



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Especiación de As en aguas subterráneas
por técnicas voltamperométricas y espectroscópicas**

Autor: Alejandro García Recio

Tutor/es: María del Sol Vega Alegre

Resumen

El arsénico es uno de los principales contaminantes de aguas subterráneas y supone una importante amenaza sanitaria y medioambiental. Solo es superado por el plomo como el principal contaminante inorgánico en la National Priority List (NPL). También es uno de los materiales tóxicos regulados por la Resource Conservation and Recovery Act (RCRA). El As no puede ser transformado en un material no tóxico, solo puede pasar a una forma menos tóxica. Generalmente, la presencia de As en las aguas subterráneas es el resultado de procesos naturales, pero la acción humana también ha contribuido (empleo de combustibles fósiles, actividad minera, uso de herbicidas y pesticidas, fungicidas para madera...). Resulta por tanto fundamental disponer de métodos sensibles para determinar las diferentes especies de As en aguas, para así poder prevenir cualquier enfermedad derivada de la ingesta de agua contaminada por este elemento, lo cual causa una gran cantidad de muertes en países subdesarrollados.

En este trabajo se han estudiado y optimizado algunos parámetros de dos métodos analíticos muy utilizados en la determinación de arsénico, como son la espectroscopía de absorción atómica por generación de hidruros (HG-AAS) y la voltamperometría de redisolución anódica con micro-electrodo de oro (ASV). Se ha investigado la estabilidad de la señal analítica modificando diferentes parámetros y a lo largo del tiempo, así como los efectos de diversos interferentes potenciales presentes en las muestras. De los ensayos realizados se sacaron las siguientes conclusiones:

- Algunos iones presentes en las muestras de agua pueden interferir en la cuantificación de especies de arsénico por HG-AAS y ASV cuando éstos se encuentran en altas concentraciones, en especial el Fe^{3+} . En general, en las muestras tomadas, las concentraciones de dichos iones no son suficientemente altas para que las interferencias sean consideradas significativas.
- Para muestras con concentraciones bajas de As(III) y As(V), existe una variación considerable de la señal con el paso del tiempo si no se ha utilizado ningún conservante, por lo que resulta fundamental añadir alguno además de

mantener las muestras en frío y a oscuras. Se recomienda utilizar un conservante como HNO_3 o H_3PO_4 en concentraciones 10 mM, dependiendo del método utilizado.

Abstract

Arsenic is one of the main contaminants in groundwater, and it's one of the major health and environmental threats. According to the National Priority List (NPL), arsenic is only surpassed by lead as main inorganic contaminant. It also is one of the toxic materials regulated under the Resource Conservation and Recovery Act (RCRA). Arsenic cannot be transformed into a non-toxic material; it can only be transformed into a form less toxic to organisms in the environment. In general, arsenic in groundwater originates from natural processes; however, human activities have had an important impact (combustion of fossil fuels, mining activity, arsenical pesticides and herbicides, wood preservatives...). It is fundamental to have sensitive methods for the determination of arsenic species in water samples, in order to prevent any disease by arsenic contaminated water ingest, which is a common cause of dead in many underdeveloped countries.

In this paper, we have studied and optimized some parameters in two analytical methods such as absorption atomic spectroscopy by hydride generation (HG-AAS) and anodic stripping voltammetry with micro-wire gold electrode (ASV). We have also investigated the stability of the analytical signal along several weeks modifying some parameters, as well as the effect of various potential interfering substances present in the samples. From these trials we have drawn some conclusions:

- Some ions present in groundwater may interfere the quantification of arsenic species by HG-AAS and ASV when they are in high concentrations, specially the ion Fe^{3+} . But in the samples recollected, the concentration of these ions are not significantly high to consider the interference important.
- For samples with low concentrations of As(III) and As(V), we observe a considerable variation of the signal over time if we do not use any preservative, so it is imperative to add an adequate reagent to preserve the distribution of arsenic species, besides storing the samples in the fridge and in the dark. It is proposed the use of 10 mM nitric acid or phosphoric acid, depending of the analytical method.

Índice

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Arsénico y medio ambiente	1
1.2. Toxicidad del arsénico	3
1.3. Problemática mundial del arsénico	4
1.4. Técnicas analíticas para la determinación y especiación de arsénico	5
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. Procedimientos analíticos	11
3.2. Preparación y conservación de muestras y patrones	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1. Optimización del rango de medida en HG-AAS	17
4.2. Reproducibilidad de la señal analítica en HG-AAS	18
4.3. Optimización de los parámetros en ASV	20
4.4. Efecto de la matriz analítica en ASV.....	24
4.5. Efecto de interferentes potenciales en HG-AAS.....	26
4.6. Elección de conservante para la estabilización de las especies de As	30
4.7. Resultados de la especiación de arsénico	34
5. CONCLUSIONES	37
6. BIBLIOGRAFÍA	39

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ARSÉNICO Y MEDIO AMBIENTE

El arsénico es el vigésimo mineral más abundante de la tierra, y el duodécimo mineral más abundante del cuerpo humano. En el agua de mar es el decimocuarto elemento más abundante y se encuentra concentrado en sedimentos marinos que pueden contener hasta 3000 mg/kg [1]. El As(III) es más abundante que el As(V), salvo en aguas subterráneas en las que suele predominar la forma oxidada, formando diferentes especies ácido-base de arseniato [2]. La relación entre las concentraciones de As(III) y As(V) puede utilizarse como un indicador químico del estado redox de sistemas de aguas subterráneas [3].

En general, el arsénico presente en el medio ambiente es de origen natural, pero algunas actividades humanas como la combustión de combustibles fósiles, la actividad minera o el uso de herbicidas y pesticidas arsenicales pueden constituir, de forma local, una importante fuente de este elemento [4]. Aproximadamente, el 70% de la producción de arsénico se destina a la fabricación de pesticidas, siendo el arseniato de cromo y cobre (CCA) el más utilizado, como conservante de la madera [5].

El As de origen natural suele encontrarse en la litosfera combinado con sulfuro, oxígeno o hierro. Su presencia en las aguas, especialmente en las subterráneas, es debida a la meteorización y lixiviación de minerales y rocas, especialmente rocas sedimentarias y depósitos volcánicos, de forma que la concentración de arsénico en aguas subterráneas está relacionada con las características geológicas, hidrológicas y geoquímicas locales de los materiales de los acuíferos [6].

Los mecanismos de movilización de arsénico más frecuentemente descritos son la disolución reductiva de minerales ricos en óxidos de hierro y manganeso, la disolución oxidativa de sulfuros (arsenopirita), y la desorción competitiva en condiciones alcalinas y oxidantes, típica en ambientes áridos y semiáridos [1,6]. El arsénico contenido en rocas y

minerales pasa entonces al agua subterránea, desde donde entra en la cadena alimentaria humana. En acuíferos ricos en materia orgánica, la metilación es también un proceso importante en la transferencia de As del sedimento al agua o a la atmósfera, como se muestra en la **Fig. 1.1.1**.

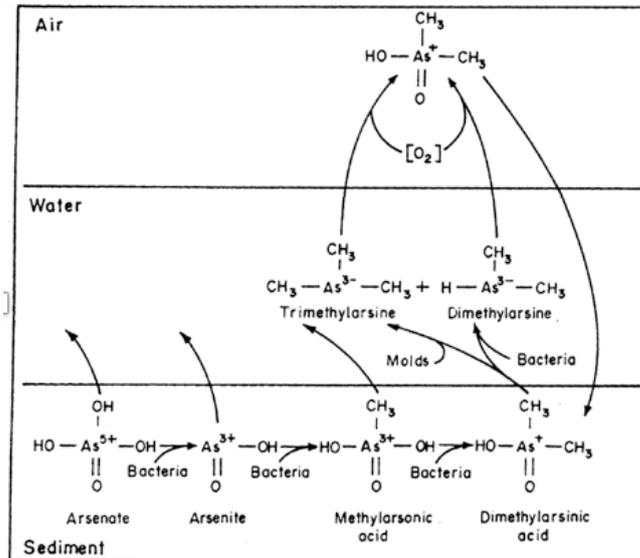


Fig.1.1.1 Ciclo Biológico del Arsénico

Dependiendo del pH y del potencial de oxidación-reducción del agua, se puede encontrar el arsénico formando diferentes compuestos, como arsenitos y arseniatos (los más comunes), o como ácido metilarsínico (MMA), y ácido dimetilarsínico (DMA), compuestos metilados de menor toxicidad.

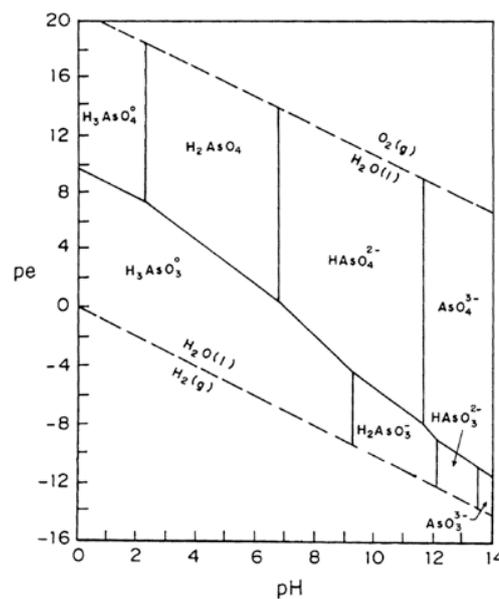


Fig.1.1.2 Diagrama Eh-pH del Arsénico en agua a 1 bar y 25°C

El diagrama pe-pH (o Eh-pH) representado en la **Fig. 1.1.2** muestra los intervalos de potencial redox y pH a los cuales predomina cada una de las especies ácido-base de As(III) y As(V). Este diagrama puede usarse para predecir la especiación de As inorgánico en aguas midiendo únicamente el potencial redox y el pH [7].

1.2. TOXICIDAD DEL ARSÉNICO

Los seres humanos pueden estar expuestos a As a través de la comida, del aire o del agua, pero también por contacto de la piel con suelos o agua contaminados con el elemento [8]. Una exposición prolongada causa gran variedad de problemas de salud: respiratorios, cardiovasculares, gastrointestinales, genotóxicos, mutagénicos o cancerígenos, por lo que la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO) fijó el límite de As en agua potable en 10 µg/L [9]. Esta referencia se basa principalmente en la capacidad de detección analítica, y es el mismo límite establecido en las legislaciones europea (Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de Noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas a consumo humano), norteamericana o japonesa. Sin embargo, otros países continúan con un límite de 50 µg/L [10].

La concentración de As en aguas naturales depende de la composición geológica y el grado de polución del ambiente. El As(III) es unas 60 veces más tóxico que As(V), y los compuestos inorgánicos de As son unas 100 veces más tóxicos que los compuestos orgánicos [11].

Aproximadamente el 50% del As que entra en el cuerpo humano es excretado por la orina. El contenido de As en orina, piel, pelo, uñas, excrementos y pulmones se utiliza como indicador del peligro en una población expuesta a contaminación por este elemento. Algunas enfermedades derivadas de una larga exposición a agua contaminada son: conjuntivitis, hiperqueratosis, hiperpigmentación, enfermedades cardiovasculares, trastornos en el sistema nervioso, cáncer de piel, gangrena, leocomelosis, hepatomegalia o esplenomegalia. Efectos en pulmones, útero, tracto genitourinario y otras partes del cuerpo han sido detectados en estados avanzados de envenenamiento por As [12].

1.3. PROBLEMÁTICA MUNDIAL DEL ARSÉNICO

Se han detectado elevados niveles de As en aguas subterráneas de regiones con actividad térmica (Nueva Zelanda, 8500 µg/L) o geotérmica (Japón, 6400 µg/L). En un gran número de acuíferos alrededor del mundo se han detectado concentraciones de As muy superiores a 10 µg/L, el límite máximo recomendado por la O.M.S. Los casos más destacables se localizan en varias zonas de Argentina, Bangladesh, Chile, China, Hungría, India, México, Mongolia, Rumanía, Taiwan, Vietnam y algunas zonas de EEUU, sobre todo la de la costa oeste [13]. Debido a la extensión del problema, a la población tan numerosa expuesta a niveles anormalmente altos de este contaminante, y a que las aguas subterráneas son el único recurso hídrico en grandes áreas del planeta, se considera que la presencia de arsénico en las aguas subterráneas es uno de los problemas medioambientales más graves a los que está expuesta la humanidad.



Fig 1.2.1 Distribución global de problemas documentados de As alrededor del mundo tanto en acuíferos como en zonas de actividad minera y geotérmica.

En España se han detectado problemas de contaminación significativos en las Marismas del Pinar (Huelva), en la cuenca del Tajo y en la cuenca del Duero [14]. En el año 2000, a raíz de la realización de análisis químicos en las aguas que abastecían a la población de Íscar (Valladolid), se detectaron contenidos de arsénico que superaban la concentración máxima admisible vigente en aquel momento (50 µg/L). Posteriores análisis en otras localidades confirmaron que altos contenidos de arsénico en las aguas subterráneas se extendían por un amplio sector de la Cuenca del Duero que comprendía la zona de Tierra de Pinares (Valladolid), El Carracillo y Las Cogotas (Segovia) y La Moraña (Ávila), y afectaba a más de 40 poblaciones [15].

