

Tesis Doctoral

Metodologías combinadas de análisis en línea. Estudios de especiación de arsénico inorgánico en aguas subterráneas

Sigrist, Mirna

2009

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Sigrist, Mirna. (2009). Metodologías combinadas de análisis en línea. Estudios de especiación de arsénico inorgánico en aguas subterráneas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Sigrist, Mirna. "Metodologías combinadas de análisis en línea. Estudios de especiación de arsénico inorgánico en aguas subterráneas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química-Física

METODOLOGÍAS COMBINADAS DE ANÁLISIS EN LÍNEA. ESTUDIOS DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO INORGÁNICO EN AGUAS SUBTERRÁNEAS

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área de Ciencias Químicas

Mirna Sigrist

Directora de Tesis: Dra. Mabel Tudino

Director Asistente: Ing. Horacio Beldoménico

Consejero de Estudios: Dr. Fernando Battaglini

Lugar de trabajo: Laboratorio Central, Facultad de Ingeniería Química,
Universidad Nacional del Litoral

Buenos Aires, 2009

Agradecimientos

A Mabel, por continuar con la dirección de mi trabajo y sus palabras de estímulo en momentos de dificultad.

A Horacio, por alentar constantemente mi desarrollo profesional a lo largo de todos estos años.

A Juana, por el placer de la lucha compartida.

Al Laboratorio Central de la Facultad de Ingeniería Química por el apoyo brindado en la concreción de esta difícil tarea.

A Erico Flores y su grupo de trabajo de la Universidad Federal de Santa María, Brasil, por su amabilidad durante mi estadía y el entrenamiento recibido en HPLC-ICPMS.

A mi esposo y a mis hijos, por su amor y paciencia durante los años dedicados a este proyecto.

A todos los que demostraron su interés por mi anhelo de embarcarme en esta misión y se alegran por este momento.

Es mi deseo dedicar este trabajo a la memoria de Daniel Batistoni, quien fuera mi guía en los comienzos de este camino, permitiéndome disfrutar en el tiempo compartido, la verdadera humildad de los grandes.

**METODOLOGÍAS COMBINADAS DE ANÁLISIS EN LÍNEA.
ESTUDIOS DE ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO INORGÁNICO
EN AGUAS SUBTERRÁNEAS**

Resumen

El objetivo del presente trabajo es el estudio y la optimización de metodologías analíticas combinadas para la evaluación de arsénico total y sus especies inorgánicas a nivel de vestigios en aguas naturales. Las distintas estrategias se basaron en sistemas de inyección en flujo (FI) acoplados a generadores de hidruros (HG) y detectores atómicos (AAS) con atomizador de tubo de cuarzo (QT). Las metodologías para la “especiación” elemental de arsénico en aguas naturales desarrolladas en este trabajo fueron optimizadas en condiciones no usuales para FI-HG-QT-AAS con el objetivo de mantener la distribución original de especies existente en el momento del muestreo.

En el Capítulo 1 se presenta un panorama actualizado del problema sanitario ocasionado por la presencia de arsénico en las aguas subterráneas utilizadas para consumo humano en diferentes regiones del planeta, la relación existente entre las características hidrogeológicas de los reservorios naturales y la especie arsenical predominante, los avances aportados por recientes estudios toxicológicos y epidemiológicos como así también, el estado de la reglamentación sobre el tema a nivel nacional e internacional. Las metodologías analíticas más utilizadas en la determinación de arsénico y sus especies son también presentadas y discutidas en este capítulo.

En el Capítulo 2 se realiza una revisión detallada de las diferentes estrategias mencionadas en la literatura para la preservación de las especies metálicas a nivel de vestigios en muestras acuosas. Se presenta un muestreador para la extracción de agua subterránea destinada al análisis de “especiación”, el que fuera diseñado y construido en ocasión de este trabajo, con el objetivo de conservar la integridad de las muestras y las especies arsenicales durante las operaciones de muestreo. Las tareas de muestreo realizadas han involucrado la separación de las especies de arsénico inorgánico en campo mediante la utilización de resinas de intercambio aniónico fuertes y la recolección de las muestras para su análisis en laboratorio utilizando métodos en línea. Se discuten aquí, las ventajas y desventajas de la adición de preservantes en campo cuando el objetivo es el análisis de “especiación”, justificándose de esta forma la modalidad adoptada en este trabajo.

En el Capítulo 3 se presenta la optimización de una metodología FI-HGAAS para la determinación selectiva de As(III) mediante discriminación por pH en muestras de agua no acidificadas, en decir, sin preservar. Se presentan los mecanismos de transferencia de masa del analito desde el generador al detector y se postulan mecanismos de generación de átomos en tubos de cuarzo. Se analiza la bondad del diseño del sistema en flujo en términos de control de la dispersión (física y química) del bolo de muestra en el volumen total del *manifold*. Se muestran los resultados obtenidos en condiciones optimizadas y se hace una evaluación crítica de la influencia de las distintas variables operativas en la respuesta analítica ya que, la valoración en un medio de baja acidez, es atípica para el sistema FI-HGAAS empleado.

En el Capítulo 4 se presenta un segundo método para la “*especiación*” de arsénico basado en un proceso de extracción en fase sólida (SPE) en columna para la separación de As(III) y As(V) a través de intercambio de iones, acoplado a un sistema de generación de hidruros y detección por espectrometría atómica. Las variables del sistema SPE-FI-HG-QT-AAS desarrollado para la determinación de As(III) en línea, se optimizaron mediante la aplicación de diseño experimental.

En el Capítulo 5 se muestran los resultados del análisis de *especiación* de As(III) y As(V) inorgánicos en muestras de agua subterránea. Se realiza un estudio de interferencias ocasionadas por mecanismos de competencia en el proceso de extracción y se proponen alternativas para su eliminación. Se presentan aquí los estudios de validación de las metodologías analíticas desarrolladas en ocasión del trabajo utilizando como alternativa la espectrometría de masa con plasma inductivo acoplada a cromatografía líquida de alta performance (HPLC-ICPMS). Se comparan críticamente los resultados obtenidos.

El Capítulo 6 se dedica a detallar los reactivos, materiales y métodos utilizados a lo largo del trabajo.

El último capítulo está dedicado a las principales conclusiones. Las referencias bibliográficas son presentadas al final del trabajo.

Palabras claves: *arsénico, especiación inorgánica, aguas naturales, inyección en flujo, generación de hidruros en condiciones de baja acidez, espectrometría de absorción atómica, HPLC-ICPMS, trazabilidad de resultados.*

**COMBINED METHODOLOGIES OF ANALYSIS ON LINE.
STUDIES OF INORGANIC ARSENIC SPECIATION
IN UNDERGROUND WATERS**

Abstract

The main objective of the present work is the study and optimization of analytical methodology for the determination of ultra-traces of total arsenic and inorganic forms of arsenic in waters. The different approaches are based on flow injection systems (FI) coupled to hydride generation-quartz tube-atomic absorption spectrometry HG-QT-AAS. In order to keep the original distribution of arsenic species at the moment of sampling, analytical determinations were optimized under unusual conditions for HG-QT-AAS such as relatively high pH.

In Chapter 1, a contemporary and broad panorama of the sanitary problem produced by the high contents of arsenic in groundwater used for human drinking around the world is presented. The relationship between the different hydrogeological characteristic of natural reservoirs and the predominant arsenic species, the advances produced by the latest toxicological and epidemiological studies and the current worldwide regulations are shown. The main analytical methodologies are also presented and fully discussed along this chapter.

Chapter 2 shows a detailed review on the different approaches reported in the literature for the preservation of ultratrace levels of metal species in natural waters. A new device for groundwater samples extraction is presented. The apparatus was completely designed and assembled in our laboratories with the purpose of keeping samples integrity at the moment of the sampling operations. These operations were performed in the field and they have involved the separation of inorganic arsenic species by means of ionic exchange and the proper collection before transportation to our laboratory. The advantages and disadvantages of adding some kind of chemical compound for preservation are discussed here in order to explain the approach embraced along this work.

Chapter 3 presents the optimization of the FI-HG-QT-AAS methodology for the selective determination of As(III) by pH discrimination in non-preserved water samples (mostly free of mineral acids). The mechanisms of mass transfer of the analyte from the chemical vapor generator to the AAS and those of atoms production in the heated quartz tube are evaluated and discussed. The goodness of the design of the FI system is assessed in terms of the chances for chemical and physical control of the dispersion of the sample bolus in the whole manifold

volume. Results obtained under optimized conditions are shown. A critical evaluation on the influence of the different operational variables on the analytical signal is included considering that the determination is performed under unusual conditions for HG (a relatively high pH value).

A second method for arsenic speciation is presented in Chapter 4. It is based on a on-column solid phase extraction (SPE) for the separation of As(III) and As(V) by means of ionic exchange coupled to HG-QT-AAS. The operational variables of this new on-line system were optimized through experimental design.

Chapter 5 shows the results obtained for As(III) and As(IV) determinations in groundwater samples. The influence of different interferences usually occurring in natural waters is evaluated in terms of their competitiveness with the analytes during the extraction process. Alternatives for the elimination of interferences are also presented. Validation of analytical results performed by high performance liquid chromatography coupled to plasma mass spectrometry (HPLC-ICPMS) is also shown in this chapter. Results are compared and fully discussed.

Chapter 6 is dedicated to experimental and the last chapter is devoted to the most relevant conclusions. Bibliographical references are displayed at the end of the work.

Keywords: *arsenic, inorganic speciation, natural waters, flow injection, hydride generation under atypical conditions, atomic absorption spectrometry, HPLC-ICPMS, traceability.*

INDICE

Capítulo 1

Introducción	1
1.1. Arsénico en el medio ambiente	1
1.2. Metabolismo, toxicidad y legislación: una terna aún no resuelta	4
1.3. Necesidad del análisis de especiación	7
1.4. Técnicas analíticas para la determinación de arsénico total y especies. Ventajas de la incorporación de la inyección en flujo	8

Capítulo 2

Muestreo y preservación de aguas naturales para la determinación de especies de arsénico inorgánicas	17
2.1. Estrategias de preservación de las especies As(III) y As(V) en soluciones acuosas	19
2.1.1. Estabilidad de las especies de As inorgánicas en soluciones sintéticas	19
2.1.2. Estabilidad de las especies de As inorgánicas en muestras de aguas naturales	19
2.1.3. Selección del método de preservación utilizado	23
2.2. Colección y preservación de las muestras en campo	24
2.2.1. Sitio de muestreo	24
2.2.2. Dispositivo de muestreo	25
2.2.3. Tareas de muestreo	27

Capítulo 3

Sistemas en flujo acoplados a generación de hidruros y espectrometrías atómicas para la valoración de arsénico total y especies inorgánicas de arsénico	34
3.1. La espectrometría de absorción atómica	37
3.1.1. Componentes básicos de un espectrómetro de absorción atómica. Líneas de desarrollo en AAS	37
3.1.2. La señal analítica en AAS. Ley de Beer-Lambert	40
3.1.3. Corrección por absorción específica	42
3.2. Vapor químico por AAS	44
3.2.1. Generación del hidruro	45
3.2.2. Atomización de hidruro	52
3.3. Interferencias en HGAAS	56
3.3.1. Interferencias no espectrales en fase líquida	56

3.3.2. Interferencias no espectrales en fase gaseosa	57
3.4. La inyección en flujo en HGAAS	58
3.5. Resultados y discusión	62
3.5.1. Valoración de arsénico total en muestras de agua	62
3.5.2. Comportamiento de FI-HGAAS en la determinación de As(III) inorgánico mediante discriminación por pH selectivo en muestras no acidificadas	62
3.5.2.1. Influencia de la acidificación del medio	64
3.5.2.2. Influencia de la concentración de borohidruro de sodio	65
3.5.2.3. Influencia de la velocidad y composición del flujo de gas de transporte	66
3.5.2.4. Influencia de la longitud y forma de los conductos de mezcla y reacción	67
3.5.3. Metodología propuesta para la determinación selectiva de As(III) inorgánico en muestras de agua no acidificadas por FI-HGAAS mediante discriminación cinética por pH	67

Capítulo 4

Desarrollo y optimización de un sistema SPE-FI-HGAAS para la determinación en línea de especies inorgánicas de arsénico	76
4.1. Técnicas de separación/preconcentración acopladas a FI-AAS	77
4.2. Técnicas de separación/preconcentración cromatográficas acopladas a AAS	83
4.3. Diseño y optimización de un sistema SPE-FI-HGAAS	87
4.3.1. SPE en la eliminación de interferencias de As(V)	87
4.3.2. Acoplamiento en línea de SPE a FI-HGAAS	90
4.3.3. Figuras de mérito	91
4.3.4. Análisis de especiación en muestras sintéticas	92

Capítulo 5

Resultados del análisis de especiación de arsénico inorgánico en muestras de agua subterránea. Comparación de resultados por HPLC-ICPMS	101
5.1. Análisis de especiación de arsenicales inorgánicos por FI-HGAAS mediante discriminación cinética en condiciones de baja acidez para la determinación selectiva de As(III)	101
5.2. Análisis de especiación de arsenicales inorgánicos por SPE-FI-HGAAS “off-line” y “on-line”. Interferencias de aniones competidores	102
5.3. Análisis de especiación de arsenicales por HPLC-ICPMS. Interferencia del ión poliatómico $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$	103

5.4. Comparación de resultados. Costo-sensibilidad	105
--	-----

Capítulo 6

Materiales y Métodos	112
-----------------------------	-----

6.1. Reactivos	112
----------------	-----

6.1.1. Reactivos usados para la determinación de arsénico total por FI-HGAAS	112
--	-----

6.1.2. Reactivos usados para los estudios de especiación de arsénico inorgánico por FI-HGAAS mediante discriminación cinética en condiciones de baja acidez	113
---	-----

6.1.3. Reactivos y materiales usados para los estudios de especiación de arsénico inorgánico por SPE-FI-HGAAS “off-line” y “on-line”	113
--	-----

6.1.4. Reactivos y materiales usados para los estudios de especiación de arsénico inorgánico por HPLC-ICPMS	114
---	-----

6.2. Aparatos	114
---------------	-----

6.3. Procedimientos	116
---------------------	-----

6.3.1. Determinación de As total en aguas subterráneas por FI-HGAAS	116
---	-----

6.3.2. Determinación selectiva de As(III) inorgánico en muestras de agua no acidificadas por FI-HGAAS mediante discriminación cinética en condiciones de baja acidez	117
--	-----

6.3.3. Ensayos en “batch” para la evaluación de la resina de intercambio aniónico SAX en la separación de As(III) y As(V)	117
---	-----

6.3.4. Análisis de especiación de As(III) y As(V) en muestras sintéticas por SPE-FI-HGAAS	118
---	-----

6.3.5. Análisis de especiación de As(III), As(V) y As particulado en muestras de agua subterránea por SPE FI-HGAAS “off-line”	118
---	-----

6.3.6. Análisis de especiación de As(III) y As(V) en muestras de agua subterránea por SPE-FI-HGAAS	119
--	-----

6.3.7. Análisis de especiación de arsenicales en muestras de agua subterránea por HPLC-ICPMS	119
--	-----

Capítulo 7

Conclusiones	127
---------------------	-----

Referencias	129
--------------------	-----

Capítulo 1

Introducción

1.1. Arsénico en el medio ambiente

En la naturaleza, el arsénico puede encontrarse en cuatro estados de oxidación: As(V), As(III), As(0) y As(-III) con una abundancia terrestre aproximada de 1,5-3 mg kg⁻¹. Su presencia en el ambiente se encuentra asociada a fuentes naturales incluyendo la corteza terrestre, suelos, sedimentos, aire, agua y organismos vivos, y a fuentes antropogénicas. Su concentración promedio en rocas ígneas y sedimentarias comprendida entre 0,5 - 2,5 mg kg⁻¹, lo ubica en el lugar número 20 en términos de abundancia en la corteza terrestre. Más de 200 formas minerales naturales contienen este elemento en su composición de las cuales, 60% aproximadamente corresponden a arsenatos, 20% a sulfuros y el resto a arseniuros, arsenitos, óxidos, silicatos y arsénico elemental [1]. La arsenopirita (FeAsS), el mineral de arsénico más abundante, constituye su principal fuente de obtención.

La concentración promedio de arsénico en suelos, del orden de 6 mg kg⁻¹, muestra una gran variación con las regiones geográficas [2]. Las menores concentraciones son atribuibles a suelos arenosos y las mayores a suelos aluviales y orgánicos. El pH y el potencial redox sumado al tipo y concentración de los componentes adsorbentes definen la forma química de las especies de arsénico en los suelos. En general, las formas inorgánicas aparecen como predominantes aunque también pueden encontrarse enlazadas a materiales orgánicos. Las formas de As(V) inorgánicas predominan en suelos con ambientes aeróbicos de características oxidantes y se encuentran fuertemente absorbidas sobre arcillas, óxidos e hidróxidos de hierro y manganeso y materia orgánica. Por el contrario, las formas de As(III) predominan en suelos con características reductoras. Ambos estados de oxidación están sujetos a reacciones químicas y microbiológicas de óxido-reducción y metilación, lo cual deriva en la formación de compuestos de arsénico metilados, principalmente ácido monometilarsónico (MMAA), ácido dimetilarsónico (DMAA) y óxido de trimetilarsina (TMA₃O) bajo condiciones oxidantes y metilarsinas volátiles en ambientes anaeróbicos.

El arsénico en el aire se encuentra preferentemente adsorbido a material particulado como una mezcla de arsenito y arsenato. La presencia de especies orgánicas sólo resulta significativa en áreas de aplicación de pesticidas arsenicales [3]. En general, la concentración promedio en aire no contaminado es muy baja y oscila entre 0,4 y 30 ng m⁻³ [4,5].

Las aguas naturales contienen generalmente bajas concentraciones de metales traza de variable toxicidad. Los elementos presentes en forma catiónica, tales como Pb(II), Cd(II), Cu(II), Zn(II), entre otros, disminuyen su solubilidad a medida que aumenta el pH del medio mientras que los elementos que forman oxianiones tales como el As, Se y Cr permanecen disueltos inclusive a pHs altos. La solubilidad relativamente elevada del arsénico hace que pueda encontrarse tanto en ambientes reductores como oxidantes [6]. A potenciales rédox altos o moderados, se halla estabilizado como una serie de oxianiones pentavalentes H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} , AsO_4^{3-} . Por el contrario, en condiciones más reductoras (ácidas y medianamente alcalinas) predominan las especies de arsénico trivalente H_3AsO_3 (ver figuras 1.1; 1.2; 1.3). La presencia de As(0) y As(-III) es muy poco frecuente en ambientes acuáticos. Las formas orgánicas pueden ser producidas por actividad biológica, generalmente en aguas superficiales pero raramente en cantidades importantes. Entre los elementos presentes en agua de mar, el arsénico ocupa el lugar 14 con una concentración promedio entre 1 y 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ [7], donde el arsenato aparece como la especie termodinámicamente más estable [8]. Las concentraciones reportadas para aguas superficiales no contaminadas se encuentran comprendidas entre 1 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$, con valores de hasta 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ en áreas de industria minera [9]. Los más altos niveles de arsénico en sistemas acuáticos han sido reportados en las áreas de actividad térmica, donde las concentraciones alcanzan valores superiores a 6000 $\mu\text{g L}^{-1}$ [10]. En estos casos, el impacto de la contaminación generalmente permanece localizado en las proximidades del conducto termal como resultado de la capacidad fuertemente adsorbente que presentan los suelos y sedimentos por el arsénico, facilitando las acciones de reconocimiento y remediación.

Sin embargo, cuando la presencia de concentraciones elevadas de arsénico alcanza al agua subterránea, el problema adquiere una mayor magnitud, principalmente cuando se trata de reservorios utilizados para suministro de agua de bebida humana. Si bien las concentraciones son inferiores a 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ en su gran mayoría [11], alrededor de 20 países en el mundo padecen de contaminación arsenical en sus acuíferos afectando la calidad del suministro hídrico de más de 150 millones de personas. El incidente ocurrido en las aguas subterráneas de la costa sur-oeste de Taiwán, donde se informaron concentraciones entre 400 y 600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de arsénico en las zonas endémicas (1961-1985) [12], marcó el inicio de una serie de relevamientos y estudios asociados a esta problemática que aún en la actualidad despiertan gran interés en la comunidad científica, en organismos de control y en la población en general. También Bangladesh, India [13,14], Vietnam [15], Hungría, China, Chile, Estados Unidos, México y Argentina, entre otros, poseen aguas subterráneas contaminadas naturalmente con arsénico en niveles de hasta 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ [16]. En términos de población expuesta, los mayores problemas se presentan en Bengal Oeste (India), donde 40 millones de personas consumen agua contaminada con arsénico. En general, la

magnitud de la contaminación en las regiones afectadas posee un alto grado de variabilidad espacial lo que hace dificultoso o imposible predecir la concentración de arsénico en un sitio en particular a partir de los resultados obtenidos en sus vecindades.

En los acuíferos reductores, caracterizados por condiciones de pH cercanas a la neutralidad, escasez de oxígeno disuelto y de nitratos, y concentraciones de Fe, Mn y NH_4 elevadas, las formas de As(III) constituyen una alta proporción del arsénico total. Su movilización se origina generalmente en la desorción de óxidos minerales y la disolución reductiva (reducción a As(III)) de óxidos de Fe y Mn. Son ejemplos de este tipo, los acuíferos Cuaternarios de Bangladesh, Bengal Oeste (India) y Taiwan, donde más del 50 % del arsénico total se encuentra en la forma de As(III) [14,17], como también Vietnam, Hungría, Rumania y este de Estados Unidos. Los acuíferos oxidantes contaminados se encuentran generalmente en regiones áridas o semiáridas donde la recarga es lenta. Las bajas velocidades de flujo aumentan la magnitud del problema debido a la restricción de su remoción. Estos acuíferos se caracterizan por su elevada salinidad, presencia de O_2 disuelto y altos valores de pH. La solubilidad de los óxidos minerales bajo estas condiciones es baja por lo que la movilización del arsénico se produce principalmente como resultado de la desorción de los óxidos de Fe y Mn. La forma dominante es As(V) y suele estar asociado a otros aniones y oxianiones (F , HCO_3^- , V , Se , Mo). Ejemplo de estos son los acuíferos sedimentarios y volcánicos Cuaternarios del norte de Chile, México, sur-este de Estados Unidos y la región centro de Argentina [18-20], sobre la cual se focalizan los estudios llevados a cabo en el presente trabajo.

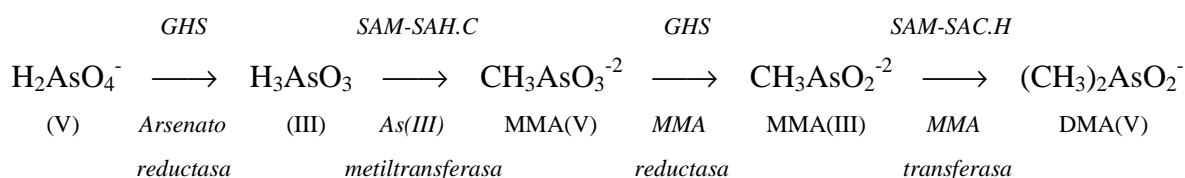
Como muchos otros metales, el arsénico es un elemento acumulativo en los organismos vivos. El rango de concentraciones encontradas es verdaderamente amplio dependiendo de las cantidades incorporadas o ingeridas. Los mayores niveles de acumulación se informan en animales marinos, en los que la mayor proporción se encuentra en la forma de compuestos orgánicos como arsenobetaína (AsB) y arsenocolina AsC), muy resistentes a la degradación química pero de baja toxicidad. En humanos, el arsénico se ubica en el lugar número 12, con una concentración promedio de $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ sobre base húmeda [7]. Su acumulación se manifiesta principalmente en tejidos ectodérmicos ricos en azufre como uñas y pelo.

Las fuentes antropogénicas de arsénico en el medioambiente superan en una relación 3:1 a las fuentes de origen natural. El agua, el aire y el suelo se convierten en los receptores del arsénico liberado por el hombre en su “cuestionada utilización de los recursos naturales”. La oxidación de minerales de sulfuro en actividades de minería, el uso de pesticidas, la aplicación de fertilizantes y los residuos industriales constituyen las principales causas de ingreso del contaminante al ambiente.

1.2. Metabolismo, toxicidad y legislación: una terna aún no resuelta.

El hombre se halla expuesto a diferentes especies de arsénico inorgánico y orgánico principalmente a través del agua y los alimentos. Cada una de estas formas posee propiedades fisicoquímicas y biodisponibilidad diferentes por lo que el estudio de la cinética y metabolismo es de complejo tratamiento aún comparado a otros contaminantes.

El arsenato ingerido es rápidamente reducido a arsenito en el plasma. La metilación parcial del arsenito tiene lugar en el hígado, donde las enzimas metiltransferasas de arsénico realizan el proceso de metilación con S-adenosilmetionina como dador de grupos metilo y GHS como co-factor esencial:



En ausencia de una ingesta excesiva de arsénico inorgánico, el metabolito mayoritario observado en la excreción urinaria es el DMA(V) (~ 60 %). Estudios recientes [21,22] han mostrado que el DMA(V) y el MMA(V) son reducidos en el organismo a sus ácidos trivalentes dimetil y monometilarsinosos, respectivamente, y excretados a través de la orina. Cuando el arsenical ingerido es la AsB, su absorción y excreción no involucran cambios significativos en el organismo [23]. La utilización de arsenato marcado radiactivamente (As^{74}) permitió observar que 60-70% del arsénico inorgánico es excretado por la orina (33-38% en 48 horas; lo restante en cinco días). La modalidad más frecuente por la cual actúa un elemento tóxico es la inactivación de sistemas enzimáticos. Ha sido sugerido que el arsénico trivalente interacciona con enzimas que contienen grupos -SH y -OH, especialmente cuando hay dos grupos -SH adyacentes. La acción inhibitoria se basa en la interrupción de la generación de ATP debido a la inactivación de la dehidrogenasa piruvato por complejación con As(III). Como consecuencia de este proceso, la cantidad de piruvato en sangre aumenta, la producción de energía disminuye y finalmente la célula es lentamente dañada [24]. El orden de toxicidad históricamente reconocido para las especies de arsénico, en el que los arsenicales inorgánicos solubles aparecen más tóxicos que los orgánicos, y el As(III) inorgánico aparece como más tóxico que el As(V) inorgánico [25,26], ha sido revisado en estos últimos años a la luz de las investigaciones más recientes. El avance de las técnicas analíticas permitió profundizar en la identificación y cuantificación de los

metabolitos de arsénico inorgánico creando nuevas hipótesis relacionadas a exposición, metabolismo y toxicidad [27,28]. El proceso de metilación considerado durante muchos años como el mecanismo de detoxificación para compuestos de arsénico en los mamíferos, ha sido fuertemente objetado a partir de la demostración de que metabolitos metilados pueden ser parcialmente responsables de efectos asociados con la exposición de arsénico [29]. El MMA(III), recientemente identificado en orina de personas expuestas a concentraciones moderadas de arsénico en agua de bebida [27], mostró ser hasta 26 veces más tóxico que el As(III) inorgánico en pruebas realizadas en células humanas [30,31] y 100 veces más potente como inhibidor *in vitro* de la tioredoxina reductasa [32]. La mayor genotoxicidad del MMA(III) y el DMA(III) comparada al As(III) inorgánico también ha sido comprobada [33].

Además de la excreción urinaria, las heces constituyen otra vía significativa de eliminación de arsénico. La transpiración, uñas, pelo, piel y en menor medida la leche materna [34], son rutas minoritarias. No obstante, algunas de estas rutas de liberación del contaminante son utilizadas como indicadores de exposición. El biomarcador más usado es el arsénico que se determina en uñas, pelo, sangre y orina. La aparición de arsénico en uñas y pelo es interpretada como exposición lejana ya que el As(III) aparece acumulado en tejidos ricos en queratina. La presencia de arsénico en sangre y orina es un indicador de exposición muy alta o reciente que revela su rápida eliminación por estas rutas.

La literatura abunda en observaciones toxicológicas para poblaciones expuestas a altos niveles de arsénico principalmente en agua de bebida [35,36]. Sin embargo, sólo pocos estudios hacen referencia al impacto ocasionado por concentraciones bajas o moderadas [37,38] en los que los efectos a largo tiempo parecen ser independientes de la forma química de exposición. Una revisión detallada puede encontrarse en la referencia [7]. Los efectos dérmicos tales como melanosis, queratosis, hiperqueratosis, enfermedad de Bowen o cáncer, han sido sistemáticamente reportados para exposiciones crónicas por consumo diario de aguas que contienen entre 0,01 a 0,1 mg As kg⁻¹ o más [25,35,36]. Los sistemas respiratorio [39], pulmonar [40], nervioso, gastrointestinal y cardiovascular también presentan serias afecciones relacionadas con la ingesta de concentraciones de arsénico elevadas. La enfermedad del pie negro (BFD), observada en múltiples estudios epidemiológicos llevados a cabo en Taiwán, aparece como resultado de deficiencias en el torrente circulatorio [41]. El hecho de que la misma prevalencia de BFD no haya sido observada en otros lugares con contaminación arsenical importante indica que otros factores, tales como la desnutrición u otros factores concurrentes, pueden haber jugado un rol decisivo [1]. Casos de anemia y leucemia han sido relacionados a exposiciones orales, crónicas, intermedias y agudas [7]. Su acumulación en el hígado y riñón ha sido asociada a

disfunciones diversas en ambos órganos. Los efectos genotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos se asocian a su acción inhibitoria en la reparación de ADN, principalmente debido a su alta capacidad de enlace con grupos -SH.

La profundización del conocimiento epidemiológico y toxicológico asociado a las especies de arsénico sumado al avance de las técnicas analíticas se ha visto reflejado en las reducciones aplicadas de manera sucesiva a los niveles recomendados o permitidos del contaminante. En agua de bebida, el nivel de contaminante máximo (MCL) establecido en la normativa europea CE (Comunidad Europea) 1998 [42], US EPA (Agencia de Protección del Medioambiente de Estados Unidos de América) 2001 [43] y recientemente adoptado por el Código Alimentario de nuestro país [44] es de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Esta concentración fue recomendada como valor de guía provisional por la WHO (Organización Mundial de la Salud) en 1993 [45] luego de que los compuestos de arsénico inorgánico fueran clasificados por la IARC (Agencia Internacional para Investigación del Cáncer) en el Grupo 1, correspondiente a compuestos con evidencias suficientemente comprobadas de carcinogenicidad para humanos. Este valor, ha sido calculado a partir de la curva de relación dosis-respuesta estimada para riesgo de cáncer de piel en la población de Taiwán crónicamente expuesta a concentraciones elevadas de arsénico en el agua de bebida [30,46] (corresponde a un riesgo estimado de cáncer de piel de $6 \cdot 10^{-4}$), y ha dado lugar a muchas discusiones. Si bien existen evidencias del modo de acción marcadamente no lineal para la carcinogénesis del arsénico [47], no es posible conocer hasta el momento el rango donde aparece la desviación a la linealidad. Experiencias preliminares *in vitro* llevadas a cabo sobre células humanas sugieren que dicha desviación podría estar ubicada en el rango del MLC de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ [48], de manera que el riesgo real a este nivel de concentración sería significativamente menor a aquel obtenido por extrapolación de la curva dosis-respuesta lineal a partir de altas concentraciones. Esta carencia de información científica acerca del riesgo de la exposición a bajas concentraciones de arsénico en agua de bebida, genera numerosas discusiones en torno a la adopción de límites nacionales o regionales permitidos para el contaminante ya que la aplicación de metodologías destinadas a su reducción (ósmosis inversa, reacciones de adsorción, entre otras) implica emprendimientos costosos de considerable envergadura. La OPS (Organización Panamericana de la Salud) ha llevado a cabo un interesante estudio epidemiológico de la exposición al arsénico a través del agua de consumo en la provincia de Santa Fe, Argentina, cuyos datos han sido recientemente publicados [49]. El incremento promedio de la tasa de mortalidad asociada a cánceres de hígado, vejiga y piel no melanoma estimada en 20 casos por millón al comparar poblaciones expuestas a concentraciones menores a $50 \mu\text{g l}^{-1}$ y concentraciones comprendidas entre 50 y $100 \mu\text{g l}^{-1}$, indicó la presencia de asociaciones estadísticamente significativas. No obstante, la baja incidencia observada ha permitido

argumentar en favor de un mayor límite regional permitido del contaminante basado en la relación costo-beneficio.

1.3. Necesidad del análisis de especiación

Es evidente que la determinación de la concentración total de arsénico, como sucede con muchos otros elementos, no es suficiente para realizar una evaluación ajustada de las consideraciones ambientales y clínicas que ocasiona su presencia. Como hemos mencionado, la movilidad y toxicidad del arsénico es dependiente de la forma química en la que se encuentra. Más de 20 especies de arsénico han sido identificadas en los sistemas ambientales y biológicos [50] entre las que As(III) y As(V) inorgánicos como ácidos arseniosos (H_3AsO_3 , H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-}) y ácidos arsénicos (H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-}), respectivamente, dimetilarsinato (DMA), monometilarsinato (MMA), arsenobetaína (AB) y arsenocolina (AC) aparecen como mayoritarias. La identificación y cuantificación de las formas individuales recibe el nombre de “análisis de especiación”. El término especies se asigna a las distintas formas que presenta un analito utilizando diferentes criterios como, su composición isotópica, estado de oxidación (especies redox), forma molecular (compuestos organometálicos), coordinación (formación de complejos), fase en la cual está presente el analito (disuelto, coloidal, absorbido, etc) o también su solubilidad selectiva en solventes diferentes.

La preservación de la integridad de las especies de interés durante las etapas de muestreo, conservación y pretratamiento es uno de los puntos clave a tener en cuenta para un análisis de “especiación” exitoso. De allí que deberá evitarse cualquier tratamiento de la muestra que resulte en un desplazamiento del equilibrio, destrucción o transformación de las especies. Otro aspecto crucial es la necesidad de utilizar detectores altamente sensibles debido a que, ante un análisis de “especiación”, será necesario valorar fracciones de elementos a nivel de vestigios. En el capítulo siguiente se describen detalladamente aspectos relacionados con las modalidades de preservación de las especies de arsénico en matrices acuosas.

Además de la importancia biológica y toxicológica que involucra el análisis de “especiación” arsenical, donde la mayor toxicidad adjudicada al As(III) prioriza el interés en el desarrollo de métodos para su determinación selectiva [51], su impacto en el orden tecnológico no es un aspecto menor. La eficiencia de los procesos de remoción de arsénico en el agua depende fuertemente de la forma química en la que se encuentra. Tanto para los tratamientos por ósmosis inversa como para el uso de materiales adsorbentes o procesos de coagulación, el As(V) es la especie con mayor facilidad de remoción [52-55]. Este hecho es sumamente importante a la

hora de desarrollar o seleccionar tecnologías para tratamientos de agua de consumo ya que la posibilidad de una etapa de acondicionamiento deberá ser evaluada en función de la forma rédox.

La literatura abunda en publicaciones referidas al análisis de “especiación” de arsénico en agua [35,56]. A partir de los primeros trabajos de “especiación” ambiental informados por Braman y Foreback en 1973 [57] en los que se utilizaba generación de hidruros (HG)-trampa criogénica (CT)-cromatografía gaseosa (CG), el número de trabajos publicados en el tema ha experimentado un incremento exponencial con múltiples propuestas de metodologías combinadas donde las técnicas espectrométricas adquieren un rol fundamental. Sin embargo, la necesidad de contar con prácticas estandarizadas para preservación de las especies, disponer de materiales de referencia, reconocer especies orgánicas encontradas y aún no identificadas [58,59], así como ampliar la información existente sobre la distribución de arsenicales en las regiones afectadas, son claros ejemplos que avalan la continuidad de los estudios en el tema.

1.4. Técnicas analíticas para determinación arsénico total y especies. Ventajas de la incorporación de la inyección en flujo.

Son varios los métodos analíticos que han sido utilizados para la detección de arsénico y sus especies en matrices de variada complejidad. Las condiciones diferenciadas en los parámetros operativos como así también la combinación de técnicas analíticas en forma discontinua o en línea hacen que, en muchos casos, un mismo sistema de detección pueda ser utilizado para la determinación de As total o sus especies individuales. En este sentido, la incorporación de sistemas automatizados basados en el movimiento controlado de fluidos en tubos de diámetro pequeño ha mostrado ser la mejor alternativa para el análisis químico, con la posibilidad de efectuar gran número de operaciones (tales como separación y preconcentración de las especies) en forma sucesiva, con mínima contaminación y alta precisión. Cuando la inserción de un volumen de muestra reproducible y controlado forma parte de este sistema automatizado, entraremos en el campo del análisis por inyección en flujo (FI) cuyo fundamento y características principales se tratan en detalle en el Capítulo 3 dada su relevancia en el presente trabajo.

A continuación nos referiremos brevemente a las metodologías analíticas más relevantes empleadas para la determinación de arsénico y sus especies, enfatizando en el análisis de “especiación” para As(III) y As(V) inorgánico en matrices ambientales acuosas:

Las espectrometrías de absorción atómica (AAS) de llama y fluorescencia atómica (AFS) acopladas a la generación de hidruros (HG) como método de derivatización de muestra aparecen

como las técnicas más utilizadas para la determinación de arsénico inorgánico. La alta selectividad, baja susceptibilidad a interferencias de la matriz, robustez y relativa facilidad de operación sumadas a costos de inversión y operación accesibles constituyen las razones principales por las cuales las espectrometrías atómicas han alcanzado una amplia difusión en la mayoría de los laboratorios. A partir del primer trabajo que utiliza HGAAS informado por Holak [60] en 1969, el número de publicaciones referidas a fundamentos teóricos y especialmente a aplicaciones en las más diversas matrices ha crecido de manera exponencial. El empleo de solución de tetrahidroborato de sodio (NaBH_4) en sustitución del sistema metal/ácido (generalmente Zn/HCl) antiguamente utilizado para generar los hidruros [61], aumentó enormemente la popularidad de esta técnica dada su relativa simplicidad y rapidez en el proceso de derivatización [62]. La técnica de generación de hidruros puede ser empleada como una herramienta sumamente útil en el análisis de “especiación” ya que, bajo condiciones de pH controladas, sólo ciertos estados de oxidación como las formas trivalentes de As y Sb y tetravalentes de Se y Te, forman sus respectivos hidruros permitiendo su determinación selectiva. Resulta oportuno notar que las especies formadoras de hidruros mencionadas, son precisamente las formas más tóxicas de cada elemento. Para el caso particular del arsénico, el NaBH_4 o THB volatiliza el As(III) entre pH -1 a 7 y el As(V) a pH menores de 0,3 para formar arsina. Las especies orgánicas del tipo $\text{Me}_n\text{AsO}(\text{OH})_{3-n}$ ($n = 1$ a 3) forman hidruros de metilarsénico (III) y trimetilarsénico (III) para valores de pH entre 0,3 y 1 [63]. Anderson et al. describieron la determinación selectiva de especies arsenicales inorgánicas y orgánicas mediante la utilización de diferentes soluciones buffer y reactivos [64]. Las diferentes velocidades de reacción que presentan las especies inorgánicas tri y pentavalentes con el NaBH_4 para formar hidruros pueden entonces ser utilizadas con buenos resultados para su determinación diferencial. Muchos de los trabajos informados en la literatura utilizan la HG solamente con la finalidad de preconcentración, ya que la etapa de separación de las especies se lleva a cabo previamente mediante técnicas tales como trampa fría [65,66], cromatografía de intercambio iónico a baja presión [67], extracción líquido-líquido [68,69], etc.

Aunque las técnicas de separación y preconcentración discontinuas usando técnicas como extracción con solventes, extracción en fase sólida, precipitación o co-precipitación, etc, son frecuentemente descritas en la literatura, la laboriosidad y lentitud que involucra su uso las coloca en una situación de desventaja respecto de los requerimientos de los laboratorios modernos. Las reacciones redox, en particular las sensibles a pH como las que nos ocupan, pueden verse afectadas cuando se realizan operaciones discontinuas lentas que habilitan la interconversión de especies en función del tiempo. La incorporación de FI permite diseñar sistemas donde la acidificación, separación y preconcentración puedan llevarse a cabo en

tiempos cortos, de manera que dicha interconversión de especies resulte poco significativa [70]. Por otra parte, la condición única de operación en tiempos reproducibles propia de los sistemas FI, soslaya la necesidad de alcanzar el equilibrio físico o químico al momento de medir. Una rigurosa evaluación de los parámetros y su comportamiento para la determinación específica de As(III) en un sistema de inyección en flujo acoplado a HGAAS se desarrolla en el Capítulo 3.

Tanto en HGAAS como en HGAFS la especie mensurable con sensibilidad aceptable y en condiciones de acidez no extrema, es el As(III). Sin embargo, la adición de una etapa previa de reducción de As(V) a As(III) permite extender el uso de cualquiera de las metodologías nombradas a la determinación de arsénico inorgánico total. El prerreductor de As(V) más utilizado es el yoduro de potasio en medio fuertemente ácido [64,71-74]. La oxidación de yoduro a triyoduro por oxígeno atmosférico puede prevenirse mediante la adición de ácido ascórbico al prerreductor. En los últimos años, se ha evidenciado una fuerte tendencia a recomendar el uso de L-cisteína como agente reductor ya que permite el trabajo en condiciones menos ácidas, reduce la influencia de interferentes y permite aumentar la sensibilidad del método analítico [75]. También ha sido informado su uso en la solución de NaBH₄ como estrategia para obtener sensibilidades comparables para As(III) y As(V) que hagan posible la determinación directa de arsénico inorgánico total [76]. Sin embargo, su uso no se ha extendido aún a las aplicaciones de rutina. La bibliografía ha descrito también el uso menos frecuente de otros agentes de prerreducción tales como el ácido mercaptoacético [64], el sulfito de sodio [77] y la hidracina [78]. La prerreducción de la muestra puede llevarse a cabo a través de un procedimiento discreto (en "batch") o en línea [79-81], espacio este último donde los sistemas FI cobran particular relevancia [71,82,83]. Guo et al [84] desarrollaron un método de rutina totalmente automatizado para la determinación de As(III), As(V), MMAA y DMAA en orina con valores de absorbancia comparables usando FI-HGAAS mediante la adición de L-cisteína en HCl diluido.

La espectrometría de absorción atómica electrotérmica (ETAAS) con horno de grafito (GFAAS) es otra alternativa analítica para valorar arsénico total en los niveles típicos de ocurrencia en aguas naturales no poluídas. Esta técnica, basada en la absorción de átomos libres generados a partir de una muestra depositada en un pequeño tubo de grafito calentado eléctricamente a altas temperaturas, posee una sensibilidad marcadamente superior a la AAS de llama. Sin embargo, cuando se trata de analitos volátiles como la mayoría de los compuestos arsenicales, se corre el riesgo de obtener señales deprimidas como consecuencia de la covolatilización del analito en el proceso de eliminación de la matriz de muestra. O sea, la característica fundamental de los sistemas de generación de vapor químico, es decir, la producción de compuestos volátiles del analito, es la máxima debilidad de los ETAAS en general

y los GFAAS en particular. Para evitar la desventaja descrita más arriba, es necesario utilizar en el horno de grafito los denominados modificadores de matriz de muestra [85-88] que retienen al arsénico en el tubo de carbón hasta el momento de su atomización. Por otra parte, la modalidad discontinua de operación, dificulta el acoplamiento en línea de los GFAAS con sistemas cromatográficos o de flujo para realizar análisis de “especiación” [70]. No obstante, varios trabajos describen la automatización de las operaciones de separación/preconcentración acopladas a ETAAS mediante diseños optimizados con buenos resultados, en los que la incorporación de columnas con distintos tipos de materiales de relleno para extracción en fase sólida aparece como la modalidad más utilizada para este propósito [89-93]. Así, la detección de arsénico en matrices acuosas basada en la preconcentración de la muestra previa a ETAAS [94] con modificadores de matriz, ha logrado alcanzar valores de sensibilidad comparables a FI-HGAAS [95] pero en condiciones de operación más complicadas.

La espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado (ICP MS) constituye una de las herramientas actuales más prometedoras para la determinación de arsénico en una multiplicidad de matrices ambientales y biológicas. A partir de sus primeras aplicaciones en la década del '60, ICP MS ha logrado un importante reconocimiento entre las técnicas de análisis evidenciado por el gran número de trabajos publicados. ICP utiliza un plasma para ionizar los componentes de la muestra que llega acidificada en forma de aerosol. La alta temperatura del plasma atomiza y ioniza todas las formas de arsénico de manera que, a diferencia de AAS, es posible alcanzar alta sensibilidad para todos los arsenicales. ICP MS se caracteriza por su capacidad de detección multielemental, elevada sensibilidad, amplio rango dinámico de trabajo (más de 3 órdenes de magnitud) y posibilidad de análisis absoluto por dilución isotópica. Los nebulizadores neumáticos son los más utilizados para la introducción de la muestra debido a su simplicidad de operación y bajo costo. Sin embargo, cuando el objetivo es la determinación de arsénico, el empleo de estos dispositivos presenta ciertas desventajas, esto es, a la baja eficiencia de transporte del analito hacia el plasma (< 5%) se suman las interferencias producidas por los altos niveles de cloruro que dan lugar a la formación del ión poliatómico $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ de igual masa que el ^{75}As [96,97]. Como resultado, los límites de detección se ven empobrecidos. La incorporación de la HG previo a la entrada del ICP MS aporta ventajas significativas en este sentido. La introducción de la muestra en forma gaseosa aumenta en aproximadamente un 100% la eficiencia de transporte del analito al ICP, lo que se traduce en un incremento de la sensibilidad y una reducción de los niveles de detección. Además, la liberación del hidruro de la matriz de muestra elimina las interferencias originadas por la presencia de cloruros. Sin embargo, el éxito de un sistema HG-ICP MS reside en establecer condiciones de compromiso entre la generación optimizada de los hidruros (es decir, eficiencia en la formación de todos los

hidruros de interés) y la operación del ICP MS (tolerancia a los ácidos, a las sales, a la evolución de hidrógeno, etc). Sólo de esta manera, los límites de detección para arsénico mejoran en un orden de magnitud comparados con los obtenidos al usar nebulizadores convencionales [98]. El uso de FI acoplado a sistemas HG-ICP MS ha dado lugar al desarrollo de metodologías para determinación de arsénico en muestras ambientales con límites de detección inferiores a 10 ng L^{-1} (ppt) [99]. Sin dudas que el elevado costo de instrumentación, la necesidad de reactivos ultrapuros y la laboriosa tarea de optimización dada la multiplicidad de variables que involucran estos sistemas aparecen como las mayores desventajas. Otra alternativa descrita para el reemplazo de la nebulización directa en ICP MS por un modo de introducción de muestra gaseosa, consiste en la vaporización electrotérmica (ETV) [100]. Este método también permite la eliminación de las interferencias de cloruros, debido a la posibilidad de remoción parcial o completa de los componentes orgánicos e inorgánicos de la matriz durante una etapa de calentamiento y calcinación. Los modificadores químicos utilizados en este caso poseen la función adicional de actuar como transportadores físicos, aumentando la eficiencia de transporte del analito al ICP hasta un 80%, aproximadamente [98,101,102]. No obstante, la escasez de reproducibilidad ($> 10\%$) y la presencia de efectos de memoria son frecuentemente observadas en la determinación de arsénico por ETV-ICP MS .

