

Tesis presentada como parte de los requisitos de la Universidad Nacional del Litoral,

para la obtención del grado académico de:

Magister

en el campo de:

Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Realizada en:

Laboratorio Central de Servicios Analíticos de la Facultad de Ingeniería Química

Universidad Nacional del Litoral

Director:

Ing. Horacio R. Beldoménico

Tesis Magistral

**ESTUDIO POR FI HG AAS DE LAS ESPECIES DE
ARSÉNICO EN AGUAS NATURALES,
SUS TRANSFORMACIONES QUÍMICAS
Y SU INFLUENCIA EN LA PRODUCCIÓN LÁCTEA
DE LA CUENCA SANTAFESINA**

Autora: Lic. Mirna Sigrist

-2000-

Dedicado a Lina y Carlo.

Mi agradecimiento a Margarita, Néida y Renato.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
Capítulo I: INTRODUCCION	4
I.1. Generalidades.....	4
I.2. Caracterización del sistema “agua subterránea - leche de vaca”.....	7
I.2.1. Ubicación geográfica estratégica.....	7
I.2.2. Características generales de la leche	7
I.3. Metabolización del arsénico	9
I.3.1. Biometilación en sistemas acuáticos.....	10
I.3.2. Biometilación en mamíferos.....	10
I.4. El arsénico como agente causante de enfermedades.....	12
I.5. Estado actual de la legislación.....	13
I.5.1. Arsénico en agua de bebida.....	13
I.5.1.1. Determinación del Nivel Máximo Global de Contaminante.....	15
I.5.2. Arsénico en leche.....	16
I.6. Métodos existentes para la determinación analítica del arsénico.....	16
I.6.1. Determinación de arsénico en aguas subterráneas.....	17
I.6.1.1. Determinación de arsénico total.....	17
I.6.1.2. Determinación de As(III) y As(V) inorgánicos.....	18
I.6.2. Determinación de arsénico total en leche.....	21
Capítulo II: METODOS ANALITICOS	23
II.1. Espectrometría de absorción atómica.....	24

II.2. Generación de hidruros.....	25
II.2.1. Liberación del hidruro.....	27
II.2.2 Transporte del hidruro.....	28
II.2.3. Métodos de generación de hidruros.....	29
II.3. Inyección de flujo. Aplicabilidad en la generación de hidruros.....	30
II.4. Atomización del hidruro.....	36
II.5. Interferencias.....	38
II.6. Equipamiento.....	41
II.7. Drogas y reactivos. Material de referencia.....	42
II.8. Criterios considerados para el control de calidad analítico.....	47
II.9. Plan de muestreo.....	49
II.10. Determinación de As total en aguas subterráneas.....	52
II.11. Especiación de As(III) y As(V) inorgánicos en aguas subterráneas.....	53
II.12. Determinación de As total en total en las muestras de leche.....	54
Capítulo I: TRABAJO EXPERIMENTAL -Estudios previos-	56
III.1. Estudios para la especiación de As(III) y As(V) inorgánicos en aguas subterráneas.....	56
III.1.1. Concentración de solución carrier de HCl.....	57
III.1.2. Concentración de solución reductora de NaBH ₄	60
III.1.2.1. Límites de detección y cuantificación.....	64
III.1.2.2. Interferencias de As(V) sobre la señal de As(III).....	66
III.1.2.3. Selección de la concentración de NaBH ₄	68
III.1.3. Verificación de interferencias de As(V) sobre la señal de As(III) en muestras sintéticas.....	70

III.1.4. Presencia de organoarsenicales. Riesgo de error sistemático.....	71
III.2. Estudios para la cuantificación de As total en leche.....	72
III.2.1. Curva de calibración para la cuantificación de As total en muestras de leche.....	73
III.2.2. Pérdidas por volatilización. Cantidad de fundente.....	75
III.2.3. Curvas de calibración para la cuantificación de As total en blancos de reactivos.....	76
III.2.4. Límites de detección y cuantificación.....	78
Capítulo III: TRABAJO EXPERIMENTAL -Resultados y discusión-	79
III.3. Resultados y discusión.....	79
III.3.1. Valores de As total y especies inorgánicas As(III) y As(V) obtenidos en aguas subterráneas.....	79
III.3.2. Validación del método de determinación de As total en aguas subterráneas.....	81
III.3.3. Presencia de As(III).....	82
III.3.4. Parámetros de caracterización. Correlaciones.....	82
III.3.5. Resultados de As total en leche. Comparación entre contenidos de As total en agua subterránea y leche.....	85
Capítulo IV: CONCLUSIONES	89
ANEXO I	93
Corridas	
Curva de calibrado de As total para aguas subterráneas.	

Determinaciones de As total en muestras de aguas subterráneas.....	93
Determinación de As total en Material de Referencia NIST 1643d.....	104
Curva de calibrado de As(III) inorgánico.....	105
Determinaciones de As(III) inorgánico en muestras de agua subterránea.....	109
Curva de calibrado de As para la determinación de As total en leche.....	116
Blancos de reactivos para la determinación de As total en leche.....	118
ANEXO II	121
Salidas estadísticas	
Validación de solución estándar de As(III).....	121
Validaciones de solución estándar de As(V) reducido.....	125
As total en leche. Adición estándar.....	129
As total en leche. Soluciones estándar en medio HCl 1,2M.....	130
As total en leche. Soluciones estándar en medio HCl 4,5M.....	131
Estudios de cuantificación de As total en leche. Comparación entre método de adición estándar y soluciones estándar en medio HCl 1,2M.....	132
Estudios de cuantificación de As total en leche. Comparación entre método de adición estándar y soluciones estándar en medio HCl 4,5M.....	136
Validación del método de determinación de As total en aguas subterráneas.....	140
Análisis de variables múltiples para aguas subterráneas.....	142
Correlación para As total en agua subterránea y leche.....	144
GLOSARIO	145
REFERENCIAS	148

RESUMEN

Generalmente la inocuidad de los alimentos se atribuye a las condiciones de obtención y procesamiento de las materias primas. Sin embargo, los factores que condicionan el medio en el cual se desarrollan las fuentes primarias para la elaboración de alimentos (animales y vegetales) constituyen el punto de partida hacia una calidad óptima y controlada. El presente trabajo de tesis pretende establecer el grado de incidencia del consumo de agua con tenores elevados de arsénico sobre la producción láctea de vacas criadas en regiones cuyas aguas subterráneas padecen esta contaminación, como consecuencia de la composición geológica de los mantos rocosos que las contienen. El estudio se realiza sobre muestras de agua subterránea y leche de vaca recolectadas en 12 establecimientos situados en localidades ubicadas en el centro-oeste de la provincia. Para la determinación del contenido de arsénico total en ambas matrices se analiza la información actualizada disponible y se evalúan ventajas y desventajas de la espectrometría de absorción atómica asistida por un sistema automático de inyección de flujo con generación de hidruros en línea, empleado para las experiencias. La inserción de la inyección de flujo en la espectrometría atómica constituye una metodología novedosa para el análisis de elementos en leche y alimentos en general.

La ausencia de compuestos organoarsenicales en aguas subterráneas hace posible la determinación sin digestión del arsénico inorgánico total presente en la muestra; por su parte, la eliminación de materia orgánica necesaria para la determinación de As total en leche se realiza por calcinación de la muestra a 550 °C, verificándose la participación crítica de fundentes como $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ ante la volatilidad elevada de haluros arsenicales a estas temperaturas. Debido a las diferentes sensibilidades de las especies arsenicales en el análisis del contenido de As total mediante generación de hidruros utilizando NaBH_4 , tanto las muestras de agua subterránea

como de leche, son prerreducidas con solución de KI previo a la determinación analítica instrumental. Para la cuantificación de As total en leche se utilizan soluciones estándares acuosas de As que simplifican la metodología. La selección del método de cuantificación implementado implica la comparación de pendientes de curvas de calibrado acuosas en medios diferentes y por adición estándar.

El riesgo inherente a la contaminación arsenical de estas aguas subterráneas se evalúa mediante la especiación de As(III) por concentraciones variables de NaBH_4 por FI HG AAS. La separación de las especies arsenicales inorgánicas (arsenito y arsenato) utilizando esta metodología, requiere del estudio de las variables involucradas y la evaluación del límite de detección, sensibilidad e interferencias causadas por la presencia predominante de As(V). La concentración de la especie pentavalente se calcula como la diferencia entre el contenido de As total y As (III) en las muestras. La integridad de las especies desde la toma de muestra hasta el momento de su análisis se preserva mediante la adición de HCl y Fe(II) para frenar posibles mecanismos de oxidación del As(III). El error sistemático que causaría la presencia de organoarsenicales se estudia mediante la respuesta instrumental obtenida para soluciones estándar de MMA y DMA utilizando la metodología de especiación implementada.

Los criterios de calidad considerados para el control analítico involucran el establecimiento previo a la determinación de As total y especiado de los límites de detección, cuantificación, sensibilidad relativa y rangos de trabajo de cada metodología, validación de las soluciones estándar para especiación preparadas a partir de drogas sólidas por comparación con soluciones patrón, exactitud de la metodología para la determinación de As total en aguas subterráneas mediante el análisis de material de referencia de agua natural (Standard Reference Material[®] 1643d National Institute of Standards & Technology NIST. Elementos traza en agua.

Concentración certificada de As $56,02 \pm 0,73 \mu\text{g/L}$, precisión de la especiación de As(III) en aguas subterráneas por extracción en campo de duplicados de muestra y de la determinación de As total en leche por análisis de duplicados de muestra realizados en el laboratorio, evaluación de blancos de reactivos como indicador de procesos libres de contaminación y muestras fortificadas para evaluación de interferencias de matriz y control de procesos.

Los resultados obtenidos se analizan mediante la aplicación de modelos estadísticos que permiten interpretar interrelaciones entre las variables estudiadas, considerando además parámetros de caracterización en aguas subterráneas como dureza total y alcalinidad total. Los Anexos contienen la documentación seleccionada como respaldo técnico del trabajo, incluyendo hojas de trabajo correspondientes a corridas y salidas estadísticas.

I. INTRODUCCION

I.1. Generalidades.

