



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Optimización mediante diseños de experimentos de
métodos espectroscópicos y voltamperométricos para la
especiación de arsénico en aguas**

Autor: Ruth Urueña Martín

Tutor/es: María del Sol Vega Alegre

Resumen

El arsénico es uno de los principales contaminantes de las aguas subterráneas y constituye una preocupante amenaza sanitaria y medioambiental. Esto se debe a su carácter tóxico y bioacumulativo, por lo que la exposición prolongada incluso a bajos niveles del elemento provoca una respuesta tóxica a largo plazo.

La presencia de arsénico en las aguas suele deberse a procesos geológicos naturales, pero en algunos casos también puede ser resultado de la acción humana debido a diversos factores: actividad minera, uso de combustibles fósiles... La toxicidad del elemento depende de la especie química, siendo las especies inorgánicas más tóxicas que las orgánicas, y As(III) más tóxico que As(V). Esto implica que sea necesario tener métodos muy sensibles para determinar las diferentes especies de arsénico en el agua, de esta forma se pueden prevenir las enfermedades derivadas de la exposición a este contaminante.

En este trabajo se han estudiado y optimizado los parámetros de dos de los métodos más utilizados para la especiación de As inorgánico: voltamperometría de redisolución anódica con electrodo de oro (ASV) y espectroscopía de absorción atómica por generación de hidruros (HG-AAS). Se han estudiado los diferentes parámetros que influyen en la señal analítica a lo largo del tiempo y se han llevado a cabo diseños de experimentos para obtener las condiciones óptimas de medida. Se han estudiado las interferencias de matriz en muestras dopadas, para lo que se han realizado ensayos utilizando como matrices analíticas agua desionizada y agua subterránea recogida de un manantial (Baños de Cerrato, Palencia). Las conclusiones obtenidas en los diferentes estudios son las siguientes:

- El método de voltamperometría de redisolución es más reproducible que la espectroscopía de absorción atómica; el equipo de HG-AAS empleado proporciona señales no reproducibles, la sensibilidad no es estable en el tiempo y por lo tanto no proporciona resultados con la precisión necesaria.
- En general, la matriz analítica no afecta de forma significativa a la señal obtenida.
- Las muestras deben ser estabilizadas con conservantes ácidos (como HCl y HNO₃) para preservar las especies As(III) y As(V) y evitar la conversión causada por reacciones redox. En particular, se ha observado la rápida reducción de As(V) a As(III) en muestras no preservadas, pero la acidificación con HNO₃ a pH 1-2 ha conseguido evitar ese proceso.

Abstract

Arsenic is one of the main pollutants of groundwater and constitutes a health and environmental threat. This is due to its toxic and bioaccumulative nature. Thus prolonged exposure to even low levels of the element causes a long-term toxic response.

The presence of arsenic in water is usually due to natural geological processes, but in some cases it can also result from human action as a result of different factors: mining activity, the use of fossil fuels, etc. The toxicity of this element depends on the chemical species, the inorganic species being more toxic than the organic species, and As(III) being more toxic than As(V). This means that it is necessary to use very sensitive methods to determine the different species of arsenic in water so that diseases derived from exposure to this pollutant can be prevented.

In this work, the parameters of two of the most frequently used methods for the speciation of inorganic As have been studied and optimized: anodic stripping voltammetry with gold electrode (ASV) and atomic absorption spectroscopy by hydride generation (HG-AAS). The different parameters that influence the analytical signal over time have been studied and experimental designs have been carried out to obtain the optimum measurement conditions. Matrix interferences in doped samples have been studied. For this reason, tests have been carried out using deionised water and groundwater collected from a spring as analytical matrices (Baños de Cerrato, Palencia). The conclusions drawn from the different studies are as follows:

- - The anodic stripping voltammetry is more reproducible than atomic absorption spectroscopy; the HG-AAS equipment used provides non-reproducible signals, the sensitivity is not stable over time and thus it does not bring accurately enough results.
- - In general, the analytical matrix provided by the groundwater does not significantly affect the signal obtained.
- - Samples should be stabilized with acidic preservatives (such as HCl and HNO₃) to preserve As(III) and As(V) species and avoid conversion caused by redox reactions. In particular, the rapid reduction of As(V) to As(III) in non-preserved samples has been observed, but acidification with HNO₃ at pH 1-2 has managed to avoid this process.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Arsénico en agua.....	5
1.2. Métodos de determinación de arsénico.....	7
1.3. Optimización de métodos analíticos.....	10
2. OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO.....	13
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Determinación de As por ASV.....	15
3.2. Determinación de As por HG-AAS.....	17
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
4.1. Optimización de un método ASV para especiación de As en aguas.....	19
4.2. Optimización de un método HG-AAS para especiación de As en aguas.....	27
4.3. Validación de los métodos.....	39
5. CONCLUSIONES.....	41
6. BIBLIOGRAFÍA.....	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Arsénico en agua.

El arsénico es un elemento químico, de número atómico 33, que pertenece al grupo de los metaloides y se encuentra distribuido en la atmósfera, litosfera, hidrosfera y biosfera de diferentes formas, aunque raramente se encuentra en estado metálico.

Es el vigésimo mineral más abundante de la corteza terrestre, el decimocuarto en agua de mar y el duodécimo en el cuerpo humano. El único isótopo estable en la naturaleza es el ^{75}As , aunque hay otros radioisótopos identificados. De las diversas fuentes de As en el medio ambiente, las aguas naturales, especialmente las subterráneas, representan la mayor amenaza para el humano por tener efectos nocivos para la salud (*Smedley y Kinniburgh, 2002*).

El arsénico puede tener origen natural o antropogénico, pero la mayoría de los problemas ambientales derivan de la movilización de arsénico de los materiales que constituyen la litosfera a través de una combinación de procesos naturales, tales como reacciones de meteorización, actividad biológica, emisiones volcánicas, y el lixiviado de arsénico de minerales y rocas, afectando a grandes áreas del planeta.

La exposición a altos niveles de arsénico se debe a diversas causas: consumo de agua contaminada o uso para la preparación de comidas, riego de cultivos y para procesos industriales. Otra vía importante para su captación es el consumo de alimentos contaminados.

La principal vía de entrada de arsénico en la cadena alimenticia humana es el agua, esto justifica la gran preocupación de las autoridades por controlar su concentración en el agua de consumo. El límite actual establecido tanto por la Organización Mundial de la Salud como por reglamentaciones nacionales (Directiva europea de aguas potables) es de 10 $\mu\text{g/L}$ para agua potable, y se está considerando una nueva reducción a 5 $\mu\text{g/L}$, dada la toxicidad de este elemento y su incidencia en la aparición de ciertos tipos de cánceres y otra serie de trastornos asociados a la exposición continuada a este metaloide.

En la actualidad, el arsénico está considerado como un elemento cancerígeno por la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), siendo un contaminante que la OMS sitúa entre las diez sustancias químicas más preocupantes para la salud pública. Los efectos más característicos por una exposición prolongada al arsénico inorgánico son la aparición de lesiones cutáneas y cáncer de piel. El *Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico* (HACRE) es una enfermedad que se manifiesta mediante lesiones de la piel que puede derivar en cáncer. A su vez, la ingesta de arsénico puede causar enfermedades cardiovasculares, dermatológicas y oncológicas, ya sea por toxicidad aguda o crónica, ya que incluso bajas concentraciones de arsénico, cuando se ingieren durante un largo período de tiempo, puede producir condiciones graves, conocidas colectivamente como arsenicosis; siendo comunes los casos de traqueobronquitis, enfisema, fibrosis pulmonar y lesiones cancerígenas en pulmón, hígado, esófago, vejiga, aparato digestivo, laringe y riñón.

Los primeros casos de envenenamiento por arsénico en las aguas de consumo se registraron en Argentina y Taiwán hacia la mitad del siglo XX (*Smedley y Kinniburgh, 2002*).

La contaminación de las aguas subterráneas por arsénico es un problema muy extendido, presentándose en más de 70 países del mundo (Ravenscroft et al., 2009; López-Geta et al., 2009). En las dos últimas décadas se han detectado y documentado acuíferos contaminados por arsénico en el sudeste asiático (Bangladesh, China, India, Nepal, Camboya, Vietnam...) y en América (Argentina, Chile, México, Estados Unidos...). También se han detectado, aunque de menor gravedad y extensión, en países europeos como España, Francia, Hungría y Reino Unido, entre otros.

Las consecuencias de la presencia de este metaloide en el agua se multiplican en zonas con gran actividad agrícola y ganadera. Allí está presente en la naturaleza, en rocas sedimentarias o volcánicas, y se incorpora en la cadena alimenticia a través de las plantas o animales ampliando así su efecto nocivo.

En la siguiente figura se muestra la distribución mundial de acuíferos con altos contenidos en arsénico, incluyendo aguas geotermales y agua contaminada por actividades mineras.

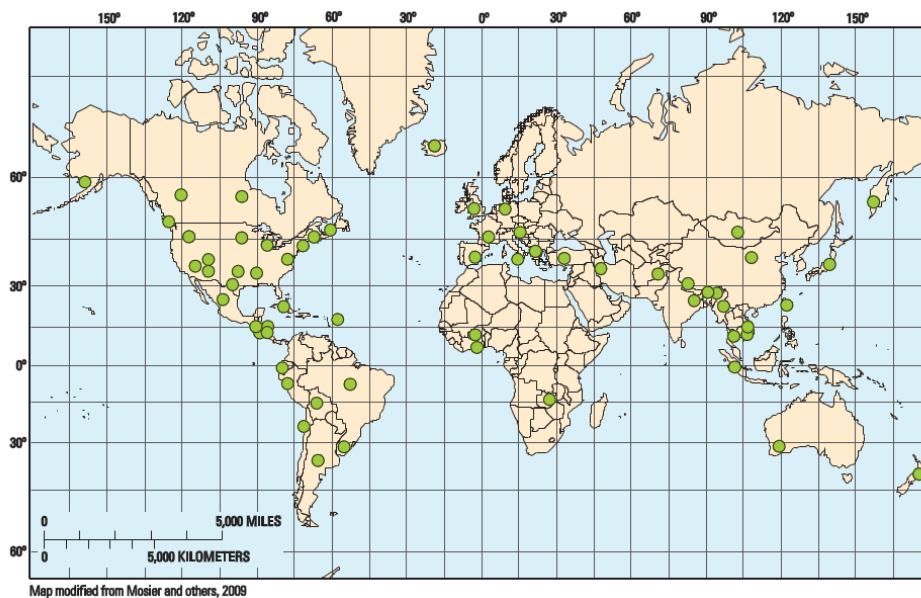


Fig. 1.1. Distribución mundial de acuíferos en los cuales la concentración de arsénico en agua subterránea excede 10 $\mu\text{g/L}$ (Barringer y Reilly, 2013).

En España, en los últimos años han aumentado los problemas relacionados con la presencia de arsénico. El cambio en la normativa de la Unión Europea, plasmada en el Real Decreto RD 140/2003 (BOE 45 de 2003), que estableció un límite máximo admisible para aguas de consumo humano de 10 $\mu\text{g/L}$ ha provocado que muchos recursos hídricos hayan dejado de ser potables porque superan el límite.

Una de las áreas más afectadas de España se encuentra en los acuíferos del Cenozoico de la cuenca del Duero (Gómez et al., 2006). El problema se identificó por vez primera en el año 2000, debido a la realización de análisis químicos en las aguas que abastecían a la población de Íscar (Valladolid). Los análisis en otras localidades de Castilla y León confirmaron la gravedad del problema, ya que los altos contenidos de arsénico en las aguas subterráneas se extendían por un amplio sector de la Cuenca del Duero que implicaba extensas áreas de Valladolid, Ávila y Segovia (Delgado et al., 2009).

La solución planteada inicialmente consistió en aprovechar las aguas superficiales de los ríos Adaja y Eresma, resolviendo el abastecimiento de agua potable a la zona afectada, que ha

sido el más urgente por su gravedad y su trascendencia social. Aunque el problema de abastecimiento se ha solventado, el agua subterránea sigue siendo un recurso socio-económico de vital importancia en esta zona semiárida de la cuenca y se sigue empleando profusamente en la agricultura, ganadería e industria de la región.

1.2. Especiación de arsénico inorgánico en aguas.

El diagrama Eh-pH (diagrama de Pourbaix) para el arsénico mostrado en la Fig. 1.2 permite conocer los intervalos de potencial redox y pH a los cuales predomina cada una de las especies acido-base de As (III) y As (V). Este diagrama puede usarse para predecir la especiación de As inorgánico en aguas a partir de medidas de potencial redox y pH del agua realizadas *in situ* (Smedley y Kinniburgh, 2002).

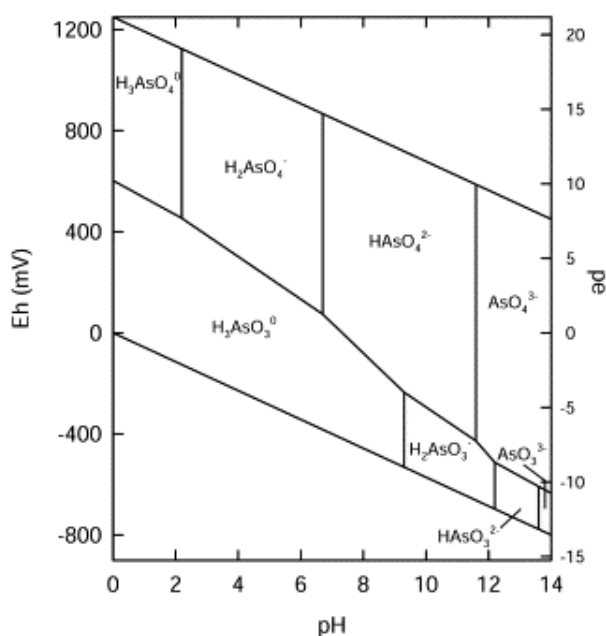


Fig. 1.2. Diagrama Eh-pH de especies de As en agua para el sistema As-O₂-H₂O, a 25°C y 1 bar (Brookins, 1988).

En condiciones oxidantes y bajos valores de pH (inferiores a 6,9), el estado As (V) predomina sobre el As (III), encontrándose fundamentalmente como $H_2AsO_4^-$, mientras que a pH más alto prevalece $HAsO_4^{2-}$. En cambio, en condiciones reductoras predominará la especie neutra H_3AsO_3 hasta pH superior a 9, requiriéndose condiciones fuertemente alcalinas para que aparezcan especies aniónicas de As (III) (Brookins, 1988; Yan et al., 2000).

De este modo, la diferente toxicidad de las especies de As (III) y As (V), junto con los diferentes mecanismos de movilización relacionados tanto con el estado de oxidación como con la carga de la especie predominante, hacen necesario conocer no solo la concentración total del elemento en el agua, sino también su distribución entre las diferentes especies químicas.

La elección de la técnica para la determinación de arsénico es una tarea difícil porque la concentración de las especies del elemento a menudo es inferior a los límites de detección y además coexisten diferentes especies del mismo elemento.

Los métodos más populares para la especiación y determinación de arsénico consisten en la hibridación entre una técnica de separación y una técnica de detección con sensibilidad adecuada para los bajos niveles de concentración de arsénico en aguas. La técnica de separación más común es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en sus diversas modalidades. Como sistemas de detección se emplean espectrometría de absorción atómica (AAS), espectrometría de fluorescencia atómica (AFS), espectrometría de emisión atómica mediante plasma inductivo (ICP-OES) y espectrometría de emisión atómica mediante plasma inductivo con detector de masas (ICP-MS).

La combinación de otros métodos de separación como la cromatografía gaseosa (GC), y la electroforesis capilar (CE), con métodos espectroscópicos de alta sensibilidad ya mencionados, también ha sido aplicada a la determinación de especies inorgánicas de arsénico. Las técnicas voltamperométricas de redisolución también han dado buenos resultados para la determinación de estas especies a nivel de trazas.

Se describen a continuación las características más relevantes de las técnicas aplicables a la determinación de As (III) y As (V) en aguas de las que dispone la Universidad de Valladolid en la actualidad:

- *Voltamperometría de redisolución anódica (ASV).*

Se trata de una técnica electroquímica en la que se mide la corriente originada por una reacción de transferencia de electrones en la superficie de un electrodo en función del potencial aplicado al mismo. Para ello se aplican diferentes programas de potencial y se obtiene un voltamperograma, en el que la posición de los picos en el eje de potencial permite la identificación de la especie analizada y la altura (intensidad) o área (carga) es proporcional a la concentración de analito en la muestra.