Cuando el interés reside en la determinación de los diferentes compuestos de un analito, la estrategia utilizada consiste en el acoplamiento de técnicas de separación cromatográfica a detectores específicos. Si bien aparecen en la literatura una gran cantidad de trabajos describiendo múltiples combinaciones de técnicas “hifenadas”, se tiende a utilizar las más consolidadas. En vista del número de trabajos publicados a partir de los '80, la inclusión de un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) al ICP MS ha mostrado el mayor crecimiento. Las razones que motivaron su rápida aceptación en análisis de “especiación” elemental pueden resumirse en: i) en contraste con el uso de GC, en HPLC no es necesaria la derivatización del analito a especies volátiles de manera que sólo se encuentran involucradas etapas de limpieza (clean-up) y extracción/preconcentración [79,80,103,104]; ii) la amplia variedad de fases móviles y estacionarias disponibles para HPLC posibilitan la separación de un gran número de especies con sólo encontrar la combinación adecuada; iii) la velocidad de flujo de la fase móvil y la velocidad de aspiración del ICP son comparables lo que habilita un fácil acoplamiento en la línea; iv) la alta sensibilidad que presenta este detector hace generalmente innecesaria la preconcentración del analito; v) los sistemas *hifenados* HPLC-ICP MS se encuentran disponibles en el mercado; y vi) la posibilidad de establecer un análisis de “especiación” preciso y con bajos límites de detección al utilizar métodos de dilución isotópica [105]. Las columnas de intercambio iónico son generalmente preferidas a las de par iónico o fase

reversa para la separación de las especies de arsénico, debido posiblemente a una mayor selectividad y menor tiempo de análisis requerido para la medida [106]. Las columnas de intercambio aniónico se emplean comúnmente para la separación de As(III), As(V), MMA(V) y DMA(V) mientras que las columnas de intercambio catiónico se prefieren para la separación de especies tales como arsenobetaína (AsB), arsenocolina (AsC), óxido de trimetilarsina (TMAO) y ión tetrametilarsonio (Me_4As^+) [107,108]. Las cromatografías de par iónico, si bien permiten el análisis de especies arsenicales orgánicas e inorgánicas tanto neutras como iónicas [109] los iones de amonio frecuentemente utilizados como agente de pareamiento solamente permiten la separación de un número limitado compuestos [106].

En este momento, la mayor desventaja que presenta esta poderosa combinación analítica reside en los elevados costos del ICP MS, manifestados no sólo en la inversión sino también en el mantenimiento para su correcta operación. Por otro lado, la determinación simultánea de especies de elementos diferentes por HPLC-ICP MS [81] puede ser aplicada raramente, limitando así la capacidad multielemental que caracteriza a este detector. Otro aspecto que merece ser contemplado, son los largos tiempos de análisis generalmente requeridos. Actualmente la instrumentación HPLC-ICP MS en los laboratorios analíticos se encuentra casi exclusivamente afectada al campo de la investigación, sin embargo, la necesidad inminente del análisis de “especiación” en la práctica rutinaria de los laboratorios comerciales motivada por exigencias de control de calidad y legislación, requiere de alternativas que permitan la determinación confiable de las especies a costos razonables. En este sentido, cuando el objetivo perseguido no incluye a la determinación individual de todas las formas químicas de un analito sino que es suficiente la identificación y/o cuantificación de, por ejemplo, las especies más tóxicas, se puede recurrir a una “especiación” operacional (relacionada con las operaciones que se realizan para aislar los compuestos) que tenga un correlato funcional (relacionado con la biodisponibilidad de dichos compuestos). Así, los métodos de extracción o volatilización acoplados a espectrometrías atómicas son comparativamente más simples, menos costosos, generalmente más precisos, a la vez que involucran tiempos de operación más cortos, todas ventajas importantes en el análisis de rutina.

Los tubos de cuarzo son los atomizadores de AAS más adecuados para la detección en línea en análisis de “especiación” luego de una separación cromatográfica. Su mayor limitación reside en el hecho de que solamente puede ser determinado el analito presente en fase gaseosa, es decir, GC o HG. En el caso de utilizar HPLC para la separación de compuestos, una interfase HG ubicada entre el cromatógrafo y el detector aparece como una alternativa importante para especies formadoras de hidruros [57,62,110]. La incorporación de HG permite obtener mayor

sensibilidad en comparación con el acoplamiento directo HPLC AAS [111]. HPLC-FI-HGAAS ha sido utilizado para la determinación de especies de arsénico de importancia toxicológica [112]. La fotooxidación por UV [110,113] y la termooxidación [114] han sido incorporadas luego del HPLC para descomposición de AsB y AsC y la posterior generación del hidruro con detección por AAS. Una ventaja adicional resultante de la inclusión de un paso de fotooxidación previo a HG, especialmente cuando se trabaja con fluidos biológicos, consiste en que las sensibilidades para las diferentes especies de arsénico, tanto inorgánicas como orgánicas, se vuelven comparables [70]. Por su parte, el acoplamiento HPLC-HG-ICP AES ha sido muy poco utilizado debido principalmente a limitaciones en la sensibilidad de las medidas [51]. Las metodologías que involucran separaciones cromatográficas y no cromatográficas de las especies de arsénico con distintos sistemas de detección se discuten en el Capítulo 4.

Varios métodos espectrofotométricos han sido utilizados en la determinación de arsénico total y sus especies. Howard y Arbab-Zavar [115] utilizaron dietilditiocarbamato de plata (SDDC) para determinar As(III) y As(V); la detección de As(III) en la forma de triyoduro luego de una extracción con benceno mostró una mayor sensibilidad [116]. También Chatterjee et al [14] utilizaron AgDDTC/CHCl₃/hexametilentetramina para la determinación espectrofotométrica de especies inorgánicas de As. No obstante, si bien se trata de una instrumentación de costo accesible para los laboratorios de rutina, los niveles de detección generalmente superiores a 10 µg L⁻¹ de arsénico informados empleando técnicas espectrofotométricas, hacen que su utilización se torne poco favorable a los fines de cumplimentar con normativas vigentes para aguas de bebida y ambientales.

Las técnicas electroanalíticas también han sido utilizadas para la determinación de arsénico. La falta de electroactividad del As(V) constituye la base de los métodos de “especiación de arsenicales”. La voltimetría de barrido lineal con un electrodo de gota de mercurio colgante (HMDE) no permite alcanzar los niveles de detección requeridos para la valoración de ultravestigios debido, principalmente, a que las altas corrientes capacitivas generan una señal de fondo que impide discriminar la señal del analito cuando es pequeña. La polarografía de pulso diferencial (DPP) [117,118] mejora los límites de detección pero aún siguen siendo poco prometedora cuando, por ejemplo, se quiere diagnosticar contaminación temprana de un recurso hídrico [95,117]. Las técnicas voltamétricas de redisolución anódica (ASV) y catódica (CSV) suelen ser más adecuadas para la determinación de trazas metálicas debido a la mayor sensibilidad que genera la preconcentración del analito sobre el electrodo de trabajo. Los métodos por ASV utilizan electrodos de oro y platino para la deposición del arsénico metálico debido a que el uso de HMDE puede devenir en la oxidación del mercurio con

la consecuente interferencia en la señal analítica. Los métodos que involucran CSV utilizan principalmente electrodos de carbón grafito para realizar la etapa de preconcentración [95,51]. Un HMDE se empleó en la determinación de As(III) en agua por voltametría de redisolución catódica de pulso diferencial (DPCSV) con Cu(II) para la formación de compuestos intermetálicos con arsénico (lo cual aumenta la sensibilidad) [119]. Un paso de reducción de As(V) a As(III) con ácido clorhídrico concentrado, ácido bromhídrico y cloruro de hidracina fue llevado a cabo previo a la determinación de As total. El límite de detección alcanzado de 1 mg L^{-1} evidencia los inconvenientes para su uso analítico. Una mejor performance pudo alcanzarse con el uso de un HMDE para muestras de agua tratadas con peróxido de hidrógeno y ácido sulfúrico con Cu(II) y Se(IV) para la formación de compuestos intermetálicos [120]. El límite de detección alcanzado fue del orden de $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Una etapa previa de irradiación UV y la adición de manitol al electrolito soporte fueron las estrategias aplicadas para la determinación de As total. La aplicación de métodos de DPASV y ASV mostró límites de detección $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ [121]. En este caso, el sulfito de sodio en solución de ácido concentrado se utilizó para la reducción de As(V) en la determinación de As total. Evidentemente, los altos niveles de detección alcanzados sumado a la gran cantidad de reactivos utilizados y, como en el caso de DPASV, los largos tiempos de análisis involucrados, las técnicas voltamétricas no ofrecen hasta el momento una performance atractiva para el análisis de especiación de arsénico a nivel de vestigios.

En cuanto a la utilización de electroforesis capilar (CE), los métodos informados para la especiación de arsénico se limitan a soluciones estándar o sistemas de matrices simples. Cuando CE se emplea en muestras reales, se observan cambios en los tiempos de migración del analito en las muestras con respecto al de los patrones. Diferentes sistemas de detección, tales como fotométricos, conductimétricos [122] e ICP MS con nebulizadores de inyección directa (DIN) [123] han sido acoplados a CE en análisis de “especiación” de arsenicales inorgánicos y orgánicos, dando lugar a niveles de detección en el orden del mg L^{-1} . La incorporación de la generación de hidruros como interfase entre electroforesis capilar y un ICP AES para análisis de especiación de As [124] resultó en límites de detección para As(III) y As(V) de $0,32 \text{ mg L}^{-1}$. Evidentemente, el desarrollo de metodologías que involucran CE para el análisis de especiación de arsénico en los niveles de concentración requeridos para monitoreos ambientales permanece aún como un área pendiente de la química analítica.

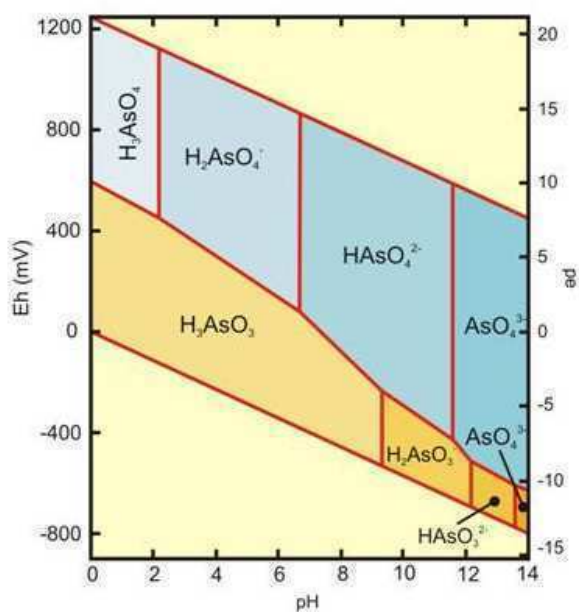


Figura 1.1. Diagrama de potencial para especies acuosas de As en agua a 25 °C.

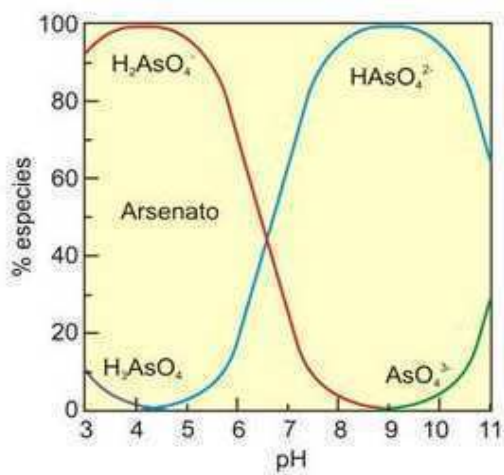


Figura 1.2. Distribución de especies acuosas de As(V) en función del pH.

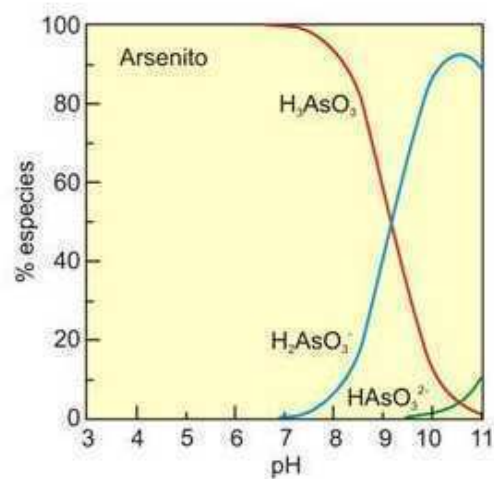


Figura 1.3. Distribución de especies acuosas de As(III) en función del pH.

Capítulo 2

Muestreo y preservación de aguas naturales para la determinación de especies inorgánicas de arsénico

El arsénico disuelto puede formar una variedad de especies acuosas con diferentes estados de oxidación. En aguas naturales, las formas inorgánicas de As(III) y As(V) son, predominantemente, arsenito y arseniato. Como hemos mencionado en el capítulo anterior, el conocimiento del estado redox de las especies de arsénico permite interpretar cuestiones relacionadas con su toxicidad, movilidad, transformaciones geoquímicas y eficiencia de los procesos tecnológicos utilizados para su remoción [125-127].

La distribución de los arsenicales tanto orgánicos como inorgánicos en ambientes acuáticos se encuentra básicamente controlada por el pH, el potencial redox (Eh), la presencia de Fe(III) y de H₂S, tal como veremos seguidamente. La interconversión entre especies puede ser causada por reacciones de óxido-reducción, precipitación, adsorción o actividad microbiana [128-130]. Por ejemplo, la reducción de As(V) por H₂S, conocida desde principios del siglo XX, ha explicado el predominio total de As(III) en aguas termales con concentraciones significativas de compuestos sulfurosos [131,132]. La presencia de Fe(III) puede afectar la distribución de las especies arsenicales según: a) El Fe(III) produce una rápida oxidación de As(III) [133,134] debido a la formación de radicales libres que actúan como intermediarios de reacción. La velocidad de oxidación se ve favorecida con el aumento de la relación Fe(III)/As(III), la presencia de luz y la disminución del pH debido a la rápida producción de diclororadicales ya sea por reacciones fotoquímicas, aumento de la temperatura y/o catálisis metálica. b) La eventual precipitación de Fe(OH)₃ que adsorbe preferencialmente arseniatos, ya que las formas oxianiónicas del As(V) a valores de pH típicos de aguas naturales son más propensas a la adsorción que la forma neutra As(OH)₃ que caracteriza a los arsenitos [135,136]. Un efecto similar pero de menor magnitud es el producido por MnO₂ [137].

Los microorganismos pueden alterar la distribución de arsenicales en aguas naturales debido a su capacidad de oxidar o reducir las especies en un rango amplio de temperatura, pH y composición de la solución. Las primeras observaciones fueron reportadas hacia fines del siglo XIX, describiendo la reducción de As(III) a trimetilarsina mediante la utilización de hongos. La reducción microbiana de As(V) puede obedecer a procesos de respiración anaeróbica bacteriana o de detoxificación [138,139] y puede persistir aún cuando las muestras en estudio hayan sido

sometidas a filtración [140]. Cuando una muestra de agua herméticamente cerrada contiene carbono orgánico disuelto como fuente de alimentación utilizable puede tener lugar la reducción de As(V) si no es debidamente conservada. No obstante, en condiciones aeróbicas también es posible observar la acción de microorganismos reductores de As. Esto adquiere especial importancia cuando se utilizan resinas orgánicas para la obtención de agua deionizada. Algunos autores han adjudicado la reducción de As(V) observada en soluciones sintéticas a la posible presencia de bacterias reductoras en los cartuchos de deionización [135,140]. La oxidación rápida de As(III) también ha sido reportada vía actividad microbiana [141], especialmente en aguas termales [142,143].

Dado la susceptibilidad que presentan las especies de arsénico a la modificación de su distribución original cuando son separadas de su ambiente natural, la necesidad de contar con procedimientos de preservación o estabilización estandarizados constituye un tópico de suma importancia aún poco explorado [144]. Los métodos propuestos en la literatura presentan una marcada inconsistencia y los estudios experimentales reportados generalmente no son explicados con adecuada claridad [128]. No existen hasta el momento procedimientos completamente efectivos para la preservación de muestras de aguas naturales, razón por la cual la separación de las especies en el sitio de muestreo suele ser la práctica recomendada [135,136,145]. Las grandes variaciones en las composiciones de la matriz sin duda contribuyen a la dificultosa tarea de encontrar procedimientos de preservación exitosos [146]. Además, las transformaciones redox observadas en experimentos llevados a cabo sobre muestras sintéticas en laboratorio no aparecen reflejadas con la misma magnitud en muestras reales debido principalmente al estado de estabilización natural en el que se encuentran las especies. La reducción fotocatalizada de Fe(III), la cual aparece como la causa más importante de oxidación de As(III) en experimentos de laboratorio, es poco observada en muestras reales debido a que las concentraciones de Fe(III) disuelto en aguas naturales son generalmente bajas y su fotorreducción es inhibida por la presencia de Fe(II) o SO_4^{2-} [128,134].

La filtración y la acidificación han sido dos estrategias históricamente adoptadas en los procedimientos de colección de muestras en campo para análisis de metales con anterioridad a la incursión en estudios de “especiación”. La principal finalidad de la acidificación propuesta por Collins en 1928 [147] es evitar la precipitación de hidróxidos de Fe, Mn y Al a partir de sus iones disueltos. La práctica de filtración mediante filtro de membrana con tamaño de poro $0,45 \mu\text{m}$ permite básicamente estandarizar la fracción correspondiente a metales disueltos y suspendidos [148,149], además de actuar como barrera de microorganismos y materiales particulados [150].

Dos aspectos aparecen como los más importantes a la hora de experimentar una modalidad de preservación para los arsenicales en agua: la compatibilidad con la técnica analítica utilizada para la determinación del analito y la necesidad de estabilizar otras especies rédox tales como Fe(II/III) cuyas transformaciones podrían influir en la estabilidad del As(III) y As(V). A continuación se presenta una breve referencia de las estrategias de preservación más relevantes reportadas en la literatura.

2.1. Estrategias de preservación de las especies As(III) y As(V) en soluciones acuosas.

2.1.1. Estabilidad de las especies de As inorgánicas en soluciones sintéticas.

Los experimentos de preservación de arsenicales inorgánicos muestran que las velocidades de interconversión As(III)/As(V) en agua de alta pureza son muy lentas. La ausencia de compuestos oxidantes o reductores en estas soluciones permite que, aún a temperatura ambiente, la distribución de las especies no muestre cambios significativos al menos por el término de dos [128] o tres [151] semanas para concentraciones de As(III) y As(V) de hasta $50 \mu\text{g L}^{-1}$, sin adición de reactivos y expuestas a la luz. Los resultados de experimentos como los mencionados concuerdan con investigaciones anteriores, las que indican que la velocidad de oxidación del As(III), para condiciones de pH no extremas, es muy baja a menos que la barrera de activación sea superada por calentamiento [152], ultrasonido [153], catálisis metálica [154] o la presencia de oxidantes fuertes, tal como Fe(III) [151]. Algo similar ha sido sugerido para el As(V), ya que su lenta velocidad de reducción sólo puede ser revertida por la presencia de reductores fuertes, tal como el H_2S [151,155]. Estas afirmaciones llevan a objetar resultados obtenidos por algunos autores [135,140], quienes observaron la rápida reducción de As(V) a As(III) al cabo de 2 días en soluciones preparadas en laboratorio y mantenidas a temperatura ambiente ($22 \text{ }^\circ\text{C}$). El hecho fue atribuido a una posible reducción microbiana originada en la resina orgánica utilizada para el proceso de deionización del agua. Experimentos que involucren el uso de agua bidestilada (en lugar de deionizada) para corroborar sus hallazgos, no han sido informado. Esta reducción inicial no logró revertirse en el término de 10 días; por el contrario, la conservación inmediata de las soluciones a $5 \text{ }^\circ\text{C}$ no mostró indicios de reducción. La refrigeración a temperaturas de $4\text{-}5 \text{ }^\circ\text{C}$ extiende los períodos de conservación de las soluciones puras de As(III)/As(V) [128,151,156] y más aún, cuando se requiere la preservación de especies arsenicales orgánicas [157], debido a la disminución de las cinéticas de reacción y la inhibición del crecimiento microbiano

La presencia de oxidantes o reductores presentes como impurezas a nivel de vestigios, principalmente en las soluciones empleadas como fases móviles en los procesos de separación

cromatográficos, puede alterar significativamente los resultados en estudios de preservación de soluciones puras, es decir, soluciones que sólo contienen As(III) y As(V), originando confusión en la interpretación de los datos. La existencia de impurezas de Fe(III) [133-135] y de permanganato [158] podría ser la causa de la rápida oxidación observada para As(III) en soluciones sintéticas preparadas en laboratorio. Por lo tanto, la calidad de los materiales y reactivos utilizados en experimentos de preservación constituye un punto crucial a los fines de minimizar las discrepancias.

Varios ácidos inorgánicos han sido testeados en estudios de preservación de muestras sintéticas. La característica oxidante del HNO₃ ha demostrado en algunas ocasiones ser poco aconsejable como reactivo de preservación de las especies rédox de arsénico [140]. Sin embargo, dado que la oxidación de As(III) ocurre vía una fotooxidación con nitrato [159], su utilización resultó adecuada en ausencia de luz para preservar la distribución de As(III/V) por aproximadamente 3-4 días a 20 °C, inclusive en presencia de Fe(III) (1 mg L⁻¹). El H₂SO₄ ha logrado estabilizar la distribución de arsenicales por períodos mayores a 3 meses en muestras sintéticas con exposición a la luz y a temperatura ambiente [135]. Resultados similares fueron obtenidos cuando las soluciones se adicionaron con Fe(III). No obstante, dificultades asociadas a la purificación de este ácido, determinan que su uso sea poco aconsejable como aditivo de preservación de trazas metálicas. La adición de HCl aparece como la estrategia de preservación más estudiada [130,160], debido posiblemente a que este ácido mineral ha sido el reactivo tradicionalmente recomendado por métodos estandarizados para el almacenamiento de muestras acuosas destinadas a la determinación de metales. La distribución de las especies rédox de As no mostró signos de alteración luego de 45 días de conservación con HCl a pH < 2 para soluciones expuestas a la luz [128]. Cambios mínimos (< 3%) en la distribución se observaron luego de casi 3 meses de conservar las soluciones en estas mismas condiciones [151]. El H₃PO₄ ha mostrado una menor frecuencia de uso, posiblemente debido a su capacidad de propiciar el crecimiento microbiano [129].

Otro reactivo de preservación muy utilizado ha sido el ácido etilendiamintetraacético (EDTA) debido a su capacidad de formar complejos quelantes. Se ha investigado especialmente, su acción conservante en muestras con altas concentraciones de Fe y Mn tales como aguas provenientes de drenajes mineros. Este reactivo resultó ser muy adecuado para la preservación de soluciones de As(III)/As(V) adicionadas con Fe(III), conservadas a temperatura ambiente y expuestas a la luz. La regulación del pH y la reducción de la actividad microbiana fueron otras ventajas asociadas a su uso [135].

2.1.2. Estabilidad de las especies de As inorgánicas en muestras de aguas naturales.

La estabilidad de As(III) y As(V) inorgánicas fue observada durante 6 días en muestras de agua natural filtradas y conservadas a temperatura ambiente [140]. Al cabo de este tiempo, las reacciones de interconversión produjeron el aumento de la concentración de As(V) a expensas del As(III). Los cambios ocurridos en la distribución e inclusive en la concentración de As total se vieron minimizados con la refrigeración de la muestra. Algunos autores observaron que la sola conservación a 4-5 °C sin adición de reactivos fue adecuada para preservar las especies arsenicales inorgánicas en muestras de agua filtradas por un período aproximado de 7 [161] a 30 días [140] sin cambios significativos en la concentración de As total por períodos aún mayores. La preservación de las especies de arsénico sin adición de conservantes por un tiempo más prolongado ha sido informada para agua intersticial mediante la aplicación de temperaturas inferiores a 0 °C [162].

La retención del material suspendido mediante la filtración de las muestras con filtro de membrana de tamaño de poro 0,45 µm cumple un rol esencial en la estabilización de las especies As(III)/As(V), especialmente cuando se adopta la adición de ácidos como estrategia de preservación. La acidificación de muestras que no han sido adecuadamente filtradas provoca cambios en la distribución de las especies y en la concentración total del elemento, debido a la liberación de arsénico adsorbido sobre material coloidal.

En cuanto a la utilización de reactivos de preservación en aguas naturales, es decir, donde la distribución original de las especies de arsénico inorgánicas no es conocida como en el caso de las soluciones preparadas en el laboratorio, en la opinión del autor, es meritorio aclarar que la forma en la cual se llevan a cabo los experimentos reportados en la literatura conducen a veces a interpretaciones confusas: esto es: i) en estudios realizados para evaluar la estabilidad en el tiempo, no siempre se observan mediciones que revelen el estado original en la distribución de las especies, es decir, previo al agregado del reactivo de preservación. En otras palabras, el reactivo en estudio puede ser eficiente para estabilizar las especies inorgánicas de arsénico, pero a partir de los datos aportados no es posible saber si su adición produjo o no una alteración de las concentraciones originales; ii) la valoración de las concentraciones de As(III) o As(V) a través de la medida de arsénico total, no es en absoluto representativa de los cambios que pueden haber sufrido las especies durante su conservación. En general, podemos decir que la mayoría de los estudios basados en la acidificación de muestras reales para prevenir la coprecipitación de As junto a los hidróxidos de Fe, Mn o Al no aportan suficiente explicación acerca de los cambios ocurridos en la distribución de arsenicales [130].

La refrigeración a 4 °C combinada con la adición de HCl a pH menor a 2 fue informada como una estrategia adecuada para mantener la distribución de los arsenicales inorgánicos en muestras de aguas naturales, inclusive de aguas termales y de drenajes mineros, las cuales poseen altos contenidos salinos [128,130,132,151]. La permanencia en la oscuridad ha sido aconsejada cuando el objetivo es la preservación a mediano plazo (5 a 19 meses). Las discrepancias existentes en la literatura respecto a experimentos que sugieren la oxidación del As(III) en aguas naturales ante la adición de HCl como reactivo de preservación [135,140] fueron atribuidas a procesos de actividad microbiana originados en las resinas utilizadas para deionizar el agua empleada en las experiencias y eventualmente a una posterior contaminación de las columnas cromatográficas [128]. Como hemos mencionado, la adición de H₂SO₄ ha dado buenos resultados en la preservación de muestras sintéticas; sin embargo, no es un reactivo comúnmente adoptado para preservar metales en muestras de agua natural debido a su tendencia a formar precipitados, como por ejemplo BaSO₄. Una situación similar sucede con el uso de H₃PO₄ ya que puede conducir a la formación de precipitados del tipo FePO₄·2H₂O que actúan adsorbiendo el arsénico [128,129]. No obstante, algunos autores han informado resultados satisfactorios para muestras con alto contenido de Fe conservadas en H₃PO₄ 0,01 mol L⁻¹ y refrigeradas a 6 °C [130]. El agregado de HNO₃ en concentraciones variables a muestras de agua natural adicionadas con 5 µg L⁻¹ de cada especie, provocó la oxidación de As(III) a As(V). Inmediatamente luego de la acidificación con HNO₃ 0,1 y 0,4%, la relación As(III)/As(V) fue 0,6 y 0,4, respectivamente [140].

Las muestras de aguas naturales ricas en Fe representan quizás el mayor desafío en estudios de preservación. Como ya hemos mencionado, los resultados de experimentos realizados sobre muestras sintéticas muchas veces difieren sustancialmente de aquellos observados cuando la misma estrategia de preservación es aplicada a muestras reales, y en este sentido, las muestras con alto contenido de Fe son un claro ejemplo. En soluciones sintéticas adicionadas de HCl y expuestas a la luz, la oxidación de As(III) por Fe(III) pudo ser minimizada mediante la adición de SO₄²⁻ y Fe(II) e inclusive, detenida por hasta 70 días cuando las soluciones se mantuvieron en la oscuridad [128]. En este caso, la adsorción de fotones por el complejo FeSO⁺ formado entre el SO₄²⁻ y el Fe(III) impide la producción de radicales libres involucrados en el proceso de formación del As(IV), intermediario en el proceso de oxidación del As(III) [134]. Además, la reacción competitiva del Fe(II) con los diclororadicales inhibe la oxidación del As(III) en la medida que la relación Fe(II)/As(III) aumenta. Sin embargo, en aguas naturales, las elevadas concentraciones de Fe(III) generalmente se hallan asociadas a altas concentraciones de Fe(II) y SO₄²⁻, por lo que la rápida oxidación de As(III) por Fe(III), típica en soluciones sintéticas, no es observada en muestras reales. Este hecho motivó la objeción a estudios de preservación que

utilizaron Fe(II) en exceso para evitar la oxidación de As(III) en muestras de agua subterránea, aunque a diferencias de los mecanismos de inhibición oxidativa descritos arriba, en este caso los autores adjudicaron la disminución de velocidad de oxidación del As(III) a la interrupción de la reducción del Fe(III) por exceso de Fe(II) [163].

Al igual que en muestras sintéticas, el ácido etilendiamintetraacético (EDTA) ha mostrado buenos resultados en la preservación de la distribución de las especies en muestras de agua enriquecidas naturalmente con As. La adición de 1% (v/v) de solución de EDTA 0,125M fue recomendada para preservar la relación As(III/V) en muestras de aguas subterráneas previamente adicionadas de hasta 10 mg L^{-1} de Fe(II) [135]. Cantidades mayores serían aconsejables para muestras con contenidos mayores de Fe, tales como las aguas de drenajes mineros que suelen alcanzar concentraciones de hasta 10^5 mg L^{-1} de Fe(III) disuelto.

2.1.3. Selección del método de preservación utilizado

Hemos mencionado que la estrategia de preservación adoptada depende principalmente de la técnica analítica utilizada en la determinación del analito y la necesidad de estabilizar otras especies redox tales como Fe, Mn y Al. La acidificación con HCl aparece como la modalidad más recomendada cuando se emplea HGAAS (aún cuando los metales interferentes se encuentren en bajas concentraciones) debido a que la matriz acidificada adquiere características similares a la solución transportadora de HCl que se utiliza en el momento de medir. Sin embargo, cuando la separación de las especies de arsénico es llevada a cabo por procesos de intercambio iónico mediante la utilización de resinas acopladas en línea al sistema de detección como en el método SPE-FI-HGAAS desarrollado en el Capítulo 4, el uso de ácidos inorgánicos para preservar ocasiona serios inconvenientes. Esto es notorio ante la presencia de altas concentraciones de iones concomitantes como Cl^- , SO_4^{2-} y NO_3^- que deterioran marcadamente la eficiencia de retención de las especies de As cargadas debido a la competencia por los sitios activos. En este caso, la adición de EDTA o la conservación de las muestras a bajas temperaturas hasta el momento del análisis aparecen como los métodos de preservación más adecuados. En nuestro caso, el conocimiento de la presencia de bajas concentraciones de interferencias metálicas formadoras de hidróxidos ($\text{Fe} < 0,1 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{Mn} < 0,1 \text{ mg L}^{-1}$) en las aguas subterráneas objeto de este estudio, nos ha permitido prescindir de la adición de EDTA en la seguridad de que no se producirían hidróxidos insolubles. De hecho, en ninguna de las muestras colectadas se observó formación de precipitados.

Finalmente, se seleccionaron las siguientes estrategias para conservar la distribución original de las especies inorgánicas de arsénico en las muestras de aguas subterráneas colectadas:

a) conservación a temperatura de 4-5 °C para las muestras destinadas al análisis de especiación en el laboratorio a corto plazo (menor a tres días); b) congelamiento a -18 °C (luego del transporte a 4-5 °C) para las muestras destinadas a experiencias de especiación a mediano plazo (2 meses); c) separación inmediata de As(III) y As(V) en campo por SPE, mediante la utilización de cartuchos con resina de intercambio aniónico fuerte (SAX, Varian, Harbor City, USA) [145]. Las características, funcionamiento y performance de la resina se describen detalladamente en los Capítulos 4 y 6. En el presente capítulo solamente nos referiremos a la modalidad de trabajo durante el muestreo de campo sin profundizar en el análisis de “especiación” propiamente dicho.

2.2. Colección y preservación de las muestras en campo.

Sin lugar a dudas, la obtención de resultados confiables cuando se llevan a cabo estudios medioambientales, comienza por un muestreo planificado que contemple el control de las múltiples y variadas operaciones involucradas. No podríamos hablar de resultados verdaderamente exitosos sólo con la implementación de metodologías analíticas desarrolladas y optimizadas satisfactoriamente en el laboratorio a menos que sean precedidas por tareas de campo apropiadas.

2.2.1. Sitio de muestreo

Las muestras de agua subterránea utilizadas en este estudio para análisis de especiación fueron colectadas a partir de cinco pozos encamisados de profundidades variables entre 15 y 25 metros, construidos para suministro público de agua de bebida en la localidad de Suncháles, provincia de Santa Fe, Argentina (30°93'S 61°57'W). En esta localidad, ubicada en la región central de la llanura chaco-pampeana, la problemática de contaminación arsenical adquiere características altamente significativas. La explotación del acuífero con mejores condiciones de calidad de agua (localizado en el estrato superior comprendido hasta 25-30 metros de profundidad, compuesto principalmente por depósitos de loess y arcillas de origen Cuaternario y concreciones de carbonato de calcio [164]), no logra revertir la situación. El agua de red consumida por la población debe ser tratada previamente mediante procesos de ósmosis inversa para reducir los tenores de arsénico a niveles inferiores a 50 µg L⁻¹. Sin embargo, como sucede en la mayoría de los centros poblacionales que poseen como fuente de suministro hídrico aguas subterráneas contaminadas con arsénico, la reducción a niveles menores de 10 µg L⁻¹, compatibles con el límite máximo permitido en la legislación argentina recientemente modificada (Código Alimentario Argentino Cap. XII, junio de 2007) y con un plazo de 5 años

para adecuación a la normativa, plantea serios inconvenientes tecnológicos de permanente discusión en los organismos de control involucrados.

2.2.2. Dispositivo de muestreo.

Si bien la literatura que aborda la especiación de metales a nivel de ultravestigios en aguas subterráneas es muy amplia, no podemos decir lo mismo en cuanto a la descripción de metodologías concretas y de dispositivos utilizados para llevar a cabo las tareas de muestreo. La mayoría de los trabajos publicados describe de manera somera el procedimiento de extracción de muestras a partir de la napa de agua.

Un muestreo confiable comienza con la construcción (o eventual selección) de perforaciones adecuadas en las cuales el ingreso de materiales extraños o agua de lluvia, entre otros, no sea posible [165,166]. La profundidad a la cual se encuentra la napa es uno de los parámetros más importantes a tener en cuenta para seleccionar el sistema de colección. En general, es posible diferenciar entre aquellos sistemas que extraen el agua hacia la superficie mediante bombeos y aquellos en que se colecta la muestra en forma discreta mediante dispositivos ubicados o sumergidos en la zona de muestreo [167].

Los sistemas de bombeo pueden ser conducidos a velocidades muy variables. A medida que aumenta la velocidad de extracción, el incremento de las perturbaciones generadas en la zona de muestreo produce la movilización de partículas con metales asociados normalmente inmovilizadas, derivando en la pérdida de representatividad de las muestras. Idealmente, la velocidad de extracción debería ser igual o menor a la velocidad de recarga del pozo [168,169]. La succión de agua mediante el uso de bombas peristálticas es solamente factible cuando la columna de agua generada alcanza unos pocos metros de altura (menor a 5 metros) [170]. Para profundidades mayores se utilizan bombas sumergibles tipo vejiga (*bladder pump*) con sistemas de funcionamiento neumático, y bombas centrífugas accesibles a menores costos. La necesidad de garantizar el equilibrio redox en ensayos de especiación requiere de la ausencia de componentes metálicos en los sistemas de muestreo y, en este sentido, el empleo de las bombas sumergibles tipo centrífugas de las que generalmente dispone el mercado, resulta poco conveniente.

La colección de muestras en la napa es llevada a cabo mediante dispositivos que permiten la provisión de un volumen discreto de agua (generalmente entre 350 ml y 1,5 litros). Para la determinación de metales, los más utilizados consisten en tubos plásticos denominados *bailers*, los cuales pueden ser operados a través de válvulas simples o duales. La colección mediante el

uso de *bailers* se caracteriza por su bajo costo y facilidad en el manejo de las tareas de campo. Sin embargo, cuando las muestras presentan altos valores de turbiedad o concentración de partículas, la perturbación ocasionada por la inmersión del dispositivo puede generar diferencias significativas en las concentraciones de metales traza entre muestras filtradas (filtro de poro 0,45 μm) y sin filtrar. Esto se debe a la inclusión de metales asociados con partículas normalmente inmovilizadas, principalmente hidróxidos de Fe, partículas de Fe elemental y compuestos de Fe adsorbidos a la superficie de otras partículas, dando origen todo ello a la fracción denominada arsénico particulado en el análisis de especiación. En muestras con bajos valores de turbidez, esta diferencia adquiere menor relevancia y suele volverse insignificante si se utilizan sistemas de bombeo adecuadamente purgados, sugiriendo la presencia predominante de los metales traza como especies disueltas y no asociadas con partículas de tamaño mayor a 0,45 μm [167].

La oxigenación de las muestras constituye una situación indeseable en el análisis de trazas de arsénico total y especies debido a la posibilidad de formación de hidróxidos metálicos, especialmente de Fe y Mn, que actúan absorbiendo especies disueltas de As(V) tal como explicáramos más arriba. En este sentido, los muestreadores *bailers* convencionales propician la oxigenación como resultado de la exposición atmosférica durante las operaciones de colección y trasvasado lo que, eventualmente, modificaría la “especiación” de los compuestos arsenicales.

Considerando las ventajas y desventajas de los distintos muestreadores y evaluando su posible comportamiento en los sitios de muestreo seleccionados, se llevó a cabo el diseño, desarrollo y construcción de un dispositivo de inmersión para la extracción de las muestras de agua destinadas a especiación de arsénico. En los casos en que se conozcan previamente los valores de turbiedad y que estos sean menores a 1 NTU (unidades nefelométricas de turbiedad), valores habituales en los pozos de muestreo, la posibilidad de diferencias significativas entre fracciones filtradas y no filtradas se minimiza. No obstante, se determinó la concentración de arsénico particulado de cada muestra. En cuanto a la posibilidad de oxigenación, fue drásticamente disminuida al eliminar las etapas de trasvasado de las muestras colectadas.

El muestreador construido de Delrin® y polipropileno consiste en un receptáculo de 450 ml de capacidad (8 cm de diámetro interno; 9 cm de altura interna) desmontable mediante una rosca, provisto de una válvula de cierre formada por un resorte y un cono de Delrin® ubicados dentro de un vástago enroscado en la parte superior del receptáculo y, un segundo vástago (3,5 cm de diámetro externo; 8 cm de largo), en la parte inferior atravesado longitudinalmente por un conducto (4 mm de diámetro) para extracción y/o expulsión de muestra. Un anillo de Delrin® (6,5 diámetro externo; 3,5 cm diámetro interno; 8 cm de altura)

con plomo en su interior, reviste el vástago inferior para ajustar el peso del dispositivo. La Figura 2.2 muestra un esquema del muestreador utilizado.

Para realizar el muestreo, el equipo unido a un flotante plástico por medio de una cuerda de un metro de longitud, fue descendido hasta la napa de agua. Ambos dispositivos (muestreador y flotante) se operaron desde la superficie mediante dos cuerdas: una unida al muestreador y otra al flotante. El trayecto de descenso fue manipulado mediante la cuerda unida al muestreador de manera que la válvula de cierre superior permanezca cerrada impidiendo la entrada de agua a través del orificio inferior. Una vez ubicados correctamente ambos dispositivos (flotante en la superficie de agua y muestreador a un metro de profundidad), pequeños movimientos ascendentes de tensión en la cuerda unida al flotante provocan la apertura de la válvula de cierre del muestreador como consecuencia de su propio peso. De esta manera, el agua ingresa por el orificio inferior del muestreador. Luego de un tiempo breve (2-3 minutos) se libera la cuerda del flotante, y el muestreador completamente lleno, es ascendido mediante la cuerda unida a él. En la Figura 2.3 puede observarse un esquema que detalla las operaciones de muestreo.

Los recipientes utilizados para el almacenamiento de las muestras constituyen otro factor a considerar debido a la posibilidad de que ciertos materiales de envase puedan absorber o liberar arsénico. Los materiales poliméricos como polietileno de alta densidad, polipropileno, Teflón y policarbonato presentan una retención menor al 5% (excepto para MMA, < 10%) e insignificante liberación de compuestos de arsénico en un amplio rango de temperaturas. Debido a la utilización de As_2O_3 en la industria del vidrio, los recipientes construidos con este material han mostrado liberar cantidades de arsénico significativas cuando son tratados con HNO_3 para su limpieza [171]. En estos casos, la verificación de los valores de blancos de arsénico debería ser una práctica adoptada rutinariamente. En el presente trabajo, el almacenamiento de las muestras fue realizado en recipientes de polietileno de alta densidad.

2.2.3. Tareas de muestreo.

La planificación de las actividades de muestreo llevadas a cabo en este trabajo incluyó una serie de procedimientos que contemplaron no sólo aspectos analíticos propios del análisis de “especiación”, sino también requerimientos básicos que permitieron evaluar la calidad de los procesos de colección y transporte de muestras. Las tareas se focalizaron en:

- a. Extracción de muestras de agua subterránea para análisis de “especiación” en laboratorio de compuestos arsenicales inorgánicos solubles de As(III) y As(V) y la

valoración de arsénico total. Se utilizó FI-HGAAS con esquema de discriminación cinética en condiciones de baja acidez y SPE-FI-HGAAS para el análisis de especiación. Las valoraciones de arsénico total se realizaron por FI-HGAAS.

- b. Extracción de muestras de agua subterránea para análisis de especiación arsenical con separación de las especies en campo. El arsénico particulado fue separado por filtración con membrana (tamaño de poro 0,45 μm) y las especies inorgánicas solubles As(III) y As(V) por SPE mediante la utilización de cartuchos de resina de intercambio aniónico SAX.
- c. Fortificación (*spiking*) de muestras de agua subterránea con soluciones estándar de As(III) y As(V) para evaluación de la recuperación.
- d. Extracción de muestras de agua subterránea para su caracterización fisicoquímica.
- e. Control de la contaminación mediante la verificación de tenores de arsénico en blancos de campo y blancos de equipamiento.

La obtención de muestras para la experiencia descrita en el punto a. consistió en la filtración de alícuotas (20 ml) extraídas a partir del orificio de salida inferior del muestreador utilizando jeringas plásticas de puntas prolongadas con tubos plásticos flexibles del 10 cm de longitud. Luego, las jeringas (sin el tubo) fueron acopladas a discos de filtro para jeringa con membrana (tamaño de poro 0,45 μm). Las muestras filtradas fueron almacenadas en botellas de polietileno y refrigeradas a 4-5 °C hasta el momento de su análisis.

La separación de especies en campo detallada en el punto b. se llevó a cabo mediante un tren de muestreo compuesto por una jeringa plástica, un disco de filtro, un adaptador plástico y un cartucho de resina de intercambio aniónico. La Figura 2.4. describe gráficamente la secuencia de muestreo. Las soluciones colectadas que contienen la especie trivalente, los cartuchos utilizados para la retención de As(V) y los discos de filtro con depósito de arsénico particulado se mantuvieron refrigerados hasta el momento de su análisis en el laboratorio. Como veremos en el Capítulo 5, los problemas inherentes a la especiación en campo se observan cuando la capacidad de intercambio de la resina es superada debido a la presencia de altas concentraciones de aniones concomitantes como Cl^- y SO_4^{2-} [135]. En estos casos la dilución de la muestra, con el consiguiente empobrecimiento de los límites de detección, o el aumento de la cantidad de resina de intercambio aparecen como posibles soluciones.

Los ensayos de fortificación indicados en el punto c. se realizaron sobre volúmenes medidos de muestra colectados en matraces volumétricos de 100 ml. Las muestras fortificadas con As(III) y As(V) se trataron de la misma forma indicada en el punto b.

La toma de muestras para las experiencias detalladas en d. consistió en la colección de un volumen de agua de napa con el muestreador y su expulsión al interior de botellas de 100 ml accionando la válvula de cierre. Las medidas de pH y conductividad fueron realizadas en el laboratorio.

Los blancos de campo del punto e. se verificaron con el objetivo de medir la contaminación accidental o incidental durante el proceso completo de muestreo. Para ello, se llevaron al campo botellas con agua destilada que luego fueron sometidas al mismo tratamiento detallado en b. Los blancos de equipamiento permitieron verificar la descontaminación del muestreador entre sucesivas extracciones. Las muestras de verificación y control se tomaron luego de lavar el muestreador dos veces con agua destilada.

En el Capítulo 5 se presentan los resultados de las determinaciones analíticas para todos los analitos involucrados.