1.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN Y ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO

Como se ha indicado antes, la toxicidad del arsénico en aguas destinadas al consumo humano depende no solo de la concentración total del elemento, que no debe superar 10 µg/L, sino también de la forma o especie química predominante, puesto que la toxicidad de las diferentes especies químicas que puede formar este elemento es diferente. Por otro lado, la especiación de As en agua subterránea ayudará a dilucidar los procesos físico-químicos responsables de la solubilización y transporte del arsénico en los acuíferos afectados.

La elección de la técnica idónea para la especiación de As es una tarea difícil, debido a que la concentración de las especies del elemento es a menudo inferior a los límites de detección de muchas técnicas analíticas actuales, y a la coexistencia de diferentes especies del elemento. Es por ello habitual el uso de métodos analíticos que combinen una etapa de separación de especies con una etapa de detección mediante una técnica que sea suficientemente sensible.

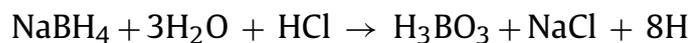
La técnica de separación más utilizada es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), acoplada habitualmente a un Espectrómetro de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS) para detectar las especies separadas. Esta unión solo necesita

una interfase simple y directa, permite minimizar el pretratamiento de la muestra y además permite el análisis multielemental de diferentes matrices [16,17].

Además de *HPLC-ICP-MS*, otras técnicas de detección de arsénico muy utilizadas son las siguientes:

- *Espectroscopía de Absorción Atómica*: Existen dos modalidades, usando un sistema generador de hidruros (HGAAS) o utilizando una cámara de grafito (GFAAS).
 - o *HG-AAS*: Esta modalidad de absorción atómica utiliza un generador de hidruros, que es una herramienta muy sensible para la determinación de As a nivel de trazas. Se precisa una etapa de separación previa para cuantificar las especies As(III) y As(V).

La muestra es bombeada a un colector donde reacciona con HCl y NaBH₄. La arsina generada es arrastrada por una corriente de Ar a un separador líquido-gas y después a una celda de absorción calentada con una llama de aire-acetileno [18].



La formación de arsina depende del pH, ya que el As(III) tiene que estar totalmente protonado antes de reducirse. La especie H₃AsO₃, totalmente protonada, predomina hasta pH próximo a 10. A pH < 1 se forman hidruros tanto de las especies de As orgánicas como de las inorgánicas [19].

La señal obtenida de As(V) es un 40% más baja que la obtenida de As(III). Para discernir entre As(III) y As(V) lo más recomendable es separar las especies mediante extracción en fase sólida o con cambiadores aniónicos, que usualmente retienen preferiblemente As(V), determinándose As(III) en el líquido eluido. Una segunda alícuota de la muestra se trata con KI para reducir el As(V) a As(III), seguido de la transformación en arsina, cuantificando así As total. El problema del tratamiento con KI es que requiere un medio ácido fuerte y una gran concentración del mismo conlleva la formación de yoduros insolubles [20].

Otra opción para evitar el uso de KI consiste en aumentar las concentraciones de HCl y NaBH₄ [21].

- *GF-AAS*: Este método posee una sensibilidad muy superior a la de la absorción atómica de llama. La muestra se inyecta en un horno de grafito, donde primero sufre una deshidratación y posteriormente una calcinación, formándose las sales de arsénico. Éstas son disociadas y posteriormente el As es atomizado. Se utiliza un espectrómetro de absorción atómica con una lámpara de arsénico de cátodo hueco [22].
- *Técnicas Voltamperométricas*: Dentro de esta técnica se engloban dos modalidades, voltamperometría de redisolución anódica (ASV) y voltamperometría de redisolución catódica (CSV).
 - *Voltamperometría de Redisolución Anódica (ASV) con electrodo de oro*: Aplicando un potencial adecuado al electrodo de trabajo de oro, 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. Una segunda medida, aplicando un potencial de deposición más reductor, provoca la reducción conjunta de As(V) y As(III) a As(0), que en la etapa de redisolución anódica generan una corriente de oxidación proporcional a la concentración de As total. El As(V) se calcula por diferencia [14,23]. La sensibilidad de la técnica se puede adaptar al nivel de concentración aumentando o disminuyendo el tiempo de deposición aplicado. El empleo de microelectrodos permite disminuir la corriente capacitiva, y con ello los límites de detección (hasta 0.05 µg/L) [24].

Un problema relacionado con los electrodos sólidos es la inesperada desaparición de la señal o la pérdida de sensibilidad, que suelen ir asociadas al ensuciamiento de la superficie del electrodo y se corrigen mediante pulido y limpieza del electrodo. Los electrodos de Au y Pt no deben emplearse a potenciales mayores de 0,7 V para evitar la oxidación de la superficie. Debido a la baja sobretensión del hidrógeno, solo el As (III) es propenso al análisis cuantitativo [25]. El oro es un buen material de trabajo gracias a su

relativamente elevada sobretensión de hidrógeno. Para evitar la formación de burbujas de hidrógeno, se recomienda utilizar como electrodo un disco rotatorio de oro [26].

- *Voltamperomería de redisolución catódica (CSV)*: En una primera determinación, se deposita As(III) en un electrodo de gota de mercurio, bien adsorbido como complejo con un ligando adecuado, o bien reduciéndolo a As(0) en presencia de Cu para formar un compuesto intermetálico Cu-As, capaz de amalgamarse con el mercurio. Posteriormente se aplica un barrido catódico de potencial para reducirlo a arseniuro, registrando la corriente catódica. En una segunda determinación se mide As total, para lo cual el As(V) debe ser previamente reducido a As(III) con yoduro o ácido ascórbico [27]. Se pueden determinar concentraciones de arsénico inferiores a 1 µg/L.

Un problema relacionado con la especiación de As en aguas subterráneas es la estabilidad de las especies inorgánicas de arsénico durante el muestreo y almacenamiento de las muestras [28]. Los procesos de adsorción/desorción de especies de As sobre oxohidróxidos de hierro y manganeso y sobre partículas de arcilla, causados por variaciones del pH y Eh del agua, y la interconversión de As(III) y As(V) causada por reacciones redox, provocadas por otros componentes de la matriz analítica, son los principales procesos que pueden alterar la especiación de As en aguas subterráneas.

Para prevenir la interconversión de las especies inorgánicas de As presentes en agua, se han descrito diferentes estrategias de conservación de las muestras empleando reactivos ácidos (ácido nítrico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácido acético) o complejantes (AEDT). Pero no hay acuerdo en las condiciones óptimas de conservación pues parecen estar condicionadas por la composición de la matriz analítica de la muestra, por lo que deben ser optimizadas para cada acuífero en el que se realice la especiación de arsénico. Además, la técnica analítica empleada en la especiación de As también condiciona el reactivo conservante a emplear pues este no debe provocar interferencias en la medición [29-31].

2. OBJETIVOS DEL TRABAJO

El objetivo del trabajo es comparar dos métodos analíticos para la determinación y especiación de arsénico inorgánico en aguas subterráneas de la región: Espectroscopía de Absorción Atómica con Generación de Hidruros (HG-AAS) y Voltamperometría de Redisolución Anódica (ASV) utilizando un electrodo serigrafiado de oro. Se compararán aspectos relativos a la precisión de las medidas, exactitud, tiempo de análisis y coste analítico.

Para ello, se procederá previamente a optimizar los parámetros experimentales de ambos procedimientos analíticos para una determinación y cuantificación óptimas de la concentración de As(III) y As(V) en muestras de agua subterránea, teniendo en cuenta diferentes condicionantes como la naturaleza de la matriz o la presencia de posibles interferentes. Los ensayos a realizar con este fin serán:

- Elección de condiciones experimentales óptimas para la especiación de arsénico en *HG-AAS*, incluyendo rango óptimo de medida, comparación de la sensibilidad del método para As(III) y As(V), estabilidad de la señal analítica para As(III) y As(V), y el efecto de interferentes químicos potenciales.
- Elección de condiciones experimentales óptimas en *ASV*, incluyendo también el rango óptimo de medida, el efecto de diferentes matrices y de las variables voltamperométricas sobre la señal analítica, y la influencia de diferentes interferentes químicos potenciales.
- Estudio de las condiciones de conservación de las muestras de agua para estabilizar las especies de As.
- Los procedimientos optimizados se aplicarán a la especiación de arsénico inorgánico en muestras de agua subterránea provenientes de la margen sur de la Cuenca del Río Duero. Se comprobará si los resultados obtenidos por ambos procedimientos son comparables.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Los experimentos para la especiación de arsénico y los diferentes estudios de interferencias se realizaron en dos equipos diferentes: un espectrómetro de absorción atómica con generación de hidruros (HG-AAS) y un equipo de voltamperometría de redisolución anódica con un electrodo de oro. Además, durante la especiación de arsénico en diferentes muestras se compararon los datos con los obtenidos por ICP-MS.

3.1.1 HG-AAS

Para las determinaciones por HG-AAS se empleó un generador de vapores de hidruro Agilent VGA 77 [32] acoplado a un espectrómetro de absorción atómica Varian con una lámpara de cátodo hueco de As.

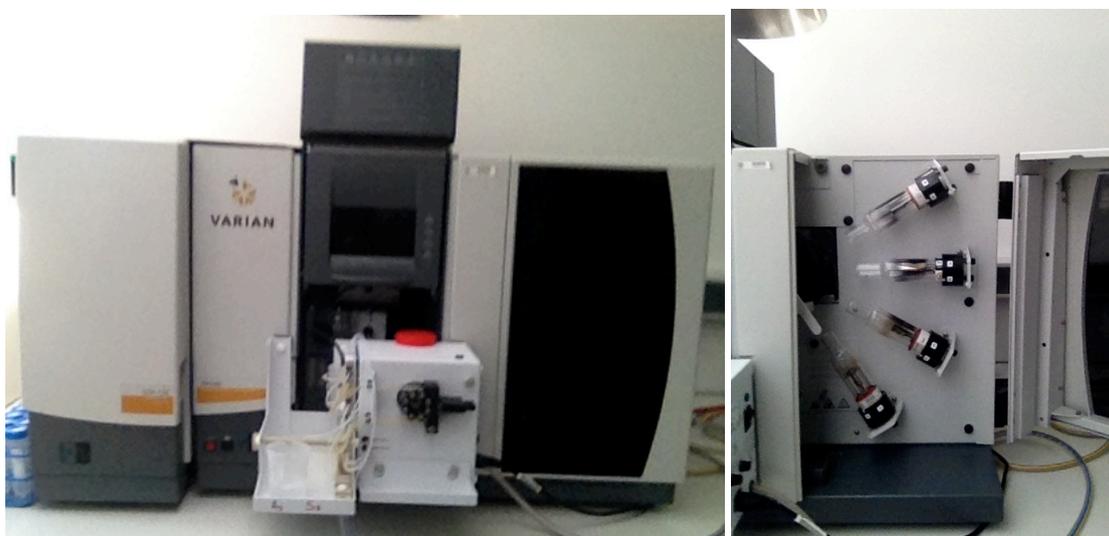


Fig 3.1.1 Equipo HG-AAS utilizado: vista general y detalle de las lámparas de cátodo hueco

Para la medición de As(III) es necesario un pre-tratamiento con un cartucho de aluminosilicato que retiene selectivamente A(V), ya que si no el agente reductor utilizado es capaz de producir una reducción parcial de As(V) que interfiere en la correcta medida

del As(III). Para medir el As total, el As(V) se reduce previamente a As(III) añadiendo KI al 1% y acidificando con HCl 1M, dejando un tiempo de reacción de 50 min a temperatura ambiente (que puede reducirse a 4 min calentando a 70°C). El valor de As(V) de la muestra se obtiene por diferencia del As total y el As(III) obtenido en las medidas.

La disolución reductora del generador de hidruros está formada por NaBH₄ 0.6% w/v con NaOH 0.5% w/v, mientras que la disolución ácida está compuesta por HCl 5 M.

3.1.2 ASV

Las determinaciones por voltamperometría de redisolución anódica se realizaron con un polarógrafo Metrohm CompuTrace equipado con un electrodo scTRACE que contiene los tres electrodos serigrafados: electrodo de trabajo de oro, electrodo de referencia de plata y electrodo auxiliar de carbono.



Fig. 3.1.2.1 Celda electroquímica y equipo ASV utilizado

Para la activación y limpieza del electrodo de oro se utilizó una disolución limpiadora de H₂SO₄ 0.5 M y KCl 0.05 M, mientras que para la medición de las muestras y patrones se adicionó un electrolito formado por ácido sulfámico 1 M, ácido cítrico 0.5 M y KCl 0.45 M.

Para las diferentes medidas, se tomaron 10 mL de la muestra de agua y 2 mL de la disolución electrolítica.

3.1.3 ICP-MS

Una vez comparados los resultados con los anteriores métodos, se determinó el arsénico de diferentes muestras en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid, LTI-Uva, mediante un ICP-MS Agilent 7500c, equipado con sistema de reacción octopolo y celda de colisión.