Las especies químicas a analizar deben ser oxidables o reducibles sobre el electrodo (electroactivas). El parámetro que controla el proceso de oxidación y reducción es el potencial aplicado al electrodo.

Para llevar a cabo el proceso hay que aplicar el potencial adecuado al electrodo con el que estamos trabajando durante un tiempo controlado durante el cual el As (III) es reducido a As (0) y depositado sobre la superficie del electrodo. Posteriormente se aplica un barrido de potencial anódico (lineal o pulsado), que provoca la reoxidación de As (0) a As (III), registrándose una corriente anódica proporcional a la concentración de As (III) en la muestra. Se realiza una segunda medida, aplicando un potencial de deposición más reductor que en la etapa de redisolución anódica, y que provoca la reducción conjunta de As (V) y As (III) a As (0), obteniendo la corriente de oxidación proporcional a la concentración de As total. El As (V) se calcula por diferencia entre el As total y el As (III) (*Feeney and Kounaves, 2002*).

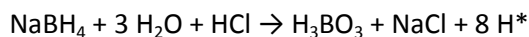
La sensibilidad de la técnica se puede adaptar al nivel de concentración aumentando o disminuyendo el tiempo de deposición aplicado.

- *Espectrofotometría de absorción atómica por generación de hidruros (HGAAS-GFAAS).*

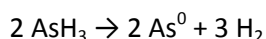
Esta técnica es adecuada para cuantificar trazas de elementos formadores de hidruros como As, Se, Hg, Sn, Sb, Ge, Bi y Te.

La muestra disuelta en ácido diluido (HCl) se mezcla con un reductor, siendo el más usado borohidruro de sodio. Esta reacción produce H atómico que reacciona con el elemento para

formar el hidruro volátil. El mecanismo de formación de los hidruros es complicado (Howard, 1997).



Una vez formado el hidruro gaseoso, es arrastrado de la disolución y transportado por un gas portador (habitualmente argón) hasta una celda de cuarzo, donde es calentado por una llama aire-acetileno produciéndose una descomposición térmica que provoca la atomización del elemento:



La celda está alineada con el camino óptico de la radiación emitida por la lámpara de cátodo hueco de arsénico, se produce una absorción de la luz por parte de los átomos del analito que será proporcional a su concentración. La absorción aumenta a medida que crece el número de átomos producidos, llega a un máximo y cae al consumirse completamente el analito.

La formación de la arsina depende del pH, ya que el As (III) tiene que estar totalmente protonado antes de reducirse. La señal obtenida de As (V) es un 40% más baja que la obtenida para As (III) debido a que la cinética de formación del hidruro del As (V) es más lenta, por lo que habitualmente se reduce previamente As (V) a As (III) empleando yoduro potásico, solo o combinado con ácido ascórbico. La determinación individualizada de las dos especies presentes en una muestra se realiza por diferencia, aunque es recomendable separar las especies antes del análisis mediante cromatografía, extracción en fase sólida o con cambiadores iónicos. Las ventajas que ofrece HG-AAS frente a otras técnicas de determinación de arsénico son que separa efectivamente el elemento de su matriz química, eliminando así el efecto de interferencias de matriz en el proceso de atomización y disminuyendo la absorción de fondo, y que la atomización de la arsina es más eficiente que la que tiene lugar en absorción atómica convencional (Ulusoy H. I. et al, 2011; Anawar H. M., 2012; Coelho N.M.M et al, 2002).

- *Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).*

Esta técnica es capaz de discriminar diferentes isótopos y además tiene límites de detección bajos, adecuados al análisis de trazas de elementos tóxicos.

Un ICP-MS se puede dividir en cinco partes: introducción de muestra, generación de iones (plasma), interfase de acondicionamiento, discriminador de iones y detector.

Para la determinación de arsénico, la muestra es introducida por nebulización neumática a través de la cámara de rocío al plasma. El aerosol de la muestra es llevado al centro del plasma de argón de alta temperatura donde la muestra es atomizada e ionizada para producir una nube de iones cargados positivamente. Los iones son extraídos, identificados y cuantificados mediante un cuadrupolo, que puede barrer todo el rango de masas y realizar el análisis multielemental. Los resultados obtenidos se comparan con la recta de calibración para obtener la concentración del elemento en la muestra. Las interferencias isobáricas y poliatómicas se corrigen mediante ecuaciones de interferencias basadas en la abundancia isotópica natural.

La combinación de esta técnica de detección con una etapa previa de separación cromatográfica por cambio iónico, permite la separación de las especies de arsénico, tanto inorgánicas (arsenito, arseniato) como orgánicas (monometilarsénico, MMA, dimetilarsénico, DMA, arsenobetaína) (Marcinkowska et al, 2015; Litter et al., 2009).

1.3. Optimización de métodos analíticos.

Tradicionalmente, la optimización se ha realizado mediante el método de ensayar "un factor a la vez", que consiste en realizar la experimentación cambiando un solo factor permaneciendo el resto constante en unas condiciones específicas. Requiere realizar muchos ensayos y es en la mayoría de los casos incapaz de alcanzar el óptimo porque no puede simular ni investigar las interacciones entre factores.

Por el contrario, los métodos de optimización de "muchos factores a la vez", consiguen no solo hallar la combinación óptima de los niveles de las variables de entrada con un reducido número de experimentos, sino evaluar las interacciones entre factores y estimar el porcentaje de contribución a la varianza de las respuestas debido a cada factor, lo que permite discernir los factores críticos.

El diseño de experimentos (*design of experiments*, DOE) ayuda a investigar simultáneamente los efectos de varias variables de entrada (factores) sobre una o varias variables de salida (respuestas), con un gran ahorro de experimentación. Para ello se realizan ensayos en los que se introducen cambios deliberados en los valores o niveles de los factores, diseñados de acuerdo a un patrón específico definido por el diseño elegido, y se registra el resultado. El análisis de varianza de los resultados de los experimentos realizados permite identificar los factores ensayados que ejercen un efecto significativo en la respuesta, y a partir de ahí identificar el nivel o valor del factor que produce la respuesta óptima del sistema.

Entre los diseños de experimentos más populares cabe destacar: diseños factoriales completos y fraccionales, de superficie de respuesta, de Plackett & Burman, de bloques aleatorios, de cuadrado latino y grecolatino, y los arreglos ortogonales de Taguchi (Box et al., 1978; Ross, 1988; Gutiérrez Pulido, Dean et al., 2012).

El diseño de parámetros de Taguchi se ha popularizado en el campo de la ingeniería porque, además de buscar optimizar la respuesta, consigue que esta sea insensible a variaciones incontroladas del sistema, haciendo el proceso o producto robusto frente a dicha variabilidad no controlada. Para ello, esta metodología introduce intencionadamente la variabilidad en el diseño de experimentos, en forma de factor de ruido, y realiza la experimentación combinando los factores de control a optimizar y el factor de ruido con el objeto de encontrar la relación señal-ruido (S/R) óptima. El objetivo no es eliminar la variación incontrolada (ruido), sino diseñar los productos y/o procesos de forma que los efectos provocados por factores no controlables no influyan o lo hagan mínimamente.

La mayor parte de los investigadores optimizan los sistemas de medida (métodos analíticos) para un único valor de la respuesta. Pero los sistemas de medida se aplican en la práctica a rangos amplios de valores, definidos por las concentraciones reales de analito en las muestras, y no se tiene la certeza de que el efecto de los factores de control y de ruido sea el mismo cuando la magnitud de la respuesta varía, es decir, es necesario conseguir que la variación debida a los factores de ruido sea mínima en todo el rango de medida.

Para abordar esta cuestión se ha introducido en el diseño experimental el concepto de variable dinámica y de relación señal-ruido (S/R) dinámica (Wu y Wu, 1996). La S/R dinámica contempla la relación lineal (correlación), la sensibilidad (pendiente de la línea de calibrado en un método de análisis) y variabilidad (error residual) de la respuesta entre la entrada y la salida de un sistema de

medida dinámico. Para lograr que la respuesta sea óptima en todo el rango de medida es requisito imprescindible que la relación entre las variables de entrada y la variable de salida sea lineal en todo el rango de la respuesta.

El diseño de experimentos de Taguchi para variables dinámicas aplicado a la optimización de un método de análisis para la determinación de arsénico en aguas implica los pasos siguientes:

- Definir el rango dinámico para la variable: rango lineal de respuesta del método deseado
- Definir los factores de control que afectan a la respuesta a optimizar (señal analítica) y los niveles a ensayar.
- Elegir el factor de ruido cuyo efecto en la respuesta se pretende minimizar e introducirlo en la experimentación a dos niveles extremos que simulen la composición variable de la matriz analítica.
- Elegir el arreglo ortogonal en el que se puedan encajar los factores de control elegidos y sus niveles.
- Realizar la experimentación aleatorizando el orden de realización de los experimentos.
- Analizar los resultados mediante ANOVA para encontrar la máxima sensibilidad (máxima pendiente), el máximo rango lineal y la máxima relación S/R (mínimo error residual).

2. OBJETIVOS

La presencia de elevados niveles de arsénico en las aguas subterráneas de muchos acuíferos de Castilla y León, en especial en la margen sur de la cuenca del Duero, hacen necesario disponer de métodos rápidos, sencillos y baratos para determinar tanto la concentración total de arsénico como los contenidos individuales de las especies más tóxicas y abundantes, arsénico (III) y arsénico (V).

Dentro de las técnicas más sencillas y asequibles disponibles en los laboratorios analíticos se encuentran la espectrometría de absorción atómica por generación de hidruros (HG-AAS) y la voltamperometría de redisolución anódica (ASV) con electrodos de oro, siendo los electrodos serigrafiados desechables los más adecuados para análisis de rutina.

Estas técnicas poseen la sensibilidad y selectividad adecuadas para su empleo en la determinación de especies inorgánicas de arsénico, pero presentan algunas limitaciones que los laboratorios analíticos deben solventar para poder obtener resultados técnicamente válidos:

- Repetibilidad: los electrodos sólidos empleados para la determinación de arsénico por ASV presentan un problema de ensuciamiento de su superficie que se traduce en medidas poco reproducibles. En HG-AAS la pérdida de precisión suele estar asociada a la dificultad para obtener una llama estable.
- Veracidad o sesgo: causado habitualmente por una mala corrección del blanco o por el efecto de la matriz analítica, este último es especialmente acusado en ASV.
- Rango lineal pequeño. Cuando se analizan muestras con niveles de concentración muy variables, como en el caso de As en aguas subterráneas, es conveniente disponer de un amplio rango lineal que evite tener que diluir muestras concentradas. El rango lineal se puede ajustar en ASV adaptando el tiempo de deposición al nivel de analito en la muestra, pero es más difícil de ampliar en HG-AAS.

En este trabajo se ha abordado la optimización de estos dos métodos analíticos para la determinación de As (III) y As (V) en aguas naturales, empleando diferentes tipos de diseños experimentales (optimización variable a variable, diseño factorial completo y diseño de Taguchi para variables dinámicas), para solventar estos los tres problemas descritos y obtener métodos robustos, esto es, insensibles al efecto matriz, que proporcionen resultados veraces y precisos frente a variaciones incontroladas de las condiciones experimentales de medida.

Una vez estudiado el efecto de diversos factores experimentales en la señal analítica y optimizadas las condiciones experimentales de medida, los métodos se validarán para verificar que los resultados proporcionados son adecuados al fin último, que es la determinación especiación de trazas de As (III) y As (V) en aguas continentales, superficiales y subterráneas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Los equipos que se han utilizado para llevar a cabo la optimización de un método de especiación de arsénico en agua son: un equipo de voltamperometría de redisolución anódica con un electrodo de oro y un espectrómetro de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS).

Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada con una conductividad máxima de 20 $\mu\text{S}/\text{cm}$. La calidad de todos los reactivos empleados fue p.a. (para análisis) o superior. Los patrones de As (III) y As (V) se prepararon por pesada en una balanza analítica de precisión $\pm 0.1\text{mg}$, por lo que las concentraciones calculadas están expresadas en mg/kg o $\mu\text{g}/\text{kg}$. No obstante, como las disoluciones de los patrones de calibración son muy diluidas, se ha considerado que su densidad es 1 y se han usado los valores de concentración en $\mu\text{g}/\text{L}$ en todos los cálculos posteriores.

Se realiza la validación del método utilizando agua subterránea recogida de la fuente Baños de Cerrato (Palencia).

Patrones de calibración:

Para la preparación de los patrones de As (III) se partió de un patrón comercial de 1000 mg/L estabilizado con ácido, del cual se pesan 0.5g en un recipiente de plástico de 50mL, se añaden 100 μL de HCl concentrado para acidificar y se enrasa con agua desionizada hasta 50g, obteniendo así una disolución de 10 mg/L . Esta disolución se conserva refrigerada y se renueva quincenalmente.

Semanalmente se prepara un patrón de As (III) de 1 mg/L en un recipiente de plástico de 50mL. Se añaden 5g de la disolución patrón de 10 mg/L de As (III), 100 μL de HCl concentrado y se enrasa hasta 50g. Este patrón es el que se empleará para la preparación de los patrones de calibración de As (III).

Los patrones de As (V) se han preparado a partir de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ del 99.98% de pureza (Sigma). Se pesan 0.2082g de la sal en una balanza analítica, se disuelve y enrasa a 50g con agua desionizada en un recipiente de plástico. De esta forma se obtiene un patrón de 1000 mg/L . De la misma forma que en el caso del As (III), se realizan las mismas diluciones, y se obtienen los patrones de 10 mg/L y 1 mg/L .

3.1. Determinación de As por ASV

Para las determinaciones por voltamperometría de redisolución anódica se utilizó un polarógrafo Metrohm CompuTrace equipado con potenciostato/galvanostato y celda polarográfica a la que se han conectado electrodos serigrafados scTRACE (Metrohm) que contienen los tres electrodos: electrodo de trabajo de oro, electrodo de referencia de plata y electrodo auxiliar de carbono.

Antes de empezar a utilizar el electrodo es necesario activarlo, para ello se utiliza una disolución de H_2SO_4 0.5M y KCl 0.05M, preparada con 0.373g de KCl pesado en la balanza de

precisión y 2.78ml de H₂SO₄ concentrado; a continuación, se enrasa hasta 100mL con agua desionizada.

Para la medición de las muestras y patrones se toman 10mL de la muestra de agua a medir y 2mL de una disolución electrolítica preparada previamente. La disolución de electrolito contiene ácido sulfámico 1M, ácido cítrico 0.5M y KCl 0.45M. Para prepararla se pesa en la balanza de precisión 9.71g de ácido sulfámico, 10.51g de ácido cítrico y 3.35g de KCl, se disuelve y se enrasa hasta 100ml con agua desionizada.

En la determinación de As (III) y As total por ASV las reacciones que tienen lugar son las siguientes:

1. Deposición reductiva del elemento. A un potencial de -0.3V tiene lugar la reducción de As (III) sobre la superficie del electrodo de oro: $\text{As (III)} + 3\text{e}^- \rightarrow \text{As (0)}$. Si se aplica $E = -0.5\text{V}$, un potencial más reductor, además de la reacción anterior también tiene lugar la reducción del As (V), $\text{As (V)} + 5\text{e}^- \rightarrow \text{As (0)}$.
2. Redisolución anódica. Una vez que ha finalizado la deposición se aplica el barrido de potencial en el sentido de la oxidación y el As (0) depositado sobre el electrodo se reoxida a As (III) según la reacción: $\text{As (0)} + 3\text{Cl}^- \rightarrow \text{AsCl}_3 + 3\text{e}^-$
Se registra un pico anódico a aproximadamente 0.1 V cuya corriente (altura) es proporcional a la cantidad de As (0) depositada que es proporcional a su vez a la concentración en disolución de As (III) o de As (V) si los parámetros experimentales son constantes.

Se obtienen señales en forma de pico cuya área y altura son proporcionales a la intensidad de corriente registrada y, por ende, a la concentración de arsénico en la disolución.