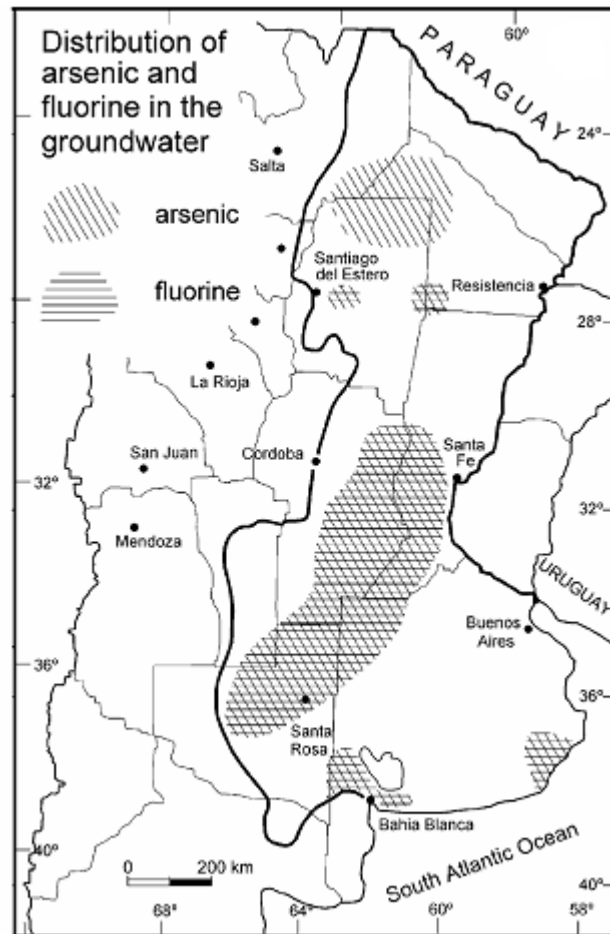


Figura 2.1. Regiones con aguas subterráneas contaminadas con arsénico en la planicie chaco-pampeana argentina [172].

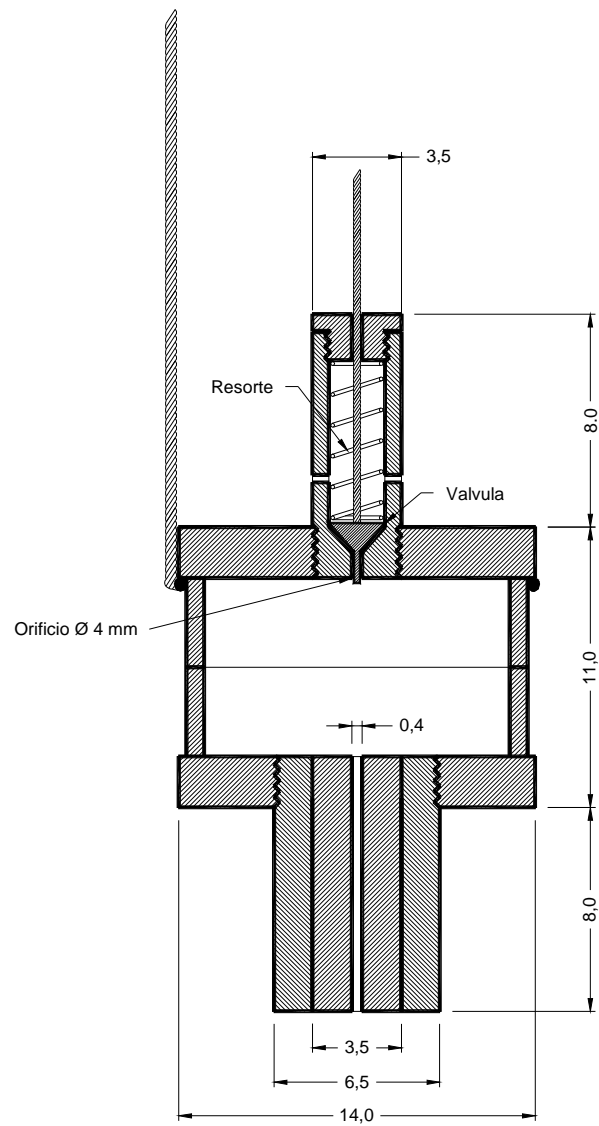


Figura 2.2. Dispositivo utilizado para el muestreo de agua subterránea. Dimensiones expresadas en cm.

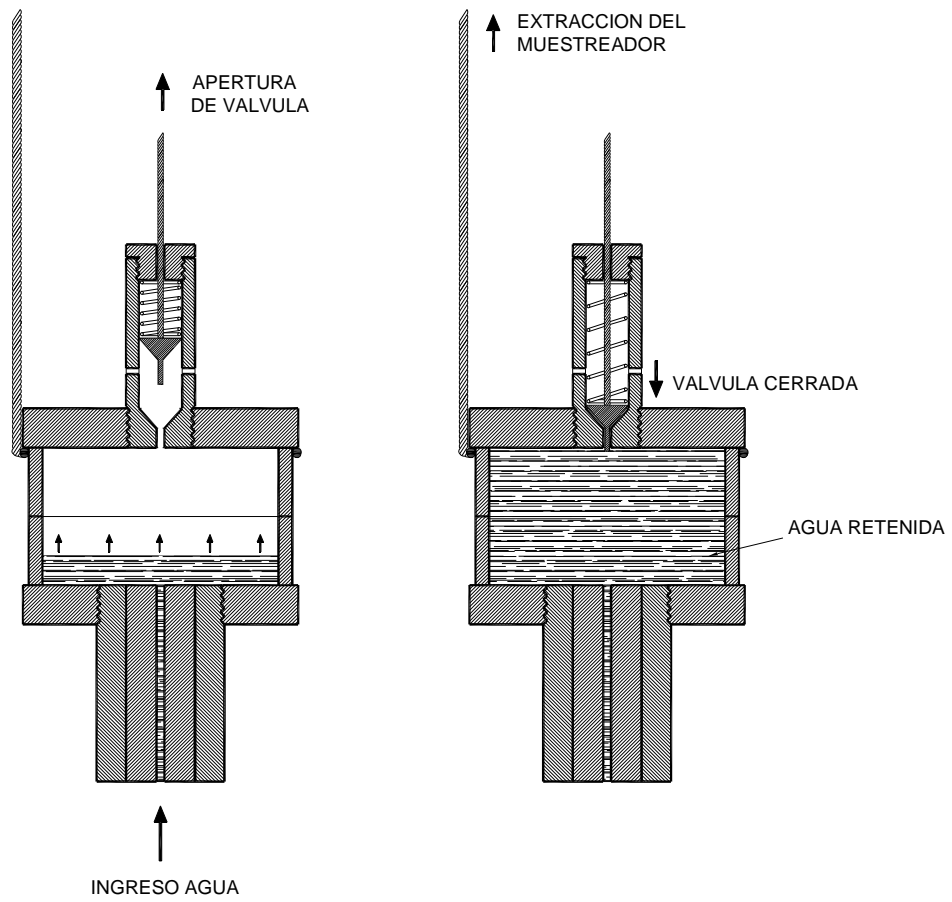


Figura 2.3. Etapas del proceso de extracción de muestra.

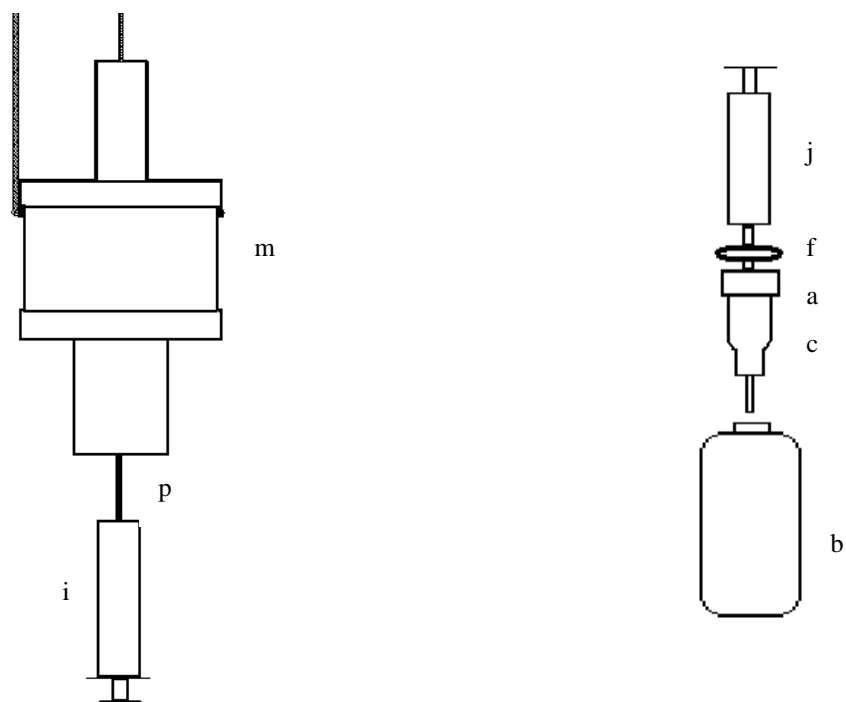


Fig. 2.4. Diagrama esquemático del dispositivo utilizado para la separación en campo de arsenicales inorgánicos solubles y particulado en muestras de agua subterránea. m: muestreador; p: punta plástica; j: jeringa; f: filtro; a: adaptador; c: columna con resina SAX; b: botella de colección.

Capítulo 3

Sistemas en flujo acoplados a generación de hidruros y espectrometrías atómicas para la valoración de arsénico total y especies inorgánicas de arsénico.

La espectrometría de absorción atómica (AAS) con generación de hidruros (HG) es una de las técnicas más empleadas para la determinación de elementos formadores de hidruros covalentes volátiles pertenecientes a los grupos IVA a VIA tales como arsénico, antimonio, selenio, bismuto, telurio, germanio, estaño y plomo. Si bien la determinación de estos elementos es posible utilizando AAS con llama, las cifras de mérito obtenidas con este tipo de valoración son, en general, pobres. La generación de hidruros, generalmente producida por la adición de tetrahidrobóranos, permite un aumento importante de la sensibilidad y de los límites de detección (ver Tabla 3.1), al tiempo que produce una drástica reducción del efecto producido por interferencias propias de la matriz de muestra al liberar al analito de la misma [63]. Cuando la denominación “generación de hidruros” se extiende a “generación de vapor químico” (CVG), se incluye al mercurio en esta lista ya que, si bien no forma hidruros, se libera de la matriz de muestra bajo la forma elemental volátil Hg^0 , dando lugar a la técnica conocida como vapor frío de mercurio (CV). En el caso particular de Hg, la determinación por AAS se realiza sin llama.

En los últimos años se han utilizado reactivos diferentes a los tetrahidrobóranos, al tiempo que se plantearon discusiones sobre la naturaleza de las especies químicas generadas para aislar el analito de la matriz [173,174], hecho que motivó el uso del término genérico CVG en lugar de los más específicos HG o CV. De hecho, el desarrollo de varios sistemas para CVG ha permitido extender la técnica a la valoración de casi 30 analitos [175]; sin embargo, sólo aquellas metodologías basadas en reacciones en medio acuoso, preferentemente a temperatura ambiente, con cinéticas rápidas para la generación de vapor químico, facilidad para la liberación de los vapores formados y posibilidad de control de interferencias, mostraron resultados analíticamente atractivos. Como ejemplo podemos citar el uso de cianotrihidrobórato de sodio (NaBH_3CN), el cual presenta mejores resultados que el tetrahidrobórato de sodio en cuanto a la cantidad de hidruro producido; sin embargo, su utilización se ve limitada por una velocidad de generación de los hidruros extremadamente lenta [176].

Las prácticas más usuales [175] de CVG con detección por espectrometría atómica incluyen la aplicación de los siguientes sistemas: i) HG con tetrahidrobórato de sodio para As, Bi, Sb, Se, Sn y Te; ii) generación de CV con tetrahidrobórato de sodio o solución de Sn (II) para Hg y iii) generación de etil derivados con tetraetilborato de sodio para Hg, Pb, Se y Sn. Esta última alternativa presenta algunas desventajas relacionadas con la elevada toxicidad de los derivados etilados y los altos costos de reactivos por lo que se la utiliza con poca frecuencia [177,178]. Más allá de esta generalización, otras técnicas de CVG se encuentran informadas en la literatura aunque con menor frecuencia. La CVG de In, Tl [179], Cd [72], Cu [180] y más recientemente Ag, Au, Ni y Zn [181] mediante reacción con tetrahidrobórato ha sido informada, aunque en algunos de estos casos, la especie química que se forma aún no está perfectamente elucidada. La determinación de Cd mediante la generación de vapor frío ha sido descrita en la literatura [182] asignándose la producción de Cd^0 a la descomposición del hidruro de cadmio formado, lo que permite la valoración de Cd utilizando AAS sin asistencia de llama. También es posible la determinación de Cd mediante etilación y posterior detección por AAS con atomizador de tubo de cuarzo [183]. La adición de cloruro de estaño (II) [184] o mezcla de tricloruro de titanio y magnesio en medio acidificado [185] fue utilizada para la generación de seleniuros. La vaporización de analitos mediante la derivatización a sus cloruros es un antiguo procedimiento de aislamiento selectivo que ha presentado renovado interés por los investigadores en los últimos años. Elementos como Bi, Cd, Mo, Pb, Sn, Tl, Zn [186], As [187], Al [188] y Ge [186,189] son liberados en la forma de cloruros gaseosos al calentar la solución de muestra en atmósfera de HCl, para luego ser arrastrados al atomizador. Vestigios de Os han sido volatilizados a OsO_4 por técnicas de CVG misceláneas y conducido a una llama de óxido nitroso-acetileno [190]. La volatilización de Ni en la forma de carbonilo, inicialmente reportada por Vijan [191] en 1980, ha sido objeto de sucesivas modificaciones. El Ni es reducido inicialmente al estado elemental con tetrahidrobórato de sodio; el pasaje de una corriente de monóxido de carbono a través de la suspensión resulta en su volatilización bajo la forma de carbonilo. El $Ni(CO)_4$ puede ser determinado directamente por AAS [192] o preconcentrado mediante una trampa fría de nitrógeno líquido previo a su atomización por AAS [193]. Sturgeon et al. [194] alcanzaron niveles de detección de 4 ng L^{-1} preconcentrando el vapor proveniente de 10 ml de muestra en un tubo de grafito a $500 \text{ }^\circ\text{C}$ y posterior atomización a $2700 \text{ }^\circ\text{C}$. Brueggemeyer y Caruso [195] determinaron vestigios de Pb mediante derivatización a tetrametilo de Pb con metil litio. El vapor liberado por calentamiento fue conducido a un atomizador de tubo de cuarzo calentado a $980 \text{ }^\circ\text{C}$. El sistema alcanzó un nivel de detección de 5 ng de Pb. Sturgeon et al. [196] simplificaron el procedimiento al generar tetraetilo de Pb por reacción con tetraetilborato de sodio seguido de una etapa de preconcentración en un tubo de grafito a $400 \text{ }^\circ\text{C}$. La generación de

compuestos volátiles de Cr [197,198], Fe [197,199] y Co [197,198] mediante la formación de sus quelatos volátiles, especialmente con β -dicetonatos y detección por técnicas espectrométricas atómicas, constituye un área de creciente aplicación debido, principalmente, al incremento de la sensibilidad en uno o dos órdenes de magnitud comparado con AAS convencional.

Las primeras aplicaciones de HG¹ basadas en sistemas de mezcla manual para muestra y reactivos implicaban una manipulación ciertamente dificultosa. La incorporación de la inyección en flujo (FI) a HGAAS a partir de los trabajos de Astrom [200], facilitó enormemente la implementación de la técnica, lo que generó en la década pasada la aparición de sistemas *hifenados* FI-HGAAS. La gran cantidad de publicaciones referidas a aspectos teóricos y de aplicación [62,201,202] aparecidas en estos últimos años es indicativa del interés que dicha metodología ha despertado en la comunidad científica. Las ventajas más relevantes que presenta FI-HGAAS son evidentes al momento del análisis y pueden resumirse de la siguiente manera:

- Alta frecuencia de análisis.
- Bajo consumo de muestra y reactivos (1-2 órdenes menores que los procedimientos discontinuos).
- Alta reproducibilidad (debido a un mayor número de réplicas posibles en la unidad de tiempo).
- Alta sensibilidad y bajo límite de detección (1-2 órdenes menores que los procedimientos discontinuos).
- Mínimo riesgo de contaminación por tratarse de sistemas cerrados e inertes.
- Aumento de la selectividad mediante discriminación cinética determinada por las condiciones de ausencia de equilibrio termodinámico, hecho que permite un aumento de la tolerancia a iones metálicos interferentes mediante el diseño de sistemas que favorecen la reacción principal (generalmente más rápida) en desmedro de las secundarias no deseadas.
- Disminución del efecto memoria provocado por depósitos de metales reducidos acumulados o boruros del metal al posibilitarse el trabajo con altos flujos volumétricos de muestra y reactivos, disminuyéndose el tiempo de residencia de los productos en la tubería de reacción. Como siempre, la selección de estos tiempos de residencia debe ser una situación de compromiso que permita la reducción del efecto memoria manteniendo una producción eficiente del vapor de interés analítico.
- Escaso espacio físico en el laboratorio debido a su volumen reducido.

¹ En el caso particular de arsénico, se adopta la sigla HG ya que la producción de arsina está comprobada en la literatura [63,174,203,204]

A continuación se describen los fundamentos, características y componentes básicos involucrados en los sistemas acoplados FI-HGAAS.

3.1. La espectrometría de absorción atómica

La espectrometría de absorción atómica, a más de 50 años de haber sido propuesta por Alan Walsh [205] es actualmente una técnica ampliamente reconocida y utilizada en numerosas áreas del análisis instrumental. Sus variadas aplicaciones comprenden desde determinaciones a nivel de trazas hasta componentes mayoritarios. Debido a su elevada especificidad y selectividad como así también a su modo de operación relativamente simple, ha logrado mantener su lugar aún con el advenimiento de poderosas técnicas como ICP-OES e ICP-MS. La publicación de más de 1000 trabajos originales por año relacionados a AAS indica claramente que la producción de nuevos desarrollos y aplicaciones de rutina se encuentran en constante crecimiento [206].

Los principales tópicos que motivan las tareas de investigación y desarrollo en AAS pueden resumirse en estudios de mecanismos de reacción y atomización, modificación y optimización de métodos analíticos, especialmente en análisis de vestigios y ultravestigios y análisis directo de sólidos empleando técnicas denominadas de “*slurry*” [207-210]. La incorporación de desarrollos instrumentales posteriores que incluyen el horno de grafito como generador de vapor atómico [211,212], los detectores de estado sólido [213-215], las fuentes de radiación para determinación multielemental simultánea [216-218] y los distintos “modos” de inyección de muestra automatizados, incluyendo la posibilidad de pretratamiento [219,220], sin dudas contribuyeron a la jerarquización de AAS.

3.1.1. Componentes básicos de un espectrómetro de absorción atómica. Líneas de desarrollo en AAS

Un espectrómetro puede ser considerado como el conjunto de los instrumentos ópticos y mecánicos requeridos para la generación, conducción, dispersión, selección, aislación y detección de energía radiante. El rango de longitudes de onda de uso en AAS depende de la fuente de radiación, las componentes ópticas y el detector. Generalmente está comprendido entre 852,1 nm (la longitud de onda más sensible para el cesio) y 193,7 nm (la longitud de onda más usada en la determinación de arsénico).

Los componentes básicos de un espectrómetro de absorción atómica convencional son bien conocidos y varios libros de texto [206,221] se explayan sobre los mismos, razón por la cual no

serán descritos en este trabajo. Las características que por excelencia revisten a la AAS son, sin dudas, su selectividad y especificidad. Sin embargo, la configuración clásica de los espectrómetros de simple canal: fuente de radiación de longitud de onda específica – atomizador – monocromador – detector, solamente permite la determinación de elementos individuales. La estrategia más reciente consiste en el uso de espectrómetros multicanal equipados con fuentes continuas para la determinación simultánea o cuasi simultánea de elementos a diferentes longitudes de onda. Los espectrómetros simultáneos, cuya reciente aparición en el mercado ha dado lugar a una serie de trabajos [222,223], no se han consolidado aún como para lograr una posición de competencia frente a técnicas analíticas robustas de determinación multielemental. Actualmente, los esfuerzos de optimización se han focalizado en mejorar el control de interferencias espectrales por solapamiento de líneas, aumentar la resolución de los instrumentos ópticos, extender los ámbitos dinámicos lineales de concentración para la mayoría de los elementos sin mayores cambios constructivos, simplificar la operación de los equipos y obtener valores de sensibilidad y límites de detección comparables a los espectrómetros de canal simple.

Se pueden diferenciar dos formas de construcción de espectrómetros de absorción atómica multielemento. El diseño convencional emplea fuentes de línea (dando lugar a la determinación simultánea), mono o policromadores y detectores de tubos fotomultiplicadores (PTM). La segunda alternativa consiste en el uso de fuentes continuas (determinación cuasi simultánea). Para ello se utilizan policromadores Echelle de alta resolución (en el orden del ancho medio de la línea atómica de 1 a 3 picómetros) y detectores de estado sólido que permiten la medición espacial de la radiación. La combinación con redes o prismas convencionales permite obtener espectros bidimensionales [224].

El uso de fuentes de línea de longitud de onda específica, tales como las lámparas de descarga sin electrodos (EDL), posee la ventaja inicial de emitir alta energía radiante. El número de lámparas que pueden ser utilizadas es acotado por razones de espacio y suele limitarse a seis. La dispersión espectral puede llevarse a cabo mediante policromadores con varias ranuras de salidas y PMTs colocados detrás de ellas o, como alternativa, utilizando varios monocromadores o redes de difracción [225] con un detector para cada canal. Ninguna de las dos alternativas planteadas resulta completamente satisfactoria, ya que la primera es de construcción relativamente compleja y la segunda necesita de un cuidadoso realineamiento ante cada cambio de elemento. Por otro lado, cada fuente debería ser modulada a su propia frecuencia si se pretende conservar la selectividad que caracteriza a AAS. La situación se vuelve aún más compleja cuando se utilizan combinaciones de elementos arbitrarias ya que la posibilidad de solapamiento de línea y el riesgo de que líneas de elementos diferentes lleguen al detector

simultáneamente aumenta de manera considerable. En este sentido, la utilización de policromadores Echelle de alta resolución y detectores de estado sólido permite que los espectrómetros simultáneos puedan operar independientemente del tipo de radiación utilizada, es decir, varias fuentes de línea o una fuente de radiación continua.

El escaso desarrollo observado durante muchos años para fuentes continuas de alta calidad y detectores de estado sólido motivó que los espectrómetros simultáneos de tipo convencional que emplean componentes conocidos hayan logrado mayores aplicaciones aunque, frecuentemente, con pérdidas considerables en sensibilidad y acotados rangos dinámicos de trabajo [225,226]. El empleo de una lámpara de radiación continua de arco de xenón y un detector de estado sólido del tipo matriz de fotodiodos desarrollado por Winefordner et al. para horno de grafito [216], llama [217] e ICP [218], puede citarse como uno de los avances más importantes en el tema. Recientemente, la aplicación de pulsos a la fuente de radiación continua ha permitido obtener valores de masas características con factores 1,5 a 2 veces menores que con el uso de fuentes de línea para medidas en el UV lejano de antimonio (217,6 nm), arsénico (193,7 nm), cadmio (228,8 nm) y zinc (213,8 nm). La disposición instrumental involucra un atomizador de horno de grafito, un policromador Echelle y un detector CCD [227-229].

La comparación del estado actual de AAS multielemental con otras técnicas empleadas en la determinación elemental simultánea muestra un panorama a futuro de características prometedoras aunque es evidente la necesidad de aumentar los estudios básicos y las aplicaciones. En comparación con la espectrometría de emisión atómica (OES), AAS posee un rango dinámico de trabajo significativamente menor debido a que en OES la intensidad de emisión aumenta linealmente con la concentración del analito, mientras que en AAS es proporcional al logaritmo de la relación I_0/I (ver 3.1.2). Esta desventaja posee una importancia considerable para la determinación multielemental si los elementos individuales están presentes en concentraciones relativamente variables. Un problema adicional es que las condiciones de atomización óptimas difieren frecuentemente entre los distintos analitos. Ambas razones han determinado que la mayoría de grupos de trabajo hayan restringido sus investigaciones en espectrómetros simultáneos a un número de elementos no superior a 10.

En términos de costo-beneficio, los espectrómetros multicanal con atomizador de llama se encuentran en una situación de desventaja comparados a ICP-OES. Para costos similares, ICP-OES ofrece una mejor performance al considerar la cantidad de elementos que pueden ser determinados en forma simultánea, el mayor rango dinámico de trabajo y los menores niveles de detección. En general, los costos por canal disminuyen con el aumento del número de canales. En este sentido, los espectrómetros de doble canal representan la alternativa más desfavorable si

se tiene en cuenta la mínima ganancia aportada. En los últimos años, AAS multielemental ha sido restringida casi exclusivamente al uso de atomizadores electrotérmicos ya que la reducción en los tiempos de análisis sumada a los bajos niveles de detección característicos de ETAAS, la posiciona como una técnica analítica prometedora, especialmente al considerar que la única técnica comparable, ICP-MS, es mucho más costosa a la vez que requiere de personal altamente entrenado.

3.1.2. La señal analítica en AAS. Ley de Beer-Lambert

Los átomos libres en estado gaseoso poseen la capacidad de absorber energía radiante y pasar de su estado energético basal a un estado excitado al promover un electrón externo a una configuración menos estable. Como respuesta al fenómeno de absorción, el retorno inmediato y espontáneo al estado basal provoca la emisión de energía radiante equivalente a la cantidad de energía absorbida en el proceso de excitación. El espectro de emisión constituye una característica única para la identificación cualitativa del elemento.

El parámetro de interés y convencionalmente adoptado para las medidas espectrométricas es la absorbancia A , definida como:

$$A = \log_{10} I_0 / I \quad (3.1)$$

donde I_0 es la intensidad de radiación incidente e I es la intensidad de radiación transmitida. En la espectrometría de absorción atómica en particular, el interés está centrado en la cantidad de luz absorbida por la nube de átomos ubicada en el camino óptico.

La relación lineal que se establece entre la absorbancia y la concentración de analito está definida por la Ley de Beer-Lambert:

$$A = kbc \quad (3.2)$$

donde:

“ A ” es absorbancia;

“ k ” es el coeficiente de absorción (constante característica de cada especie absorbente) que es una medida de la cantidad de radiación que puede ser absorbida por un átomo;

“ b ” es la longitud del camino óptico; y

“ c ” es la concentración de las especies absorbentes.

Si el coeficiente de absorción k se conoce es posible obtener medidas absolutas del número de átomos libres en el volumen de absorción. Sin embargo en la mayoría de los casos, k no se conoce con la exactitud adecuada. Este hecho no es importante para las mediciones analíticas, ya que en este caso el interés principal no es la concentración absoluta de átomos sino la cantidad de analito en una muestra.

Las etapas involucradas principalmente en el cambio de fases ocurrido durante la formación de átomos gaseosos actúan en detrimento de una relación simple entre el número de átomos absorbentes y la concentración del analito en la muestra, por lo tanto el cumplimiento de la Ley de Beer-Lambert se ve indefectiblemente afectado. La química analítica aplicada a AAS ha encontrado una solución a este problema que consiste en el uso de muestras o soluciones de calibración al considerar que, para condiciones experimentales constantes, los efectos ocasionados por los múltiples parámetros del sistema también permanecen constantes. De esta manera, cuando se miden las absorbancias de muestras o soluciones de calibración que contienen concentraciones conocidas del analito y se registran sus valores en función de dichas concentraciones, se establece la relación o curva de calibración empleada para el cálculo de las concentraciones desconocidas. Por lo tanto AAS, al igual que otras técnicas espectrométricas, es una técnica relativa basada en el uso de una curva de calibración para establecer la relación entre la cantidad o masa de un analito y el valor del parámetro medido.

Como ha sido mencionado, un requerimiento de la Ley de Beer-Lambert es la proporcionalidad lineal entre la absorbancia A y el número de átomos libres. Esto implica una serie de suposiciones [230,231]:

- Todas las especies absorbentes deben poseer el mismo coeficiente de absorción k , es decir, la radiación debe ser absolutamente monocromática, el volumen de absorción debe ser isotérmico y la orientación de las especies absorbentes en el plano de polarización de la radiación no debería ejercer influencia alguna.
- El haz de radiación debe ser paralelo al camino óptico y poseer una intensidad homogénea.
- La concentración de las especies absorbentes debe ser suficientemente baja para minimizar la reducción de k debido a interacciones mutuas (ensanchamiento por resonancia).
- Otros mecanismos que podrían atenuar la potencia de radiación, tales como la dispersión de luz, deben ser despreciables.
- Las especies absorbentes deben estar distribuidas de manera homogénea en el volumen de absorción.

En la práctica estos requerimientos se cumplen sólo parcialmente lo que determina que la relación entre absorbancia A y cantidad o masa de analito presente desviaciones de la linealidad,

especialmente para altos valores de absorbancia. En general, las razones más importantes de desviación obedecen a características espectrales de las líneas analíticas (más de una línea atravesando el paso de banda espectral, presencia de estructura hiperfina, entre otros), a la distribución inhomogénea de la temperatura y a la densidad atómica en el volumen de absorción.

3.1.3. Corrección por absorción inespecífica

Las interferencias espectrales originadas en el atomizador constituyen uno de los problemas más importantes de las espectroscopías atómicas. La radiación que pasa a través del atomizador puede ser atenuada por una cantidad de fenómenos denominados en forma conjunta absorción de fondo o absorción no específica, los cuales se suman al proceso de absorción atómica propiamente dicha. Tales fenómenos pueden ser originados por la absorción de moléculas gaseosas o por la dispersión de la radiación debido a la presencia de partículas sólidas. La corrección por absorción de fondo casi simultánea con la medida del analito por AAS puede realizarse de maneras diferentes:

- Corrección mediante el uso de fuentes de radiación continuas
- Corrección por efecto Zeeman
- Corrección por el uso de pulsos de corriente alta

A continuación, realizaremos una breve descripción de cada una de las alternativas con el propósito de analizar su utilidad en los sistemas FI-HGAAS.

La primera de ellas supone que el ruido de fondo es un fenómeno de banda ancha que se mantiene constante en el rango definido por el paso de banda espectral seleccionado. Las radiaciones provenientes de la fuente de línea y de la fuente continua (lámpara de deuterio) atraviesan el volumen de absorción. Las longitudes de onda de la lámpara de deuterio que lleguen al detector serán las comprendidas en el paso de banda espectral del monocromador (0,2-2 nm), mientras que el ancho de la línea analítica es aproximadamente dos órdenes menor por lo que su incidencia en la absorción de radiación continua es despreciable. La absorción de fondo es sustraída de la absorción total medida con la fuente de línea obteniéndose la absorción específica del analito.

El éxito de esta corrección depende de un número de suposiciones:

- a. El ruido de fondo debe ser continuo y homogéneo en el volumen de absorción.
- b. El camino óptico seguido por ambos haces debe ser el mismo.

- c. Dado que se trata de una corrección secuencial, serían admisibles pequeños errores originados en las diferencias existentes entre la velocidad de cambio y la frecuencia de medición.
- d. Las intensidades de ambas fuentes deben ser similares para garantizar un adecuado balance electrónico.
- e. Se deben tener en cuenta los rangos de longitudes de onda óptimos de cada fuente continua. A bajas longitudes de onda, 193 nm - 330 nm, son aconsejables las lámparas de deuterio pero a longitudes de onda superiores otras alternativas como las lámparas halogenadas, ofrecen mejor potencia radiante.
- f. También debe ser considerado el deterioro de la relación señal/ruido (S/R) debido al uso de dos fuentes de radiación.

La corrección por efecto Zeeman se basa en el corrimiento que experimenta el perfil de absorción del analito con respecto a la línea de emisión cuando un campo magnético de aproximadamente 1 Tesla es aplicado al volumen de absorción. Como consecuencia, aparece un desdoblamiento simétrico de los niveles energéticos de los electrones externos que origina la separación de las líneas de emisión atómicas. Este fenómeno descrito en 1897 por el físico alemán Pieter Zeeman, aparece como resultado de la interacción entre un campo magnético externo y el momento magnético atómico.

Un gran número de transiciones electrónicas pueden ser posibles por efectos del desdoblamiento. Para el caso más simple se observa una línea central π y dos líneas laterales σ simétricamente ubicadas respecto de la línea central. Cada tipo de línea responde de manera diferente a la radiación polarizada proveniente de la fuente. El pico π absorbe la radiación polarizada en un plano paralelo al campo magnético externo, mientras que los picos σ absorben la radiación polarizada perpendicular al campo. En consecuencia, el analito absorberá durante la parte del ciclo en que la radiación de la fuente está polarizada, mientras que la absorción molecular de banda ancha y la dispersión por partículas sólidas tendrá lugar en ambos ciclos. Un sistema de adquisición de datos adecuados permite la discriminación y sustracción de la absorbancia inespecífica para obtener valores de absorbancia corregidos por el ruido de fondo.

El uso de fuentes de radiación que puedan operar en un campo magnético sin mayores dificultades para obtener una corrección de fondo directa por efecto Zeeman no ha logrado hasta el momento un desarrollo adecuado para todas las fuentes de producción de átomos. Cuando el magnetrón es colocado en el atomizador, la compatibilidad entre ambos depende principalmente de las características de ensamble del atomizador. Tanto las llamas usadas en AAS de 10 cm de longitud como los atomizadores de tubos de cuarzo empleados en las técnicas de generación de

hidruros o vapor frío, son poco compatibles con la instalación del magnetrón ya que los requerimientos de energía para éste son realmente importantes. La aplicación de efecto Zeeman para corrección de fondo en este caso implicaría la reducción del tamaño de la celda de absorción y el uso de menores volúmenes de muestras y reactivos, lo que se traduciría en una pérdida de sensibilidad. Hasta el momento, el uso de fuentes continuas proporciona una forma de corrección de fondo mucho más adecuada para estas técnicas. En cambio, la corrección de ruido de fondo por efecto Zeeman ha encontrado verdadera aplicación en los atomizadores de horno de grafito y se ha convertido en una práctica usual de trabajo.

La corrección de fondo por pulsos de corriente alta se basa en el ensanchamiento y posterior autoinversión de las líneas de resonancia de una lámpara de cátodo hueco (HCL) cuando se aumenta la corriente de operación [232], lo que lleva a la aparición de una depresión en el centro de la línea. El incremento de esta depresión con la intensidad de corriente provocará una menor absorción por parte del analito debido al menor solapamiento de la línea analítica con el perfil de absorción. No sucede lo mismo con los perfiles de banda ancha que no se ven influenciados por los cambios en la intensidad de corriente. Por lo tanto, la aplicación de corrientes normales permite medir un valor de absorción total mientras que la zona de ensanchamiento y desdoblamiento del perfil de emisión provocados por pulsos de corriente alta, sólo mide el ruido de fondo próximo a la línea analítica. En consecuencia, la alternancia entre pulsos de corriente normal y de alta intensidad permite discriminar la absorción inespecífica del analito y obtener el valor corregido mediante un sistema de adquisición de datos adecuado. La pérdida de sensibilidad, a la que puede conducir esta forma de corrección de fondo, dependerá principalmente de la proporción de la absorción del analito que sea medida en la fase de corriente alta. Esta proporción es fuertemente dependiente de la efectividad del proceso de autoinversión, que es mayor cuanto más volátil sea el analito “*target*” [233].

3.2. Vapor químico por AAS

La gran expansión y utilización de la técnica de CVG para el análisis de elementos traza se debe principalmente a su relativa simplicidad y a la rapidez del proceso de derivatización. Particularmente, la popularidad de esta técnica ha crecido de manera notable a partir del uso de borohidruro de sodio (NaBH_4) o de potasio (KBH_4) como agentes derivatizantes.

El proceso de determinación de vapor químico por AAS comprende dos etapas: la generación del vapor y la detección del analito de interés. Cuando el vapor químico generado corresponde a un hidruro volátil, como es el caso de la arsina, la detección incluye un proceso de

atomización capaz de permitir la conversión de los hidruros a átomos del analito en estado libre. Tanto la generación como la atomización de los hidruros han transitado por caminos de múltiples discusiones teóricas y experimentales durante décadas con el objetivo de explicar de manera convincente los mecanismos involucrados. No obstante, el número de publicaciones destinadas a explicar aspectos teóricos de HGAAS es marcadamente inferior que el referido a aplicaciones de la técnica. A continuación se describen aspectos relacionados a ambos procesos considerando las investigaciones más recientes y los mecanismos propuestos.

3.2.1. Generación del hidruro

La generación de hidruros implica los siguientes procesos:

- Formación del hidruro a partir de la muestra, es decir, la conversión del analito al correspondiente hidruro covalente mediante una reacción química y su transferencia a la fase gaseosa;
- Transporte del hidruro liberado al atomizador.

La eficiencia del proceso completo (β_g), es decir, la fracción de analito transportada en la forma de hidruro al atomizador, puede expresarse a través de la siguiente ecuación:

$$\beta_g = \frac{N_0}{c_0 V_s} \quad (3.3)$$

donde N_0 es el número total de átomos del analito suministrados en la forma de hidruro al atomizador, c_0 es la concentración del analito en la muestra y V_s es el volumen de muestra.

Este parámetro es gobernado por dos procesos de transferencia de masa, uno correspondiente a la liberación del analito hasta la fase gaseosa y el otro al transporte del hidruro hasta el atomizador; por lo tanto, β_g también toma la forma:

$$\beta_g = \beta_r + \beta_t \quad (3.4)$$

donde

- β_r es la eficiencia de liberación del hidruro definida como la fracción de analito liberado en la forma de hidruro a partir de la solución:

$$\beta_r = \frac{N_{\text{liberado}}}{c_0 V_s} \quad (3.5)$$

siendo N_{liberado} el número total de átomos del analito liberados en la muestra líquida en la forma de hidruro. Debido a la presencia de un cambio de fase, β_r se ve favorecida por el burbujeo de gases para inducir el cambio de fase y la agitación mecánica; y

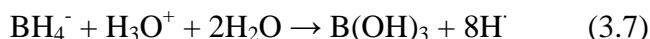
- β_t es la eficiencia de transporte del hidruro definida como la fracción de hidruro liberado transportada al atomizador mediante el gas de transporte:

$$\beta_t = \frac{N_0}{N_{\text{liberado}}} \quad (3.6)$$

Las condiciones de contorno para las ecuaciones generales planteadas arriba pueden consultarse en la referencia [63].

La técnica de generación de hidruros más antigua involucra un sistema metal/ácido (generalmente Zn/HCl) [61] para la reducción del analito a hidruro. Actualmente, la alternativa más utilizada para la formación de hidruros es la reacción con compuestos boranos, especialmente borohidruro de sodio en medio ácido. Las soluciones de borohidruro son muy inestables. Su descomposición obedece a una reacción de segundo orden con una constante de velocidad de $1,22 \cdot 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ l min}^{-1}$ (30 °C) para valores de pH entre 3,8 y 14. A los pH más ácidos con que se trabaja normalmente, la reacción de descomposición puede completarse en unos pocos microsegundos. La forma más empleada para estabilizar las soluciones de borohidruro consiste en la alcalinización con NaOH diluido y, en menor medida, la filtración o ultrafiltración con membrana. Los intentos por mejorar el rendimiento de generación del hidruro tales como la utilización de columnas cromatográficas dopadas con borohidruro de sodio sólido como ámbito en el que se llevan a cabo las reacciones al pasar la muestra ácida [234] o, el agregado de tensoactivos a la mezcla de reacción con la finalidad de aumentar la eficiencia de generación del hidruro a través de la formación de medios moleculares organizados [235], resultaron poco prometedores [236].

Como hemos mencionado, los mecanismos que gobiernan las reacciones involucradas en el proceso de generación de hidruros con tetrahidroboranos han sido fuente de numerosas discusiones [202]. Los mecanismos basados en la presencia de hidrógeno atómico o naciente han sido adoptados por años, casi de forma unánime, a partir de la década del '70. Robbins y Caruso [237] fueron los primeros en sugerir este mecanismo al postular que el borohidruro actuaba como fuente de hidrógeno naciente:

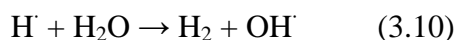
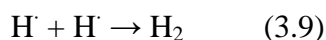


El hidrógeno naciente formado era considerado el agente efectivo de derivatización que reaccionaba con el analito para formar el hidruro correspondiente:



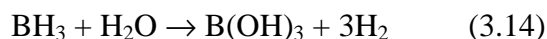
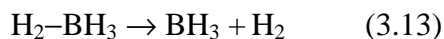
donde m representa el estado de oxidación del analito y n el número de coordinación del hidruro.

La formación de hidrógeno molecular era atribuida a la presencia de hidrógeno naciente en exceso:



Si bien, a través de los años, el mecanismo del hidrógeno naciente fue adoptado como válido por la comunidad científica toda, la comprobación experimental de tal aserción no aparecía. Por el contrario, los trabajos de más reciente aparición han objetado su validez de manera contundente. Los estudios realizados por Laborda et al. [238] indican que la formación de hidrógeno atómico originada en la hidrólisis ácida de borohidruro no es posible a partir de evaluaciones termodinámicas. La generación de hidruros de estaño, antimonio y bismuto en el rango de pH de 1,4 a 12,7 usando borohidruro y otros complejos boranos como agentes reductores reportada por D'Ulivo [172], constituye otra evidencia de suma significación ya que la formación de hidrógeno naciente no es posible en medio básico. Los estudios comparativos llevados a cabo por el autor mostraron que, en muchos casos, la relación entre la concentración de hidrógeno naciente originada por la descomposición del borohidruro (C_H) y la concentración estequiométrica mínima (S_H) necesaria para generar el hidruro es mayor que 1, lo que muestra que el mecanismo de hidrógeno naciente no puede justificar el proceso. Las experiencias de generación de hidruros de arsénico con reactivos deuterados [173,203] aportan más evidencias en este sentido. Las hidrólisis de NaBH_4 y NaBD_4 en H_2O y D_2O , respectivamente, resultaron en la formación de HD como producto principal (> 95%). Finalmente, a la luz de las investigaciones más recientes y de la mano de la espectrometría de masas, la formación de hidruros volátiles parece haber encontrado un mecanismo convincente en la transferencia directa de átomos de hidrógeno del borohidruro a la especie activa del analito a través de procesos basados en la formación de complejos analito-borano [239,240]. En este nuevo contexto, la producción de gas

hidrógeno y ácido bórico tienen lugar vía la formación de intermediarios:



Las reacciones (3.11) y (3.12) formadoras del intermediario $\text{H}_2\text{-BH}_3$ aparecen como las determinantes de la velocidad de reacción en función del pH del medio. Para los valores de pH más altos, la ecuación 3.11 gobierna el proceso y la velocidad de descomposición del borohidruro se vuelve muy lenta. Para valores de $\text{pH} \leq 1$, la descomposición puede completarse en unos pocos microsegundos.

El mecanismo simplificado propuesto por Howard [62] para la formación de hidruros de arsénico supone que el borohidruro actúa como reductor y fuente de hidrógeno. Cuando los oxoaniones de arsénico reaccionan con borohidruro, se asume que el primer paso es la reducción del estado de oxidación pentavalente al estado de oxidación trivalente:



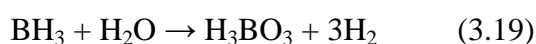
donde R es un grupo metilo y $0 \leq n \leq 3$. El paso siguiente consiste en la formación de la arsina correspondiente:



En ausencia de especies orgánicas las expresiones anteriores se reducen a:



Finalmente, la hidrólisis de borano lleva a la producción de ácido bórico e hidrógeno gaseoso:



Generalmente en HG se utiliza un gran exceso del agente reductor lo que produce una abundante liberación de hidrógeno. Las burbujas resultantes inducen el cambio de fase con la consiguiente transferencia del hidruro a la fase gaseosa. La concentración de los hidruros de arsénico en la solución de reacción es menor que su solubilidad, por lo que la presencia de hidrógeno juega un rol decisivo en su liberación. Una vez en fase gaseosa, el hidruro es conducido a un separador gas-líquido y luego arrastrado hasta un atomizador por una corriente de gas de transporte inerte. Si la incorporación del gas de transporte se realiza en la solución de reacción, la demanda de borohidruro se reduce considerablemente. Los gases que comúnmente se utilizan son argón, nitrógeno, helio e hidrógeno, dependiendo su elección de razones económicas y el tipo de atomizador utilizado [63]. Las pérdidas de hidruro por descomposición o adsorción sobre las tuberías deben ser minimizadas. La silanización de las superficies de vidrio es una práctica eficiente en la prevención de pérdidas [241,242]. La presencia de pequeñas gotitas en la tubería de transporte del hidruro como consecuencia del pasaje de aerosol líquido a través de la membrana del separador empobrece significativamente la sensibilidad y reproducibilidad de las medidas, en especial cuando se utilizan como atomizadores celdas de cuarzo calentadas externamente. La incorporación de trampas con desecantes ubicadas a la salida del separador debe hacerse con suma precaución debido a la posibilidad de absorción de los hidruros sobre el material utilizado [243].

La menor velocidad que presenta la reacción 3.17 respecto de 3.18 permite discriminar cinéticamente las especies inorgánicas tri y pentavalentes de arsénico en función del pH del medio y/o de la concentración de borohidruro. Esta propiedad ha dado lugar a una multiplicidad de métodos de “especiación” basados principalmente en la discriminación por pH (el tema se trata con mayor detalle en el punto 3.5). Sin embargo, cuando la “especiación” no es el objetivo y es necesario cuantificar arsénico total, es fundamental asegurar que todas las especies arsenicales se encuentren en el mismo estado de oxidación, lo que no necesariamente se logra llevando la concentración de ácido a valores elevados [76]. De hecho, la sensibilidad de la determinación de arsénico pentavalente es menor que la correspondiente a arsénico pentavalente [244] por lo que la modalidad más utilizada para la cuantificación de arsénico total consiste en la prerreducción de todas las especies presentes a la forma As(III). Esta prerreducción puede ser parte del procedimiento de preparación de la muestra o, como veremos más adelante, puede realizarse en la línea de análisis. El yoduro de potasio en ácido clorhídrico 4-6 M es el agente prerreductor más utilizado para este propósito [64,71-74]. En estas condiciones, las interferencias ocasionadas por elementos de transición se reducen en varios órdenes de magnitud. La prerreducción tiene lugar mediante la siguiente reacción:



la que depende fuertemente de la concentración de ioduro, la acidez de la muestra y la temperatura. El agregado de altas concentraciones de ioduro (generalmente se trabaja en exceso) puede llevar a la producción de grandes cantidades de yodo por acción del oxígeno presente en la corriente acuosa, lo cual trae dificultades para la cuantificación del analito por HGAAS con celda de cuarzo [71] ya que podría favorecerse la reacción inversa a la formulada en 3.20. La adición de ácido ascórbico genera mejores condiciones de trabajo ya que aumenta de manera notoria la estabilidad de las soluciones y previene la oxidación del ioduro a yodo libre. El tiempo necesario para la reducción completa de As(V) a As(III) a temperatura ambiente (en el presente trabajo, 45 minutos en HCl 4 M y solución prerreductora de ioduro de potasio 1,7% (m/v) - ácido ascórbico 1,7% (m/v)) disminuye drásticamente trabajando a temperaturas próximas a 100 °C ya que se trata de una reacción endotérmica. De esta manera, el diseño de un sistema en flujo requerirá pre-reducción en línea a alta temperatura para operar en tiempos cortos compatibles con la automatización. Esta fuerte dependencia de la reacción de reducción con la temperatura ha sido clave para el diseño de sistemas con prerreducción por calentamiento en línea. Para la reducción de Se(VI) en estas condiciones, Stripeikis et al. [245] reportaron que, además, es esperable que la reacción inversa exotérmica tenga pocas probabilidades de ocurrencia si no se deja que el sistema enfríe.

