproductivos y oncológicos complejos. Se ha observado que puede interrumpir la transición de la fase G2/M del ciclo celular y afectar la maduración meiótica en ovocitos de mamíferos (Kim et al., 2025). En el ámbito de la oncología, destaca su capacidad para modular la apoptosis mediada por mitocondrias y suprimir fenotipos asociados a la transición epitelio-mesénquima (EMT) en líneas celulares de cáncer colorrectal, lo que sugiere un potencial terapéutico que requiere una mayor exploración (Kwon y Jung, 2026).

Uno de los mayores aportes de la BVC a la agricultura moderna es su papel en la neutralización de mecanismos de resistencia. En artrópodos, la resistencia a menudo depende de los transportadores de casete de unión a ATP (ABC), responsables del eflujo de xenobióticos. Se ha demostrado que la BVC puede potenciar la eficacia de otros plaguicidas al inhibir estas proteínas de transporte, evitando que el insecto expulse el agente tóxico (Al Khoury et al., 2021). En modelos específicos como *Bombyx mori*, la toxina modula las respuestas inmunes y altera significativamente los perfiles transcriptómicos, debilitando las defensas biológicas del organismo (Fan et al., 2026). Asimismo, su aplicación directa ha mostrado una eficacia notable contra *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la papa), una plaga de gran impacto económico y de alta capacidad para desarrollar resistencia a insecticidas convencionales (Ulusoy et al., 2026).

Para comprender estos fenómenos biológicos, es necesario analizar la interacción de la BVC a escala atómica. Estudios estructurales avanzados han revelado que su capacidad ionófora depende de interacciones específicas cation-π y rutas de hidratación selectivas para iones como Ba^{2+} y Na^{+} (Kamioka et al., 2025; Vo et al., 2025). En este sentido, la química computacional, mediante herramientas de acoplamiento (docking) y de dinámica molecular, permite dilucidar estas interacciones (Al Khoury et al., 2024; Al Khoury et al., 2022). Sin embargo, el mecanismo de acción está solo parcialmente aclarado y puede variar según el organismo. Aunque tradicionalmente se estudian las interacciones con proteínas globulares completas, la reactividad fundamental se da en el contacto con residuos específicos de aminoácidos (Al Khoury et al., 2022; Zhang et al., 2021). Bajo esta premisa, el método propuesto por González-Pérez (2017a) introduce el Coeficiente de Transferencia de Electrones (CTE) para evaluar la probabilidad de interacciones redox entre micotoxinas y biomoléculas (González-Pérez, 2017b). El CTE es un descriptor derivado de la química cuántica que actúa como un análogo de la impedancia electrónica molecular. Para derivar este coeficiente, es necesario calcular las energías de los orbitales frontera: el HOMO (orbital molecular ocupado de mayor energía) y el LUMO (orbital molecular no ocupado de menor energía), así como la brecha de banda (BG) y el potencial electrostático (EP).

En este estudio se emplea este marco teórico para evaluar la afinidad electrónica de la BVC por entornos aminoacídicos específicos de la cutícula de *L. decemlineata*. Para ello, se seleccionó la proteína cuticular parcial AYA50038, considerada un modelo estructural representativo de este insecto plaga. Su perfil aminoacídico permite examinar directamente los principales microambientes polares e hidrofóbicos con los que la micotoxina interactúa durante el contacto y la penetración cuticular. Este enfoque ofrece una base científica para diseñar estrategias de control biotecnológico más eficientes.

Metodología

La composición aminoacídica de la proteína cuticular AYA50038 se obtuvo del Protein Data Bank, permitiendo un análisis preciso de la interacción entre la BVC y los residuos de aminoácidos (AA) (Al Khoury et al., 2024). Para el análisis de la BVC y las biomoléculas, se utilizó el software HyperChem (versión 8.0.1). El estudio empleó la Teoría Hart Three Fock con sus métodos semi-empíricos derivados, que facilitan el cálculo de propiedades electrónicas en moléculas de tamaño medio con una alta eficiencia computacional. La BVC se optimizó bajo los mismos parámetros. Posteriormente se construyeron complejos binarios.

Para la construcción de los complejos binarios, cada par molecular se orientó según un criterio geométrico basado en la interacción electrónica más probable. En todos los casos, el lóbulo de mayor densidad electrónica del orbital HOMO de la especie donadora se alineó con la región de mayor contribución del orbital LUMO de la especie aceptora, de modo que la aproximación inicial reflejara adecuadamente la dirección preferente de la transferencia electrónica en sistemas no covalentes. Esta orientación previa es particularmente relevante debido a la fuerte dependencia de las energías de frontera y del potencial electrostático con la distancia y del arreglo espacial de las moléculas. Una vez definidos los pares (incluidas las combinaciones entre los 20 aminoácidos, así como las interacciones de la BVC en su roles reductor y oxidante), todas las estructuras fueron sometidas a una optimización geométrica completa mediante el método semi-empírico PM3, lo que garantizó que las energías reportadas correspondieran a configuraciones estacionarias.

El método SE-PM3, utiliza parámetros ajustados para replicar propiedades moleculares con un equilibrio óptimo entre precisión y bajo costo computacional. Los parámetros de cálculo específicos aplicados en HyperChem fueron: Opciones Semi-empíricas, Carga y Espín. Carga Total: 0 (Neutra). Multiplicidad de espín: 1 (singlete). Control SCF (campo autoconsistente): Límite de convergencia de 0,01 y de interacción de 1000. La optimización de la geometría molecular se realizó mediante el algoritmo de Polak-Ribiére, un método de minimización de energía ampliamente utilizado para encontrar la conformación más estable de la molécula.

Tras la optimización, se calcularon los siguientes descriptores de reactividad electrónica, esenciales para la aplicación posterior de la teoría del CTE. Los AA fueron modelados molecu-

larmente. Para evaluar todas las interacciones de oxidación-reducción posibles, siguiendo un enfoque combinatorio hamiltoniano. El CTE, propuesto por González-Pérez (2017a), se utilizó como índice principal para inferir la probabilidad de oxidación-reducción y la reactividad molecular. El CTE se calcula directamente a partir de los descriptores BG y EP. Un valor de CTE alto indica una mayor inestabilidad molecular y una alta propensión a participar en reacciones de transferencia de electrones. Este índice permitió realizar un análisis dicotómico para cuantificar y clasificar la afinidad de oxidación-reducción de la BVC en interacción con AA.

$$BG = |HOMO - LUMO| \quad \text{eq. 1}$$

$$EP = |E_- - E_+| \quad \text{eq. 2}$$

$$CTE = \frac{BG}{EP} \quad \text{eq. 3}$$

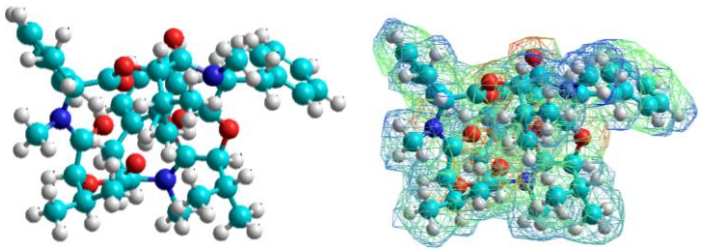
La brecha de energía (*BG*) se define como la diferencia absoluta entre las energías de los orbitales frontera y constituye un indicador directo de la estabilidad y la reactividad química. Este valor describe la transferencia electrónica intermolecular bajo la condición de que el HOMO se localice en el donador y el LUMO en el aceptor. En términos energéticos, representa la energía necesaria para que un electrón se transfiera de una molécula a otra; por tanto, valores menores de *BG* se asocian con una mayor reactividad. El Potencial Electrostático (*EP*) representa la diferencia entre el valor del potencial electrostático más negativo (*E*-) y más positivo (*E*+) de la molécula. Este parámetro se visualizó mediante un mapa de isosuperficie 3D para identificar sitios nucleofílicos y electrofílicos. Un valor de CTE elevado indica inestabilidad molecular y una alta propensión a participar en reacciones de transferencia de electrones, lo que facilita un análisis dicotómico para clasificar la reactividad de la BVC frente a los entornos proteicos de *L. decemlineata*.

En este trabajo se empleó el método semi-empírico PM3 para evaluar las interacciones binarias entre la BVC y los aminoácidos. La elección de este método responde al marco conceptual adoptado, basado en la Teoría del Electrón de Valencia (TEV), cuyo enfoque se centra en la redistribución electrónica entre orbitales de valencia y en la transferencia HOMO→LUMO como descriptor fundamental del comportamiento redox. En este contexto, los métodos semi-empíricos derivados de TEV resultan particularmente adecuados porque no incorporan explícitamente la correlación electrónica interna, lo que permite analizar de manera directa la contribución de los orbitales de valencia al proceso de transferencia electrónica.

Por el contrario, los métodos basados en la Teoría del Funcional de la Densidad (DFT) sí incluyen correlación electrónica interna, lo cual es altamente valioso para estudios de energía absoluta, superficies de potencial y caracterización detallada de interacciones no covalentes. Sin embargo, dicha correlación introduce efectos que no forman parte del formalismo de TEV, y que pueden interferir con la interpretación directa de los parámetros de transferencia electrónica utilizados en este estudio. Por lo cual el método semi-empírico PM3 constituye una herramienta coherente con el objetivo central del trabajo: analizar tendencias relativas del coeficiente de transferencia de electrones en un modelo estrictamente basado en orbitales de valencia. La comparación con métodos DFT se reconoce como una línea futura de validación externa, pero no afecta la interpretación interna del modelo empleado.

Resultados y discusión

La figura 1 muestra dos representaciones complementarias de la molécula de Bauvericina (BCV), un depsipéptido cíclico perteneciente a la familia de las enniatinas. En la imagen de la izquierda se presenta el modelo molecular en formato de bolas y cilindros, generado con el software Hyperchem, lo que permite visualizar la arquitectura cíclica característica y la disposición tridimensional de los átomos que conforman sus unidades repetitivas. Esta representación facilita la identificación de los enlaces peptídicos modificados y de los grupos funcionales que participan en la conformación global del anillo. En la imagen de la derecha se observa el mapa electrostático calculado a partir de la densidad electrónica, en el que se representan las regiones de potencial electrostático negativo y positivo mediante superficies coloreadas, junto con los valores extremos del potencial expresados en eV/a_0.



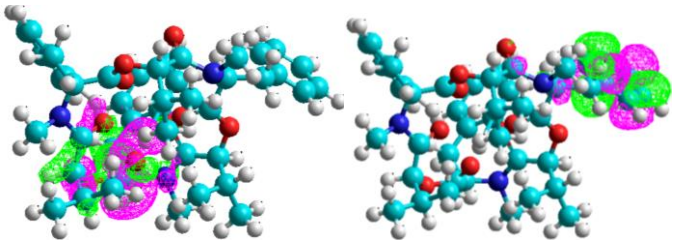
(a) **(b)**

Fig. 1: Representaciones estructurales y electrónicas de la beauvericina (BVC). a) beauvericina (BVC). Diseño de bolas y cilindros con el simulador Hyperchem. b) BVC. Mapa electrostático, densidad electrónica, potencial electrostático. -d = 0139 eV/a_0; +d = +0,187 eV/a_0. El modelo de bolas y cilindros (izquierda) muestra la conformación cíclica del depsipéptido, mientras que el mapa electrostático (derecha) ilustra la distribución de potenciales negativos y positivos alrededor de la molécula. Ambas visualizaciones permiten relacionar la geometría molecular con su patrón de densidad electrónica.

La comparación entre ambas representaciones proporciona información estructural y electrónica relevante para comprender el comportamiento fisicoquímico de la BVC. La geometría cíclica rígida observada en el modelo molecular sugiere una conformación relativamente estable, lo que coincide con la capacidad de la BVC para interactuar de manera específica con membranas biológicas y formar complejos con cationes. El mapa electrostático revela zonas de alta densidad electrónica asociadas principalmente a los átomos electronegativos del anillo, las cuales podrían actuar como sitios preferenciales de coordinación metálica o de interacción con grupos polares. Por el contrario, las regiones de potencial positivo indican superficies susceptibles a interacciones con nucleófilos o dominios cargados negativamente en proteínas. En conjunto, estas representacio-

nes permiten inferir cómo la distribución electrónica y la conformación espacial de la BVC contribuyen a sus propiedades bioactivas, incluyendo su capacidad ionófora y su actividad citotóxica reportada en diversos sistemas biológicos.

La figura 2, presenta los orbitales de frontera de la BVC, mostrando a la izquierda el orbital molecular ocupado de mayor energía (HOMO) y a la derecha el orbital molecular desocupado de menor energía (LUMO). En ambas representaciones, la estructura tridimensional del depsipéptido se visualiza mediante esferas de colores que identifican los distintos átomos, mientras que las regiones orbitales se muestran como superficies en malla coloreadas en verde y magenta, correspondientes a los signos de la función de onda. El HOMO aparece distribuido principalmente sobre determinados fragmentos del anillo peptídico, mientras que el LUMO se localiza en regiones distintas, evidenciando una separación espacial entre ambos orbitales.



(a) **(b)**

Fig. 2: Orbitales de frontera de la beauvericina (BVC). a) BVC. HOMO -7,493794 eV. b) BVC. LUMO +0,3009026 eV. Visualización del HOMO y LUMO calculados para la BVC mediante análisis de orbitales moleculares. Las superficies isovalóricas muestran la distribución espacial de los coeficientes de la función de onda. El HOMO se localiza predominantemente sobre segmentos del anillo peptídico con mayor densidad electrónica, mientras que el LUMO se sitúa en regiones estructuralmente diferenciadas asociadas a centros electrofílicos. La separación espacial entre ambos orbitales determina los posibles canales de transferencia de electrones y los sitios preferenciales de reactividad.

La distribución espacial de los orbitales de frontera proporciona información clave sobre la reactividad electrónica de la beauvericina. El HOMO, localizado en zonas específicas del anillo (particularmente en grupos funcionales con mayor densidad electrónica), sugiere los sitios más susceptibles a procesos de oxidación o a interacciones con aceptores de electrones. En contraste, el LUMO se concentra en regiones estructuralmente distintas, asociadas a grupos capaces de aceptar densidad electrónica, lo que sugiere posibles centros de ataque nucleofílico o de interacción con donadores electrónicos. La clara separación espacial entre HOMO y LUMO sugiere una transición electrónica localizada y un comportamiento intramolecular que podrían influir en la actividad ionófora y en las propiedades bioactivas de la BVC.