Se pueden aplicar diferentes modulaciones de potencial al barrido anódico:

-Voltamperometría de onda cuadrada (Square Wave, SW). La corriente anódica se mide en intervalos de tiempo cortos en la parte final de la onda positiva, que corresponde a la reoxidación del As depositado en el electrodo, al tiempo t_{11} , y se mide en la parte final de la onda negativa, al tiempo t_{12} , de cada onda cuadrada. La diferencia de intensidades, $i_1 - i_2$, se registra en función del valor del potencial en cada escalón. Se obtiene un voltamperograma donde la señal que corresponde a la oxidación del As (0) es un pico casi simétrico.

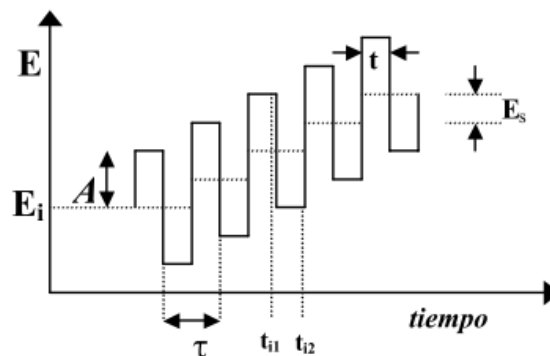


Fig. 3.1.1. Variación del potencial con el método de onda cuadrada (SW).

-Voltamperometría diferencial de impulsos (Diferential Pulse, DP). El potencial inicial aplicado durante el tiempo de medida aumenta en pequeños incrementos de amplitud constante, ES. Se aplica un impulso de potencial constante en un tiempo corto al final del tiempo de medida. Se miden dos intensidades de corriente, una inmediatamente después de aplicarse el impulso, t_{11} ,

y otra inmediatamente antes de terminar el impulso, t_{i2} . El registro se realiza como la diferencia entre las dos intensidades de corriente, $i_2 - i_1$, en función del potencial impuesto al electrodo.

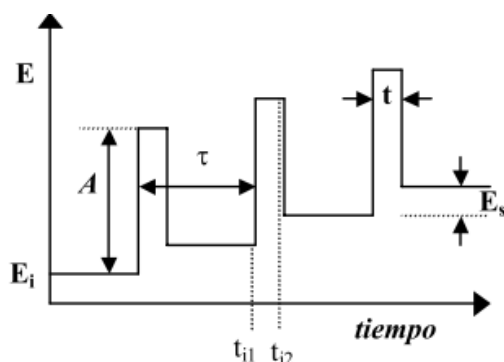


Fig. 3.1.2. Variación del potencial con el método diferencial de impulsos (DP)

Después de la optimización se decide que el método empleado es la voltamperometría de onda cuadrada y se optimizan dentro del método las condiciones que se van a emplear para obtener las líneas de calibrado. Todas las determinaciones se han realizado al menos por duplicado y los resultados mostrados son la media aritmética de las medidas tomadas.

Condiciones instrumentales generales empleadas para la determinación de As por SW-ASV:

Stirrer Speed	3000rpm	Equilibration time	5s
Stirring time	10s	Start potencial	-0.3V
Start potencial	-0.2V	End potencial	0.4V
Vertex potencial	1.0V	Potencial step	0.01V
Cycles	5	Frecuency	25Hz
Deposition time	30s	Pulse amplitud	0.02V
Potencial 2(deposit)	-0.15V		

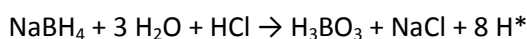
La diferencia entre la determinación de As (III) y As (total) viene dada por el potencial 1, se trata del potencial de acondicionamiento .

As (III)	As (total)
-0.5V	-1.0V

3.2. Determinación de As por HG-AAS

Para llevar a cabo las determinaciones por HG-AAS se utilizó un generador de hidruros Agilent VGA acoplado a un espectrómetro de absorción atómica de llama Varian equipado con celda de cuarzo y lámpara de cátodo hueco de arsénico. La llama utilizada fue aire-acetileno.

Esta técnica consta fundamentalmente de tres etapas: generación y volatilización del hidruro, transferencia del hidruro y atomización en el espectrómetro de absorción atómica. La generación del hidruro se consigue tratando la muestra con una disolución de borohidruro de sodio en medio ácido (HCl). Las reacciones que tienen lugar en el sistema de forma general son:



Donde H^* es el hidrógeno formado y m el estado de oxidación del arsénico.

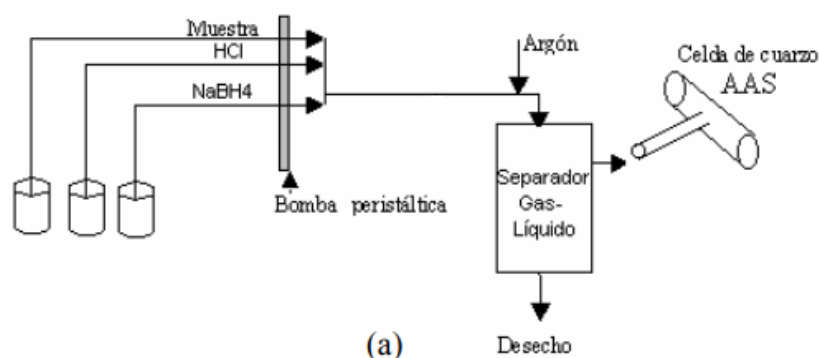


Fig. 3.2.1. Esquema equipo HG-AAS.

Las condiciones instrumentales del sistema son:

Longitud de onda (nm)	193.7(recomendada)-197.2-189.0
Anchura de rendija (nm)	0.5R(recomendada)-0.2-1.0
Corriente de la lámpara (mA)	10
Flujo de aire/acetileno (L/min)	2.2 / 9.8
Gas de arrastre	Argón
Pre-reductor	NaBH ₄

Para llevar a cabo la medición de As (V) se reduce previamente a As (III) añadiendo KI al 1%, acidificando con HCl y dejando un tiempo de reacción de 70 minutos a temperatura ambiente.

Para medir el As es necesaria una disolución reductora del generador de hidruros formada por NaBH₄ con NaOH al 5% que se prepara diariamente, y una disolución ácida formada por HCl. En la optimización del método se estudia la influencia de las concentraciones de ambas disoluciones para obtener los mejores resultados, así como las condiciones instrumentales que pueden afectar a la señal obtenida.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. Optimización de un método ASV para especiación de As en aguas.

Como se pueden aplicar diferentes modulaciones de potencial se optimizan los parámetros de cada uno de los diferentes métodos.

-Voltamperometría de onda cuadrada.

Se estudió el efecto que se produce sobre la intensidad y la forma del pico la variación de diferentes parámetros: frecuencia de onda, potencial del escalón y amplitud, en una disolución de As (III) con una concentración de 15 $\mu\text{g/L}$.

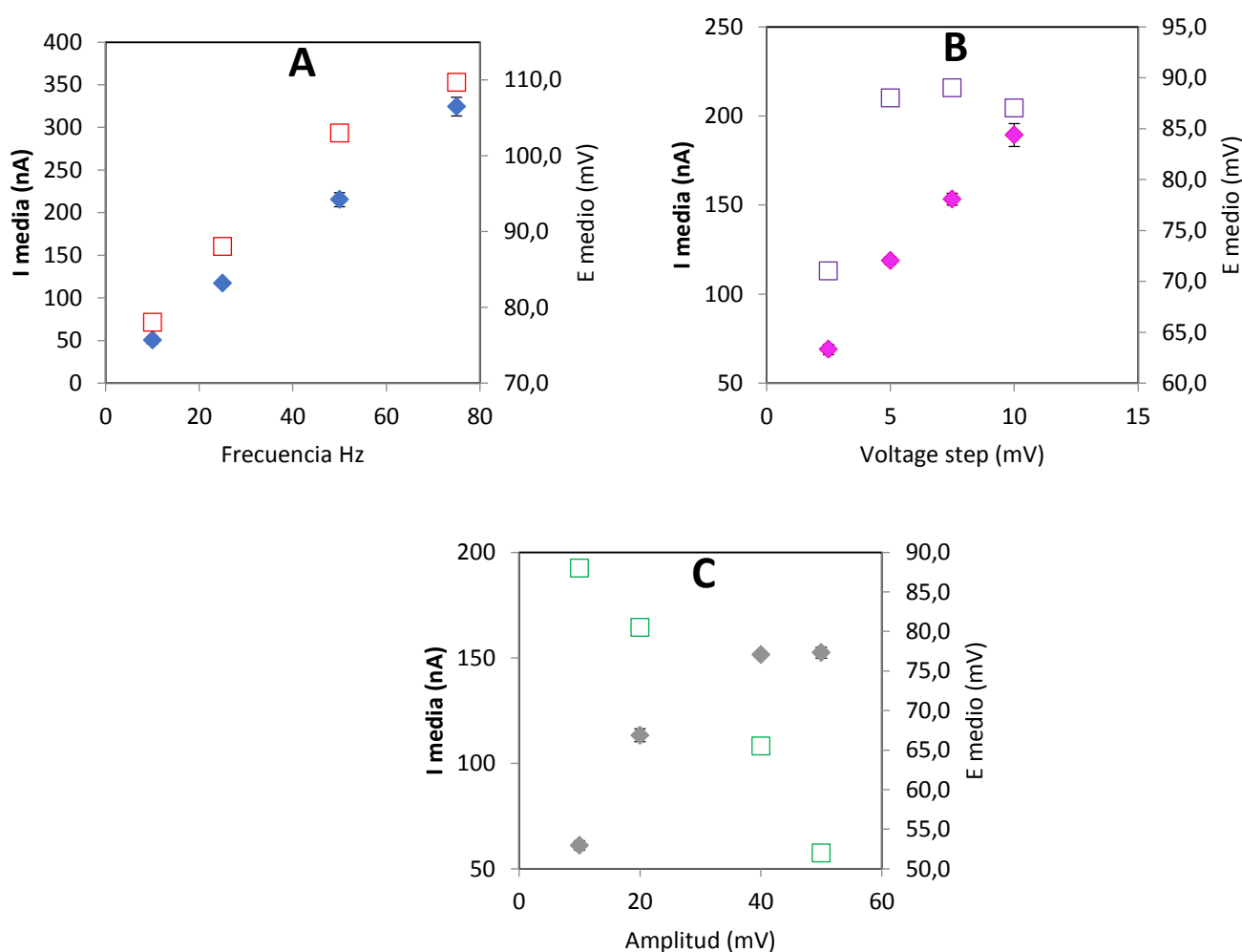


Fig. 4.1.1. Efecto de los parámetros de la onda cuadrada sobre la señal en una disolución de As (III): (A) Frecuencia, (B) Potencial del escalón, (C) Amplitud de la onda. \blacklozenge Intensidad del pico anódico, \square Potencial de pico

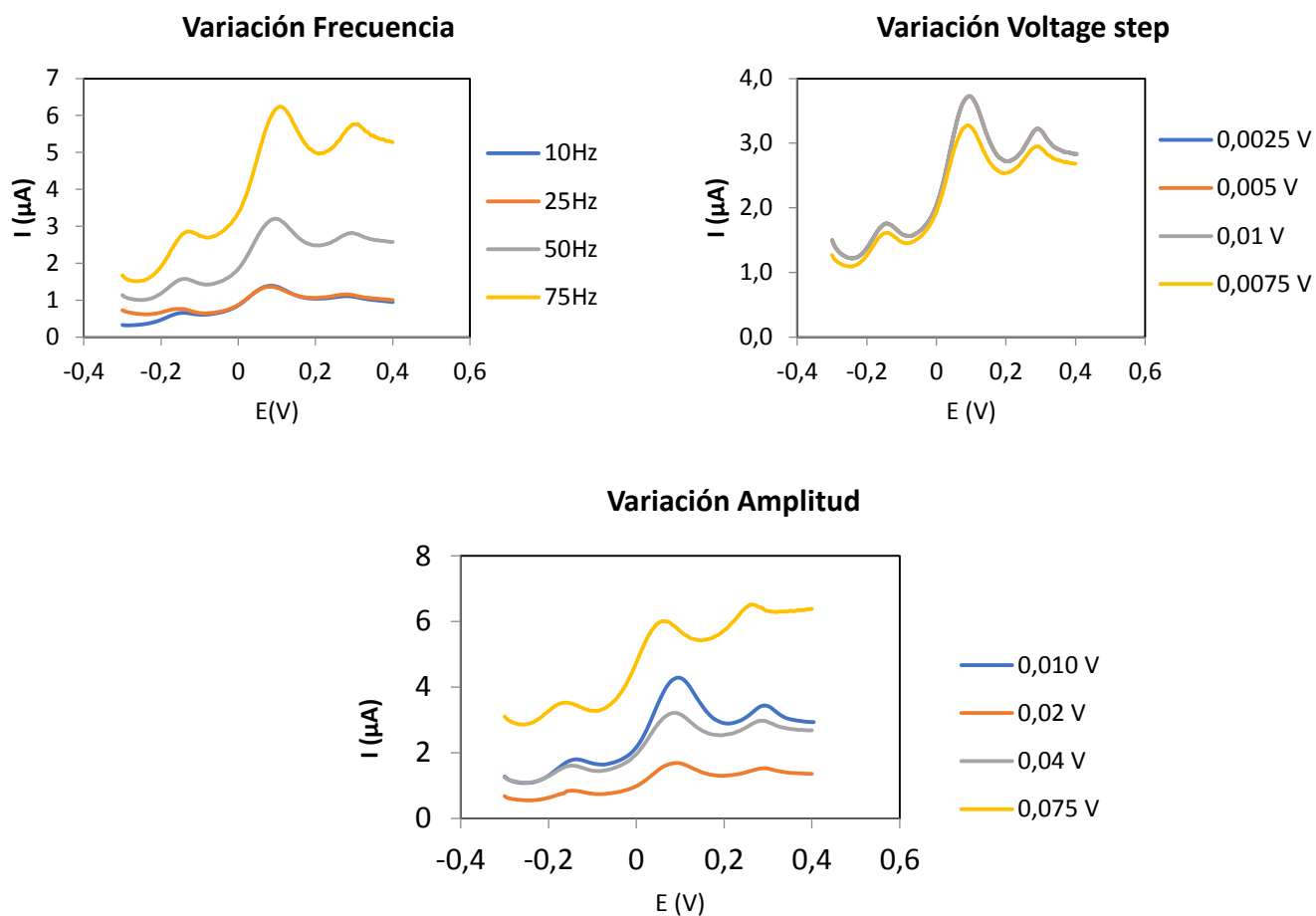
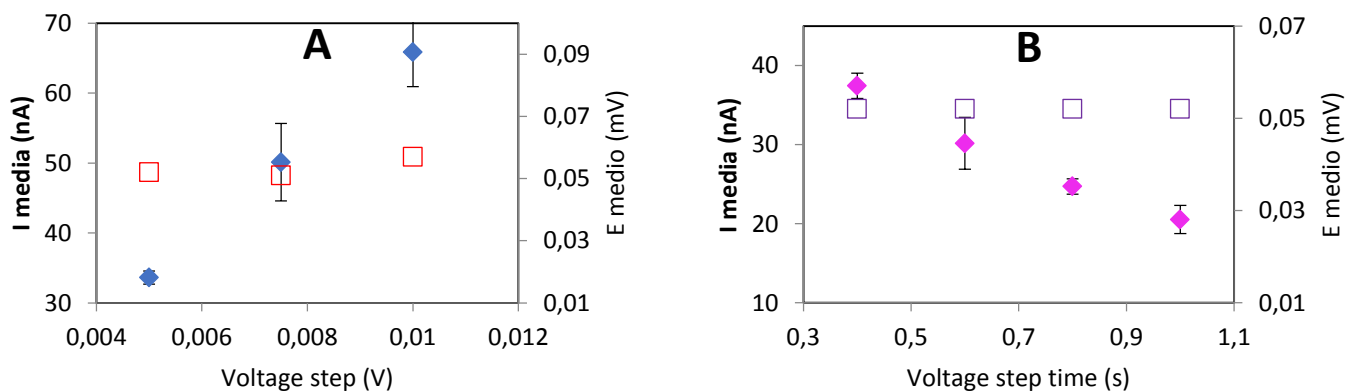


Fig. 4.1.2. Representación de la variación de la forma del pico del voltamperograma en cada una de las condiciones analizadas.

-Voltamperometría diferencial de impulsos.

En este caso también se analiza el efecto de la variación de los parámetros sobre una disolución de As (III) de $15\mu\text{g/L}$, el potencial del escalón, el tiempo aplicando el potencial y la amplitud.