Las altas concentraciones de ácido y reactivo involucrados en la prerreducción con ioduro de potasio y el consecuente problema asociado a la disposición de los residuos, impulsó en estos últimos años la incorporación de la L-cisteína como agente reductor, aunque su aplicación no ha tenido hasta el momento una amplia repercusión en los laboratorio de rutina. Brindle y sus colaboradores fueron pioneros en su utilización [75,246,247] mientras que otros autores [248-251] continuaron con la investigación de los mecanismos involucrados en las reacciones rédox. Los resultados informados no revelan mejoras ni en el tiempo de reacción necesario para la completa reducción de As(V) a As(III) a temperatura ambiente ni en la extensión de la zona lineal de la curva de calibrado (que llega hasta 10 µg L⁻¹) en comparación con el uso de ioduro de potasio; las ventajas más importantes residen en las menores concentraciones de reactivos (L-cisteína 1% (m/v); HCl 0,1 M) y en los menores límites de detección obtenidos (0,01 µg L⁻¹ para arsénico calculados como 3s). Otros reactivos se han utilizado ocasionalmente como prerreductores, tales como tiourea [76], tiosulfato [252,253] o cloruro de titanio [254,255].

Modos de generación de hidruros

La generación de hidruros puede llevarse a cabo de dos modos diferentes según la forma de transporte del hidruro al atomizador, estas son: colección y transferencia directa. En el modo de colección, el hidruro es atrapado en un aparato adecuado hasta que se completa la reacción y luego es transportado al atomizador. La colección puede realizarse en medios absorbentes, en sistemas cerrados bajo presión o en trampas frías. Estos métodos fueron muy empleados en los primeros años de la aplicación de la generación de hidruros ya que la reducción mediante la dupla metal/ácido era lenta llevando el tiempo de operación a varios minutos. Obviamente, la discontinuidad entre la colección de los hidruros y el arrastre resultaba ventajosa ya que, una vez recolectados, se arrastraban al atomizador en tiempos cortos.

En el modo de transferencia directa, el hidruro liberado es directamente transportado a un atomizador. La rápida reacción de formación de hidruros utilizando el sistema $\text{BH}_4^-/\text{ácido}$ hace que la colección del hidruro liberado sea prescindible, de manera que en la actualidad los métodos de transferencia directa son mucho más usados. Corrientemente se emplean dos métodos de transferencia directa: sistemas discretos o en “batch” y sistemas en flujo conocidos como flujo continuo (CF) e inyección en flujo (FI).

En los sistemas discretos se emplean frascos de reacción donde se mezclan la muestra acidificada y la solución de borohidruro de sodio. El hidruro y el hidrógeno formados son arrastrados por una corriente de gas inerte desde el extremo superior del frasco hasta el atomizador donde los hidruros transformados en átomos libres absorben radiación electromagnética proveniente de una fuente y originan una señal transitoria.

En el modo CF (ver Figura 3.1), la generación de hidruros se produce en un reactor que consiste en un tubo plástico dispuesto en forma helicoidal, al cual arriban sucesivamente la muestra, una solución ácida transportadora y la solución de borohidruro de sodio por medio de tuberías plásticas e impulsadas por una bomba peristáltica. Las fases líquida y gaseosa resultantes se separan en un separador gas-líquido; la fase gaseosa es conducida hasta el atomizador donde se obtiene una señal estacionaria debido a la entrada continua de muestra.

En el modo FI (ver Figura 3.2), la reacción de generación de hidruros se lleva a cabo en un reactor donde convergen la solución de borohidruro de sodio y la solución ácida que transporta un volumen definido de muestra que se inserta en el flujo continuo de la solución de transporte a través de una válvula de inyección. El hidruro contenido en la fase gaseosa es arrastrado desde el separador gas-líquido hasta el atomizador donde se obtiene, en este caso, una señal transitoria debido a la característica discreta de la entrada de muestra en el sistema. Como FI es el modo de

transferencia de hidruros utilizado en el presente trabajo, sus características se discuten más detalladamente en 3.4.

Los separadores gas-líquido de membrana son los más utilizados actualmente en sistemas CF y FI. Su funcionamiento se basa en la difusión del gas a través de una membrana de PTFE® o de goma siliconada permeable sólo a los gases. El hidruro gaseoso arrastrado por el gas de purga y el hidrógeno generado en la reacción atraviesan la membrana y se dirigen al atomizador mientras que los líquidos de desecho son conducidos al drenaje desde la parte inferior del separador. Un separador de este tipo se utilizó en el presente trabajo (ver Figura 3.3). Los separadores hidrostáticos, utilizados con anterioridad a los de membrana, consisten en un tubo en forma de U que posee un pequeño reactor en una de sus ramas donde tiene lugar la separación. La mezcla gaseosa emerge a partir del extremo superior del tubo mientras que el líquido de desecho lo hace por la parte inferior.

Algunos autores han informado alternativas muy interesantes con la finalidad de realizar la preparación de las muestras en línea mediante la utilización de sistemas CF [74,256] o FI [71,83,257] acoplados a HGAAS. Nielsen y Hansen [71] diseñaron un sistema para la reducción en línea de As(V) a As(III) en el cual la muestra, en conjunto con la solución prerredactora (HCl 4 M, ioduro de potasio 1,0% (m/v); ácido ascórbico 0,5% (m/v)), son calentadas al pasar por un reactor anudado inmerso en un baño de aceite termostatzado a 140 °C y luego, enfriadas al atravesar un segundo reactor anudado inmerso en un baño de agua a 10 °C. Los parámetros del sistema fueron optimizados de manera de obtener una completa reducción sin necesidad de recurrir a la interrupción del flujo.

3.2.2. Atomización del hidruro

Los atomizadores de hidruros deben permitir la conversión eficiente del hidruro a vapor atómico, independientemente de la composición de la muestra. El mayor tiempo de permanencia de los átomos en estado libre permite alcanzar una óptima sensibilidad en la medida. Para la determinación de hidruros por AAS pueden emplearse distintos tipos de atomizadores: llamas de difusión de gas hidrógeno/gas inerte, hornos de grafito y celdas de tubo de cuarzo.

Las llamas de difusión de hidrógeno/argón e hidrógeno/nitrógeno fueron utilizadas casi exclusivamente en los comienzos de la generación de hidruros acoplada a AAS [258,259]. El hidruro puede introducirse en la llama arrastrado por el gas de purga sin más requerimientos que los de un quemador convencional de AAS. La ventaja de este tipo de llamas con respecto a las de aire-acetileno es que la absorción de fondo es mucho menor a las longitudes de onda

características de los elementos formadores de hidruros (por debajo de 200 nm). Sin embargo, la presencia aún significativa de absorción de fondo, el ruido instrumental y la elevada dilución del hidruro en los gases de la llama desfavorecen el límite de detección. Esta forma de atomización de hidruros no ha sido muy empleada ni tampoco optimizada desde sus comienzos. Algunos trabajos recientes sugieren que la llama de difusión miniaturizada altamente combustible, rica en hidrógeno y oxígeno, puede ser una alternativa a considerar como atomizador de hidruros [174,260].

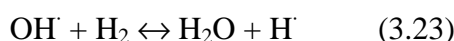
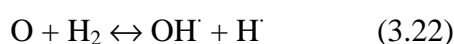
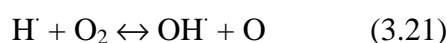
La aplicación de hornos de grafito para la atomización de hidruros por AAS fue introducida en 1973 [212]. Existen dos modalidades para su uso: atrapamiento in-situ y atomización en línea. El atrapamiento in-situ [213] consiste en usar el horno de grafito como medio de retención primero y como celda de atomización luego. El hidruro purgado desde un generador se absorbe en la superficie del horno calentado a 200-600 °C hasta su evolución completa. Posteriormente la aplicación de temperaturas superiores a los 2000 °C causa la atomización del analito. Los factores críticos que deben tenerse en cuenta para evitar la pérdida de hidruros son la geometría y la calidad de la superficie de grafito, la temperatura de retención y el flujo de gas de purga. La interfase utilizada en el transporte del hidruro desde el generador hasta el horno de grafito es esencial para maximizar la eficiencia. Actualmente, el mecanismo más empleado consiste en un capilar de cuarzo colocado en el punto de inyección del brazo del automuestreador de manera que el capilar pueda ser fácilmente retirado previo al paso de atomización. Cuando se emplea la modalidad de atomización en línea, el hidruro se transfiere directamente a un horno de grafito precalentado a la temperatura de atomización a través del flujo de gas de purga. Este tipo de dispositivos solamente ha sido utilizado para análisis de rutina debido a su sensibilidad limitada como consecuencia de un paso óptico reducido.

Los atomizadores de celda de cuarzo han sido los más utilizados desde su descubrimiento en 1975 por Siemer y Hagemann [261]. Estos constan de dos tubos dispuestos en forma de T. El brazo central de estos atomizadores cumple la función de liberar los hidruros transportados por el flujo de gas de purga hacia un tubo de atomización perpendicular al primero y alineado con el paso óptico del espectrómetro de absorción atómica. Según su forma de calentamiento estas celdas pueden ser de dos tipos: de llama interna y calentados exteriormente. Las celdas de llama interna operan con una llama de oxígeno (aire)/hidrógeno en su interior que logra sostenerse debido a la entrada de oxígeno (aire) a través de un tubo auxiliar. Como la cantidad de hidrógeno proveniente de la descomposición del borohidruro durante la reacción no es suficiente para asegurar un proceso de atomización eficiente, se provee a la entrada de la celda una cantidad de hidrógeno adicional. El segundo tipo de celda de atomización consiste en un dispositivo de

cuarzo dispuesto en forma de T calentado exteriormente con una llama de aire/acetileno a temperaturas de 1100 °C aproximadamente o con una resistencia eléctrica. La distribución de temperaturas dentro del atomizador depende de la velocidad de flujo del gas y su máximo está limitado por la durabilidad térmica del cuarzo. La cantidad de hidrógeno liberada durante la reacción de generación de hidruros es suficiente para alcanzar una atomización eficiente operando bajo condiciones optimizadas. Este ha sido el dispositivo de atomización adoptado en el presente trabajo (ver Figura 3.4).

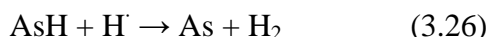
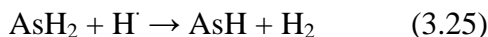
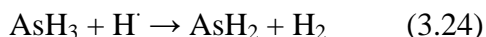
Los últimos años han sido escenario de numerosas discusiones relacionadas con los mecanismos de atomización de hidruros que tienen lugar en celdas de cuarzo calentadas interna o externamente, mecanismos entre los cuales no aparece una diferencia netamente marcada. Las diversas interpretaciones han estado especialmente fundadas en la naturaleza de la especie química involucrada directamente en el proceso de atomización, ya sean radicales hidrógeno [260,262-264] u oxígeno [204,265,266]. El planteo de estos mecanismos comenzó luego de que numerosos trabajos revelaran que la atomización por descomposición térmica es sólo eficiente en los casos de hidruros de bismuto y plomo. Recientemente han sido obtenidas las primeras evidencias experimentales directas de la desaparición de radicales hidrógeno ante la presencia de arsina empleando una llama miniaturizada de hidrógeno/oxígeno introducida en la cavidad de un espectroscopio de resonancia de spin (ERS) [267].

El mecanismo propuesto por Rubezca y Dedina [260] para celdas de cuarzo con llama interna de hidrógeno/oxígeno asume que la atomización se debe a radicales libres generados en la zona de reacción de la llama de difusión a través de las siguientes reacciones:



En presencia de exceso de hidrógeno se forman radicales H^\cdot y OH^\cdot (dos radicales por cada molécula de oxígeno). Debido a que la recombinación de radicales es un proceso considerablemente más lento que el de su formación, es esperable una concentración superior a la de equilibrio en las zonas más calientes. Por último, dada la alta velocidad de la reacción (3.23) se llega a un estado estacionario donde la cantidad de radicales H^\cdot es varios órdenes superior que la de OH^\cdot .

Los hidruros arrastrados por el gas de transporte interaccionan con la nube de radicales H^\cdot a través del siguiente mecanismo [264]:



Luego son arrastrados por el gas de transporte hasta la zona central del atomizador. Dado que la probabilidad de formación de átomos de arsénico libres es proporcional al número de colisiones con radicales $\text{H} \cdot$, la eficiencia de la atomización local se incrementa con el número creciente de radicales libres, lo que depende principalmente del suministro de oxígeno al atomizador. Sin embargo, la cantidad de radicales no es un factor decisivo para asegurar la eficiencia de la atomización, sí lo es en cambio, la densidad de la nube en la sección transversal del atomizador. La posición exacta de la nube de radicales en las celdas de cuarzo calentadas externamente, a diferencia de los atomizadores con llama interna, no puede determinarse en un sitio fijo sino que depende de: el perfil de temperaturas en el atomizador, la velocidad y composición del flujo de gas de transporte y el diseño del atomizador. Por ejemplo, la nube podría estar ubicada en el brazo de entrada, en la unión con el tubo T o en el tubo central. Esto hace que el diámetro interno del atomizador en el sitio donde se halla la nube, sea en muchos casos una variable más significativa que la velocidad del gas de purga. El tiempo de residencia de los átomos libres en el paso óptico es controlada por dos procesos de decaimiento: mecánico (convección forzada) y químico (adsorción sobre la superficie, formación de dímeros, etc).

La ausencia de hidrógeno en el atomizador imposibilita la atomización de los hidruros en celdas de cuarzo calentadas externamente [263,268,269]. Por lo general, la descomposición del borohidruro asegura la presencia de hidrógeno en el atomizador. La arsina, sólo puede ser atomizada si la relación estequiométrica O_2/H_2 es menor a 0,5 [204,264]. La importancia de la presencia de oxígeno para alcanzar una óptima sensibilidad en las medidas ha sido tema de extensa discusión. Las investigaciones realizadas por Dedina y Rubeska en atomización de arsina [260] han demostrado que para un dado atomizador y condiciones establecidas de velocidad de flujo de gas y temperatura, la absorbancia observada depende del suministro de oxígeno. La sensibilidad aumenta rápidamente hasta alcanzar una plataforma que se mantiene aproximadamente constante a medida que el suministro de oxígeno continúa. La cantidad de oxígeno necesaria para alcanzar una sensibilidad óptima (punto inicial de la plataforma) depende de la temperatura de atomización, la velocidad total del flujo de gas y el diámetro interno del atomizador. Una cantidad de oxígeno muy pequeña, como aquella normalmente disuelta en las soluciones de muestra y reactivos, es suficiente para la mayoría de los elementos formadores de hidruros volátiles a temperaturas cercanas a 1000 °C. La permeabilidad de las tuberías y conectores a la difusión de gases puede constituir otra fuente de entrada de oxígeno al sistema

[263]. La utilización de temperaturas de calentamientos más bajas requiere de mayor cantidad de oxígeno para compensar las pérdidas de sensibilidad [204,263].

3.3. Interferencias en HG AAS

Las interferencias típicas de AAS pueden clasificarse en dos grupos: espectrales y no espectrales. Las interferencias espectrales se deben a la radiación absorbida por otras especies además de los átomos del analito. Las interferencias no espectrales se deben a la influencia de los constituyentes de la muestra sobre la señal analítica.

Cuando se emplea HG las interferencias espectrales no son relevantes debido a la separación que experimenta el analito del resto de los componentes de la matriz. La corrección por absorción de fondo puede ser necesaria en presencia de grandes excesos de otros elementos formadores de hidruros cuando se utilizan atomizadores de llama u horno de grafito, especialmente cuando se hallan involucrados medios no acuosos. La influencia relativa de las interferencias espectrales sobre la señal depende de la concentración del analito. En este caso, el método de adición estándar no contribuye a mejorar la exactitud y precisión de la medición analítica porque, particularmente, la absorción de fondo es una interferencia de ordenada al origen, la cual no se puede corregir por dicho método.

Las interferencias no espectrales pueden ocurrir en la fase líquida durante la formación del hidruro y su transferencia desde la solución (ver 3.3.1), o bien pueden afectar al analito en la fase gaseosa (ver 3.3.2). Las primeras se deben a cambios en la velocidad de liberación del hidruro (interferencia en la cinética y eficiencia de liberación). Estas son causadas por especies interferentes presentes en la solución de la muestra. Las interferencias en fase gaseosa son causadas por especies volátiles, generalmente, otros hidruros. Las interferencias no espectrales por lo general no dependen de la concentración del analito, por lo que el método de adición estándar resulta apropiado para corregir la pendiente de la curva de calibrado influenciada por estos interferentes. Esta última alternativa es sólo válida en los casos en que la sensibilidad no sea disminuida fuertemente por la presencia de estos interferentes.

3.3.1. Interferencias no espectrales en fase líquida

Pueden clasificarse básicamente en dos grupos: interferencias de composición química e interferencias de matriz.

Las primeras corresponden a los casos en que el analito se encuentra presente en las muestras en formas químicas diferentes de aquellas utilizadas en los estándares de calibración. En estos casos la liberación del hidruro de la muestra puede ser diferente a la solución patrón, aún cuando ésta fuera adicionada a la muestra. Esto puede suceder cuando los enlaces orgánicos del analito no se descomponen completamente durante el tratamiento de la muestra o cuando el analito en la muestra posee un estado de oxidación diferente a la del analito en la solución patrón de modo que, la eficiencia para la conversión a hidruro sea distinta. Este es el caso de As(III) y As(V).

Las interferencias de matriz tienen lugar cuando sus componentes afectan la eficiencia de liberación del hidruro. Pueden ser componentes presentes en la muestra líquida, tales como partículas sólidas, compuestos orgánicos disueltos no destruidos en la mineralización y compuestos inorgánicos disueltos. En este último grupo se encuentran las interferencias más comunes de la determinación de As por HGAAS. Los interferentes inorgánicos pueden actuar a través de los siguientes mecanismos:

- a. Interferencia ión-ión: el ión de analito reacciona con el ión de interferente en la solución de la muestra previamente a la adición de borohidruro, formándose un compuesto que no se convierte en hidruro o lo hace con menor eficiencia.
- b. Interferencia ión-producto: las especies formadas por la reacción del interferente con borohidruro se enlazan a iones del analito de manera que la eficiencia de liberación del hidruro disminuye.
- c. Interferencia ión-hidruro: el hidruro formado es enlazado al interferente presente en forma iónica.
- d. Interferencia hidruro-producto: las especies formadas por la reacción del interferente con el borohidruro capturan el hidruro.

Los interferentes inorgánicos pueden ser clasificados en tres grupos: metales nobles, metales de transición y oxidantes fuertes. Estos últimos generalmente interfieren en la liberación de los hidruros de As, Sb y Se. El mecanismo posiblemente sea gobernado por la acción de interferencias ión-ión, donde la oxidación del analito a su valencia positiva más alta impide o disminuye la formación de los hidruros.

3.3.2. Interferencias no espectrales en fase gaseosa

Las interferencias en fase gaseosa más relevantes corresponden a la presencia de otros elementos formadores de hidruros los que pueden alterar los mecanismos de atomización.

Pueden actuar en forma directa o por modificación de la superficie de la tubería de transporte del hidruro al atomizador, produciendo una pérdida de sensibilidad por adsorción del analito gaseoso en las paredes de los conectores.

Con el propósito de minimizar las interferencias en fase líquida y gaseosa en la determinación de As por HGAAS pueden aplicarse ciertos procedimientos generales:

- a. Optimización de las concentraciones de ácido clorhídrico y borohidruro.
- b. Uso de agentes enmascarantes y separación con resinas quelantes para aumentar la tolerancia a los iones de los elementos de transición y a los metales nobles.
- c. Separaciones gas-líquido más rápidas y eficientes para un mejor control de las interferencias en fase líquida.
- d. Reemplazo de los oxidantes por agua oxigenada o evaporación a sequedad. En estos casos hay que considerar el riesgo de pérdida de analito por volatilización; lo que puede hacer necesaria la adición de coadyuvantes.
- e. Control del estado de oxidación del analito o del interferente; por ejemplo, la reducción de As(V) a As(III) disminuye la posibilidad de interferencias.
- f. Aplicación de técnicas de adición estándar.
- g. Uso de sistemas FIA para maximizar la selectividad por discriminación cinética en condiciones de ausencia de equilibrio termodinámico; selección de sistemas diseñados para favorecer la reacción principal y minimizar el efecto de las reacciones secundarias no deseadas. A continuación se describen principios y características de esta técnica analítica y las ventajas de su incorporación a la HG.

3.4. La inyección en flujo en HGAAS

El concepto de inyección en flujo fue introducido por Ruzicka y Hansen [270] como una nueva técnica de análisis a mediados de los '70, después de muchos años de desarrollo. En la primera edición de su monografía, "Flow Injection Analysis", publicado en 1981, los autores definen la inyección en flujo como un método basado en la inserción de una muestra líquida en una corriente continua no segmentada en movimiento de un líquido adecuado. La muestra inyectada es transportada a un detector que registra continuamente la absorbancia, potencial de electrodo, o cualquier otro parámetro físico o medida que cambie continuamente como resultado del pasaje de muestra a través de una celda de flujo. Años más tarde, esta primera definición fue modificada por los autores para hacerla más abarcadora. La revisión define entonces la inyección en flujo como "la obtención de información de un gradiente de concentración a partir de una

zona bien definida de fluido manipulada reproduciblemente a través de una medida de tiempo exacto en una corriente de flujo bajo condiciones termodinámicas no equilibradas” [271]. Esta definición marca la principal diferencia entre FI y CF, ya que en el segundo las medidas se realizan en condiciones de equilibrio termodinámico estable.

Los principios básicos de FIA pueden resumirse de la siguiente manera:

- a. Un volumen exacto de muestra es inyectado en una zona definida de una solución transportadora continua.
- b. La geometría y las características hidrodinámicas del sistema controlan la dispersión del analito en esta zona.
- c. Las medidas generalmente se realizan bajo condiciones termodinámicas no equilibradas. Ni el equilibrio físico (homogeneización del flujo) ni el equilibrio químico (reacciones completas) se alcanzan al momento de detectarse la señal en la mayoría de los casos.
- d. Los tiempos de operación son altamente reproducibles.

La obtención de respuestas cuantitativas en un sistema que opera bajo condiciones termodinámicas no equilibradas solamente es posible como consecuencia de la alta repetitividad y reproducibilidad que caracterizan a los sistemas FI. Esta particularidad le confiere a la técnica importantes ventajas tales como: a) ahorro en el tiempo de análisis ya que no es necesario alcanzar el equilibrio de la reacción para realizar la medida; b) si se emplean zonas de reacción cortas es posible lograr una discriminación cinética favoreciendo las reacciones rápidas generalmente deseables y suprimiendo las más lentas.

La reproducibilidad y repetitividad de los sistemas FI alcanzan también a la dispersión o mezcla progresiva que sufre la muestra en la solución de transporte, lo que ocasiona en un reactor tubular una zona de muestra representada por un perfil de concentraciones de gradientes continuo con una concentración máxima en la cumbre del pico (ver Figura 3.5). La dispersión D de la muestra puede expresarse entonces como:

$$D = \frac{C_0}{C} \quad (3.27)$$

donde C_0 es la concentración original de analito en la muestra y C es la concentración del analito en el máximo del pico FIA [271].

La definición más reciente de FI introducida por Fang [272] destaca más claramente otros aspectos decisivos de la técnica al proponer que “FI es una técnica de flujo no cromatográfica para análisis cuantitativo a través de la manipulación reproducible de zonas de muestra y

reactivos en un sistema de flujo bajo condiciones termodinámicas no equilibradas”. El carácter no cromatográfico de FI implica que todas las separaciones realizadas con esta técnica, aún aquellas que involucran materiales cromatográficos, conducen solamente a la separación de los componentes individuales pero no a la separación de una mezcla en sus componentes, esto es, nunca trabaja sobre la migración diferencial de componentes individuales.

Las técnicas FI ofrecen diversas posibilidades para la adición de reactivos a la muestra de medida. En la mayoría de los casos el reactivo se transporta por una línea separada y se mezcla con las soluciones de transporte y de muestra en una o más zonas de reacción de dimensiones variables, el conjunto recibe el nombre de configuración FIA o, el más utilizado nombre de “*manifold*”. La modalidad más utilizada en el acoplamiento FI-HG consiste en la mezcla continua de un flujo constante de solución ácida de transporte, f_s , y otro de solución de reactivo borohidruro en un punto de convergencia a partir del cual se establece una zona de reacción. Un volumen fijo de muestra se inserta en la corriente ácida de transporte y al llegar a la zona de reacción entra en contacto con la solución de borohidruro. Una corriente de gas de purga se introduce luego de la zona de reacción. El líquido y el gas son entonces separados en dos flujos de salida: el hidruro gaseoso que fluye al atomizador arrastrado por el gas de transporte y el efluente líquido que es conducido al drenaje. Las bombas peristálticas constituyen la forma más utilizada para producir el transporte de líquidos en los sistemas FI.

La velocidad total del flujo de gas de transporte F es la suma de las velocidades del flujo de gas de purga F_o y del flujo de hidrógeno formado a partir de la descomposición del borohidruro:

$$F = F_o + f_B V_h \quad (3.28)$$

donde f_B es la velocidad del flujo de borohidruro expresada como velocidad del flujo de masa de borohidruro puro y V_h es el volumen de hidrógeno liberado por unidad de masa de borohidruro (2540 ml g^{-1} a 20 °C).

La función de suministro de analito líquido, $s_{(t)}$ (número de átomos del analito en el punto de convergencia con el borohidruro) puede expresarse como:

$$s_{(t)} = c_{(t)} f_s \quad (3.29)$$

$$\int_0^{\infty} s_{(t)} dt = c_o V_s \quad (3.30)$$

donde $c_{(t)}$ es la concentración del analito en la corriente ácida de transporte, c_o es la

concentración del analito en la muestra inyectada y V_s es el volumen de muestra inyectada. La diferencia entre $c_{(t)}$ y c_o depende del grado de dispersión de la muestra y se cuantifica a través del coeficiente de dispersión D definido en la ecuación 3.27.

La función para el suministro de hidruro al atomizador $S_{(t)}$ (número de átomos de analito liberados al atomizador en la forma de hidruro por unidad de tiempo) es controlada por la dispersión de la muestra en la corriente de fluido previo al separador gas-líquido y por la mezcla del hidruro en el volumen muerto del separador y tubos de conexión al atomizador. La derivación de esta función requiere ciertas condiciones de contorno extremas tales como: los componentes de la reacción se mezclan en forma homogénea al inicio de la reacción; el hidruro que entra al separador gas-líquido es liberado al volumen del separador sin ninguna demora y el tubo que conecta el separador gas-líquido con el atomizador tiene un volumen despreciable.

Estas suposiciones implican que la remoción del hidrógeno a partir del separador es un proceso de primer orden con una constante de velocidad, k_m dada por la siguiente relación:

$$k_m = \frac{F}{V_M} \quad (3.31)$$

donde V_M es el volumen muerto del separador.

Si bien las suposiciones anteriores corresponden a un sistema ideal, las ecuaciones planteadas para la derivación de la función reflejan de manera aproximada el proceso real.

La ecuación para el número de átomos de analito presentes como hidruros en el volumen muerto del separador (N_M) puede expresarse como:

$$\frac{dN_M}{dt} = \beta_r S_{(t)} - k_m N_M \quad (3.32)$$

El primer término a la derecha de la ecuación describe la velocidad de entrada del hidruro al volumen muerto del separador y el segundo, la velocidad de desaparición del hidruro a partir del volumen muerto. Evidentemente, el segundo término controla la función de suministro del hidruro $S_{(t)}$, la cual puede expresarse como:

$$S_{(t)} = \beta_t k_m N_M \quad (3.33)$$

3.5. Resultados y discusión

3.5.1. Valoración de arsénico total en muestras de agua

Las condiciones de borohidruro y/o ácido en exceso generalmente empleadas en la determinación de elementos formadores de hidruros por FI-HGAAS garantizan la normal evolución de las reacciones involucradas, a pesar de no alcanzarse el equilibrio físico y químico. Sin embargo, tal como mencionáramos anteriormente, el empleo de altas concentraciones de ácido no siempre es suficiente para lograr sensibilidades comparables entre As(III) y As(V). Las respuestas obtenidas en el sistema utilizado en este trabajo (ver Figura 3.6) para concentraciones crecientes de HCl se muestran en las Figura 3.7. La Tabla 6.1 presenta los parámetros químicos e instrumentales utilizados de manera rutinaria para la determinación de As total. Cuando se utiliza FI como técnica de introducción de muestras, normalmente éstas se acondicionan de manera de hacerlas compatibles con la solución que se utilizará como transportadora. Una concentración de HCl 1,2 M (similar a la solución de transporte típica) es el medio habitualmente seleccionado para soluciones estándar y/o muestras en el sistema utilizado, adicionadas de solución prerreductora de ioduro de potasio 5% (m/v) - ácido ascórbico 5% (m/v) [273]. Los métodos y reactivos se describen detalladamente en el Capítulo 6.

3.5.2. Comportamiento de FI-HGAAS en la determinación de As(III) inorgánico mediante discriminación por pH selectivo en muestras no acidificadas.

La discriminación por pH constituye una modalidad muy utilizada en estudios de especiación de arsénico por HGAAS, ya sea empleando modos discretos, CF o FI. Los primeros trabajos publicados en este campo por Braman et al. [274] sugerían que la generación de hidruros a partir de especies de arsénico con borohidruro depende fuertemente del pH en la medida que, sólo las moléculas totalmente protonadas y no disociadas, reaccionan rápidamente y se reducen a sus arsinas correspondientes. Los valores de las constantes de disociación K_a aportados por los autores permitieron establecer la relación entre el pH y la fracción de cada especie no disociada en solución acuosa en estado de equilibrio (ver Figuras 1.2 y 1.3). La molécula de ácido arsenioso (forma en la que se encuentra el As(III) en solución acuosa) pierde su primer H^+ a valores de pH cercanos a 9,2, mientras que la molécula de ácido arsénico lo hace a valores de pH mucho más bajos. De esta manera, la generación de arsina a partir de As(III) puede llevarse a cabo selectivamente a valores de pH altos en comparación con As(V).

El número de publicaciones referidas a la especiación de arsenicales por discriminación de pH es verdaderamente elevado. Como reseñas relevantes se pueden citar los trabajos de Howard y Arbab-Zabar [66], quienes llevaron a cabo la reducción de las especies inorgánicas de arsénico por ajuste controlado de pH con soluciones de ácido clorhídrico usando AAS. Anderson et al. [64] realizaron un interesante trabajo de combinación de varios medios y reactivos conducentes a la reducción selectiva de As(III), As(V), MMAA y DMAA usando CF-HGAAS. Los autores finalmente seleccionaron una solución reguladora de ácido cítrico-citrato para la determinación específica de As(III), ácido acético para As(III) y DMAA y ácido mercaptoacético para As total. La determinación de As(III) en medio acético por CF-HGAAS fue reportada por Wolfgang y Jekel [275]. Torralba et al. [276] evaluaron la determinación selectiva de As(III) en un medio ácido cítrico/citrato en presencia de bajas concentraciones de arsénico orgánico por FI y CF-HGAAS. Más recientemente, Carrero et al [277] estudiaron el efecto de la concentración ácida sobre la generación de arsina para As(III), As (V), MMAA y DMAA en diferentes medios de reacción por FI-HGAAS.

A partir de la literatura, es posible observar que los métodos utilizados generalmente llevan a cabo una etapa de pretratamiento en la que la muestra es acidificada de manera similar a las soluciones de transporte seleccionadas. Sin embargo, como vimos en el capítulo anterior, la carencia de una metodología de preservación estandarizada para las especies, sumada a la confusión existente acerca del efecto que realmente genera el agregado de agentes de conservación, tal como la alteración en la distribución de As(III) y As(V) observada en muestras de aguas naturales y sintéticas adicionadas con HCl o HNO₃ [140], induce a la idea de evaluar el comportamiento del sistema FI-HGAAS utilizado en la medición de muestras no acidificadas. En términos termodinámicos, la presencia de O₂ disuelto (E_0 , 1,229 V) aparece como una de las causas más comprometedoras para el equilibrio del par redox As (III)/As (V) (E_0 , 0,559 V) y la disminución de los valores de pH en las muestras no son favorables en este sentido. Los estudios del presente trabajo se han focalizado entonces en la evaluación y optimización de los parámetros involucrados en la determinación selectiva de As(III) inorgánico en soluciones de muestras no acidificadas transportadas por soluciones de baja acidez.

La inyección de volúmenes pequeños de muestra no acidificada (< 1 ml) al flujo de una solución de transporte de ácido diluido, determina la necesidad de un cuidadoso proceso de optimización de todas las variables operativas. Las típicas señales gaussianas obtenidas como respuestas transitorias en el sistema FI-HGAAS empleando concentraciones de ácido clorhídrico de pH < 0 (HCl 1,2 M), sufren una marcada alteración en su forma a medida que disminuye la acidez de la solución de transporte dando lugar a la aparición de señales de picos dobles.

La presencia de picos dobles ha sido asociada en la literatura a procesos ocurridos por condiciones no optimizadas tanto en la etapa de generación como de atomización del hidruro. En la etapa de generación, la distribución inhomogénea del pH a lo largo de la zona de reacción incide en la eficiencia de producción [172] por lo que son esperables señales distorsionadas. De hecho, la deficiencia en la concentración de protones en el centro de la zona de muestra (valores de pH relativamente altos) provoca una depresión central que se traduce como un doble pico. Por otro lado, ya en el atomizador, una deficiencia de radicales hidrógeno también provocada por escasa acidez [206] puede conducir a un deterioro en la eficiencia de las reacciones de atomización 3.24 a 3.26, especialmente ante la llegada de mayor cantidad de analito. Como reseñas relevantes que informaron la presencia de picos dobles en FI-HGAAS debido a ineficiencia en la atomización, podemos citar los trabajos de Welz y Guo [262], quienes atribuyeron su aparición a la deficiencia de radicales hidrógeno en el atomizador de tubo de cuarzo generada por i) temperaturas de atomización menores a las óptimas ($< 900\text{ }^{\circ}\text{C}$) y ii) altas concentraciones de arsina que llegan al atomizador. En estudios llevados a cabo con atomizadores de llama miniaturizada, D'Ulivo y Dedina [174] asociaron los picos dobles a procesos de recombinación de átomos libres.

Como veremos a continuación, una evaluación sistemática de los parámetros involucrados en los procesos de generación y atomización de los hidruros no solamente permitió interpretar los cambios observados en las señales ante la modificación de las variables, sino consolidar una metodología optimizada aplicable al análisis de especiación de arsenicales inorgánicos en muestras de aguas naturales en su estado original no acidificadas.

3.5.2.1. Influencia de la acidificación del medio.

Como una consecuencia del proceso dispersivo ocurrido en la zona de mezcla, el uso de soluciones de transporte medianamente concentradas de HCl (1,2 M) permitió mantener señales gaussianas cuando se utilizaron soluciones estándar de As(III) sin acidificar, con una disminución en la sensibilidad de aproximadamente 15% respecto a la solución acidificada. En el intento de minimizar la exposición de la especie trivalente a las mayores concentraciones de ácido, se experimentó con el uso de soluciones de transporte más diluidas y similares a la muestra de medida. La Figura 3.8 muestra las respuestas obtenidas para una solución de $45\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ de As(III) en agua usando soluciones de transporte con concentraciones crecientes de HCl entre 0,1 y 1,2 M y solución reductora de NaBH_4 0,2% (m/v) en NaOH 0,025% (m/v). La presencia de condiciones físicas y químicas fuera del equilibrio que caracteriza a FI, determina la

existencia de un perfil de concentraciones de muestra y reactivos a lo largo del sistema. Para las condiciones experimentales mencionadas, esto condujo a la presencia de condiciones menos ácidas correspondientes al centro de la zona de muestra no acidificada cuando se emplean las soluciones de transporte con concentración de ácido más diluido. Así es como, excepto con el empleo de una concentración de HCl 1,2 M, todos los picos muestran un desdoblamiento que puede atribuirse a una deficiencia en la generación de arsina como consecuencia de una $[H^+]$ en defecto o bien, a una disminución de la producción de átomos de arsénico en el atomizador. Si bien el incremento en la sensibilidad con la concentración de ácido es evidente, a la vez que previsible, el interés del estudio se focalizó en el uso de soluciones de transporte de ácido diluido para obtener así, datos más valederos sobre la concentración de las especies rédox. Una serie de experiencias adicionales fueron llevadas a cabo con el fin de evaluar los cambios producidos en la forma de la señal cuando la muestra neutra es acidificada hasta las condiciones de acidez de la solución de transporte (HCl 0,1 M). La Figura 3.9 muestra la progresiva desaparición del doble pico. Algunos autores han reportado estudios similares, aunque solamente para solución de transporte y muestra en HCl 0,1 M [248].

La disminución progresiva de la eficiencia en la generación del hidruro con el aumento de los valores de pH debido a la inyección de muestras no acidificadas, sin dudas aparece hasta aquí como la explicación más razonable para la formación de las señales de doble picos. No obstante, la posibilidad de una deficiencia en la concentración de radicales hidrógeno que llegan al atomizador, se plantea como una segunda alternativa al origen del fenómeno, tal como veremos más abajo.

3.5.2.2. Influencia de la concentración de borohidruro de sodio

La fuerte dependencia de la generación de arsina con la concentración de borohidruro puede observarse claramente en la Figura 3.10. La disminución en la sensibilidad fue observada de manera conjunta a la desaparición de las anomalías en la señal para concentraciones de borohidruro decrecientes. Welz y Guo [262] asociaron este comportamiento a la menor cantidad de arsina liberada al atomizador cuando se utilizan bajas concentraciones del reductor. Las experiencias llevadas a cabo en este estudio no encontraron asidero en esta explicación ya que las señales obtenidas para menores concentraciones de As(III) (15 y 30 $\mu\text{g L}^{-1}$) no mostraron cambios significativos en la forma del doble pico. Su desaparición, sí pudo observarse para una concentración de As(III) de 45 $\mu\text{g L}^{-1}$ cuando se utilizaron menores concentraciones de borohidruro. El hecho encontró una interpretación más ajustada a las observaciones

considerando que se producen cambios menos drásticos de pH en el conducto de reacción debido a las características menos básicas de las soluciones diluidas de borohidruro.

En virtud de los resultados, es evidente que el uso de bajas concentraciones del agente reductor no es una estrategia apropiada para la optimización de la señal.

3.5.2.3. Influencia de la velocidad y composición del flujo de gas de transporte

Las variaciones de la velocidad del flujo de nitrógeno también condujeron a modificaciones en la forma y sensibilidad de las señales. Como se muestra en la Figura 3.11, el incremento de la velocidad del gas entre 50 y 125 ml min⁻¹ ocasionó un aumento de la depresión del doble pico. Considerando nuevamente la presencia de condiciones de escasa acidez para la zona media de la muestra, evidentemente las más bajas velocidades de flujo de gas de transporte ejercen una acción reparadora de la forma de la señal como consecuencia de un mayor tiempo de reacción disponible para la generación del hidruro. Cabe aclarar en este punto que el sistema FI-HGAAS utilizado posee dos zonas (o conductos) de reacción entre las que se localiza la entrada de gas nitrógeno: el primer segmento se extiende desde el punto de unión de la solución ácida transportadora de la muestra con la solución de borohidruro hasta la entrada del gas de transporte y el segundo desde la entrada de gas hasta el separador gas-líquido. El uso de menores velocidades de flujo de nitrógeno también dio lugar a un aumento en la sensibilidad de la medida, como consecuencia de la menor dilución de la arsina en la corriente gaseosa y un mayor tiempo de residencia del analito en el atomizador. Sin embargo, como se puede apreciar en la figura, el alargamiento de los tiempos de aparición bajo estas condiciones compromete la frecuencia de análisis.

Hemos mencionado que la producción variable de gas hidrógeno a partir del aumento progresivo de los valores de pH durante el proceso de generación de los hidruros, plantea otra alternativa al origen de las fluctuaciones en la forma de la señal. Sin embargo, experiencias complementarias llevadas a cabo mediante la adición externa de 15 a 45% de hidrógeno en la corriente de gas nitrógeno (15 a 45 ml min⁻¹ de hidrógeno para un flujo total del gas de transporte de 100 ml min⁻¹) no mostraron cambios significativos tanto en la forma como en la sensibilidad de la respuesta, desestimándose así la posibilidad de deficiencias en el proceso de atomización.

3.5.2.4. Influencia de la longitud y forma de los conductos de mezcla y reacción

Continuando con el proceso de optimización de la señal, se evaluaron distintas estrategias basadas en el uso de conductos de mezcla y de reacción de longitud y forma variables. La permanencia del desdoblamiento de la señal con el reemplazo del conducto de mezcla utilizado en las experiencias anteriores por un conducto anudado de la misma longitud (310 mm; volumen de 320 μL) indicó que la bifurcación del pico no obedece a problemas generados en la cinética de mezclado. Una performance diferente presentó el uso de un conducto de mezcla lineal (no anudado) con el doble de longitud (620 mm; volumen de 640 μL), el cual permitió obtener señales con una marcada tendencia a la eliminación del doble pico. Es claro que el fenómeno de dilución, si bien permite recuperar una señal con un solo máximo, empobrece atributos como la sensibilidad y la frecuencia de análisis.

El empleo de conductos de reacción más largos mostró resultados mucho más exitosos. La sustitución del primer tramo del conducto de reacción, es decir, el segmento anterior a la entrada de gas de transporte (115 mm; i.d. 0,89 mm) por un conducto de mayor longitud (480 mm; i.d. 0,89 mm) dio lugar a la obtención de picos con un solo máximo al tiempo que no se observaron cambios con el uso de un reactor anudado de esta misma longitud (ver Figura 3.12). Finalmente, el mayor tiempo de contacto entre los reactantes no solamente permitió obtener diagramas de típica forma gaussiana, sin necesidad de disminuir la velocidad de flujo del gas de transporte, sino que además condujo a un aumento de la sensibilidad como consecuencia de una mayor cantidad de hidruro generado.

3.5.3. Metodología propuesta para la determinación selectiva de As (III) inorgánico en muestras de agua no acidificadas por FI-HGAAS mediante discriminación cinética por pH.

A la luz de las experiencias realizadas y focalizando en el objetivo perseguido de obtener respuestas selectivamente atribuibles a la presencia de As(III), donde las posibilidades de interconversión redox sean rigurosamente minimizadas, la optimización de la señal FI-HGAAS mediante la selección de conductos de reacción más largos presenta características ventajosas en comparación a la utilización de menores velocidades de flujo de nitrógeno o conductos de mezcla más largos, tales como la disminución del tiempo total involucrado en el análisis de cada muestra y la menor dispersión de la muestra en la solución ácida de transporte.

La obtención de figuras de mérito adecuadas constituye generalmente uno de los aspectos más importantes en la optimización de metodologías analíticas. No obstante, el objetivo particularmente propuesto en el presente capítulo basado en condiciones de baja acidez, atípicas para FI-HGAAS, no estuvo focalizado en el alcance de cifras de mérito óptimas sino en el aporte de conocimientos y estrategias que permitan desarrollar una metodología capaz de determinar selectivamente As(III) bajo estas condiciones llevando a un mínimo la posible interconversión de especies inorgánicas y adaptando la metodología a la realidad de las muestras.

El método propuesto se aplicó a la especiación de arsenicales inorgánicos en muestras de agua subterránea. La determinación de As(III) inorgánico en las muestras no acidificadas utilizando una solución de transporte de HCl 0,1 M pudo llevarse a cabo sin más modificaciones a los parámetros utilizados para la determinación de arsénico total que el reemplazo del primer tramo del conducto de reacción por otro de mayor longitud. La concentración de As(V) puede ser calculada a partir de la diferencia entre las concentraciones de As inorgánico total y As(III). En la Tabla 3.2 se presentan las figuras representativas de la performance del método. Los resultados del análisis de especiación en muestras reales se presentan en el Capítulo 5 (Tabla 5.1). Los métodos y reactivos utilizados se detallan en el Capítulo 6.

Elemento	FAAS	GFAAS ^a	HG/CVAAS ^b
As	150	0,2	0,1
Bi	30	0,25	0,03
Hg	300	1,0	0,009
Sb	45	0,15	0,05
Se	100	0,25	0,03
Sn	150	0,2	0,5
Te	30	0,4	0,03

^a Volumen de muestra 50 μl ; ^b Volumen de muestra 500 μl .

Tabla 3.1. Límites de detección instrumentales ($3s$) en $\mu\text{g L}^{-1}$ para FAAS, GFAAS, HGAAS y CVAAS [206].

Performance	
Curva de calibrado	
Ámbito de trabajo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,4 - 45,0
Coefficiente de correlación	0,9986
Pendiente ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)	$6,8 \cdot 10^{-3}$
Límite de detección ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,0
Límite de cuantificación ^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3,4
Precisión (RSD, $n = 3$) (%)	5

^{a,b} Calculado sobre la base de 3 y 10 veces la desviación estándar de 10 medidas de blancos de reactivo independientes, respectivamente.

Tabla 3.2. Figuras de mérito para la determinación selectiva de As(III) por FI-HGAAS en condiciones de baja acidez.