3.1.3.1 Equipo ICP-MS utilizado

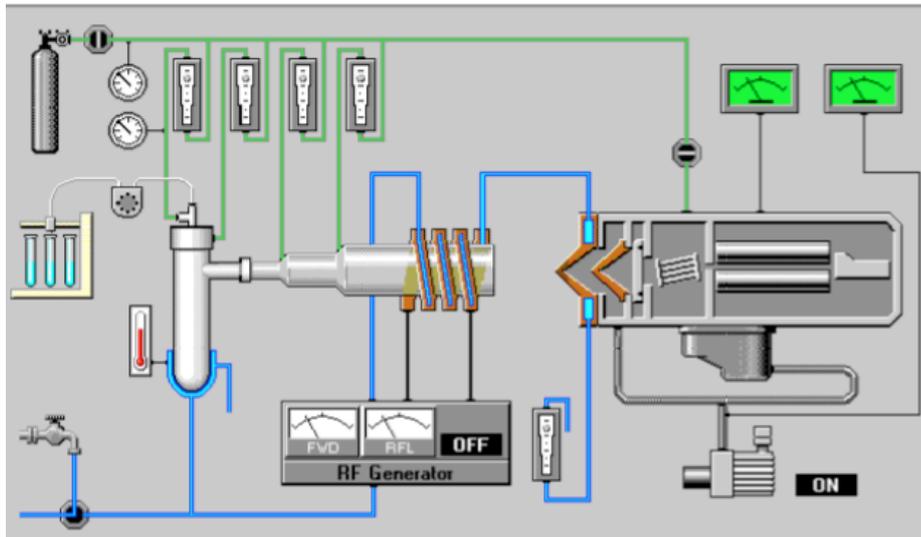


Fig 3.1.3.2 Esquema del equipo ICP-MS

El flujo de gas portador fue de 1,8 L Ar/min. La bomba del nebulizador tenía una velocidad de 0.3 rps. Se utilizó una relación m/z de 75 para la determinación de As.

3.2 PREPARACIÓN Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS Y PATRONES

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 utilizados 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 ± 0.1 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 la unidad y se han usado los valores de concentración en $\mu\text{g}/\text{L}$ en todos los cálculos posteriores.

3.2.1 PATRONES DE CALIBRACIÓN

Para la preparación de los patrones de As(III) se partió de un patrón ya preparado de 1000 mg/kg, del cual se pesa 1.25 g en un recipiente de plástico de 25 mL y se enrasa con agua desionizada hasta 25 g, obteniéndose una disolución de 50 mg/L de As(III). Esta disolución se conserva refrigerada en la oscuridad, y se renueva quincenalmente.

Diariamente y antes de cada ensayo se prepara un patrón de As(III) de 1 mg/L, por dilución en un recipiente de plástico de 25 mL, de 0,5 g de la disolución patrón de 50 mg/L de As(III). Esta disolución se emplea en la preparación, por dilución, de los patrones de calibración necesarios.

Para la preparación de los patrones de As (V) se preparó primero una disolución de 1000 mg/L. Para ello se pesaron 0,1041 g de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en un recipiente de plástico de 25 mL, y se añadieron 25 μL de HNO_3 del 65% (w/m), enrasándose posteriormente con agua desionizada hasta los 25 g. A partir de esta disolución patrón se pesan 1,25 g en un recipiente de plástico de 25 mL y se enrasa con agua desionizada para preparar el patrón de 50 mg/kg de As(V). Ambos patrones se conservan en frío y en la oscuridad, y se renuevan quincenalmente.

Se prepararán diariamente patrones de 1 mg/L por dilución de 0,5 g del patrón de As (V) de 50 mg/kg en un recipiente de plástico de 25 mL. Esta disolución se empleará para la preparación, por dilución, de los patrones de calibración.

3.2.2 HG-AAS

Para preparar la disolución reductora de NaBH_4 0,6% (w/v) + NaOH 0,5% (w/m) se pesan 1,5 g de NaBH_4 con precisión $\pm 0,1$ mg y se transfieren a un matraz de 250 mL, adicionando luego 25 mL de una disolución previamente preparada de NaOH 5% (w/m). Posteriormente se enrasa con agua desionizada. Esta disolución se ha de renovar diariamente.

Para la disolución ácida de HCl 5 M se diluyen 103,5 mL de HCl 37% (w/m) en un matraz de 250 mL. Esta disolución puede conservarse en frío y utilizarse durante varios días.

En los patrones de calibración del rango de $\mu\text{g/L}$, para la reducción se añaden en 50 mL 0,5000 g de KI (1%) y 4,3 mL de HCl .

3.2.3 ASV

La disolución de limpieza y activación del electrodo de oro se prepara mezclando, en un matraz de 100 mL, 0,3730 g de KCl , 2,78 mL de H_2SO_4 96% (w/v) y agua desionizada. El electrolito soporte para las determinaciones por ASV se preparó mezclando 9,71 g de ácido sulfámico, 10,51 g de ácido cítrico y 3,35 g de KCl , medidos en una balanza analítica, en un matraz de 100 mL. Se enrasa con agua desionizada y se disuelve por completo con la ayuda de un baño de ultrasonidos.

3.2.4 HPLC-ICP-MS

Para HPLC-ICP-MS se prepara una fase móvil concentrada de pH 6.0 compuesta por tampón fosfato 200 mM y AEDT 20 mM, a partir de 0.1162 g de Na_2HPO_4 , 1.2670 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 0.3722 g de Na_2AEDT , completando con agua hasta 50 g. A partir de dicha disolución se hace una dilución 5:500 en un matraz de 500 mL y se desgasifica, obteniendo una disolución de tampón fosfato 2 mM y AEDT 0.2 mM que se usará como fase móvil.

Los patrones mixtos de As(III) y As(V) se preparan a partir de patrones de As(III) y As(V) de 1000 mg/kg, de manera similar a como se prepararon para las otras dos técnicas.

3.2.5 CONSERVACIÓN DE MUESTRAS

Para preservar las especies de As , las muestras de agua subterránea se tomaron y conservaron en las siguientes condiciones [31]:

1. *Filtración* por presión a través de una membrana no reactiva de acetato de celulosa de 0.45 μm de tamaño de poro para eliminar las partículas en suspensión. Algunas bacterias son de menor tamaño y, para eliminarlas, deben utilizarse filtros de entre 0.1-0.2 μm , pero en esos casos las concentraciones de As disuelto halladas son menores. La operación de filtrado se completó en menos de 10 min para minimizar el riesgo de precipitación de óxidos de hierro y manganeso en muestras alcalinas [31].
2. *Acidificación* de la muestra filtrada con el conservante elegido (ácido nítrico o ácido fosfórico) para evitar la precipitación óxidos metálicos, para reducir la actividad microbiológica y para minimizar la adsorción de metales sobre coloides y sobre las paredes del recipiente. La acidificación es necesaria para mantener el Fe y el Mn en disolución, evitando la co-precipitación del arsénico o la adsorción del mismo en los oxihidróxidos de Fe y Mn [31].
3. *Recipiente*: Las muestras se almacenaron en recipientes de polietileno. El vidrio prelavado con HNO_3 suele provocar la lixiviación de As y contaminación de la muestra; por el contrario, algunos tipos de plástico causan pérdidas de As que en determinadas condiciones se pierde por volatilización a través de los poros del plástico.
4. *Transporte y almacenamiento*: Las muestras se transportaron al laboratorio en neveras refrigeradas con hielo. Una vez en el laboratorio, se conservaron refrigeradas a 4°C y en la oscuridad para reducir los procesos bióticos y abióticos y para evitar reacciones catalizadas por la luz.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OPTIMIZACIÓN DEL RANGO DE MEDIDA EN HG-AAS

Se registraron líneas de calibrado en dos intervalos de concentración de As(III) y As(V). Por un lado en el rango corto de 0,5 – 10 $\mu\text{g/L}$ y por otro lado en el rango de 5 – 150 $\mu\text{g/L}$. El objetivo de estos ensayos fue estimar el rango de respuesta lineal del instrumento en las condiciones experimentales y comparar la sensibilidad de la técnica para las dos especies de As mediante la comparación de las pendientes de las líneas de calibrado en el tramo recto.

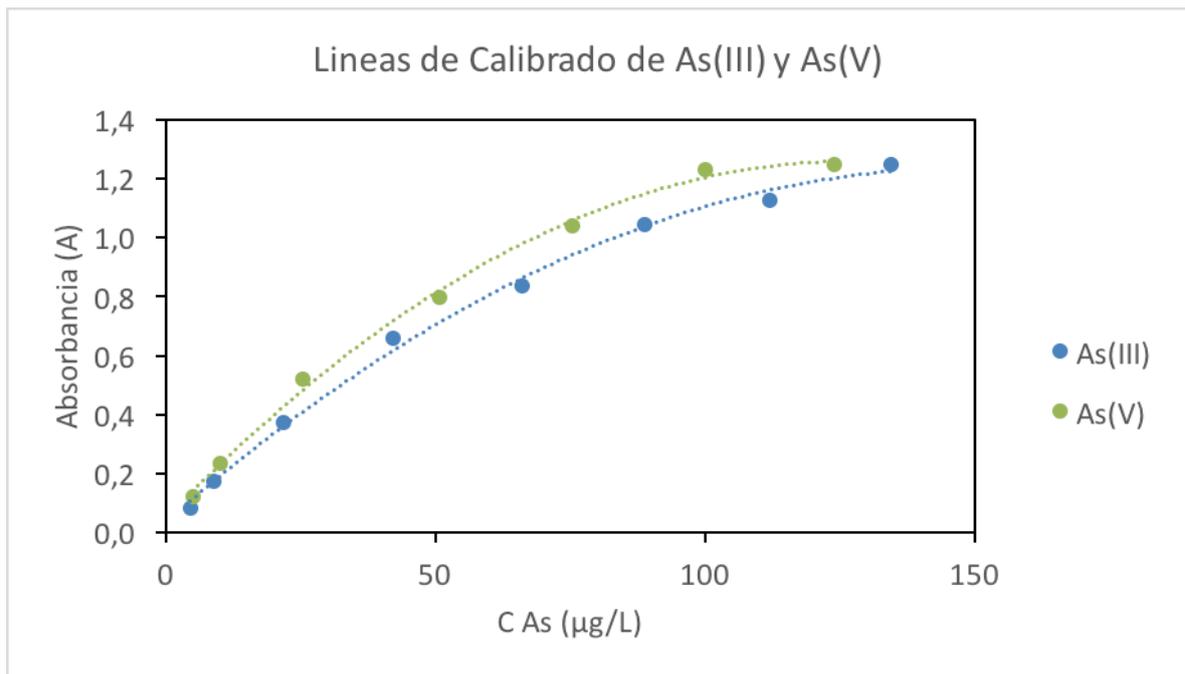


Fig 4.1.1. Líneas de Calibrado de As(III) y As(V) en el rango de 0,5-150 $\mu\text{g/L}$

Aunque la longitud de onda recomendada para la determinación de As por AAS es 193,7 nm, observamos que el rango lineal era muy estrecho y excesivamente sensible para los niveles de concentración de As en las muestras reales. Por ello se intentó ampliar el rango lineal empleando la longitud de onda secundaria de As, a 197,2 nm. Las líneas de calibrado registradas para As(III) y As(V) en el rango de concentraciones 5 – 150 $\mu\text{g/L}$ se

muestran en la **Fig. 4.1.1**. Incluso en estas condiciones, se pierde la linealidad a concentraciones superiores a 10 $\mu\text{g/L}$, por lo que se optó por realizar las determinaciones de As en HG-AAS únicamente para el rango corto de concentraciones, de 0,5 – 10 $\mu\text{g/L}$, a la longitud de onda primaria, 193,7 nm, diluyendo las muestras en caso necesario.

4.2 REPRODUCIBILIDAD DE LA SEÑAL EN HG-AAS

Para el segundo ensayo se realizaron sucesivas líneas de calibrado para As(V) y As(III) por HG-AAS, empleando la longitud de onda principal (193,7 nm), durante un periodo prolongado de tiempo, con el objetivo de comprobar si la respuesta del instrumento se mantenía estable en el tiempo y si los patrones podían utilizarse durante varias semanas.

Para ello, se prepararon diariamente 10 patrones de calibración de As(III) y As(V) con concentraciones comprendidas entre 0,5 y 10 $\mu\text{g/L}$, a partir de las mismas disoluciones madres de As(III) y As(V) de 1 mg/L, y se obtuvo la correspondiente línea de calibrado. Las medidas de las pendientes se realizaron durante un mes, a razón de dos sesiones por semana espaciadas durante al menos 2 días. La **Fig. 4.2.1** muestra las líneas de calibrado registradas. Se observa la linealidad de la respuesta en el rango de concentraciones ensayado y la poca variabilidad de las pendientes para cada una de las especies de As.