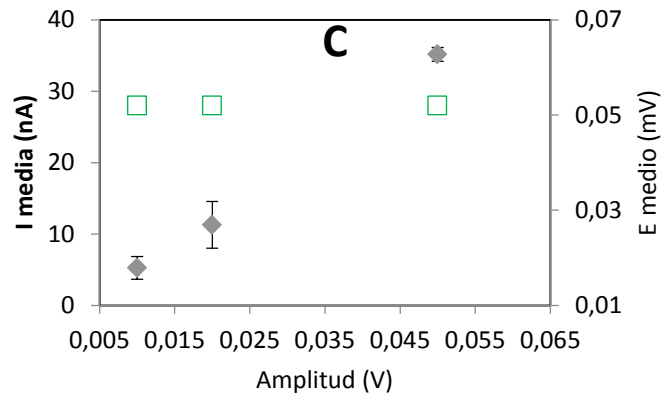


Fig. 4.1.3. Efecto de los parámetros en voltamperometría diferencial de impulsos sobre la señal en una disolución de As (III): (A) Potencial del escalón, (B) Tiempo de aplicación del impulso, (C) Amplitud de la onda. ◆ Intensidad del pico anódico, □ Potencial de pico

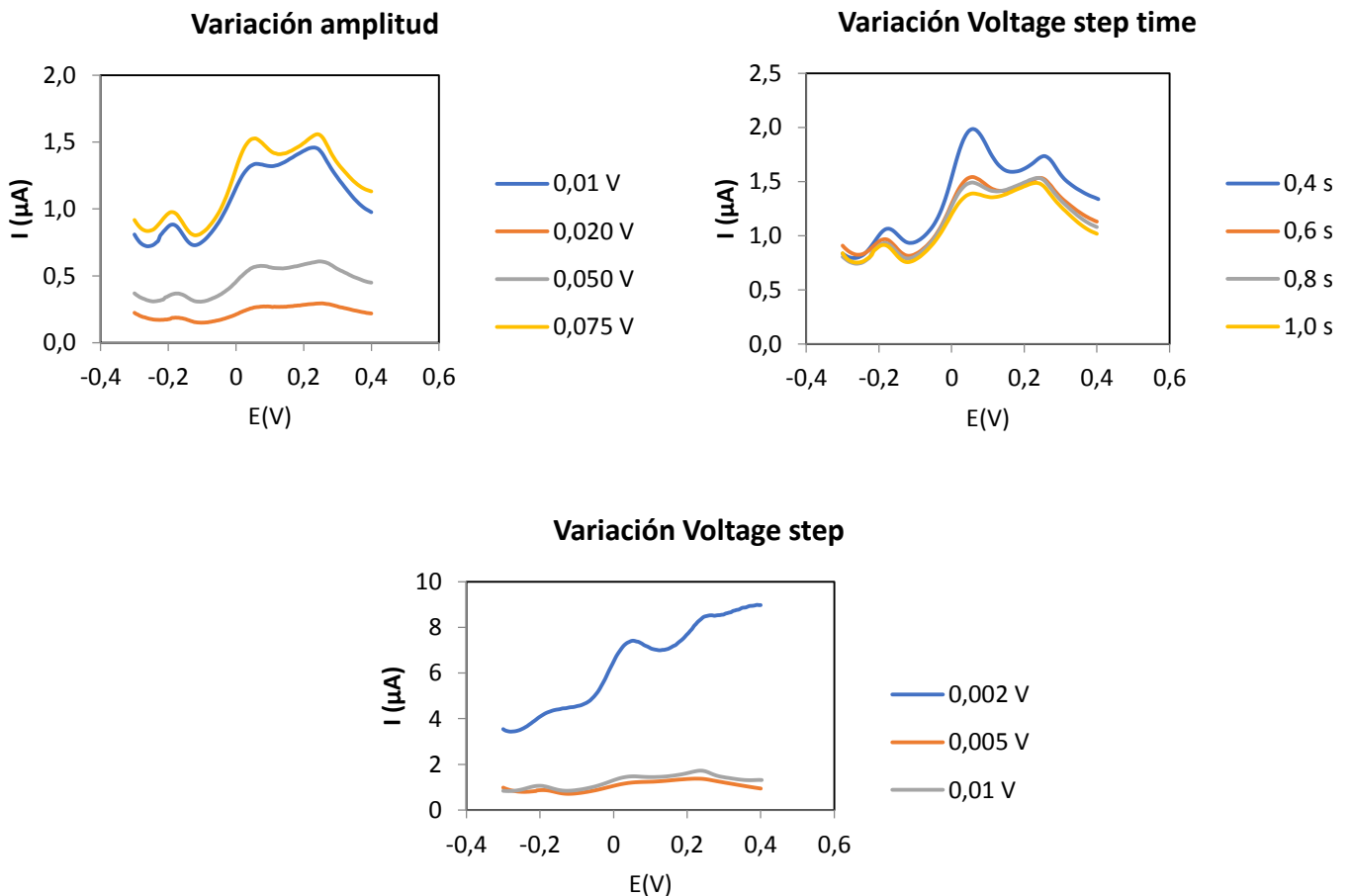


Fig. 4.1.4. Representación de la variación de la forma del pico del voltamperograma en cada una de las condiciones analizadas.

Para seleccionar los valores óptimos de los parámetros voltamperométricos estudiados se tuvieron en cuenta varios criterios: velocidad de barrido alta para disminuir el tiempo de análisis, sensibilidad óptima (corriente de pico elevada) manteniendo la corriente residual a un valor bajo,

pico anódico simétrico y bien resuelto. Con estos criterios, se seleccionó el modo de barrido de onda cuadrada por sus mayores sensibilidad y velocidad de análisis, y los siguientes valores óptimos de los parámetros de la onda cuadrada fueron fijados para subsecuentes medidas: frecuencia 25Hz, amplitud 0.02V y potencial del escalón (voltage step) 0.01V.

Se investigó el efecto del tiempo de deposición sobre la corriente del pico correspondiente a la redisolución anódica del As depositado sobre el electrodo, para establecer rangos de respuesta lineal a diferentes tiempos de deposición. Para ello, se registró la corriente de pico en función de la concentración de As (III) a tres tiempos de deposición de 15, 30 y 60 s, manteniendo constantes el resto de parámetros del método. Los resultados se muestran en la Figura 4.1.5. Se observa que la corriente aumenta linealmente con la concentración hasta 25-30 $\mu\text{g/L}$ para 30 y 60 s de deposición, pero puede incrementarse hasta 50 $\mu\text{g/L}$ cuando se emplean tiempos de deposición menores. Por tanto, la sensibilidad puede modularse en función del nivel de concentración en la muestra, evitando diluciones de la misma que pueden incrementar la incertidumbre del resultado.

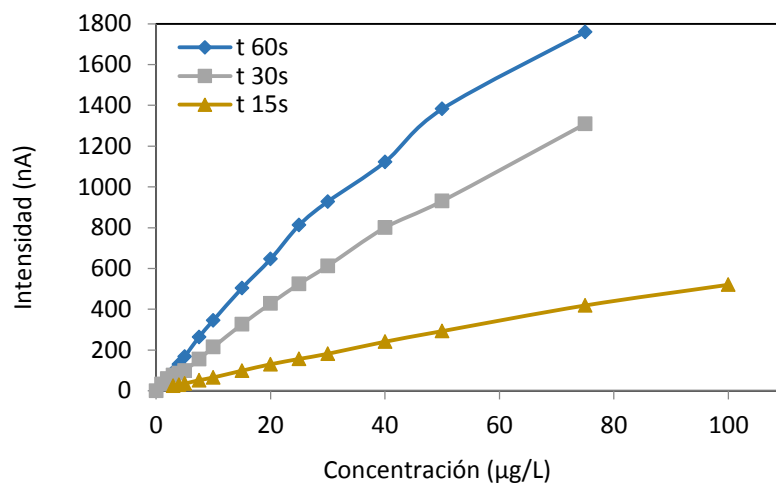


Fig. 4.1.5. Líneas de calibrado para As (III) con diferentes tiempos de deposición.

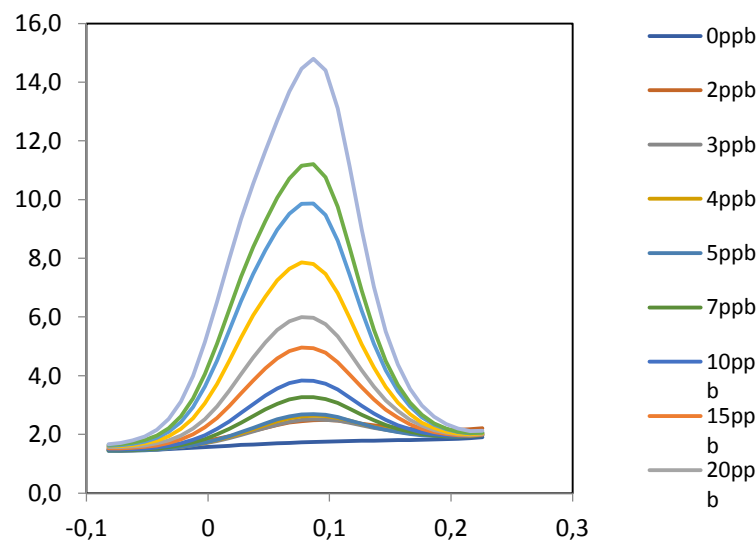


Fig. 4.1.6. Voltamperogramas registrados en función de la concentración de As (III) para un tiempo de deposición de 30 s

Analizando los resultados se elige un tiempo de deposición de 30 segundos para el resto de experimentos de optimización y validación, con el que se obtiene una respuesta lineal entre 0 y 25µg/L

Para completar la optimización del método se deben analizar las condiciones de pretratamiento para encontrar los valores óptimos del potencial de acondicionamiento, al cual se deposita As como As (0), y del potencial de deposición, ligeramente superior que se aplica durante solo unos segundos para eliminar sustancias codepositadas y evitar que se redisuelvan con el As, interfiriendo en su determinación. Para optimizar estos dos parámetros se empleó un diseño factorial completo de dos factores a tres niveles (diseño 3²) que implica realizar 9 experimentos combinando los valores de los factores. Los experimentos se realizan en las condiciones optimizadas anteriormente para el método de onda cuadrada y con una disolución de As (III) de 25mg/ml. Los niveles de los factores ensayados, su combinación en cada experimento, y la corriente media de pico registrada (n=2) se muestran a continuación:

Experimento	E _{acondic} (V)	E _{depos} (V)	I _{media} (nA)
1	-0,6	-0,5	377,9
2	-0,6	-0,25	328
3	-0,6	-0,15	304,9
4	-0,5	-0,5	336,95
5	-0,5	-0,25	269,85
6	-0,5	-0,15	269,15
7	-0,3	-0,5	161,3
8	-0,3	-0,25	128,65
9	-0,3	-0,15	144,2

Un análisis de varianza, ANOVA, de los resultados del experimento ha demostrado que el potencial de acondicionamiento y, en menor medida, el potencial de deposición y la interacción de ambos factores, afectan significativamente ($p < 0.05$) a la corriente de pico registrada.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A: E depos (V)	10532,4	2	5266,18	97,56	0,0000
B: E acond (V)	121310	2	60655,2	1123,71	0,0000
INTERACCIONES					
AB	2169,38	4	542,344	10,05	0,0022
RESIDUOS	485,8	9	53,9778		
TOTAL	134498	17			

La representación gráfica de los valores medios de intensidad de pico a cada nivel de los factores ensayados permite elegir el nivel óptimo de cada factor y observar el efecto de su interacción (Fig. 4.1.7).

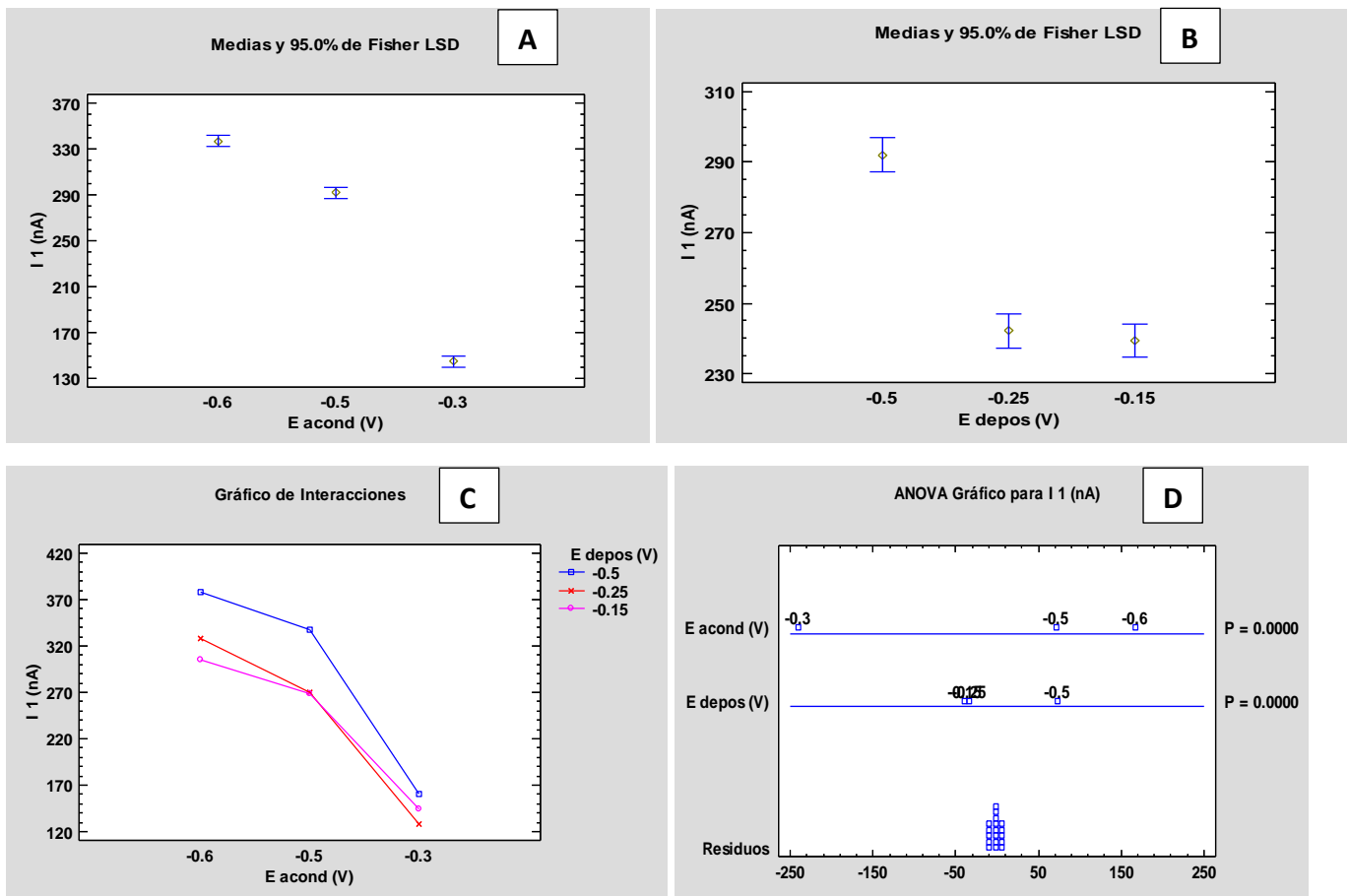


Fig. 4.1.7. Resultados del diseño experimental para optimizar los parámetros de preconcentración de As(III): (A) gráfico de medias del potencial de acondicionamiento, (B) gráfico de medias del potencial de deposición, (C) gráfico de interacciones y (D) gráfico del ANOVA.

En el gráfico A se observa que los intervalos de confianza de las intensidades medias a cada nivel de potencial de acondicionamiento no se solapan, indicando diferencias significativas entre todos los niveles de este factor. En cambio, en la figura B, en el potencial de deposición no existen diferencias significativas entre -0.25V y -0.15V, solo el potencial más negativo produce un cambio significativo en la respuesta debido a que a este valor tan negativo continúa la reducción de As(III) sobre la superficie del electrodo de oro. Este mayor efecto del potencial de acondicionamiento se observa claramente en la figura D.

En el gráfico C se observa que la interacción entre los dos potenciales se produce únicamente cuando se usan los valores más positivos del potencial de deposición. Esa interacción es no obstante débilmente significativa (valor-p 0.0022) y se ha despreciado a la hora de elegir los niveles óptimos.