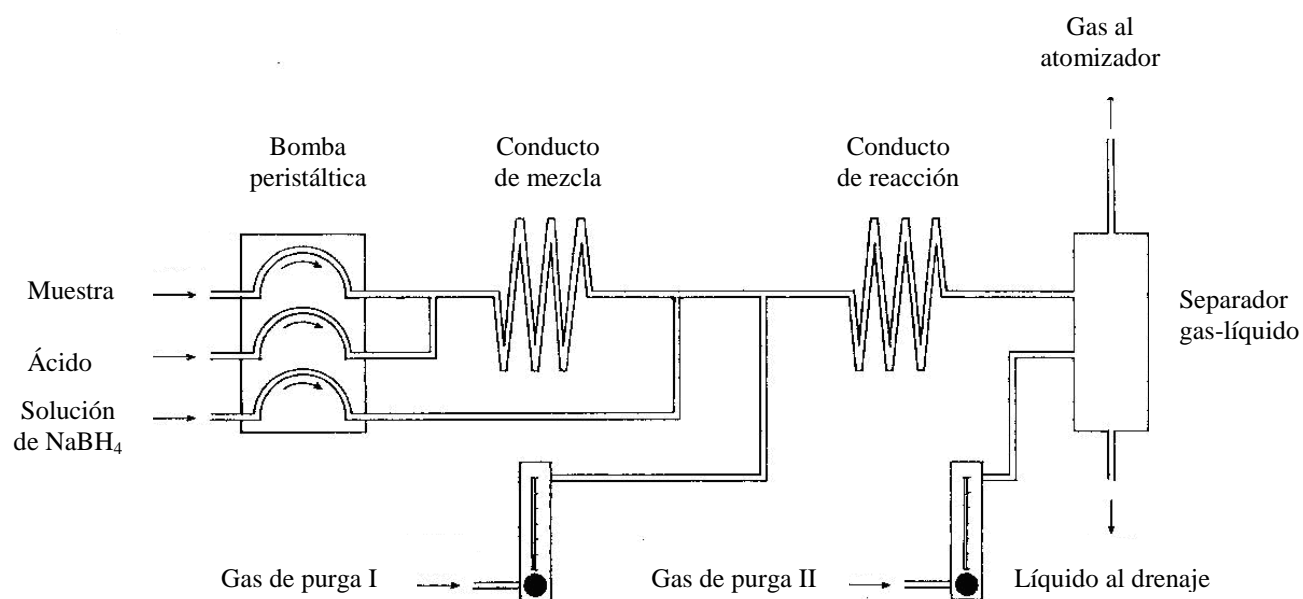
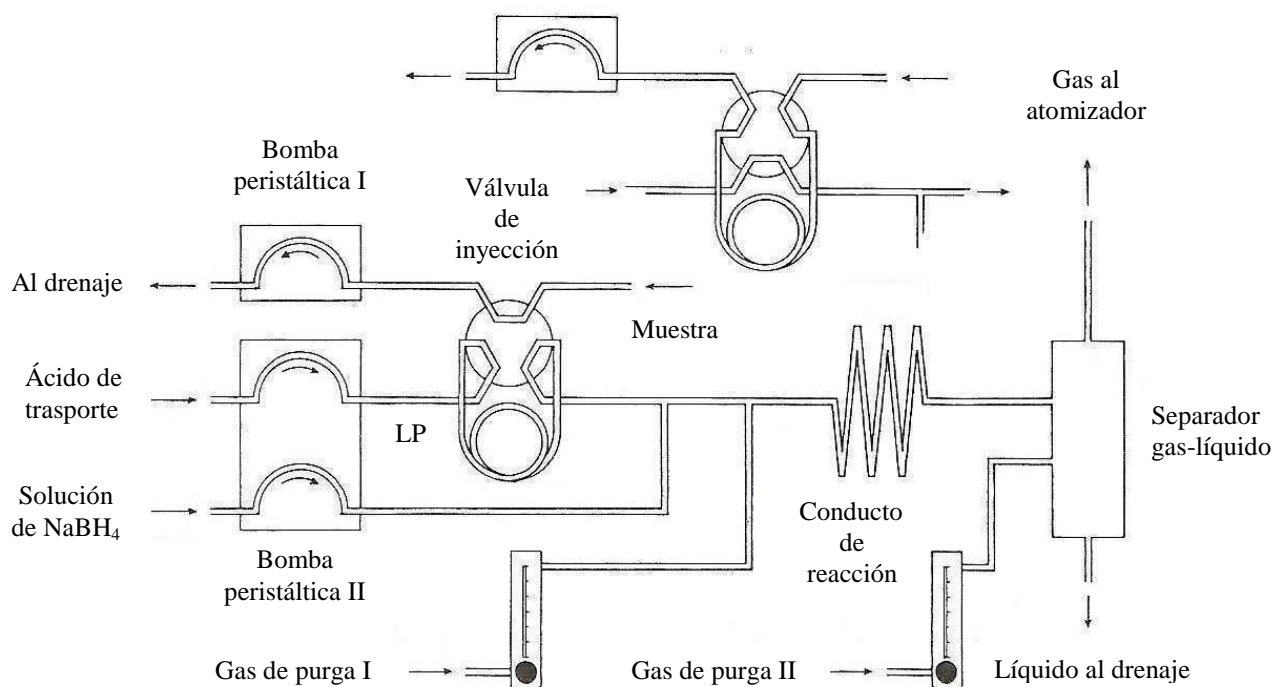


Figura 3.1. Esquema de un sistema de generación de hidruros con flujo continuo.



LP: Loop de muestra

Figura 3.2. Esquema de un sistema de generación de hidruros con inyección en flujo.

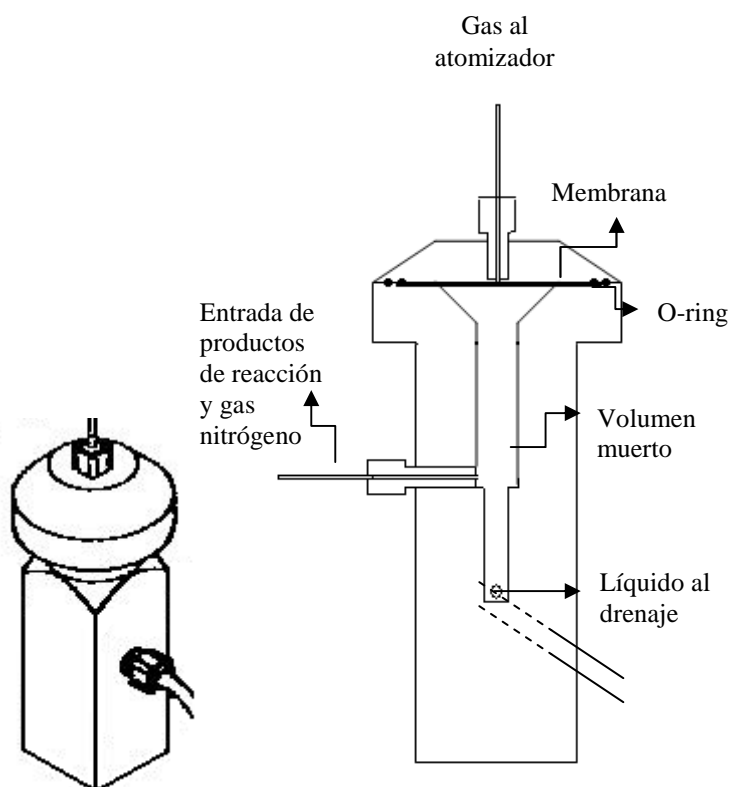


Figura 3.3. Separador gas-líquido de membrana para un sistema de generación de hidruros con inyección en flujo.

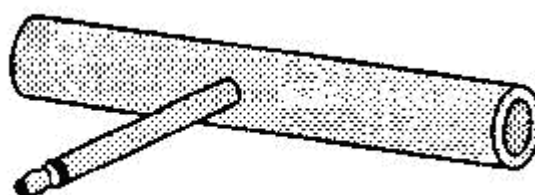


Figura 3.4. Celda de cuarzo adecuada para calentamiento externo en llama de aire acetileno.

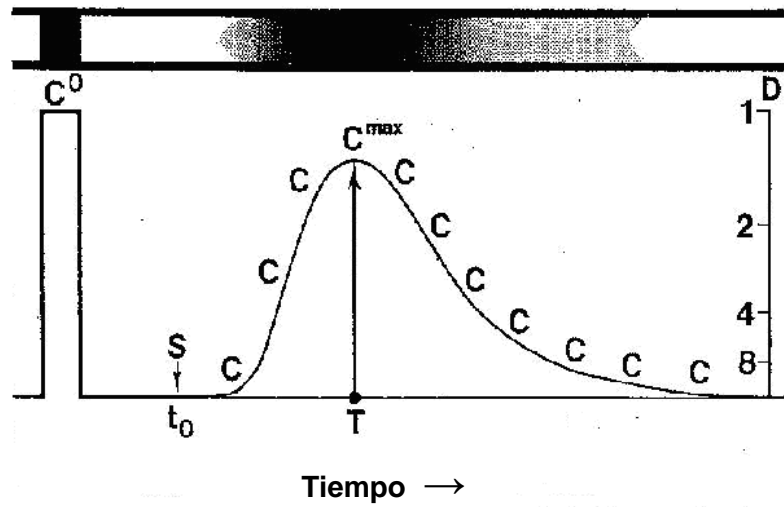
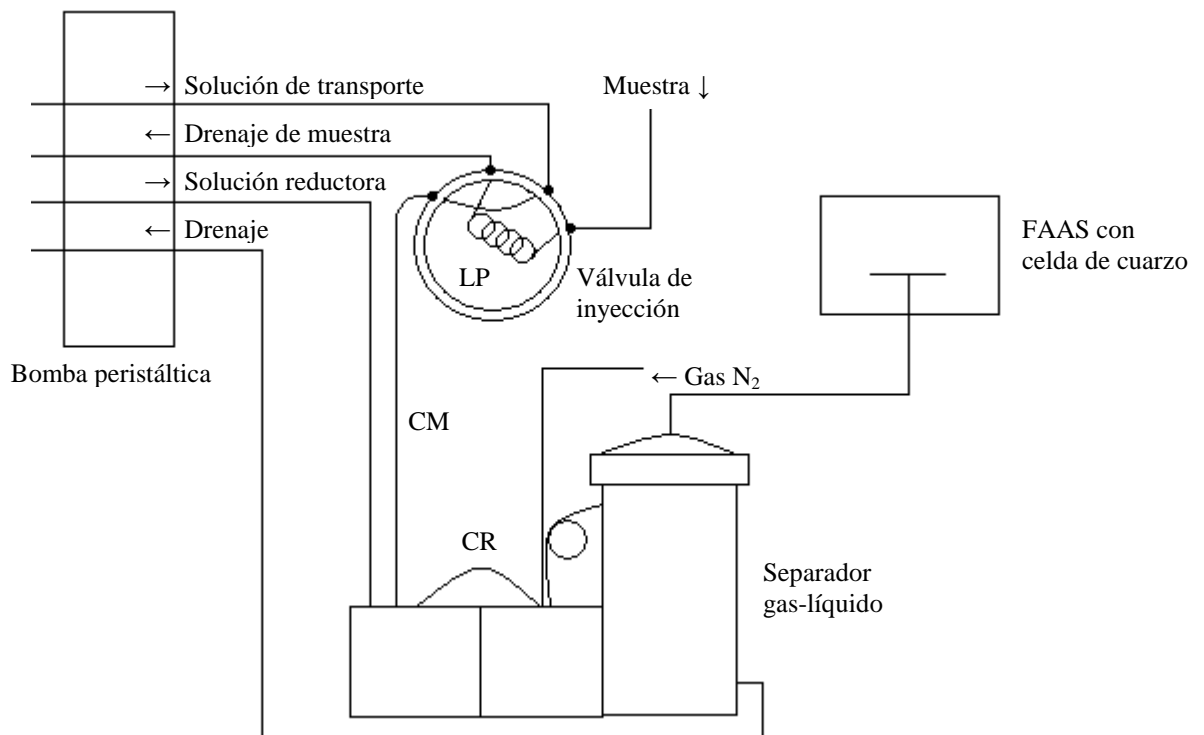


Figura 3.5. Esquema de dispersión de la muestra en FI utilizando un reactor tubular.



FAAS: Espectrómetro de absorción atómica de llama

CM: Conducto de mezcla

CR: Conductos de reacción

Figura 3.6. Descripción del sistema FI-HGAAS utilizado.

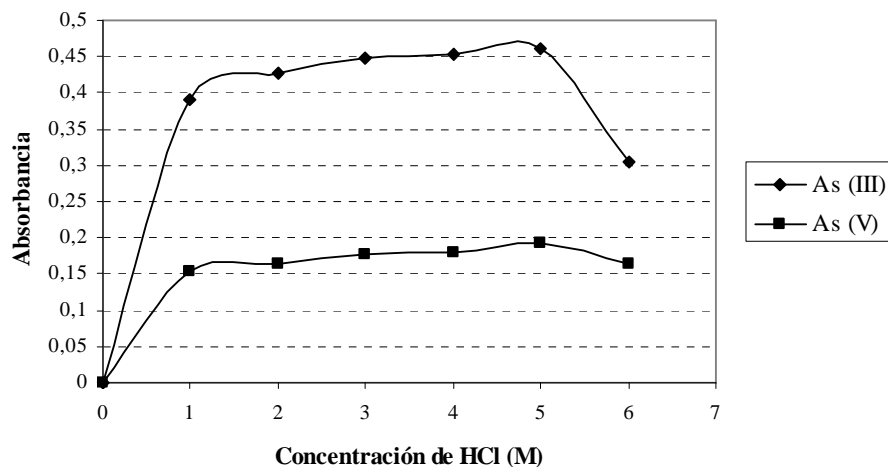


Figura 3.7. Valores de absorbancia de As(III) y As(V) $30 \mu\text{g L}^{-1}$ en función de la concentración de HCl en la solución de transporte.

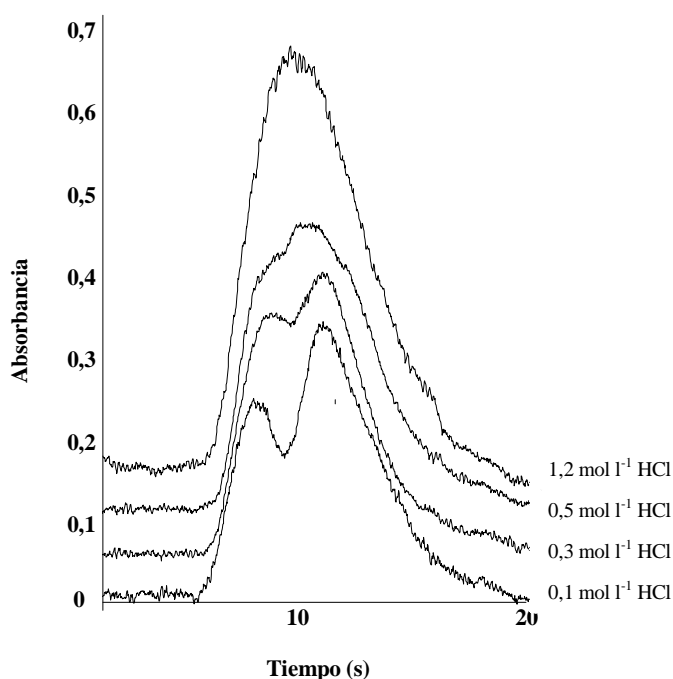


Figura 3.8. Señales de absorbancia de soluciones de As(III) $45 \mu\text{g L}^{-1}$ no acidificadas utilizando soluciones de transporte con concentraciones crecientes de HCl, solución reductora NaBH_4 0,2% (m/v) en NaOH 0,025% (m/v) y velocidad de flujo de gas de transporte 75 ml min^{-1} . Las señales se hallan desplazadas a intervalos regulares para una mejor visualización.

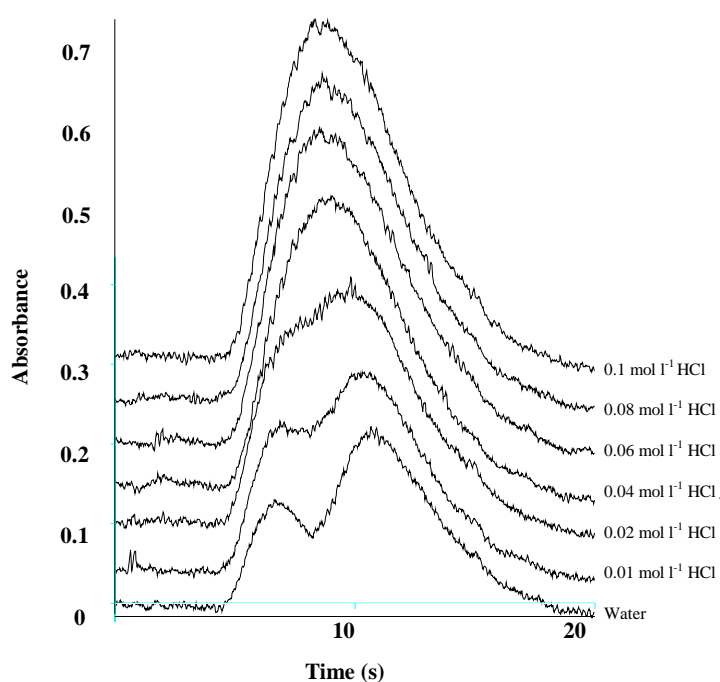


Figura 3.9. Señales de absorbancia para soluciones de As(III) $30 \mu\text{g L}^{-1}$ acidificadas con HCl en concentraciones crecientes utilizando solución de transporte HCl 0,1 M, solución reductora NaBH_4 0,2% (m/v) en NaOH 0,025% (m/v) y velocidad de flujo de gas de transporte 75 ml min^{-1} .

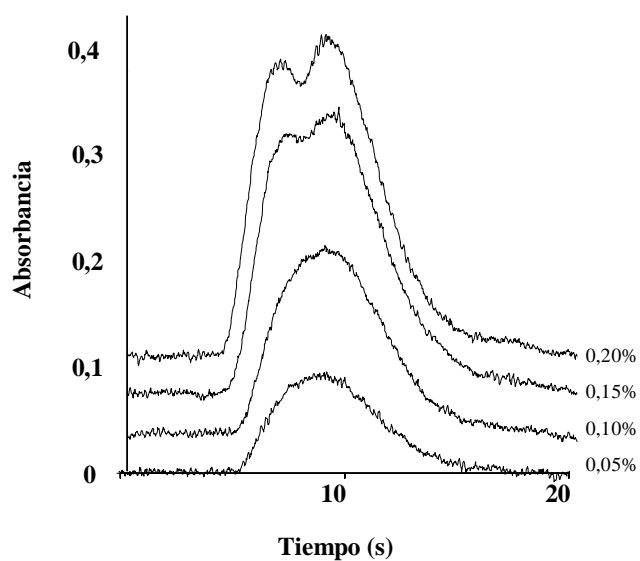


Figura 3.10. Señales de absorbancia para soluciones de As(III) $45 \mu\text{g L}^{-1}$ a diferentes concentraciones de NaBH_4 en la solución reductora utilizando solución de transporte HCl 0,1 M y velocidad de flujo de gas de transporte 75 ml min^{-1} .

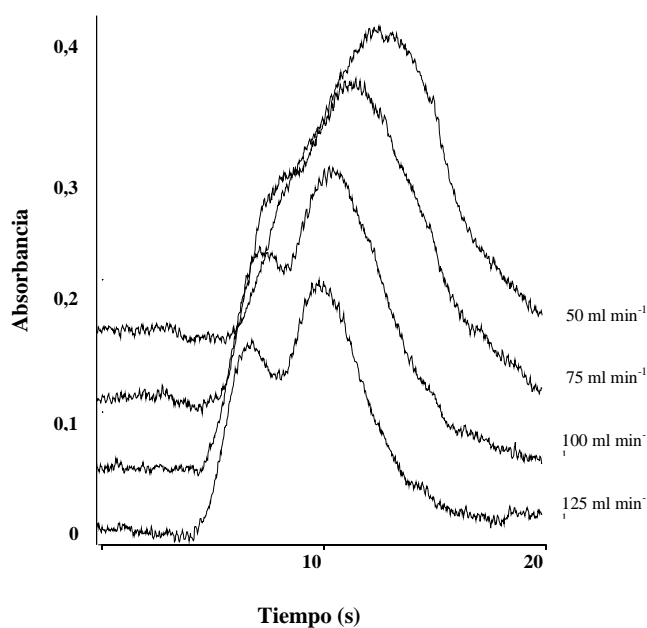


Figura 3.11. Señales de absorbancia para soluciones de As(III) 30 µg L⁻¹ a velocidades de flujo de nitrógeno variable utilizando solución de transporte HCl 0,1 M y solución reductora NaBH₄ 0,2% (m/v) en NaOH 0,025% (m/v).

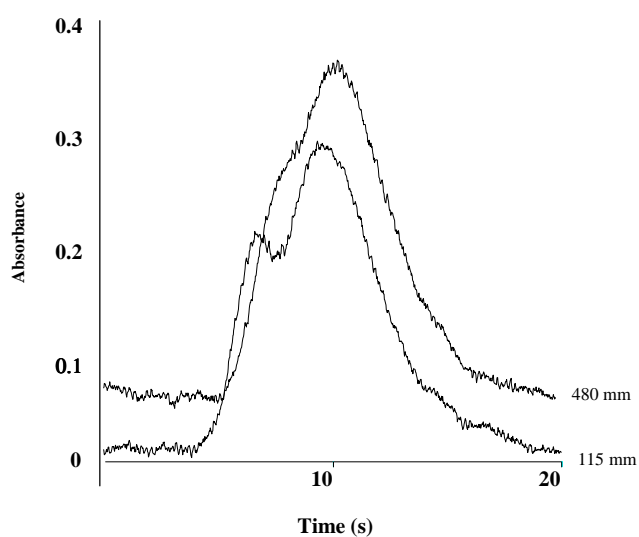


Figura 3.12. Señales de absorbancia para soluciones de As(III) 45 µg L⁻¹ no acidificadas utilizando dos longitudes diferentes del conducto de reacción, solución de transporte HCl 0,1 M, solución reductora NaBH₄ 0,2% (m/v) en NaOH 0,025% (m/v) y velocidad de flujo de gas de transporte 75 ml min⁻¹.

Capítulo 4

Desarrollo y optimización de un sistema SPE-FI-HGAAS para la determinación en línea de especies inorgánicas de arsénico.

Hemos mencionado que la forma en la cual un elemento químico ingresa al organismo generalmente define su toxicidad. Es así como en muchos casos, su determinación específica se vuelve tanto o más importante que la determinación de su contenido total [278]. Dado que las técnicas espectrométricas atómicas no permiten la determinación selectiva de las diferentes formas químicas de un elemento, el análisis de “especiación” involucra dos etapas: separación y detección. En este sentido, una variedad importante de combinaciones entre técnicas analíticas de separación y detección espectrométrica se encuentran descritas en la literatura. En la Figura 4.1 se pueden apreciar las combinaciones más relevantes. Si bien la hibridación entre las técnicas más modernas tales como HPLC e ICPMS, entre otras, ha demostrado ser muy exitosa para el análisis de “especiación”, un gran número de laboratorios no dispone aún de estos equipos costosos y sofisticados. Por su parte, dada la amplia difusión alcanzada por AAS en los laboratorios analíticos de rutina, la posibilidad de su utilización con fines de “especiación” no deja de ser una alternativa sumamente atractiva.

El análisis de “especiación” requiere, en general, sistemas de detección de muy alta sensibilidad ya que involucra la determinación de formas químicas en ámbitos de concentración que van desde $\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1} o menores. Como mencionamos en el capítulo anterior, los atomizadores de llama en AAS frecuentemente presentan inconvenientes para la detección sensible de ciertos elementos por lo que un paso previo de preconcentración resulta insoslayable para la optimización de la sensibilidad y el límite de detección. Por otra parte, la forma continua de medida de los atomizadores de llama facilita su acoplamiento con diferentes técnicas de separación y/o preconcentración en línea.

Es importante notar que la preconcentración puede llevarse a cabo en el mismo proceso de separación del analito de la matriz de muestra, tal como es el caso de la técnica de generación de hidruros que nos ocupa.

Las técnicas separativas en análisis de “especiación” pueden ser clasificadas de acuerdo a los mecanismos involucrados en “no cromatográficas” y “cromatográficas”. Las técnicas de separación FI corresponden al tipo no cromatográfico [279] ya que el objetivo es separar un

analito individual o grupo de analitos de la matriz de muestra, a diferencia de las cromatográficas donde el propósito es la separación de los componentes individuales de la muestra en función de la retención selectiva de cada uno de ellos. En realidad, existe una gran similitud entre los materiales, metodologías y equipamientos utilizados en ambos tipos de técnicas.

4.1 Técnicas de separación/preconcentración acopladas a FI AAS

La introducción de FI en la automatización de procesos analíticos generó un cambio drástico en la práctica tradicional de los laboratorios. Las técnicas de separación intentaron incorporarse a los sistemas FI prácticamente desde sus inicios mientras que, su utilización para propósitos de preconcentración, comenzó varios años más tarde. Ante el advenimiento de los sistemas FIA para la separación y preconcentración en línea [279], se definieron nuevos parámetros para evaluar la eficiencia de los diferentes procesos involucrados. Uno de ellos es el factor de enriquecimiento “Enrichment Factor” (EF), definido teóricamente como la relación entre la concentración de analito en la solución eluida y en la muestra original. La relación entre las pendientes de la zona lineal de las curvas de calibrado antes y después de la preconcentración, evaluadas bajo las mismas condiciones analíticas, suele usarse como una aproximación al valor de EF. Sin embargo, los altos valores de este parámetro no siempre son indicativos de altas eficiencias ya que podrían haber sido alcanzados a expensas de tiempos de preconcentración largos y consumos de muestra elevados. La eficiencia de concentración “Concentration Efficiency” (CE) definida como el producto del factor de enriquecimiento (EF) y la frecuencia de muestreo expresada en número de muestras por minuto, resulta un parámetro más robusto en este sentido. Otro aspecto importante de este parámetro es que permite la comparación entre sistemas diferentes. El grado de pérdida del analito en los distintos procesos puede ser cuantificado a través del factor de transferencia de masa (P), definido como la relación entre la masa de analito en la muestra original y en la muestra concentrada. En sistemas de preconcentración en columnas, como veremos más adelante, P se conoce como eficiencia de retención (%E).

Las ventajas que ofrece la incorporación de métodos FI en los procesos de separación y preconcentración de analitos son muy favorables si se comparan con la práctica discontinua o el uso de CF. Las más importantes pueden resumirse en:

- Incremento en la velocidad de muestreo: de 1 a 2 órdenes de magnitud.
- Incremento de la eficiencia de enriquecimiento para sistemas de preconcentración: 5 a 50

veces.

- Menor consumo de muestras y reactivos: 1 a 2 órdenes de magnitud.
- Alta reproducibilidad y aumento de la precisión.
- Menor riesgo de contaminación por tratarse de sistemas cerrados.
- Facilidad de automatización.
- Posibilidad de aumento de selectividad por discriminación cinética.
- Poco espacio ocupado en el laboratorio.

La reproducción de señales analíticas bajo condiciones de no equilibrio característica de los sistemas FI determina la necesidad de un cuidadoso diseño y optimización de las metodologías de separación/preconcentración a emplear, especialmente cuando las condiciones de equilibrio entre muestras y soluciones estándar difieren unas de otras. Esto podría ser visto como un hecho poco ventajoso.

Las técnicas de separación FI pueden clasificarse según el tipo de interfase a través de la cual tiene lugar la transferencia de masa. Las separaciones encontradas en la literatura pueden agruparse básicamente de la siguiente manera:

- Líquido-líquido: corresponden a este tipo de interfase la diálisis y la extracción por solventes. Ambas pueden operar de manera continua y se diferencian por los procesos físico-químicos que gobiernan los procesos de transferencia de masa entre las fases. En la diálisis la separación se establece como una consecuencia de las diferentes movilidades iónicas que atraviesan una membrana de separación. Esta membrana constituye una barrera necesaria dado que las fases involucradas son miscibles. En la extracción por solventes, de uso más difundido, la separación se produce debido a la diferencia de solubilidad del compuesto entre dos fases, una acuosa y otra orgánica prácticamente inmiscibles. La separación de As(III) y As(V) mediante pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC) para formar un complejo con As(III) extraído luego con cloroformo y seguida de la determinación discontinua por HGAAS, ha sido informada con límites de detección aceptables [68].

Las extracciones líquido-líquido FI acopladas a AAS no poseen mayores dificultades. La adaptación entre el flujo a la salida del sistema de extracción y la velocidad de entrada al nebulizador del espectrómetro, la cual normalmente es de un orden superior, es generalmente el punto crucial en la tarea de optimización. Cuando no se requiere de alta sensibilidad, este inconveniente puede solucionarse mediante la compensación de la diferencia entre las velocidades de flujo por adición de un flujo adicional del mismo solvente que se utiliza como extractante.

Sin embargo, no se observa un desarrollo exitoso de los separadores líquido-líquido acoplados a AAS a juzgar por el número de trabajos publicados. Posiblemente, se deba a que son poco convincentes para la manipulación sencilla de muestras y reactivos.

- Líquido-gas: como es el caso de la generación de hidruros descrita en detalle en el capítulo anterior. Dado que las mayores ventajas se obtienen cuando los propósitos de separación y preconcentración se logran de manera conjunta, la técnica de generación de hidruros constituye una provechosa herramienta de “especiación” en este sentido. Como mencionamos anteriormente, los estados de oxidación individual de los analitos presentan diferencias en la eficiencia o en la velocidad de reducción del hidruro cuando se emplea borohidruro de sodio como agente reductor. En el caso del arsénico y antimonio, las formas con estado de oxidación +3 forman el hidruro mucho más rápido que aquellas de estado de oxidación +5, a la vez que la eficiencia de generación alcanzada depende fuertemente del pH [64,258,280]. El selenio y el telurio solamente forman sus hidruros a partir del estado de oxidación +4 ya que el estado +6 se reduce con muchísima dificultad. La característica distintiva de los sistemas FI que permite realizar mediciones analíticas en condiciones de no equilibrio termodinámico, se vuelve aquí particularmente ventajosa dada la posibilidad de discriminación entre las distintas formas químicas reactivas en función de sus velocidades de reacción.

La técnica de trampa criogénica ha sido asociada a HG desde los inicios de la “especiación” de arsenicales en el ambiente [281]. La separación de las especies de arsénico inorgánicas y orgánicas formadoras de arsenias por reacción con borohidruro de sodio en medio ácido es posible a través de sus diferentes puntos de ebullición. La generación de AsH_3 , volatilizable a $-55\text{ }^\circ\text{C}$ a partir de ambas formas inorgánicas As(III) y As(V), hace que esta técnica solamente pueda ser utilizada a los fines de “especiación” inorgánica cuando la reacción de generación de hidruros, previa a la retención criogénica, se lleve a cabo mediante reducción selectiva por cambio de pH.

- Líquido-sólido: pueden mencionarse básicamente dos tipos de metodologías:
 - i. Precipitación/coprecipitación-disolución
 - ii. Extracción en fase sólida (SPE).

Las técnicas de separación por precipitación han sido muy utilizadas en combinación con AAS. Sin embargo, éstas han declinado marcadamente en los últimos años ante la aparición de otras técnicas más eficientes y con mayor facilidad de automatización. Su operación en sistemas discretos conduce generalmente a tareas laboriosas, elevado consumo de tiempo, riesgo de contaminación y uso de grandes volúmenes de muestra. La aplicación de técnicas FI en la

búsqueda del mejoramiento y a la vez automatización de los procesos de precipitación/coprecipitación-disolución necesita de la resolución de varios inconvenientes, principalmente aquellos originados en la dificultad de manipulación de mezclas heterogéneas en sistemas en línea.

Los primeros trabajos sobre precipitación/disolución en línea para preconcentración de elementos traza con detección FAAS fueron presentados por el grupo de Valcarcel [282,283] en los años '80. El precipitado formado en un reactor es retenido en un filtro y luego disuelto en una solución adecuada. Esta combinación ha resultado poco atractiva para el análisis de trazas debido, principalmente, a un proceso de transferencia de masa entre las fases líquida y sólida poco efectivo, traducido finalmente en una pérdida importante de sensibilidad. Por otra parte, los largos tiempos de reacción que generalmente involucra la formación de precipitados (en sistemas *en batch* oscilan entre 15 minutos y unas pocas horas) determinan que solamente aquellos procesos extremadamente rápidos permitan recuperaciones cuantitativas del analito cuando se utiliza operación en línea. Los sistemas de coprecipitación/disolución en línea usando colectores de precipitado del tipo *knotted reactors* (reactores anudados) asociados a AAS, resultan una alternativa más interesante, tal como se puede encontrar en los trabajos de Fang et al. [284]. Los cambios en la fuerza centrífuga dentro del reactor ocasionados por el cambio en la dirección del flujo favorecen la adsorción del precipitado en las paredes del tubo, aumentando sensiblemente la capacidad de colección.

La separación y preconcentración simultáneas de especies elementales mediante la utilización de columnas o microcolumnas empaquetadas con soportes sólidos específicos previas a su detección por AAS, constituye hoy en día una estrategia analítica muy utilizada. Los mejores beneficios se obtienen cuando las columnas o microcolumnas se insertan en el sistema de medición en línea. A partir de los trabajos de preconcentración en columna FI con detección por FAAS reportados por Olsen et al. [285] en los años '80, comienza un período de marcado desarrollo en el tema evidenciado por el crecimiento exponencial de las publicaciones.

Básicamente, el proceso consiste en el pasaje de un volumen de muestra acondicionada a través de un sólido contenido en una columna. Las especies experimentan un proceso de retención ó elución dependiendo de su afinidad por el soporte. La retención y la elución de un analito son los dos pasos claves del proceso SPE. La retención consiste en el fenómeno de inmovilización que experimenta un analito sobre la superficie del sólido causado por la atracción establecida entre ambos a medida que la solución de muestra pasa a través del lecho. La interacción entre el analito, el sólido de empaquetado de la columna y la matriz de la muestra, determina la eficiencia del proceso. Por su parte, la elución tiene lugar cuando el analito al pasar

por la columna, se encuentra más atraído por un solvente específico o la propia solución de muestra que por el material de empaquetado de la columna.

Si el objetivo de SPE es la retención de interferencias, las columnas utilizadas generalmente poseen mayor tamaño que aquellas empleadas para preconcentración ya que, de esta manera, se obtiene una mayor capacidad de carga (con respecto a las microcolumnas), lo que permite aumentar la cantidad de interferencias retenidas. Además, el tiempo de vida del material de empaquetado se alarga al poder realizar un mayor número de determinaciones sin reemplazo. Obviamente, estas observaciones son válidas toda vez que las columnas de retención de interferencias se encuentren localizadas antes del inyector. En cambio, las columnas para preconcentración del analito y posteriores al inyector, poseen dimensiones pequeñas (volúmenes de lecho del orden de microlitros) y cargan pequeñas masas de sólido. Esto previene la dispersión del pulso de muestra logrando su retención sobre una banda angosta del sólido y la posterior elución en un volumen mínimo de solvente. En nuestra alternativa de diseño, donde una columna previa al inyector elimina las interferencias, la saturación de la micro-columna concentradora se transforma en un problema poco importante ya que la cantidad de analito a preconcentrar es muy pequeña.

En los procesos de extracción por sólidos intervienen interacciones polares, no polares, de intercambio iónico y covalentes. Generalmente, los sólidos no actúan sólo por uno de estos mecanismos pero, en ciertas condiciones de contorno, es posible realizar el proceso de extracción bajo el predominio de uno de ellos. Según el tipo de relleno utilizado se pueden distinguir varias estrategias para la retención de los analitos: a) retención por intercambio iónico con resinas aniónicas o catiónicas no selectivas, tal como las utilizadas en el presente trabajo, b) retención por intercambio iónico con grupos quelantes específicos y c) retención por adsorción.

Los mecanismos de intercambio iónico se basan en los equilibrios de intercambio que se producen entre un analito en solución que transporta una carga, ya sea negativa o positiva y un sólido funcionalizado que posee una carga opuesta. O sea que el material de empaquetado de la columna está formado por un sólido base de elevada masa molecular unido químicamente a grupos funcionales ácidos o básicos. Los grupos más comunes son el ácido sulfónico para la retención de cationes y las aminas cuaternarias para la retención de aniones. Los soportes poliméricos consisten en pequeñas partículas esféricas porosas producto de la copolimerización del estireno y el divinilbenceno. Según el porcentaje de divinilbenceno utilizado (grado de entrecruzamiento) se obtienen resinas con diferentes propiedades mecánicas y morfológicas. A mayor grado de entrecruzamiento se obtienen estructuras más rígidas con grupos funcionales más próximos, lo que aumenta la selectividad. Recientemente, se han desarrollado dos nuevos

tipos de resinas: a) partículas esféricas no porosas de vidrio o poliméricas recubiertas con una resina de intercambio iónico y b) resinas de base silíceas obtenidas mediante la reacción de organosilanos con sílice activada. El material resultante posee un grupo funcional del organosilano enlazado covalentemente al sustrato de sílice a través de una unión silil éter. Los grupos silanoles remanentes pueden ser desactivados al aplicar una reacción de “endcapping” de manera de obtener una superficie cuyas propiedades específicas dependen principalmente del grupo funcional amino o sulfónico unido con mínimas interacciones del sustrato. Estos nuevos desarrollos se caracterizan por mejorar el proceso de transferencia de masa entre el analito y el intercambiador pero su capacidad es considerablemente inferior a las resinas poliméricas tradicionales.

La selectividad de las resinas puede ser incrementada a través de la unión de grupos químicos específicos tal como el material conocido como Chelex-100 (con grupos funcionales inminodiacéticos) el cual fue el primero utilizado en un sistema FI para preconcentración de metales pesados en columna [285]. Otros rellenos han sido utilizados posteriormente tales como: grupos 8-hidroxiquinolina inmovilizado sobre vidrio de poro controlado y sílica gel [286,287], grupos salicílicos [288] y grupos poliditiocarbamatos [289], entre otros.

Por último, en la retención por adsorción, complejos metálicos no cargados se absorben sobre sílicas funcionalizadas con cadenas hidrocarbonadas de longitud variable. Los agentes complejantes más utilizados han sido los ditiocarbamatos y el dietilditiofosfato de sodio. Los complejos formados son eluidos generalmente con solventes orgánicos. Algunos ejemplos de materiales utilizados son sílicas C-18 (18 átomos de carbono), polímeros del tipo poliestireno divinilbenceno (XAD-4) y poliacrilatos (XAD-8). Las resinas esféricas porosas Amberlite XAD-7 recubiertas con óxidos de zirconio fueron utilizadas con éxito para la separación de As(III) y As(V) [290]. El reemplazo de las columnas de C-18 por reactores tubulares anudados [291,292] de Teflón ofrece la ventaja de retener mayor cantidad de analito quedando los complejos retenidos sobre las paredes del tubo. Estos reactores presentan una mayor vida útil que las columnas, las que se compactan fácilmente por las operaciones de preconcentración y elución sucesivas. Estos sistemas de difícil automatización, poseen además la desventaja de producir retenciones débiles con baja eficiencia de preconcentración. Karthikeyan et al. [293] desarrollaron un sistema de extracción por adsorción acoplado a FI-HGAAS para el análisis de especiación de As(III) y As(V) basado en la preconcentración y separación en línea usando una microcolumna empaquetada con alúmina activada. Los complejos arsenicales absorbidos formados mediante reacción con solución de quinolina-8-ol-5 ácido sulfónico, se eluyeron con solución de HCl 10%. La elevada sensibilidad que presenta la metodología sin dudas constituye

su principal ventaja, aunque la marcada disminución en la eficiencia de retención para valores de pH entre 6 y 8 aparece como un inconveniente a considerar cuando se llevan a cabo análisis de especiación en muestras reales.

Los métodos de separación FI basados en extracción en fase sólida han sido acoplados en línea a técnicas de separación gas-líquido o líquido-líquido para la remoción de metales interferentes. Marshall y van Staden [294] usaron una columna de intercambio iónico en línea para la retención de metales en la determinación de selenio y arsénico mediante FI-HGAAS. También Tyson et al. [295] describieron un sistema de separación en columna para remover grandes concentraciones de cobre en la determinación de elementos formadores de hidruros. Una alternativa muy interesante a la utilización de columnas de extracción por sólidos fue descrita por Yalcin y Le [145]. Los autores emplearon SPE con resinas de intercambio aniónico y catiónico fuertes en el sitio de muestreo, como etapa discontinua de separación de especies arsenicales inorgánicas y orgánicas en aguas naturales. Las mediciones de cada una de las formas químicas fueron luego realizadas en el laboratorio. Esta práctica resulta aparentemente ventajosa para garantizar una interconversión de especies químicas despreciable durante el muestreo y transporte, por lo que como veremos más adelante, fue considerada en las experiencias del presente trabajo.

4.2 Técnicas de separación/preconcentración cromatográficas acopladas a AAS

Las técnicas cromatográficas generalmente son preferidas cuando la identificación y cuantificación de un número considerable de especies está en juego. La excelente resolución alcanzada por estas técnicas, las cuales se han impuesto gradualmente a los demás procesos de separación empleados en las décadas del '70 y '80, se contrapone a la desventaja ocasionada por los largos tiempos de análisis.

El acoplamiento de procedimientos de separación cromatográfica con detección espectrométrica da lugar a las denominadas “técnicas hifenadas”. Dado que la situación ideal que contemple todas las características de un resultado de especiación exitoso (es decir, la detección de la totalidad de las especies para un dado analito, la conservación de su integridad durante el análisis, elevada sensibilidad, mínimo tratamiento de la muestra, entre otras) no ha logrado consolidarse plenamente hasta el momento, es necesario priorizar alguna característica respecto de otra en función de los requerimientos del análisis particular. El acoplamiento entre cromatografía gaseosa (GC) y FAAS descrito por primera vez a mediados de los '60 [296] no

despertó una inmediata aceptación debido, principalmente, a la baja sensibilidad en la detección de las especies. A partir de la incorporación del horno de grafito [297,298] y los atomizadores de tubo de cuarzo [299,300] como detectores, el acoplamiento alcanzó un considerable campo de desarrollo y aplicación, evidenciado por los numerosos trabajos publicados posteriormente [301-306]. Actualmente, los tubos de cuarzo calentados con llama interna de oxígeno-hidrógeno son los atomizadores excluyentes empleados en GC-AAS [307]. Indudablemente, el mayor inconveniente que presenta este acoplamiento se origina en el volumen limitado de solución muestra a inyectar que, generalmente, no supera los 100 μ l. De esta manera, la extracción y preconcentración de especies analíticas de interés se vuelven casi inevitables. Si a esto se suman las reacciones de derivatización requeridas para generar compuestos volátiles compatibles con GC, es claro que este tipo de acoplamiento se convierte en una práctica poco ventajosa para el análisis de especiación. Los numerosos pasos involucrados generalmente no se llevan a cabo en línea, requiriéndose un trabajo manual que hace el tiempo de análisis muy prolongado. La reciente incorporación de microondas para la lixiviación de especies organometálicas en forma previa [308] o simultánea [309] al proceso de derivatización/extracción en sólo 5 minutos o menos parece abrir nuevas expectativas a la utilización de cromatografía gaseosa capilar (CGC)-AAS en análisis de especiación [310].

La incorporación de la cromatografía líquida (HPLC) como componente separativo de los sistemas “hifenados” tuvo una rápida y exitosa aceptación para una amplia variedad de matrices. Comparada con las técnicas de GC ofrece claras ventajas tales como la posibilidad de separar especies no volátiles y prescindir de reacciones de derivatización previas. Los diversos mecanismos que actúan en la separación, tales como par iónico, intercambio iónico, exclusión iónica y exclusión por tamaño (permeación por gel) con elución isocrática o por gradiente, permiten detectar una multiplicidad de especies.

Las cromatografías de par aniónico y catiónico en columnas de fase reversa ofrecen buenos resultados en el análisis de especies arsenicales orgánicas e inorgánicas tanto neutras como iónicas [109]. Entre los agentes de apareamiento más empleados se pueden mencionar el tetrabutilamonio (TBA) en sus formas de hidróxido y fosfato para especies aniónicas y compuestos del tipo sulfonato para las especies catiónicas. La resolución obtenida depende de la concentración del agente de apareamiento, la velocidad de flujo, la fuerza iónica y el pH de la fase móvil [311]. La utilización de columnas de intercambio aniónico y catiónico en HPLC constituye una modalidad muy utilizada en el análisis de especiación de arsenicales. Mientras que las columnas de intercambio aniónico se emplean comúnmente para la separación de As(III), As(V), MMA(V) y DMA(V), las columnas de intercambio catiónico se prefieren para la

separación de especies tales como arsenobetaína (AsB), arsenocolina (AsC), óxido de trimetilarsina (TMAO) y ión tetrametilarsonio (Me_4As^+) [107,108]. Las soluciones diluidas de carbonato de amonio [312] y fosfato de amonio [313,314] como así también las soluciones reguladoras de $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ [315] aparecen como las fases móviles más comunes. La cromatografía de exclusión iónica que involucra el uso de resinas de intercambio aniónico o catiónico fuertes para la separación de compuestos débilmente ionizados o neutros, muestra una menor frecuencia de aplicación que las dos técnicas anteriores. Sin embargo, ha mostrado excelentes resultados para la separación de As(III), As(V), MMA(V), DMA(V) y AsB utilizando resinas de metacrilato carboxilado [316]. Por su parte, la cromatografía de permeación por gel acoplada a otras técnicas de separación, se encuentra generalmente asociada a la identificación de especies de arsénico orgánicas [317,318].

La polaridad que poseen las especies inorgánicas de arsénico como así también la mayoría de los organoarsenicales hace que las técnicas de intercambio iónico y fase reversa sean las preferidas para su separación. Gong. et al. publicaron un interesante trabajo de recopilación para distintos tipos de columnas y fases móviles empleadas en el análisis de especiación de arsénico en matrices acuosas diversas [50].

En general, podríamos decir que la combinación HPLC-FAAS no ha sido considerada como una técnica demasiado exitosa. Como ejemplo de aplicación podemos mencionar el sistema en línea para la separación y detección de As(III), As(V), MMA y DMA reportado por Hansen et al. [319] utilizando una columna de intercambio aniónico polimérica y llama de H_2 -Ar. La interfase utilizada entre la columna de HPLC y el nebulizador del espectrómetro consistió en un tubo capilar de PTFE. Sin embargo, este tipo de estrategias se hallan sujetas a una serie de inconvenientes difíciles de resolver [320]. En general, el acoplamiento redundante en señales pobres ya que el ingreso de especies del analito al atomizador es bajo como consecuencia de la baja eficiencia de nebulización y desolvatación de la fase móvil. Tampoco es un problema menor la diferencia entre las velocidad de flujo de la fase móvil a la salida del cromatógrafo y la velocidad de ingreso de solución impuesta por la cámara de niebla. Lo mismo ocurre con la incompatibilidad de solventes: los que son amigables para la elución no lo son para el nebulizador/atomizador y viceversa.