La tabla 1 presenta el conteo y la proporción relativa de los aminoácidos identificados en la proteína cuticular parcial AYA50038 de *Leptinotarsa decemlineata*, compuesta por 219 residuos. La tabla organiza los aminoácidos por abreviatura estándar, indicando para cada uno el número de unidades presentes y su porcentaje respecto al total. Se observa una marcada predominancia de alanina (28,31%), seguida de valina (11,87%) y serina (9,59%), mientras que otros residuos, como triptófano, no están presentes en la secuencia. En conjunto, la tabla 1 resume cuantitativamente la composición primaria de esta proteína cuticular.

Tabla 1. Composición aminoacídica de la proteína cuticular parcial AYA50038 de *Leptinotarsa decemlineata*. Conteo y porcentaje relativo de los 219 residuos que conforman la secuencia anotada en NCBI. La tabla evidencia la alta abundancia de Ala, Val y Ser, consistente con perfiles típicos de proteínas cuticulares, y la ausencia de Trp en el conjunto analizado.

N	AA	Unidades	Porcentaje
1	Ala	62	28,31%
2	Arg	3	1,37%
3	Asn	3	1,37%
4	Asp	3	1,37%
5	Cys	2	0,91%
6	Gln	5	2,28%
7	Glu	4	1,83%
8	Gly	7	3,20%
9	His	14	6,39%
10	Ile	8	3,65%
11	Leu	10	4,57%
12	Lys	4	1,83%
13	Met	2	0,91%
14	Phe	4	1,83%
15	Pro	16	7,31%
16	Ser	21	9,59%
17	Thr	11	5,02%
18	Trp	0	0,00%
19	Tyr	14	6,39%
20	Val	26	11,87%
	Total	219	100,00%

La distribución de aminoácidos mostrada en la tabla 1 sugiere características estructurales y funcionales propias de proteínas cuticulares de insectos. El alto contenido de alanina y valina (aminoácidos pequeños e hidrofóbicos) es consistente con regiones estructurales compactas y posiblemente con la formación de motivos repetitivos asociados a rigidez o resistencia mecánica. La presencia moderada de serina, prolina e histidina puede indicar zonas con potencial para interacciones específicas o modificaciones postraduccionales típicas de proteínas cuticulares. La ausencia de triptófano y la baja representación de residuos aromáticos en general apuntan a una proteína con menor participación en interacciones π–π o en dominios de plegamiento dependientes de aromáticos. En conjunto, el perfil composicional respalda la anotación funcional de esta secuencia como proteína cuticular parcial y ofrece pistas sobre su papel estructural en *L. decemlineata*.

La tabla 2 presenta un conjunto de interacciones electrónicas entre diversos aminoácidos del microorganismo y la toxina BVC, modeladas mediante parámetros cuánticos derivados de orbitales frontera. Cada fila corresponde a un par *reductor–oxi-*

Tabla 2. Interacciones electrónicas entre los aminoácidos de *L. decemlineata* y la toxina bauvericina.

No.	Reductor	Oxidante	HOMO	LUMO	BG	E-	E+	EP	CTE	*L. decemlineata*
41	Glu	Bauvericina	-10,374	0,301	10,675	-0,111	0,187	0,298	35,822	-
40	Ser	Bauvericina	-10,156	0,301	10,457	-0,108	0,187	0,295	35,449	-
39	Asp	Bauvericina	-10,370	0,301	10,671	-0,118	0,187	0,305	34,986	-
38	Gln	Bauvericina	-10,023	0,301	10,324	-0,124	0,187	0,311	33,196	-
37	Thr	Bauvericina	-9,896	0,301	10,197	-0,123	0,187	0,310	32,895	-
36	Asn	Bauvericina	-9,929	0,301	10,230	-0,125	0,187	0,312	32,788	-
35	Ala	Bauvericina	-9,879	0,301	10,180	-0,124	0,187	0,311	32,732	-
34	Bauvericina	Val	-7,494	0,931	8,425	-0,149	0,109	0,258	32,655	
33	Ile	Bauvericina	-9,872	0,301	10,173	-0,128	0,187	0,315	32,295	-
32	Val	Bauvericina	-9,914	0,301	10,215	-0,131	0,187	0,318	32,122	26
31	Leu	Bauvericina	-9,645	0,301	9,946	-0,126	0,187	0,313	31,777	-
30	Gly	Bauvericina	-9,902	0,301	10,203	-0,137	0,187	0,324	31,492	-
29	Phe	Bauvericina	-9,553	0,301	9,854	-0,126	0,187	0,313	31,482	-
28	Cys	Bauvericina	-9,639	0,301	9,940	-0,129	0,187	0,316	31,455	-
27	Lys	Bauvericina	-9,521	0,301	9,822	-0,127	0,187	0,314	31,279	-
26	Pro	Bauvericina	-9,447	0,301	9,747	-0,128	0,187	0,315	30,944	-
25	Tyr	Bauvericina	-9,056	0,301	9,357	-0,123	0,187	0,310	30,184	-
24	Bauvericina	Leu	-7,494	0,922	8,416	-0,149	0,130	0,279	30,164	10
23	Bauvericina	Ala	-7,494	0,749	8,243	-0,149	0,132	0,281	29,334	62
22	Met	Bauvericina	-9,062	0,301	9,363	-0,134	0,187	0,321	29,168	-
21	Trp	Bauvericina	-8,299	0,301	8,599	-0,112	0,187	0,299	28,761	0
20	Bauvericina	Phe	-7,494	0,283	7,777	-0,149	0,127	0,276	28,178	4
19	Bauvericina	Gly	-7,494	0,902	8,395	-0,149	0,159	0,308	27,258	7
18	His	Bauvericina	-9,307	0,301	9,608	-0,169	0,187	0,356	26,990	-
17	Arg	Bauvericina	-9,176	0,301	9,477	-0,165	0,187	0,352	26,924	3
16	Bauvericina	Ile	-7,494	0,972	8,465	-0,149	0,188	0,337	25,120	8
15	Bauvericina	Cys	-7,494	-0,236	7,258	-0,149	0,140	0,289	25,115	2
14	Bauvericina	Trp	-7,494	0,133	7,626	-0,149	0,155	0,304	25,087	0
13	Bauvericina	His	-7,494	0,503	7,997	-0,149	0,171	0,320	24,990	14
12	Bauvericina	Lys	-7,494	0,943	8,437	-0,149	0,195	0,344	24,525	4
11	Bauvericina	Thr	-7,494	0,832	8,326	-0,149	0,191	0,340	24,488	11
10	Bauvericina	Pro	-7,494	0,792	8,286	-0,149	0,191	0,340	24,370	16
9	Bauvericina	Gln	-7,494	0,755	8,249	-0,149	0,192	0,341	24,190	3
8	Bauvericina	Asn	-7,494	0,644	8,138	-0,149	0,193	0,342	23,795	3
7	Bauvericina	Ser	-7,494	0,565	8,059	-0,149	0,198	0,347	23,224	21
6	Bauvericina	Bauvericina	-7,494	0,301	7,795	-0,149	0,187	0,336	23,199	-
5	Bauvericina	Arg	-7,494	0,558	8,052	-0,149	0,199	0,348	23,137	3
4	Bauvericina	Tyr	-7,494	0,293	7,786	-0,149	0,193	0,342	22,767	14
3	Bauvericina	Glu	-7,494	0,438	7,932	-0,149	0,201	0,350	22,663	4
2	Bauvericina	Asp	-7,494	0,420	7,914	-0,149	0,204	0,353	22,419	3
1	Bauvericina	Met	-7,494	0,145	7,639	-0,149	0,192	0,341	22,401	2

dante, en el que el aminoácido actúa como donante de electrones y la BVC (o, en algunos casos, otro aminoácido) como aceptor. Para cada interacción se reportan los valores de HOMO, LUMO, band gap (BG), energías de captura electrónica (E−), energías de cesión (E+), potencial electrónico (EP) y coeficiente de transferencia de electrones (CTE). Estos parámetros permiten visualizar la profundidad del pozo cuántico asociado a cada interacción molecular. La última columna cuantifica las unidades relativas de la proteína de membrana del microorganismo que participan en o responden a la interacción. En algunos casos aparece un guion, lo que indica la ausencia de señal o una interacción no detectada. Los valores numéricos en rojo destacan las interacciones más intensas o energéticamente favorables, es decir, aquellas que se ubican en el fondo del pozo cuántico y representan los estados más estables o de mayor afinidad entre el aminoácido y la BVC. Los valores del número 1 a 10 indican que ciertos aminoácidos generan interacciones particularmente profundas con la BVC, lo que sugiere una mayor probabilidad de transferencia electrónica, acoplamiento estructural dentro del entorno de membrana. Estas interacciones profundas pueden corresponder a puntos críticos donde la toxina ejerce su efecto sobre la proteína de membrana del micro-

organismo, ya sea alterando su conformación, su permeabilidad o su función bioenergética.

La comparación entre HOMO, LUMO y BG permite inferir qué aminoácidos son más susceptibles a actuar como reductores efi cientes frente a la BVC. Un HOMO alto y un BG reducido suelen correlacionarse con una mayor facilidad de donación de electrones, lo cual coincide con los valores rojos que caracterizan los estados más estables. Asimismo, las energías E− y E+ ayudan a identificar qué interacciones favorecen la captura o la cesión de electrones, lo cual puede relacionarse con mecanismos de toxicidad o de desestabilización de la membrana.

Es importante señalar que, aunque la proteína cuticular parcial AYA50038 de *L. decemlineata* no contiene residuos de triptófano (Trp), como se indica en la tabla 1, este aminoácido se incluyó en el conjunto de interacciones teóricas presentado en la tabla 2. La inclusión de este control externo se realizó para evaluar la consistencia del modelo teórico y contrastar las tendencias observadas en el CTE, sin afectar la interpretación de los resultados correspondientes al fragmento proteico objeto de estudio.

Finalmente, la columna de unidades de proteína de membrana sugiere que las interacciones más profundas podrían asociarse a regiones específicas de la membrana en las que ciertos aminoácidos son más abundantes o estructuralmente expuestos. Esto abre la posibilidad de mapear las zonas vulnerables del microorganismo frente a la Bauvericina, o incluso de modelar rutas de entrada, de anclaje o de disrupción funcional de la toxina.

Los resultados obtenidos permiten integrar, por primera vez, un análisis cuántico detallado de las interacciones entre la BVC y los aminoácidos constituyentes de una proteína cuticular de *L. decemlineata*, con la evidencia biológica y toxicológica previamente reportada sobre esta micotoxina. La caracterización electrónica de la BVC (incluyendo su geometría cíclica rígida, su mapa electrostático y la separación espacial entre HOMO y LUMO) confirma su naturaleza altamente polarizable y su capacidad para establecer interacciones específicas con grupos funcionales polares y parcialmente cargados, tal como se ha descrito en estudios estructurales recientes (Kamioka et al., 2025; Vo et al., 2025). Esta arquitectura electrónica favorece la formación de pozos cuánticos profundos cuando la molécula se aproxima a ciertos aminoácidos, lo que se refleja en valores de E– más negativos, brechas energéticas más reducidas y valores de CTE más bajos observados en la tabla.

Un hallazgo central es que predomina la reducción sobre la oxidación, lo que indica que la BVC actúa preferentemente como aceptor de electrones frente a la mayoría de los aminoácidos de la proteína cuticular. Esto es coherente con su comportamiento ionóforo y con su capacidad para perturbar los gradientes electroquímicos en células animales e insectos (Moyano-López et al., 2025; Dayeh et al., 2025). La tendencia general muestra que los aminoácidos con grupos polares o cargados (como Glu, Asp, Gln, Asn y Ser) generan los pozos cuánticos más profundos cuando actúan como reductores, lo que se evidencia en los valores de HOMO más negativos y en las interacciones más intensas (valores rojos). Estas interacciones sugieren que la BVC se acopla preferentemente a regiones de la proteína cuticular con alta densidad electrónica, posiblemente asociadas a dominios expuestos o funcionales.

La correlación entre la abundancia de aminoácidos en la proteína cuticular y la intensidad de la interacción cuántica aporta un elemento interpretativo clave. Aminoácidos como Ala, Val y Ser (ampliamente representados en la proteína AYA50038) presentan interacciones relevantes con la BVC, aunque no siempre las más profundas. Esto sugiere que la afinidad cuántica no depende únicamente de la frecuencia del residuo, sino también de la combinación entre la disponibilidad estructural y las propiedades electrónicas intrínsecas. Por ejemplo, Val presenta una interacción fuerte (CTE = 32,122) y coincide con su alta abundancia (26 unidades), lo que podría convertirla en un punto de anclaje recurrente para la toxina. En contraste, aminoácidos menos abundantes, pero altamente reactivos, como Glu o Asp, generan pozos cuánticos más profundos, lo que indica que pequeñas proporciones de residuos cargados pueden ser suficientes para facilitar la unión inicial de la BVC.

La presencia de interacciones intensas entre BVC y aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp) también es consistente con la literatura que describe interacciones cation–π y mecanismos de coordinación con cationes metálicos (Kamioka et al., 2025)[11]. Aunque Trp está ausente en la proteína cuticular analizada, su interacción simulada con BVC muestra un pozo cuántico profundo, lo que sugiere que proteínas con dominios aromáticos podrían ser aún más susceptibles a la toxina.

Desde una perspectiva biológica, estos resultados ayudan a explicar por qué la BVC presenta actividad insecticida significativa contra *L. decemlineata* (Ulusoy et al., 2026). La capacidad de la toxina para establecer interacciones electrónicas estables con componentes de la cutícula podría facilitar su retención superficial, su penetración o su transporte hacia tejidos internos. Además, la afinidad por residuos polares coincide con la presencia de proteínas cuticulares especializadas en hidratación, elasticidad y remodelación, procesos esenciales para el desarrollo y la muda del insecto (Chen y Hawthorne, 2025; Liao et al., 2026). La interacción cuántica profunda con aminoácidos cargados podría interferir con la integridad estructural o funcional de estas proteínas, contribuyendo a la disrupción fisiológica observada en estudios toxicológicos.

Finalmente, la predominancia de la reducción sobre la oxidación sugiere que la BVC podría actuar como un sumidero electrónico en el microambiente cuticular, favoreciendo procesos de desestabilización molecular que podrían amplificarse en tejidos internos. Esto es coherente con los mecanismos de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y apoptosis reportados en células expuestas a BVC (Moyano-López et al., 2025; Kwon y Jung, 2026). En conjunto, los resultados cuánticos y la evidencia biológica convergen en un modelo en el que la BVC se une preferencialmente a residuos polares y cargados de proteínas

cuticulares, establece pozos cuánticos profundos que favorecen la transferencia electrónica y desencadena una cascada de efectos que contribuyen a su eficacia como toxina natural contra *L. decemlineata*.