A la vista de los resultados del diseño de experimentos factorial completo, los niveles óptimos seleccionados para la etapa de preconcentración fueron: potencial de acondicionamiento -0.5V, y potencial de deposición -0.15V; el valor seleccionado para el potencial de deposición no difiere significativamente del valor -0.25V, pero la aplicación de un potencial un poco más anódico puede reducir la potencial interacción de otros metales codepositados con As (p.e. Cu), mejorando la exactitud de los resultados.

Con todos los parámetros optimizados se procede a obtener la línea de calibrado para el As (III) en las condiciones instrumentales seleccionadas se resumen en la tabla.

Stirrer Speed	3000rpm	Potencial 2(deposit)	-0.15V
Stirring time	10s	Equilibration time	5s
Start potencial	-0.2V	Start potencial	-0.3V
Vertex potencial	1.0V	End potencial	0.4V
Cycles	5	Potencial step	0.01V
Potencial 1(acond)	-0.5V	Frecuency	25Hz
Deposition time	30s	Pulse amplitud	0.02V

Para ver el efecto de la matriz analítica de las muestras de agua subterránea para las que el método va dirigido, se registró la línea de calibrado en agua desionizada y en una muestra de agua subterránea con muy baja concentración de As. La Figura 4.1.8 muestra los resultados obtenidos para un tiempo de acondicionamiento (deposición) de 30s. Se observa que las pendientes de ambas rectas son prácticamente idénticas, y tampoco difieren los intervalos de respuesta lineal, entre 0 y 40 µg/L, por lo que se descarta el efecto matriz en la determinación de As(III) en agua subterránea por SW-ASV.

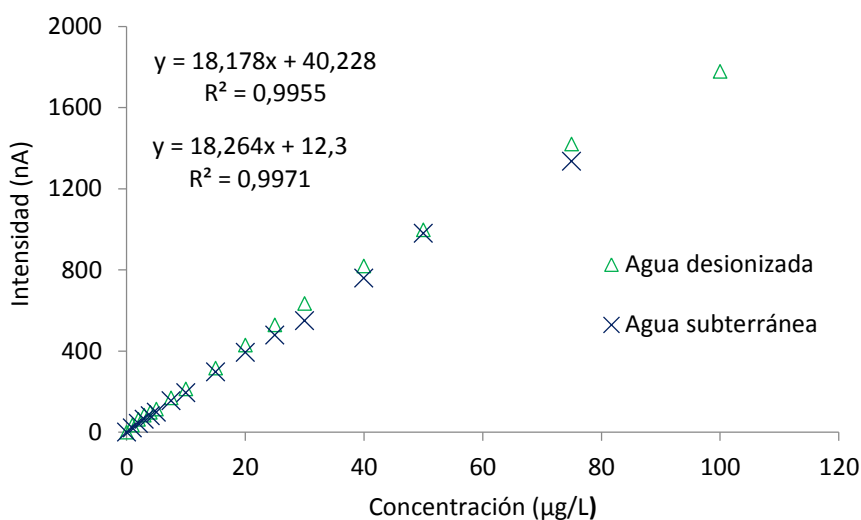


Fig. 4.1.8. Líneas de calibrado para As (III) en una matriz de agua subterránea y en agua desionizada. Tiempo de acumulación, 30s.

Para medir el As (total) en disolución no se tiene que optimizar las condiciones porque ya están optimizadas para el As (III), por lo tanto, de la misma forma que en el caso del As (III) se analiza la diferencia entre utilizar como medio agua desionizada y agua subterránea. Las condiciones de la línea de calibrado son:

Stirrer Speed	3000rpm	Potencial 2(deposit)	-0.15V
Stirring time	10s	Equilibration time	5s
Start potencial	-0.2V	Start potencial	-0.3V
Vertex potencial	1.0V	End potencial	0.4V
Cycles	5	Potencial step	0.01V
Potencial 1(acond)	-1.0V	Frecuency	25Hz
Deposition time	30s	Pulse amplitud	0.02V

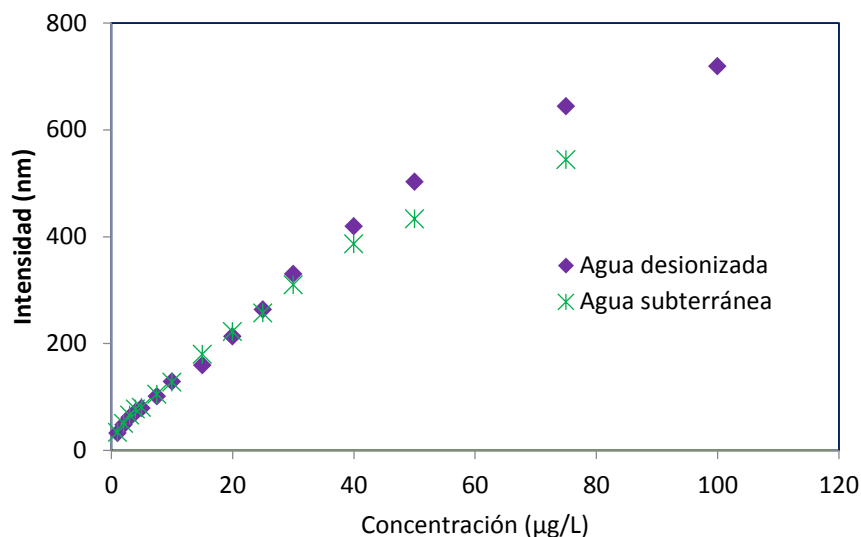


Fig. 4.1.9. Representación de las líneas de calibrado para As total en diferentes medios para analizar el efecto de matriz en el agua subterránea.

En el caso del As (total) el rango lineal obtenido es de 0 a 30 mg/ml en ambos medios, es un rango menor que para el caso del As (III).

Si se representa de forma conjunta las cuatro líneas de calibrado, **fig. 4.1.10**, se observa que la señal para el caso del As (III) es prácticamente el doble que para el caso del As (total).

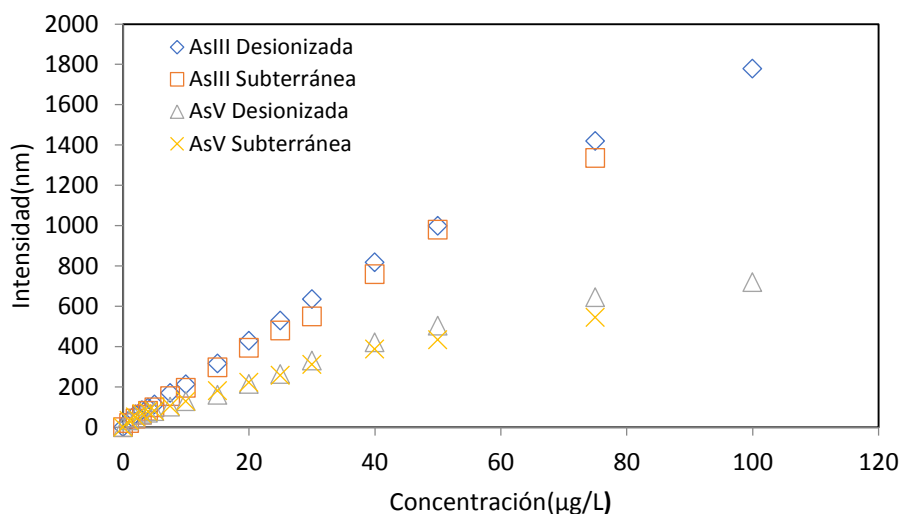


Fig. 4.1.10. Líneas de calibrado para As (III) y As (total) en agua subterránea y agua desionizada.

Se hace una prueba de comparación de pendientes para las dos líneas de As (III) y y también para las de As (total). En el caso del As (III), con agua desionizada y subterránea, el resultado obtenido es que las pendientes son comparables y por lo tanto no existe efecto de matriz. En cambio, en el caso del As (total), las pendientes no son comparables y por lo tanto existiría efecto de matriz que hace necesario el empleo del método de adiciones patrón para como método de calibración.

4.2. Optimización de un método HG-AAS para especiación de As en aguas.

Se registraron diferentes líneas de calibrado para As (III) y As (V) en un rango de 0-50 $\mu\text{g/L}$. El objetivo de los ensayos fue estimar el rango lineal de respuesta del equipo en diferentes condiciones, así como encontrar las condiciones óptimas de medida. Una vez encontradas las condiciones óptimas se comparó la sensibilidad de la técnica para las dos especies de As mediante la comparación de las pendientes del tramo recto de las líneas de calibrado.

Las diferentes líneas de calibrado se obtienen empleando como disolución reductora una disolución de NaBH_4 0.6% y como ácido HCl 5M.

La longitud de onda recomendada para la determinación de As por HG-AAS es 193.7nm, se intentó ampliar el rango lineal de la línea de calibrado empleando una longitud de onda secundaria, 197.2nm. Incluso en estas condiciones se observa que, para concentraciones superiores a 20 $\mu\text{g/L}$, se pierde la linealidad.

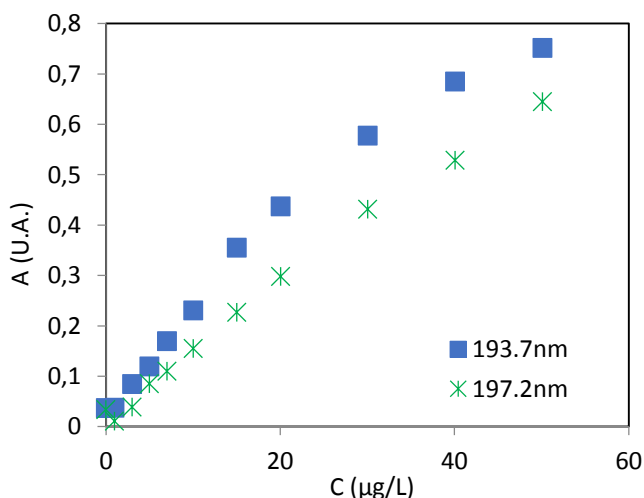


Fig. 4.2.1. Influencia de la longitud de onda en la línea de calibrado de As (III).

Otro de los parámetros que se analiza para aumentar la linealidad de la línea de calibrado es la anchura de la rendija, se tienen tres posibilidades: 0.5R, 0.2, 1.0. Cuando lo que se varía es la anchura de la rendija se observa que la diferencia es mínima por lo que se trabaja con el valor recomendado para el As, que es anchura de rendija 0.5R.

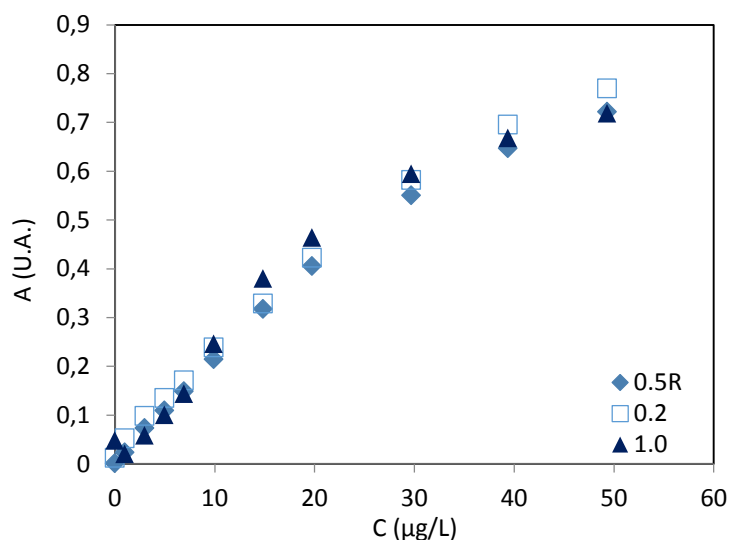


Fig. 4.2.2. Influencia de la anchura de rendija en la línea de calibrado de As (III) para $\lambda = 193.7\text{nm}$.

Como se ve en la fig. 4.2.2 la anchura de rendija no tiene apenas efecto en la pendiente de las líneas de calibrado por lo tanto no será un factor en el diseño del experimentos.

Una vez se han analizado estos parámetros se debe analizar cuál es el efecto que tiene en la linealidad de la línea de calibrado la concentración de NaBH_4 y también la concentración de HCl. Se obtienen líneas de calibrado con las diferentes combinaciones utilizando NaBH_4 : 0.25%, 0.6% y 1.0%, y de la misma forma con HCl: 2M, 5M y 7M.

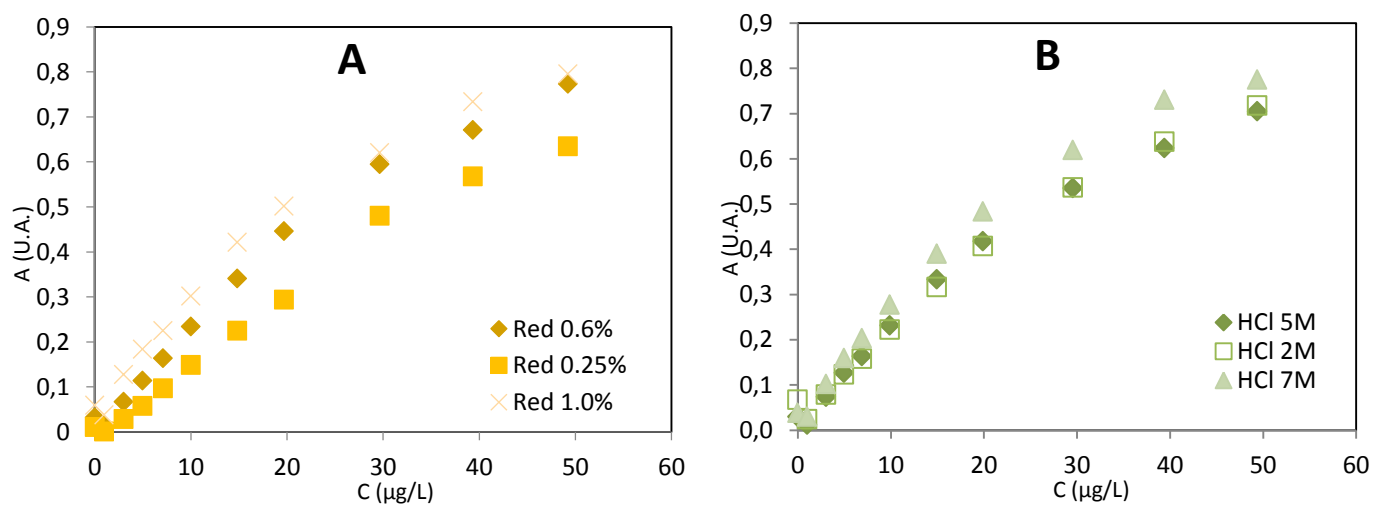


Fig. 4.2.3. Líneas de calibrado de As (III) con longitud de onda 193.7nm, anchura de rendija 0.5R. (A) Influencia de la concentración de NaBH_4 con HCl 5M; (B) Influencia de la concentración de HCl con NaBH_4 al 0.6%.

En el caso del As (V) se realiza una reducción previa a As (III) utilizando KI 1% y acidificando con HCl, por lo tanto además de optimizar los parámetros que se optimizan en el caso del As (III) también se tiene que analizar el efecto que tienen sobre la línea de calibrado utilizar diferentes concentraciones de KI y de HCl para la reducción previa. Se analizan líneas de calibrado con una concentración final de KI: 0.5%, 1.0% y 2.5%, combinándolo con 25ml de HCl: 0.5M, 1M y 2M.

En este caso se comparan las líneas de calibrado obtenidas para las condiciones ya analizadas en el As (III) por lo tanto se mide para una concentración de ácido 2M combinado con una concentración de reductor 0.6% y 0.25%, y empleando las condiciones de medida recomendadas para la anchura de la rendija y la longitud de onda.