El acoplamiento HPLC-GFAAS ofrece un aumento marcado en la sensibilidad, sin embargo, la modalidad continua del cromatógrafo y discreta del atomizador electrotérmico, obligan a la recolección de alícuotas de eluido para su posterior detección, lo que se vuelve una tarea bastante laboriosa. Algunos autores han logrado sortear estos inconvenientes automatizando el acoplamiento HPLC- GF AAS [321,322] mediante interfases adecuadas.

La generación de hidruros con borohidruro ha sido una forma de interfase muy utilizada entre HPLC y AAS, tal como lo evidencian los numerosos trabajos informados en la literatura [110,112,114,323-329]. Esta atractiva combinación ofrece una mayor sensibilidad para aquellas especies de As que producen arsinas volátiles. Para la detección de especies no formadoras de hidruros, la termo-oxidación [114], la oxidación asistida por microondas [328,330] y la fotólisis por UV con persulfato de potasio [114,331-333] aparecen como las modalidades más empleadas para la destrucción de la materia orgánica previa a la reacción de HG.

Otra alternativa de separación cromatográfica para especies metálicas es la cromatografía líquida de baja presión basada en el uso de materiales muy similares a los descritos en el apartado anterior para técnicas de SPE en sistemas FI. En este caso, se detecta más de una especie en función de su tiempo de retención a medida que eluyen de la columna. Como ejemplo, la especiación de As(V), DMA y MMA mediante resinas de intercambio iónico seguida por la detección discontinua en GFAAS fue reportada por Pacey y Ford [67] con límites de detección en el orden de 1 ng mL^{-1} . El As(III) fue calculado por diferencia entre As total y las demás especies. También Russeva et al. propusieron un método para la determinación de As(III) y As(V) utilizando una columna rellena con un soporte inerte modificado con reactivo de estaño orgánico $[(\text{C}_8\text{H}_{17})_2\text{SnCl}_2]$. El As(V) de la muestra ajustada a pH 2,5-3,5 fue retenido en la columna y luego eluido con HCl 2M mientras que el As(III) eluyó con la muestra. Ambos se midieron por FAAS y GFAAS [334].

La incorporación de HG en sistemas continuos como etapa intermedia entre la separación cromatográfica de especies de inorgánicas y orgánicas de As a baja presión y detección por AAS [145,335,336] dio como resultado metodologías analíticas de buena performance. En estas metodologías la elución selectiva de las especies se realiza mediante la intervención de soluciones reguladoras específicas. Las soluciones de elución informadas más frecuentemente incluyen $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ y NaHCO_3 . Los mejores resultados para la elución isocrática de As(III) y As(V) se obtuvieron utilizando solución reguladora de fosfato. Para fase reversa, el clorhidrato de tetrabutilamonio, el ácido malónico y el metanol resultaron una buena mezcla de trabajo [336].

Al observar ventajas y desventajas de las posibles combinaciones de las técnicas analíticas descritas aquí, se desprende que las metodologías en línea constituyen la manera más versátil de llevar cabo el análisis de especiación a nivel de vestigios. En el presente trabajo, el estudio de las especies arsenicales inorgánicas en aguas naturales fue evaluado utilizando técnicas de separación no cromatográficas y cromatográficas con detección espectrométrica en línea. En primer lugar, la forma trivalente fue selectivamente cuantificada a través de su producto de

reacción AsH_3 mediante una metodología combinada que incluyó la separación no cromatográfica de As(III) por SPE seguida por generación de hidruros y detección por AAS. Como se detalla en el Capítulo 5, los resultados del método SPE-FI-HGAAS desarrollado fueron luego comparados con las respuestas obtenidas para As(III) y As(V) utilizando cromatografía líquida acoplada a detección espectrométrica de masas (HPLC-ICPMS).

4.3 Diseño y optimización de un sistema SPE-FI-HGAAS

En repetidas oportunidades nos hemos referido a las diferentes velocidades de reacción que poseen las especies inorgánicas de As(III) y As(V) para formar hidruros cuando reaccionan con borohidruro de sodio en medio ácido. Las cinéticas de estas reacciones presentan una fuerte dependencia con el pH del medio y la concentración de borohidruro de sodio, por lo que ajustando dichos parámetros es posible distinguir entre ambas especies por mecanismos de discriminación cinética. Sin embargo, lograr que las interferencias de As(V) sobre la señal de As(III) sean verdaderamente insignificantes utilizando menores concentraciones de HCl y/o borohidruro de sodio, generalmente conduce a sistemas con menor eficiencia en la reacción de generación de hidruros a partir de As(III) [337].

En un intento por mantener la sensibilidad en la determinación específica de As(III) empleando concentraciones de reactivos típicas para la generación de hidruros es que proponemos en este trabajo la eliminación previa de la interferencia de As(V) mediante su retención sobre un soporte sólido. Esta forma de trabajo posee la ventaja de llevar a cabo la medición de la especie más tóxica As(III) sin interferencias de la forma pentavalente de una manera rápida y directa, confiriendo una mayor garantía de integridad a la especie detectada. La adopción de esta estrategia de medición trae aparejada la desventaja de no preconcentrar As(III) ya que se encuentra en la forma neutra H_3AsO_3 que no es retenida por la columna. Sin embargo, como veremos más adelante, el límite de detección alcanzado para la metodología desarrollada cubre ampliamente las expectativas de las regulaciones actuales.

4.3.1 SPE en la eliminación de interferencias de As(V)

Las interacciones que gobiernan el proceso de extracción de As(V) en el presente trabajo son del tipo intercambio iónico fuerte. En este tipo de interacción, la presencia o ausencia de

carga en los grupos iónicos del analito y de la resina o intercambiador dependen del pH del medio. El pKa de cada grupo de la resina es un parámetro sumamente importante ya que por ejemplo, trabajando a los valores de pH típicos de las aguas naturales (6,5-8,5), la mitad de los grupos sustituyentes tendrá carga y la otra mitad no [338]. Los grupos catiónicos cargados aumentan a valores de pH menores al pKa y disminuyen a valores de pH superiores a su pKa. Con los grupos aniónicos ocurre exactamente lo contrario. Por lo tanto, la capacidad de retención será función de la carga que posean el analito y el intercambiador al pH que se encuentre la muestra. Como podemos ver en la Figura 1.1, la diferencia entre las constantes de disociación del ácido arsenioso ($pK_a = 9,29$) y el ácido arsénico ($pK_{a1} = 2,25$; $pK_{a2} = 6,76$ y $pK_{a3} = 11,29$) permite separar a las especies de As(III) de las especies de As(V) sobre la base del intercambio iónico. A $pH \approx$ neutro, el ácido arsenioso no se encuentra disociado y está presente como H_3AsO_3 . Por lo tanto, no es retenido a su paso por la columna de intercambio aniónico. Por el contrario, el ácido arsénico, disociado en las formas $H_2AsO_4^-$ y $HAsO_4^{2-}$ quedará retenido en una columna. La disposición más utilizada que consiste en el sólido empaquetado en la columna maximiza la exposición de la muestra para un proceso de extracción eficiente ya que se optimiza la relación masa de analito/masa de resina.

Dado que el intercambio iónico es un mecanismo competitivo, una segunda condición es que la muestra no contenga altas concentraciones de especies iónicas fuertemente competitivas con el analito (contraiones), de manera que el proceso de retención se ve favorecido si se trabaja con muestras de baja salinidad o baja fuerza iónica. En este sentido, las altas concentraciones de aniones pueden ocasionar serias interferencias en la retención de las formas de As(V).

En cuanto a los solventes empleados para eluir eficientemente el analito retenido en un proceso de SPE por intercambio iónico deben poseer alta fuerza iónica, elevada concentración de contraiones altamente selectivos y un pH al cual el sólido y/o el analito no posean carga. En columnas de intercambio aniónico, la elución de las formas inorgánicas de As(V), generalmente se lleva a cabo empleando soluciones concentradas de HCl donde todo el As(V) aparece completamente protonado (ver pK_{a1}).

Propiedades del intercambiador: las resinas de intercambio aniónico fuerte SAX de base sílica, tal como las utilizadas en las experiencias, son estables en una rango de pH aproximado de 2 a 7,5. A valores de pH menores, la unión silil éter se debilita y los grupos funcionales de la superficie comienzan a degradarse. No obstante, cuando los sólidos empaquetados se exponen a distintos solventes por períodos de tiempo cortos pueden usarse en un rango de pH de 1 a 14. A diferencia de las resinas de base polimérica, las resinas de base sílica son más resistentes a pH

extremos y no presentan contracción ni expansión significativa debido a su rigidez. La distribución de tamaño de partícula generalmente se encuentra en el rango de 15 a 100 micrones. Para el aislamiento de compuestos con peso molecular hasta 15000, tal como H_2AsO_4^- y HAsO_4^{2-} los más usados son intercambiadores con una porosidad promedio de 60 Angstroms. Para moléculas de mayor peso molecular se emplean resinas con porosidad cercana a los 4000 Angstroms.

La capacidad y la selectividad son dos características sumamente importantes de las resinas. La capacidad está definida como la masa total de analito que puede ser fuertemente retenido por una determinada masa de resina bajo condiciones óptimas. Para intercambiadores iónicos, la capacidad generalmente se expresa en términos de miliequivalentes por gramo de resina basado en el número de grupos iónicos disponibles en el intercambiador. Generalmente se encuentran en el orden de 0,5 a 1,5 meq/g. Es necesario considerar aquellos componentes indeseables de la muestra que van a ser retenidos junto con el analito de interés en el cálculo de la cantidad de resina requerida para el proceso de extracción. Esto es sumamente importante para aquellos casos donde el analito se encuentre en baja proporción respecto de los componentes interferentes, tal como sucede en el análisis de trazas. En estos casos el aumento de la masa de intercambiador o la dilución de la muestra podrían conducir a encontrar una solución, dependiendo del objetivo buscado. Consideraciones referidas a la saturación de la resina utilizada en este trabajo se encuentran en el Capítulo 6. El uso de cartuchos de resina empaquetada en lugar de microcolumnas permite un importante aumento en la capacidad de carga.

El volumen de lecho aparece como otro concepto a ser considerado. Esta unidad de medida usada para caracterizar la retención y la elución en un proceso de extracción con intercambiadores, se define como la cantidad de solvente requerido para llenar todos los poros internos y espacios intersticiales de un determinado tamaño de lecho. En general, se considera que la retención del analito es suficientemente fuerte cuando no existen evidencias de su elución con el pasaje de 20 volúmenes de lecho de un solvente de lavado o de la propia muestra. En general, un proceso de elución no debería requerir más de 5 volúmenes de lecho.

El grado de retención del analito y el tamaño del lecho determinan el rango de velocidades de flujo de muestra y solvente adecuados para una buena eficiencia del proceso. En general las velocidades de flujo empleadas para 100 mg de lecho de intercambiador no deberían superar los 10 ml min^{-1} , aunque para mecanismos de extracción por intercambio iónico son aconsejables velocidades menores a 5 ml min^{-1} . Obviamente, este parámetro se convierte en el punto crítico para la interfase entre SPE y un sistema FI-HGAAS en línea.

La eficiencia de la separación entre As(III) y As(V) con resinas de intercambio iónico SAX se evaluó en una primera instancia a partir de ensayos en “batch” mediante el uso de muestras sintéticas. La pequeña granulometría y tamaño de poro del intercambiador determinaron la necesidad de aplicar vacío para la elución de muestras y eluyentes. Los sitios activos de intercambio se maximizaron mediante la solvatación de la resina con 1 ml de metanol luego desplazado por un pequeño volumen de agua destilada-deionizada. La recuperación total de As(III) en la solución eluida es claramente indicativo que la forma química $\text{As}(\text{OH})_3$ neutra al pH de trabajo ($\text{pH} \approx \text{neutro}$) no experimenta retención ni tampoco alteración durante el pasaje por la columna. Por su parte, la ausencia de As(V) en la solución eluida cuando se pasan soluciones de este analito a través de la columna, demuestra una excelente eficiencia de retención para las especies aniónicas pentavalentes. El lavado con 40 volúmenes de lecho (20 ml) de solución de muestra no afectó el proceso de retención. El pequeño volumen de solución de HCl 1M empleada para la elución (menor o igual a 1 ml) de las especies retenidas con valores de recuperación del 100% evidencia los altos valores de EF que pueden ser alcanzados en la preconcentración de As(V). Los resultados de las experiencias pueden observarse en la Tabla 4.1. Materiales, reactivos y procedimientos se detallan en el Capítulo 6.

4.3.2 Acoplamiento en línea de SPE a FI-HGAAS

Como hemos mencionado, una de las ventajas de utilizar FI en la automatización de los procesos analíticos consiste en la posibilidad de incorporar al sistema dispositivos apropiados para objetivos específicos de manera relativamente simple. Dos diseños diferentes para la separación de interferentes usando columnas acopladas a técnicas FI han sido presentados hasta el momento. Las dos estrategias se diferencian por la ubicación de la columna, la que puede ser colocada antes (Figura 4.2.a.) o después (Figura 4.2.b.) de la válvula de muestreo. Se podría pensar que el segundo diseño (4.2.b) presentaría algunas ventajas respecto del primero [295] como, por ejemplo: una mayor precisión debido a que en el primer sistema es posible la formación de burbujas de aire durante la succión de la muestra, una menor demanda de muestra ya que en el primer diseño hay un volumen muerto entre la salida de la columna y la entrada a la válvula de muestreo y, por último, una frecuencia de regeneración más baja de la columna debido al menor volumen de muestra procesado. Sin embargo, la ubicación de la columna en la línea de la solución de transporte (solución de HCl) ocasionaría que el proceso de separación entre As(III) y As(V) se lleve a cabo bajo condiciones de pH muy diferentes a la de la muestra original. Este aparente inconveniente también se observa en el diseño propuesto por Yalcin y Le

[336] en su trabajo de separación cromatográfica a baja presión de especies arsenicales. Por otro lado, si bien el trabajo con columna posicionada antes de la válvula de muestreo puede presentar las desventajas mencionadas arriba, también es cierto que el diseño mostrado en 4.2.a. simplifica considerablemente la manipulación de muestras y reactivos.

En el presente trabajo la forma de introducción de la muestra que se presenta en la Figura 4.2.a. resultó la más adecuada para el objetivo propuesto, es decir, lograr la medición de As(III) diferenciado de la especie pentavalente de manera directa y confiable. Una ventaja sumamente importante es que la inserción de la columna a los sistemas en línea, tales como FI-HGAAS, no requiere de interfases específicas. La conexión entre la salida de la columna y la entrada de la válvula de muestreo se realizó mediante un acoplamiento simple utilizando un tubo conector de 10 cm de largo y 0,2 cm de diámetro interno. El reservorio de la columna se cargó con un volumen de 10 ml de muestra aproximadamente. El sistema de propulsión empleado para conducir los fluidos a través del sistema FI-HGAAS fue utilizado para lograr el movimiento de muestras y solventes atravesando las columnas. Al ponerse en funcionamiento la bomba peristáltica, el eluido de la columna que contiene As(III) ingresa al sistema FI-HGAAS en la forma de trabajo convencional. La Figura 4.3 muestra un esquema del sistema diseñado para la separación y determinación de As(III).

Los diferentes parámetros químicos y operacionales del sistema SPE-FI-HGAAS se sometieron a un diseño de experimentos para “*screening*” de variables. La concentración de HCl, concentración de borohidruro de sodio y el flujo de caudales de soluciones y muestra a través de la velocidad de la bomba peristáltica resultaron ser las más significativas. Estas variables se optimizaron mediante la aplicación de un diseño de experimentos del tipo central compuesto [339]. Las Tablas 4.2 y 4.3 muestran los resultados para ambos diseños. La variable de respuesta medida en todos los casos fue el máximo de absorbancia.

4.3.3 Figuras de mérito

Los parámetros del sistema SPE-FI-HGAAS desarrollado y las figuras de mérito más relevantes se muestran en las Tablas 4.4 y 4.5 respectivamente. Los niveles de detección de $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ As(III) y cuantificación de $1,7 \mu\text{g L}^{-1}$ As(III), alcanzados para la metodología y aplicables para ensayos de rutina resultaron ampliamente satisfactorios, especialmente si se tiene en cuenta el nivel de cuantificación práctico ($4 \mu\text{g L}^{-1}$) informado para la determinación rutinaria de arsénico total por técnicas espectrométricas atómicas con generación de hidruros [340].

Los reactivos utilizados para la reacción de generación de arsina son la única contribución a la señal del blanco, ya que la forma directa de medida del As(III) a partir de la solución de muestra eluída de la columna determina que no intervengan reactivos adicionales.

4.3.4 Análisis de especiación en muestras sintéticas

La metodología se aplicó al análisis de muestras sintéticas preparadas en agua destilada-deionizada con una concentración de As(III) correspondiente al 10% del arsénico inorgánico total, tratando así de simular el contenido promedio que presenta el As(V) en muestras reales. La incorporación del intercambiador aniónico a la línea del sistema FI-HGAAS permitió eliminar la interferencia de As(V) y, de esta manera, determinar directa y selectivamente el contenido del arsenical inorgánico más tóxico, el As(III). Como hemos visto en el apartado 4.3.1., la retención que experimenta el As(V) en la resina deja abierta la posibilidad de preconcentración para la especie pentavalente; sin embargo dicha preconcentración no fue considerada de interés para el desarrollo del método propuesto. La calibración con soluciones acuosas de As(III) puede llevarse a cabo removiendo la columna ya que no hay retención de As(III), tal como se explicara precedentemente. En la Tabla 4.6 se presentan las concentraciones de las muestras preparadas y los resultados de los ensayos. El error relativo porcentual obtenido indica la ausencia de interferencias de As(V) en la respuesta de As(III). La eficiencia en la retención del interferente sumada a la elevada recuperación del As(III) adicionado a las muestras satisface con éxito los objetivos inicialmente propuestos.

Soluciones de trabajo	Concentración nominal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración hallada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación porcentual (%)
Columna A			
M ₁ : 15 ml solución As(III)	30	31,2 ± 0,5	104
M ₂ : 1 ml de HCl 1M (contraíón)	-	< LD (0,6) ^a	-
Columna B			
M ₃ : 15 ml solución As(V)	30	< LD (0,6) ^a	-
M ₄ : 20 ml de DDW ^b	-	< LD (0,6) ^a	-
M ₅ : 1 ml de HCl 1M (contraíón)	-	30,6 ± 0,1	102
M ₆ : 1 ml de HCl 1M (contraíón)	-	< LD (0,6) ^a	-
Columna C			
15 ml solución mezcla: As(III)	12		
As(V)	18		
M ₇ : As(III)		12,0 ± 0,5	100

n = 2; intervalo de confianza del 95%.

^a límite de detección calculado como 3 desviaciones estándar correspondientes a la medida de 10 blancos de reactivos utilizando los parámetros de la Tabla 6.1.

^b agua destilada-deionizada

Tabla 4.1. Resultados obtenidos en los ensayos de separación de As(III) y As(V) en sistemas discontinuos.

Factor	Nivel Alto (+)	Nivel Bajo (-)
Concentración de HCl (mol L ⁻¹)	3	1
Concentración de NaBH ₄ (% m/v)	0,3	0,1
Flujo de gas de transporte (N ₂) (ml min ⁻¹)	100	50
Velocidad de bomba peristáltica (V) (rpm)	100	70
- Velocidad de flujo de HCl (ml min ⁻¹)	10,0	6,9
- Velocidad de flujo de NaBH ₄ (ml min ⁻¹)	5,0	3,4
- Velocidad de flujo de muestra (ml min ⁻¹)	4,7	3,1
Relación aire/acetileno de llama (R)	2,5	2

Factor	Efecto	
[HCl]	0,037	Error crítico E _c = 0,014 (t = 2,566)
[NaBH ₄]	0,118	
N ₂	-0,011	
V	0,034	
R	0,005	
F ₁	-0,009	
F ₂	-0,002	
F ₃	0,003	
F ₄	-0,002	
F ₅	-0,007	
F ₆	-0,003	

Tabla 4.2. Diseño factorial Plackett-Burman (5 factores, 6 fantasmas, 2 niveles) para “screening” de variables del sistema SPE-FI-HGAAS.

Factor	0	+1	-1	+α	-α
Concentración de HCl (mol L ⁻¹)	3	4	2	4,7	1,3
Concentración de NaBH ₄ (% m/v)	0,3	0,4	0,2	0,47	0,13
Velocidad de bomba peristáltica (rpm)	100	110	90	117	83
- Velocidad de flujo de HCl (ml min ⁻¹)	10,0	10,9	8,9	11,6	8,2
- Velocidad de flujo de NaBH ₄ (ml min ⁻¹)	5,0	5,6	4,5	5,9	4,1
- Velocidad de flujo de muestra (ml min ⁻¹)	4,7	5,1	4,2	5,3	3,8

Valor $\alpha = 1,68$

Ecuación para el modelo de regresión:

$$\text{Respuesta} = -0,0081 + 0,0110 [\text{HCl}] + 0,206 [\text{NaBH}_4] + 0,00116 V$$

Tabla 4.3. Diseño factorial Central Compuesto Circunscrito (CCC) para la optimización de variables significativas del sistema SPE-FI-HGAAS.

Parámetro	
Concentración de HCl (mol L ⁻¹)	3,5
Concentración de NaBH ₄ (% m/v)	0,35
Velocidad de bomba peristáltica (V) (rpm)	110
- Caudal de solución de HCl (ml min ⁻¹)	10,9
- Caudal de solución de NaBH ₄ (ml min ⁻¹)	5,6
- Caudal de muestra (ml min ⁻¹)	5,1

Tabla 4.4. Parámetros del sistema SPE-FI-HGAAS optimizado para la determinación selectiva de As(III).

Performance	
Límite de detección ^a (µg L ⁻¹)	0,5
Límite de cuantificación ^b (µg L ⁻¹)	1,7
Blanco de reactivos (ng)	< 0,5
Presición (RSD, n = 3) (%)	5

^{a,b} Calculado sobre la base de 3 y 10 veces la desviación estándar de 10 medidas de blancos de reactivo independientes, respectivamente.

Tabla 4.5. Figuras de mérito para la determinación selectiva de As(III).

Concentración de As(III) nominal (µg L⁻¹)	Concentración de As total nominal (µg L⁻¹)	Concentración de As(III) hallada (µg L⁻¹)	Error relativo para As(III) (%)
1	10	< 1,7 ^a	-
5	50	5,0 ± 0,4	0
10	100	10,0 ± 0,7	0
20	200	19,5 ± 1,6	2

n = 3; intervalo de confianza del 95%.

^a límite de cuantificación.

Tabla 4.6. Análisis de especiación de As inorgánico sobre muestras sintéticas.

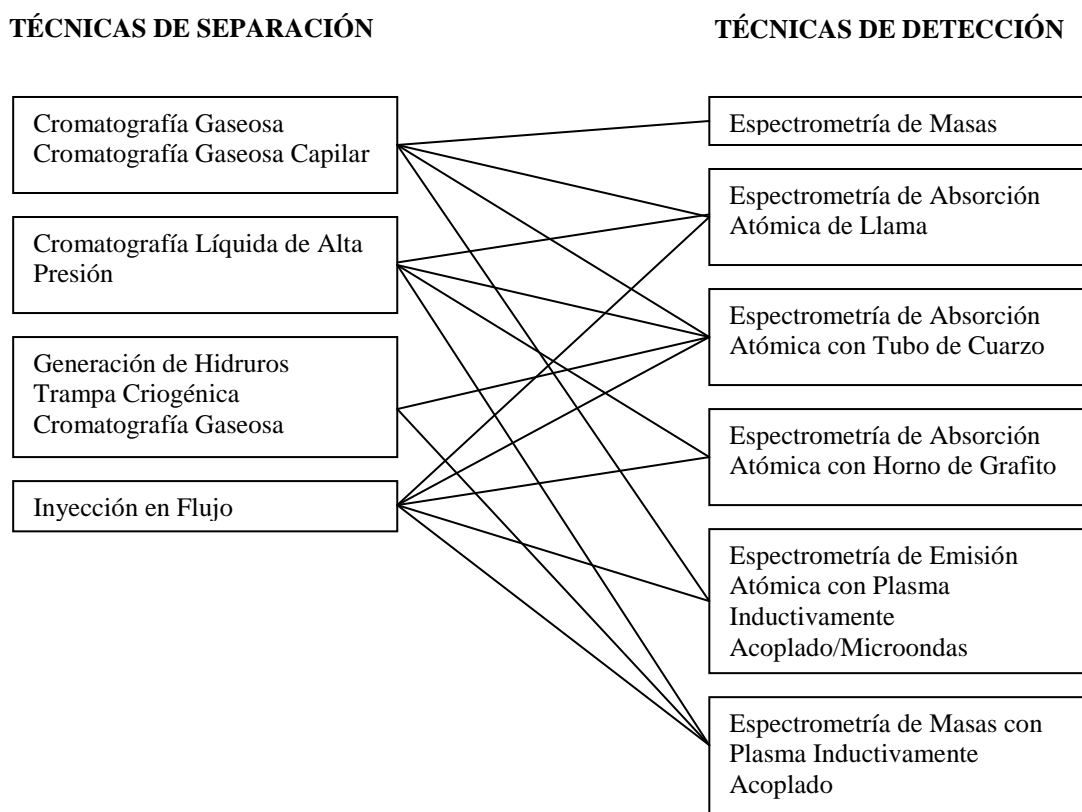


Figura 4.1. Principales técnicas de separación y detección descritas en la literatura para la determinación espectrométrica de especies elementales [206].

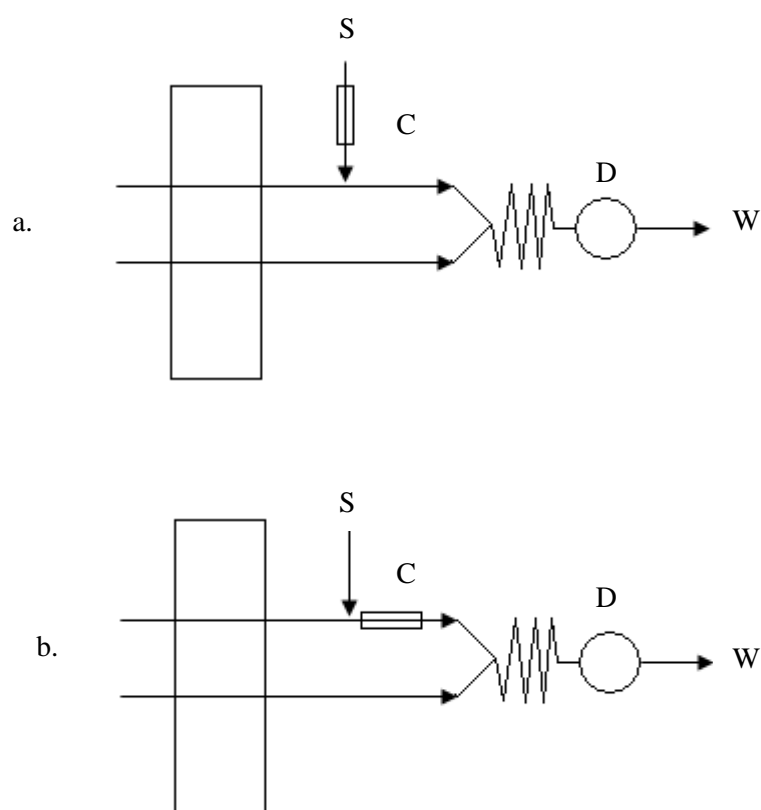


Figura 4.2. Diagramas esquemáticos de manifold FI con columnas en línea para separación de interferencias. a: separación pre-inyección. b: separación post-inyección. S, muestra; C, columna empacada; D, detector; W, drenaje.

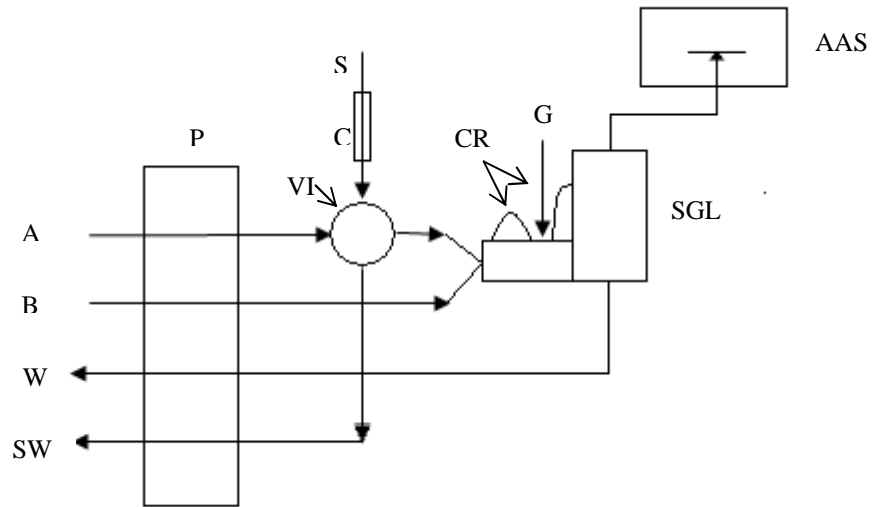


Figura 4.3. Sistema SPE-FI-HGAAS empleado para de determinación selectiva de As(III).

A, solución ácida de transporte; B, solución reductora; W, drenaje de reacción; SW, drenaje de muestra; P, bomba peristáltica; S, muestra; C, columna de intercambio iónico; VI, válvula de inyección; G, gas de transporte; CR, conductos de reacción; SGL, separador gas-líquido; AAS, espectrómetro de absorción atómica con atomizador de celda de cuarzo.

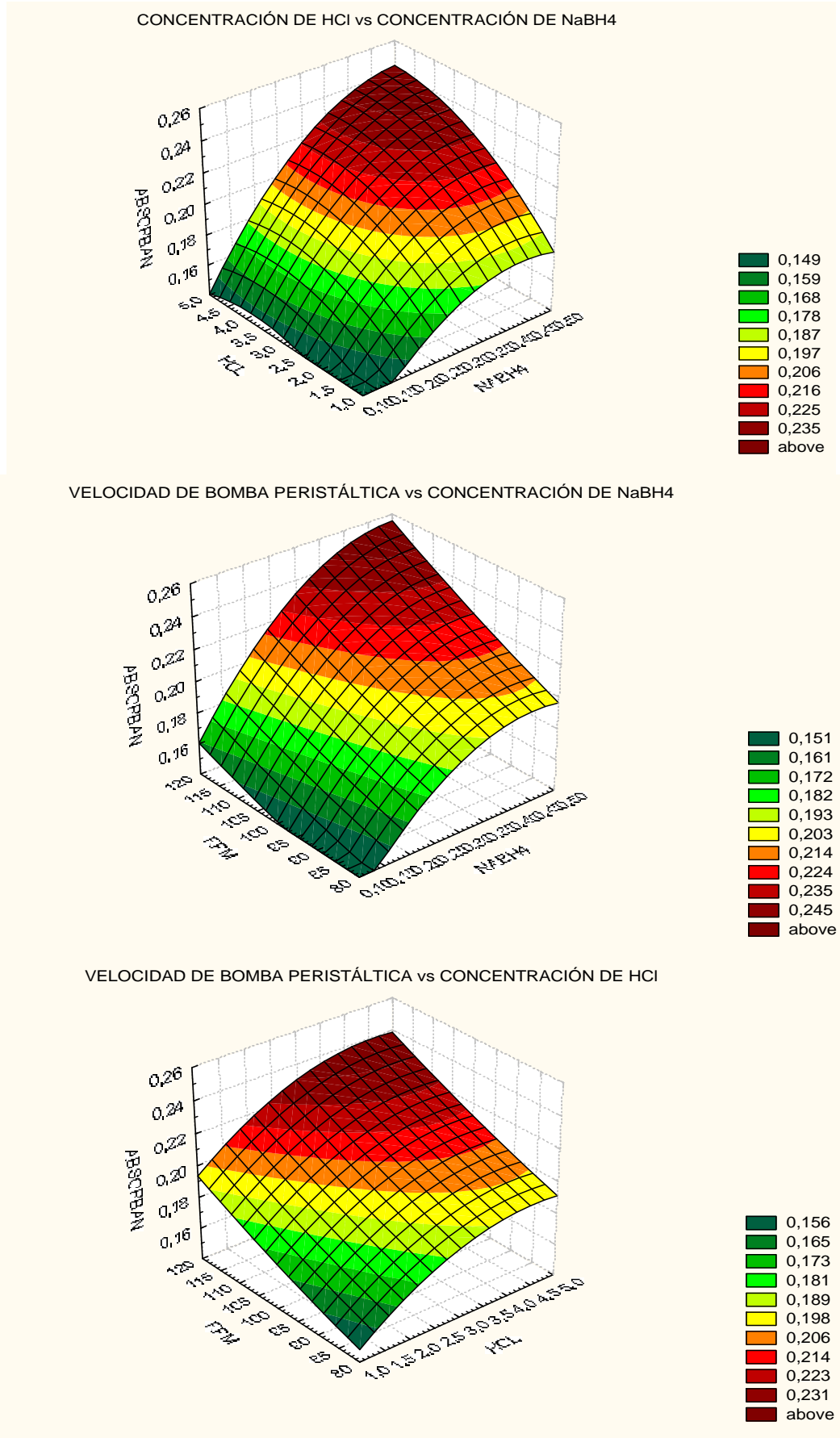


Figura 4.4. Superficies de respuestas obtenidas mediante la aplicación de diseño de experimentos Central Compuesto Circunscrito (CCC) para la optimización de variables.

Capítulo 5

Resultados del análisis de especiación de arsénico inorgánico en muestras de aguas subterráneas. Comparación de resultados por HPLC-ICPMS.

En el Capítulo 1 nos hemos referido a las principales razones que llevan a la necesidad de investigar acerca de la distribución de arsenicales inorgánicos en aguas destinadas al consumo humano: evaluación del riesgo para la salud humana y eficiencia en las técnicas de remoción de este contaminante [52,125]. Con la finalidad de profundizar en el conocimiento de la composición arsenical de los recursos hídricos utilizados para bebida humana en nuestro país, las metodologías desarrolladas en los Capítulos 3 y 4 se aplicaron al análisis de especiación de As(III) y As(V) en muestras de agua subterráneas correspondientes a la región centro de la llanura chaco-pampeana (Localidad de Suncháles - Provincia de Santa Fe).

5.1. Análisis de especiación de arsenicales inorgánicos por FI-HGAAS mediante discriminación cinética en condiciones de baja acidez para la determinación selectiva de As(III).

El método propuesto en 3.5.3. se aplicó a la determinación selectiva de As(III) inorgánico en las muestras de agua subterránea. Las muestras no acidificadas fueron analizadas utilizando una solución de transporte de HCl 0,1 M, a los fines de obtener respuestas selectivamente atribuibles a la presencia de la especie trivalente, minimizando las posibilidades de interconversión redox. La forma de preservación seleccionada para las muestras de campo basada solamente en refrigeración requiere que el tiempo transcurrido entre el muestreo y el análisis de especiación en el laboratorio sea el mínimo posible. El análisis realizado a las 24 horas del muestreo mostró niveles de As(III) inferiores al límite de detección del método ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.1. Los métodos y reactivos utilizados se detallan en el Capítulo 6.

5.2. Análisis de especiación de arsenicales inorgánicos por SPE-FI-HGAAS “off-line” y “on-line”. Interferencias de aniones competidores.

La determinación selectiva de As(III) por SPE-FI-HGAAS en línea como también la determinación de las especies separadas en campo se realizaron a las 24 horas del muestreo. Como ya hemos mencionado, la rápida saturación de la capacidad de intercambio es una de las limitaciones más importantes que presenta el uso de resinas no selectivas. Esta desventaja adquiere mayor significación cuando se lleva a cabo el análisis de muestras reales. La elevada capacidad de intercambio que presenta la resina utilizada para la retención de As(V) (para la forma predominante HAsO_4^{2-} : 500 mg de resina/14,6 mg de As(V)) se ve seriamente afectada por la presencia de aniones competidores, especialmente cloruros y sulfatos, comúnmente encontrados en aguas naturales. La dilución de las muestras aparece en estos casos como una modalidad adecuada para eliminar el efecto de los aniones concomitantes [135], al tiempo que obliga a mejorar la performance de la determinación en términos de cifras de mérito. Como podemos apreciar en la Tabla 5.1, la adopción de esta estrategia resultó satisfactoria en el análisis de especiación por SPE-FI-HGAAS en línea. La dilución de las muestras que presentaron mayores contenidos de cloruros y sulfatos en una relación 3:5 fue suficiente para resolver las interferencias sobre la señal de As(III) (Tabla 5.2). Sin embargo, como era previsible, la especiación con separación en campo presentó inconvenientes para las muestras con mayor contenido de interferentes (Tabla 5.3).

Las concentraciones de As total para las muestras analizadas variaron entre 58,5 y 216 $\mu\text{g L}^{-1}$. La trazabilidad de la metodología FI-HGAAS utilizada para la determinación de As total fue verificada mediante el análisis de un material de referencia, NIST 1643d (Tabla 5.4). El valor global del contaminante para las muestras en estudio corresponde a la suma de especies inorgánicas de As(III) y As(V) en solución y arsénico particulado. Las concentraciones obtenidas para As(III) inferiores a los límites de detección y variables entre 0,7 y 3,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ para arsénico particulado indicaron el gran predominio de la forma pentavalente. En el Capítulo 6 se describen los métodos, reactivos, materiales y equipamiento utilizados para cada una de las determinaciones analíticas. Tanto para los blancos de campo como de equipamiento, la ausencia de contaminación se verificó mediante la determinación de arsénico total.

Las características fisicoquímicas de las muestras evidenciaron la presencia de ambientes predominantemente oxidantes a juzgar por la presencia de oxígeno disuelto (2,8 a 5,6 mg L^{-1}), altos valores de pH (7,8 a 8,5), concentraciones relativamente elevadas de nitratos (3,7 a 11,3 mg L^{-1}) y sulfatos (92 a 974 mg L^{-1}) a la vez de bajas proporciones de parámetros propios

de ambientes reductores tales como amonio ($< 0,05 \text{ mg L}^{-1}$), hierro ($< 0,1 \text{ mg L}^{-1}$) y manganeso ($< 0,01 \text{ mg L}^{-1}$). La Tabla 5.5 muestra los valores hallados para la serie de parámetros fisicoquímicos evaluados.

5.3. Análisis de especiación de arsenicales por HPLC-ICPMS. Interferencia del ión poliatómico $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$.

El acoplamiento HPLC-ICPMS aparece en la actualidad como la herramienta analítica más moderna y poderosa para la determinación de niveles traza de especies metálicas elementales. Una interesante recopilación de trabajos publicados a partir de la década del '80 que muestra su aplicación en el análisis de especiación de muestras ambientales, ha sido informada por Guerin et al. [109]. La alta eficiencia de separación de HPLC sumada a la sensibilidad extremadamente alta, capacidad multielemental y multiisotópica y amplio rango dinámico de detección de ICPMS son las principales ventajas de esta exitosa combinación. La desventaja más importante que presenta al momento es sin dudas su elevado costo, a lo que se suma también el requerimiento de extensos tiempos de análisis cromatográfico.

Con el propósito de comparar los resultados del análisis de especiación llevado a cabo por SPE-FI-HGAAS con una metodología capaz de monitorear de manera sensible y robusta las especies de arsénico presentes en muestras reales, la implementación de una combinación de cromatografía aniónica e ICPMS proporcionó información de gran utilidad. La sensibilidad y los bajos límites de detección a los que se accede por el método HPLC-ICPMS, han permitido cuantificar los valores de As(III) no detectables mediante la aplicación de SPE-FI-HGAAS.

En capítulos anteriores nos hemos referido a la baja o nula presencia de especies orgánicas de arsénico en aguas subterráneas libres de contaminación. No obstante, la ausencia de organoarsenicales fue verificada para las muestras en estudio por HPLC-ICPMS. Se utilizaron como fases móviles soluciones de carbonato de amonio, eluyente de uso muy frecuente en cromatografía de intercambio iónico debido a su capacidad para separar los compuestos de arsénico y a su escasa tendencia a formar depósitos de sal en la interfase del ICPMS [80,107]. El pH de la fase móvil juega un rol fundamental en la resolución cromatográfica. Así podemos ver que a valores de pH cercanos a 7, el As(III) se encuentra como una molécula neutra (ácido arsenioso) [341], la arsenocolina (AsC) y el ácido trimetilarsínico (TMA) como especies catiónicas mientras que la arsenobetaína (AsB) puede comportarse como una especie catiónica o un Zwitterion [342] capaz de co-eluir con el As(III). A valores de pH superiores al pK_a del ácido arsenioso ($> 9,3$), el As(III) pierde su primer protón, interacciona con la fase estacionaria

aniónica y podría co-eluir junto al ácido dimetilarlésico (DMA), el cual tampoco se encuentra completamente protonado. Por lo tanto, generalmente se debe seleccionar un pH de compromiso.

La separación cromatográfica de seis especies arsenicales orgánicas e inorgánicas se llevó a cabo sobre 200 μl de muestra filtrada (tamaño de poro 0,2 μm) utilizando soluciones de carbonato de amonio 1,5mM, 12mM y 20mM como fase móvil a pH 8,7 con un tiempo de separación cromatográfica de 30 minutos. Las especies eluyeron en el siguiente orden: AsB, As(III), DMA, MMA, *p*-ASA y As(V) (Figura 5.1) [79]. Cuando las muestras de agua subterránea fueron analizadas, solamente se observaron picos con tiempos de retención coincidentes con As(III), As(V) e interferencias de cloruros (como veremos más adelante en este mismo capítulo), evidenciándose así la sola presencia de arsenicales inorgánicos. El equipamiento, los materiales y reactivos y las condiciones operativas utilizadas para el HPLC-ICPMS se describen en el Capítulo 6.

La separación cromatográfica de As(III) y As(V) inorgánicos pudo completarse en el término de 8 minutos utilizando una fase estacionaria de carbonato de amonio 20 mM a pH 8,7 en modo de elución isocrática, simplificándose considerablemente la operación de la corrida (Figura 5.2). Las condiciones operativas como también las curvas de calibrado para cada especie en un rango de concentraciones entre 0,1-1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para As(III) y 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para As(V) se presentan en el Capítulo 6.

La presencia de un alto contenido de cloruros puede causar interferencias espectrales isobáricas poliatómicas en la determinación de ^{75}As (único isótopo natural del arsénico) por ICPMS debido a la formación de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ en el plasma, el cual posee la misma relación nominal m/z que el arsénico. Si bien se han informado diferentes estrategias matemáticas [343] y operativas [344,345] para la eliminación de las interferencias ocasionadas por los cloruros, un efecto minimizador puede lograrse mediante la dilución de la muestra con agua pura. Es pertinente aclarar en este punto que los límites de detección extremadamente bajos de la metodología HPLC-ICPMS utilizada en el presente trabajo (As(III) 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$; As(V) 0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$) hacen posible este tipo de práctica simple, manteniendo aún niveles de detección ampliamente aceptables.

Las experiencias llevadas a cabo sobre muestras reales con adición de cloruro en concentraciones variables entre 100 a 1000 mg L^{-1} mostraron una cierta ineficiencia de resolución entre el pico de As(III) y la interferencia de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ bajo las condiciones de trabajo. Como puede apreciarse en la Figura 5.3, la dilución de la muestra en una proporción 1:5 (LD para As(III) 0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$; LD para As(V) 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$) permitió reducir el efecto de la interferencia a niveles insignificantes.

Los resultados de las medidas realizadas sobre una dilución 1:5 de la muestra original se muestran en la Tabla 5.6.

5.4. Comparación de resultados. Costo-sensibilidad.

La aplicación de metodologías que conduzcan a la posibilidad de evaluar con eficacia la presencia de trazas de contaminantes en diferentes matrices es indudablemente mandatoria para los laboratorios analíticos interesados en esta temática. En este sentido, HPLC-ICPMS constituye actualmente la combinación estratégica más competitiva. Concretamente en nuestro trabajo, su implementación fue sumamente útil para poder conocer la distribución y cuantificar las especies de arsénico inorgánicas en las muestras de agua subterránea sometidas a evaluación. Por su parte, la utilización de la metodología SPE-FI-HGAAS en el análisis de especiación, demostró poseer una adecuada performance para la determinación rutinaria de As(III) a juzgar principalmente por la excelente recuperación, la ausencia de interferencias de As(V) y la obtención de límites de detección compatibles con los estándares de arsénico nacionales e internacionales establecidos para agua de bebida. Finalmente podríamos decir que la relación costo/performance de ambas técnicas constituirá un aspecto importante a evaluar en función de las necesidades y posibilidades de cada laboratorio.

Identificación de muestra	Unidades	As total	As(III)	As(III)
		FI-HGAAS	-FI-HGAAS ^c	SPE-FI-HGAAS
Pozo 3	$\mu\text{g L}^{-1}$	$177,8 \pm 0,1$	< LD (1,0)	< LD (0,5) ^a
Pozo 4	$\mu\text{g L}^{-1}$	$216,0 \pm 4,2$	< LD (1,0)	< LD (0,8) ^b
Pozo 7	$\mu\text{g L}^{-1}$	$119,9 \pm 5,0$	< LD (1,0)	< LD (0,8) ^b
Pozo 8	$\mu\text{g L}^{-1}$	$86,1 \pm 1,9$	< LD (1,0)	< LD (0,5) ^a
Pozo 9	$\mu\text{g L}^{-1}$	$58,5 \pm 1,0$	< LD (1,0)	< LD (0,5) ^a

n = 3; intervalo de confianza del 95%.

^{a,b} Límite de detección para As(III) por SPE-FI-HGAAS en muestra original y muestra diluida 3:5, respectivamente.

Tabla 5.1. Resultados del análisis de especiación de arsenicales inorgánicos en muestras de aguas subterráneas mediante la determinación selectiva de As(III) por FI-HGAAS^a (mediante discriminación cinética en condiciones de baja acidez) y SPE-FI-HGAAS con determinación de As total por FI-HGAAS.

Identificación de muestra	Dilución	Cloruros (mg L ⁻¹)	Sulfatos (mg L ⁻¹)	As(III) ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)
4	original	400 ± 7	700 ± 14	$129,4 \pm 1,7$
4	3:5			< LD (0,8) ^b
4	2:5			< LD (1,2) ^b
4	1:5			< LD (2,5) ^b
7	original	610 ± 10	974 ± 14	$78,4 \pm 2,5$
7	3:5			< LD (0,8) ^b
7	2:5			< LD (1,2) ^b
7	1:5			< LD (2,5) ^b

^a Señal correspondiente a As(V) no retenido en la columna de intercambio iónico.