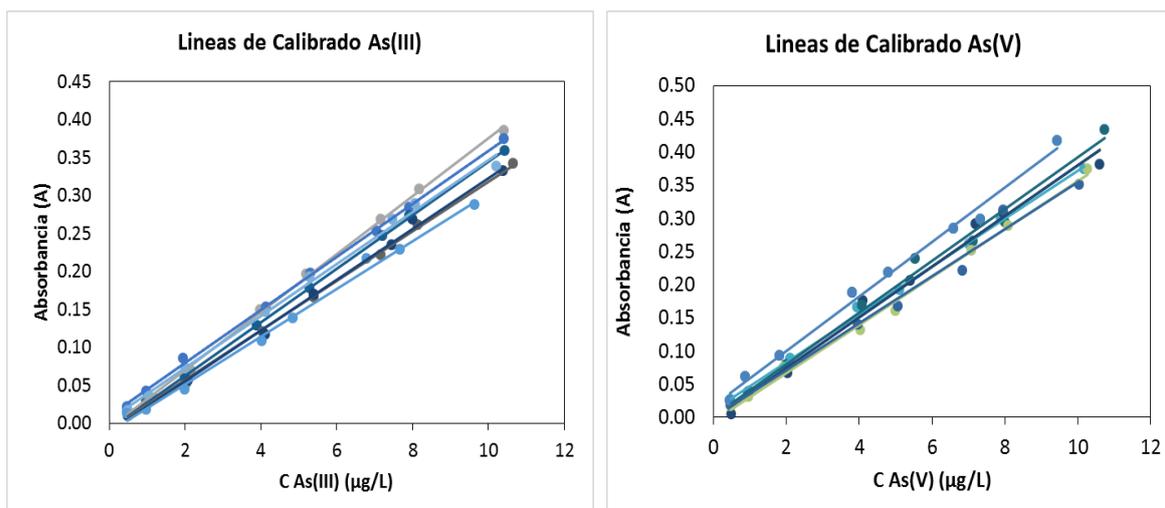


Fig. 4.2.1. Líneas de calibrado de As(III) y As(V) por HG-AAS a 193.7 nm

La **Tabla 4.2.1.** muestra las pendientes de cada línea registrada. Para comprobar si las pendientes de las líneas de calibrado para As(III) y As(V) son comparables se aplicó una prueba t de comparación de pares de valores. Se obtuvo un valor de $t = 2,869$, superior al valor crítico tabulado (t crítico = 2,447), por lo que se confirma que las diferencias son significativas, siendo mayor la pendiente media obtenida para As(V).

Fecha	As(III)	As(V)
16/2/16	0,0381	0,0361
17/2/16	0,0350	0,0382
23/2/16	0,0352	0,0391
24/2/16	0,0326	0,0362
29/2/16	0,0335	0,0354
1/3/16	0,0305	0,0392
8/3/16	0,0342	0,0410
Media	0.0342	0.0379

Tabla 4.2.1. Variación de las pendientes de las líneas de calibrado con el tiempo

La **Fig. 4.2.2.** facilita la visualización de la variación en el tiempo de las pendientes de la línea de calibrado. Se observa que inicialmente las pendientes son comparables, pero al cabo de unos días aumentó la sensibilidad para As(V) disminuyendo para As(III).

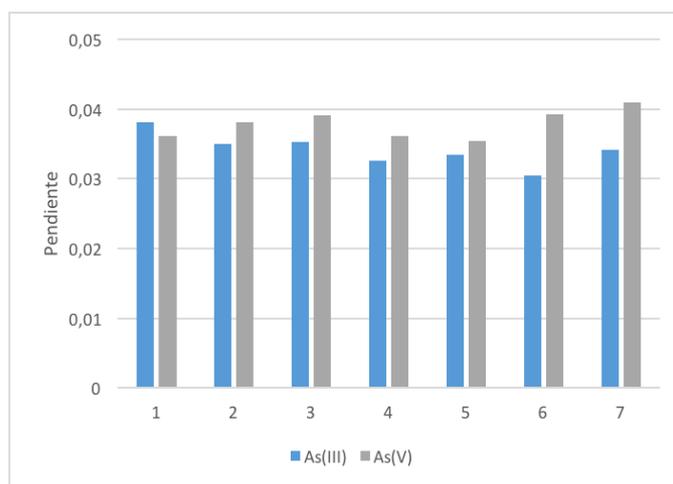


Fig. 4.2.2. Variación temporal de las pendientes de las líneas de calibrado por HG-AAS

Como se observa en las gráficas, las líneas de calibrado tanto para As(III) como para As(V) sufren una variación de la pendiente con el paso del tiempo (hasta de un 10%). Por ello se consideró óptimo volver a preparar los patrones de 1000 mg/L quincenalmente y los de

50 mg/L semanalmente, para evitar un error excesivo en las medidas por la variación de la pendiente. Ambos patrones son más estables si se conservan con un 0,1% de HNO₃.

Se decidió, en consecuencia, preparar diariamente tanto las disoluciones madre de 1 µg/L de As(III) y As(V) como los patrones de calibración para evitar el efecto de su falta de estabilidad sobre las determinaciones de As(III) y As(V) en muestras de agua.

4.3 OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS INSTRUMENTALES EN ASV

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

1. *Deposición reductiva del elemento:* A E= -0.3 V (vs AgCl/Ag): $\text{As(III)} + 3\text{e}^- \rightarrow \text{As(0)}$.

A un potencial más reductor (E= -0.5 V vs AgCl/Ag) se produce, además:



2. *Redisolución anódica.* Al finalizar 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): $\text{As(0)} + 3\text{Cl}^- \rightarrow \text{AsCl}_3 + 3\text{e}^-$, registrándose una corriente anódica proporcional a la cantidad de As(0) depositada que, a su vez, es proporcional a la concentración de As(III) y/o As(V) en la disolución si los parámetros experimentales (velocidad de agitación, tiempo de deposición...) se mantienen constantes.

Se obtienen señales en forma de pico cuya área y altura son proporcionales a la intensidad de la corriente registrada.

La intensidad de la señal se puede aumentar aplicando una modulación de potencial al barrido lineal anódico [33]. De entre las modulaciones de potencial disponibles se han aplicado las que se describen a continuación.

En voltamperometría de onda cuadrada (SWASV), la corriente anódica correspondiente a la reoxidación del As depositado en el electrodo es medida durante intervalos de tiempo muy cortos en la parte final de la onda positiva, al tiempo t_{11} , y en la parte final de la onda

negativa, al tiempo t_{i2} de cada onda cuadrada. La diferencia entre las intensidades de corriente, i_{1-2} , se registra en función del valor del potencial en cada escalón, obteniéndose un voltamperograma donde la señal correspondiente a la oxidación del As(0) es un pico aproximadamente simétrico.

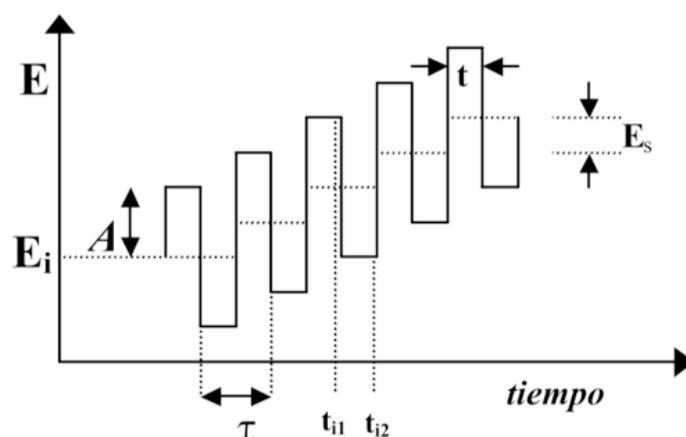


Fig 4.3.1. Variación del potencial aplicado en función del tiempo en Onda Cuadrada (SW)

Se estudió el efecto que ejercen, sobre la intensidad y forma del pico de una disolución de As(III) de $10 \mu\text{g/L}$, los siguientes parámetros: frecuencia de la onda, amplitud (A), variación de potencial del escalón (E_s), duración del impulso (τ). La **Fig. 4.3.2.** muestra los resultados obtenidos.

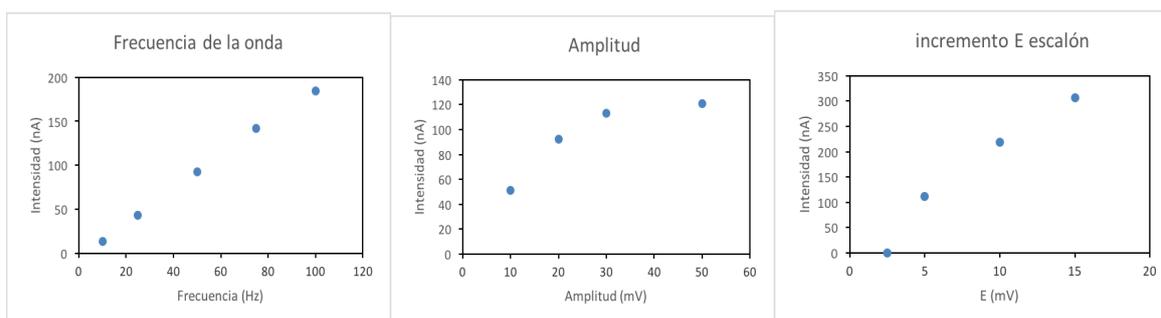


Fig. 4.3.2. Efecto de los parámetros de SWASV sobre la señal obtenida para una disolución de As(III) de $10 \mu\text{g/L}$

Los valores óptimos elegidos para la determinación de As(III) y As total en las muestras fueron: frecuencia de la onda, 50 Hz; amplitud de la onda, 30 mV; incremento de potencial del escalón, 10 mV; velocidad de barrido, 500 mV/s.

En voltamperometría diferencial de impulsos (DPV), el potencial inicial aplicado durante el tiempo de medida aumenta en pequeños incrementos de amplitud constante, E_s . Al final del tiempo de medida se aplica un impulso de potencial de valor constante durante un tiempo corto. Se miden dos intensidades de corriente: una inmediatamente antes de la aplicación del impulso, t_{i1} y otra inmediatamente antes de terminar el impulso, t_{i2} . El registro se efectúa como la diferencia entre estas dos intensidades de corriente, $i_2 - i_1$, en función del potencial impuesto al electrodo.

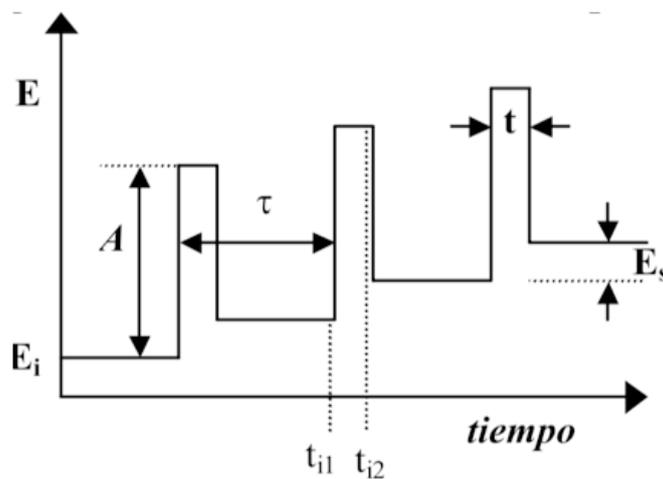


Fig. 4.3.3. Diagramas correspondientes a la técnica diferencial de impulsos (DP)

Como la mayoría de los parámetros ya fueron optimizados con SWASV, en este caso nos hemos centrado únicamente en ver el efecto de la amplitud del impulso y del incremento de potencial entre impulsos. Los resultados se muestran a continuación.

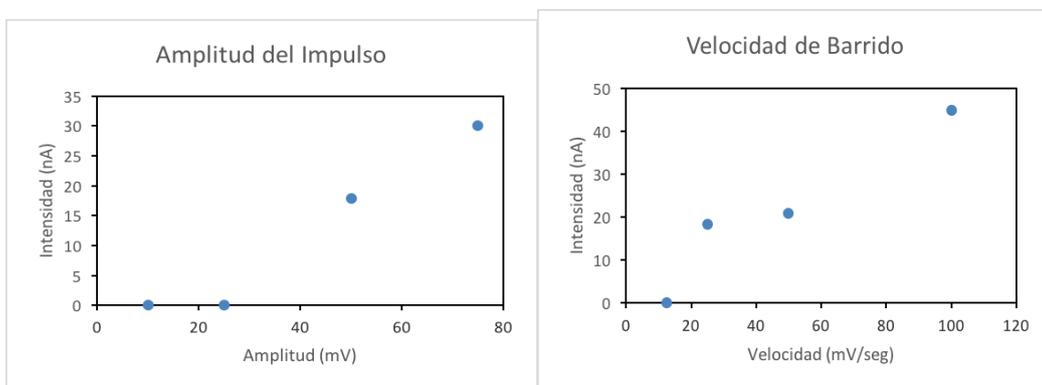


Fig. 4.3.4. Efecto de los parámetros de DPASV sobre la señal obtenida para una disolución de $As(III)$ de $10 \mu g/L$

Los valores seleccionados fueron: amplitud del impulso, 50 mV y velocidad de barrido, 100 mV/s (incremento de potencial, 10 mV; duración, 0.1 s).