El arsénico aparece con frecuencia en la corteza terrestre. Las más altas concentraciones se encuentran en depósitos minerales y en áreas de actividad térmica elevada. Si bien es considerado un contaminante natural del agua, la formación geológica propia de una región puede elevar las concentraciones de arsénico en aguas naturales a niveles de riesgo para la salud humana. Las actividades antropogénicas, tales como las operaciones de minería, acería, refinamiento, preservación de bosques y el uso en el pasado de pesticidas en la agricultura suelen sumarse a las causas naturales de contaminación. El tipo de elementos presentes en los alimentos de origen vegetal y animal, como así también su concentración y forma química dependen, en parte, de las características geológicas de los suelos y de las aguas de su entorno (Rodricks y Pholand, 1981). El arsénico aparece en los alimentos en cantidades pequeñas, ya sea naturalmente o como resultado de la contaminación ambiental a la que se hallan expuestos (Ulman et al., 1998). El agua y los alimentos se consideran los contribuyentes principales a la exposición de arsénico para los humanos; las exposiciones dérmicas y por inhalación se consideran minoritarias (Borum y Abernathy, 1994). En cuanto a su discutida esencialidad, investigaciones recientes introducen el arsénico como un nuevo elemento ultratraza esencial para el crecimiento, aunque su función específica aún se desconoce.

El arsénico es un elemento reactivo de transición que forma complejos con otros metales, el carbón y el oxígeno. La variedad de formas químicas en las que aparece en los sistemas naturales incluye As(III) (arsenito) y As(V) (arsenato) inorgánicos y varios compuestos arsenicales mono, di y tri metilados (Howard y Arbab-Zavar, 1981). Históricamente, los datos

de contaminación arsenical en muestras ambientales reflejaban el contenido total del elemento; actualmente existe un interés creciente en la determinación de las concentraciones de las especies individuales, debido a las diferencias de biodisponibilidad y toxicidad de cada una de ellas. Por su parte, la determinación del contenido de arsénico total para la evaluación de la exposición al arsénico por alimentos tampoco es un indicador adecuado, ya que las especies con muy diferentes toxicidades son determinadas mediante un análisis de arsénico no especiado. Sin embargo, la mayoría de los estudios de arsénico en alimentos sólo brindan información acerca de las cantidades de arsénico total (Schoof et al., 1999).

La naturaleza tóxica del arsénico depende de su estructura molecular (Jiménez et al., 1994). Los compuestos de arsénico inorgánicos se consideran generalmente más tóxicos que los compuestos orgánicos; el arsénico elemental es el menos tóxico, siendo la arsina el compuesto de mayor riesgo. Estudios realizados a comienzos de la década pasada revelaban una toxicidad aproximadamente 60 veces mayor para el As(III) que para el As(V) y 100 veces superior para los compuestos de arsénico inorgánicos que para los compuestos orgánicos (Chatterjee et al., 1995); sin embargo, recientes investigaciones indican la probable carcinogenicidad del DMA para humanos (Vasken Aposhian et al., 1999).

El arsénico presente en aguas subterráneas es generalmente de origen geológico (Driehaus y Jekel, 1992). Las especies predominantes en este medio son sus formas inorgánicas de As(III) y As(V), siendo esta última la forma mayoritaria. Las especies solubles más comunes de As(V) son formas de ácido arsénico: H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} , AsO_4^{3-} ; las especies solubles más comunes de As(III) son formas de ácido arsenioso: H_3AsO_3 , y H_2AsO_3^- . En el rango de pH 5 a 9, los datos de equilibrio indican la presencia predominante del As(V) como H_2AsO_4^- y del As(III) como H_3AsO_3 (Burriel Marti et al., 1985), adjudicándose a esta última especie

aproximadamente un 10% del arsénico total en aguas aeróbicas (Torralba et al., 1994). El predominio de As(III) se informó en aguas anaeróbicas o con muy bajo contenido de oxígeno disuelto en una cantidad aproximada al 80% (Haswel, 1985). Ambas especies pueden interconvertirse dependiendo de la naturaleza oxidativa o reductora del sistema. Un tercer grupo de componentes podría estar orgánicamente enlazado, pero los niveles documentados son raramente mayores a 1 ppb.

Los compuestos de arsénico son asimilados por una gran cantidad de alimentos de origen vegetal y animal, encontrándose en cantidades relativamente bajas (<0,1 a 0,9 µg/g) (Cervera y Montoro, 1994). Las más altas concentraciones se encuentran en peces, mariscos, carnes y granos. Los pescados de mar y mariscos poseen elevadas concentraciones de arsenobetaina considerada esencialmente no tóxica. Este constituye un ejemplo claro de la evaluación inadecuada de la toxicidad del arsénico presente en los alimentos cuando se realiza una determinación de arsénico total. Para una comparación consistente entre los niveles de arsénico en agua de bebida y alimentos es conveniente diferenciar entre las formas inorgánicas y orgánicas de arsénico en los alimentos. En este aspecto, se ha demostrado que la mayoría del arsénico presente en alimentos de origen marino corresponde a compuestos organoarsenicales, mientras que para los alimentos de origen terrestre (cuyas concentraciones de arsénico total son 2 ó 3 órdenes de magnitud menor respecto de los alimentos marinos), 25 a 100% del arsénico total es atribuible al arsénico inorgánico (Vasken Aposhian et al., 1999).

La especiación de las formas de arsénico en la dieta contribuye a las evaluaciones de la exposición al arsénico y su posible rol nutricional. Sin embargo, las limitaciones en el análisis rutinario de ciertos alimentos, especialmente materiales biológicos como la leche, hacen que solamente sea factible la determinación de arsénico total. Las concentraciones encontradas en

leche son muy bajas y su mecanismo de excreción por esta vía es prácticamente desconocido. El contenido de arsénico encontrado en muestras de leche de vaca extraídas de las góndolas de mercado en España fue de 0,14 a 0,77 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso húmedo. Los autores de este trabajo concluyeron que los niveles de arsénico encontrados no presentan un problema toxicológico considerando las muestras analizadas (Cervera et al., 1994). Valores menores a 2,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso húmedo se obtuvieron en estudios realizados en E.E.U.U. para la evaluación de la calidad de la leche consumida por la población (Vasken Aposhian et al., 1999). La contaminación arsenical en leche humana y de vaca también se estudió en Izmir, ciudad localizada en una isla de Turquía con grandes volcanes en extinción. Las medias para leche humana y de vaca oscilaron entre 4,1 y 5,3 $\mu\text{g}/\text{L}$, valores que los autores tampoco consideraron nocivos para los lactantes e infantes alimentados con productos de leche de vaca de la región (Ulman et al., 1998).

I.2. Caracterización del sistema “agua subterránea - leche de vaca”.

I.2.1. Ubicación geográfica estratégica.

La región de la provincia de Santa Fe seleccionada para este estudio constituye una cuenca lechera por excelencia, cuyas fuentes de agua subterránea utilizadas para consumo del ganado se caracterizan por su alto contenido de arsénico, cloruros, sulfatos y flúor. Puede definirse geográficamente como una franja ubicada al oeste de la provincia entre los meridianos 60° y 62° (Curso sobre agua potable, 1999).

I.2.2. Características generales de la leche.

La leche es el primer alimento ingerido por los humanos durante los primeros meses de vida. La leche materna es gradualmente reemplazada (en algunos casos desde el primer momento) por la leche de vaca. Prácticamente la totalidad de la leche producida para consumo humano en el mundo occidental es la leche de ganado vacuno; de aquí, la generalización de llamar simplemente “leche” a la leche de vaca.

La leche está compuesta por una compleja mezcla de lípidos, proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales. La tabla 1 muestra la composición media de la leche producida por razas occidentales (Fennema, 1993):

Tabla 1. Composición media de la leche producida por razas occidentales.

<u>Componente</u>	<u>Porcentaje medio</u>
Agua	86,6%
Grasa	4,1%
Proteína	3,6%
Lactosa	5,0%
Ceniza	0,7%

La proteína es de alta calidad nutritiva. Se clasifican en caseínas y proteínas del suero, fácilmente separables por precipitación ácida o coagulación con cuajo. Actualmente ambas fracciones se destinan a la producción de alimentos.

Los triglicéridos constituyen el 97-98% de los lípidos totales. La lipólisis de los mismos ocurrida durante el almacenamiento ocasiona la disminución de su concentración en leche, provocando un aumento de la cantidad de ácidos grasos libres y de mono y diglicerol. La fracción lipídica presenta mayor variabilidad composicional que el resto de los componentes de la leche. Los factores ambientales, como la dieta, influyen directamente en su composición.

Las sales presentes en la leche contienen principalmente calcio, magnesio, potasio, citratos y bicarbonatos de sodio, cloruros y fosfatos. Están distribuidas entre la fase soluble y la fase coloidal. La contribución de las sales y la lactosa a la osmolalidad necesaria para el ajuste de la presión osmótica entre la leche y la sangre hace que estos componentes sean los menos variables del sistema.

Por otro lado, la leche es una excelente fuente de riboflavina y vitamina B₁₂ y una fuente adecuada de vitamina A, tiamina y equivalentes niacina. La vitamina C puede quedar retenida en una cantidad importante si se aplica un pocesamiento adecuado.

I.3 Metabolización del arsénico.

Las especies de arsénico inorgánicas se metabolizan en el medio ambiente a través de una metilación biológica, cuyo resultado conduce a una transformación a las formas orgánicas MMA, DMA, arsenozúcares, arsenobetaína y arsenocolina. Hasta comienzos de la década pasada, los estudios en el tema mostraban a la biotransformación del arsénico inorgánico como un mecanismo de detoxificación, ya que las formas inorgánicas más tóxicas disminuyen a expensas de la formación de organoarsenicales con supuesta menor toxicidad (Chaterjee et al., 1995). Sin embargo, la ausencia de arsenicales metilados en la orina de los monos marmoset y chimpanzee (Vather et al., 1982), sumado a investigaciones recientes que clasifican al DMA como un probable carcinógeno humano y la mayor toxicidad encontrada para el MMA(III) respecto del MMA(V), siendo que el primero procede al último en la cadena de metilación, son causas suficientes para que actualmente la biometilación del arsénico inorgánico no se considere un proceso de detoxificación (Vasken Aposhian et al., 1999).

I.3.1. Biometilación en sistemas acuáticos.

La biometilación de los compuestos de arsénico inorgánico en aguas resulta en cantidades trazas de MMA y DMA. Mientras que la reducción de As(V) a As(III) es una reacción químicamente controlada (tanto en suelos aeróbicos como anaeróbicos), la metilación de As(III) a MMA puede considerarse controlada por microorganismos. La aparente existencia de una concentración límite de As(III) a partir de la cual se produce microbiológicamente MMA, podría influir indirectamente sobre la relación entre As(III) y As(V). La complejidad de estos procesos constituye un problema a la hora de la interpretación de los datos (Haswel, 1985).