^b Límites de detección correspondientes a cada dilución (LD en muestra original $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$).

Tabla 5.2. Evaluación de interferencias de cloruros y sulfatos sobre la señal de As(III) en muestras de agua subterránea utilizando SPE-FI-HGAAS.

Identificación de muestra	Unidades	As(III)	As(V)	As particulado
		SPE/ FI-HGAAS	SPE/ /FI-HGAAS	Filtración/ /FI-HGAAS
Pozo 3	$\mu\text{g L}^{-1}$	< LD (0,6)	$177,9 \pm 4,4$	$2,6 \pm 0,3$
Pozo 4	$\mu\text{g L}^{-1}$	$129,4 \pm 1,7$	$90,7 \pm 1,0$	$3,7 \pm 0,5$
Pozo 7	$\mu\text{g L}^{-1}$	$78,4 \pm 2,5$	$34,4 \pm 3,4$	$1,5 \pm 0,1$
Pozo 8	$\mu\text{g L}^{-1}$	< LD (0,6)	$82,3 \pm 4,2$	$0,7 \pm 0,1$
Pozo 9	$\mu\text{g L}^{-1}$	< LD (0,6)	$55,2 \pm 2,0$	$0,9 \pm 0,1$

n = 3; intervalo de confianza del 95%.

LD: límite de detección de As(III) por FI-HGAAS para las condiciones descriptas en Tabla 6.1.

Tabla 5.3. Resultados del análisis de especiación de arsenicales inorgánicos en muestras de aguas subterráneas por SPE-FI-HGAAS con separación de las especies en campo.

Material de referencia	Valor de As total hallado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor de As total certificado ($\mu\text{g L}^{-1}$)
NIST 1643d (Trace elements in water)	$55,6 \pm 1,5$	$56,02 \pm 0,73$

n = 3; intervalo de confianza del 95%.

Tabla 5.4. Resultados obtenidos en la determinación de arsénico total en material de referencia por FI-HGAAS.

Parámetro	Unidades	Mín.	Máx.	Media
pH		7,80	8,53	8,00
O ₂ disuelto	mg L ⁻¹	2,8	5,6	4,16
Conductividad	μS cm ⁻¹	980	3600	1472
Cloruro	mg L ⁻¹	75	610	271
Alcalinidad	mg L ⁻¹	193	320	264
Bicarbonato	mg L ⁻¹	61	183	124
Dureza	mg L ⁻¹	23	416	245
Sulfato	mg L ⁻¹	92	974	440
Nitrato	mg L ⁻¹	3,7	11,3	6,5
Amonio	mg L ⁻¹	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Sodio	mg L ⁻¹	124	787	380
Potasio	mg L ⁻¹	10	46	31
Calcio	mg L ⁻¹	6,1	50	32
Magnesio	mg L ⁻¹	2,6	56	27
Zinc	mg L ⁻¹	< 0,01	< 0,01	< 0,01
Manganeso	mg L ⁻¹	< 1	< 1	< 1
Hierro	mg L ⁻¹	< 0,1	< 0,1	< 0,1

Tabla 5.5. Caracterización fisicoquímica de las muestras de aguas subterráneas estudiadas en el análisis de especiación de arsénico inorgánico.

Identificación de muestra	Unidades	As(III)	As(III)	As(V)	As(V)
		SPE- -FI-HGAAS	HPLC- -ICPMS	SPE- -FI-HGAAS	HPLC- -ICPMS
Pozo 3	$\mu\text{g L}^{-1}$	< LD ^a (0,5)	0,38	177,8	175,1
Pozo 4	$\mu\text{g L}^{-1}$	< LD ^b (0,8)	0,44	216,0	207,1
Pozo 7	$\mu\text{g L}^{-1}$	< LD ^b (0,8)	0,39	119,9	123,2
Pozo 8	$\mu\text{g L}^{-1}$	< LD ^a (0,5)	0,40	86,1	82,1
Pozo 9	$\mu\text{g L}^{-1}$	< LD ^a (0,5)	0,44	58,5	62,0

^{a,b} Límite de detección para muestra original y muestra diluida 3:5, respectivamente.

Tabla 5.6. Comparación de resultados del análisis de especiación de arsenicales inorgánicos en muestras de aguas subterráneas por SPE FI HGAAS y HPLC-ICPMS.

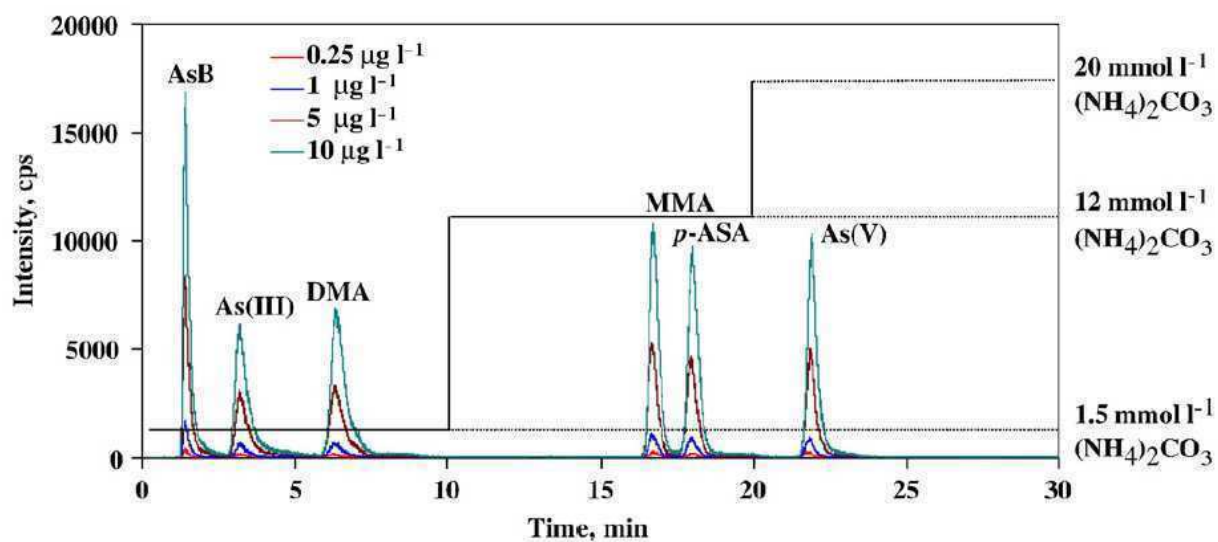


Fig. 5.1. Separación cromatográfica de especies inorgánicas y orgánicas de arsénico por HPLC-ICPMS [79].

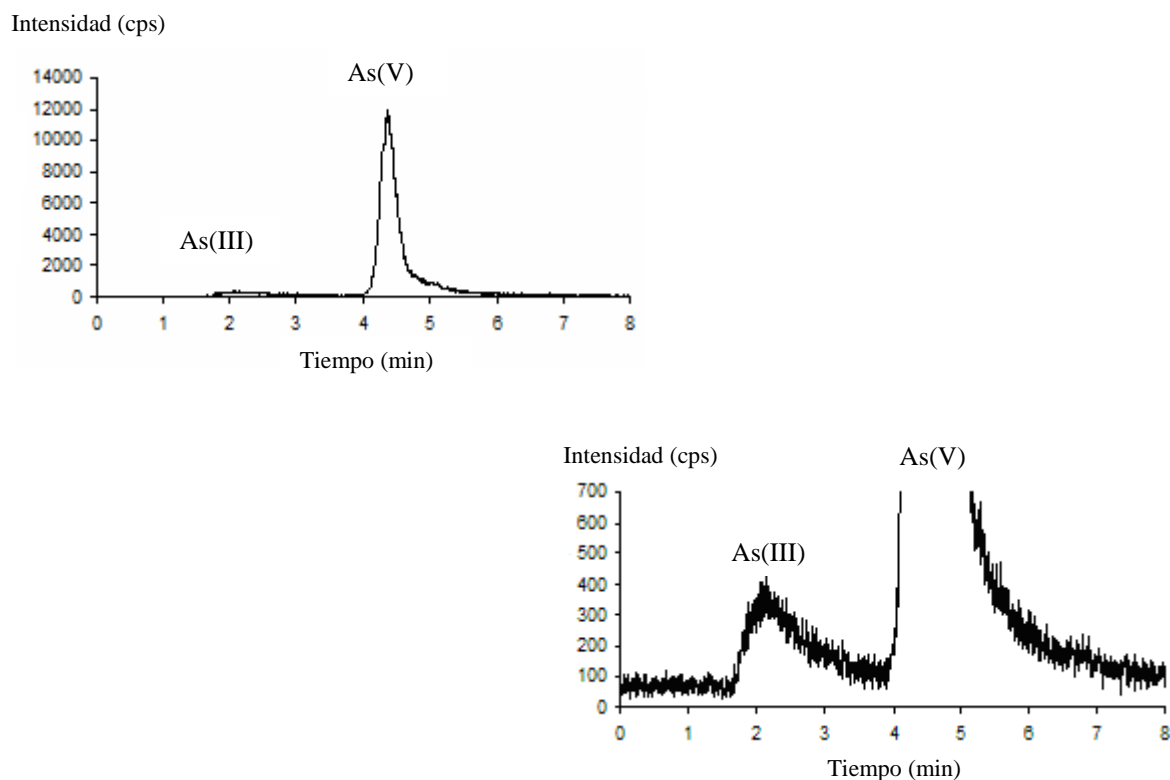


Fig. 5.2. Cromatograma de una solución estándar conteniendo As(III) y As(V) inorgánicos por HPLC-ICPMS.

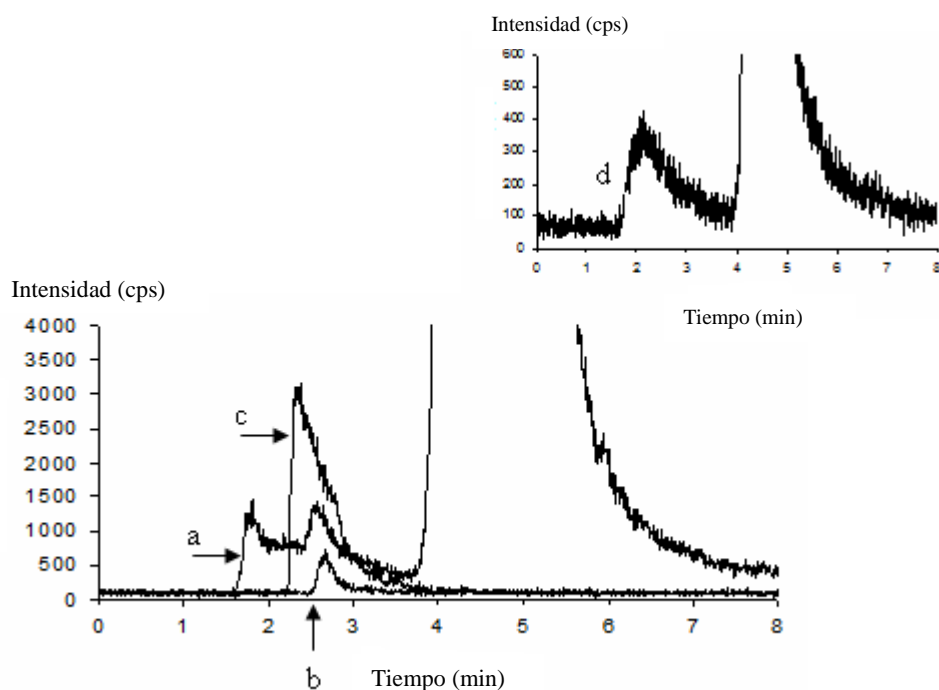


Figura 5.3. Interferencias de $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ en la determinación de ^{75}As por HPLC-ICPMS.

a: muestra N° 3 adicionada con $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de As(III); b: solución de cloruros 100mg L^{-1} ; c: solución de cloruros 1000mg L^{-1} ; d: muestra N° 3 diluida 1:5.

Capítulo 6

Materiales y Métodos

6.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima pureza disponible y como mínimo de calidad analítica. Las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua destilada-deionizada (DDW).

Las soluciones de ácido clorhídrico usadas como soluciones de transporte fueron preparadas por dilución de ácido clorhídrico concentrado para análisis de trazas metálicas (J. T. Baker, Phillipsburg, USA) en DDW.

Las soluciones de borohidruro de sodio (NaBH_4) usadas como agente reductor fueron preparadas por disolución de cantidades apropiadas de NaBH_4 (Merck, Darmstadt, Alemania) en una solución de DDW conteniendo $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de hidróxido de sodio (Merck, Darmstadt, Alemania).

6.1.1. Reactivos usados para la determinación de arsénico total por FI-HGAAS

Las soluciones patrón utilizadas para las determinaciones de As total se obtuvieron por dilución apropiada de una solución stock de 1000 mg L^{-1} de As(V) (ácido arsénico en solución de ácido nítrico 0,5M) (Merck, Darmstadt, Alemania) y prerreducción a As(III) mediante la adición de ácido clorhídrico concentrado para análisis de trazas metálicas (J. T. Baker, USA) y solución prerreductora de yoduro de potasio 5% (m/v) - ácido ascórbico 5% (m/v) preparada por disolución de 5 g de KI (Merck, Darmstadt, Alemania) y 5 g de $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ (Merck, Darmstadt, Alemania) en 100 mL de DDW. El ácido clorhídrico concentrado y la solución prerreductora fueron adicionados al 10% (v/v) según el siguiente procedimiento: a un volumen de 10 mL de agua que contiene al analito se le adicionaron 10 mL de HCl concentrado y 10 mL de solución prerreductora. La mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 45 minutos y luego se llevó a 100 mL con DDW.

Como solución de de transporte fue utilizado ácido clorhídrico 1,2 M y solución de NaBH_4 0,2% (m/v) como agente reductor.

Para la validación del método se empleó el material de referencia NIST Standard Reference Material[®] 1643d “Trace Elements in Water”.

6.1.2. Reactivos usados para los estudios de especiación de arsénico inorgánico por FI-HGAAS mediante discriminación cinética en condiciones de baja acidez.

Las soluciones patrón de As(III) se obtuvieron por dilución apropiada de una solución stock de 1000 mg L⁻¹, preparada a partir de 1,3204 g de trióxido arsenioso As₂O₃ (Riedel-de Haën, Alemania).

Las soluciones de ácido clorhídrico en concentraciones variables de 0,01 a 1,2 M fueron utilizadas como soluciones de transporte y las soluciones de NaBH₄ en concentraciones variables de 0,05 a 0,2% (m/v) como agente reductor.

Para los estudios de atomización de la arsina se utilizó gas hidrógeno con pureza 99,998% (Linde, Argentina).

6.1.3. Reactivos y materiales usados para los estudios de especiación de arsénico inorgánico por SPE-FI-HGAAS “off-line” y “on-line”.

Las soluciones patrón de As(III) se obtuvieron por dilución apropiada de una solución stock de 1000 mg L⁻¹, preparada a partir de trióxido arsenioso (Riedel-de Haën, Alemania).

Las soluciones patrón de As(V) se obtuvieron por dilución apropiada de una solución stock de 1000 mg L⁻¹ de As(V) (ácido arsénico en solución de ácido nítrico 0,5 M) (Merck, Darmstadt, Alemania) en DDW.

Las soluciones de ácido clorhídrico en concentraciones variables de 1,0 a 4,7 M fueron utilizadas como soluciones de transporte. Para la elución de As(V) se utilizó solución de ácido clorhídrico 1 M. Las soluciones de NaBH₄ en concentraciones variables de 0,10 a 0,47% (m/v) fueron utilizadas como agente reductor.

Se utilizó la resina de intercambio aniónico SAX (intercambio aniónico fuerte) empaquetada en columnas Bond Elut de 10 mL de capacidad (Varian, Harbor City, USA) con grupo funcional trimetilaminopropil (forma cloruro), diámetro de partícula 40 μm; tamaño de poro 60 Å; cantidad de sorbente 500 mg; capacidad de intercambio 0,78 meq/gramo. Las resinas se acondicionaron previamente con 1 mL de metanol y se lavaron con DDW previo a las experiencias de separación.

Se utilizaron jeringas plásticas de 20 mL con un tubo plástico de 10 cm de longitud insertado en la punta para la extracción de agua a partir del orificio de salida del muestreador. La jeringa (sin el tubo) fue luego acoplada al tren de separación de especies en campo. La filtración de las muestras en campo se realizó mediante un filtro para jeringa (Microclar, Argentina) con membrana de nylon (tamaño de poro 0,45 μm). Se utilizaron adaptadores plásticos (Variant, Harbor City, USA) para ajustar el acoplamiento entre el filtro y la columna.

6.1.4. Reactivos y materiales usados para los estudios de especiación de arsénico inorgánico por HPLC-ICPMS

Las soluciones fueron preparadas en DDW obtenida con un sistema Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, USA).

Las soluciones patrón de As(III) y As(V) utilizadas se obtuvieron por diluciones apropiadas de soluciones stock de 1000 mg L⁻¹, preparadas a partir de arsenito de sodio (NaAsO₂, Merck, Darmstad, Germany) y arsenato de sodio (Na₂HAsO₄ 7H₂O, Riedel-deHaën, Seelze, Alemania), respectivamente.

Se emplearon como fases móviles soluciones de carbonato de amonio (Merck) 1,5 mM, 12 mM y 20 mM preparadas en DDW y filtradas con un filtro de membrana (tamaño de poro 0,45 μm). El pH del eluyente fue ajustado a un valor de 8,7 mediante el agregado de hidróxido de amonio (Merck) o ácido nítrico (Merck) según correspondiere.

Para el estudio de interferencias por ⁴⁰Ar³⁵Cl se utilizaron soluciones stock de cloruro 1000 mg L⁻¹, (Merck, Darmstadt, Alemania) diluidas a 100 mg L⁻¹.

Se utilizó una columna de intercambio aniónico Dionex IonPac[®] AS14 (250 mm x 4 mm i.d.; tamaño de partícula 9 μm). El material empaquetado es un polímero de divinilbenceno/etilvinilbenceno con enlaces de alquil amonio cuaternario como grupo funcional. Una columna de las mismas características Dionex IonPac[®] AG14 con una longitud de 50 mm fue utilizada como columna de guarda.

6.2. Aparatos

Los estudios de optimización y aplicación de la metodología para la determinación selectiva de As(III) y las determinaciones de arsénico total se realizaron acoplando un sistema de análisis por inyección en flujo Perkin Elmer FIAS 100 MHS (Sistema de hidruros y mercurio)

(Connecticut, USA) a un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 3110 (Connecticut, USA) equipado con celda de cuarzo para atomización (16 cm x 1 cm i.d.) con un tubo de salida lateral en forma de “T” (8,5 cm x 0,5 cm i.d.), la que fuera calentada exteriormente con una llama de aire-acetileno. Se utilizó una lámpara de cátodo hueco de arsénico (Photron, Victoria, Australia) como fuente. El sistema de hidruros y mercurio FIAS 100 cuenta con una bomba peristáltica de 7 canales, una válvula inyectora de cuatro vías y un separador gas líquido con membrana de separación (Amplitaq[®]DNA Polymerase con GeneAmp[®], Perkin Elmer, Connecticut, USA). El sistema completo fue administrado a través de una PC provista de un software de operación e información AA Winlab Perkin Elmer. La especiación de arsénico inorgánico por SPE-FI-HGAAS se realizó mediante el uso de columnas empaquetadas con resina de intercambio aniónico y acopladas al sistema de flujo anterior (ver Figura 4.3).

Las experiencias llevadas a cabo para el análisis de especiación de arsénico en muestras de agua subterránea por HPLC-ICPMS se realizaron con un espectrómetro de masas con plasma inductivamente acoplado Perkin Elmer SCIEX Model ELAN[®] DRC II (Thornhill, Canadá) con nebulizador concéntrico (Meinhard Associates, Golden, USA), cámara de aerosol ciclónica (Glass Expansion, Inc., West Melbourne, Australia) y bomba desgasificadora Perkin Elmer Serie 200, acoplado a un sistema de cromatografía líquida provisto de bomba cuaternaria de alta presión Perkin Elmer Serie 200, una válvula inyectora de seis vías Rheodyne, un “loop” de muestra de 200 µL, una columna de separación (Dionex, IonPac[®] AS14) y una columna de guarda (Dionex, IonPac[®] AG14). La conexión entre la columna de separación y el nebulizador del espectrómetro de masas se realizó mediante un tubo de PEEK.

El muestreador utilizado para la extracción de muestras de agua subterránea fue totalmente construido de Delrin[®] y polipropileno. El diseño provisto de una válvula de cierre en la parte superior y un orificio de extracción y/o expulsión en la parte inferior permitió disponer de un volumen de 500 mL de muestra sin que se establezca contacto alguno con el medio circundante.

Las experiencias de separación de As(III) y As(V) en “batch” necesitaron de un sistema de alto vacío provisto de una bomba (Pascal, Argentina) y un contenedor hermético apropiado para la operación a baja presión, de diseño y construcción “home made”.

6.3. Procedimientos

6.3.1. Determinación de As total en agua subterránea por FI-HGAAS

El sistema FI utilizado consiste de tuberías para la circulación de los fluidos ensambladas mediante acoples de volumen muerto, una bomba peristáltica de 7 canales para propulsión y una válvula inyectora de cuatro vías. La circulación de fluidos se realizó a través de tuberías de PTFE y de Tygon[®] para los tramos afectados a la bomba peristáltica. El sistema generador de hidruros consistió de un dispositivo de unión entre la corriente de HCl transportadora de la muestra y la solución reductora de NaBH₄, una zona de reacción formada por dos conductos de PTFE (primer conducto: longitud 115 mm; i.d. 0,89 mm; segundo conducto: longitud 310 mm; i.d. 0,89 mm), una válvula de entrada de gas nitrógeno ubicada entre ambos conductos de reacción, un separador gas líquido de membrana y un conducto de transporte del hidruro hasta la celda de atomización ubicada en el seno de la llama aire-acetileno (ver Figura 6.1 y 6.2). Todos los pasos involucrados en el funcionamiento del sistema FI-HGAAS se realizan automáticamente con control operativo desde la PC.

Durante la etapa de prellenado (PL) la muestra atraviesa el “loop” de muestreo (volumen 500 µL) durante 15 segundos y se dirige al drenaje. Este paso de lavado previo se realizó solamente para la primera medida de cada grupo de réplicas con la finalidad de eliminar remanentes de la muestra anterior. La segunda etapa (L) (o primera etapa para todas las demás réplicas excepto la primera) consiste en el llenado del volumen del “loop” de muestreo durante 10 segundos. PL y L se realizan estando la válvula de inyección en la posición de llenado. Mientras la muestra en PL y L circula hacia el drenaje, la solución de transporte de HCl 1,2 M (flujo volumétrico 11 mL min⁻¹) y la solución reductora de NaBH₄, 0,2% (flujo volumétrico 5,6 mL min⁻¹) circulan desde sus respectivos reservorios hacia la celda de reacción. Inmediatamente finalizado el tiempo de llenado, la válvula gira a la posición de inyección (I) y permanece allí durante 15 segundos. Durante este lapso de tiempo el “loop” de muestreo se ubica en el paso de la corriente transportadora y la muestra es arrastrada hasta el punto de convergencia con la solución reductora, a partir del cual comienza la reacción de generación del hidruro. Finalmente, la válvula de inyección gira hacia la posición de llenado donde, luego de 2 segundos, la bomba peristáltica se detiene con el propósito de evitar el consumo innecesario de muestra y reactivos entre medidas.

El hidruro formado en el conducto de reacción se conduce al separador gas-líquido donde la fase gaseosa es arrastrada a la celda de cuarzo por una corriente de nitrógeno que fluye a

75 mL min⁻¹. La absorción de la arsina atomizada permite registrar una señal (altura de pico) de la que se obtiene la concentración de As total. La Tabla 6.1 muestra los parámetros instrumentales y operacionales del método descrito.

El tratamiento de la muestra consiste en la prerreducción de una alícuota de 10 mL mediante el agregado de 2,5 mL de HCl concentrado y 1 mL de solución de KI 5% (m/v) - C₆H₈O₆ 5% (m/v). Las muestras se dejan reposar durante 45 minutos a temperatura ambiente y se completa el volumen a 25 mL con DDW. Las señales de absorbancia se interpolan en la curva de calibrado para As total en concentraciones variables entre 12,5 y 50 µg L⁻¹ (ver Figura 6.3). Las muestras cuyas concentraciones exceden el ámbito de trabajo se diluyen con una solución de HCl de modo tal que tales diluciones contengan la misma proporción de ácido que la solución original lo que permite su interpolación directa en la curva de trabajo.

6.3.2. Determinación selectiva de As(III) inorgánico en muestras de agua no acidificadas por FI-HGAAS mediante discriminación en condiciones de baja acidez.

La aplicación de la metodología a muestras de agua no acidificadas involucró el mismo sistema FI-HGAAS y manejo operativo descriptos en el apartado anterior para la determinación de arsénico total sin más modificaciones que: i) uso de una solución de transporte de HCl 0,1 M; ii) reemplazo del primer tramo del conducto de reacción por un conducto de mayor longitud (480 mm; volumen 500 µL). La curva de calibración fue construida con soluciones estándar de As(III) para concentraciones comprendidas entre 10 y 30 µg L⁻¹.

6.3.3. Ensayos en “batch” para la evaluación de la resina de intercambio aniónico SAX en la separación de As(III) y As(V).

Las columnas empaquetadas con la resina aniónica se colocaron en el sistema de vacío. Los sitios de intercambio se activaron a un máximo por el pasaje de 1 mL de metanol lavado luego con 2 mL de DDW. El reservorio de una columna (A) se llenó con un volumen de 15 mL de solución patrón de As(III) 30 µg L⁻¹. La velocidad de flujo ajustada mediante el dispositivo de vacío fue 5 mL min⁻¹. La solución eluída se recogió en un matraz de 25 mL (M₁) al igual que en las restantes experiencias realizadas en el ensayo. La verificación del proceso de elución de la especie trivalente se realizó pasando por la misma columna 1 mL de solución de HCl 1M (M₂). Por una segunda columna (B) se pasaron 15 mL de una solución patrón de As(V) 30 µg L⁻¹ (M₃). Luego, la columna se lavó con 20 mL de agua destilada (40 volúmenes de lecho; volumen de

lecho: 0,5 mL) para evaluar la eficiencia de retención del As(V) ante el lavado que ocasionaría el pasaje de mayores volúmenes de muestra (M_4). Finalmente, se realizaron 2 pasajes de solución de HCl 1 M consecutivos (M_5) (M_6) de 1 mL cada uno. En una tercera columna (C) se procedió a la separación de las especies a partir de 15 mL de una solución patrón mezcla de As(III) $12 \mu\text{g L}^{-1}$ y As(V) $18 \mu\text{g L}^{-1}$. Se puede observar que la recuperación de As(III) en la solución eluida (M_7) fue completa. Las determinaciones analíticas para M_1 y M_7 se realizaron sobre una curva de calibrado para As(III), mientras que el resto de las soluciones fueron medidas como se describe en 6.3.1, agregando en cada caso el volumen de ácido adecuado para obtener soluciones de HCl 1,2 M. Los resultados de las experiencias se muestran en la Tabla 4.1.

6.3.4. Análisis de especiación de As(III) y As(V) en muestras sintéticas por SPE-FI-HGAAS

Se prepararon muestras sintéticas en DDW con una concentración de As(III) correspondiente al 10% del arsénico inorgánico total en el rango de concentraciones de 1 a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ para As(III) y 10 a $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para As total (el 90% restante corresponde a As(V)). La calibración para la cuantificación de As(III) se llevó a cabo con soluciones patrón en la forma de trabajo convencional, es decir, sin utilización de columna. Luego se removió el capilar de muestreo y se insertó la columna SAX al inicio de la línea de análisis del sistema FI-HGAAS mediante un tubo de Tygon[®] (10 cm de longitud; 0,3 cm i.d.) como se detalla en la Figura 4.3. El reservorio de la columna se cargó con un volumen de 10 mL de muestra aproximadamente y se dio comienzo a la medición. La Tabla 6.2 muestra los parámetros optimizados que se utilizaron para la determinación selectiva de As(III) por SPE-FI-HGAAS. La determinación de As total se realizó como se describe en 6.3.1 y el valor de As(V) fue calculado como la diferencia entre el contenido de arsénico total y As(III).

6.3.5. Análisis de especiación de As(III), As(V) y As particulado en muestras de agua subterránea por SPE FI-HGAAS “off-line”.

Un volumen de 20 mL de muestra fue extraído con una jeringa plástica a través del muestreador. Luego de remover la punta plástica, la jeringa fue insertada en un dispositivo de filtración-separación tal como se muestra en la Figura 2.4. El acondicionamiento de la resina con metanol y DDW se realizó previo al montaje del tren de trabajo. Luego, el émbolo de la jeringa fue presionado cuidadosamente a manera de lograr un flujo continuo aproximado de 1-2 gotas por minuto. Inmediatamente finalizado el proceso de separación, las botellas con la solución eluida, las columnas y los filtros fueron refrigerados en conservadoras de Telgopor[®].

La determinación de As(III) se realizó por FI-HGAAS por interpolación de la señal en una curva de calibrado construida con soluciones patrón de As(III) en concentraciones de 10 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. El As(V) retenido en las columnas fue eluido con 1 mL de HCl 1M y el arsénico particulado colectado en el filtro de membrana, con 5 ml de HCl 1 M. Para la determinación espectrométrica de As(V) y arsénico particulado se aplicó el procedimiento descrito en 6.3.1.

6.3.6. Análisis de especiación de As(III) y As(V) en muestras de agua subterránea por SPE-FI-HGAAS.

La determinación selectiva de As(III) por SPE-FI-HGAAS en las muestras de agua subterráneas se realizó utilizando el sistema de acoplamiento descrito en 6.3.4. y los parámetros operacionales detallados en la Tabla 6.2. Una columna diferente fue utilizada para cada determinación. Las señales de absorbancia (altura de pico) se interpolaron en una curva de calibrado construida con soluciones patrón de As(III) en el rango de 10 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. Las muestras más salinas se diluyeron 3:5 con agua destilada-deionizada y se midieron nuevamente. El As(V) fue calculado como la diferencia entre As total medido y As(III).

6.3.7. Análisis de especiación de arsenicales en muestras de agua subterránea por HPLC-ICPMS.

Las condiciones operacionales para las experiencias de especiación de arsenicales por HPLC-ICPMS se muestran en la Tabla 6.3. La monitorización de las especies orgánicas e inorgánicas se llevó a cabo sobre un volumen de 200 μL de muestra diluida en una relación 1:5 con DDW mediante un programa de elución en tres etapas de 10 minutos cada una. Las fases móviles utilizadas fueron soluciones de $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 1,5mM, 12mM y 20mM a pH 8,7. El modo de colección de datos fue un monitoreo de ión simple (SIM) para una relación m/z 75. Los tiempos de retención de cada pico fueron comparados con los correspondientes a cada analito.

La separación cromatográfica de As(III) y As(V) inorgánicos se realizó utilizando una fase móvil de carbonato de amonio 20 mM a pH 8,7. Las condiciones operacionales se muestran en la Tabla 6.4. Las curvas de calibrado fueron construidas en un rango de concentraciones entre 0,1-1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para As(III) y 10-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para As(V). Para el análisis de especiación, un volumen de 200 μL de muestra diluida 1:5 fue inyectado en el cromatógrafo. La identificación de ambas especies se realizó comparando los tiempos de retención con las soluciones patrón.

AAS		
Longitud de onda	(nm)	193,7
Ancho de banda espectral	(nm)	0,7
Tiempo de lectura	(s)	20,0
Flujo de aire	(mL min ⁻¹)	5
Flujo de acetileno	(mL min ⁻¹)	2
FI-HG		
Flujo de solución de transporte HCl 1,2 M	(mL min ⁻¹)	11,0
Flujo de solución reductora NaBH ₄ 0,2% (m/v)	(mL min ⁻¹)	5,6
Flujo de gas de transporte N ₂	(mL min ⁻¹)	75
Velocidad de bomba peristáltica	(rpm)	100
Longitud de conducto de reacción tramo I	(mm)	115
Longitud de conducto de reacción tramo II	(mm)	310
Volumen de muestra	(μL)	500
Tiempo de prellenado	(s)	15
Tiempo de llenado	(s)	10
Tiempo de inyección	(s)	15

Tabla 6.1. Parámetros instrumentales y operacionales usados para la determinación de As total por FI-HGAAS.

AAS		
Longitud de onda	(nm)	193,7
Ancho de banda espectral	(nm)	0,7
Tiempo de lectura	(s)	20,0
Flujo de aire	(mL min ⁻¹)	5
Flujo de acetileno	(mL min ⁻¹)	2
SPE-FI-HG		
Flujo de solución de transporte HCl 3,5 M	(mL min ⁻¹)	11,5
Flujo de solución reductora NaBH ₄ 0,35% (m/v)	(mL min ⁻¹)	5,9
Flujo de gas de transporte N ₂	(mL min ⁻¹)	75
Velocidad de bomba peristáltica	(rpm)	110
Longitud de conducto de reacción tramo I	(mm)	115
Longitud de conducto de reacción tramo II	(mm)	310
Volumen de muestra	(μL)	500
Tiempo de prellenado	(s)	35
Tiempo de llenado	(s)	10
Tiempo de inyección	(s)	15

Tabla 6.2. Parámetros instrumentales y operacionales usados para la determinación de As(III) por SPE-FI-HGAAS

HPLC

Separación cromatográfica de AsB, As(III), DMA, MMA, *p*-ASA y As(V)

Flujo de fase móvil (NH ₄) ₂ CO ₃	(mL min ⁻¹)	1,5
1° etapa (NH ₄) ₂ CO ₃ 1,5 mM	(min)	10
2° etapa (NH ₄) ₂ CO ₃ 12 mM	(min)	10
3° etapa (NH ₄) ₂ CO ₃ 20 mM	(min)	10
Modo de elución	Isocrática	
Tiempo de acondicionamiento	(min)	10
Tiempo de lectura	(min)	30
Volumen de muestra	(μL)	200

HPLC

Separación cromatográfica de As(III) y As(V)

Flujo de fase móvil (NH ₄) ₂ CO ₃ 20 mM	(mL min ⁻¹)	1,5
Modo de elución	Isocrática	
Tiempo de acondicionamiento	(min)	10
Tiempo de lectura	(min)	8
Volumen de muestra	(μL)	200

ICPMS

Potencia RF	(W)	1400
Flujo de gas de plasma	(L min ⁻¹)	15
Flujo de gas auxiliar	(L min ⁻¹)	1,08
Flujo de gas de nebulizador	(L min ⁻¹)	1,15
Conos muestreador y <i>skimmer</i>	Pt	
Lente de iones	(V)	7,2
Modo de colección de datos	Monitoreo simple de ⁷⁵ As	
<i>Dwell time</i>	(ms)	250

Tabla 6.3. Parámetros operacionales usados para la determinación de especies arsenicales HPLC-ICPMS.

HPLC		
Flujo de fase móvil (NH ₄) ₂ CO ₃ 20 mM	(mL min ⁻¹)	1,5
Modo de elución	Isocrática	
Tiempo de acondicionamiento	(min)	10
Tiempo de lectura	(min)	8
Volumen de muestra	(μL)	200
ICPMS		
Potencia RF	(W)	1400
Flujo de gas de plasma	(L min ⁻¹)	15
Flujo de gas auxiliar	(L min ⁻¹)	1,08
Flujo de gas de nebulizador	(L min ⁻¹)	1,15
Conos muestreador y <i>skimmer</i>	Pt	
Lente de iones	(V)	7,2
Modo de colección de datos	Monitoreo simple de ⁷⁵ As	
<i>Dwell time</i>	(ms)	250

Tabla 6.4. Parámetros operacionales usados para la determinación de As(III) y As(V) inorgánicos por HPLC-ICPMS.

Performance	
As(III)	
Curva de calibrado	
Ámbito de trabajo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,07 - 1,00
Coeficiente de correlación	0,9986
<hr/>	
Límite de detección ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,02
Límite de cuantificación ^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,07
Precisión (RSD, n = 3) (%)	< 5
<hr/>	
As(V)	
Curva de calibrado	
Ámbito de trabajo ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,33 - 100
Coeficiente de correlación	0,9959
<hr/>	
Límite de detección ^a ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,10
Límite de cuantificación ^b ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,33
Precisión (RSD, n = 3) (%)	< 4
<hr/>	

^{a,b} Calculado sobre la base de 3 y 10 veces la desviación estándar de 10 medidas de blancos de reactivo independientes, respectivamente.

Tabla 6.5. Figuras de mérito para la determinación de As(III) y As(V) inorgánicos por HPLC-ICPMS.

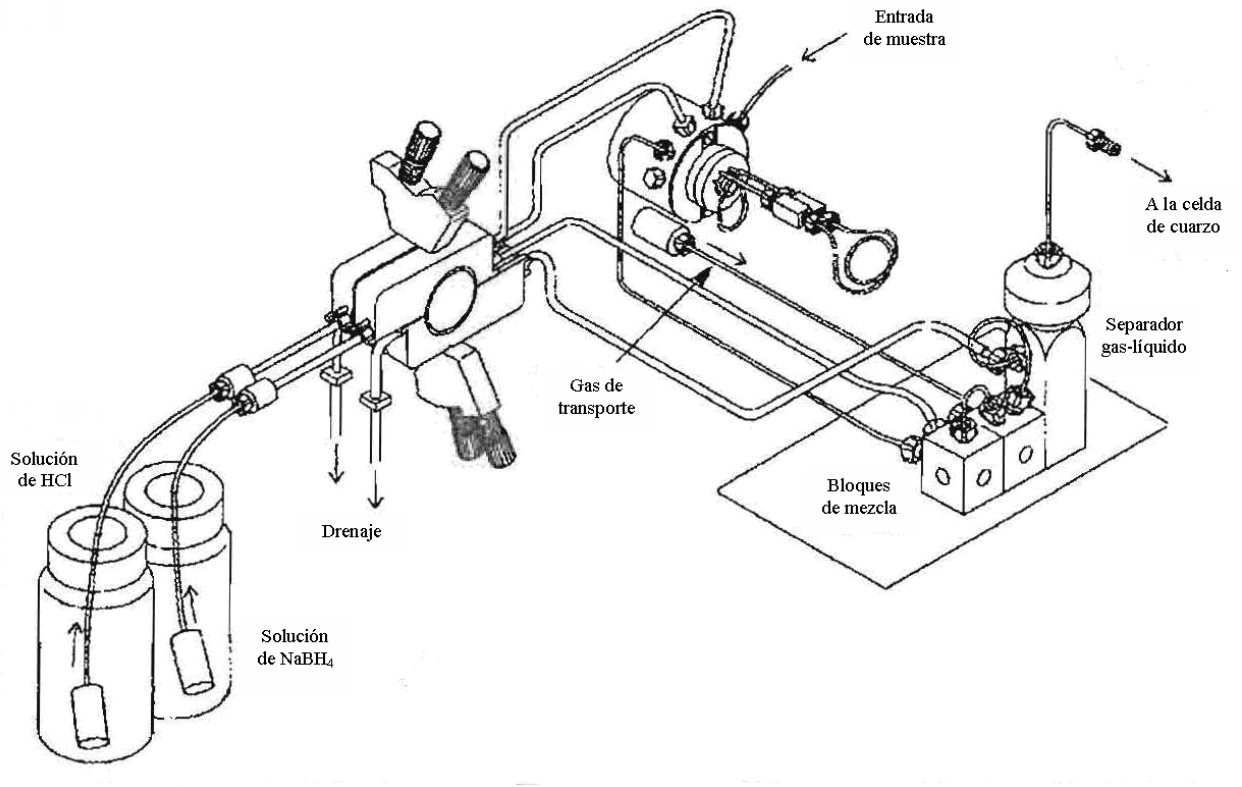


Figura 6.1. Esquema del sistema de inyección en flujo con generación de hidruros utilizado.

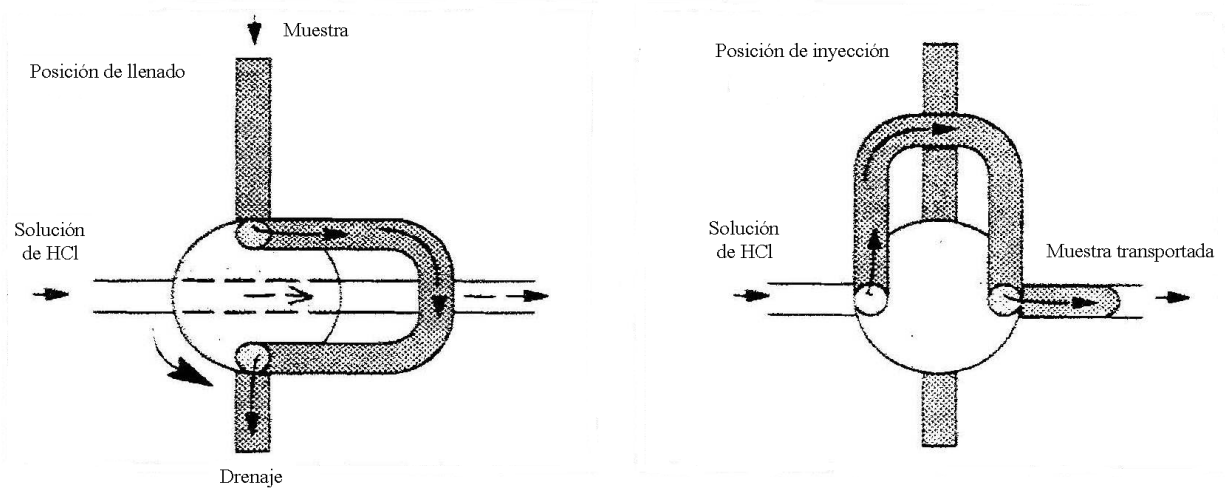


Figura 6.2. Operaciones del sistema de inyección en flujo.

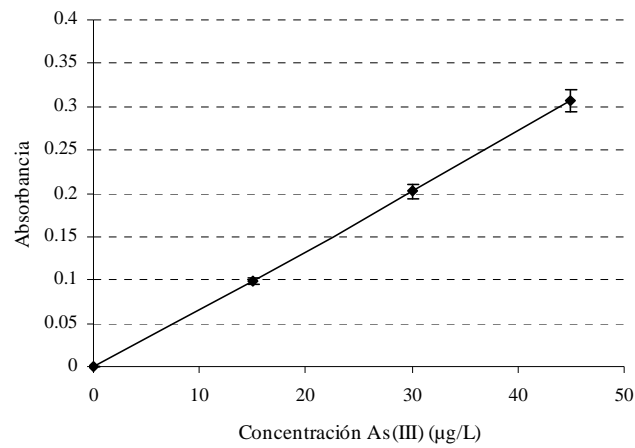


Figura 6.3. Curva de calibrado para la determinación selectiva de As(III) por FI-HGAAS en condiciones de baja acidez.

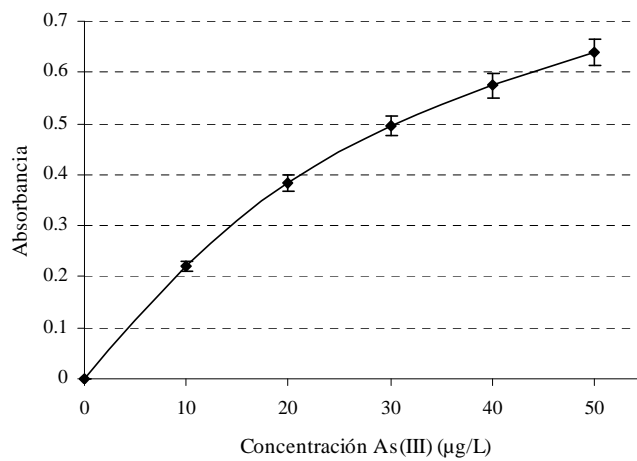


Figura 6.4. Curva de calibrado para la determinación selectiva de As(III) por SPE-FI-HGAAS.

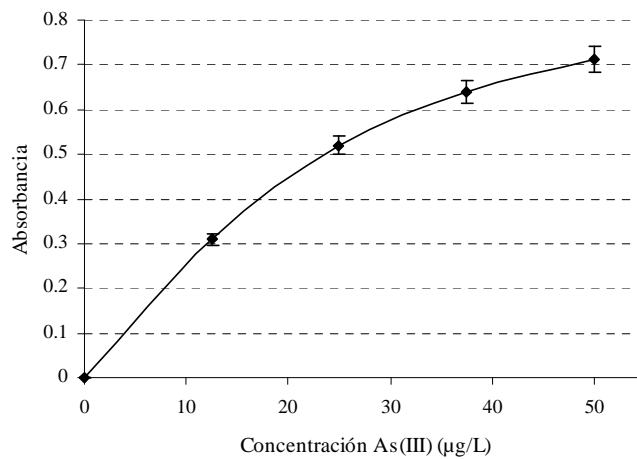


Figura 6.5. Curva de calibrado para la determinación de As total por FI-HGAAS.

Capítulo 7

Conclusiones

El análisis de las diferentes estrategias para la preservación de las especies de arsénico inorgánicas a nivel de vestigios en muestras acuosas abordadas en la literatura y discutidas en el Capítulo 2, permitió evidenciar la carencia de métodos estandarizados como así también las múltiples controversias generadas en torno a la interconversión de las especies redox ante la adición de conservantes. La modalidad de preservación adoptada en este trabajo, consistente en la sola refrigeración a temperatura de 4-5 °C para las muestras destinadas al análisis de especiación a corto plazo (menor a 72 horas) y el congelamiento a -18 °C para las muestras destinadas a experiencias de especiación a mediano plazo (menor a 2 meses), permitió detener los procesos de oxidación manteniendo inalterada la distribución original de las especies. Cabe mencionar que el uso del muestreador especialmente construido para la extracción de agua subterránea con propósitos de especiación metálica, contribuyó a disminuir la posibilidad de oxigenación de las muestras. Los resultados obtenidos a partir de las experiencias de separación inmediata de As(III) y As(V) inorgánicos en campo (mediante el empleo de resinas de intercambio aniónico fuerte SAX) permitieron concluir que dicha práctica implica tareas de muestreo significativamente más laboriosas comparadas con la colección de muestras destinadas a separación/detección en laboratorio. Además, su aplicación no mostró resultados aceptables para muestras con elevado contenido de competidores aniónicos interferentes.