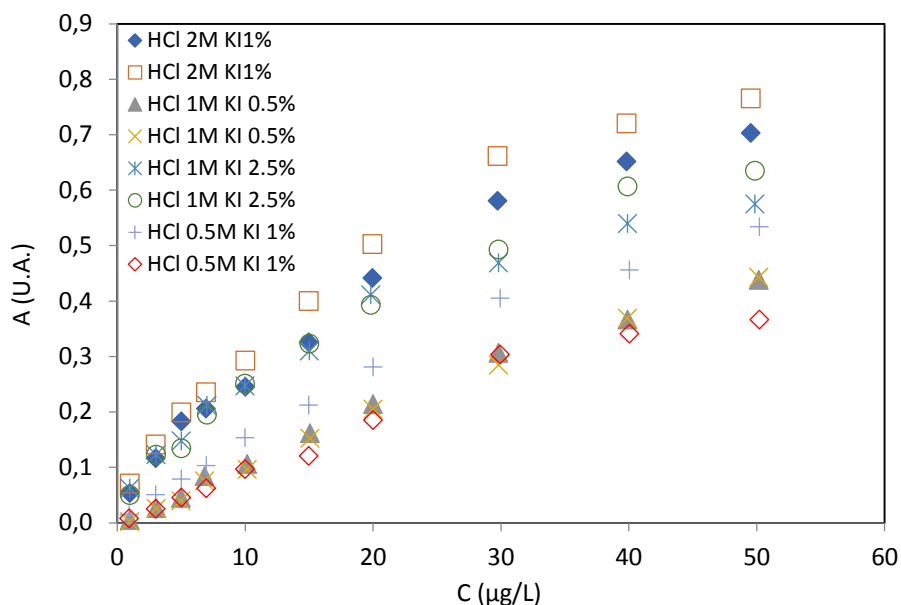


Figura 4.2.4. Variación de las líneas de calibrado de As (V) utilizando una concentración de reductor 0.6% y HCl 2M.

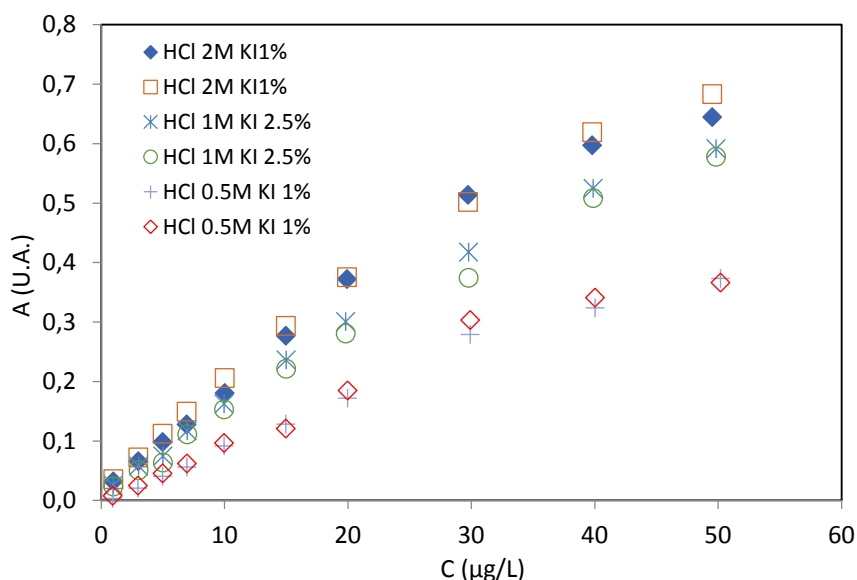


Figura 4.2.5. Variación de las líneas de calibrado de As (V) utilizando una concentración de reductor 0.25% y HCl 2M.

Una vez establecidos los intervalos de los factores que afectan a la determinación de As(III) por HG-AAS se procedió a planificar y realizar un diseño de experimentos de Taguchi para encontrar las condiciones experimentales que influyen en la sensibilidad del método y reducir el efecto de la matriz analítica en el rango lineal, en la sensibilidad y en la precisión de las medidas.

La matriz analítica de las muestras de agua subterránea es un factor de ruido no controlable cuyo efecto debemos minimizar. Para simular el efecto de matriz que tendremos en muestras de agua subterránea y evaluar su efecto en la sensibilidad del método, se prepara una disolución con diferentes iones que se utiliza como medio para los patrones de As, de esta forma se obtienen las líneas de calibrado simulando el efecto que puede causarnos el medio en el que se encuentre el analito. Se utilizan diferentes concentraciones de distintos compuestos:

Compuesto	Concentración (mM)
KNO ₃	0.13
Mg(NO ₃) ₂	2.08
NaHCO ₃	8.20
CaCl ₂	2.82
CaSO ₄	7.20
NaNO ₃	0.70

Se emplean dos disoluciones con iones diferentes, una de ellas con las concentraciones indicadas anteriormente y en el segundo caso se utiliza una preparada a partir de ella realizando una dilución 1:10.

La tabla siguiente muestra los factores de control y el factor de ruido ensayados y sus niveles.

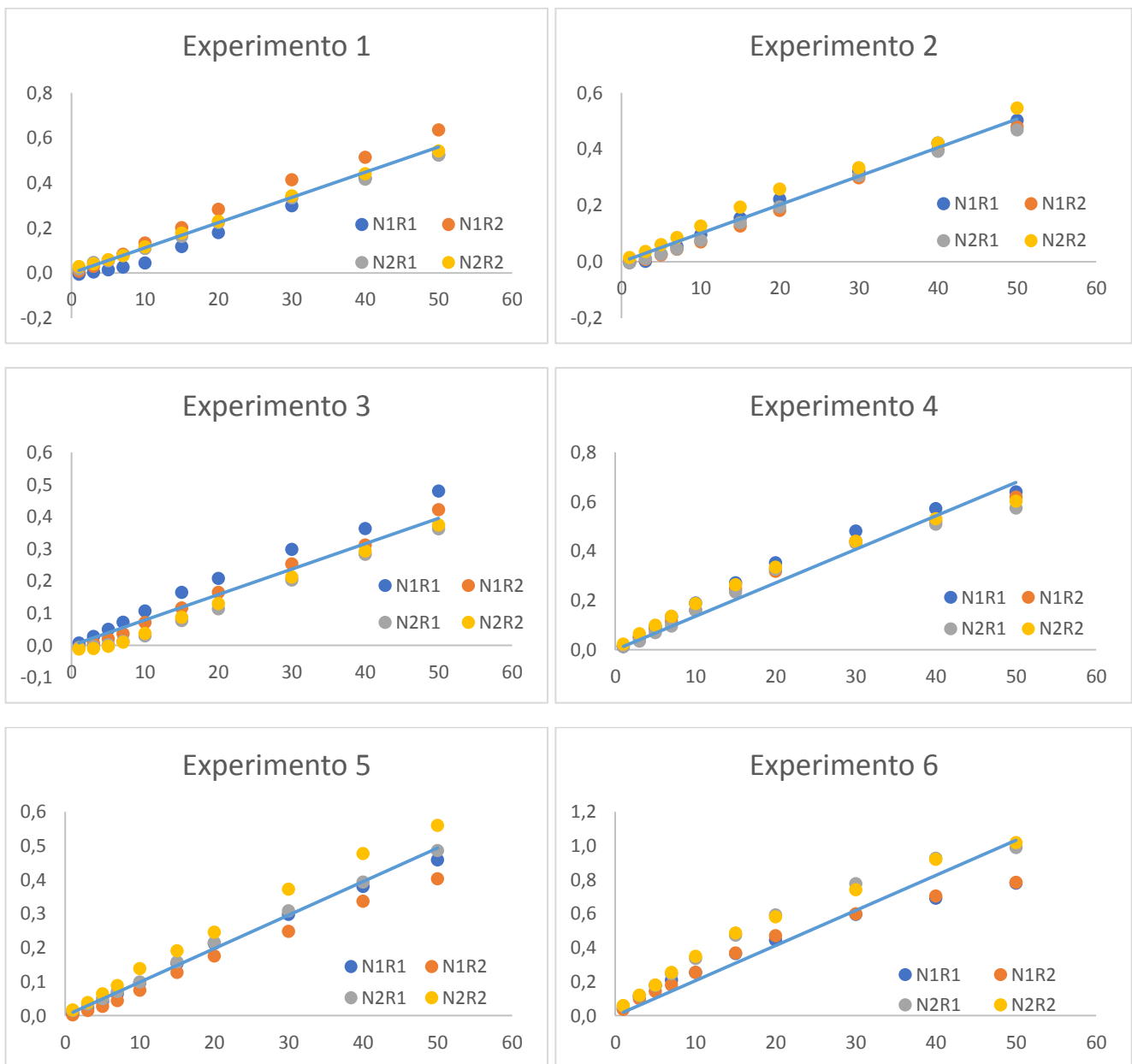
Factor	Símbolo	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Concentración de NaBH ₄ (% m/V)	Red	0,25	0,6	1
Concentración de HCl (mol/L)	Ac	1	2	5
Longitud de onda (nm)	λ	189,0	193,7	197,2
Factor de ruido (iones disueltos)	N	Bajo	Alto	

Tres factores de control (Red, Ac y λ) a tres niveles contienen $3 \times (3-1) = 6$ grados de libertad, por lo que se necesitará hacer al menos 6 diferentes experimentos (6 diferentes combinaciones de los factores de control). El arreglo ortogonal de Taguchi que se ajusta a esos grados de libertad es un L₉(3⁴), que supone 9 experimentos. Cada experimento debe realizarse a 2 niveles del factor ruido y cada uno de los 9x2 experimentos se realizó por duplicado (réplicas simbolizadas por R). La combinación de niveles de los factores de control en las 9 experiencias es la siguiente:

Experimento	Red	Ac	λ
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

Para optimizar el método, no a un único valor de concentración de analito, como sucede con otros diseños de experimentos, sino en todo el rango de aplicación, se realizaron los 9x2x2 experimentos a diferentes concentraciones de As (III) comprendidas entre 1 y 50 µg/L. Para ello, se prepararon patrones de As(III) de concentraciones comprendidas entre 1 y 50 µg/L en las disoluciones diluida y concentrada de iones y se midieron ambas series de patrones dos veces, empleando la combinación de factores de control de cada uno de los 9 diseños de experimentos. De esta forma no se optimiza la respuesta para un único valor de concentración, sino para todo el rango de aplicación, esto es, se optimiza la sensibilidad del método.

Se obtuvieron las 36 líneas de calibrado que se muestran en la Figura 4.2.6.



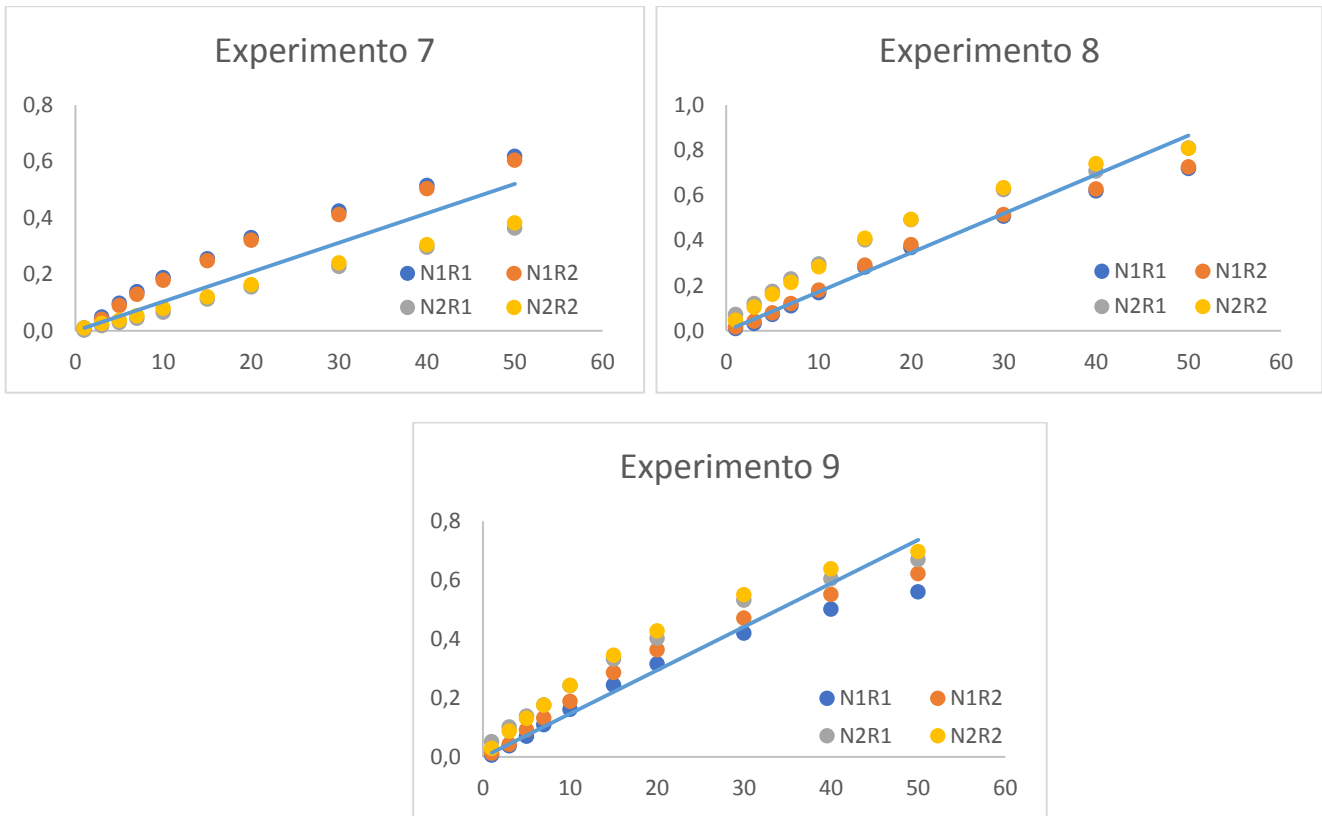
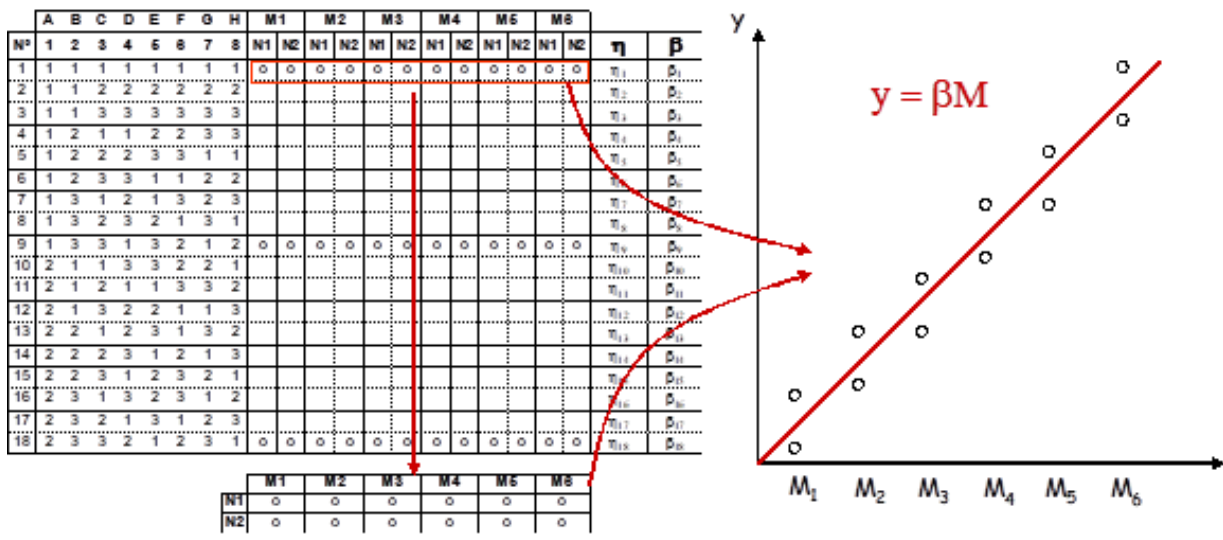


Fig. 4.2.6. Líneas de calibrado en las condiciones de los diferentes experimentos que se analizan para el diseño.

La relación señal-concentración obtenida en la determinación de As(III) por HG-AAS es una función de tipo proporcional en el origen puesto que $A=kC$.



$$\eta_{dinámica} = S / N_{dinámica} = 10 \log \frac{\beta^2}{\sigma^2}$$

$$y = \beta M + e$$

$$\eta = 10 \log \frac{\beta^2}{\sigma^2} \quad S_T = \sum_{i,j}^{r_0, k} y_{i,j}^2 \quad (gl = r_0 k)$$

En estas expresiones, S_T es la suma de cuadrados totales, e simboliza el error residual, β es la sensibilidad (pendiente de las relaciones respuesta-concentración), η es relación señal-ruido dinámica, que es el parámetro a optimizar, y σ simboliza el error total (ruido más falta de ajuste).