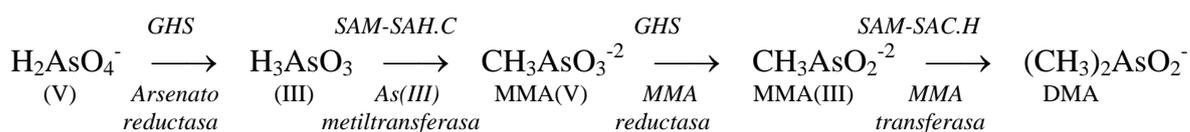
I.3.2. Biometilación en mamíferos.

Los primeros estudios sobre la transformación biológica del arsénico inorgánico demostraron la capacidad de los hongos para convertir arsénico inorgánico a sus derivados MMA(V) y DMA (Challenger, 1951). Años más tarde, se iniciaron los estudios en sistemas mamíferos a través de la especiación del arsénico urinario en un grupo de humanos. Los resultados obtenidos mostraron en este fluido biológico mezclas de DMA, MMA, As(V), As(III) y fueron el punto de partida para la investigación de la biometilación del arsénico inorgánico en mamíferos (Vather, 1994).

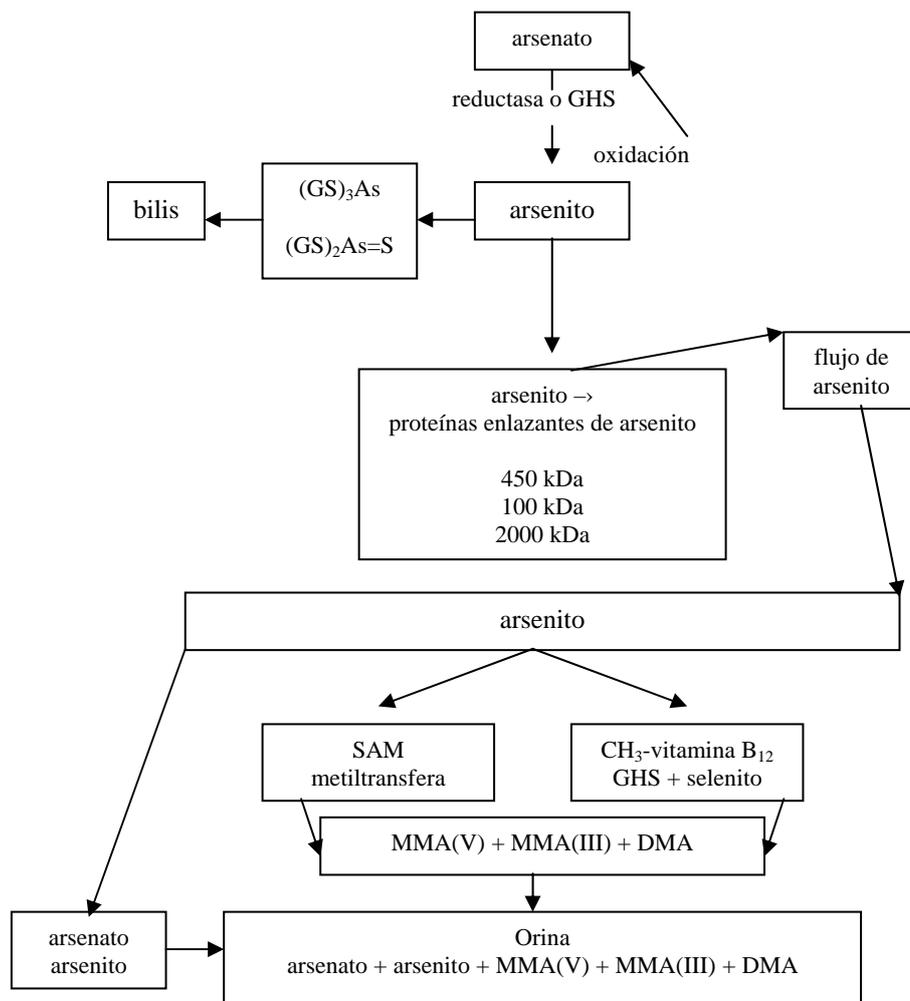
El arsenato y el arsenito son interconvertibles. La administración de uno de ellos resulta en la aparición del otro en la orina. El arsenato es reducido a arsenito enzimáticamente por reductasa y no enzimáticamente por GSH (glutatiol). La metilación se produce vía SAM (S-

adenosilmetionina) y metiltransferasas. La figura 1 muestra la secuencia con soporte científico para la biotransformación del arsénico inorgánico en mamíferos.

Figura 1. Biometilación del arsénico inorgánico en mamíferos.



La metilación no enzimática procede vía metilvitamina B₁₂, GHS y selenito (sólo demostrada *in vitro*). La concentración de arsénico en la bilis aumenta con la cantidad de GHS y selenio. Recientemente se ha detectado la presencia de un componente de selenio, arsénico y glutatiol en bilis de conejo. Este compuesto, llamado compuesto de Gailer, explica por primera vez el mecanismo por el cual el selenio previene la intoxicación por arsénico. Otra forma de decrecimiento de la toxicidad del arsénico es por enlaces a proteínas. Se han encontrado 3 proteínas que enlazan arsenito en el hígado de conejo. Ellas son la 450 kDa, 100 kDa y 2000 kDa. Estas proteínas actuarían como reservorios de arsenito previniendo la intoxicación. Cuando estos reservorios están saturados del analito aparece un flujo de arsenito. Esto explicaría por qué las especies de arsénico metiladas no aparecen en la orina inmediatamente después a la exposición al arsénico. La figura 2 muestra el mecanismo de detoxificación sugerido por Vasken Aposhian y sus colaboradores, el cual propone el enlace con proteínas como el verdadero mecanismo de detoxificación del arsénico inorgánico, aunque la clarificación de estos mecanismos requiere aún mucho esfuerzo, especialmente en el área de la biología molecular.

Figura 2. Diagrama de flujo para la detoxificación del arsénico inorgánico.

I.4. El arsénico como agente causante de enfermedades.

La toxicidad del arsénico frecuentemente se conoce por los incidentes de envenenamiento y su uso medicinal. Sin embargo informes epidemiológicos de cánceres relacionados al arsénico despertaron el interés hacia las exposiciones crónicas; el caso más estudiado a nivel mundial ocurrido en Taiwan (concentraciones de arsénico superiores a 600 $\mu\text{g/L}$), asocia los niveles de

arsénico en agua de bebida al incremento de cáncer de piel y cánceres internos en las poblaciones expuestas (Tseng et al., 1961). También se observaron en estas poblaciones otros efectos no cancerosos tales como pigmentación alterada de la piel e hiperqueratosis. Los estudios epidemiológicos realizados indican que la carcinogenicidad proviene tanto del arsénico que ingresa al organismo por vía de ingestión como de inhalación, aunque su modo de acción es aún incierto. Investigaciones recientes realizadas en Salta (Argentina) mostraron evidencias de cáncer de vejiga asociado con exposiciones al arsénico de aguas de bebida (Hopenhayn-Rich et al., 1996). Estudios llevados a cabo en Inglaterra (Cuzik et al., 1992) y Japón (Tsuda et al., 1990) contribuyeron a las evidencias de asociación entre la ingesta de arsénico y el cáncer de vejiga.

El arsénico es la única sustancia conocida para la cual existen evidencias de riesgo de cáncer por ambas vías (ingestión e inhalación). Por otro lado, también es el único carcinógeno para el cual se demostró claramente que la exposición a través del agua de bebida sería responsable de cáncer en humanos. La U.S. EPA clasificó al arsénico como carcinógeno del Grupo A. Esta designación se usa cuando existe evidencia suficiente, generalmente a partir de estudios epidemiológicos, para soportar una asociación causal entre la exposición a un agente y enfermedades cancerosas en humanos.

I.5. Estado actual de la legislación para arsénico.

I.5.1. Arsénico en agua de bebida.

Las Guías para la Calidad del Agua Potable publicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1985 y revisadas en 1995, recomiendan establecer normas nacionales que prioricen

los componentes químicos con presencia probable debido a las características geológicas de la región y/o las actividades humanas desarrolladas en la misma. El Código Alimentario Argentino Actualizado en su Capítulo XXIII: Bebidas Hídricas, Agua y Agua Gasificada establece 0,05 mg/L como valor máximo de arsénico en estos rubros, sin especificar la forma química en la que se encuentra. El Anexo A de la Ley 11200 de la provincia de Santa Fe establece los límites para agua potable con vigencia en la provincia y asigna al arsénico un límite obligatorio de 0,100 mg/L y un límite recomendado de 0,050 mg/L. Por su parte, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria dependiente del Ministerio de Agricultura, Pesca y Ganadería de la Nación Argentina (SENASA) sugiere como límite provisorio a partir de Enero del 2000, 0,2 mg/L de arsénico para establecimientos rurales o tambos.

En general, tanto las normas europeas como las americanas, van adoptando nuevos valores de concentración máxima admisibles para los distintos componentes disueltos en agua a medida que se profundiza en el conocimiento (Curso sobre agua potable, 1999). El estándar de agua de bebida de U.S. EPA bajo la Ley de Seguridad de Agua de Bebida de ese país (SDWA) es 50µg/L para arsénico. Este nivel fue desarrollado en 1942 por el Servicio de Salud Pública de E.E.U.U. (PHS) sin bases metodológicas en la evaluación del riesgo. Para su determinación se utilizaron datos de toxicidades agudas y a corto tiempo asociadas con altos niveles de arsénico consumido. El arsénico dietario se estimó en 900 µg/día, por lo que un consumo de 2 litros por día de agua de bebida conteniendo 50 µg/L de arsénico se consideró responsable de aproximadamente el 10% del total de arsénico ingerido. Este valor de 50 µg/L de arsénico en agua de bebida se estableció como nivel máximo permitido en protección de la salud pública. Las Reformas de la SDWA del año 1996 impulsaron el desarrollo de un plan de investigación del arsénico con la finalidad de revisar el MCL y establecer la reglamentación final para Enero del 2001. La propuesta de U.S. EPA en respuesta a este requerimiento fue presentada

públicamente el 24 de Mayo del 2000 y consiste en la reducción del estándar de arsénico a 5 $\mu\text{g/L}$. Para este plan, se eligió como formato el paradigma evaluación del riesgo/caracterización del riesgo, ya que la evaluación del riesgo puede considerarse como un acercamiento sistemático para analizar las fuentes de variabilidad e incerteza científica (Plan Research for Arsenic in Drinking Water, U. S. EPA, 1998).