La última técnica utilizada fue la de Direct Current (DCV), también conocida como Linear Sweep (LSV) o Barrido Lineal. En la práctica, el barrido no es exactamente lineal sino aplicado en forma de escalones de potencial creciente de corta duración.

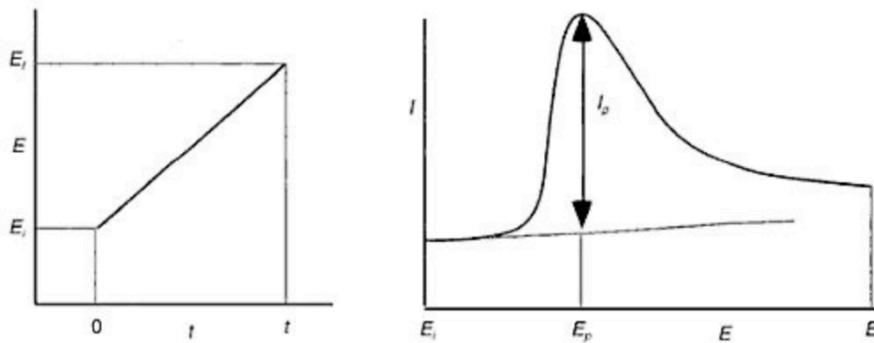


Fig 4.3.5 Diagramas correspondientes a la técnica de Barrido Lineal (LS)

En todas las técnicas de barrido descritas, la representación de la intensidad de corriente que circula por el electrodo indicador en función del potencial impuesto da lugar a un voltamperograma en forma de pico cuyos parámetros más importantes son la intensidad del pico (I_p), proporcional a la concentración, y el potencial del pico (E_p), característico de cada sustancia.

Finalmente, se estudió el efecto del potencial y tiempo de deposición sobre la intensidad del pico de redisolución anódica.

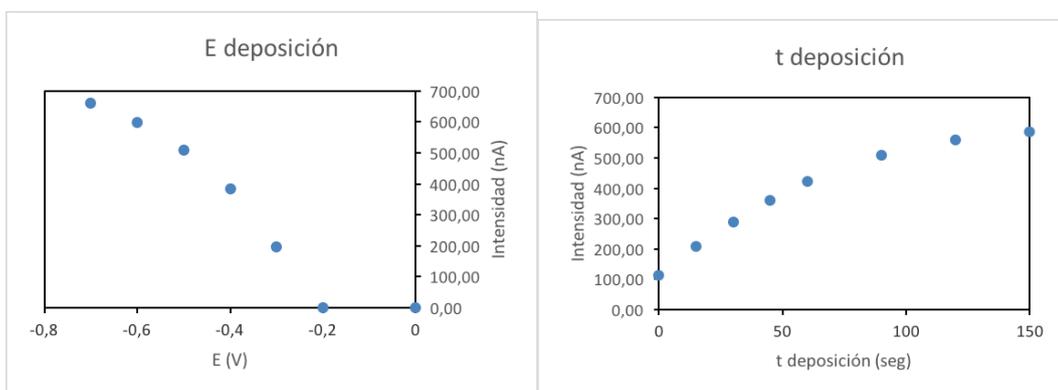


Fig. 4.3.6. Efecto del potencial y del tiempo de deposición sobre la intensidad del pico anódico para una disolución de As(III) de 10 $\mu\text{g/L}$.

El potencial de deposición elegido para la determinación de As(III) fue de -0.3 V pues a potenciales mayores no se produce la reducción a As(0), y a potenciales más reductores no se produce la separación de especies pues también se reduce As(V). Para la cuantificación simultánea de As(III) y As(V) se eligió un potencial más reductor, de -0.5 V. No se disminuyó más dicho potencial porque aumentaba la producción de hidrógeno impidiendo la correcta medida.

4.4 EFECTO DE LA MATRIZ ANALÍTICA EN ASV

Una vez optimizados los parámetros instrumentales en SWASV, DPASV y DCV, se investigó el efecto de la matriz analítica sobre la sensibilidad y el rango lineal para As(III). Para ello se obtuvieron líneas de calibrado por el método de adiciones patrón sobre tres matrices distintas (agua destilada, agua embotellada, que introduce el efecto de los componentes inorgánicos del agua, y agua del Canal de Castilla, que posee además materia orgánica), adicionando volúmenes crecientes de un patrón de 1 mg/L de As(III). Las **Figs. 4.4.1, 4.4.2** y **4.4.3**. muestran la variación de la intensidad corregida por la dilución frente a la concentración de As(III) añadida.

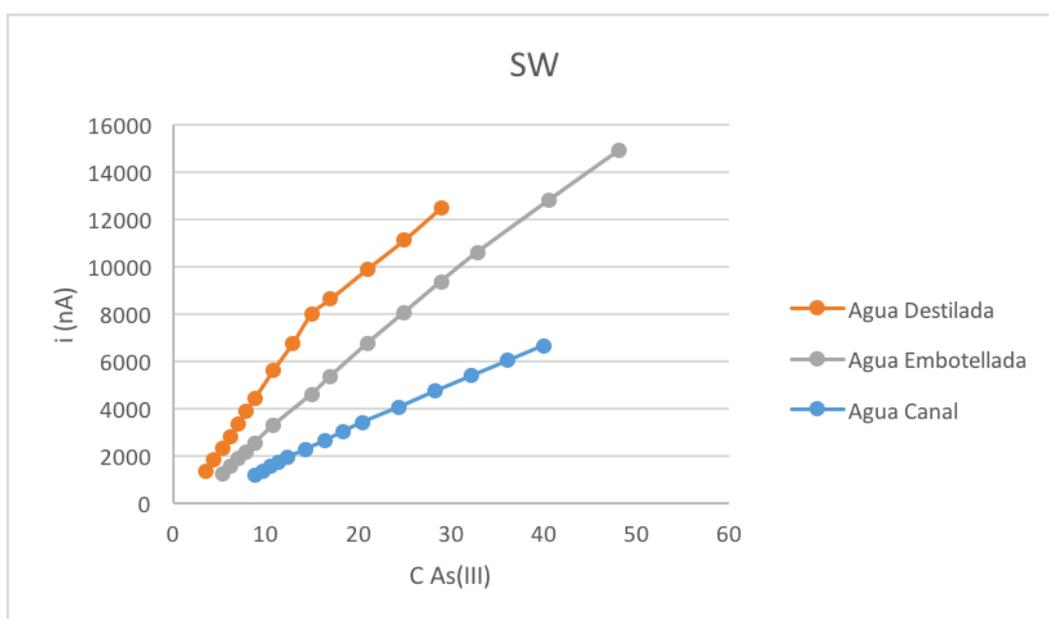


Fig 4.4.1. Líneas de Calibración obtenidas por SWASV en diferentes matrices

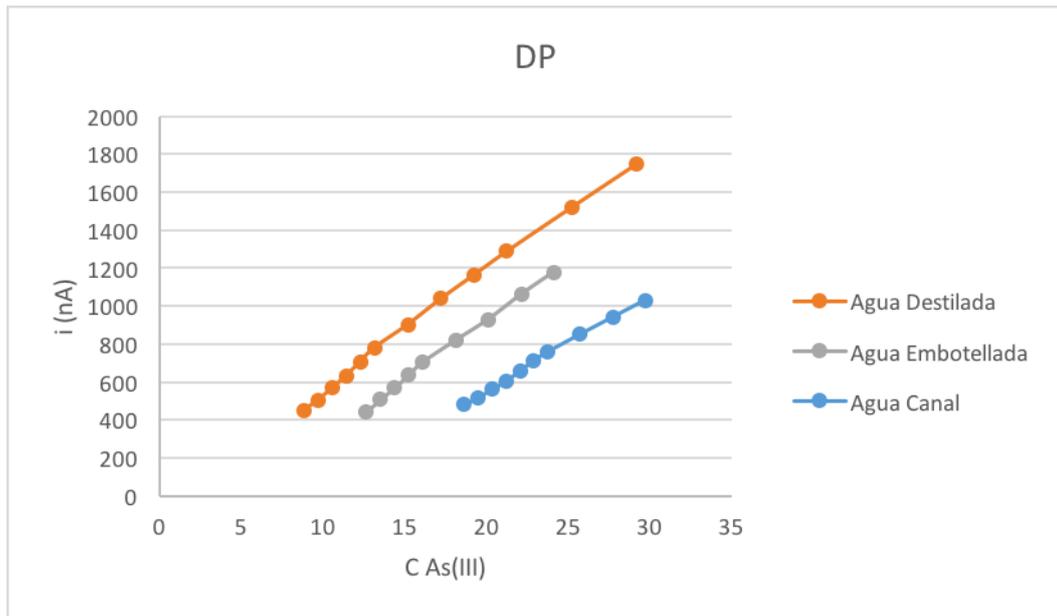


Fig 4.4.2. Líneas de Calibración obtenidas por DPASV en diferentes matrices

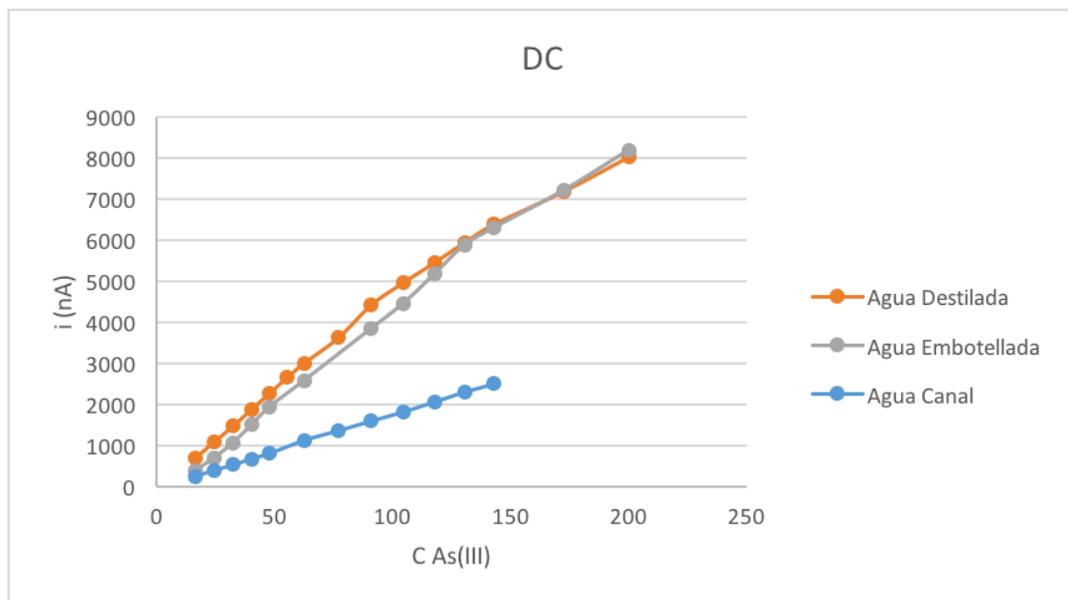


Fig 4.4.3. Líneas de Calibración obtenidas por DCASV en diferentes matrices

De estos gráficos se pueden extraer algunas conclusiones: (i) SWASV es el método más adecuado para la determinación de As(III) en concentraciones más bajas (0-10 $\mu\text{g/L}$), DPASV resulta más recomendable para un rango más amplio (10-25 $\mu\text{g/L}$) mientras que DCASV es mejor cuando se tienen muestras con altas concentraciones de As(III) (50-150 $\mu\text{g/L}$). Para concentraciones mayores será necesario diluir la muestra pues en todas las técnicas de barrido se pierde la linealidad. (ii) El efecto de posibles interferentes presentes, tanto en el agua embotellada como en el agua de canal, se observa en la

pendiente, que disminuye a medida que aumenta la complejidad de la muestra; en consecuencia, el límite de detección empeora. El límite de detección también empeora al pasar de SW a los otros modos de barrido. Para corregir este acusado efecto matriz deberá emplearse, como método de calibración, el método de adiciones patrón.

Se optó finalmente por emplear SWASV para la determinación y especiación de As en aguas subterráneas y, en caso de que la concentración sea superior al rango lineal, diluir la muestra con lo que se diluirán también los posibles interferentes.

4.5 EFECTO DE INTERFERENTES POTENCIALES EN HG-AAS

A continuación se estudió el efecto ejercido de varios iones, presentes de manera habitual en muestras de agua subterránea, sobre la especiación de As por HG-AAS para evaluar si ejercen un efecto competitivo. En el caso de voltamperometría, el ensayo de interferentes no se realizó ya que en el manual del equipo proporcionado por el fabricante se especifican los interferentes más importantes y la manera de reducir su efecto [34].

Los interferentes potenciales considerados fueron los cationes Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Sb^{3+} , Se^{2+} , Bi^{3+} y Ca^{2+} , los aniones NO_3^- y SO_4^{2-} y también se consideró el efecto del AEDT, como simulador de la materia orgánica y para posteriores ensayos de conservación. En el caso de interferencias significativas, habría que plantear la necesidad de realizar una cuantificación por algún método que minimice el efecto matriz (calibración por el método de adiciones patrón). Por otro lado, si un anión no presenta interferencias significativas se puede considerar el uso del ácido de dicho anión como conservante para posteriores ensayos.