Factor señal	M_1	M_2	...	M_k	L
r_0 lecturas	y_{11}	y_{21}	...	y_{k1}	$L_1 = \sum_{i=1}^k M_i y_{i1}$
	y_{12}	y_{22}	...	y_{k2}	$L_2 = \sum_{i=1}^k M_i y_{i2}$

	y_{1r_0}	y_{2r_0}	...	y_{kr_0}	$L_{r_0} = \sum_{i=1}^k M_i y_{ir_0}$
Total	$y_1 = \sum_{j=1}^{r_0} y_{1j}$	$y_2 = \sum_{j=1}^{r_0} y_{2j}$...	$y_k = \sum_{j=1}^{r_0} y_{kj}$	

A partir de las medidas de absorbancia de los patrones de cada uno de los experimentos y empleando las ecuaciones relacionadas debajo, descritas en la bibliografía (Wu y Wu, 1996), se estiman los valores de η , β y S_β para cada uno de los 9 experimentos.

$$S_\beta = \frac{(M_1 y_1 + M_2 y_2 + \dots + M_k y_k)^2}{r_0 (M_1^2 + M_2^2 + \dots + M_k^2)} = \frac{(L_1 + L_2 + \dots + L_{r_0})^2}{r_0 (M_1^2 + M_2^2 + \dots + M_k^2)}$$

$$L_1 = \sum_{j=1}^k M_j y_{1j} = M_1 y_{11} + M_2 y_{12} + \dots + M_k y_{1k}$$

$$L_{r_0} = \sum_{j=1}^k M_j y_{r_0 j} = M_1 y_{r_0 1} + M_2 y_{r_0 2} + \dots + M_k y_{r_0 k}$$

$$S_\beta = \frac{\left(\sum_{j=1}^k M_j y_j \right)^2}{r_0 r} = \frac{\left(\sum_{i=1}^{r_0} L_i \right)^2}{r_0 r} = \frac{(L_1 + L_2 + \dots + L_{r_0})^2}{r_0 r} \quad (gl = 1)$$

$$r = (M_1^2 + M_2^2 + M_3^2 + \dots + M_k^2) = \sum_{j=1}^k M_j^2$$

$$S_T (gl = r_0 k) \begin{cases} S_L (gl = r_0) \\ S_e (gl = r_0 (k-1)) \end{cases} \begin{cases} S_\beta (gl = 1) \\ S_{N\beta} (gl = r_0 - 1) \end{cases}$$

$$S_L = \frac{\left(\sum_{i=1}^{r_0} L_i^2 \right)}{r} = \frac{\left(L_1^2 + L_2^2 + \dots + L_{r_0}^2 \right)}{r} \quad (\text{gl} = r_0)$$

$$S_{N\beta} = S_L - S_\beta = \frac{\left(L_1^2 + L_2^2 + \dots + L_{r_0}^2 \right)}{r} - \frac{\left(L_1 + L_2 + \dots + L_{r_0} \right)^2}{r_0 r} \quad (\text{gl} = r_0 - 1)$$

$$S_e = S_T - S_L \quad (\text{gl} = r_0(k-1))$$

$$S_N = S_{N\beta} + S_e = S_T - S_\beta \quad (\text{gl} = r_0 k - 1)$$

$$V_e = \frac{S_e}{r_0(k-1)} \quad (\text{gl} = r_0(k-1)); \quad V_N = \frac{S_N}{r_0 k - 1}$$

$$\eta = 10 \log \frac{\frac{1}{r_0 r} (S_\beta - V_e)}{V_N}$$

$$S = 10 \log \frac{1}{r_0 r} (S_\beta - V_e) = 10 \log \beta^2$$

$$\beta = 10^{\frac{S}{20}}$$

Experimento	Red	Ac	λ	η	S_β	β
1	1	1	1	-9,39	-39,02	0,0112
2	1	2	2	-7,10	-39,89	0,0101
3	1	3	3	-12,69	-42,04	0,0079
4	2	1	2	-10,03	-37,35	0,0136
5	2	2	3	-10,50	-40,11	0,0099
6	2	3	1	-14,35	-33,70	0,0207
7	3	1	3	-17,18	-39,65	0,0104
8	3	2	1	-13,24	-35,24	0,0173
9	3	3	2	-13,66	-36,63	0,0147

El ANOVA de estos resultados nos permitirá identificar los factores de control que afectan significativamente a estos tres parámetros. Las tablas de ANOVA que se muestran a continuación muestran que:

- Ninguno de los factores de control ensayados tienen efecto significativo en la relación señal/ruido, η .
- Ninguno de los factores de control ensayados tienen efecto significativo en la sensibilidad de las mediciones por HG-AAS en las condiciones ensayadas, β .
- Sólo la longitud de onda de medida tienen un efecto mínimamente significativo en la bondad del ajuste, esto es, en la linealidad de la recta de calibrado entre 1 y 50 $\mu\text{g/L}$ de As(III).

Tabla de ANOVA para la relación señal-ruido, η .

Fuente Variación	gl	SS	MS	F	S'	%	p	F _{crítico}
Red	2	37,67	18,83	8,792134	33,38	45,09	0,1021	19,000
Ac	2	16,35	8,17	3,815506	12,06	16,29	0,2077	19,000
λ	2	15,74	7,87	3,674936	11,46	15,48	0,2139	19,000
R = e	2	4,28	2,14					
e _p					17,14	23,14		
Total	8	74,04			74,04	100,00		

Tabla de ANOVA para la sensibilidad, bondad del ajuste, S_{β} .

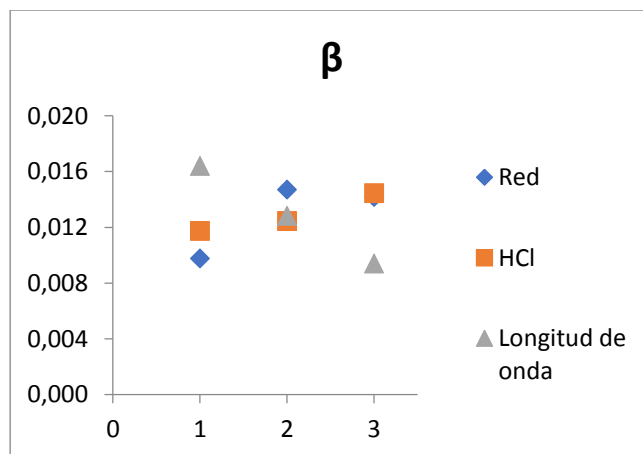
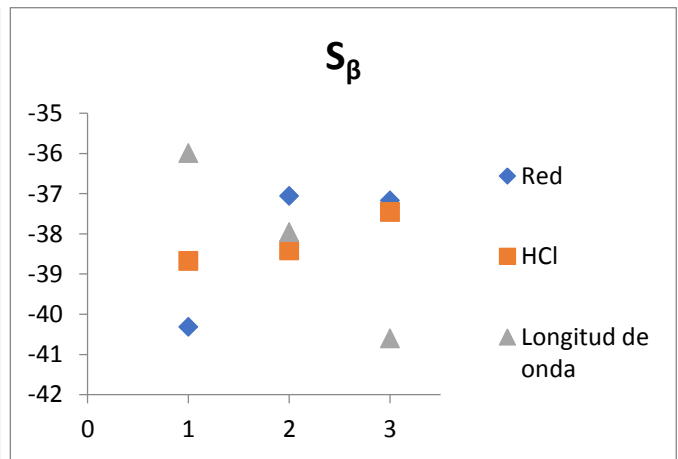
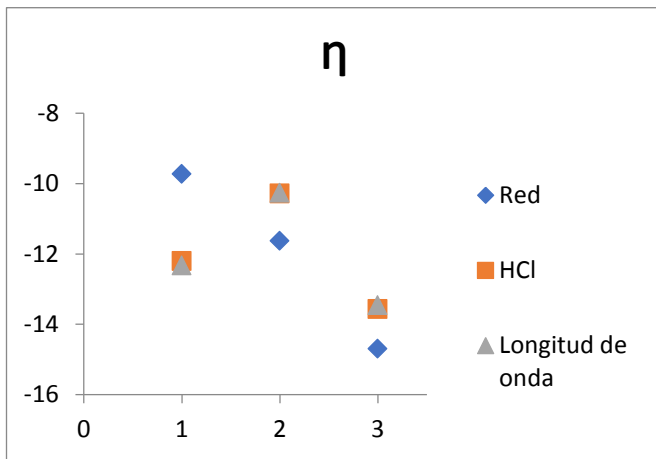
Fuente Variación	gl	SS	MS	F	S'	%	p	F _{crítico}
Red	2	20,56	10,28	19,26	19,49	34,64	0,0494	19,000
Ac	2	2,46	1,23	2,31	1,39	2,48	0,3025	19,000
λ	2	32,18	16,09	30,15	31,12	55,30	0,0321	19,000
R = e	2	1,07	0,53					
e _p					4,27	7,59		
Total	8	56,27			56,27	100,00		

Tabla de ANOVA para la sensibilidad, pendiente de la línea de calibrado, β .

Fuente Variación	gl	SS	MS	F	S'	%	p	F _{crítico}
Red	2	0,000044	0,000022	9,114451	0,000039	29,38	0,0989	19,000
Ac	2	0,000012	0,000006	2,437309	0,000007	5,20	0,2909	19,000
λ	2	0,000073	0,000037	15,06973	0,000068	50,94	0,0622	19,000
R = e	2	0,000005	0,000002					
e _p					0,000019	14,48		
Total	8	0,000134			0,000134	100,00		

Los valores medios de η , β y S_{β} para cada uno de los niveles de los factores de control permitirá identificar las condiciones experimentales que minimizan el efecto del factor de ruido (η máximo), mejoran la sensibilidad del método (β máximo) y mejoran la linealidad (S_{β}). Dichos valores medios se tabulan a continuación. La Figura 4.2.7 muestra gráficamente esos valores.

η	Red	Ac	λ	R = e
1	-9,72	-12,20	-12,32	-11,18
2	-11,63	-10,28	-10,26	-12,87
3	-14,69	-13,56	-13,46	-11,99
Dif.	4,97	3,29	3,19	1,69
S_{β}	Red	Ac	λ	R = e
1	-40,32	-38,67	-35,99	-38,59
2	-37,05	-38,41	-37,96	-37,74
3	-37,17	-37,46	-40,60	-38,21
Dif.	3,26	1,22	4,62	0,84
β	Red	Ac	λ	R = e
1	0,0097	0,0117	0,0164	0,0119
2	0,0147	0,0124	0,0128	0,0137
3	0,0142	0,0144	0,0094	0,0129
Dif.	0,0050	0,0027	0,0070	0,0018



Figuras 4.2.7. Variación de los parámetros η , β y S_{β} en función del nivel de los factores de control ensayados.

Se observa que la máxima linealidad se consigue empleando $\lambda=189$ nm; el resto de los factores no influyen significativamente en los parámetros a optimizar, por lo que se seleccionará la combinación de niveles de los factores que minimice el efecto de la matriz analítica, esto es, maximice la relación S/R, η . Los experimentos en los que las líneas de calibrado han sido más reproducibles y los rangos lineales más amplios han sido los experimentos 2, 4 y 6. Si se comparan los experimentos 2 y el 6, se ve que con el experimento 6 hay un menor rango lineal y además los puntos quedan más separados, es decir, hay una mayor influencia del ruido. Se eligieron finalmente las condiciones experimentales del experimento 2 que, a costa de perder sensibilidad, minimiza la influencia del efecto matriz, mejora la reproducibilidad y aumenta el rango lineal, lo cual es deseable para la determinación de As en aguas subterráneas contaminadas por este elemento tóxico.

Las condiciones seleccionadas para medir As en agua por HG-AAS fueron finalmente: Reductor 0.25%, HCl 2M, anchura de rendija 0.5R y longitud de onda 193.7nm.

Una vez confirmado se hacen varias líneas de calibrado con As (III) para comparar el efecto de matriz, se utiliza agua desionizada, la concentración de iones alta y la dilución de iones diluida, cada una de ellas se hace por duplicado. Para comprobar se preparan dos muestras con agua de río y subterránea dopadas con 20ppb de As (III).

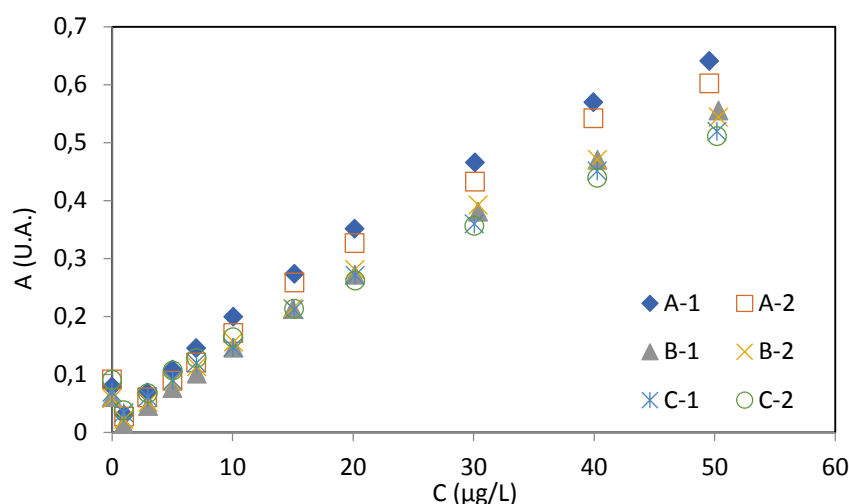


Fig. 4.2.8. Líneas de calibrado para As (III) en las condiciones óptimas, (A) en agua desionizada, (B) en matriz simulando concentración baja de iones, (C) en matriz simulando concentración alta de iones.

Se realizan medidas replicadas de la línea de calibrado en varios días pero la pendiente es muy variable entre días y se concluye que no se trata de un método reproducible ya que hay mucha variación entre las pendientes de las líneas que tienen las mismas condiciones. Se debe emplear por lo tanto el método de adiciones patrón.

Método de adiciones patrón.

En el método de adiciones patrón se comparan tres de los experimentos analizados anteriormente, en concreto los experimentos 2, 3 y 7.

Para este método en cada experimento se analiza un blanco preparado con agua desionizada y una muestra de agua subterránea dopada con 10 µg/L de As(III).

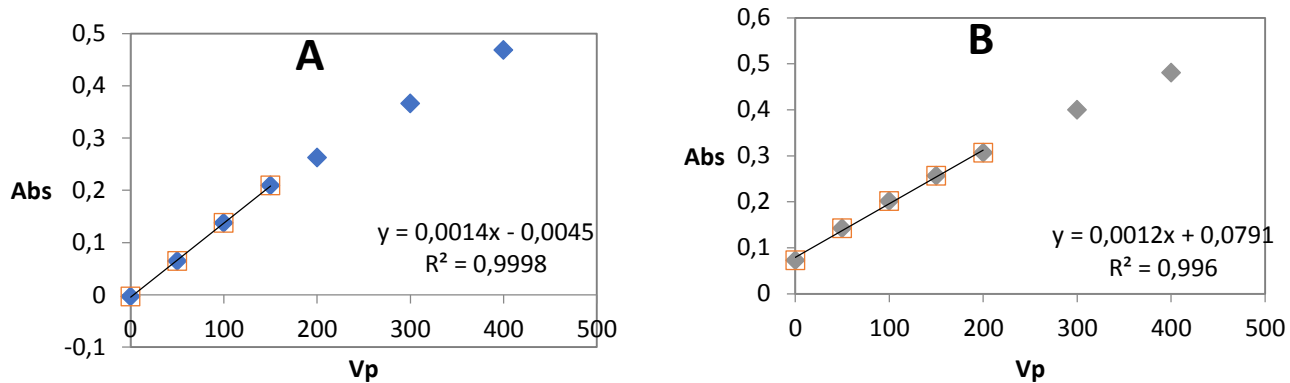


Fig. 4.2.9. Método de adiciones patrón en las condiciones del experimento 2, (A) agua desionizada, (B) agua subterránea dopada con As (III).