El análisis de la evaluación del riesgo consta de cuatro partes: la identificación del riesgo, la evaluación de la relación dosis/respuesta, la evaluación de la exposición y la caracterización del riesgo. La identificación del riesgo involucra la descripción de efectos potenciales (por ejemplo, enfermedades a corto tiempo, cáncer, efectos reproductivos) que “podrían” ocurrir debido a la exposición al arsénico. La evaluación de la dosis respuesta determina su toxicidad al describir la relación entre la cantidad de exposición y la magnitud del perjuicio en humanos. La evaluación de la exposición describe la naturaleza y tamaño de las poblaciones expuestas y la magnitud y duración de la exposición; también incluye la descripción de las vías de transporte del arsénico en el medio ambiente (por ejemplo, aire, aguas, alimentos) y las rutas de entrada al individuo (oral, dérmica o de inhalación). La caracterización del riesgo utiliza los datos proporcionados por los puntos anteriores y permite obtener conclusiones generales sobre el riesgo potencial de exposición al arsénico al mismo tiempo que admite las limitaciones de las mismas; además estima la probabilidad de que los individuos de una población experimenten cualquiera de los efectos adversos asociados con el arsénico, bajo condiciones de exposición conocida o esperadas.

I.5.1.1. Determinación del Nivel Máximo Global de Contaminante (MCLG).

El MCLG se define como el nivel de contaminante que no producirá efectos adversos para la salud, incorporando un margen de seguridad. Acorde a la política de U.S. EPA, para contaminantes con fuerte evidencia de carcinogenicidad vía agua de bebida (como el arsénico), el MCLG se establece en un valor 0; para contaminantes con limitadas o sin evidencias de carcinogenicidad, el MCLG se basa en los efectos no cancerosos utilizando la Dosis de Referencia (RfD). La RfD es determinada a partir del nivel más bajo o inexistente de efectos adversos. Si el contaminante muestra una evidencia limitada de carcinogenicidad, se aplica al RfD un factor igual a 10 para el cálculo de MCLG. Bajo estas consideraciones, se define al MLC como el MCLG “posible”, considerando la mejor tecnología disponible, técnicas de tratamiento y justificación de costos luego de comprobar los resultados bajo condiciones de campo.

I.5.2. Arsénico en leche.

En 1973 la Comisión Mixta FAO/WHO estableció la ingesta diaria máxima de arsénico en 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso de individuo. La misma comisión disminuyó este nivel a 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso de individuo. Desde 1961 FDA realiza estudios sistemáticos del contenido de arsénico en alimentos. Los datos más recientes incluyen seguimientos realizados durante los períodos transcurridos desde Abril de 1982 a Abril de 1988 y desde Junio de 1988 a Abril de 1990 (U.S. FDA, 1992). Se analizó el contenido de arsénico de 234 alimentos; los alimentos fueron separados en 11 categorías y la ingesta dietaria total se promedió para tres grupos de edades (infantes, jóvenes y adultos). Se estimaron ingestas de arsénico total de 21,5; 27,6 y 52,6 $\mu\text{g}/\text{día}$ por alimentos para infantes, jóvenes y adultos, respectivamente, considerando los valores promedio de consumo diario para las 11 categorías. Estos valores podrían determinar una nueva revisión de la ingesta diaria máxima. En cuanto a los niveles de arsénico total permitidos para

leche, FIL-IDF (Federación Internacional de Lechería) estableció en 1986 valores menores a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras que el límite establecido en nuestro país por SENASA es de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

I.6. Métodos existentes para la determinación analítica del arsénico.

Los métodos instrumentales implementados para la cuantificación de arsénico en aguas y alimentos comprenden técnicas de espectrometría de absorción y emisión atómica, absorción molecular, fluorescencia atómica y de rayos X, análisis por activación neutrónica y métodos electroquímicos (voltametría de redisolución anódica y polarografía de pulso diferencial). Los más usados son los métodos de espectrometría atómica, ya sean de absorción o emisión atómica, acoplados a generación de hidruros (HG AAS, HG ICP AES), métodos electrotérmicos con horno de grafito (ET-AAS) y plasma (ICP AES). Para la determinación de arsénico en aguas se utiliza también la detección por ICP MS.

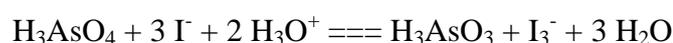
En la espectrometría atómica con generación de hidruros las soluciones acuosas de muestra se tratan con un agente reductor después de la acidificación para generar el hidruro volátil covalente. El hidruro es transportado por un gas inerte (normalmente Ar o N_2) al sistema de atomización (tubos de cuarzo calentados eléctricamente o por llama de aire-acetileno, tubo de horno de grafito, llamas de difusión de gas hidrógeno inerte o espectroscopía tal como ICP). El hidruro descompone en los átomos metálicos gaseosos y el elemento es medido por AAS o AES.

I.6.1. Determinación de arsénico en aguas subterráneas.

I.6.1.1. Determinación de arsénico total.

Se define el arsénico “total” como el arsénico solubilizado en la muestra después de una digestión con ácidos minerales en caliente (Plan Research for Arsenic in Drinking Water, U. S. EPA, 1998). Sin embargo, la ausencia de compuestos organoarsenicales en aguas subterráneas hace posible la determinación en frío y sin digestión del arsénico inorgánico total presente en la muestra. El As(III) y As(V) inorgánicos presentan sensibilidades muy diferentes cuando se determinan mediante generación de hidruros por espectrometría de absorción atómica. La sensibilidad del As (V) es menor a la del As(III), dependiendo de la acidez de la solución y de la concentración del agente de generación de hidruros. Por lo tanto, se sugiere la prerreducción de la muestra para reducir todo el arsénico presente a As(III) (Guo, et al., 1990).

El ioduro de sodio o potasio es el prerreductor más utilizado:



La eficiencia de esta reacción reversible depende fuertemente de la concentración de ioduro, de la acidez de la muestra y de la temperatura, como así también de la matriz de la muestra y de la presencia de oxidantes. Debido a la interrelación de los parámetros pueden existir varias combinaciones de condiciones experimentales óptimas. Otro prerreductor utilizado es la mezcla ioduro de potasio-ácido ascórbico; este ácido orgánico en concentraciones de 0,1 a 5% m/v reduce el ioduro resultante y mejora la estabilidad de las soluciones de muestra.

I.6.1.2. Determinación de As(III) y As(V) inorgánicos.

La especiación se define como la separación, identificación y cuantificación de las formas químicas del arsénico (Plan Research for Arsenic in Drinking Water, U. S. EPA, 1998). Esta

separación puede ser entre especies inorgánicas y orgánicas o, más complejo, entre las especies arsenicales individuales; el grado adecuado de especiación depende de la aplicación. La diferencia analítica entre las metodologías para arsénico total y las basadas en especiación es que las últimas preservan las formas químicas y separan las especies individuales antes de la detección. Esta diferencia analítica implica la necesidad de asegurar la integridad de las especies desde el muestreo hasta la detección. EPA, FDA, USGS, ASTM y SM aún no establecen metodologías de especiación que garanticen este aspecto.

Por su parte, EPA considera que los reportes referidos a la especiación de arsénico en agua, fluidos biológicos y alimentos reflejan el avance en sistemas de separación y detección innovadores, pero pocas veces reúnen todos los requisitos necesarios para formular una metodología analítica completa que contemple los siguientes aspectos: 1) Qué protocolo de muestreo aseguraría la integridad de las especies? 2) Cómo puede eliminarse la matriz sin destruir la información de las especies? 3) Qué componentes de una matriz causan interferencias? Para ello deben plantearse todas las etapas del análisis de especiación: preservación de la muestra, separación de las especies y detección.

Preservación de la muestra.

El As(III) es sensible a la oxidación durante la conservación de la muestra. El objetivo principal de esta etapa es evitar la oxidación del As(III) a As(V) desde el muestreo hasta su análisis en el laboratorio. El método de preservación más utilizado en muestreos de agua subterránea consiste en filtrar la muestra recolectada en un recipiente limpio, enjuagado tres veces como mínimo con el agua de muestra, con un filtro de diámetro de poro 0,45 μm y acidificar la muestra filtrada con ácido clorhídrico concentrado en una relación de 1 ml en 100 ml de muestra. Luego

refrigerar el recipiente conteniendo la muestra acidificada a menos de 4 °C (SOP-37, EPA, 1997). Bajo estas condiciones (pH <2 y temperatura < 4 °C) la actividad microbiana es suficientemente inhibida .

Sin embargo, la oxidación de As(III) puede continuar debido a constituyentes inorgánicos de las aguas subterráneas con propiedades oxidantes. El Fe(III) y el Mn(IV) surgen como posibles oxidantes por comparación de potenciales redox, aunque sólo la presencia de Fe(III) se considera un factor de riesgo en aguas subterráneas cuyas características reductoras permiten la existencia de As(III). Este factor puede ser eliminado con el agregado de una cantidad en exceso de FeCl₂ (Borho y Wilderer, 1997).

Separación de las especies.

Las características de los compuestos de arsénico inorgánicos y orgánicos hacen posible su separación por diferentes técnicas analíticas (Alfassi, 1994):

1. Especiación de arsénico inorgánico (arsenito y arsenato) por extracción con solventes. El As(III) solo puede extraerse a partir de un medio ácido utilizando un medio acomplejante (pirrolidínditiocarbamato, sec-butilditiofosfato). El As(V) puede calcularse como la diferencia de las fracciones obtenidas con y sin adición de un agente reductor.
2. IEC convencional para la separación de varias especies de arsénico mediante columnas de intercambio iónico y aniónico. Se pueden separar As(III), As(V), MMA y DMA.