Los reactivos utilizados para preparar las disoluciones interferentes fueron patrones comerciales ya preparados: Fe^{3+} 1000 ppm (Panreac); Cu^{2+} 1000 ppm (Panreac); Zn^{2+} 1000 ppm (Fluka); Ni^{2+} 1000 ppm (Panreac); Co^{2+} 1000 ppm (Fisher Chemical); Sb^{3+} 1000 ppm (Panreac); Se^{2+} 1000 ppm (Panreac); Bi^{3+} 1000 ppm (Panreac); y Ca^{2+} 1000 ppm (Panreac).

Se prepararon disoluciones de 5 $\mu\text{g/L}$ de As(III), y concentraciones crecientes de cada interferente catiónico de 1, 5, 50 y 500 $\mu\text{g/L}$ en función de su posible abundancia en las muestras de agua. El Ca^{2+} , como suele ser más abundante, se adicionó en concentraciones mayores dentro del rango de 1 a 100 mg/L. Para los interferentes aniónicos se prepararon de nuevo disoluciones de la misma concentración de As(III) y se añadieron concentraciones del 0,1% y del 1% de cada sustancia. Para el AEDT, se prepararon adicionalmente dos disoluciones con 0,01 M y 0,1 M del interferente.

Los resultados obtenidos del análisis de interferentes se muestran en la figura:

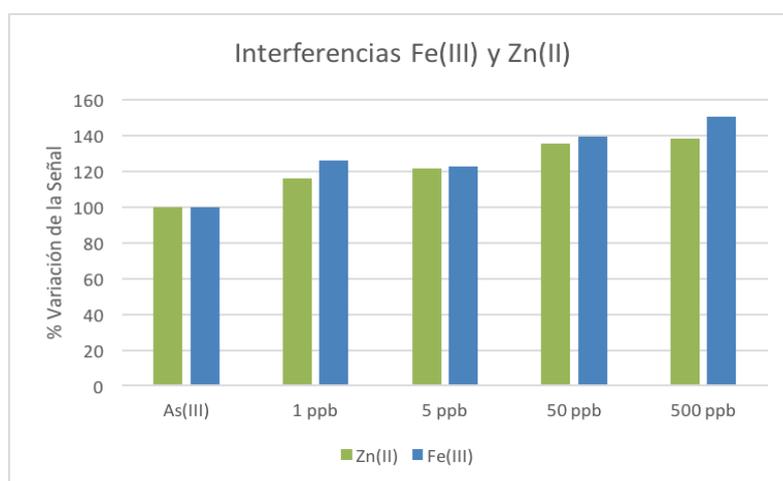


Fig 4.5.1. Efecto del Fe(III) y del Zn(II) sobre la señal de As(III) en HG-AAS

Un aumento de la concentración de Fe(III) en las disoluciones da como resultado un aumento de la señal en HG-AAS. Diferentes estudios revelaron que altas concentraciones de Fe (III) provocan la oxidación de As(III) a As(V), pero esto no ocurre hasta concentraciones mayores de los 500 $\mu\text{g/L}$ de Fe(III) en la disolución. Mayores concentraciones del catión podrían interferir seriamente en la determinación de especies de As.

El Zn(II) parece provocar interferencias muy bajas a concentraciones pequeñas, y solo muestra un aumento ligeramente mayor a concentraciones altas (500 $\mu\text{g/L}$). En el caso de muestras de agua con concentraciones muy altas de Zn(II), habrá que considerar realizar una corrección de las medidas.

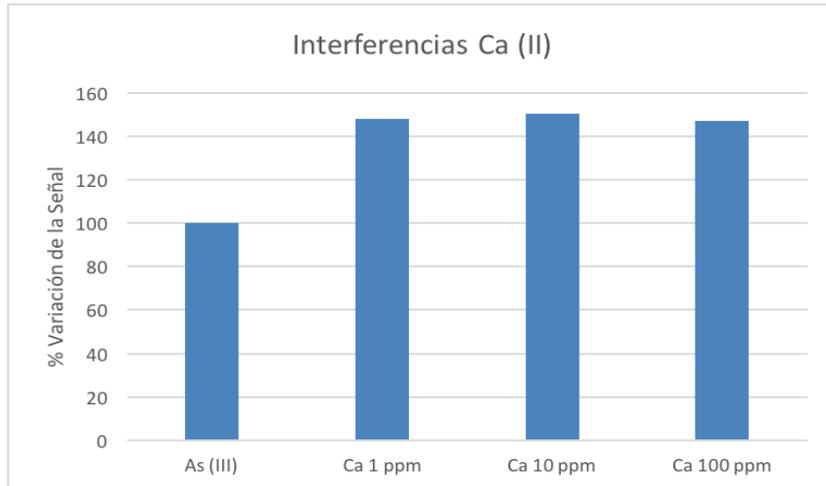


Fig. 4.5.2 Efecto del Ca(II) sobre la señal de As(III) en HG-AAS

La presencia de Ca(II) no modifica excesivamente la señal, incluso a altas concentraciones del orden de los 100 mg/L.

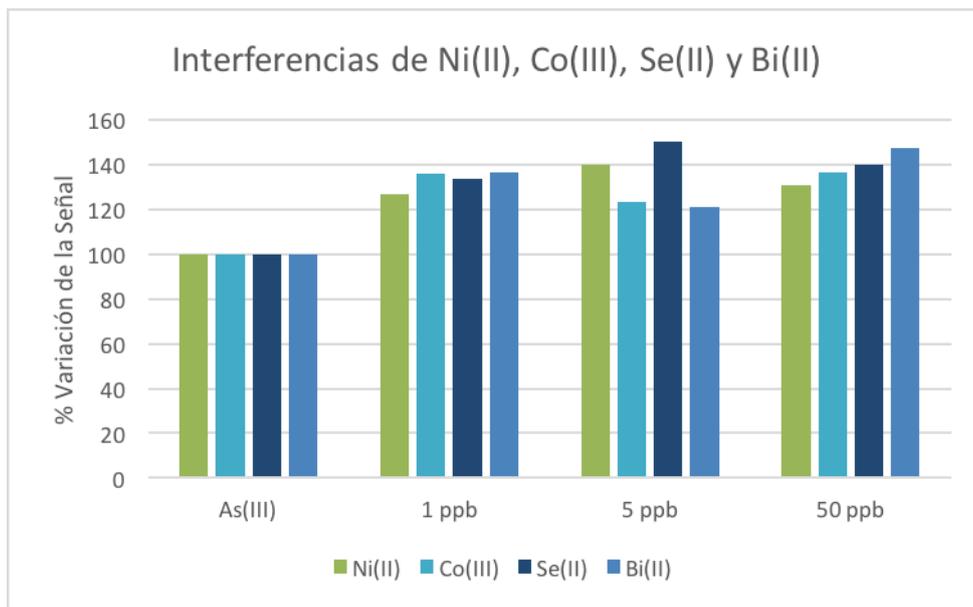


Fig 4.5.3. Efecto del Ni(II), Co(III), Se(II) y Bi(II) sobre la señal del As(III) en HG-AAS

El efecto de los elementos Ni(II), Co(III), Se(II) y Bi(II) es similar para los tres niveles de concentración ensayados, por lo que se consideró que no alteran en exceso la señal de As(III).

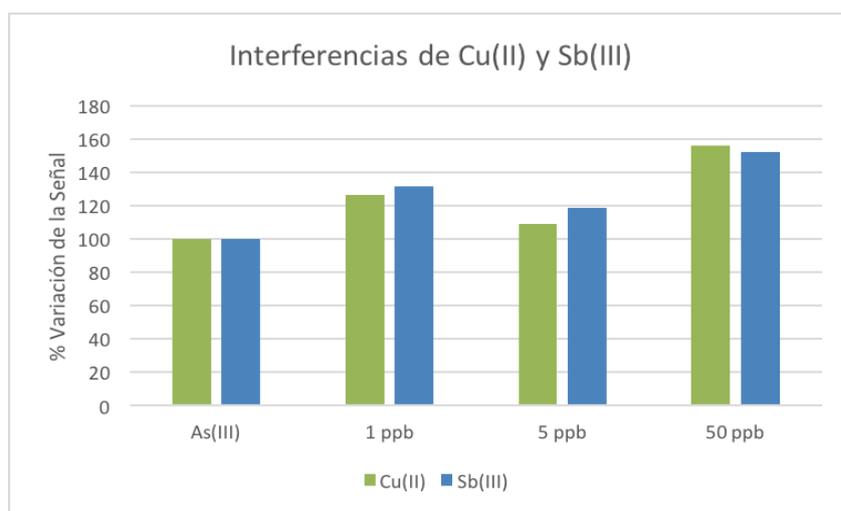


Fig 4.5.4. Efecto del Cu(II) y Sb(III) sobre la señal del As(III) en HG-AAS

El efecto de los cationes Cu(II) y Sb(III) es similar a los anteriormente citados, aunque con la diferencia de que sí se observa un aumento más considerable a concentraciones altas de ambos iones (50 µg/L). En el caso de aguas que presenten altas concentraciones de uno o ambos cationes, habrá que realizar la corrección pertinente en la medida.

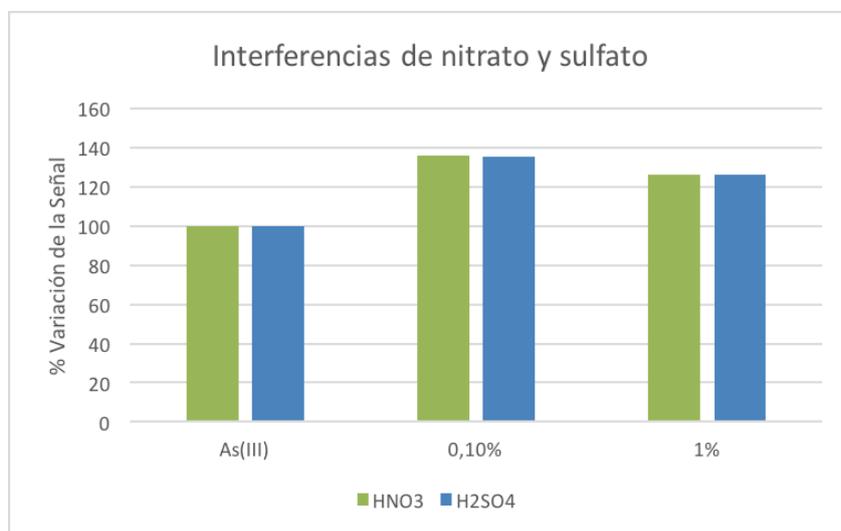


Fig. 4.5.5. Efecto del nitrato y de sulfato sobre la señal del As(III) en HG-AAS

La presencia de NO_3^- y SO_4^{2-} no alteró en exceso la señal de As(III), lo cual hace que puedan ser considerados como conservantes para las muestras de As.

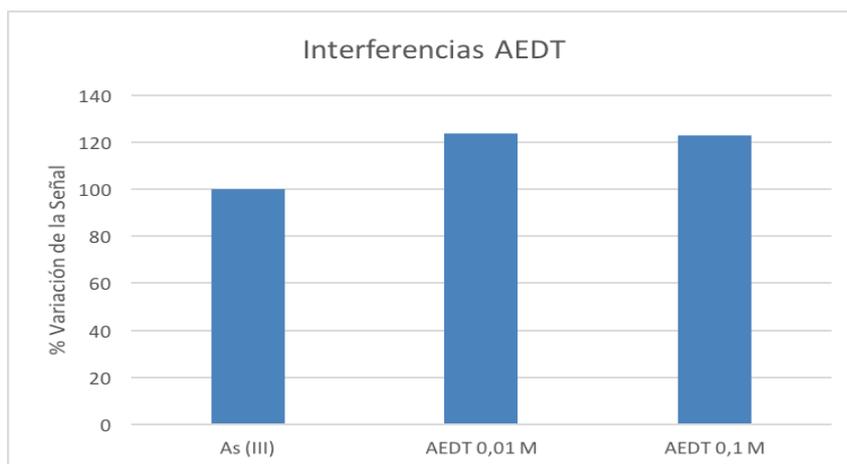


Fig. 4.5.6. Efecto del AEDT sobre la señal del As(III) en HG-AAS

La presencia de AEDT en la muestra de As(III) no afecta prácticamente a la señal en HG-AAS, por lo que el AEDT podría ser una buena opción para conservar las muestras cuando se mida en HG-AAS.

En el caso de algunos interferentes, como en Ni(II), Co(III), Se(II) o Bi(II), parece que la señal aumenta de forma notable al pasar de ausencia a 1 ppb de interferente, pero como la tendencia del aumento de la señal no parece aumentar al incrementar la concentración de interferente, se ha supuesto que esa variación de la señal es debida a un error en la preparación de la muestra o un error en la medida.

Altas concentraciones de Fe(III), Zn(II), Cu(II) y Sb(III) parecen ser los interferentes que más modifican la señal, por lo que en el caso de encontrarse muestras de agua con concentraciones altas de esos cationes habrá que realizar las correcciones pertinentes. Aún así, en las muestras tomadas para el ensayo de especiación no se apreciaron niveles excesivos, por lo que el efecto de los interferentes se pudo ignorar.