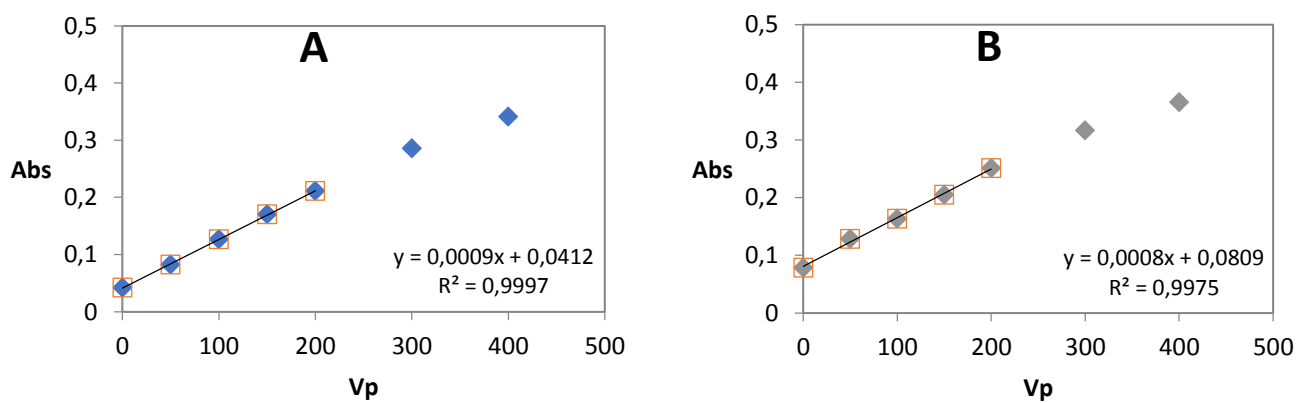


Fig. 4.2.10. Método de adiciones patrón en las condiciones del experimento 7, (A) agua desionizada, (B) agua subterránea dopada con As (III).

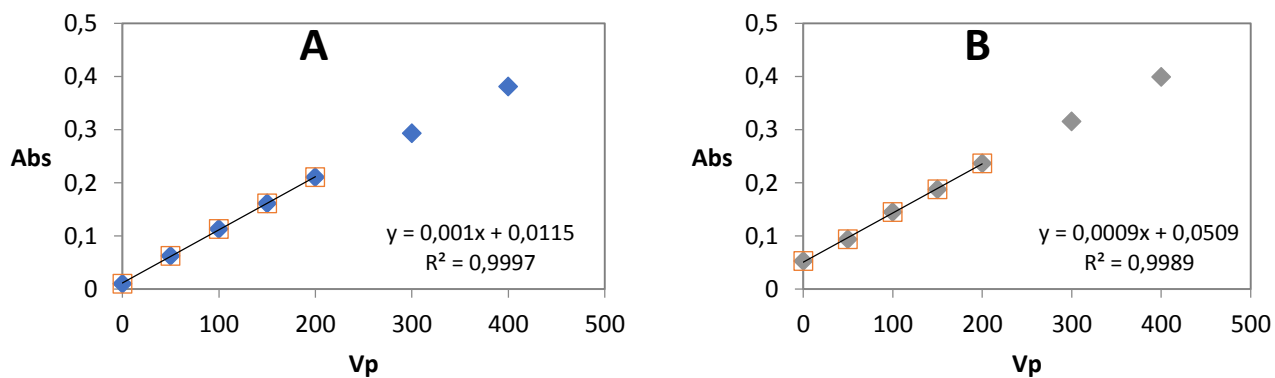


Figura 4.2.11. Método de adiciones patrón en las condiciones del experimento 3, (A) agua desionizada, (B) agua subterránea dopada con As (III).

En cada experimento se realiza una prueba de comparación de pendientes, se trata de un caso particular de la prueba t de comparación de dos medias. El resultado de esta prueba es que únicamente en el caso del experimento 7 las pendientes son comparables y por lo tanto no hay efecto de matriz.

4.3. Estabilidad de las especies inorgánicas de As

Para comprobar si las especies de As inorgánico son estables en disolución se miden por SW-ASV se prepara una disolución de 500ml que contiene $5\mu\text{g/L}$ de As (III) y $5\mu\text{g/L}$ de As (V) utilizando como medio agua subterránea. Las medidas se hacen por duplicado, teniendo en cuenta las condiciones óptimas ya establecidas en el caso de As(III) y As (total), se hacen adiciones de $60\mu\text{L}$ para obtener una línea de calibrado. Estas medidas se realizan a lo largo de varios días de forma que se obtiene la variación de la concentración en función del tiempo, conservando las disoluciones en todos los casos en el frigorífico. La concentración de As (III) se obtiene de forma directa, en cambio, la concentración de As (V) se obtiene por diferencia entre el valor obtenido del As (total) y el As (III).

Las Figuras 4.3.1.A y 4.3.1.B muestran respectivamente la evolución de la concentración de As (III) y As (V) a lo largo del tiempo. En ambas figuras se ha representado mediante una línea horizontal la concentración teórica añadida en la disolución para comparar los valores.

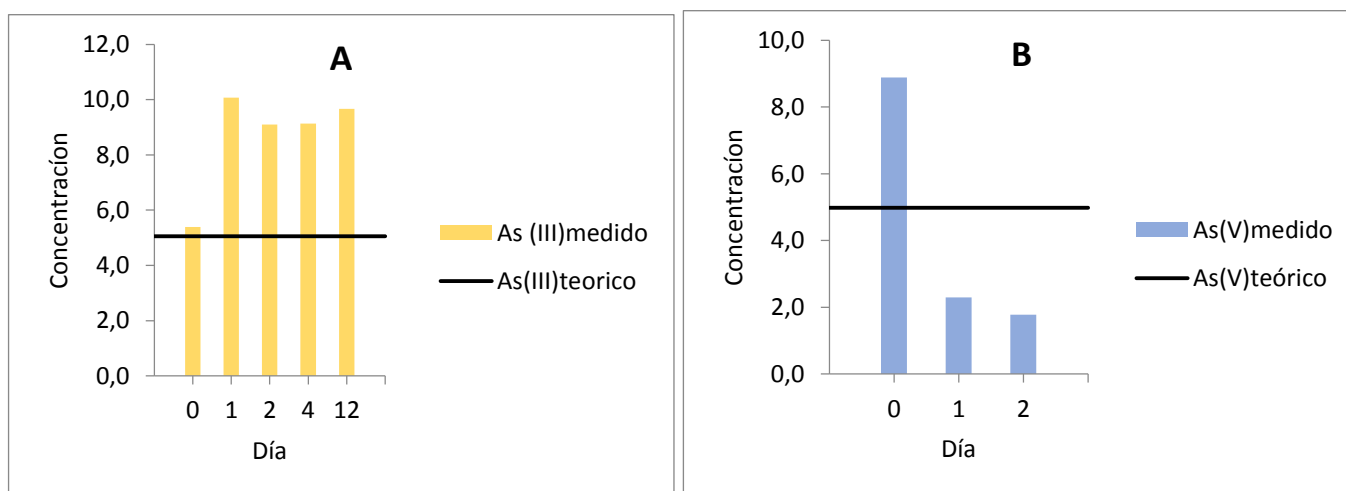


Fig. 4.3.1. Variación de la concentración de As (III) y As (V) en una muestra de agua subterránea a lo largo del tiempo.

Como se observa en las figuras, la concentración de As (III) el día de su preparación coincide aproximadamente con el valor teórico añadido. A lo largo de los días se ve como la concentración ha aumentado y es aproximadamente 10mg/L lo que hace pensar que el As (V) se ha reducido a As (III), ya que en la figura B se observa que su concentración ha disminuido considerablemente.

Para intentar solucionar el problema de conservación del As (V) a lo largo del tiempo se procede a preparar nuevas disoluciones conteniendo $5\mu\text{g/L}$ de As (III) y $5\mu\text{g/L}$ de As (V), en una de

ellas se añaden 250 μ L de HCl y en la otra 250 μ L de HNO₃. Se mide en las mismas condiciones óptimas ya establecidas en varios días consecutivos (Figura 4.3.2).

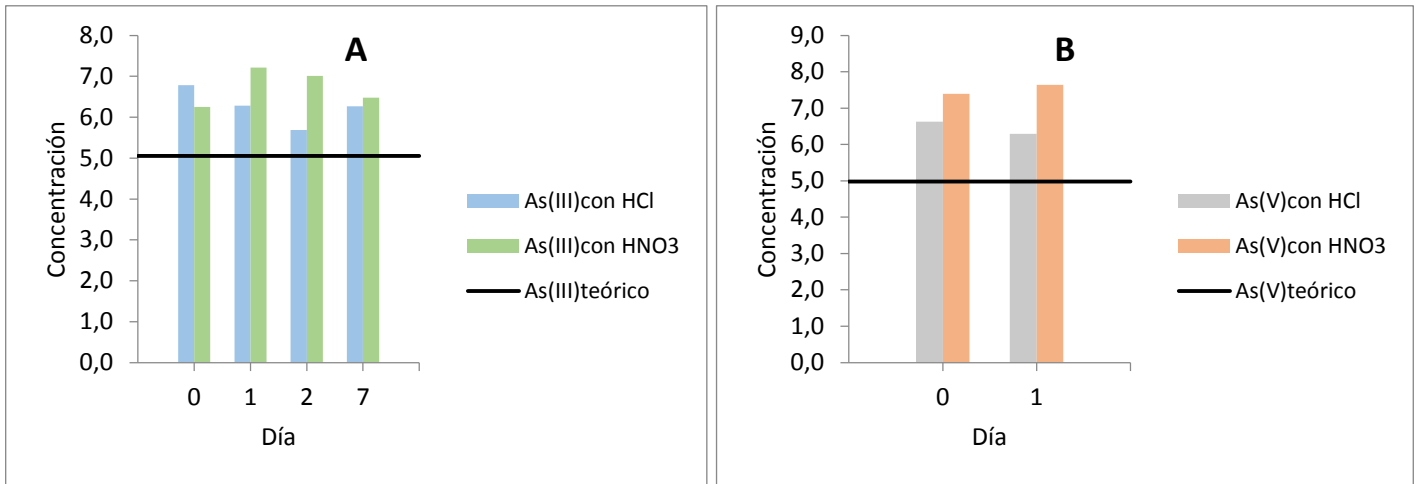


Fig. 4.3.2. Variación de la concentración de As (III) y As (V) en agua subterránea acidificada con HCl y con HNO₃ a lo largo del tiempo.

En estas figuras se puede observar como tanto las concentraciones de As (III) como las de As (V) se mantienen más o menos constantes a lo largo del tiempo y además son valores próximos a los añadidos teóricamente en las disoluciones.

De esta forma se debe concluir que es necesario acidificar la muestra de As, con HCl o con HNO₃, para evitar que el As (V) que posea la disolución se reduzca a As (III) en un corto periodo de tiempo. El ácido utilizado no tiene efecto en la conservación de la muestra ya que en ambos casos permanece constante la concentración.

5. CONCLUSIONES.

El método de HG-AAS no es un método muy reproducible, se obtienen pendientes de las líneas de calibrado muy diferentes a lo largo de los diferentes días, y por lo tanto no es un método fiable para la determinación de As. En cambio, el método de ASV es mucho más reproducible ya que se obtienen resultados y pendientes muy próximas midiendo las mismas muestras a lo largo del tiempo.

En el caso del método ASV también se han obtenido las condiciones óptimas. En primer lugar se optimizó la modulación del potencial y se decidió que SW era mejor que DPV, esto se debe a que SW es un método más rápido y presenta mayor sensibilidad, ya que la intensidad de corriente global es la suma de dos corrientes, anódica (oxidación) y catódica (reducción). Dentro de este método se analizan las condiciones óptimas de medida y los parámetros obtenidos para validar finalmente el método son:

Para medir As (III).

Stirrer Speed	3000rpm	Potencial 2(deposit)	-0.15V
Stirring time	10s	Equilibration time	5s
Start potencial	-0.2V	Start potencial	-0.3V
Vertex potencial	1.0V	End potencial	0.4V
Cycles	5	Potencial step	0.01V
Potencial 1(acond)	-0.5V	Frecuency	25Hz
Deposition time	30s	Pulse amplitud	0.02V

Para medir As (total).

Stirrer Speed	3000rpm	Potencial 2(deposit)	-0.15V
Stirring time	10s	Equilibration time	5s
Start potencial	-0.2V	Start potencial	-0.3V
Vertex potencial	1.0V	End potencial	0.4V
Cycles	5	Potencial step	0.01V
Potencial 1(acond)	-1.0V	Frecuency	25Hz
Deposition time	30s	Pulse amplitud	0.02V

En la validación del método se obtiene como conclusión que es necesario conservar las muestras de As en un medio ácido porque el As (V) se reduce a As(III) en cortos periodos de tiempo, de forma que se obtienen resultados falsos de concentraciones.

Independientemente de la reproducibilidad, se ha optimizado el método de HG-AAS y las condiciones más favorables para la medida son las siguientes.

Longitud de onda	193.7nm	HCl	2M
Anchura de rendija	0.5R	Reductor(NaBH ₄)	0.25%

Como las pendientes obtenidas no son reproducibles se empleó el método de adiciones patrón en diferentes condiciones experimentales y en diferentes matrices analíticas en un intento de mejorar la exactitud de los resultados. Una prueba de comparación de pendientes de las líneas obtenidas en diferentes matrices dio como resultado que, en general, las pendientes no son reproducibles, por lo que se debe calibrar siempre mediante este método.

6. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Anawar H. M., Arsenic speciation in environmental samples by hydride generation and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta*. 88 (2012) 30-42
- [2] Barringer, J.L., Reilly, P.A. (2013). Arsenic in Groundwater: A Summary of Sources and the Biogeochemical and Hydrogeologic Factors Affecting Arsenic Occurrence and Mobility. USGS.
- [3] Box, G.E.P., Hunter, W.G., Hunter, J.S. (1978). *Statistics for Experimenters. An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*. Wiley, USA.
- [4] Brookins Douglas G. *Eh-pH Diagrams for Geochemistry*. (1988)
- [5] Coelho N.M.M., Cosmen da Silva A., Moraes da Silva C. Determination of As(III) and total inorganic arsenic by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 460 (2002) 227-233
- [6] Dean, A., Voss, D., Draguljić, D. (2017). *Design and Analysis of Experiments*, 2nd ed. Springer, Berlin.
- [7] Feeney, R., Kounaves, S., Voltammetric measurement of arsenic in natural waters. *Talanta* 58 (2002) 23-31.
- [8] Gomez J.J., Lillo J., Sahun B., Naturally occurring arsenic in groundwater and identification of the geochemical sources in the Duero Cenozoic Basin, Spain. *Environ. Geol.* 50 (2006) 1151-1170.
- [9] Gutiérrez Pulido, H. (2012). *Análisis y diseño de experimentos*. McGraw-Hill, Barcelona.
- [10] Litter M. I., Armienta M.A., Farías S.S. *Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos* (2009)
- [11] López-Geta, J.A. (2009). *Importancia de la geología e hidrogeología en la investigación y gestión de los humedales*.
- [12] Marcinkowska M., Komorowicz I., Barańkiewicz D., Study on multielemental speciation analysis of Cr (VI), As (III) and As (V) in water by advanced hyphenated technique HPLC/ICP-DRC-MS. Fast and reliable procedures. *Talanta*. 144 (2015) 233-240
- [13] Melamed D., *Monitoring Arsenic in the environment: a review of science and technologies with the potential of field measurements*. *Analytica Chimica Acta*. 532 (2005) 1-13
- [14] Ravenscroft, P., Brammer, H., Richards, K.S.(2009). *Arsenic Pollution: A Global Synthesis*. Wiley-Blackwell, UK.
- [15] Ross, Phillip J. (1988). *Taguchi techniques for quality engineering. Loss function, orthogonal experiments, parameter and tolerance design*. McGraw-Hill, USA.

[16] Smedley P.L., Kinniburgh D.G., A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters. *App. Geo.*, 17 (2002) 517-568

[17] Ulusoy H. I., Akcay M., Ulusoy S., Gurkan R., Determination of ultra trace arsenic species in water samples by hydride generation atomic absorption spectrometry after cloud point extraction. *Analytica Chimica Acta*. 703 (2011) 137-144

[18] Wu, Y., Wu, A. (1996), *Diseño robusto utilizando los métodos Taguchi*. Díaz de Santos, Madrid.