3. Técnicas de cromatografía líquidas más sofisticadas como HPLC que ofrecen mejor resolución de las especies de arsénico y el interfaseado con detectores apropiados. Esta técnica cromatográfica permite la separación de As(III), As(V), MMA y DMA.
4. La generación de hidruros por pH selectivo se utiliza frecuentemente para la separación de As(III) y As(V) inorgánicos. A pH 5 sólo el As(III) es convertido a arsina, mientras que a pH 1 el As(V) pasa a arsina conjuntamente con el As(III). El As(V) puede determinarse como la diferencia entre arsénico inorgánico total y As(III).
5. La colección en trampa fría es una extensión del método de generación de hidruros por pH selectivo. No sólo se colecta arsina, sino también monometilarsina y dimetilarsina cuando se trabaja a pH 1. El calentamiento selectivo hace posible la volatilización secuencial de las arsinas.
6. Los métodos de cromatografía gaseosa permiten la separación de arsenicales luego de técnicas de derivatización, por ejemplo a sus dietilditiocarbamatos, complejos 2,3-dimercaptopropanol o metilglicolatos.

I.6.2. Determinación de arsénico total en leche.

Muy pocos laboratorios en el mundo realizan determinaciones confiables de elementos trazas en materiales biológicos, mientras que una gran cantidad encuentran dificultades para mantener la precisión y exactitud al menos en un rango del 10 al 20%, aún empleando técnicas analíticas que ofrecen alta sensibilidad y muy bajos límites de detección. Esta situación indica que la sensibilidad y detección excelentes de los instrumentos actuales no siempre son la solución al

problema de la precisión y exactitud y, por lo tanto, de la generación de datos confiables en el área multidisciplinaria de la investigación de elementos traza en materiales biológicos. Las causas de esta inconsistencia analítica posiblemente obedecen al desconocimiento de interferencias de matriz, defectos en la preparación de muestras y estándares, procedimientos de calibración inadecuados, cambios no controlados en el estado de oxidación del arsénico, blancos de reactivos significantes y generalizaciones de las investigaciones (Alfassi, 1994; Dedina y Tsalev, 1995).

El dinamismo de los sistemas biológicos constituye otra fuente importante de error al momento de la interpretación de los datos generados. En el caso particular de la leche de vaca, las variedades genéticas, la época del año en que se efectúa el muestreo, el período de lactación del animal y la composición de la alimentación son algunas de las causas que pueden originar inconsistencia ante la comparación de resultados analíticos. La variación del contenido proteico de la leche influye particularmente en el contenido de arsénico debido a los enlaces entre este elemento y las proteínas (Alfassi, 1994). El avance en el desarrollo de materiales de referencia de muestras biológicas es un paso muy importante para la validación de las metodologías analíticas. No obstante, los materiales de referencia de muestras biológicas existentes hasta el momento no cubren las expectativas de los químicos analistas de elementos traza.

La información existente acerca de la determinación de arsénico en leche es muy escasa (Cervera et al., 1994); las limitaciones en la diferenciación de compuestos de arsénico en fluidos biológicos sumado a las bajas concentraciones de arsénico reportadas en leche hacen que el parámetro determinado sea solamente el contenido de arsénico total (Ulman et al., 1998). Las muestras de leche pueden colectarse manualmente o por bombas plásticas en condiciones de extrema limpieza. Son muy susceptibles al crecimiento bacterial si no se congelan. Se debe

tener sumo cuidado para seleccionar la fase de interés o para que las fases estén apropiadamente mezcladas.

Las formas convencionales de mineralización de muestra consisten en la eliminación de la materia orgánica por vía húmeda y vía seca. La mineralización por vía húmeda utiliza un ataque ácido en caliente. Hay diversas opiniones acerca de las interferencias producidas por los ácidos oxidantes utilizados en este tipo de digestión, ya que dificultan la reducción posterior del As(V) presente en la muestra digerida al estado de oxidación As(III), más sensible para la formación del hidruro. La mezcla ácida más utilizada es $\text{HNO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4\text{-HClO}_4$. La digestión por vía seca consiste en la eliminación de la materia orgánica mediante la calcinación de la muestra a 550 °C. El uso de fundentes como MgO y/o $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ es crítico debido a la volatilidad elevada del AsCl_3 (Cervera et al., 1995), posible de formarse por los cloruros presentes en la muestra.

II. METODOS ANALITICOS

La determinación de arsénico total y sus especies inorgánicas en aguas subterráneas, como así también la cuantificación de arsénico total en leche de vaca, se estudiaron durante el presente trabajo a los fines de aportar metodologías que permitan obtener resultados confiables. La generación de hidruros mediante el uso de NaBH_4 y la espectroscopía de absorción atómica de llama se seleccionaron como técnica de reducción del analito y detección, respectivamente. La introducción de un sistema automático de inyección de flujo como modo de inserción de muestra le confiere al trabajo características innovadoras para el análisis de alimentos, donde prácticamente esta técnica no ha sido utilizada. La espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros e inyección de flujo es indudablemente la técnica más sensible y aprovechable para la determinación y especiación de arsénico (Dedina y Tsalev, 1995). El siguiente cuadro resume las metodologías planteadas para cada una de las determinaciones:

Etapa	As total en aguas subterráneas	As(III) inorgánico en aguas subterráneas	As total en leche
Tratamiento de la muestra	<u>Prerreducción:</u> solución mezcla de KI 5% - $\text{C}_6\text{O}_8\text{H}_6$ 5%.	<u>Preservación:</u> Fe(II) y HCl. Conservación a menos de 4 °C.	<u>Digestión vía seca:</u> fundente solución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 50%. <u>Prerreducción:</u> solución de KI 15%.
Determinación analítica instrumental	<u>Modo de entrada de muestra:</u> inyección de flujo. <u>Generación del hidruro:</u> reducción con NaBH_4 en medio ácido. <u>Detección:</u> FAAS con tubo de cuarzo.	<u>Modo de entrada de muestra:</u> inyección de flujo. <u>Generación del hidruro:</u> reducción selectiva por concentraciones variables de NaBH_4 en medio ácido. <u>Detección:</u> FAAS con tubo de cuarzo.	<u>Modo de entrada de muestra:</u> inyección de flujo. <u>Generación del hidruro:</u> reducción con NaBH_4 en medio ácido. <u>Detección:</u> FAAS con tubo de cuarzo.

En los puntos siguientes se presenta una descripción somera de cada una de las técnicas

implementadas en el desarrollo del presente trabajo de tesis.

II.1. Espectrometría de absorción atómica.

La espectrometría de absorción atómica es una técnica de análisis basada en la capacidad de los átomos al estado libre de absorber energía de magnitud apropiada y pasar de su estado energético basal a un estado excitado, promoviendo un electrón externo a una configuración menos estable. El retorno inmediato y espontáneo a su 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 para la cuantificación mediante absorción atómica es la cantidad de luz, a una longitud de onda resonante, que absorbe un conjunto de átomos ubicados en el paso de luz. Cuanto mayor es el número de átomos, mayor es la cantidad de luz absorbida de manera predecible. La absorbancia es el término más conveniente para caracterizar la absorción de luz, ya que este parámetro mantiene una relación lineal con la concentración. La Ley de Beer define la relación:

$$A = abc$$

donde:

“A” es absorbancia;

“a” es el coeficiente de absorción (constante característica de las especies absorbentes);

“b” es la longitud del paso óptico interceptado por las especies absorbentes; y

“c” es la concentración del analito en la muestra.

Cuando se miden absorbancias de soluciones estándar conteniendo concentraciones conocidas del analito y se registran los datos de absorbancia en función de las concentraciones se establece la relación de calibración. Luego, al medir las absorbancias de soluciones desconocidas se puede determinar su concentración sobre la curva de calibración. La incorporación de microcomputadoras en la instrumentación moderna permite la calibración aún en la zona no lineal.

II.2. Generación de hidruros.

Los elementos arsénico, antimonio, titanio, selenio, bismuto y plomo pueden separarse a partir de una solución de muestra mediante reacciones de reducción en medio ácido, pasando a sus formas de hidruros volátiles (AsH_3 , SbH_3 , SnH_4 , SeH_2 , BiH_3 , TeH_2 y PbH_4). Esta técnica se utiliza ampliamente en la determinación de trazas de estos elementos en agua y alimentos.

La generación de hidruros por reacciones químicas ácidas con detección espectrométrica de absorción atómica implica los siguientes procesos (Dedina y Tsalev, 1995):

- liberación del hidruro a partir de la solución de muestra, es decir, la conversión de un analito en una muestra acidificada a hidruro y su transferencia a la fase gaseosa;
- transporte del hidruro liberado por un flujo de gas carrier a un atomizador.

La eficiencia de la generación de hidruros, β_g , es la fracción de analito transportado en la forma de hidruro al atomizador:

$$\beta_g = \frac{N_0}{c_0 V_s}$$

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 inyectado de muestra.

La eficiencia del proceso completo de generación de hidruros, β_g , se define de la siguiente manera:

$$\beta_g = \beta_r + \beta_t$$

donde:

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

$$\beta_r = \frac{N_{\text{liberado}}}{c_0 V_s}$$

donde N_{liberado} es el número total de átomos del analito liberados a partir de la muestra líquida en la forma de hidruro;

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

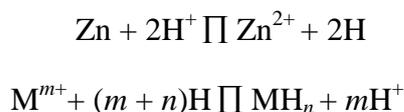
$$\beta_t = \frac{N_0}{N_{\text{liberado}}}$$

El gas carrier debe ser inerte respecto al hidruro. Los gases más comúnmente utilizados son argón, nitrógeno, helio e hidrógeno, dependiendo su elección de la economía óptima y la performance del atomizador. Por otro lado, el hidrógeno liberado durante la generación del hidruro cumple con la función adicional de dirigir al hidruro desde la mezcla de reacción hasta la fase gaseosa, ya que la concentración del hidruro en la mezcla de reacción es mucho más baja que la solubilidad del hidruro. El flujo de gas carrier debe ser suficientemente alto para compensar las fluctuaciones del flujo total de gas debidas a la producción discontinua de

hidrógeno.

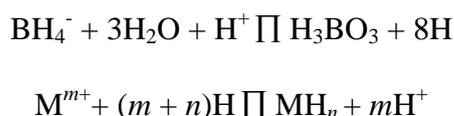
II.2.1. Liberación del hidruro.

Las condiciones óptimas para la liberación del hidruro dependen de la identidad del analito y su valencia. La técnica más antigua involucra un sistema metal/ácido (generalmente Zn/HCl), para producir hidrógeno naciente necesario para la reducción del analito a hidruro:



donde m y n son las valencias del analito M en la solución de la muestra y en el hidruro, respectivamente. Esta reacción se conoce con el nombre de reacción de Marsh. También se estudió la generación de arsina por la reducción del analito con aluminio metálico en un medio alcalino.