La preferencia de la BVC por los residuos polares sugiere una retención en microambientes cuticulares hidratados, lo que facilita su inserción en la matriz proteica. Este mecanismo coincide con estudios sobre las rutas de hidratación y de complejación de enniatinas (Vo et al., 2025). La identificación de residuos que generan pozos cuánticos profundos permite mapear las regiones vulnerables de la cutícula de *L. decemlineata*. Esto puede guiar el diseño de formulaciones basadas en BVC o análogos con mayor afinidad electrónica (Ulusoy at al., 2026; Fan et al., 2026).

Conclusiones

La beauvericina actúa como un donante electrónico eficiente frente a AA polares y cargados de la proteína cuticular AYA50038. Los valores bajos de CTE para Met, Glu, Asp, Tyr, Arg, Ser, Asn, Gln y Pro (los primeros 9 del fondo y la beauvericina) indican la formación de pozos cuánticos profundos que estabilizan el complejo. Este comportamiento sugiere una retención preferencial en microambientes polares, lo que facilita la penetración cuticular y contribuye a su actividad insecticida. Como hallazgo extra, por el bajo valor de la beauvericina (23,199 y sexto lugar en el pozo cuántico) podría indicar que es un insecticida de acción prolongada, es decir, sus residuos como sustancia pura, tarda mucho en abandonar el sistema biológico.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Universidad Tecnológica de Tecamachalco y a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (Secihti).

Referencias

Al Khoury, C., Bashir, Z., Tokajian, S., Nemer, N., Merhi, G., & Nemer, G. (2022). In silico evidence of beauvericin antiviral activity against SARS-CoV-2. *Computers in Biology and Medicine, 141*, 105171. https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.105171

Al Khoury, C., Nemer, N., & Nemer, G. (2021). Beauvericin potentiates the activity of pesticides by neutralizing the ATP binding cassette transporters in arthropods. *Scientific Reports, 11*, 10865. https://doi.org/10.1038/s41598-021-89622-5

Al Khoury, C., Tokajian, S., Nemer, N., Nemer, G., Rahy, K., Thoumi, S., Al Samra, L., & Sinno, A. (2024). Computational applications: Beauvericin from a mycotoxin into a humanized drug. *Metabolites, 14*, 232. https://doi.org/10.3390/metabo14040232

Caloni, F., Fossati, P., Anadón, A., & Bertero, A. (2020). Beauvericin: The beauty and the beast. *Environmental Toxicology and Pharmacology, 75*, 103349. https://doi.org/10.1016/j.etap.2020.103349

Chen, D., & Hawthorne, D. J. (2025). The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *BMC Genomics, 26*(1), 702. https://doi.org/10.1186/s12864-025-11867-5

Dayeh, V. R., Solhaug, A., Hamilton, M. E., Linton, L. E., Lee, L. E. J., & Bols, N. C. (2025). The impact of beauvericin on rainbow trout intestinal epithelial cells at different temperatures and dosing methods. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal, 61*(5), 614–626. https://doi.org/10.1007/s11626-025-01014-5

Fan, J., Bi, Y., Li, J., Su, H., Cheng, A., & Li, B. (2026). Beauvericin modulates immune responses in the silkworm, *Bombyx mori*: Insights from cellular and transcriptomic analyses. *Journal of Invertebrate Pathology, 217*, 108608. https://doi.org/10.1016/j.jip.2026.108608

González-Pérez, M. (2017a). Quantum theory of the electron transfer coefficient. *International Journal of Advanced Engineering, Management and Science, 3*(10), 1024–1028. https://doi.org/10.24001/ijaems.3.10.9

González-Pérez, M. (2017b). Quantum modeling to determine the carcinogenic potential of aflatoxin B1 produced by *Aspergillus* sp. and its metabolic derivate aflatoxin M1. *Mexican Journal of Biotechnology, 2*(2), 255–270.

Kamioka, S., Ito, R., Ohshimo, K., & Misaizu, F. (2025). Compact conformation of Ba2+-beauvericin complex by triple cation-π interactions: Insight into ion transport mechanism from gas-phase structures. *Journal of Physical Chemistry Letters, 16*(29), 7462–7469. https://doi.org/10.1021/acs.jpclett.5c01573

Kim, Y., Jo, Y. J., Yoon, S. B., Kwon, J., You, H. J., Youn, C., Choo, Y. K., & Kim, J. S. (2025). Beauvericin disrupts G2/M transition and induces meiotic arrest during mouse oocyte maturation. *Reproductive Toxicology, 137*, 109032. https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2025.109032

Kwon, M., & Jung, H. J. (2026). Beauvericin induces mitochondrial apoptosis and attenuates EMT-associated phenotypes and angiogenic signaling in colorectal cancer cells in vitro. *Journal of Microbiology and Biotechnology, 36*, e2511035. https://doi.org/10.4014/jmb.2511.11035

Liao, L. L., Wu, Y. K., Wang, Z. Y., Peng, J., Jin, L., & Li, G. Q. (2026). Ecdysis triggering hormone (ETH) is vital for pupation in *Henosepilachna vigintioctomaculata*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 121*(3), e70146. https://doi.org/10.1002/arch.70146

Moyano-López, C., Llorens, P., Juan-García, A., & Juan, C. (2025). ROS-mediated cytotoxicity and cell death pathways in SH-SY5Y cells exposed to beauvericin, patulin, and their combination. *Environmental Toxicology and Pharmacology, 120*, 104860. https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104860

Ulusoy, M., Aslıyüce, S., Goettel, M. S., Denizli, A., & Keskin, N. (2026). Beauvericin, synthesized by entomopathogenic fungi, as a promising natural pesticide of *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Management Science, 82*(1), 104–113. https://doi.org/10.1002/ps.70175

Vo, K. X., Hirata, K., Lisy, J. M., Fujii, M., & Ishiuchi, S. I. (2025). The path from sequestration to hydration: Why Na+ takes a unique route with the ionophore, beauvericin. *Journal of Physical Chemistry A, 129*(35), 8101–8109. https://doi.org/10.1021/acs.jpca.5c03824

Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P., & Gong, M. (2021). The toxins of *Beauveria bassiana* and the strategies to improve their virulence to

insects. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 705343. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705343

Zhang, Z., Zheng, C., Keyhani, N. O., Gao, Y., & Wang, J. (2021). Infection of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*, by the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Agronomy*, *11*, 1910. https://doi.org/10.3390/agronomy11101910

www.saber.ula.ve/avancesenquimica
Avances en Química, 21(2), 43-56 (2026)
Artículo científico

Determinación de mercurio total mediante espectroscopia de absorción molecular UV/Vis: revisión de métodos

Máximo A Gallignani*[1], María del Rosario Brunetto[1], Carlos Ayala[2]

[1)] Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas (FCB), Universidad Técnica de Manabí (UTM), Portoviejo, Ecuador.

[2)] Laboratorio de Espectroscopia Molecular (LEM), Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes (ULA): Mérida 5101, Venezuela.

(*) maximo.gallignani@utm.edu.ec; maximogallignani143@gmail.com

Recibido: 01/04/2026 **Revisado**: 15/06/2026 **Aceptado**: 10/07/2026

Resumen

El mercurio es un elemento con características físicas y químicas particulares. Por ello, el Hg metálico y algunos de sus compuestos han tenido múltiples aplicaciones a lo largo del tiempo. Sin embargo, su elevada movilidad, persistencia y toxicidad exigen un estricto control en muchos productos, y en diferentes matrices. En consecuencia, se han desarrollado métodos basados en técnicas electroquímicas, espectroscópicas y cromatográficas. Este trabajo presenta una revisión crítica de metodologías basadas en la espectroscopia de absorción molecular UV/Vis para la determinación de mercurio total, fundamentadas en la formación de complejos. Se contrastan estrategias de trabajo, características generales y aplicaciones.

Palabras clave: Espectroscopia de absorción molecular UV/Vis; formación de complejos; mercurio total

Abstract

Determination of total mercury by UV/Vis molecular absorption spectroscopy: a review of methods. Mercury is an element with particular physical and chemical characteristics. Therefore, metallic Hg and some of its compounds have had multiple applications over time. However, its high mobility, persistence, and toxicity require strict control in various samples and matrices. Consequently, methods based on electrochemical, spectroscopic, and chromatographic techniques have been developed. This paper presents a critical review of methodologies based on UV/Vis molecular absorption spectroscopy for the determination of total mercury, focusing on strategies based on complex formation, considering their principles, characteristics, and applications.

Keywords: UV/Vis molecular absorption spectroscopy; Complex formation; Mercury (total Hg)

Introducción

El mercurio (Hg) es un elemento ampliamente distribuido en el ambiente y de gran relevancia toxicológica debido a su elevada movilidad, persistencia y capacidad de bioacumulación. Presen-ta propiedades fisicoquímicas particulares, entre ellas: alta densidad, estado líquido a temperatura ambiente y capacidad de formar amalgamas con algunos metales (Stillman, 2003; Cadavid-Muñoz y Arango-Ruiz, 2000; Lide, 2005; Cottom et al., 1999), lo que ha favorecido su uso en diversas aplicaciones tecnológicas e industriales, incluyendo dispositivos de medición, lámparas, componentes electrónicos, procesos de electrólisis industriales como el Castner-Kellner (Crook y Mousavi, 2016) y actividades mineras para la extracción de metales preciosos como oro y plata (Gaona-Martínez, 2004). Asimismo, ha sido utilizado en odontología y en formulaciones farmacéuticas y antisépticas (Cadavid-Muñoz y Arango-Ruiz, 2000; Soratur, 2002).

Sin embargo, el Hg no cumple ninguna función biológica conocida y es un potente agente neurotóxico. Su exposición puede generar efectos adversos en el sistema nervioso central, particularmente en el cerebelo, afectando el control motor y otras funciones neurológicas (Cadavid-Muñoz y Arango-Ruiz, 2000; Eisler, 2006) Entre las diferentes especies químicas de mercurio, los compuestos orgánicos -especialmente los derivados alquilados- presentan una elevada toxicidad (Aschner et al., 2017; Brunetto et al., 1999).

El impacto ambiental del Hg es particularmente relevante en ecosistemas acuáticos, donde puede transformarse microbiológicamente en metilmercurio, una de sus formas más tóxicas y biodisponibles. Este compuesto se incorpora fácilmente a organismos primarios y se transfiere a lo largo de la cadena trófica, dando lugar a procesos de bioacumulación y biomagnificación (Hintermann, 2010; Kolipinski et al., 2020). En consecuencia, su monitoreo en matrices ambientales, biológicas y alimentarias constituye una prioridad en química analítica. En muchos casos, el contenido de Hg total representa el parámetro analítico de interés, ya sea por requerimientos normativos o como indicador de contaminación, aunque en algunos casos es necesario complementar la información con estudios de especiación.

Para ello se han desarrollado métodos basados en técnicas elec-

troquímicas (Zaib et al., 2015; Suherman et al., 2017), espectroscópicas moleculares (Sandell et al., 1989; Marczenko y Freiser, 2008; Saputri et al., 2025) y atómicas (absorción, emisión y fluorescencia atómica), generalmente acopladas a sistemas de generación de vapor frío (GVF), o de generación fotoquímica de $Hg^0_{(g)}$, para mejorar la sensibilidad (Gallignani et al., 1998; Armenta y de la Guardia, 2011; Althoff et al., 2017; Ohki et al., 2013; Covaci y Frentiu, 2022; Santos et al., 2012; Shirkhanloo et al., 2017). También se han propuesto métodos cromatográficos con distintos detectores**,** algunos de ellos con estrategias de especiación (Brunetto et al., 1999; Hight y Cheng, 2006; Suvarapu y Baek, 2017; Shahid et al., 2020). No obstante, su aplicación puede verse limitada por el costo instrumental, la complejidad operativa y los requerimientos de mantenimiento.

En este contexto, la espectroscopia de absorción molecular ultravioleta-visible (EAM UV-Vis) (Skoog et al., 2019; Rubinson y Rubinson, 2001; Dyer y Garbarino, 1973) continúa siendo una alternativa analítica atractiva por su amplia disponibilidad, bajo costo y simplicidad, además de su potencial de automatización (García, 2018; Buie, 2011). El desarrollo de nuevas celdas, que se detallan en los catálogos técnicos correspondientes (Starna, 2026), detectores multicanal, sistemas de análisis en flujo (Cerdá, 2006)y herramientas quimiométricas, ha ampliado significativamente sus posibilidades analíticas.

Sin embargo, la determinación directa de Hg por esta técnica (espectrofotometría UV/Vis) plantea un problema: las soluciones de iones y de muchos compuestos mercuriales no muestran absorción significativa en esta región. En consecuencia, los métodos espectrofotométricos se basan en reacciones donde el Hg participa, de forma directa o indirecta, en la formación o transformación de especies con absorción detectable. Estas estrategias pueden agruparse bajo dos enfoques principales:

I) Métodos basados en la formación de complejos entre el Hg y ligandos adecuados, en los que al menos una de las especies involucradas presenta absorción útil en la región de trabajo.

II) Métodos cinéticos, basados en el efecto catalítico del ion Hg^{2+} en algunas reacciones específicas.

Por razones de extensión, pero sobre todo por la diferencia en la filosofía de trabajo, los métodos cinéticos serán presentados en la parte II de este estudio (Gallignani, et al., 2003; Valero et al., 2004; Kawashima, et al., 1997). En este marco, el objetivo del presente trabajo es presentar una revisión, crítica y comparativa, de métodos espectrofotométricos para la determinación de Hg total mediante la formación de complejos, analizando sus fundamentos, estrategias, características y aplicaciones, incluyendo propuestas con etapas de preconcentración. No se consideran en la revisión métodos cromatográficos con detección UV ni estudios de especiación.

Metodología

La metodología se basa en una revisión bibliográfica mediante el uso de palabras clave en bases de datos científicas ampliamente utilizadas (Web of Science, Scopus, Google Scholar, entre otras). Los trabajos seleccionados constituyen una muestra representativa de las estrategias desarrolladas para la determinación espectrofotométrica de mercurio, considerando su evolución histórica e impacto.

En todos los casos, la especie activa es Hg^{2+}; por ello, algunos procedimientos requieren un tratamiento previo de la muestra (digestión u oxidación), aspectos que no se abordan en este trabajo.

El proceso de absorción puede involucrar especies orgánicas o inorgánicas, iónicas o moleculares, generalmente en solución líquida. Con fines didácticos (para facilitar la lectura del trabajo), se incluye un breve "Marco conceptual" con algunas consideraciones sobre el proceso de absorción y las potenciales especies absorbentes.