Los estudios detallados en el Capítulo 3 describen la necesidad de una cuidadosa optimización de los parámetros operacionales de sistemas FI-HGAAS para la determinación de As(III) inorgánico en muestras de agua no acidificadas mediante discriminación por pH selectivo, usando soluciones de transporte de ácido diluido. El uso de condiciones de baja acidez fue evaluado a los fines de minimizar la interconversión redox de los arsenicales. La formación de picos dobles observada bajo condiciones no optimizadas se atribuyó a la disminución en la eficiencia de generación de arsina causada por el aumento de pH en la zona central del bolo de muestra, a la vez que la posibilidad de un proceso de atomización ineficiente por defecto de gas hidrógeno en el atomizador, planteada como una segunda alternativa, fue experimentalmente descartada. El uso de un conducto de reacción más largo resultó ser la mejor estrategia para optimizar las señales. Las experiencias fueron de suma utilidad para explicar el comportamiento

de sistemas FI-HGAAS bajo condiciones de baja acidez. El método optimizado fue aplicado al análisis de especiación de arsénico inorgánico en aguas naturales.

La incorporación de SPE por intercambio aniónico a la línea del sistema FI-HGAAS presentada en el Capítulo 4, permitió desarrollar una metodología confiable, sensible, rápida, simple y de bajo costo para la determinación directa y selectiva de la especie arsenical más tóxica, el As(III), en muestras de aguas naturales. El método optimizado, aplicable al análisis de especiación a nivel de vestigios en laboratorios de rutina, mostró una alta eficiencia en la retención de las interferencias de As(V) y valores de recuperación para As(III) del 100% para muestras sin pretratamiento. El nivel de detección alcanzado, menor al $\mu\text{g L}^{-1}$, posiciona a la metodología SPE-FI-HGAAS desarrollada en una excelente situación de competencia ante las exigencias actuales de la normativa nacional e internacional.

Los resultados del análisis de especiación de As(III) y As(V) inorgánicos en muestras de agua subterránea utilizando las metodologías desarrolladas en el trabajo fueron detallados en el Capítulo 5. La presencia de competidores aniónicos interferentes en el proceso de SPE, derivó en la adopción de la dilución de las muestras con mayor contenido de concomitantes. No obstante, la estrategia adoptada permitió mantener bajos niveles de detección. Las muestras analizadas presentaron concentraciones de As(III) inferiores a los límite de detección alcanzados en ambos métodos, por lo que el arsénico inorgánico pentavalente mostró ser la especie ampliamente predominante. Los valores de As(III) no detectables mediante la aplicación de FI-HGAAS en condiciones de baja acidez y SPE-FI-HGAAS fueron cuantificados mediante una combinación de cromatografía aniónica e ICPMS. Además de la mayor sensibilidad y los bajos límites de detección aportados por HPLC-ICPMS, su aplicación permitió verificar la ausencia de arsenicales orgánicos en las muestras de estudio.

Finalmente, los estudios desarrollados en el presente trabajo permitieron establecer metodologías analíticas basadas en sistemas FI-HGAAS con atomizador de tubo de cuarzo con una adecuada performance en términos de exactitud, precisión, recuperación y límites de detección para la determinación rutinaria de arsénico total y sus especies inorgánicas en aguas naturales. La relación costo/performance entre las distintas técnicas constituye, sin dudas, un aspecto importante a evaluar en función de las necesidades y posibilidades de cada laboratorio. La implementación de estrategias de muestreo y metodologías analíticas desarrolladas en el presente trabajo contribuirán a ampliar la información existente sobre la distribución de las especies de arsénico en la regiones del mundo afectadas por esta problemática, para lo cual la elaboración de materiales de referencia certificados para especies metálicas en matrices acuosas constituye un tópico de suma importancia.

Referencias

- [1] WHO Arsenic Compounds, Environmental Health Criteria 224, 2nd ed., World Health Organization, **2001**, Geneva.
- [2] P. Collourn, B. Alloway, I. Thornton, *Sci. Total Environ.*, **1975**, 4, 359.
- [3] C. Davidson, W. Goold, T. Mathison, G. Wiersma, K. Brown, M. Reilly, *Environ. Sci. Technol.*, **1985**, 19, 27.
- [4] Guidelines for Drinking Water Quality, Recommendations, 2nd ed., World Health Organization, **1996**, Geneva.
- [5] G. Concha, B. Nermell, M. Vather, *Toxicol. Sci.*, **1998**, 44, 185.
- [6] P. Smedley, D. Kinniburgh, I. Huq, L. Zhen-Dong, H. Nicolli, en Chappell, W., Albernathy, C., Calderon, R. (Eds), *Arsenic Exposure and Health Effects IV*, Elsevier Science, **2001**, 9.
- [7] B. Mandal, K. Suzuki, *Talanta*, **2004**, 58, 201.
- [8] D. Johnson, *Nature*, **1972**, 240, 44.
- [9] P. Smedley, W. Edmunds, K. Pelig-Ba, en: J. D. Appleton, R. Fuge, G. Mc Hall (Eds.), *Environmental Geochemistry and Health*, **1996**, 113, 153.
- [10] H. Nakahara, M. Yanokura, Y. Murakami, *Anal. Chem.*, **1978**, 45, 25.
- [11] M. Chen, L. Ma, C. Hoogeweg, W. Harris, *Environ. Forensics*, **2001**, 2, 117.
- [12] W. Tseng, H. Chu, S. How, J. Fong, C. Lin, S. Yeh, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1968**, 40, 453.
- [13] D. Chakraborti, M. Rahman, K. Raul, U. Chowdhury, M Sengupta, D. Lodh, C. Chanda, K. Saha, S. Mukherjee, *Talanta*, **2002**, 58, 3.
- [14] A. Chatterjee, D. Das, B. Mandal, T. Chowdhury, G. Samanta, D. Chakraborti, *Analyst*, **1995**, 120, 643.
- [15] M. Berg, H. Tran, T. Nguyen, M. Pham, R. Schertenleib, W. Giger, *Environ. Sci., Technol.*, **2001**, 35, 2621.
- [16] P. Smedley, D. Kinniburgh, *Applied Geochemistry*, **2002**, 17, 517.
- [17] S. Chen, S. Dzung, M. Yang, K. Chiu, G. Shieh, C. Wai, *Environ. Sci. Technol.*, **1994**, 28, 877.
- [18] P. Smedley, H. Nicolli, D. Macdonald, A. Barros, J. Tullio, *Applied Geochemistry*, **2002**, 17, 259.
- [19] H. Nicolli, J. Suriano, M. Peral, L. Ferpozzi, O. Baleani, *Environ. Geol. Water Sci.*, **1989**, 14, 3.
- [20] P. Smedley, D. Kinniburgh, D. Macdonald, H. Nicolli, A. Barros, J. Tullio, J. Pearce, M. Alonso, *Applied Geochemistry*, **2005**, 20, 989.
- [21] B. Mandal, Y. Ogra, K. Suzuki, *Chem. Res. Toxicol.*, **2001**, 14, 371.

- [22] X. Le, X. Lu, M. Ma, W. Cullen, H. Aposhian, B. Zeng, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 5172.
- [23] M. Vather, J. Envall, *Environ. Res.*, **1983**, 32, 14.
- [24] J. Belton, N. Benson, M. Hanna, R. Taylor, *J. Environ. Sci. Health*, **1985**, 20A, 37.
- [25] United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water, **2001**.
- [26] S. Maeda, en: J.O. Nriagu (Ed.), *Arsenic in the Environment. Part I: Cycling and Characterization*, John Wiley and Sons, Inc, New York, **1994**, 155.
- [27] H. Aposhian, E. Gurzau, X. Le, A. Gurzau, S. Healy, X. Lu, M. Ma, L. Yip, R. Zakharyan, R. Maiorino, R. Dart, M. Tircus, D. Gonzalez-Ramirez, D. Morgan, D. Avram, M- Aposhian, *Chem. Res. Toxicol.*, **2000**, 13, 693.
- [28] A. Lindberg, W. Goessler, M. Grander, B. Nermell, M. Vahter, *Toxicology Letters*, **2007**, 168, 310.
- [29] M. Styblo, S. Lin, L. del Razo, D. Thomas, en: W. Chappell, C. Abernathy, R. Calderon (Eds.), *Arsenic Exposure and Health Effects*, Elsevier Science, Ámsterdam, Lausanne, New Cork, Oxford, Tokio, **2001**, 325.
- [30] J. Petrick, F. Ayala-Fierro, W. Cullen, D. Carter, H. Aposhian, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2000**, 163, 203.
- [31] M. Styblo, L. Del Razo, L. Vega, D. Germolec, E. LeCluyse, G. Hamilton, W. Reed, C. Wang, W. Cullen, D. Thomas, *Arch. Toxicol.*, **2000**, 74, 289.
- [32] S. Lin, W. Cullen, D. Thomas, *Chem. Res. Toxicol.*, **1999**, 12, 924.
- [33] M. Mass, A. Tennant, B. Roop, W. Cullen, M Styblo, D. Thomas, A. Kligerman, *Chem. Res. Toxicol.*, **2001**, 14, 355.
- [34] P. Grandjean, P. Weihe, L. Needham, V. Burse, D. Patterson, E. Sampson, P, Jorgensen, M. Vather, *Environ. Res.*, **1995**, 71, 29.
- [35] National Research Council, *Arsenic in Drinking Water*, National Academy Press, Washington, **1999**.
- [36] K. Saha, en: W. Chappell, C. Abernathy, R. Calderon (Eds.), *Arsenic Exposure and Health Effects*, Elsevier Science, Ámsterdam, Lausanne, New Cork, Oxford, Tokio, **2001**, 387.
- [37] E. Marafante, M. Vather, J. Envall, *Chem. Biol. Interact.*, **1985**, 56, 225.
- [38] M. Vather, E. Marafante, *Arch. Toxicol.*, **1985**, 57, 119.
- [39] W. Morton, D. Dunnette, en: J.O. Nriagu (Ed.), *Arsenic in the Environment. Part II: Human Health and Ecosystem Effects*, John Wiley and Sons, Inc, New York, **1994**, 17.
- [40] D. Guha Mazumder, J. Das Gupta, A. Santra, A. Pal, A. Ghose, S. Sarkar, N. Chattapadhaya, D. Chakraborti, en: C. Abernathy, R. Calderon, W. Chappell, (Eds.), *Arsenic Exposure and Health Effects*, Chapman and Hall, London, **1997**, 112.
- [41] S. Nagvi, C. Vaishnavi, H. Singh, en: J.O. Nriagu (Ed.), *Arsenic in the Environment. Part II:*

- Human Health and Ecosystem Effects, John Wiley and Sons, Inc, New York, **1994**, 55-91.
- [42] Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Directiva 98/83/CE. **1998**.
- [43] US Environmental Protection Agency (US EPA) **2001**. National Primary Drinking Water Regulations; Arsenic and Clarifications to Compliance and New Source Contaminants Monitoring. Final Rule, 40 CFR Parts 141-142, Fed. Reg., 66(14), 6976-7066.
- [44] Código Alimentario Argentino. Capítulo XII. Modificación 2007.
- [45] WHO, **1993**. Guidelines for drinking water quality. Volume 1: Recommendations, 2nd. Ed. WHO, Geneva.
- [46] K. Morales, L. Ryan, K. Brown, T. Kuo, M. Wu, C. Chen, Environ. Health Perspect., **2000**, 108, 655.
- [47] H. Clewell, H. Barton, P. Gentry, A. Shipp, J. Yager, M. Andersen, Int. J. Toxicol., **1998**, 18(2), 131.
- [48] H. Clewell, en: C. Abernathy, R. Calderon, W. Chappell, (Eds.), Arsenic Exposure and Health Effects IV, Amsterdam, London, New York, Oxford, Paris, Shannon, Tokio, **2001**, 297.
- [49] G. Corey, R. Tomasini, J. Pagura, Estudio Epidemiológico de la exposición al arsénico a través del consumo de agua, Provincia de Santa Fe, República Argentina, ISBN 987-23193-0-8, **2005**.
- [50] Z. Gong, X. Lu, M. Ma, C. Watt, X. Le, Talanta, **2002**, 58, 77.
- [51] M. Kumaresan, P. Riyazuddin, Current Science, **2001**, 80/7, 837.
- [52] M. Walker, R. Seiler, M. Meinert, Sci. Total Environm., **2008**, 389, 245.
- [53] W. Chen, R. Parette, J. Zou, F. Cannon, B. Dempsey, Water Research, **2007**, 41, 1851.
- [54] T. Choong, T. Chuah, Y. Robiah, F. Koay, I. Azni, **2007**, 217, 139.
- [55] P. Westerhoff, T. Benn, A. Chen, L. Wang, L. Cumming, EPA/600/R-08/051, **2008**, U.S. EPA, Cincinnati.
- [56] W. Cullen, K. Reimer, Chem. Rev., **1989**, 89, 713.
- [57] X. Le, M. Ma, N. Wong, Anal. Chem., **1996**, 68, 4501.
- [58] D. Bright, M. Dodd, K. Reimer, Sci. Total Environ., **1996**, 180, 165.
- [59] K. Francesconi, J. Edmonds, Adv. Inorg. Chem., **1997**, 44, 147.
- [60] W. Holak, Anal. Chem., **1969**, 41, 1712.
- [61] M. Gutzeit, Pharm. Ztg., **1879**, 24, 263.
- [62] A. Howard, J. Anal. At. Spectrom., **1997**, 12, 267.
- [63] J. Dedina, D. Tsalev, Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, **1995**, Wiley, New York.
- [64] R. Anderson, M. Thompson, E. Culbard, Analyst, **1986**, 111, 1143.
- [65] A. Howard, C. Salou, Anal. Chim. Acta, **1996**, 333, 89.

- [66] A. Howard, M. Arbab-Zavar, *Analyst*, **1981**, 106, 213.
- [67] G. Pacey, J. Ford, *Talanta*, **1981**, 28, 935.
- [68] S. Amankwah, J. Faching, *Talanta*, **1985**, 32, 111.
- [69] T. Kamada, *Talanta*, **1981**, 28, 935.
- [70] B. Welz, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1998**, 13, 413.
- [71] S. Nielsen, E. Hansen, *Analytical Chimica Acta*, **1997**, 343, 5.
- [72] X. Guo, X. Guo, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1995**, 10, 987.
- [73] G. Samanta, T. Chowdhury, B. Mandal, B. Biswas, U. Chowdhury, G. Basu, C. Chanda, D. Lodh, D. Chakraborti, *Microchemical Journal*, **1999**, 62, 174.
- [74] W. Driehaus, J. Jekel, M., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1992**, 343, 352.
- [75] H. Chen, I. Brindle, X. Le, *Anal. Chem.*, **1992**, 64, 667.
- [76] X. Le, W. Cullen K. Reimer, *Anal. Chim. Acta*, **1994**, 285, 277.
- [77] T. Hamilton, J. Ellis, T. Florence, *Anal. Chim. Acta*, **1980**, 119, 225.
- [78] J. Lown, D. Johnson, *Anal. Chim. Acta*, **1980**, 116, 41.
- [79] F. Duarte, J. Severo Fagundes Pereira, M. Foster Mesko, F. Goldschmidt, E. Moraes Flores, V. Dressler, *Spectrochim. Acta Part B*, **2007**, 62, 978.
- [80] C. B Hymer, J. Caruso, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, **2002**, 25, 639.
- [81] T. Guerin, M. Astruc, A. Batel, M. Borsier, *Talanta*, **1997**, 44, 2201.
- [82] C. Can, P. Vijan, *Anal. Chim. Acta*, **1978**, 101, 33.
- [83] J. Tyson, S. Offley, N. Seare, H. Kibble, C. Fellows, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1992**, 7/2, 315.
- [84] T. Guo, J. Baasner, D. Tsaley, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 349, 313.
- [85] D. Pozebon, V. Dressler, J. Gomes Neto, A. Curtius, *Talanta*, **1998**, 45, 1167.
- [86] E. Lima, J. Brasil, J. Vaghetti, *Talanta*, **2003**, 60, 103.
- [87] E. Lima, R. Barbosa, J. Brasil, A. Santos, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2002**, 17, 1523.
- [88] F. Shemirani, M. Baghdadi, M Ramezani, *Talanta*, **2005**, 65, 882.
- [89] M. Sperling, X. Yan, B. Welz, *Spectrochim. Acta Part B*, **1996**, 51, 1875.
- [90] M. Sperling, X. Yin, B. Welz, *Spectrochim. Acta Part B*, **1991**, 46, 1789.
- [91] M. Sperling, X. Yin, B. Welz, *Analyst*, **1992**, 117, 629.
- [92] M. Sperling, S. Xu, B. Welz, *Anal. Chim.*, **1992**, 64, 3101.
- [93] F. Fernández, J. Stripeikis, M. Tudino, O. Troccoli, *Analyst*, **1997**, 122, 679.
- [94] N. Hata, H. Yamada, I. Kasahara, S. Taguchi, *Analyst*, **1999**, 124, 23.
- [95] D. Hung, O. Nekrassova, R. Compton, *Talanta*, **2004**, 64, 269.
- [96] B. Sheppard, W. Shen, J. Caruso, D. Heitkemper, F. Fricke, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1990**, 5, 431.
- [97] X. Wei, C. Brockhoff-Schwegel, J. Creed, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2001**, 16, 12.

- [98] L. Olson, N. Vela, J. Caruso, *Spectrochimica Acta Part B*, **1995**, 50, 355.
- [99] A. Stroh, U. Volkopf, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1993**, 8, 35.
- [100] R. Sturgeon, J. Lam, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1999**, 14, 785.
- [101] B Fairman, T. Catterick, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1997**, 12, 863.
- [102] D. Pozebon, V. Dressler, A. Curtius, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1998**, 13, 7.
- [103] S. Saverwyns, X. Zhang, F. Vanhaecke, R. Cornelis, L. Moens, R. Dams, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1997**, 12, 1047.
- [104] E. Larsen, G. Pritzl, S. Hansen, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1993**, 8, 1075.
- [105] L. Rottmann, K. Heumann, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **1994**, 350, 221.
- [106] E. Larsen, S. Hansen, *Microchimica Acta*, **1992**, 109, 47.
- [107] E. Larsen, *Spectrochim. Acta Part B*, **1998**, 53, 253.
- [108] V. Vacchina, K. Polec, J Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1999**, 14, 1557.
- [109] T. Guerin, A. Austruc, M. Austruc, *Talanta*, **1999**, 50, 1.
- [110] E. Hakala, L. Pyy, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1992**, 7, 191.
- [111] S. Hansen, E. Larsen, G. Pritzl, C. Cornett, *J. Anal. Chim. Acta*, **1998**, 364, 19.
- [112] R. Zang, R. Cornelis, J. de Kimpe, L. Mees, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1996**, 11, 1075.
- [113] R. Zang, R. Cornelis, J. de Kimpe, L. Mees, *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 319, 177.
- [114] M. López, M. Gómez, M. Palacios, C. Cámara, *Fres. J. Anal. Chem.*, **1993**, 346, 643.
- [115] A. Howard, M. Arbab-Zavar, *Analyst*, **1980**, 105, 338.
- [116] K. Palanivelu, N. Balasubramanian, T. Rama Krishnan, *Talanta*, **1992**, 39, 555.
- [117] P. Sharma, *Anal. Sci.*, 1995, 11,261.
- [118] D. Meyers, L. Osteryoung, *Anal. Chem.*, **1973**, 45-267.
- [119] R. Sadana, *Anal. Chem.*, **1983**, 55, 304.
- [120] G. Henze, W. Wagner, S. Sander, *Fres. J. Anal. Chem.*, **1997**, 358, 741.
- [121] G. Forsberg, J. O'Laughlin, R. Megargle, S. Kairtyehann, *Anal Chem.*, **1975**, 47, 1586.
- [122] Y. Schelgel, J. Mattush, V. Wennrich, *Fres. J. Anal. Chem.*, **1996**, 354, 535.
- [123] Y. Lin, U. López-Ávila, J. Zhu, D. Wiederia, W. Bechert, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 2020.
- [124] X. Tian, Z. Zhuang, B. Chen, X. Wang, *Analyst*, **1998**, 123, 899.
- [125] H. Chen, M. Frey, D. Clifford, L. McNeil, M. Edwards, *J. Am. Water Works Assoc.*, **1999**, 91, 74.
- [126] M. Walker, R. Seiler, M. Meinert, *Sci. Total Environ.*, **2008**, 389, 245.
- [127] A. Bednar, J. Garbarino, J. Ranville, T. Wildeman, *J. Geochemical Exploration*, **2005**, 85, 55.
- [128] R. McCleskey, D. Nordstrom, A. Maest, *Applied Geochemistry*, **2004**, 19, 995.
- [129] B. Daus, J. Mattusch, R. Wennrich, H. Weiss, *Talanta*, **2002**, 58, 57.

- [130] J Aggett, M. Kriegman, *Analyst*, **1987**, 112, 153.
- [131] J. Ball, R. Mc Cleskey, D. Nordstrom, J. Holoway, P. Verplanck, *US Geol. Surv.*, **2002**, Open-File Report 02-382.
- [132] D. Tallman, A. Shaikh, *Anal. Chem.*, **1980**, 52, 196.
- [133] S. Hug, L. Canonica, M. Wegelin, D. Gechter, U. Von Gunten, *Environ. Sci. Technol.*, **2001**, 35, 2114.
- [134] M. Emmett, G. Khoe, *Water Res.*, **2001**, 35, 649.
- [135] A. Bednar, J. Garbarino, J. Ranville, T. Wildeman, *Environ. Sci. Technol.*, **2002**, 36, 2213.
- [136] Arsenic Removal from Drinking Water by Iron Removal, USEPA, EPA/600/R-06/006, **2006**, 58.
- [137] W. Driehaus, R. Seith, M. Jekel, *Water Res.*, **1995**, 29, 297.
- [138] D. Ahmann, A. Roberts, L. Krumholz, F. Morel, *Nature*, **1994**, 371, 750.
- [139] D. Newman, D. Ahmann, F. Morel, *Geomicrobiol.*, **1998**, 15, 255.
- [140] G. Hall, J. Pelchat, G. Gauthier, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1999**, 14, 205.
- [141] T. Salmassi, K. Venkateswaren, M. Satomi, K. Nealson, D. Newman, J. Hering, *Geomicrobiol. J.*, **2002**, 19, 53.
- [142] J. Wilkie, J. Hering, *Environ. Sci. Technol.*, **1998**, 32, 657.
- [143] T. Gihring, G. Druschel, R. McCleskey, R. Hamers, J. Banfield, *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, 3857.
- [144] K. Francesconi, J. Edmonds, M. Morita. *Arsenic in the Environment, Part I*, **1994**, 189.
- [145] X. Le, S. Yalcin, M. Ma, *Environ. Sci. Technol.*, **2000**, 34, 2342.
- [146] M. Palacios, M. Gómez, C. Cámara, M. López, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 340, 209.
- [147] W. Collins, *US Geol. Surv. Water-supply*, **1928**, paper 596 H.
- [148] *Standard Methods for the Determination of Water and Wastewater* Ed. 14th, American Public Health Association (APHA), **1976**, 127.
- [149] *Standard Methods for the Determination of Water and Wastewater* Ed. 15th, American Public Health Association (APHA), Part 300, **1980**, 141.
- [150] G. Batley, In Batley G. E. (Ed.), *Trace Element Speciation: Analytical Methods and Problems*. CRC Press Boca Raton, **1989**, 1.
- [151] J. Cherry, A. Shaikh, D. Tallman, R. Nicholson, *J. Hydrol.*, **1979**, 43, 373.
- [152] J. Tingle, *J. Am. Chem. Soc.*, **1911**, 33, 1762.
- [153] S. Witekowa, W. Farbotko, *Acta Chim*, **1972**, 17, 91.
- [154] W. Kao, T. Kuwana, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem*, **1984**, 169, 167.
- [155] E. Rochette, B. Bostick, G. Li, S. Fendorf, *Environ. Sci. Technol.*, **2000**, 34, 4714.
- [156] Z. Jokai, J. Hegoczki, P. Fodor, *Microchemical Journal*, **1998**, 59, 117.

- [157] P. Pandey, S. Yadav, S. Nair, M. Pandey, *Current Science*, **2004**, 86, 1426.
- [158] C. Feldman, *Anal. Chem.*, **1979**, 51, 664.
- [159] C. Sharpless, K. Linden, *Environ. Sci. Technol.*, **2001**, 35, 2949.
- [160] P. Gallagher, C. Schwegel, X. Wei, J. Creed, *J. Environ. Monit.*, **2001**, 3, 371.
- [161] M. Andreae, *Deep-Sea Res.*, **1978**, 25, 391.
- [162] M. Andreae, *Limnol. Oceanog.*, **1979**, 24, 440.
- [163] M. Borho, P. Wilderer, *Aqua*, **1997**, 46, 138.
- [164] E. Brunetto, M. Iriondo, *Revista de la Sociedad Geológica de España*, **2007**, 20, 17.
- [165] ASTM D 5092. Standard Practice for Design and Installation of Ground Water Monitoring Wells in Aquifers.
- [166] ASTM D 5521. Standard Guide for Development of Ground Water Monitoring Weels in Aquifers.
- [167] K. Pohlmann, G. Icopini, R. McArthur, C. Rosal, Evaluation of Sampling and Field-Filtration Methods for the Analysis of Trace Metals in Ground Water, US EPA, Las Vegas US, EPA/600/SR-94/119,**1994**.
- [168] ASTM D 6771. Standard Practice for Low-Flow Purging and Sampling for Wells and Devices used for Ground Water Quality Investigations.
- [169] ASTM D 6089. Standard Guide for Documenting a Ground Water Sampling Event.
- [170] M Barcelona, J. Gibb, J. Helfrich, E. Garske, Practical Guide for Ground Water-Sampling, **1985**, Illionois State Water Survey, Champaign, Illinois, SWS Contract Report 374.
- [171] J. Huang, G. Ilgen, *Analytical Chemical Acta*, **2004**, 512, 1.
- [172] J. Bundschuh, B. Farías, R. Martín, A. Storniolo, P. Bhattacharya, J. Cortéz, G. Bonorino, R. Albouy, *Applied Geochemistry*, **2004**, 19,231.
- [173] A. D'Ulivo, C. Baiocchi, E. Pitzalis, M. Onor, R. Zamboni, *Spectrochim. Acta Part B*, **2004**, 59, 471.
- [174] D'Ulivo, A., Dedina, J., *Spectrochim. Acta Part B*, **2002**, 57, 2069.
- [175] D. Tsalev, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1999**, 14, 147.
- [176] R. Brown, R. Fry, J. Moyers, S. Northway, M. Denton, G. Wilson, *Anal. Chem.*, **1981**, 53/11, 1560.
- [177] S. Rapsomanikis, *Analyst*, **1994**, 119,1429.
- [178] S. Rapsomanikis, O. Donard, J. Weber, *Anal. Chem.*, **1986**, 58,35.
- [179] D. Yan, Z. Yan, G. Cheng, A. Li, *Talanta*, **1984**, 31, 133.
- [180] R. Sturgeon, J. Liu, V. Boyko, V. Luong, *Anal. Chem.*, **1996**, 68, 1883.
- [181] A. Luna, R. Sturgeon, R. Campos, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 3523.

- [182] A. Sanz-Medel, M. Valdéz-Hevia y Temprano, N. Bordel García, M. Fernández de la Campa, *Anal. Chem.*, **1995**, 67/13, 2216.
- [183] L. Ebdon, P. Goodall, S. Hill, P. Stockwell, K. Thompson, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1993**, 8/5, 723.
- [184] M. Lansford, E. McPherson, M. Fishman, *At. Absorpt. Newsletter*, **1974**, 13/4, 103.
- [185] E. Pollock, S. West, *At. Absorpt. Newsletter*, **1973**, 12/1, 6.
- [186] R. Skogerboe, D. Dick, D. Pavlica, F. Lichte, *Anal. Chem.*, **1975**, 47/3, 568.
- [187] S. Tesfalidet, K. Irgum, *Anal. Chem.*, **1988**, 60/19, 2031.
- [188] S. Tesfalidet, K. Irgum., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1990**, 338/6, 741.
- [189] X. Guo, X. Guo, *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 330, 237.
- [190] R. Mallett, S. Royal, T. Steele, *Anal. Chem.*, **1979**, 51/11, 1617.
- [191] P. Vijan, *At. Spectrosc.*, **1980**, 1/5, 143.
- [192] J. Alary, J. Vandaele, C. Escrieut, R. Haran, *Talanta*, **1986**, 33/9, 748.
- [193] D. Lee, *Anal. Chem.*, **1982**, 54/7, 1182.
- [194] R. Sturgeon, S. Willie, S. Berman, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1989**, 4/5, 443.
- [195] T. Brueggemeyer, J. Caruso, *Anal. Chem.*, **1982**, 54/6, 872.
- [196] R. Sturgeon, S. Willie, R. Berman, *Anal. Chem.*, **1989**, 61/17, 1867.
- [197] J. Castillo-Suárez, E. García, J. Delfa, J. Mir, C. Bendicho, *Microchem. J.*, **1990**, 42/1, 103.
- [198] M. Jiménez, J. Mir, J. Castillo-Suárez, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1993**, 8/4, 665.
- [199] J. Castillo-Suárez, J. Mir, M. García-Ruiz, C. Bendicho, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1990**, 338/6, 721.
- [200] Astrom, O., *Anal. Chem.*, **1982**, 54, 190.
- [201] Matusiewicz, H. and Sturgeon, R. E., *Spectrochim. Acta Part B*, **1996**, 51, 377.
- [202] J. Dedina, in *Flow analysis with atomic spectrometric detection*, A. Sanz-Medel (Ed), Elsevier, **1999**, 237-273.
- [203] S. Pergantis, W. Winnik, E. Heitmar, W. Cullen, *Talanta*, **1997**, 44, 1941.
- [204] Narsito, J. Agterdenbos, *Anal. Chim. Acta*, **1987**, 197, 315.
- [205] A. Walsh, *Spectrochimica Acta*, **1955**, 7, 108.
- [206] B. Welz, M. Sperling, *Atomic Absorption Spectrometry, Third Completely Revised Edition*, **1999**, Wiley-VCH, Weinheim, Federal Republic of Germany.
- [207] S. Stephen, D. Littlejohn, J. Ottaway, *Analyst*, **1985**, 110/8, 1147.
- [208] N. Miller-Ihli, *J. Anal. At. Spectrosc.*, **1988**, 3/1, 73.
- [209] N. Miller-Ihli, *J. Anal. At. Spectrosc.*, **1989**, 4/3, 295.
- [210] G. Carnrick, G. Daley, A. Fotinopoulos, *At. Spectrosc.*, **1989**, 10/6, 170.

- [211] K. Knudson, A. Christian, *Anal. Lett.*, **1973**, 6, 1039.
- [212] G. Darsch, L. Meyer, G. Kauert, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1980**, 304, 141.
- [213] C. Hsieh, S. Petrovic, H. Pardue, *Anal. Chem.*, **1990**, 62/18, 1983.
- [214] R. Masters, C. Hsieh, H. Pardue, *Talanta*, **1989**, 36, 133.
- [215] K. Busch, M. Busch, *Multielement Detection Systems for Spectrochemical Analysis*, **1990**, John Wiley & Sons, Chichester.
- [216] A. Jones, B. Smith, J. Winefordner, *Anal. Chem.*, **1989**, 61/15, 1670.
- [217] B. Jones, M. Mignardi, B. Smith, J. Winefordner, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1989**, 4/7, 647.
- [218] M. Mignardi, B. Jones, B. Smith, J. Winefordner, *Anal. Chim. Acta*, **1989**, 227/2, 331.
- [219] J. Burguera, M. Burguera, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1997**, 12, 643.
- [220] B. Welz, M. Sperling, *Pure & Appl. Chem.*, **1993**, 65/12, 2465.
- [221] R. Beatty, *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*, **1988**, Perkin Elmer Corporation, USA, AA-914A.
- [222] J. Harnly, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1996**, 355/5-6, 501.
- [223] K. Farah, J. Sneddon, *Appl. Spectrosc. Rev.*, **1995**, 30/4, 351.
- [224] P. Keliher, C. Wohlers, *Anal. Chem.*, **1976**, 48/3, 333A.
- [225] M. Retzik, D. Bass, *Int. Lab.*, **1988**, 18/8, 49.
- [226] S. Nakamura, M. Kubota, *Analyst*, **1990**, 115/3, 283.
- [227] G. Moulton, T. H'aver, J. Harnly, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1989**, 4/7, 673.
- [228] G. Moulton, T. H'aver, J. Harnly, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1990**, 5/2, 145.
- [229] K. Schmidt, H. Becker-Rob, S. Florek, *Spectrochim. Acta Part B*, **1990**, 45/11, 1203.
- [230] G. Lothian, *Analyst*, **1963**, 88, 678.
- [231] P. Zeegers, R. Smith, J. Winefordner, *Anal. Chem.*, **1968**, 40/1326, 47A.
- [232] M. Stephenson, D. Smith, *Anal. Chem.*, **1988**, 60/7, 696.
- [233] W. Slavin, G. Carnrick, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **1988**, 19/2, 95.
- [234] S. Clark, J. Ashby, P. Craig, *Analyst*, **1987**, 112, 1781.
- [235] A. Sanz-Medel, M. Valdés-Hevia y Temprano, N. Bordel García, M. Fernández de la Campa, *Anal. Chem.*, **1995**, 67, 2216.
- [236] R. Ellis, J. Tyson, *Spectrochim. Acta Part B*, **1996**, 47, 689.
- [237] W. Robbins, J. Caruso, *Anal. Chem.*, **1979**, 51, 889A.
- [238] F. Laborda, E. Bolea, M. Baranguan, J. Castillo, *Spectrochim. Acta Part B*, **2002**, 57, 797.
- [239] A. D'Ulivo, M. Onor, E. Pitzalis, R. Spiniello, L. Lampugnani, G. Cristoforetti, S. Legnaioli, V. Palleschi, A. Salvetti, E. Tognoni, *Spectrochim. Acta Part B*, **2006**, 61, 797.
- [240] A. D'Ulivo, Z. Mester, J. Meija, R. Sturgeon, *Anal. Chem.*, **2007**, 79, 3008.
- [241] S. Branch, L. Ebdon, M. Ford, M. Foulkes, P. O'Neill, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1991**, 6, 154.

- [242] J. Dedina, *Spectrochim. Acta Part B*, **1992**, 47, 689.
- [243] J. Piwonka, G. Kaiser, G. Toelg, *Fresenius Z., Anal Chem.*, **1985**, 321, 225.
- [244] R. Bye, *Talanta*, **1990**, 37/10, 1029.
- [245] J. Stripeikis, P. Costa, M. Tudino, O. Troccoli, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 408, 191.
- [246] I. Brindle, H. Alarabi, S. Karshman, X. Le, S. Zheng, *Analyst.*, **1992**, 117/3, 407.
- [247] Le, X., Cullen, W., Reimer, K., Brindle, I., *Anal. Chim. Acta*, **1992**, 258/2, 307.
- [248] B. Welz, M. Sucmanova, *Analyst*, **1993**, 118, 1417.
- [249] B. Welz, M. Sucmanova, M., *Analyst*, **1993**, 118/11, 1425.
- [250] H. Uggerud, W. Lund, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1995**, 10/5, 405.
- [251] E. Pitzalis, D. Ajala, M. Onor, R. Zamboni, A. D'Ulivo, *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 79, 6324.
- [252] F. Puttemans, D. Massart, *Anal. Chim. Acta*, **1982**, 141, 225.
- [253] K. Subramanian, J. Méranger, *Anal. Chim. Acta*, **1981**, 124/1, 131.
- [254] C. Chung, E. Iwamoto, M. Yamamoto, Y. Yamamoto, *Spectrochim. Acta Part B*, **1984**, 49/3, 283.
- [255] E. Donaldson, *Talanta*, **1988**, 35/1, 47.
- [256] P. Goulden, P. Brooksbank, *Anal. Chem.*, **1974**, 46/11, 1431.
- [257] C. Can, P. Vijan, *Anal. Chim. Acta*, **1978**, 101, 33.
- [258] J. Agget, A. Aspell, *Analyst*, **1976**, 101, 341.
- [259] T. Nakahara, *Prog. Anal. At. Spectros.*, **1983**, 6, 163.
- [260] J. Dedina, I. Rubeska, *Spectrochim. Acta*, **1980**, 35 B, 119.
- [261] D. Siemer, L. Hagemann, *Anal. Lett.*, **1975**, 8, 323.
- [262] B. Welz, T. Guo, *Spectrochim. Acta Part B*, **1992**, 47, 645.
- [263] B. Welz, M. Melcher, *Analyst*, **1983**, 108, 213.
- [264] J. Dedina, B. Welz, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1992**, 7, 307.
- [265] D. Bax, J. T. Van Elteren, J. Agterdenbos, *Spectrochim. Acta Part B*, **1986**, 41, 1007.
- [266] J. Agterdenbos, J. P. M. Van Noort, F. F. Peters, D. Bax, J. T. Ter Heege, *Spectrochim. Acta Part B*, **1985**, 40, 501.
- [267] S. Tesfalidet, G. Wikander, K. Irgue, *Anal. Chem.*, **1999**, 35, 119.
- [268] J. Agterdenbos, D. Bax, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **1986**, 323, 783.
- [269] Narsito, J. Agterdenbos, S. Santosa, *Anal. Chim. Acta*, **1990**, 237, 189.
- [270] J. Ruzicka, E. Hansen, *Flow Injection Analysis, First Edition*, **1981**, John Wiley & Sons, New York.
- [271] J. Ruzicka, E. Hansen, *Flow Injection Analysis, Second Edition*, **1988**, John Wiley & Sons, New York.
- [272] Z. Fang, *Microchem. J.*, **1992**, 45, 137.

- [273] Sumario técnico de condiciones analíticas recomendadas e información general para Análisis de Mercurio/Hidruros por Inyección en Flujo con FIAS 100/400 Perkin Elmer, Perkin Emer, TSAA-10C.
- [274] R. Braman, D. Jonson, C. Foreback, J. Ammons, J. Bicker, *Anal. Chem.*, **1977**, 49, 621.
- [275] D. Wolfgang, M. Jekel, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1992.**, 343, 352.
- [276] R. Torralba, M. Bonilla, A. Palacios, C. Cámara, *Analisis*, **1994**, 22, 478.
- [277] P. Carrero, A. Malavé, J. Burguesa, M. Burguera, C. Rondon, *Analytical Chimica Acta*, **2001**, 438, 195.
- [278] J. Nriagu, J. Azcue, en: J. Nriagu (Ed), *Arsenic in the Environment. Part 1*, **1990**, John Wiley and Sons, Inc, New York, 1-15.
- [279] Z. Fang, *Flow Injection Separation and Preconcentration*, **1993**, VCH Verlags GmbH, Weinheim, Germany.
- [280] R. Braman, L. Justen, C. Foreback, *Anal. Chem.*, **1972**, 44/13, 2195.
- [281] R. Braman, C. Foreback, *Science*, **1973**, 182, 1247.
- [282] P. Martínez-Jiménez, M. Gallegos, M. Valcarcel, *Analyst*, **1987**, 112, 1233.
- [283] R. Santelli, M. Gallego, M. Valcarcel, *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 1427.
- [284] Z. Fang, M. Sperling, B. Welz, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1991**, 6, 301.
- [285] S. Olsen, L. Pessenda, J. Ruzicka, E. Hansen, *Analyst*, **1983**, 108, 905.
- [286] Z. Fang, *Spectrochim. Acta Rev.*, **1991**, 14, 235.
- [287] D. Beauchmin, S. Berman, *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 1857.
- [288] Z. Fang, J. Ruzicka, E. Hansen, *Anal. Chim. Acta*, **1984**, 164, 23.
- [289] X. Wang, R. Barnes, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1989**, 4, 509.
- [290] T. Suzuki, J. Bomani, H. Matsunaga, T. Yohoyama, *Chem. Lett.*, **1997**, 11, 1119.
- [291] M. Sperling, X. Yan, B. Welz, *Spectrochim. Acta*, **1996**, 51B, 1891.
- [292] X. Yan, W. van Mol, F Adams, *Analyst*, **1996**, 121, 1061.
- [293] S. Karthikeyan, T. Prasada Rao, C. Iyer, *Talanta*, **1999**, 49, 523.
- [294] G. Marshall, J. van Staden, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1990**, 5, 681.
- [295] J. Szpunar-Lovinska, M. Trojanowicz, L. Cheva, *Analyst*, **1990**, 115, 319.
- [296] B. Kolb, G. Kemmner, F. Schleser, E. Wiedeking, *Fresenius Z. Anal. Chem*, **1966**, 211, 165.
- [297] D. Segar, *Anal. Lett.*, **1974**, 7/1, 89.
- [298] J. Robinson, L. Vidarreta, D. Wolcott, J. Goodbread, E. Kiesel, *Spectrosc. Lett.*, **1974**, 7 491.
- [299] J. Van Loon, B. Radziuk, *Can J. Spectrosc.*, **1976**, 21/2, 46.
- [300] B. Radziuk, J. Van Loos, *Sci. Total Environ.* **1976**, 6, 251.

- [301] R. Lobinski, W. Dirkx, J. Szpunar-Lobinska, F. Adams, *Anal. Chim. Acta*, **1994**, 286, 381.
- [302] K. Bergmann, B. Neidhardt, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **1996**, 356, 57.
- [303] J. Szpunar, M. Ceulemans, V. Schmitt, F Adams, R. Lobinski, *Anal Chim. Acta*, **1996**, 332, 225.
- [304] D. Segar, *Anal. Lett.*, **1974**, 7, 89.
- [305] J. Robinson, E. Kiesel, J. Goodbread, R. Bliss, R. Marshall, *Anal. Chim. Acta*, **1977**, 92, 321.
- [306] D. Baxter, W. French, *Analyst*, **1993**, 118, 495.
- [307] D. Baxter, W. Frech, *Analyst*, **1993**, 118/5, 495.
- [308] J. Szpunar, V. Schmitt, O. Donard, R. Lobinski, *Trends Anal. Chem.*, **1996**, 15, 181.
- [309] I. Rodríguez Pereiro, V. Schmitt, J. Szpunar, O. Donard, R. Lobinski, *Anal. Chem.*, **1996**, 68/23, 4135.
- [310] L Szpunar, M.Ceulemans, V. Schmitt, F. Adams, R. Lovinsky, *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 332/2-3, 225.
- [311] S. Wangkarn, S. Pergantis, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2000**, 15, 627.
- [312] K. Ackely, C. B'Hymer, K. Sutton, J. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1999**, 14, 845.
- [313] X. Wei, C. Brockhoff-Schwegel, J. Creed, *Analyst*, **2000**, 125, 1215.
- [314] M. Gallardo, Y. Bohari, A. Astruc, M. Potin-Gautier, M. Austruc, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 441, 257.
- [315] M. Vilano, A. Padro, R. Rubio, *Anal. Chim. Acta*, **2000**, 411, 71.
- [316] T. Nakazato, T. Taniguchi, H. Tao, M. Dominga, A. Miyazaki, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2000**, 15, 1546.
- [317] Y. Shibata, M. Morita, *Anal. Chem.*, **1989**, 61, 2116.
- [318] S. McSheehy, R. Pohl, R. Lovinski, J. Szpunar, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, 440, 3.
- [319] S. Hansen, E. Larsen, G. Pritzl, C. Cornett, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1992**, 7, 629.
- [320] L. Edbon, S. Hill., P. Jones, *J. Anal. At. Spectrom.*, **1987**, 2/2, 205.
- [321] S. Haswell, R. Stockton, K. Bancroft, P. O'Neil, A. Rahman, K. Irgolic, *J. Autom. Chem.*, **1987**, 9/1, 6.
- [322] R. Stockton, K. Irgolic, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **1979**, 6/4, 313.
- [323] S. Haswell, P. O'Neil, K. Bancroft, *Talanta*, **1985**, 32/1, 69.
- [324] A. Howard, L. Hunt, *Anal. Chem.*, **1993**, 65/21, 2995.
- [325] S. Lamble, J. Hill, *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 334/3, 261.
- [326] X. Le, W. Cullen, K. Reimer, *Talanta*, **1994**, 41/4, 495.
- [327] A. López, R. Torralba, M. Palacios, C. Cámara, *Talanta*, **1992**, 39/10, 1343.
- [328] I. Martin, M. López, M. Gómez, C. Cámara, M. Palacios, *J. Chromatogr.*, **1995**, 666, 101.

- [329] M. Palacios, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 340/1-3, 209.
- [330] K. Lamble, M. Sperling, B. Welz, *Anal. Chim. Acta*, **1996**, 334, 261.
- [331] D. Tsalev, M. Sperling, B. Welz, *Spectrochim. Acta Part B*, **2000**, 55, 339.
- [332] R. Cornelis, X. Zhang, L. Mees, J.M. Christensen, K. Byrialsen, C. Dyrshel, *Analyst*, **1998**, 123, 2883.
- [333] D. Tsalev, M. Sperling, B. Welz, *Analyst*, **1998**, 123, 1703.
- [334] E. Russeva, I. Havezov, A. Dentcheva, *Fres. J. Anal. Chem.*, **1993**, 347, 320.
- [335] G. Ricci, L. Shepard, G. Colovos, N. Hester, *Anal. Chem.*, **1981**, 53, 610.
- [336] S. Yalcin, X. Chris Le, *Talanta*, **1998**, 47, 787.
- [337] M. Sigrist, H. Beldoménico, *Spectrochim. Acta Part B*, **2004**, 59, 1041.
- [338] D. Blevins, M Burke, T. Good, P. Harris, K. Van Horne, N. Simpson, L. Yago, *Handbook Sorbent Extraction Technology*, Varian Associates, Harbor City, USA, 2^o Ed., **1993**.
- [339] D. Massart, B. Vandeginste, L. Buydens, S. De Jong, P. Lewi, Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, **1997**, B. Vandeginste and S. Rutan Editors, Elsevier Science B.V., Amsterdam, The Netherlands.
- [340] A. Eaton, *J. Am. Water Works Assoc.*, **1994**, 86, 100.
- [341] G. Samanta, U. Chowdhury, B. Mandal, D. Chakraborti, N. Sekaran, H. Tokunaga, M. Ando, *Microchem. J.*, **2000**, 65, 113.
- [342] S. Londesborough, J. Mattusch, R. Wennrich, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **1999**, 363, 577.
- [343] C. Hymer, J. Caruso, *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1045, 1.
- [344] Z. Du, R. Houk, *J. Anal. At. Spectrom.*, **2000**, 15, 383.
- [345] R. Ritsema, T. Navarro, W. van Leeuwen, N Oliveira, P. Wolfs, E. Lebel, *Appl., Organomet., Chem.*, **1998**, 12, 591.