Sin embargo, la alternativa más utilizada para la formación de hidruro es la reacción con borohidruro en medio ácido:



La descomposición del borohidruro entre pH 3,5 y 14 es una reacción de segundo orden con una constante de velocidad (30 °C) $1,22 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ l min}^{-1}$. Por lo tanto, a $\text{pH} \leq 1$ la descomposición del borohidruro se completa en unos pocos microsegundos. El hidrógeno naciente resultante reduce el analito a hidruro de acuerdo a la reacción de Marsh. El sistema $\text{BH}_4^-/\text{ácido}$ es casi exclusivamente usado ya que es superior al método de reducción metal/ácido con respecto a la eficiencia de reducción, tiempo de reacción, contaminación del blanco y la aplicabilidad a los elementos de interés. El agente más utilizado consiste en soluciones acuosas de NaBH_4 o KBH_4

estabilizadas con NaOH. El borohidruro es el agente reductor más usado para la determinación de arsénico en alimentos, pescado, muestras biológicas, agua y materiales de referencia por HG AAS (Cervera y Montoro, 1994).

Las soluciones de borohidruro son muy inestables y aún en solución alcalina descomponen lentamente. Es aconsejable la filtración o, preferentemente, la ultrafiltración por membrana de la solución. Si bien la descomposición es menor en soluciones de álcalis más concentradas, grandes excesos de NaOH podrían ser perjudiciales debido a un efecto de neutralización y blancos de reactivos más altos. Si las soluciones de reductor se estabilizan en medio alcalino, no es necesaria la preparación diaria fresca.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron soluciones de NaBH₄ estabilizadas en solución de NaOH 0,025%. Dado que el método implementado para la separación de las especies de arsénico inorgánicas en agua subterránea consistió en una reducción selectiva por concentraciones variables de NaBH₄, la posible descomposición de este agente reductor constituyó un punto crítico durante las experiencias. Por lo tanto, la preparación de las soluciones de NaBH₄ en medio alcalino fue diaria.

II.2.2. Transporte del hidruro.

El hidruro liberado a partir de la solución de muestra es transportado al atomizador por el flujo del gas carrier. Las pérdidas en el transporte de hidruros pueden hacerse despreciables en un sistema optimizado. El aumento de velocidad del flujo de gas, la disminución del diámetro del tubo y el tamaño del recipiente del generador minimizan la magnitud de la interacción del hidruro con las superficies.

El flujo de gas transporta conjuntamente con el hidruro una cierta cantidad de spray de mezcla de reacción. La condensación de vapor de agua en la línea de transferencia debe evitarse ya que puede reducir la eficiencia del transporte del hidruro debido a la alta solubilidad de algunos hidruros en agua, deteriorando la sensibilidad y la reproducibilidad de las medidas. El pasaje de gotas de líquido a la línea de transferencia puede evitarse colocando membranas en los separadores gas-líquido, como las empleadas en el sistema de transporte del generador de hidruros utilizado en el desarrollo del presente trabajo.

II.2.3. Métodos 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: 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 a un 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 el sistema metal/ácido usado entonces era relativamente lento de manera que podía tomar varios minutos para la reacción. Obviamente, esto fue ventajoso para coleccionar los hidruros liberados y luego arrastrarlos al atomizador en el menor tiempo posible.

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 3 métodos

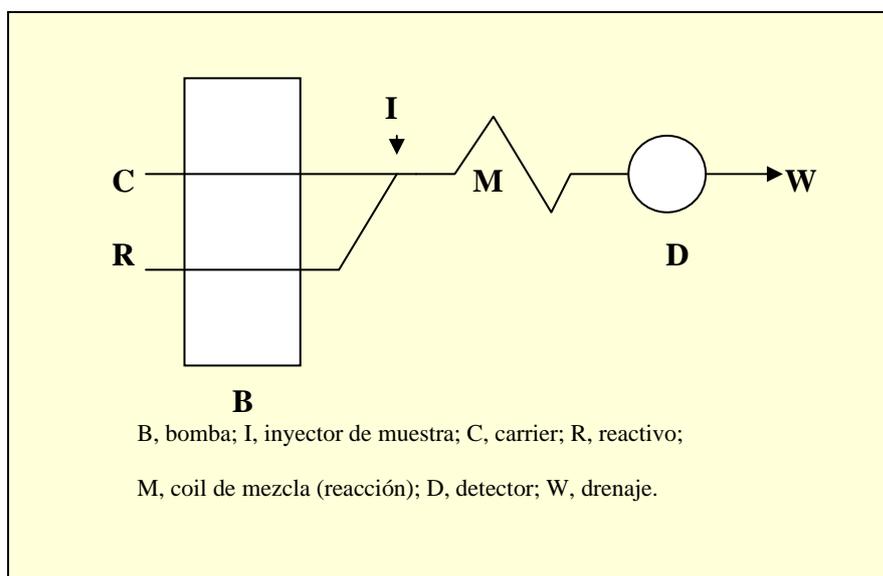
de transferencia directa: flujo continuo e inyección de flujo, como métodos automatizados, y sistemas batch. Para el desarrollo del presente trabajo de tesis se utilizó un sistema de análisis por inyección de flujo con un generador de hidruros en línea.

II.3. Inyección de flujo. Aplicabilidad en la generación de hidruros.

La espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros indudablemente es una de las técnicas más populares para la determinación de cantidades trazas de arsénico, selenio, bismuto, antimonio y otros elementos formadores de hidruros en matrices de muestras varias.

El concepto de inyección de flujo es introducido por Ruzicka y Hansen como una nueva técnica de análisis a fines de 1990, después de dieciséis años de desarrollo. En la primera edición de su monografía, “Flow Injection Analysis”, publicado en 1981, los autores definen la inyección de flujo como *un método basado en la inyección de una muestra líquida en una corriente continua no segmentada en movimiento de un líquido adecuado. La muestra inyectada forma una zona que es transportada a un detector que registra continuamente la absorbancia, potencial de electrodo, o cualquier otro parámetro físico a medida que éste cambia continuamente como resultado del pasaje de material de muestra a través de una celda de flujo y la técnica está basada en una combinación de inyección de muestra, dispersión controlada y medida de tiempo exacto* (Fang, 1993). La figura 3 muestra los componentes básicos de un sistema inyección de flujo para esta definición:

Figura 3. Esquema básico de un sistema de análisis por inyección de flujo.



Años más tarde, esta primera definición debió ser modificada por Ruzicka y Hansen, ya que publicaciones posteriores revelaron la invalidez de características anteriormente conferidas a la inyección de flujo, por ejemplo, la presencia de flujos segmentados por burbujas de hidrógeno cuando se aplicaba a sistemas de generación de hidruros. La revisión realizada por los autores define entonces la inyección de flujo como *una técnica de análisis de flujo no cromatográfico para análisis cuantitativo, realizada mediante zonas de reactivos y muestras manipuladas reproduciblemente a través de una medida de tiempo exacto en una corriente de flujo bajo condiciones termodinámicas no equilibradas.*

Esta definición marca la principal diferencia entre la inyección de flujo y el método de flujo continuo: el modo de manipulación de muestras y/o reactivos, ya que en el último la introducción de muestra es continua, pero principalmente porque las medidas se realizan en condiciones de equilibrio termodinámico estable.

En el análisis por inyección de flujo para la generación de hidruros, un flujo constante de carrier

ácido, f_s , se mezcla en forma continua con un flujo constante de solución de borohidruro; luego del punto de convergencia de ambas corrientes de fluido se inserta la entrada del gas carrier. Un volumen de la muestra se inyecta en la corriente de carrier ácido y al llegar al punto de convergencia entra en contacto con la solución de borohidruro. Líquido y gas son entonces separados en dos flujos de salida: el hidruro gaseoso arrastrado por hidrógeno y gas fluye al atomizador y el efluente líquido al drenaje. Como resultado, la velocidad total del flujo de gas es la suma de la velocidad del flujo de gas carrier y la velocidad del flujo del hidrógeno formado a partir de la descomposición del borohidruro:

$$F = F_o + f_B V_h$$

donde F_o es la velocidad del flujo de gas carrier expresada como flujo de volumen, 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 hidruro, $S_{(t)}$ (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 un volumen dado del separador y tubos de conexión al atomizador. Puede asumirse que esta dispersión sólo tiene lugar en la corriente de carrier ácido, es decir, antes del punto de convergencia con el flujo de solución de borohidruro. Sin embargo, alguna dispersión que pueda ocurrir después de este punto no invalida el tratamiento siguiente. 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:

$$s_{(t)} = c_{(t)} f_s$$

$$\int_0^{\infty} s_{(t)} dt = c_0 V_s$$

donde $c(t)$ es la concentración del analito en la corriente ácida en el punto de convergencia, c_0 es la concentración del analito en la muestra inyectada y V_s es el volumen de muestra inyectada. La forma gráfica de la función toma la forma de un pico no simétrico con un lado principal empinado y una cola baja.

La constante de tiempo característica, τ_s , de la función $s(t)$ aproxima el ancho de pico de la función a la media de su intensidad:

$$\tau_s = \frac{\int_0^{\infty} s(t) dt}{s_{max}}$$

$$\tau_s = \frac{c_0 V_s}{c_{max} f_s}$$

donde c_{max} y s_{max} son los valores máximos de las funciones respectivas. El grado de dispersión se cuantifica por el coeficiente de dispersión, D :

$$D = \frac{c_0}{c_{max}}$$

Estas dos ecuaciones permiten establecer la relación entre el coeficiente de dispersión y el ancho medio de la función de suministro de analito líquido en el punto de convergencia:

$$\tau_s = \frac{DV_s}{f_s}$$

La derivación de la función para el suministro de hidruro al atomizador requiere de la suposición de ciertos conceptos:

- Los componentes de la reacción (borohidruro y analito en la muestra) se mezclan en forma homogénea al inicio de la reacción.
- El volumen de la mezcla de reacción es igual al volumen de muestra.