Marco conceptual

Consideraciones sobre la EAM UV/Vis

La espectrofotometría UV/Vis se basa en la absorción de radiación electromagnética por especies moleculares en esta región espectral. En principio, se puede trabajar con sólidos, líquidos y gases; sin embargo, en química analítica se emplean principalmente disoluciones líquidas, y en menor extensión gaseosas. Sus fundamentos, instrumentación y aplicaciones básicas están bien documentados (Skoog et al., 2019; Rubinson y Rubinson, 2001). No obstante, a continuación, se señalan algunas consideraciones que pueden ser de interés:

- El UV/Vis de trabajo es de 190 a 780 nm. En ocasiones se extiende hasta el IR cercano (≈ 900 nm).
- La "absorción útil" requiere que la especie absorba en esta región y presente un coeficiente de extinción molar elevado ($\varepsilon > 10^3$ $L.mol^{-1}.cm^{-1}$).
- En compuestos orgánicos, la absorción depende de la presencia de cromóforos; y de la estructura de la molécula (presencia de multi cromóforos, conjugación, auxocromos, etc.) (Skoog et al., 2019; Rubinson y Rubinson, 2001; Dyer y Garbarino, 1973).
- Las características de absorción se pueden mejorar a través de una reacción de derivatización adecuada.
- En el caso de las especies inorgánicas:

  - Moléculas gaseosas como $SO_2(g)$, ciertos hidruros volátiles (AsH_3, SbH_3, SnH_4, etc.), entre otras, absorben en el UV, y sus bandas pueden utilizarse con fines analíticos (Gallignani et al., 2009; Cabredo et al., 1998; Cabrero et al., 1995).

  - Las disoluciones acuosas de iones poliatómicos pueden tener absorción en el UV (nitrito, nitrato, carbonato, etc.) o en el visible (cromato, dicromato, permanganato, etc.).

  - Las disoluciones de iones de muchos metales de transición

presentan absorción en el visible; sin embargo, estas transiciones presentan valores de **ε** relativamente bajos, lo que limita su utilidad analítica. En estos casos, se puede recurrir a reacciones químicas que generen especies absorbentes.

La determinación espectrofotométrica de Hg, cuyos iones no absorben en la región de trabajo, requiere su transformación en una especie absorbente mediante reacción con un ligando apropiado:

$$xM + yL \rightarrow M_xL_\gamma$$

donde M representa el ion Hg^{2+} y L el ligando (Cottom et al., 1999; Atkins et al., 2010; Housecroft y Sharpe, 2006).

En este marco, pueden distinguirse dos enfoques límite según el origen de la señal analítica. En los métodos directos (A), la absorción proviene del complejo formado y aumenta con la concentración de analito, mientras que en los indirectos (B), responde al ligando y decrece con la concentración de Hg. La primera variante es muy común, siendo la segunda muy escasa, pero factible.

(A) $M + L\text{-}1 \rightarrow ML\text{-}1$

donde el complejo ML_{-1} es la especie absorbente).

Ejemplo A-1: $Hg^{2+} + 2L_{Azo} \rightarrow Hg\text{-}(L_{Azo})_2$

donde L_{Azo} es un ligando tipo azo (Radhi, 2022). En este caso, la especie absorbente es el complejo, que absorbe a 626 nm.

Ejemplo A-2: $Hg^{2+}{}_{(ac.)} + 2HDz_{(ac.)} \rightarrow Hg(Dz)_2 + 2H^+$

donde Dz es el ligando: Ditizona (Mateo et al., 1988; Piña et al., 2012). En este caso, el complejo es la especie absorbente (λ= 490 nm), que se extrae en cloroformo.

(B) $M + L\text{-}2 \rightarrow ML\text{-}2$

donde el ligando L-2 es la especie que absorbe. El complejo no absorbe).

Ejemplo: $Hg^{2+} + GBI \rightarrow Hg(GBI)_2$

L-2 es el ligando: (1H-benzimidazol-2-yl)guanidina (Sundaresan et al., 2016). Se trata de un caso poco común, pero interesante. El complejo que se forma no absorbe; la señal analítica corresponde a la disminución de la absorbancia del ligando a 225 y 295 nm.

En los sistemas indirectos la química del sistema suele ser más compleja: el analito modifica la concentración o el comportamiento de otras especies absorbentes, como ocurre en las reacciones de desplazamiento (C) o en las de competencia por el ligando (D).

C) En este escenario hay dos metales y un solo ligando disponible; el segundo metal (M2) desplaza al primero en el complejo M1-L. Se colocan 2 ejemplos que ilustran situaciones distintas que se pueden desarrollar: en una se sigue la señal del complejo inicial (M1-L), mientras en la otra la absorción de interés corresponde al complejo (M2-L), producto de la reacción de desplazamiento.

$$M1\text{-}L + M2 \rightarrow M2\text{-}L + M1$$

Ejemplo C-1: $4[Fe(SCN^-)]^{2+} + Hg^{2+} \rightleftarrows [Hg(SCN)_4]^{2-} + 4Fe^{3+}$

El ligando es el ion tiocianato. Se monitorea la disminución de la absorbancia del tiocianato férrico. El producto de reacción,

$[Hg(SCN)_4]^{2-}$, no absorbe (Sulistyarti et al., 2020).

Ejemplo C2: $Zn(Dz)_2 + Hg^{2+} \rightarrow Hg(Dz)_2 + Zn^{2+}$

El ligando es la Ditizona, Dz (Ahmad et al., 2017). El Hg desplaza, o sustituye, al Zn en el complejo original. Se monitorea la absorbancia creciente del ditizonato de mercurio, que se extrae en CCl_4.

(D) El segundo escenario de métodos indirectos representa el caso inverso, una competencia por el ligando. El metal presente (M) puede unirse a dos ligandos (L1 y L2), por lo general, con diferente afinidad por él. Este tipo de esquema constituye la base de muchas titulaciones complejométricas.

$$M\text{-}L1 + L2 \rightleftarrows M\text{-}L2 + L1$$

$$[Ca^{2+}\text{- In}] + EDTA \rightarrow [Ca^{2+}\text{- EDTA}] + In$$

In es el indicador: negro de eriocromo T -NET

El Ca^{+2} esta inicialmente unido al NET (complejo rojo). El EDTA que se introduce desplaza al In en el complejo liberando al NET (color azul), generando el cambio de color en la solución, que determina el punto final. El seguimiento se puede hacer mediante una titulación espectrofotométrica (Harris, 2016).

En un marco distinto, desde el punto de vista químico, las interacciones Metal-Ligando pueden dar lugar a complejos de coordinación, quelatos, pares iónicos, de transferencia de carga, etc. En particular, el Hg^{2+} presenta afinidad por ligandos blandos -en concordancia con la teoría HSAB- formando especies como $(HgI_4)^{2-}$ o $[Hg(SCN)_4]^{2-}$, que pueden asociarse con cationes orgánicos cromóforos, así como quelatos con ligandos polidentados como la ditizona. La figura 1 sintetiza esta información, destacando las especies responsables de la absorción en cada caso.

Este trabajo tiene un claro enfoque analítico. En este contexto, la siguiente sección presenta una revisión y clasificación de los métodos reportados, orientada a relacionar el sistema químico con el diseño metodológico y el desempeño analítico.

Métodos espectrofotométricos para la determinación de mercurio

La literatura describe numerosos ligandos capaces de formar complejos con el ion Hg^{2+}, que han permitido el desarrollo de una variedad de métodos espectrofotométricos para su determinación. La tabla 1 resume los principales ligandos reportados y las siglas utilizadas para su identificación.

La mayoría son métodos directos, aunque unos pocos entran en el grupo de indirectos. No obstante, para los fines de esta revisión -centrada en el desempeño analítico- resulta conveniente adoptar una clasificación operativa basada en la forma en que se realiza la medida espectrofotométrica. Bajo este criterio, se

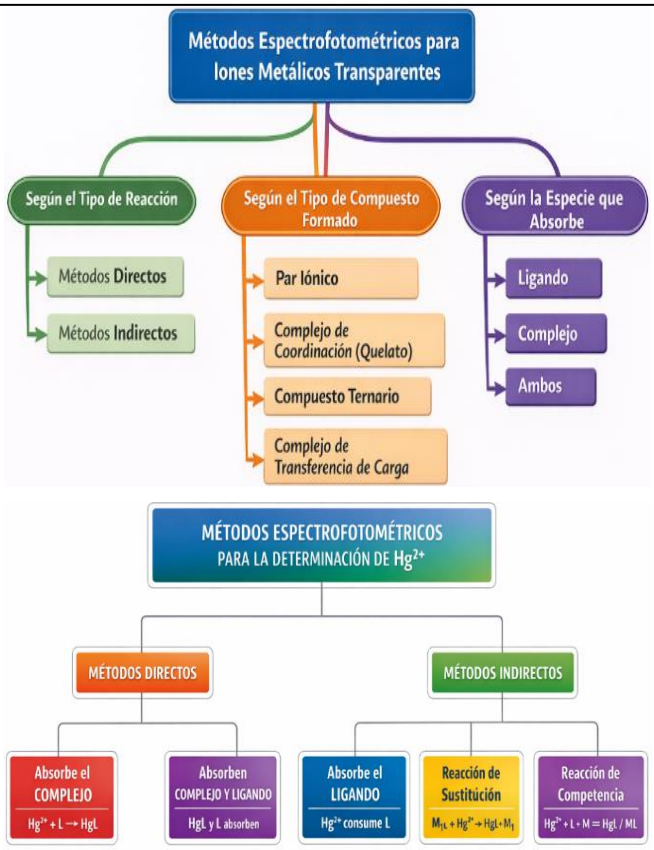


Fig. 1: Mapa conceptual sobre los métodos de análisis que se usan. (A) Clasificación en base a tres criterios: 1) Tipo de método, 2) Tipo de compuesto formado y 3) Especie absorbente. (B) Variante metodológicas que se dan dentro de los métodos directos e indirectos.

establecen tres categorías básicas: 1) métodos de lectura directa, 2) métodos extractivos y 3) métodos que incorporan etapas de preconcentración. A continuación, se discuten estos grupos indicando sus fundamentos y las estrategias de trabajo utilizadas, reseñando algunos trabajos representativos.

Grupo 1: Métodos de lectura directa

En estos métodos, todo el proceso analítico se desarrolla en el medio de reacción que contiene al analito. El ligando se añade directamente a la solución, se forma el complejo metal-ligando y se realiza la medición espectrofotométrica, destacando en ellos la simplicidad operativa. Sin embargo, para alcanzar esta condición ideal, en ocasiones se debe proporcionar asistencia para solventar problemas de solubilidad y, en algunos casos, espectrales. Las estrategias de trabajo diseñadas para solucionarlos se discuten en apartados separados, intentando, en lo posible, respetar la secuencia histórica en la evolución de los métodos de análisis.

Formación de especies coloreadas a partir del ion mercúrico: el ion $[HgI_4]^{2-}$ -Grupo 1A

Uno de los primeros sistemas utilizados para generar especies coloreadas a partir de soluciones de ion mercúrico fue la formación del ion tetraiodomercuriato(II) (figura 2). Las soluciones de $K_2[HgI_4]$ presentan color amarillo, lo que permitió explorar tempranamente su potencial analítico.

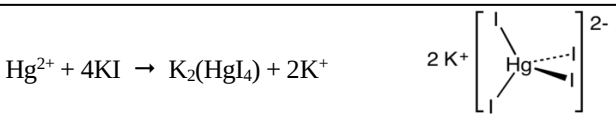


Fig. 2: Estructura propuesta para el ion HgI_4^{2-}

Pappas y Powell (1967) estudiaron este sistema, y encontraron interferencias significativas por parte de algunos cationes y aniones. Sobre esta base, Ramakrishna *et al*. (1976) propusieron la formación de un complejo (tipo par iónico ternario) por la asociación entre $[HgI_4]^{2-}$ y un catión orgánico derivado de rodamina 6G. En trabajos posteriores, se empleó rodamina B (Yow Loo et al., 2012) y tiocianato en lugar de ioduro (Hernández-Córdoba et al., 1984).

La implementación de estos métodos es sencilla y permite la detección en medios acuosos, aunque con limitaciones de selectividad y control de interferencias. Es importante destacar que en todos ellos se debe introducir en el medio de reacción un agente (gelatina, alcohol polivinílico, etc.) para estabilizar al producto de la reacción. La tabla 2A resume las características principales de estos métodos iniciales.

Formación de complejos usando nuevos ligandos Grupo 1B

Con el fin de mejorar la sensibilidad y ampliar el rango de aplicación, se desarrollaron metodologías de lectura directa asistidas, que hacen uso de ligandos con mayor afinidad por el ion mercúrico*. La asistencia consiste en introducir modifica-dores del medio como solventes orgánicos (pueden estar en la solución del ligando) o surfactantes, entre otros. El protocolo experimental en todos ellos es similar.

*Los nuevos ligandos son, estructuralmente, variados (ver tabla 1): heterociclos con átomos donadores N/S, derivados de tiocarbazona, compuestos azo, entre otros. No obstante, esta discusión excede el alcance de este trabajo, cuyo enfoque es esencialmente analítico (Cottom et al., 1999; Atkins et al., 2010; Housecroft y Sharpe, 2006).

La tabla 2B recoge algunos ejemplos representativos, que incluyen procedimientos directos (Radhi, 2022) y algunos indirectos (Sulistyarti et al., 2020; Ahmad et al., 2017). Los métodos asistidos que usan ditizona como ligando se colocan en un bloque separado, dentro de la tabla, para destacar el efecto del medio, especialmente en presencia de surfactantes, en la posición de la banda de absorción y en el coeficiente, **ε**, del complejo (Ahmed & Alam, 2003; Flores, 2011; Khan et al, 2005; Hernández y Mansilla, 2006; Orozco y Cañizares, 2010).

Si bien estos métodos mantienen la simplicidad operativa, y ofrecen buenas prestaciones analíticas, su selectividad puede verse limitada por el comportamiento espectral del sistema (ligando, complejo, medio de reacción) y/o por la presencia de interferentes. Por ello, el siguiente apartado aborda estrategias orientadas a enfrentar estos problemas.

Estrategias espectroscópicas para mejorar la selectividad – Grupo 1C

La selectividad puede ser un problema crítico en algunos méto-

Tabla 1. Ligandos utilizados para formar complejos absorbentes con el ion Hg^{2+}.