4.6 ELECCIÓN DE CONSERVANTE PARA LA ESTABILIZACIÓN DE LAS ESPECIES DE ARSÉNICO

Para la elección del conservante se investigó el efecto de una serie de reactivos ácidos o complejantes, elegidos de forma que se evitasen aquellos que interfieren en la medición por la técnica seleccionada, y de los datos obtenidos bibliográficamente [35-39]. Se

decidió comenzar el experimento con H_2SO_4 , AEDT, H_3PO_4 , HAcO , HNO_3 y HCl . Primero se realizaron ensayos para conocer cuál era la influencia en la señal a distintas concentraciones y así poder determinar la concentración idónea para que la señal de As(III) y As(V) no se viese influenciada.

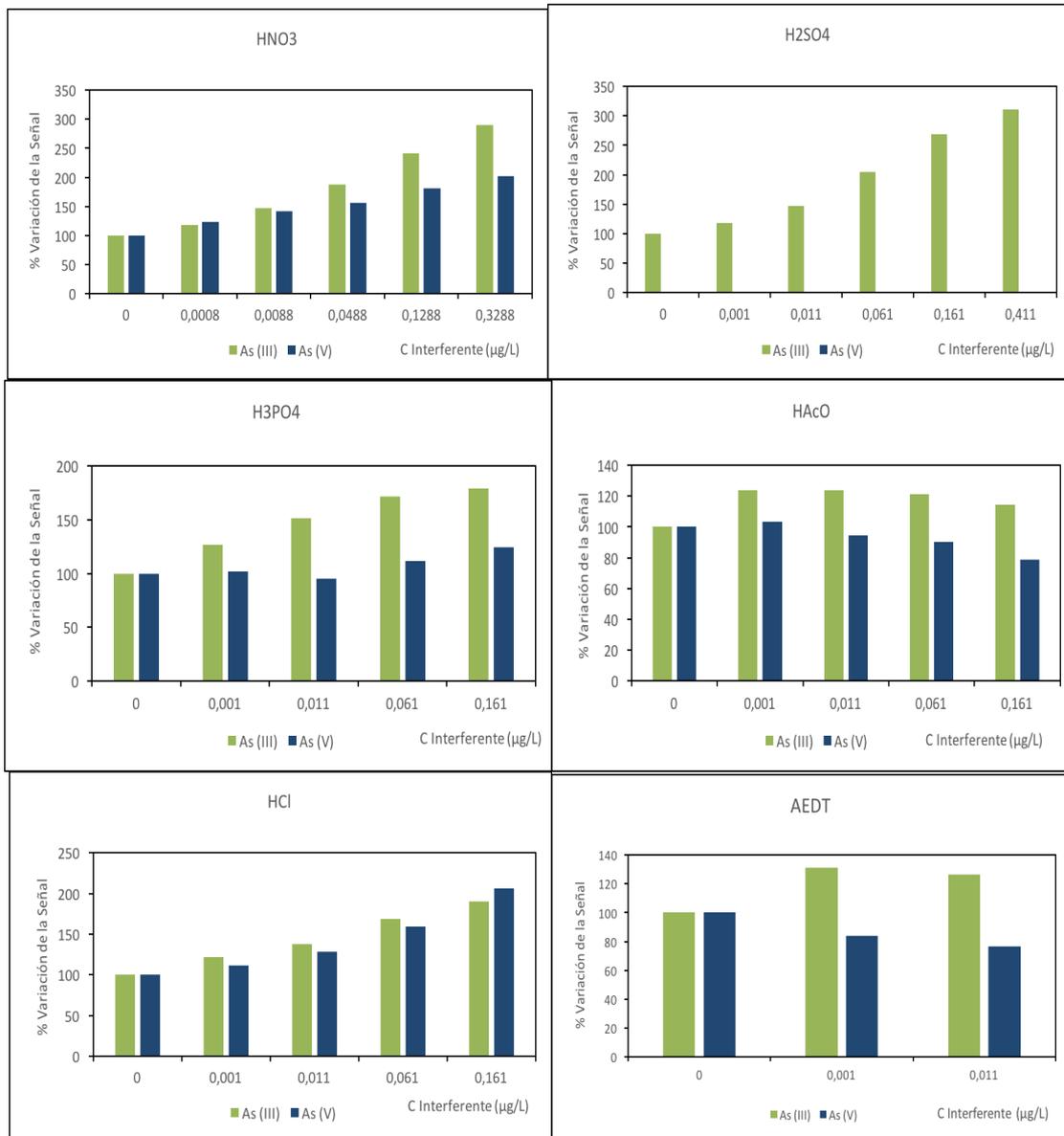


Fig 4.6.1. Efecto de los conservantes en la señal de As(III) y As(V) utilizando SWASV

Como se observa en los gráficos, la mayoría de los conservantes utilizados varían la señal de As(III) y As(V) de una manera similar, aunque hay dos casos diferentes que fueron los que se descartaron para análisis posteriores. Por un lado, el H_2SO_4 , a concentraciones altas, interfirió seriamente en la medida del electrodo de oro en voltamperometría, lo

que obligó a sustituirlo por otro, por lo que se optó por no continuar midiendo en As(V) con ese conservante. Por otro lado, el HAcO dio una señal bastante más alta en concentraciones bajas, por lo que se decidió prescindir de ese ácido también dado que la técnica ya ofrecía sobrada sensibilidad para los niveles de As en aguas subterráneas de la región.

Para el siguiente experimento, se seleccionaron los cuatro conservantes restantes: AEDT, HCl, HNO₃ y H₃PO₄, y se adicionaron en concentración 10 mM a disoluciones de As(III) y As(V) de concentración 15 µg/L. Debido a un error en la preparación, la concentración de As(V) final fue mayor de la esperada, alcanzando los 20 µg/L. Las muestras fueron guardadas en frío, a oscuras y en botes de plástico, y se realizaron mediciones de todas las muestras periódicamente tanto en voltamperometría como en HG-AAS para comprobar el tiempo que se mantiene la relación As(III)/As(V) y así poder elegir el conservante idóneo.

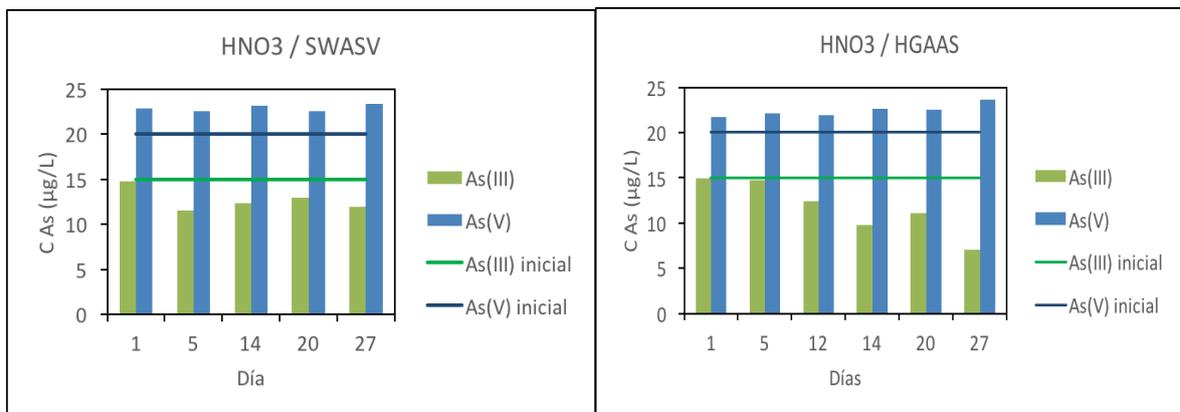


Fig. 4.6.2. Evolución temporal de la señal de As(III) y As(V) utilizando HNO₃ como conservante

El uso de HNO₃ como conservante parece mantener las muestras estables durante aproximadamente 12 días e incluso estabilizándose en las semanas posteriores. En HGAAS comienza a disminuir aproximadamente hasta los 12 días, mientras que en ASV en los mismos días sufre una estabilización que dura hasta los 27 días de almacenamiento de la muestra. Al no interferir demasiado en la relación As(III)/As(V), es un buen conservante para ser utilizado con posterioridad, sobre todo para voltamperometría.

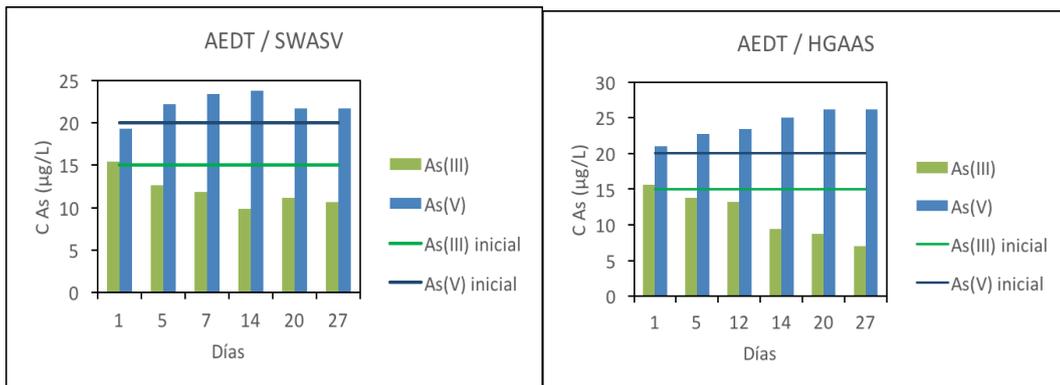


Fig. 4.6.3. Evolución temporal de la señal de As(III) y As(V) utilizando AEDT como conservante

En presencia de AEDT como conservante, la distribución de As (III) y As (V) se mantiene hasta las 120 h (5 días), incluso algo más en HGAAS. AEDT solamente (dando un pH de 6.2) no es suficiente para preservar las especies de As más de ese tiempo, sobre todo en aguas sin presencia de Fe(III) [35-37]. Es necesario acidificar con un ácido como HAcO para minimizar las pérdidas de señal por coprecipitación de otros elementos [37,38].

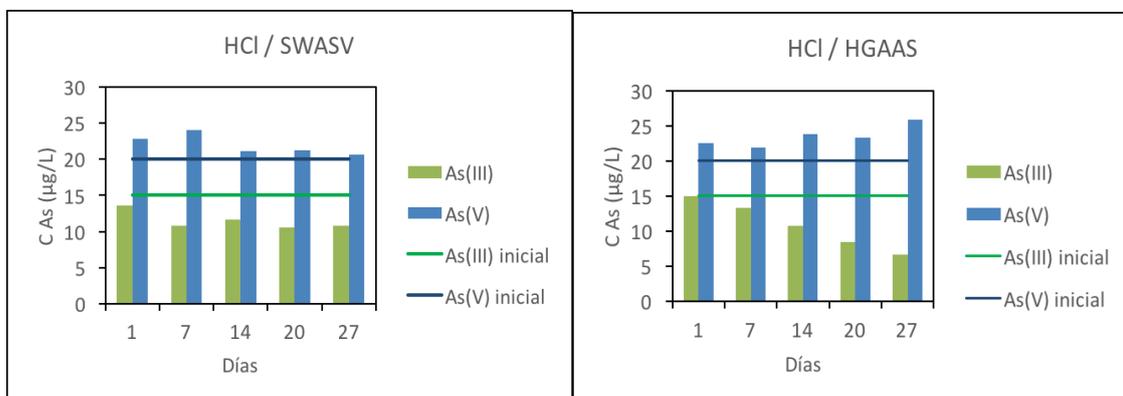


Fig. 4.6.4. Evolución temporal de la señal de As(III) y As(V) utilizando HCl como conservante

Por otro lado, el uso de HCl lleva a una disminución progresiva en HGAAS mientras que en ASV disminuye a los 7 días pero se estabiliza en esa concentración hasta los 27 días, aunque las causas de ello no se han averiguado.

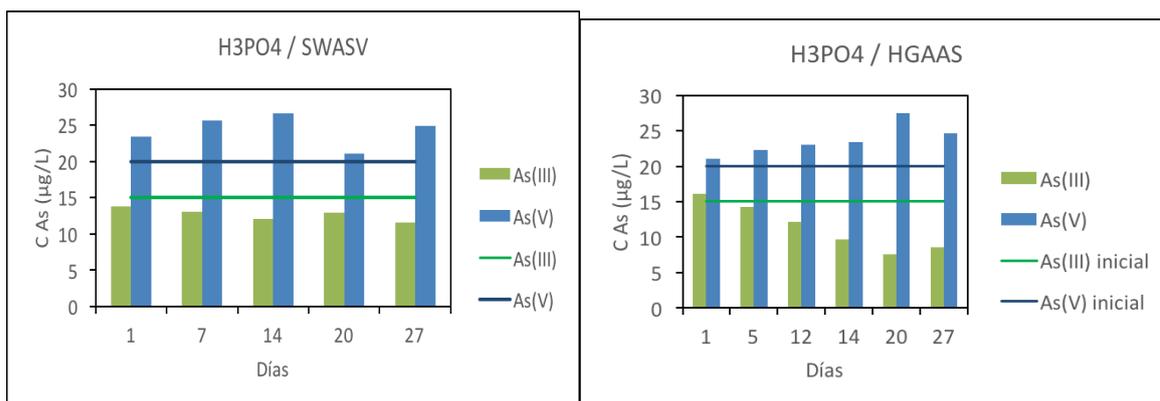


Fig. 4.6.5. Evolución temporal de la señal de As(III) y As(V) utilizando H_3PO_4 como conservante

H_3PO_4 es algo más efectivo, aunque en HGAAS As(III) disminuye a partir de los 7 días. El uso de ácido fosfórico como conservante puede llevar a la formación de precipitados de fosfatos. El fosfato de Ca no tiene demasiada relevancia debido a su alta solubilidad en disoluciones ácidas. En cambio, los fosfatos de hierro y de manganeso son más importantes debido a sus altas concentraciones en algunas aguas naturales, y a su insolubilidad en ácidos. La precipitación de $MnHPO_4$ es la más probable en aguas naturales. Es necesario un pH de 2 o menos para evitar dicha precipitación [38].