- No hay cambios significativos de acidez, volumen o temperatura en la mezcla durante las reacciones producidas en el generador.
- El consumo de borohidruro es controlado por la reacción de formación del hidruro, es decir, por cada molécula de borohidruro se forman cuatro moléculas de hidrógeno. Como una consecuencia del punto anterior esta reacción es de pseudo-primer orden con constante de velocidad k_1 .
- La liberación del hidruro es un proceso de segundo orden con constante de velocidad k_2 . La magnitud de k_2 también es influenciada por la velocidad del gas carrier y el diseño empleado para el generador de hidruros.
- Durante el total del período de tiempo para la generación del hidruro hay 3 flujos de entrada constantes al generador de hidruros: flujo de borohidruro, flujo de la solución de la muestra y flujo de gas carrier.
- La mezcla de reacción que pasa a través del generador consta de segmentos aislados de origen sucesivos, cada uno de ellos con tiempo suficiente para todas las reacciones.
- El hidruro que entra al separador gas-líquido es liberado al volumen del separador sin ninguna demora.
- El hidruro liberado está bien mezclado en el volumen del separador gas-líquido, V_d .
- El tubo que conecta el separador gas-líquido con el atomizador tiene un volumen despreciable.

Todos estos puntos 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:

$$k_m = \frac{F}{V_d}$$

La ecuación para el número de átomos de analito presentes como hidruros en el volumen dado

del separador (N_d) es:

$$\frac{dN_d}{dt} = \beta_r s_{(t)} - k_m N_d$$

El primer término a la derecha de la ecuación describe la velocidad de liberación del hidruro al volumen dado del separador, el segundo término soporta la velocidad de remoción del hidruro a partir de un volumen dado. Evidentemente, el segundo término controla la función de suministro del hidruro, $S_{(t)}$:

$$S_{(t)} = \beta_r k_m N_d$$

Según las dos últimas ecuaciones, la función de suministro del hidruro puede ser expresada como:

$$S_{(t)} = \beta_r \beta_t k_m \int_0^t s_{(t')} e^{-k_m(t-t')} dt'$$

El suministro de analito en el punto de convergencia también puede compararse con la remoción del hidruro a partir del volumen dado del separador. De esta manera, la curva de la función de suministro de hidruro, podría aproximarse a la curva de función de suministro del analito líquido, $s_{(t)}$, para $\tau_s \gg 1/k_m$:

$$S_{(t)} = \beta_r \beta_t s_{(t)}$$

Finalmente, la función de suministro de hidruro $S_{(t)}$ en su punto máximo expresa la disminución de analito liberado como hidruro cuando aumenta la dispersión de la muestra inyectada en la corriente de carrier ácido:

$$S_{m\acute{a}x} = \frac{\beta_r \beta_t f_s c_0}{D}$$

Las ventajas más relevantes de la inyección de flujo son evidentes al momento del análisis y pueden resumirse de la siguiente manera:

- Alta velocidad de muestreo, 1-2 órdenes mayor que los procedimientos batch.
- Bajo consumo de muestra y reactivos, 1-2 órdenes menor que los procedimientos batch.
- Alta reproducibilidad.
- Sensibilidad y límite de detección 1-2 órdenes menor que los procedimientos batch.
- Bajo riesgo de contaminación por tratarse de sistemas de separación cerrados e inertes.
- Aumento de la selectividad mediante la discriminación cinética determinada por las condiciones no equilibradas termodinámicamente. Aumento de la tolerancia a iones metálicos interferentes por sistemas diseñados para favorecer las reacciones principales que generalmente son más rápidas, poca posibilidad de depósitos de metales reducidos acumulados o boruros del metal por la alta velocidad de flujo de muestra y reactivo a través del conducto de reacción (estos depósitos constituyen una fuente de interferencia importante en HG AAS).
- Escaso espacio físico en el laboratorio debido a su volumen reducido.

Por otro lado, la desventaja más importante de la inyección de flujo es, posiblemente, la fuente de error ocasionada en el análisis de muestras reales, dado que estándares y soluciones de muestra pueden tener velocidades de reacción diferentes (Fang, 1993)

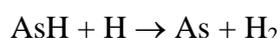
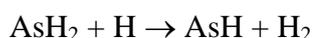
II.4. Atomización del hidruro.

Los atomizadores de hidruro deben cumplir con la conversión eficiente del hidruro de arsénico a átomos libres, independientemente de la composición de la muestra. Los átomos deben permanecer libres el mayor tiempo posible para alcanzar óptima sensibilidad en la medida. En la

espectroscopía de absorción atómica se pueden utilizar distintos tipos de atomizadores de hidruros: llamas de difusión de gas hidrógeno inerte, horno de grafito o atomizadores de tubo de cuarzo. En el desarrollo de este trabajo se utilizó un atomizador de tubo de cuarzo calentado externamente por una llama de aire-acetileno.

La composición química del sistema en el atomizador se puede caracterizar mediante cálculos de equilibrios termodinámicos, considerando que todas las reacciones que tienen lugar en el atomizador son suficientemente rápidas como para lograr el equilibrio en un tiempo menor al tiempo de residencia de los gases en el atomizador. Sin embargo, la composición de equilibrio calculada es sólo un límite de las tendencias del sistema. Para obtener exactitud en los cálculos, es importante considerar todos los productos de reacción posibles los cuales están presentes en una cantidad suficiente para influir sobre el balance de masa.

Los atomizadores de tubo de cuarzo calentados por llama de aire-acetileno constan de un tubo en forma de T alineado en el paso óptico del espectrómetro de absorción atómica. El brazo central de estos atomizadores cumple la función de liberar los hidruros transportados por el flujo de gas carrier hacia un tubo de atomización dispuesto en forma perpendicular al primero. Este tubo tiene un largo aproximado de 11 cm y un diámetro interno de 1 cm. 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. El mecanismo real de atomización del hidruro obedece a la interacción de los hidruros de arsénico con radicales H:



Dado que la probabilidad de formación de átomos de arsénico libres es proporcional al número de colisiones con radicales H, la eficiencia de la atomización local incrementa con el número creciente de radicales libres en el brazo de entrada al tubo T. Los hidruros no pueden ser atomizados en tubos de cuarzo calentados externamente en ausencia de hidrógeno. La descomposición del borohidruro garantiza su presencia en el atomizador. La arsina solamente puede ser atomizada si la relación estequiométrica O_2/H_2 es menor a 0.5.

II.5. Interferencias.

La determinación de arsénico por espectrometría de absorción atómica mediante generación de hidruros presenta dos clases de interferencias típicas: espectrales y no espectrales. Las interferencias espectrales se deben a la radiación absorbida por otras especies además de los átomos de arsénico libres. Las interferencias no espectrales se deben a la influencia de los constituyentes de la muestra sobre la señal del analito.

Las interferencias espectrales no son relevantes debido a la separación del analito a partir de la matriz. La corrección por absorción de background generalmente no es necesaria utilizando este tipo de atomizadores. La influencia relativa de las interferencias espectrales sobre la señal de arsénico depende de su concentración. En este caso, el método de adición estándar no contribuye a mejorar la exactitud y precisión de la medición analítica.

Las interferencias no espectrales pueden ocurrir en la fase líquida durante la formación del hidruro y su transferencia a partir de la solución (interferencia en fase líquida) o bien, pueden afectar el analito en fase gaseosa (interferencia en fase gaseosa). Las primeras se deben a cambios en la velocidad de liberación del hidruro (interferencia en la cinética de liberación).

Estas son causadas por especies interferentes presentes en la solución de la muestra. Las segundas son causadas por especies volátiles, generalmente por hidruros.

Generalmente las interferencias no espectrales son independientes de la concentración del analito, encontrándose en exceso respecto de éste. La independencia de la magnitud de estas interferencias respecto de la concentración de arsénico implica que puede utilizarse el método de adiciones estándar para minimizarlas. Sin embargo, éste sólo es aplicable cuando la interferencia no reduce mucho la señal observada. Otro método de minimización de interferencias no espectrales consiste en diluir la muestra, aunque sólo es posible para muestras con alto contenido de arsénico.

Interferencias no espectrales en fase líquida.

Pueden clasificarse en dos grupos básicos: interferencias compuestas e interferencias de matriz. Si el arsénico en la muestra se encuentra en una forma parcialmente diferente a la forma en que está en las soluciones estándar empleadas, la liberación del hidruro puede ser diferente a partir de la muestra que del estándar, aún si el estándar fue adicionado a la muestra. Esto constituye una interferencia compuesta. Estas tienen lugar si los enlaces orgánicos de arsénico no fueron completamente descompuestos durante el tratamiento de la muestra o si el analito está en una valencia la cual es convertida a hidruro con menor eficiencia o a una velocidad mucho más baja que la valencia del analito en el estándar.

Las interferencias de matriz tienen lugar cuando los componentes de la matriz afectan la eficiencia de liberación del hidruro. Pueden ser componentes presentes en la muestra líquida, tales como partículas sólidas o suspensión orgánica, compuestos orgánicos disueltos no

destruidos en la mineralización (los cuales disminuyen la liberación de la arsina) y compuestos inorgánicos disueltos. En este último grupo se encuentran los interferentes más comunes de la determinación de arsénico por espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros:

- Metales nobles: por ejemplo Ag, Au, Pt, Rh, etc son muy fuertes depresores.
- Metales de transición: especialmente Ni(II), Cu(II), Co(II), Fe(II) y Cr(IV).
- Los oxidantes fuertes son depresores debido a la oxidación del As trivalente a As(V).

Interferencias no espectrales en fase gaseosa.

Las pérdidas de hidruro o la demora por interacción del hidruro con la superficie del aparato se consideran una interferencia solamente cuando su magnitud difiere entre la muestra y las soluciones estándar. Los más relevantes son los demás elementos formadores de hidruros.