Siglas	Nombre del Ligando
Grupo 1-(0)	Ligandos iniciales usados para formar complejos (pares iónicos) coloreados de Hg:
(I^-)	Ion ioduro (Pappas & Powell, 1967)
I^- / Rod 6G	Ioduro y Rodamina 6G (Ramakrishna et al., 1976)
I^- / Rod B	Ioduro y Rodamina B (Yow Loo et al., 2012)
SCN^- / Rod B	Tiocianato y Rodamina B (Hernández-Córdoba et al., 1984)
Grupo 1-(1):	Ligandos usados en métodos que permiten la lectura directa en el medio de reacción:
Ligando azo	Ácido (E)-2-(4,5-bis(4-metoxifenil)-1H-imidazol-4-yl) diazenll) benzoico (Radhi, 2022)
SMR	Michler'sthioketon reagent (Hussain et al., 2019)
Br-PADAP	2 (5-Bromo-2-piridilazo)-5-(dietil amino) fenol (Simião et al., 2022)
HMBT*	2-((5-(2-hydroxy-3-methoxybenzylideneamino)–2H-1,2,4-triazole-3-ylimino)methyl)-6-methoxyphenol (Alzahrani et al., 2023)
MTCED	5-metiltiofeno-2-carboxaldehydo etilendiamino (Deepa et al., 2014)
2-ACPINH	N'-(1-(Pyridina-2-yl)etildieno)isonicotinohidrazida (Reddy et al., 2015)
GB1	1-(1H-benzimidazol-2-yl)guanidina (Sundaresan et al., 2016)
$(SCN)^-$	Ion Tiocianato (Sulistyarti et al., 2020)
MTDAA	2-Metiltofenildiazoaminoazobenzene (Guo et al., 2005)
HDz, Dz	Ditizona (Ahmed & Alam, 2003; Flores, 2011; Khan et al, 2005; Hernández y Mansilla, 2006; Orozco y Cañizares, 2010)
G-1(2)	Ligandos en métodos que usan estrategias de corrección de medida:
HOTT	6-hidroxi-3-(2-oxoindolin-3-ilideneamino)-2-tioxo-2H-1,3-thiazina-4(3H)-ona (Hamza et al., 2010)
TAR	2-Thiazolylazo) resorcinol (Al-Bagawi et al., 2017)
ACINH	Amil Cinamaldehido Isonicotinoil Hydrazona (ACINH) (Pradeep et al., 2016)
DHBTSC	3,4-DihidroiBenzaldehidoTiosemicarbazona (Mogalali et al., 2013)
ATP	2-Acetilpiridina Tiosemicarbazona (Babu y Reddy, 2012; Prasad, 2018)
DMIH	Diacetyl Monoxime Isonicotinoyl Hydrazone (Chandrasekhar et al., 2011)
Grupo 2	Ligandos usados en métodos extractivos - Tabla 2C:
(I^- & Rod B)	Ioduro y Rosadamina B (Yow Loo et al., 2012)
KXB	Benzil xantato de potasio (Rao, 2010)
TPA	Tiofenilacetona (Murti y Khopkar, 1977)
Ac. Ox	Acido Oxálico (Abdullah et al., 2019)
HDz / Dz	Ditizona (Mateo et al., 1988; Piña et al., 2012; Carrasquero et al., 2004; Ivanova et al., 2026)
Grupo 3	Ligandos presentes en métodos que incluyen etapas de preconcentración:
HDz/Dz	Ditizona (Carrera et al., 2016; Niazi et al., 2015)
BTAC	2-(2-benzotiazolilazo)- p-cresol (Lemos et al., 2012)
TMK	4,40-bis(dimethylamino)thioben-zophenone (Gharehbaghi et al., 2009)
PAR	4-(2-piridilazo) resorcinol (Yonehara et al., 2005)
AR6B	Astrazon Red (Antolová et al., 2016)
(FER)	Ferroina: $[Fe^{2+}(Fen)_3]^{2+}$ (Hosseini y Hashemi-Moghaddam, 2004; Hosseini y Hashemi-Moghaddam, 2005)
Grupo X	Ligandos presentes en trabajos que indican tendencias a futuro:
Ag@MESNA	Nano particulas de Ag funcionalizadas con sulfonato de mercaptanao (Vicente-Martínez et al, 2026)
Au (AuNPs)	Nano partículas de Au (AuNPs) funcionalizadas 8 Hidroxiquinoleina (dos Santos et al., 2025)
Abd	Abendazol (El-Shwiniy et al., 2022)

Nota: El orden en que se colocan los ligandos, corresponde -básicamente- a la secuencia en que son mencionados en el trabajo; y los grupos que se señalan responden a sus estructuras.

Tabla 2A. Métodos de lectura directa: desarrollos iniciales basados en la formación de complejos tipo par iónico.

Ligando / Complejo (Hg:L)*	λ (nm) ε (mol^{-1} L. cm^{-1})	IT: mg/L	Medio Modo: Lectura directa (LD)	Aplicación/Muestras
Ioduro (I^-) / 1:4 ⊙	323 / 2,34 x 10^4	0,04 - 0,6	LD: Acuoso, pH 4	Estudio interferencias (Pappas & Powell, 1967)
(I-) y Rod6G / 1:2◈	575 / 7,0 x 10^4	1 - 8	LD: Medio ácido + gelatina	Estudio Interferencias (Ramakrishna et al., 1976)
(I-) y RodB / 1:2◈	559 / 1,68×10^3	1 - 12	LD: Medio ácido + APV*	Estándares acuosos (Yow Loo et al., 2012)
SCN^- y RodB / 1:2◈	610 / 1,1×10^5	1 - 12	LD: Exceso SCN^- + APV*	Hg en aire● (Hernández-Córdoba et al., 1984)

*Complejo-Relación Metal:Ligando, ε: Coeficiente de extinción molar, IT: Intervalo de trabajo. Complejos tipo par iónico: ⊙ $[Hg(IO_4)]^{2-}$, ◈$[Hg(IO_4)^{2-}].(R^+)^{2-}$● El Hg se atrapa en una trampa de $H_2SO_4/KMnO_4$.

Tabla 2B. Métodos de lectura directa, con asistencia química, para la determinación de Hg(II)

Ligando Complejo*	λ (nm) ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})	LT: mg/L L_D: mg/L	Medio Modo: Lectura directa◆	Aplicaciones Muestras
Ligando Azo Hg:L = 1:2	546 / 7,96 x 10^3	0,5 - 10 / 0,19	(Ligando en etanol), no hay efecto pH, T = 25 ^{0}C.	Estudios interferencias, aguas y actividad biológica (Radhi, 2022)
SMR Hg:L = 1:1	626 / 3,39 x 10^3	3 - 20,7 / 1,7	(SMR en etanol). pH neutro, T = 25^0 C.	Interferencias, muestras fortalecidas. Recuperación (Hussain et al., 2019)
Br-PADAD Hg:L = 1:2	566 / 8,87 x 10^2	0,1 - 10 / 0,02	(Br-PADAD en alcohol). T= 25 ^{0}C, pH 9.	Aguas en zonas auríferas. Actividad biológica (Simião et al., 2022)
HMBT Hg:L = 1:2	475 / 1,59 x 10^4	0,1- 6,0 / 0,016	(HMBT en metanol). T = 25 ^{o}C, pH 10.	Aguas varias: de grifo y aguas Zam Zam (Alzahrani et al., 2023)
MTCED Hg:L = 1:1	385 / 5,5 x10^4	0,83-8.6 / n.r	(MTCEDT en metanol). pH 2. 25 ^{o}C, pH 2.	Aguas varias (mar, rio, lluvia, industriales) (Deepa et al., 2014)
2-ACPINH Hg:L = 2:3	357 / 5,48 x 10^4	0,2 - 2,0 / n.r	(Solución acuosa / DMF). pH 5. T = 25 ^{0}C.	Aguas varias, alimentos y mezclas sintéticas (Reddy et al., 2015)
MTDAA Hg:L = 1:1	520 /1,33 x 10^5	0 - 6 / 0,27	(MTDAA en etanol), Triton X.-100, T = 25 ^{0}C	Agua: potable, de lago y aguas residuales (Guo et al., 2005)
GBI Hg:L = 1:2	245 y 295 nm ε: n.r)	0,01-10^3 / 0,01	(GBI en agua/DMSO). Reducción Absorbancia en 295nm◉	Certificada RM-1515. Interferencias (Sundaresan et al., 2016)
SCN- Hg:L = 1:4	460 / 4,7 x 10^3 ▲ $[Fe(SCN)]^{2+}$	1 - 30 / 058	Sustitución del Fe por Hg en el $[Fe(SCN)]^{2+}$ ◉	Aguas fortalecidas y de lavado (de zonas auríferas) (Sulistyarti et al., 2020)
Métodos de lectura directa, asistidos, que hacen uso de la ditizona (Dz) como ligando				
Hg:L = 1:2 (L: Ditizona)●	488 / 2,5×10^4	0,1 - 25 / n.r	(Mezcla de agua y 1:4 dioxano); T = 25 ^{0}C	Aguas, sangre, orina, tejidos vegetales, etc. (Ahmed & Alam, 2003)
	502 / 4,8x10^4	0,1-12 / n.r	(Triton X100), pH 2, T = 25 ^{0}C	Aguas y suelos (Flores, 2011)
	490 / 5,0x10 ^{4}	0,05 - 10 / n.r	(Docdecil sulfato sódico), pH ácido, T = 25 ^{0}C	Aguas, tejidos y fluidos, suelos, orina (Khan et al, 2005)
	493 / 7,2x10^4	0 - 3 / n.r	(Triton X-100), medio ácido, T = 25 ^{0}C	Aguas fortalecidas Solo analizan cadmio (Hernández y Mansilla, 2006)
	493 /: n.r	0,5 - 10 / 0,27	(Tritón X-100). Sistema FIA, portador mezcla de ácidos, pH= 0, T = 25 ^{o}C◈	Productos farmacéuticos (muestras digeridas) (Orozco y Cañizares, 2010)

*Complejo: Relación Metal:Ligando, ◆LC: lectura directa, con asistencia química (solventes, surfactantes, etc.), ε: coeficiente de extinción molar, IT: Intervalo de trabajo: LD Límite de detección). nr: No reportado. ▲ Valor estimado. ◈ Estos métodos corresponden, en la clasificación primaria, a métodos indirectos, ◈ FIA: Flow injection analysis. ● El valor de ε varía con el medio de reacción utilizado.

dos espectrofotométricos: por absorción de algunos componentes, solapamiento de bandas, etc. En este marco, se han desarrollado diversas estrategias espectroscópicas para abordarlos.

La tabla 2C recopila algunos métodos para determinar Hg^{2+} que incorporan dos estrategias usadas con frecuencia: corrección β (medidas a dos λ, una analítica y otra de corrección (Hamza et al., 2010; Al-Bagawi et al., 2017) y espectroscopia derivativa (ED) (Mogalali et al., 2013; Pradeep et al., 2016; Babu y Reddy, 2012; Prasad, 2018; Chandrasekhar et al., 2011), que permiten resolver señales superpuestas y mejorar la discriminación analítica sin necesidad de etapas adicionales de separación (la ED requiere un *software* apropiado para el tratamiento de los espectros; pero sus ventajas están bien documentadas (López de Alba et al., 2017; Gallignani et al., 2005; Gallignani et al., 2008). Estas aproximaciones representan una evolución significativa en el tratamiento de sistemas complejos.

Grupo 2: Métodos extractivos

Cuando hay problemas de solubilidad, o limitaciones de selectividad o sensibilidad que no pueden resolverse en el propio medio de reacción, se recurre a estrategias de separación, dando lugar a los métodos extractivos. En estos procedimientos, el complejo formado se transfiere a la fase orgánica, donde se realiza la medida espectrofotométrica. Esta etapa adicional suele aportar importantes mejoras en selectividad y sensibilidad, aun-que a costa de mayor tiempo de operación y, consumo de reactivos. Por esta razón estos métodos iniciales tienden a ser evitados, en favor de metodologías más simples.

En la literatura se han descrito métodos extractivos muy simples (Rao, 2010). Sin embargo, los desarrollos propuestos por Yow Loo et al. (2012), Murti y Khopkar (1977) (Hg-TBA-benceno), e incluso los que hacen uso de la ditizona (Dz) como ligando (Mateo et al., 1988; Piña et al., 2012), tanto en procedimientos directos como indirectos (Ahmad et al., 2017), son más representativos de esta modalidad, incluso desde el punto de vista histórico.

Con un enfoque diferente, Abdullah y colab. (2019) propusie-

Tabla 2C. Métodos de lectura directa directos que usan herramientas para mejorar la selectividad.

Ligando Complejo*	λ (nm) ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})	IT (mg/L L_D (mg/L)	Medio Modalidad (β y ED)	Aplicaciones Muestras
➡ Lectura directa: Corrección Beta (β):				
HOTT Hg:L = 1:2	λ_{D0}: 505 y λ_β: 336 ε: 3,25 × 10^5	IT: 0.2 - 2.0 L_D: 0,026	**β:** pH = 5. D0 a λ_{D0}, con corrección a λ_β.	Fertilizantes, Aguas unidad odontología (Hamza et al., 2010)
TAR Hg:L = 1:2	λ_{D0}: 547 / λ_β = 442 ε: 1,44 × 10^5	IT: 0.1 - 2.0 L_D: 0,024	β: pH 6. Medida a λ_{D0}, con corrección a λ_β.	Aguas superficiales y de rio fortalecidas (Al-Bagawi et al., 2017)
➡ Métodos de lectura directa - Espectroscopia de derivadas:				
DHBTSC Hg:L = 1:2	λ_{D0}: 375 / λ_{D2}: 440 ε: 3,25 ×10^5	IT_{D0}: 0,05 - 0,5 IT_{D2}: 0,04 - 0,016	**ED:** (Tween 80). pH 6,5. D_0 y $D_{1(Pico\ a\ 440\ nm)}$.	Aguas residuales Aguas fortalecidas (Mogalali et al., 2013)
ACINH Hg:L = 1: 1	λ_{D0}: 391 / $\lambda_{D1(P)}$: 440 ε: 2,78×10^4	IT_{D0}: 1,0 -10 IT_{D1}: nr	**ED:** pH 10, D_0 391 nm y D_1 (Pico a 440 nm)	Aguas de rio, de Laboratorio, etc. (Pradeep et al., 2016)
ATP Hg:L = 1:1	λ_{D0}: 351 $\lambda_{D2\text{-}P}$: 410 y $\lambda_{D2\text{-}V}$: 473 ε: 5.4x10^4	IT_{D0}: 0,24 - 2,4 IT_{D2P}: 0,0296-0,664 IT_{D2V}: 0,008-0,08	**ED**: y pH 6: (ATP en DMF). Medidas λ_{D0} y λ_{D2} (pico a 410 y valle a 473).	Aguas, suelos. muestras biológicas, fármacos ayurdéticos (Babu y Reddy, 2012; Prasad, 2018)
DMIH 1:1	λ_{D0}: 375 y $\lambda_{D1(P)}$: 400 nm ε: 5.4x10^4	IT_{D1}: 1,003 - 12,03 L_D: n.r	**ED**: pH = 5,5, D0: 351 nm y $D1_{(Pico)}$ a 400 nm	Aleaciones sintéticas con Hg.; y aguas (Chandrasekhar et al., 2011)

* Relación Metal:Ligando, ε: Coeficiente de extinción molar, IT: Intervalo de trabajo, L_D: Límite de detección. D0, Di_0 Derivada de orden 0 (espectro de absorción) y orden i (1,2). Los subíndices P y V indican Pico o Valle. λDi es la longitud de onda de medida en la representación correspondiente.