4.7 RESULTADOS DE LA ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO

Los métodos de especiación propuestos se aplicaron a muestras de agua subterránea recogidas en un área extensa de la comarca de Tierra de Pinares durante el mes de mayo de 2016. Una vez obtenidos los resultados, se compararon con los proporcionados por ICP-MS (Tabla 4.6.1).

Se puede observar como, por el método voltamperométrico, las concentraciones inferiores a 3 µg/L son difíciles de detectar, aunque esto puede ser debido a un desgaste del electrodo por su uso. Para las muestras de HG-AAS es necesario una previa separación del As(III) y el As(V) mediante cartuchos de aluminosilicato para evitar la reducción parcial del As(V) que provoca una señal excesivamente alta de As(III).

Muestra	HG-AAS			SW-ASV
	As(III) ($\mu\text{g/L}$)	As(V) ($\mu\text{g/L}$)	As total ($\mu\text{g/L}$)	As tot ($\mu\text{g/L}$)
M57	0,76	22,59	23,35	22,34
M58	0,48	2,18	2,66	-
M59	0,23	6,17	6,4	5,4
M60	0,44	6,53	6,97	7,45
M61	0,32	4,94	5,26	5,42
M62	0,07	1,7	1,77	-
M63	0,68	14,94	15,62	14,28
M64	0,04	0,78	0,82	-
M65	0,82	5,16	5,98	6,37
M66	0,52	16,7	17,22	21,88
M67	0,16	17,68	17,8	13
76	0,12	34,42	34,55	26,63
77	0,43	21,05	21,48	16,01
78	0,31	9,67	9,97	7,65
79	0,6	41,55	41,81	30,78
80	0,33	36,84	37,17	30,06

Tabla 4.6.1 Especiación de As en aguas subterráneas por HG-AAS y SW-ASV

Una prueba t de comparación de pares de valores dio un valor de $t = 2,70$, ligeramente superior al valor crítico $t_{(\alpha=0,05, 15 \text{ g.d.l.})} = 2.13$, por lo que se concluye que el método HG-AAS proporciona resultados sensiblemente superiores a los proporcionados por SWASV. La causa de la discrepancia debe ser identificada y corregida.

En muchas muestras la concentración de As total no llega al máximo permitido de $10 \mu\text{g/L}$, aunque es destacable que en muchas muestras la concentración se acerca a ese valor.

5. CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo un estudio para determinar los parámetros óptimos de dos técnicas de especiación de arsénico para concentraciones bajas, como son la espectroscopía de absorción atómica por generación de hidruros (HG-AAS) y la voltamperometría de redisolución anódica con un electrodo de oro (ASV). A su vez, se han analizado y comparado los resultados de diversas muestras de agua tomadas en zonas cercanas a Valladolid para determinar la validez de los resultados en ambas técnicas.

De los resultados obtenidos en los experimentos de optimización, se pueden determinar algunas de las siguientes conclusiones:

- La técnica espectroscópica HG-AAS es la más adecuada para un rango bajo de concentraciones de As (entre 0,5 – 10 $\mu\text{g/L}$) mientras que para rangos mayores es más adecuado la utilización de una técnica voltamperométrica por pulso diferencial (DP-ASV). El uso de voltamperometría de redisolución anódica con onda cuadrada (SW-ASV) también es un buen método para determinar arsénico en bajas concentraciones.
- La señal analítica producida por HG-AAS no es estable en el tiempo, ya que las líneas de calibrado obtenidas en ensayos sucesivos a lo largo de varias semanas dan como resultado una disminución de hasta un 10% en la pendiente, lo cual indica que es necesario calibrar diariamente el equipo antes de cada medida. La técnica voltamperométrica, al utilizar el método de adiciones patrón, corrige esas posibles fluctuaciones de la sensibilidad.
- Para medidas por HG-AAS de muestras que contienen tanto As(III) como As(V), es necesario utilizar un cartucho de aluminosilicato o similar para separar las dos especies, ya que el agente reductor utilizado para transformar el As en arsina es capaz de reducir parcialmente el As(V) cuando se determina As(III).
- De todos los interferentes potenciales estudiados, únicamente el Fe(III) y Zn(II) son los que ofrecen una variación de la intensidad considerable a concentraciones

altas (>500 $\mu\text{g/L}$). Como en la mayoría de las muestras tomadas no se alcanzan esos niveles de concentración, se ha optado por no tomar ninguna precaución ni corrección adicional.

- Aunque la mayoría de los artículos bibliográficos estudiados coinciden en que la conservación en frío y en la oscuridad es suficiente para mantener las muestras, se estudió el efecto de diferentes conservantes en la relación As(III)/As(V). El uso de HNO_3 0,01M y H_3PO_4 0,01M parecen ser los que mejor resultados dan, aunque difieren dependiendo de la técnica utilizada, siendo más efectivos en voltamperometría que en espectroscopía.
- La mayor parte de las muestras de agua tomadas y medidas se aproximan peligrosamente a la concentración máxima permitida de 10 $\mu\text{g/L}$ de As total, por lo cual es indispensable llevar un seguimiento de la calidad de dichas aguas, sobre todo si están destinadas al consumo humano. Ambos métodos mostraron que el As en las aguas subterráneas analizadas se encuentra mayoritariamente en forma oxidada, As(V). No obstante, los resultados proporcionados por HG-AAS fueron ligeramente superiores.
- Aunque SWASV es una técnica más lenta porque precisa aplicar el método de adiciones patrón, presenta varias ventajas frente a HG-AAS: sus costes de mantenimiento son inferiores, las medidas son más reproducibles y la sensibilidad se puede adaptar al nivel de concentración de analito en la muestra modificando el tiempo de deposición o cambiando la modulación de potencial impuesta.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Mandal B. K., Suzuki K. T., Arsenic round the world: a review. *Talanta*. 58 (2002) 201-235
- [2] Gong Z., Lu X., Ma M., Watt C., Arsenic Speciation Analysis, *Talanta* 58 (2002) 77-96
- [3] Anthemidis A. N., Zachariadis G. A., Stratis J. A., Determination of arsenic (III) and total inorganic arsenic in water samples using an on-line sequential insertion system and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 547 (2005) 237-242
- [4] Terlecka E., Arsenic Speciation Analysis in Water Samples: A Review of the Hyphenated Techniques. *Environmental Monitoring and Assessment*. 207 (2005) 259-284
- [5] Kumaresan M., Riyazuddin P., Overview of speciation chemistry of arsenic. *Current Science*. 80 (2001) 837-846
- [6] Jain C.K., Ali I., Arsenic: Occurrence, toxicity and speciation techniques. *Wat. Res.* 34 (2000) 4304-4312
- [7] 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
- [8] Rajaković L. V., Todorović Z. N., Rajatović-Ognjanović V. N., Onjia A.E. Analytical methods for arsenic speciation analysis. *J. Serb. Chem. Soc.* 78 (2013) 1461-1479
- [9] World Health Organization, Exposure to Arsenic: A Major Public Health Concern, (2010) <http://www.who.int/ipcs/features/arsenic.pdf>
- [10] Gong Z., Lu X., Mingsheng M., Watt C., Le C., Arsenic speciation analysis. *Talanta* 58 (2002) 77-96
- [11] Rasul, S.B., Munir, A.K.M., Hossain, Z.A., Khan A.H., Alauddin M., Hussam A., Electrochemical measurement and speciation of inorganic arsenic in groundwater of Bangladesh, *Talanta* 58 (2002) 33-43
- [12] Bhattacharya P., Welch A., Stollenwerk K., McLaughlin M., Bundschuh J., Panaullah G., Arsenic in the environment: Biology and Chemistry, *Sci. Tot. Env.* 379 (2007) 109-120
- [13] Smedley P.L., Kinniburgh D.G., A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *App. Geo.* 17 (2002) 517-568.

- [14] Gomez J.J., Lillo J., Sahún B., Naturally occurring arsenic in groundwater and identification of the geochemical sources in the Duero Cenozoic Basin, Spain. *Environ. Geol.* 50 (2006) 1151-1170
- [15] Calvo C., Álvarez-Benedí J., Andrade M., Marinero P., Bolado S., Contaminación por Arsénico en aguas subterráneas en la provincia de Valladolid: Variaciones estacionales. *Estudios de la Zona no Saturada del Suelo* 6 (2003) 91-98
- [16] 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
- [17] Watts M., O'Reilly J., Smiles C., Measurement of Arsenic Compounds in Water by HPLC-ICP-MS, *Brit. Gro. Surv.* (2007) 1-27
- [18] Ulusoy H. I., Akçay M., Ulusoy S., Gürkan 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
- [19] Anawar H. M., Arsenic speciation in environmental samples by hydride generation and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Talanta.* 88 (2012) 30-42
- [20] Coelho N.M.M., Cósme 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
- [21] Anthemidis A. N., Zachariadis G. A., Stratis J. A., Determination of arsenic (III) and total inorganic arsenic in water samples using an on-line sequential insertion system and hydride generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 547 (2005) 237-242
- [22] Welz, B. Speciation analysis. The future of atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 413
- [23] Feeney, R., Kounaves, S., Voltammetric measurement of arsenic in natural waters. *Talanta* 58 (2002) 23-31
- [24] 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
- [25] Mays D.E., Hussam A, Voltammetric methods for determination and speciation of inorganic arsenic in environment-A review. *Analytica Chimica Acta.* 646 (2009) 6-16.
- [26] Hung D.Q., Nekrassova O., Compton R.G., Analytical methods of inorganic arsenic in water: a review. *Talanta* 64 (2004) 269-277

- [27] Barra C.M., Correia dos Santos M.M. Speciation of Inorganic Arsenic in Natural Waters by Square-Wave Cathodic Stripping Voltammetry, *Electroanalysis*, 13 (2001)1098-1104
- [28] I. Komorowicz, D. Barańkiewicz (2011). Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry—Last decade, *Talanta*, 84:247-261.
- [29] Ramesh Kumar A., Riyazuddin P., Preservation of inorganic arsenic species in environmental water samples for reliable speciation analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 29(10) ; (2010) ; 1212-1223
- [30] Pandey P.K., Yadav S., Nair S., Pandey M. Sampling and preservation artifacts in arsenic analysis: Implications for public health issues in developing countries. *Current Science* 86 (2004) 1426-1432
- [31] Gómez, J. L., Morales, E., Sánchez-Rodas, D., Giráldez, I., Stability of chemical species in environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry*, 19 (2000) 200-209
- [38] Agilent Vapor Generation Accessory VGA 77 and VGA 77P. User's Guide. <https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/1047.pdf> (Acceso 02.07.16)
- [32] Scholz F., *Electroanalytical Methods: Guide to Experiments and Applications*, Springer, 2 (2010) 107-143
- [39] Determination of arsenic in water with the scTRACE Gold. Application Bulletin 416/1e http://partners.metrohm.com/GetDocument?action=get_dms_document&docid=145558
1 (Acceso 02.07.16)
- [33] Bednar, A.J., Garbarino, J.R., Ranville, J.F., Wildeman, T.R., Preserving the Distribution of Inorganic Arsenic Species in Groundwater and Acid Mine Drainage Samples. *Environ. Sci. Technol* 36 (2002) 2213-2218
- [34] Samanta, G., Clifford, D., Preservation of Inorganic Arsenic Species in Groundwater, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8877-8882
- [35] P.A. Gallagher, C.A. Schwegel, X. Wei, J.T. Creed (2001). Speciation and preservation of inorganic arsenic in drinking water sources using EDTA with IC separation and ICP-MS detection. *J Environ Monit*, 3:371-376.
- [36] Gallagher, P., Schwegel C., Parks, A., Gamble B., Wymer, L., Creed J., Preservation of As(III) and As(V) in Drinking Water Supply Samples from Across the United States Using EDTA and Acetic Acid as a Means of Minimizing Iron-Arsenic Coprecipitation, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 2919-2927

[37] Daus, B., Weiss, H., Mattusch, J., Wennrich, R., Preservation of arsenic species in water samples using phosphoric acid – Limitations and long-term stability, *Talanta* 69 (2006) 430-434