Tabla 3. Métodos espectrofotométricos extractivos para la determinación de Hg(II).

Ligando Complejo *	λ (nm) ε (L.mol^{-1}.cm^{-1})	IT: mg/L	Medio Modalidad: Extracción	Aplicaciones Muestras
(I^-) y RodB (1:2)$^{\diamond}$	565 / 1,78 x10^4	0,25 - 1,35	(benceno) Solución acuosa	Hg en resinas de intercambiador iónico (Yow Loo et al., 2012)
KBX (1:2)	375 / 2,61×10^{-3}$^{\odot}$	1 - 20	(MIBK): Solución ac. pH 10	Aguas residuales y aguas fortalecidas (Rao, 2010)
TBA (1:2)	345 / 1,70 x 10^4	0,6 - 12,1	(benceno) Solución ac. pH 4. El extracto se lleva a pH 12 .	Aguas de desecho industriales (Murti y Khopkar, 1977)
Ditizona (1:2)	490 / ≈3,5x10^4	0,05 - 0,5 0,01 (V)^{o}	(CH_2Cl_2). Medio ácido; digestión previa.	Aguas varias, tejidos de peces y vegetales (Piña et al., 2012)
Ditizona (1:2)	488 nm / n.r	1,0 - 12	(CCl_4). Sustitución de Zn por Hg en soln. (pH 1) $ZnDz_2$,	Recuperación: aguas de rio fortalecidas (Ahmad et al., 2017)
Ac. oxálico $^{\bullet}$	300 nm / n.r	n.r	Soxhlet: Ac. Oxálico/$SnCl_2$	Aguas, suelos, productos agrícolas (Abdullah et al. (2019)

* Complejo: Relación Metal Ligando, ε: Coeficiente de extinción molar, IT: intervalo de trabajo, $^{\diamond}(HgI_4^{2-}).(R^+)_2^{\odot}$ El valor reportado (2,61 × 10^{-3}) es inconsistente; probablemente corresponde a 2,61×10^3. ^{o} Dependiendo del volumen de la muestra (Estos valores son para un volumen de muestra de V = 5 mL). $^{\bullet}$ La extracción *soxhelt* corresponde a un principio distinto, pero se incluye por acoplarse a una determinación espectrofotométrica. n.*r:* No reporta.

ron una modalidad de trabajo distinta, una extracción Soxhlet con ácido oxálico y cloruro estannoso, seguida de la medida espectro-fotométrica. La tabla 3 resume y contrasta las características en algunos de ellos. Sin embargo, a pesar de su mayor complejidad operativa, estos enfoques continúan siendo relevantes, especialmente en el análisis de muestras con bajas concentraciones de Hg(II) o en matrices de alta complejidad. En este punto, es importante aclarar que la extracción es una forma primaria de preconcentración; y bajo la figura de técnicas de preconcentración, vuelve a tomar presencia en el tercer grupo de métodos que se discuten en este trabajo.

En otro contexto, la ditizona ha estado presente en todos los grupos de métodos discutidos y también lo está en el grupo 3. En consecuencia, corresponde hacer algunas consideraciones sobre este ligando.

La ditizona (HDz), un ligando versátil

La ditizona (HDz, difeniltiocarbazona) es un quelante versátil,

usado en la determinación de metales como Cu, Zn y Hg (Sandell et al., 1989; Mateo et al., 1988; Flores, 2011; Carrasquero et al., 2004). En el caso del mercurio, está presente en todas las estrategias discutidas, tanto en métodos directos como indirectos; incluso en algunos con etapas de preconcentración.

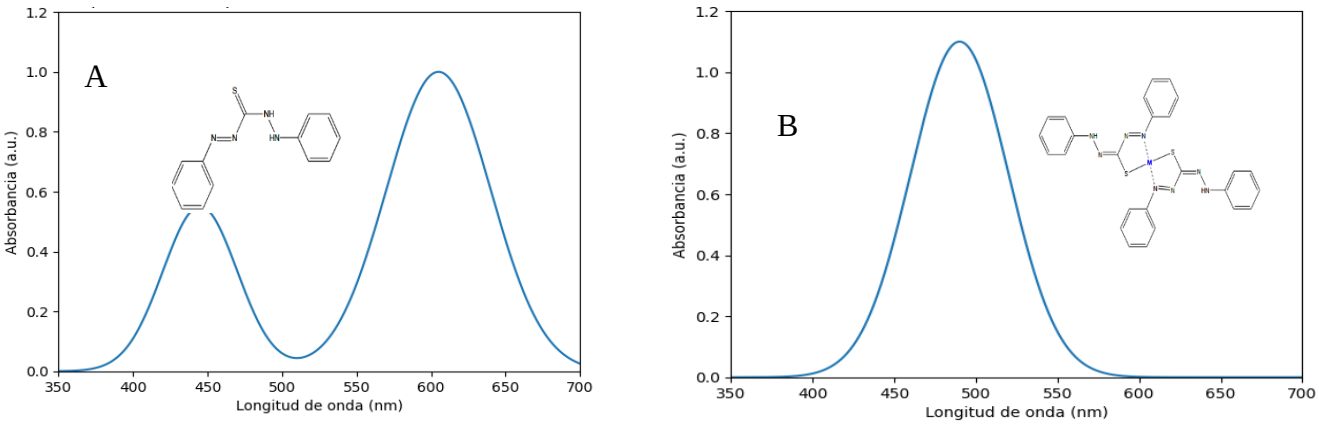


Fig. 3: Espectro de absorción simple de: (A) solución acuosa de ditizona (bandas en ≈ 435 y 605 nm) y B) solución, de ditizonato de plomo, en CCl_4 (banda en ≈490 nm). El objetivo es señalizar la absorción simple de cada componente aislado.

La figura 3 muestra la estructura y el espectro de absorción de la ditizona (solución acuosa) y del ditizonato de Hg (en CCl_4), con bandas de absorción alrededor de 435 y 600–620 nm para el ligando, y una intensa entre 485 y 500 nm para el complejo. Este es muy soluble en solventes como CCl_4, CH_2Cl_2, y $CHCl_3$, condición que suele usarse como base en los métodos extractivos. Los mecanismos de asistencia para solubilizar al complejo en el medio de trabajo inicial fueron discutidos en una sección previa. Recientemente Ivanova *et al*. (2026) publicaron un estudio sobre el equilibrio HHz-$Hg(Dz)_2$ con extracción en cloroformo.

Como extensión de las estrategias discutidas, y con el objetivo de mejorar la sensibilidad analítica, se han desarrollado metodologías que incorporan una etapa de preconcentración (PC). En general, se basan en la transferencia, retención o transformación del analito con el fin de concentrarlo en un volumen menor y aislarlo de la matriz. Dada su mayor complejidad, se presentan en un formato más detallado que permite incluir parámetros adicionales relevantes para su evaluación analítica.

Grupo 3 - Métodos que incorporan una etapa de preconcentración

Para dar cierre a esta sección del trabajo se revisan algunas es trategias de preconcentración (PC) que se usan para mejorar la sensibilidad analítica. De acuerdo con el mecanismo de separación o acumulación, los trabajos que se discuten pueden agruparse, básicamente, en cuatro bloques:

Microextracción en fase sólida (SPME): Se basa en la retención del analito sobre un adsorbente sólido, seguido de su elución en un volumen reducido. Por ejemplo, Carrera *et al.* (2016) la incorpora usando ditizona como quelante y un adsorbente a base de carbón activado.

Microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME): Es una de las modalidades más usadas, y consiste en la transferencia del analito a una fase orgánica finamente dispersa, que favorece una rápida extracción. Se muestran algunos ejemplos que la usan, pero con estrategias de trabajo distintas como: el análisis de una mezcla de Cu y Hg usando un quelante común y tratamiento quimiométrico de los datos (Niazi et al., 2015), procedimientos multietapa donde el complejo se deposita sobre una membrana que hace la función de celda; la DLLME asistida por vortex; o el uso de solventes iónicos, entre otras (Lemos et al., 2012; Gharehbaghi et al., 2009; Yonehara et al., 2005).

Generación de vapor con atrapamiento químico: Se fundamenta en la conversión del analito en una especie volátil, seguida de su separación de la matriz y retención. El método desarrollado por Yonehara *et al.* (2005) es representativo de este grupo: generación de vapor frío de Hg, separación, retención, reoxidación, formación de un complejo y medida espectrofotométrica.

Flotación y extracción de pares iónicos: En este caso, el analito forma un ion asociado hidrofóbico que puede separarse por flotación o extracción en fase orgánica, permitiendo su preconcentración. Hosseini y Hashemi-Moghaddam (2004 y 2005) desarrollaron una estrategia que combina la flotación del ion asociado $(HgI_4)^{2-}$- ferroína con su posterior extracción y medición, incorporando en trabajos posteriores etapas adicionales para incrementar la sensibilidad.

La tabla 4 sintetiza las características más relevantes de los métodos descritos. En general, muestran un carácter multietapa y pueden implicar cierta complejidad operativa; no obstante, permiten alcanzar altos factores de preconcentración, lo que constituye su principal ventaja. En este sentido, la automatiza-ción, cuando es posible, contribuye a simplificar su aplicación.

Los grupos de métodos discutidos, con el conjunto de estrategias involucradas, proporcionan una visión integral de los enfoques desarrollados para la determinación de mercurio, incluso a niveles traza. A partir de este marco, resulta pertinente considerar las tendencias actuales y perspectivas futuras en esta área.

Presente y futuro. Tendencias en los diseños metodológicos

En los últimos años se han propuesto enfoques alternativos para la determinación espectrofotométrica de Hg(II) que se apartan de los esquemas clásicos basados en complejos moleculares en

solución. Estos desarrollos incorporan nuevos tipos de reactivos y plataformas de reconocimiento, ampliando el alcance metodológico de este campo.

Entre ellos, destacan los sistemas basados en nanopartículas metálicas funcionalizadas, en los cuales el proceso de reconoc estos casos el ligando no actúa libre en solución, sino inmovilizado sobre una superficie nanométrica, manteniendo su capacidad de coordinación, pero en un entorno distinto. Ejemplos representativos incluyen nanopartículas de plata modificadas con ligandos tiolados (como MESNA), donde el Hg(II) forma especies Hg–S sobre la superficie (Vicente-Martínez et al, 2026), así como nanopartículas de oro funcionalizadas con quelantes orgánicos, como la 8-hidroxiquinoleína (dos Santos et al., 2025). En ambos casos, la interacción con el ion metálico induce cambios en las propiedades ópticas del sistema -frecuentemente asociados a fenómenos plasmónicos- que pueden ser monitoreados directamente, dando lugar a metodologías de respuesta diferente a la espectrofotometría convencional, pero conceptualmente vinculadas a la química de complejos.

En una línea diferente de trabajo, también se han explorado compuestos de interés farmacológico como posibles reactivos analíticos. En este contexto, se ha reportado el uso de albendazol como ligando para la determinación de Hg(II), aprovechando su capacidad para formar complejos con el ion metálico (El-Shwiniy et al., 2022). Este tipo de propuestas resulta de interés no solo desde el punto de vista analítico, sino también por la posibilidad de reutilizar moléculas bioactivas como agentes imiento químico tiene lugar en la interfase sólido–líquido. En complejantes, abriendo nuevas perspectivas en el diseño de métodos. No obstante, estos enfoques aún requieren mayor desarrollo y validación para su incorporación sistemática dentro de las metodologías convencionales.

Tabla 4. Métodos espectrofotométricos que incorporan etapas de preconcentración.

Ligando **Complejo***	**λ** **(nm)**	**IT: μg / L** **L_D: μg / L**	**Modo preconcentración** **Fc: Factor de PC**	**Solventes** **Ext y Dis**	**Aplicaciones** **Muestras**
Ditizona (Hg:L) 1:2	490	30 - 280 7,68	**SPME**: adsorbente sólido: Xerogel	Agua / Etanol	Aguas naturales y subterráneas (Carrera et al., 2016)
Ditizona (Hg:L) 1: 2	470-700*	10 - 300 2,8	**DLLME** (F_{PC} = 175) Usa quimiometría	S_{Ext}: CCL_4 S_{Dis}: Acetonitrilo	Aguas naturales y muestras sintéticas (Niazi et al., 2015)
BTCA (Hg:L) **1 : 1**	650	11 - 200 3,3	**DLLME** (F_{PC} = 64) Métodos multietapas	Ext: CCL_4 Dis: Etanol	Muestras de pelo, Aguas varias (Lemos et al., 2012)
TMK (Hg:L) **1:2**	575	12 - 140 3,9	**DLLME** / $F_{(PC)}$ = 18,8 TMS en micelas	S_{Ext}: Iónico S_{Dis}: Acetona	Aguas varias, suero salino (Gharehbaghi et al., 2009)
Br- y ArB6 (HgL) **1:1**◉	550	8 - 200 1,5	**DLLMCE** asistida por vortex /100 s	Soln ac. pH 2 Tolueno-CH_2Cl_2	Aguas naturales y fortalecidas (Antolová et al., 2016)
Otras variantes de preconcentración:					
PAR (Hg:L) **1:1**	525	0,5 - 20 0,16	**GVF**, retención del Hg, reoxidación, etc.	Complejo en NH_4Cl/NH_3	Efluentes industriales Aguas fortalecidas (Yonehara et al., 2005)
Ferroina◉ (Hg:L) **1:1**	509	6.5 - 190 1,25	Flotación, formación par asociado	Extracción con Acetonitrilo	Aguas de grifo, de mar, e industriales (Hosseini y Hashemi-Moghaddam, 2004)
Fer y Dz Hg:L) **1:2**	490	1,6 - 32 0,1	**Flotación**, Retención y tratamiento con NH_3	Extracción con CH_2Cl_2	Aguas industriales, de mar, cabello (Hosseini y Hashemi-Moghaddam, 2005)

*Complejo-Relación Metal:Ligando, ◉ $(HgBr_3)$ - $(Ar6B)^+$, IT y L_D: Intervalo de trabajo y Límite de detección. - λ_{Abs}: Longitud de onda de máxima absorción del complejo PC: Preconcentración y $F_{(PC)}$: Preconcentración y Factor de Preconcentración o enriquecimiento - S_{Ext} y S_{Dis}: Solventes de Extracción y Dispersión.

Tabla 5. Nuevos desarrollos metodológicos para la determinación espectrofotométrica de Hg(II)

Ligando / Complejo **Hg(II) - (NP_S-Func.)**	**λ** **(nm)**	**IT: mg / L** **I_D: mg / L**	**Medio** **Modalidad de trabajo**	**Aplicación** **Muestra**
$AgNP_S$@MESNA◉ Hg(II) - $AgNP_S$ Func.	392	0,02 - 0,2 0,07	Solución ac. Hg(II) + ´Suspensión ⦿ Agitación, toma de micromuestra y medida.	Aguas (Vicente-Martínez et al, 2026)[88]
$AuNP_S$@8HQ◆ Hg(II)- $AuNP_S$ Func.	650	01 - 1 0,02	Solución coloidal de ◆ solución ac. (pH 7) de Hg(II). Agitación, y medida	Aguas Timerasol (dos Santos et al., 2025)[89]
Abemdazol (abd) * Hg: L	585	3 - 200 0,5	El abendazol (un fármaco) actúa como el agente ligando ($\varepsilon_{Complejo}$= 6,3 x 10^3)	Aguas actividad biológica (El-Shwiniy et al., 2022)[90]

◉$AgNP_S$@ MESNA: Nanopartículas de Ag $AgNP_S$) funcionalizadas con mercaptoetano sulfonato,

◆ $AgNP_S$@ 8HQ: 8 Hidroxiquinoleina, IT y LD: Intervalo de trabajo y Límite de detección.

* El Abemdazol actúa como ligando en el método, pero es un principio farmacéutico.

De manera complementaria, se observa una tendencia creciente hacia el desarrollo de metodologías orientadas al análisis de micro muestras, en línea con la evolución de la espectrofotometría en su interacción con áreas como la biotecnología y las ciencias farmacéuticas. Este enfoque ha sido acompañado por el diseño de celdas de reducido volumen y por la disponibilidad de instrumentación específica para el análisis de pequeñas cantidades de muestra, lo que amplía el campo de aplicación de estas técnicas.

La tabla 5 resume algunas de las características de estos 3 métodos, incorporando algunos de los parámetros ya utilizados en las tablas 2, 3 y 4 para la reseña de los métodos.

Conclusiones

Se presenta una revisión de los métodos para la determinación de mercurio total mediante espectroscopia de absorción molecular UV/Vis, basada en reacciones de formación de complejos metal–ligando.

A pesar de la elevada sensibilidad y selectividad de las técnicas atómicas y cromatográficas, su costo instrumental y complejidad limitan su aplicación en numerosos laboratorios. En este contexto, la espectrofotometría UV/Vis constituye una alternativa accesible, sustentada en su amplia disponibilidad y en el desarrollo de reactivos cromogénicos adecuados. El análisis de mercurio como Hg total se justifica ya que, en muchos casos, es la información analítica de interés. La revisión permitió organizar las metodologías en métodos de lectura directa y extractivos, considerando su evolución, estrategias analíticas y tipos de ligandos empleados, así como el uso de técnicas de preconcentración para mejorar la sensibilidad.

La búsqueda de nuevos ligandos, incluyendo compuestos de diseño, se mantiene como una línea de investigación activa. Asimismo, los métodos cinéticos representan una alternativa relevante, cuyo análisis se aborda en la segunda parte de este trabajo.

Finalmente, se prevé la consolidación de tendencias como el análisis en micromuestras y el desarrollo de aplicaciones en áreas emergentes.

Referencias

Abdullah, S. O., Mohammed, Q. Y., & Kareem, S. R. (2019). Estimation of mercury in soil, water and plants spectrophoto-metrically. *Oriental Journal of Chemistry*, *35*(6), 1718–1721. http://doi.org/10.13005/ojc/350613

Ahmad, M. A., Marsom, E. S., & Hamzah, H. (2017). Spectro-photometric method for Hg(II) determination in aqueous environment using zinc dithizonate complex. *ASEAN Journal on Science and Technology for Development*, *18*(1), 25–34. https://doi.org/10.29037/ajstd.194

Ahmed, M. J., & Alam, M. S. (2003). A rapid spectrophotometric method for the determination of mercury in environmental, biological, soil and plant samples using diphenylthiocarbazone. *Journal of Spectroscopy*, *17*, 250927. https://doi.org/10.1155/2003/250927

Al-Bagawi, A. H., Ahmad, W., Saigl, Z. M., Alwael, H., Al-Harbi, E. A., & El-Shahawi, M. S. (2017). A simple and low cost dual wavelength β correction spectrophotometric determination and speciation of mercury(II) in water using chromogenic reagent 4-(2-thiazolylazo)resorcinol. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *187*, 174–180. https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.06.044

Althoff, A. G., Williams, C. B., McSweeney, T., Gonçalves, R., & Donati, G. L. (2017). Microwave-induced plasma optical emission spectrometry (MIP OES) and standard dilution analysis to determine trace elements in pharmaceutical samples. *Applied Spectroscopy*, *71*(12), 2692–2698. https://doi.org/10.1177/0003702817721750

Alzahrani, L., El-Ghamry, H. A., Saber, A. L., & Mohammed, G. I. (2023). Spectrophotometric determination of mercury(II) ions in laboratory and Zamzam water using bis-Schiff base ligand based on 1,2,4-triazole-3,5-diamine and o-vanillin. *Arabian Journal of Chemistry*, *16*, 104418. https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104418

Antolová, L. T., Zaruba, S., Sandrejov, J., Kocurov, L., Vishnikin, A. B., Baze, Y., Andruch, V., & Balogh, J. S. (2016). Spectrophotometric determination of mercury using vortex-assisted liquid–liquid microextraction. *Turkish Journal of Chemistry*, *40*(6), 965–973. https://doi.org/10.3906/kim-1605-63

Armenta, S., & de la Guardia, M. (2011). Determination of mercury in milk by cold vapor atomic fluorescence: A green analytical chemistry laboratory experiment. *Journal of Chemical Education*, *88*(4), 488–491. https://doi.org/10.1021/ed100578g

Aschner, M., Onishchenko, N., & Ceccatelli, S. (2017). Toxicology of alkylmercury compounds. *Metal Ions in Life Sciences*, 7, 403–434. https://doi.org/10.1039/BK9781847551771-00403

Atkins, P. W., Overton, T. L., Rourke, J. P., Weller, M. T., & Armstrong, F. A. (2010). *Inorganic chemistry* (5th ed.). W. H. Freeman and Company: New York, US.

Babu, S. V., & Reddy, K. H. (2012). Direct spectrophotometric determination of mercury(II) using 2-acetylpyridine thiosemicarbazone in environmental samples. *Indian Journal of Advances in Chemical Science*, *1*(1), 65–72. https://www.ijacskros.com/article/524?view=full

Brunetto, M. R., Luna, J., Zambrano, A., Gallignani, M., Burguera, J. L., Burguera, M., & Petit de Peña, Y. (1999). Determination of methyl mercury and inorganic mercury in whole blood by head-space cryofocusing gas chromatography and atomic absorption spectrometry. *Analyst*, *124*(10), 1493–1499. https://doi.org/10.1039/A904131A

Buie, J. (2011). Evolution of UV-Vis spectrophotometers. *Lab Manager*, *4*, 24–25. https://ww9.labmanager.com/evolution-of-uv-vis-spectrophotometers-18481

Cabredo, S., Galbán, J., & Sanz, S. (1998). Simultaneous determination of arsenic, antimony, selenium and tin by gas phase molecular absorption spectrometry after two-step hydride generation and preconcentration in a cold trap system. *Talanta*, *46*(4), 631–638. https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00308-1

Cabrero Pinillos S., Sanz Vicente I., Sanz Asensio, J., & Galbán Bernal, J. (1995). Simultaneous determination of sulphide and sulphi-te by gas-phase molecular absorption spectrometry. Comparative study of different calculation methods. *Talanta*, *42*(7), 937-943. https://doi.org/10.1016/0039-9140(95)01529-k

Cadavid-Muñoz, N., & Arango-Ruiz, A. (2020). El mercurio como contaminante y factor de riesgo para la salud humana. *Revista Lasallista de Investigación*, *17*(2), 280–296. http://www.scielo.org.co/pdf/rlsi/v17n2/1794-4449-rlsi-17-02-280

Carrasquero Durán, A., Domínguez, H., & Acosta, Y. (2004). Síntesis de la ditizona (difenilcarbazona): Un ejercicio integrador en el laboratorio de química orgánica. *Investigación y Postgrado*, *19*(1), 33–50. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-00872004000100003&lng=es&nrm=iso

Carrera, S., Santiago, G., & Vega, M. (2016). Spectrophotometric determination of dithizone–mercury complex by solid phase microextraction in micropipette tip syringe packed with activated carbon xerogel. *Microchemical Journal*, *129*, 133–136. https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.04.0113

Cerdá, V. (2006). *Introducción a los métodos de análisis en flujo*. Departament de Química, Universitat de les Illes Balears, Sciware: Palma de Mallorca, España.

Cotton, F. A., Wilkinson, G., Murillo, C. A., & Bochmann, M. (1999). *Advanced inorganic chemistry: A comprehensive text* (6th ed.). Wiley & Sons: New York, US.

Covaci, E., & Frentiu, T. (2022). Greenness and whiteness profiles of UV/Vis photochemical vapor generation capacitively coupled plasma microtorch optical emission spectrometry method for mercury determination and speciation in food and water. *Chemia*, 67(1), 7-25. https://doi.org/10.24193/subbchem.2022.1.01

Crook, J., & Mousavi, A. (2016). The chlor-alkali process: A review of history and pollution. *Environmental Forensics*, *17*(3), 211–217. https://doi.org/10.1080/15275922.2016.1177755

Chandrasekhar Reddy, G., Devanna, N., & Chandrasekhar, K. B.

(2011). Derivative spectrophotometric determination of mercury(II) using diacetyl monoxime isonicotinoyl hydrazone (DMIH). *International Journal of Chemistry*, *3*(2), 227–232. https://doi.org/10.5539/ijc.v3n2p227

Deepa, K., Raj, Y. P., & Lingappa, Y. (2014). Spectrophotometric determination of mercury in environmental samples using 5-methylthiophene-2-carboxaldehyde ethylenediamine (MTCED). *Der Pharma Chemica*, *6*(3), 48–55. http://derpharmachemica.com/archive.html

dos Santos, E. D., Herrmann, A. B., Zanuto, J. C., Marcon, B. H., Rodrigues, A. J. C., & Sturgeon, R. E. (2025). Spectrophotometric detection of free mercury(II) ions in thimerosal and aqueous media using 8-hydroxyquinoline functionalized gold nano-particles. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *68*, e25250518. https://doi.org/10.1590/1678-4324-2025250518

Dyer, J. R., & Garbarino, J. (1973). *Aplicaciones de espectroscopía de absorción en compuestos orgánicos*. Prentice Hall Internacional: Bogotá, Colombia.

El-Shwiniy, W. H., El-Desoky, S. I., Alrabie, A., & Abd El-Wahaab, B. (2022). Spectrophotometric determination of Zr(IV), Hg(II) and U(VI) in solution with their analytical applications: Structural characterization and molecular docking of the solid complexes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolcular Spectroscopy*, *279*, 121400. https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121400

Eisler, R. (2006). *Mercury hazards to living organisms* (1st ed.). CRC Press: Boca Ratón, US. https://doi.org/10.1201/9781420008838

Flores, B. M. (2011). Diseño y validación de un método de análisis por espectrofotometría UV-Vis para cinc(II) y mercurio(II) en muestras acuosas [Tesis de Licenciatura., Pontificia Universidad Católica de Perú]. http://hdl.handle.net/20.500.12404/1120

García, R. D. (2018). Instrumentos que revolucionaron la química: La historia del espectrofotómetro. *Avances en Química*, *13*(3), 79–82.

Gallignani, M., Bahsas, H., Brunetto, M. R., Burguera, M., Burguera, J. L., & Petit de Peña, Y. (1998). A time-based flow injection–cold vapor–atomic absorption spectrometry system with on-line microwave sample pretreatment for the determination of inorganic and total mercury in urine. *Analytica Chimica Acta*, *369*(1–2), 57–67. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00217-7

Gallignani, M., Castellanos, L., Valero, M., & Brunetto, M. R. (2008). Determinación de nitritos en chorizos por espectro-fotometría derivativa utilizando un sistema de análisis en flujo. *CIENCIA*, *16*(2), 239-248.

Gallignani, M., Ovalles, F., & Brunetto, M. R. (2009). Flow analysis–hydride generation–gas phase derivative molecular absorption spectrophotometric determination of antimony in antileishmanial drugs. *Química Nova*, *32*(2), 337–342. https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000200013

Gallignani, M., Ovalles, F., Brunetto, M. R., Burguera, M., & Burguera, J. L. (2005). Flow analysis–hydride generation–gas phase derivative molecular absorption spectrophotometric determination of antimony in oral homeopathic products formulated under alcoholic medium. *Talanta*, *68*(2), 365–373. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.08.059

Gallignani, M., Valero, M., Brunetto, M. R., Sánchez, A., Burguera, M., Burguera, J. L., & Cerdà, V. (2003). Los métodos cinéticos: Una alternativa atractiva para el análisis espectrofotométrico de nitritos en aguas a niveles de traza y ultratraza. *CIENCIA*, *11*(3), 235–251.

Gaona-Martínez, X. (2004). *El mercurio como contaminante global. Desarrollo de metodologías para su determinación en suelos contaminados y estrategias para la reducción de su liberación al medio ambiente* [Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona]. https://www.tdx.cat/handle/10803/3174#page=1

Gharehbaghi, M., Shemirani, F., & Baghdadi, M. (2009). Dispersive liquid–liquid microextraction based on ionic liquid and spectrophotometric determination of mercury in water samples. International *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, *89*(1), 21–33. https://doi.org/10.1080/03067310802272994

Guo, Y., Din, B., Tian, M., Liu, Y., Chang, X., & Meng, S. (2005). The color reaction of mercury(II) with the new reagent 2-methyl-thiophenyldiazoaminoazobenzene and its application. *Journal of Analytical Chemistry*, *60*(7), 625–628. https://doi.org/10.1007/s10809-005-0149-z

Hamza, A., Bashammakh, A. S., Al-Sibaai, A. A., Al-Saidi, H. M., & El-Shahawi, M. S. (2010). Spectrophotometric determination of trace mercury(II) in dental-unit wastewater and fertilizer samples using the

novel reagent 6-hydroxy-3-(2-oxoindolin-3-ylideneami-no)-2-thioxo-2H-1,3-thiazin-4(3H)-one and dual-wavelength correction spectrophotometry. *Journal of Hazardous Materials, 178*(1–3), 287–292. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.01.075

Harris, D. C. (2016). *Quantitative chemical analysis* (9th ed.). W. H. Freeman and Company: New York, US.

Hernández-Córdoba, M., López-García, I., & Sánchez-Pedreño, C. (1984). Spectrophotometric determination of mercury with thiocyanate and rhodamine B. *Mikrochimica Acta, 84*(5–6), 467–475. https://doi.org/10.1007/BF01197161

Hernández, C. J., & Mansilla, G. C. (2006). Solubilización de la ditizona y sus complejos de mercurio, plomo y cadmio en medio micelar y sus aplicaciones en el análisis espectrofotométrico. *Revista de la Facultad de Ciencias de la UNI*, 10(1), 23–27. https://revistas.uni.du.pe/index.php/revciuni/article/view/2410/3118

Hight, S. C., & Cheng, J. (2006). Determination of methylmercury and estimation of total mercury in seafood using high performance liquid chromatography (HPLC) and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): Method development and validation. *Analytica Chimica Acta, 567*(2), 160–172. https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.03.048

Hintermann, H. (2010). Organomercurials: Their formation and pathways in the environment. *Metal Ions in Life Sciences, 7*, 365–401. https://doi.org/10.1039/BK9781847551771-00365

Hoecroft, C. E., & Sharpe, A. G. (2006). *Química inorgánica* (2ª ed.). Pearson Educación: Madrid, España.

Hosseini, M. S., & Hashemi-Moghaddam, H. (2004). Flotation-spectrophotometric determination of mercury in water samples using iodide and ferroin. *Analytical Sciences, 20*(10), 1449–1452. https://doi.org/10.2116/analsci.20.1449

Hosseini, M. S., & Hashemi-Moghaddam, H. (2005). Sensitized extraction spectrophotometric determination of Hg(II) with dithizone after flotation as ion associate using iodide and ferroin. *Talanta*, 67(3), 555–559. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2005.01.010

Hussain, A. F., Abd-Al Abbas, S. T., & Al-Khafaji, E. (2019). Spectrophotometric determination of mercury(II) with Michler's thioketone reagent. *Journal of Global Pharma Technology, 11*(9 Suppl.), 232–239. https://jgpt.co.in/index.php/jgpt/article/view/2939/2359

Ivanova, V., Minkova, K., & Chakarov, K. (2026). Optimization of the extraction conditions for the Hg^{2+}–dithizone complex in chloroform and its determination by UV-Vis spectrophotometry. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy, 61*(1), 83–92. https://doi.org/10.59957/jctm.v61.i1.2026.8

Kawashima, T., Nakano, S., Tabata, M., & Tanaka, M. (1997). Catalytic reactions as applied to trace analysis. *Trends in Analytical Chemistry, 16*(3), 132–139. https://doi.org/10.1016/S0165-9936(97)00012-5

Khan, H., Ahmed, J., & Bhanger, M. I. (2005). A simple spectrophotometric determination of trace level mercury using 1,5-diphenylthiocarbazone solubilized in micelle. *Analytical Sciences, 21*(5), 507–512. https://doi.org/10.2116/analsci.21.507

Kolipinski, M., Subramanian, M., Kristen, K., Borish, S., & Ditta, S. (2020). Sources and toxicity of mercury in the San Francisco Bay Area, spanning California and beyond. *Journal of Environmental and Public Health, 2020*, Article 8184614. https://doi.org/10.1155/2020/8184614

Lemos, V. A., Oliveira dos Santos, L., dos Santos Silva, E., & dos Santos Vieira, E. V. (2012). Spectrophotometric determination of mercury in water samples after preconcentration using Dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of AOAC International, 95*(1), 227–231. https://doi.org/10.5740/jaoacint.11-198

Lide, D. R. (Ed.). (2005). *CRC handbook of chemistry and physics* (86th ed.). CRC Press: Boca Ratón, US.

López de Alba, P. L., & López-Martínez, L. (1993). Una introducción a la espectroscopia de derivadas. *Educación Química, 4*(3), 160–170. https://doi.org/10.22201/fq.18708404e.1993.3.66813

Marczenko, Z., & Freiser, H. (1981). Spectrophotometric determination of trace elements. *Critical Reviews in Analytical Chemistry, 11*(3), 195–260. https://doi.org/10.1080/10408348108542732

Mateo, R. D., Forteza, R., Cerdá, V., Lacort, G., Roura, M., & Baucells, M. (1988). Revisión sobre el mercurio como metal contaminante. *Química Analítica, 7*(2), 117–143.

Mogalali, M., Ramakrishna, K., & Subbarao, P. V. (2013). Derivative spectrophotometric determination of mercury (II) using 3,4-dihydroxybenzaldehyde thiosemicarbazone (DHBTSC) in presence of micelle medium. *Journal of Applied Chemistry, 3*(4), 60-67. https://iosrjournals.org/iosr-jac/papers/vol3-issue4/I0346067.pdf

Murti, M. V. R., & Khopkar, S. M. (1977). Extractive spectrophotometric determination of mercury with thiobenzoyl-acetone: Analysis of wastewater. *Bulletin of the Chemical Society of Japan, 50*(3), 738–741. https://doi.org/10.1246/bcsj.50.738

Niazi, A., Habibi, S., & Ramez, M. (2015). Preconcentration and simultaneous spectrophotometric determination of copper and mercury by dispersive liquid–liquid microextraction and orthogonnal signal correction partial least squares. *Arabian Journal of Chemistry, 8*, 706–712. http://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.12.014

Ohki, A., Hayashi, K., Ohsako, J., Nakajima, T., & Takanashi, H. (2013). Analysis of mercury and selenium during subcritical water treatment of fish tissue by various atomic spectrometric methods. *Microchemical Journal, 106*, 357-362. https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.09.008

Orozco, J. M., & Cañizares Macías, M. P. (2010). Determination of mercury in pharmaceutical formulations using a continuous flow system and dithizone in micellar medium. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 41*(1), 37–43. https://www.redalyc.org/pdf/579/57912960005.pdf

Pappas, A. J., & Powell, H. B. (1967). Spectrophotometric determination of mercury(II) in aqueous potassium iodide media. *Analytical Chemistry, 39*(6), 579–581. https://doi.org/10.1021/ac60250a021

Piña, X., Marcó, P., Marcó, P. L., Poleo, G., Rojas, J., & Torres, G. (2012). Optimización de un método analítico para la determinación de mercurio en muestras ambientales por espectrometría UV-Visible. *Avances en Química, 7*(3), 171–180.

Pradeep Raju, B., & Devanna, N. (2016). Direct and derivative spectrophotometric determination of mercury(II) using alpha-amyl cinnamaldehyde isonicotinoyl hydrazone (ACINH). *International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences, 7*(1), 82–86. http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84984924746&partnerID=MN8TOARS

Prasad Singh, S. (2018). UV-Vis spectrophotometric determination of mercury(II) using 2-acetylpyridine thiosemi-carbazone (APT) as a new analytical reagent in wastewater samples collected from Rani Pokhari of Kathmandu, Nepal. *International Journal of Chemical Studies, 2*(1), 54–56. https://www.chemistryjournal.in/assets/archives/2018/vol2issue1/2-5-17-888.pdf

Radhi, E. R. (2022). Spectrophotometric determination of Hg(II) using (E)-2-(4,5-bis(4-methoxyphenyl)-1H-imidazol-4-yl) diazenyl benzoic acid as analytical reagent. *Journal of Pharmaceutical Negative Results, 13*(1), 530–536. https://doi.org/10.47750/pnr.2022.13.S01.65

Rao, B. S. (2010). New analytical technique for the determination of mercury(II) by extraction spectrophotometric method with potassium benzyl xanthate in sewage wastes and spiked water samples. *Nature Environment and Pollution Technology, 9*(3), 503–506. https://neptjournal.com/upload-images/NL-14-6-(6)B-1514com.pdf

Ramakrishna, T. V., Aravamudan, G., & Vijayakumar, M. (1976). Spectrophotometric determination of mercury(II) as the ternary complex with rhodamine 6G and iodide. *Analytica Chimica Acta, 84*(2), 369–375. https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)82236-4

Reddy, P. N. K., Reddy, G. T., Sangita, K., Reddy, A. V. R., Parveen, S. N., & Reddy, N. C. G. (2015). Spectrophotometric determination of mercury(II) in environmental samples and synthetic mixtures using N′-(1-(pyridin-2-yl)ethylidene) isonicotinohydrazide as sensitive analytical reagent. Der Pharmacia Lettre, 7(1), 292–302. http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html

Rubinson, K. A., & Rubinson, J. F. (2001). *Análisis instrumental* (1ª ed. en español). Prentice Hall: Madrid, España.

Sandell, E. C., & Onishi, H. (1989). *Photometric determination of traces of metals* (4th ed.). John Wiley & Sons: New York, US.

Santos da Silva, C., Oreste, E.Q., Nunes, A.M, Vieira, M.A., & Ribeiro, A.S. (2012). Determination of mercury in ethanol biofuel by photochemical vapor generation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 27*(4), 689-694. https://doi.org/10.1039/C2JA10281A

Saputri, F. A., Kenanga, A.W. P., Zubaidah, E. U., Mulyadi, C. A., & Pratiwi, R. (2025). Recent updates on analytical methods for mercury determination: A review. *Pharmacia, 72*, 1-14. https://doi.org/10.3897/pharmacia.72.e152087

Shahid, M., Shahid, N., Khalid, S., Bibi, I., Bundschuh, J., Khan Niazi, N. K., & Dumat, C. (2020). A critical review of mercury speciation, bioavailability, toxicity and detoxification in soil–plant environment: Ecotoxicology and health risk assessment. *Science of the Total Environment. 711*, 134749. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134749

Shirkhanloo, H., Khaligh, A., Mousavi, H. Z., & Rashidi, A. (2017). Ultrasound assisted-dispersive-ionic liquid-micromicro-solid phase extraction based on carboxyl-functionalized nanoporous graphene for speciation and determination of trace inorganic and organic mercury species in water and caprine blood samples. *Microchemical Journal, 130*, 245–254. https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.09.012

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2019). *Principios de análisis instrumental* (7ª ed.). Cengage Learning: México.

Simião, D. C., Pereira de Andrade, F., Lima, W. G., de Jesus, M. L., Gomes Dorim, P. H., & Paiva, M. C. (2022). Determination of mercury concentration by a new spectrophotometric method and evaluation of bacterial diversity in river water samples from Brazil. *Water Supply, 22*(5), 5535. https://doi.org/10.2166/ws.2022.173

Soratur, S. H. (2002). *Essentials of dental materials*. Jaypee Brothers Publishers: New Delhi, India.

Starna. (2026). *Quartz and glass cells for spectrophotometers* (catálogo técnico). Recuperado de: https://www.starnacells.com/d_download/2026_Cell_Catalog.pdf [Acceso: 15/01/ 2026]

Stillman, J. M. (2003). *The story of alchemy and early chemistry*. Kessinger Publishing LLC: Whitefish, US.

Sundaresan, C. N., Singh, D. K., & Sunil, A. (2016). Sensing of mercury(II) using 1-(1H-benzimidazol-2-yl) guanidine as chromophore. *Journal of Advanced Chemical Sciences, 2*(1), 195–197. https://jacsdirectory.com/journal-of-advanced-chemical-sciences/articleview.php?id=72

Suherman, A. L., Tanner, E. E. L., & Compton, R. G. (2017). Recent developments in inorganic Hg^{2+} detection by voltammetry. *Trends in Analytical Chemistry, 94*, 161–172. https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.07.020

Sulistyarti, H., Retnowati, R., Sulistyo, E., Wulandari, E. R., & Nashukha, H. L. (2020). Development of indirect spectrophotometric method for mercury determination based on the formation of iron(III)–thiocyanate complex. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 833*, 012047. https://doi.org/10.1088/1757-899X/833/1/012047

Suvarapu, L. N., & Baek, S.-O. (2017). Recent studies on the speciation and determination of mercury in different environmental matrices using various analytical techniques. *International Journal of Analytical Chemistry, 2017*, Article 3624015. https://doi.org/10.1155/2017/3624015

Valero, M., Gallignani, M., Cerdà, V., & Brunetto, M. R. (2004). Desarrollo de un método cinético espectrofotométrico para la determinación de nitritos a nivel de trazas, basado en su efecto catalítico sobre la reacción redox entre la tionina y el bromato de potasio en un sistema de flujo. *CIENCIA, 12*(3), 189–204.

Vicente-Martínez, Y., Gea-Muñoz, J. L., López-García, I., & Hernández-Córdoba, M. (2026). Determination of Hg(II) in water samples using silver nanoparticles functionalized with mercaptoethane sulfonate by a portable nanodrop spectrophotometry system. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 348*(Part 1), 127214. https://doi.org/10.1016/j.saa.2025.127214

Yonehara, F. S., Pasquini, C., & Rohwedder, J. R. (2005). Flow system for preconcentration and spectrophotometric determination of reactive mercury. *Journal of the Brazilian Chemical Society, 16*(5), 928–935. https://www.scielo.br/j/jbchs/a/h7StMCmrKsBtRMb5gQFLN9k/?lang=en

Yow Loo, A. Y., Yap, P. I., Kutty, M. G., Timpe, O., Behrens, M., & Abd Hamid, S. B. (2012). Spectrophotometric determination of mercury with iodide and rhodamine B. *Sains Malaysiana*, *41*(2), 213–218. https://ukm.my/jsm/pdf_files/SM-PDF-41-2-2012/09%20Au%20Yoong%20Yow%20Loo.pdf

Zaib, M., Athar, M. M., Saeed, A., & Farooq, U. (2015). Electrochemical determination of inorganic mercury and arsenic: A review. *Biosensors and Bioelectronics*, *74*, 895–908. https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.058