Existen procedimientos generales para minimizar las interferencias en fase líquida y gaseosa en la determinación espectroscópica de arsénico mediante generación de hidruros:

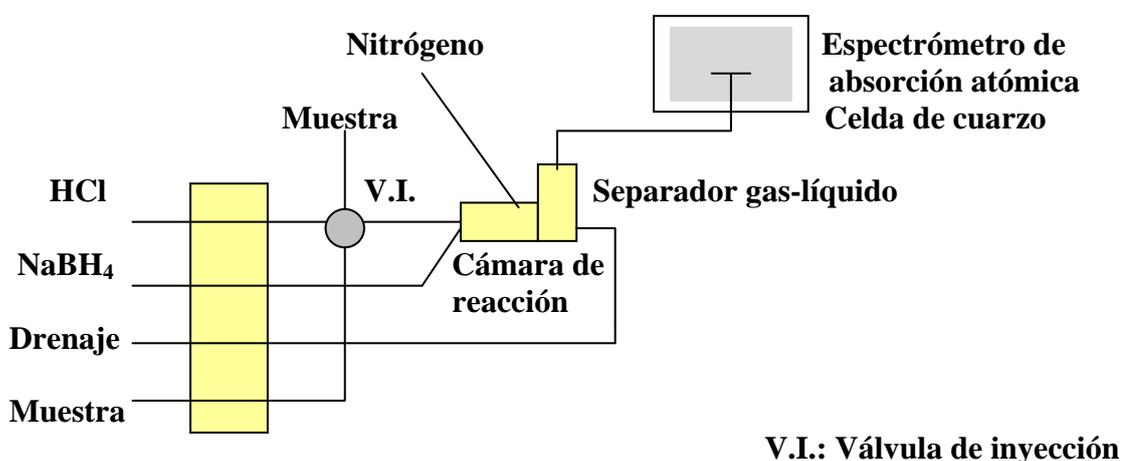
- Las altas concentraciones de HCl mejoran la tolerancia a los iones de los elementos de transición y a los metales nobles.
- Las separaciones gas-líquido más rápidas y eficientes son ventajosas en el control de las interferencias en fase líquida; en este aspecto, el empleo de inyección de flujo es totalmente ventajoso.
- Eliminación o reducción de los oxidantes.
- Control racional del estado de oxidación del analito o interferente; por ejemplo, reduciendo el As(V) a As(III) que es menos susceptible a las interferencias.
- Aplicaciones de técnicas de adición estándar y diluciones sucesivas.

II.6. Equipamiento.

La instrumentación empleada consta de un sistema de análisis por inyección de flujo Perkin Elmer-FIAS100, acoplado a un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer Model 3110, conectados a una PC provista de software de análisis GEM versión 3.1 de Perkin Elmer.

Las partes básicas que componen el FIAS100 para generación de hidruros son: una válvula de cinco vías con loop para inyección de la muestra; una bomba peristáltica que proporciona caudales constantes de muestra, solución carrier de HCl y solución reductora de NaBH₄; una cámara de reacción donde se lleva a cabo la formación de arsina; un mecanismo de suministro de gas carrier nitrógeno y un separador gas-líquido con membrana a partir del cual el gas carrier transporta la AsH₃ hasta una celda de cuarzo ubicada en el seno de una llama de aire-acetileno para la detección del As atómico. La energía del espectrómetro de absorción atómica es suministrada por una lámpara de cátodo hueco de As que operó a 9 mA proveyendo una energía de 44 W. La figura 4 muestra esquemáticamente el sistema de generación de hidruros con inyección de flujo utilizado.

Figura 4. Esquema del sistema de generación de hidruros con inyección de flujo.



II.7. Drogas y reactivos. Material de referencia.

Todos los reactivos, soluciones estándar y diluciones se prepararon con agua destilada deionizada. A continuación se emplea simplemente el término “agua” al hacer referencia al diluyente con estas características. Los ácidos minerales poseen calidad explícita “análisis para trazas metálicas”. Paralelamente a los sets de soluciones estándar de trabajo se prepararon los blancos de reactivos correspondientes. La limpieza del material de vidrio utilizado se realiza con solución de HNO₃ 50% durante 24 horas y posterior enjuague con abundante cantidad de agua.

Solución estándar de As (III) inorgánico (1000 $\mu\text{g ml}^{-1}$): para la preparación de esta solución estándar se partió de As₂O₃ 99,5%. La sal sólida se secó en estufa a 105 °C durante 2 horas. Se disolvieron 1,3204 g de As₂O₃ en 20 ml de NaOH 1M, se llevó a neutralidad con HCl 2M y finalmente se diluyó a 1000 ml con HCl 0,6M (Torralba et al., 1994).

Solución estándar intermedia de As(III) (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$): se tomó 1 ml de la solución anterior y se diluyó a 100 ml con solución de HCl 1%.

Soluciones estándar de trabajo de As(III): se tomaron 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2 ml de la solución intermedia de As(III) (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y se diluyeron a 200 ml con solución de HCl 1%, obteniéndose soluciones estándar de trabajo de 15; 30; 45 y 60 ng ml^{-1} de As(III), respectivamente.

Solución estándar de As(V) inorgánico (1163,7 $\mu\text{g ml}^{-1}$): para la preparación de la solución estándar de As(V) se partió de As₂O₅ x nH₂O. La forma hidratada de la droga utilizada hizo necesaria la cuantificación previa del contenido exacto de As(V). Para ello se realizó una

determinación yodométrica del As(V).

La reacción entre los pares redox As(V)-As(III) y I₂-I⁻ es la siguiente:



Los potenciales normales de los pares arsénico y yodo son + 0,56 y + 0,54, respectivamente. Por lo tanto, es necesario ajustar adecuadamente la acidez para llevar a cabo la titulación de As(V) con yodo.

Procedimiento.

Se disolvieron 2,0011 g de As₂O₅ x nH₂O en agua, previamente secados en estufa a 105 °C. Se colocaron 25 ml de la solución en un erlenmeyer de 250 ml y se le añadieron 2 gotas de solución de rojo de metilo. Se agregaron 11 gotas de NaOH 2N logrando el viraje del color rojo inicial al amarillo. La solución neutralizada se llevó nuevamente a color rojo con el agregado de 2 gotas de HCl 1:1 antes de la adición final de 50 ml de HCl 1:1. El calentamiento, la adición de NaHCO₃ y KI sólidos, el enfriamiento, el lavado y la titulación del I₂ liberado con solución de Na₂S₂O₄ 0,1N se llevaron a cabo según el procedimiento detallado “Química Analítica Cuantitativa” -Flaschka et al.-Vol.II páginas 207-211 (Flaschka et al., 1973). La experiencia se realizó sobre 3 alícuotas de muestra y un blanco de reactivos. La tabla 2 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 2. Resultados de la determinación yodométrica de As(V).

Identificación alícuota de muestra	Volumen gastado de Na ₂ S ₂ O ₄ 0,1N (ml)	Factor de Na ₂ S ₂ O ₄ 0,1N	Volumen de Na ₂ S ₂ O ₄ 0,1N corregido por el blanco (ml)	Volumen de Na ₂ S ₂ O ₄ 0,1N corregido por factor (ml)	Masa de As en la alícuota de muestra (mg)	Concentración de As(V) en la solución estándar (µg ml ⁻¹)
1	8,7	1,001	7,7	7,7	28,84	1153,6
2	8,8	1,001	7,8	7,8	29,22	1168,8
3	8,8	1,001	7,8	7,8	29,22	1168,8
Blanco	1,0	1,001	---	---	---	---

Por lo tanto, la concentración promedio de As(V) es 1163,7 µg ml⁻¹.

Solución estándar intermedia de As(V) (10 µg ml⁻¹): se tomaron 0,859 ml de la solución estándar de As(V) inorgánico (1163,7 µg ml⁻¹) y se diluyeron a 100 ml con solución de HCl 1%.

Soluciones estándar de trabajo de As(V): se tomaron 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2 ml de la solución intermedia de As(V) y se diluyeron a 200 ml con solución de HCl 1%, obteniéndose soluciones estándar de trabajo de 15; 30; 45 y 60 ng ml⁻¹ de As(V), respectivamente.

Solución estándar de As inorgánico (1000 µg ml⁻¹): se preparó a partir de patrón de As 1000 ± 2 mg (As₂O₅ en agua) Titrisol[®] Merck y se llevó a un volumen final de 1000 ml con agua.

Solución estándar intermedia de As inorgánico (10 µg ml⁻¹): se diluyó 1 ml de la solución estándar de As inorgánico (1000 µg ml⁻¹) a 100 ml con agua.

Soluciones estándar de trabajo de As inorgánico: se diluyeron 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2 ml de solución

estándar intermedia de As inorgánico ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) a aproximadamente 20 ml con agua en un matraz de 200 ml. Se agregaron 20 ml de HCl concentrado y 20 ml de solución prerreductora KI 5% - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 5%. Se dejaron reposar 15 minutos antes de llevar a volumen con agua, obteniéndose soluciones estándar de trabajo de 15; 30; 45 y 60 ng ml^{-1} de As, respectivamente (Recommended analytical conditions and general information for Flow Injection Mercury/Hydride Analyses using the Perkin-Elmer FIAS-100/400)

Solución estándar de As inorgánico para fortificación (500 ng ml^{-1}): se diluyeron 5 ml de la solución estándar intermedia de As inorgánico ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) a 100 ml de agua.

Solución estándar de MMA ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de As): se partió de $\text{CH}_3\text{AsO}_3\text{Na}_2$ 99%. Se disolvieron 123,9 mg en agua, llevando a un volumen final de 50 ml.

Solución estándar intermedia de MMA ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de As): se diluyó 1 ml de la solución anterior a 100 ml con solución de HCl 1%.

Soluciones estándar de trabajo de MMA: se tomaron 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2 ml de la solución intermedia de MMA ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de As) y se diluyeron a 200 ml con solución de HCl 1%, obteniéndose soluciones estándar de trabajo de 15; 30; 45 y 60 ng ml^{-1} de As, respectivamente.

Solución estándar de DMA ($1000 \mu\text{g ml}^{-1}$ de As): para la preparación de esta solución se partió de $\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2$ 98%. Se disolvieron 187,8 mg en agua, llevando a un volumen final de 100 ml.

Solución estándar intermedia de DMA ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de As): se diluyó 1 ml de la solución anterior a 100 ml con solución de HCl 1%.

Soluciones estándar de trabajo de DMA: se tomaron 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2 ml de la solución intermedia de DMA ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$ de As) y se diluyeron a 200 ml con solución de HCl 1%, obteniéndose soluciones estándar de trabajo de 15; 30; 45 y 60 ng ml^{-1} de As, respectivamente.

Soluciones estándar utilizadas para los estudios de cuantificación de As total en leche:

Soluciones estándar en medio HCl 4,5N: se tomaron 0,125; 0,25; 0,5 y 1 ml de la solución de As inorgánico (500 ng ml^{-1}). Se agregaron 2 ml de solución prerreductora de KI 15%, 3 ml de solución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 50% y se llevaron a 25 ml con solución de HCl 4,5N, obteniéndose soluciones estándar de trabajo de 2,5; 5,0; 10,0 y $20,0 \text{ ng ml}^{-1}$ de As, respectivamente. Se dejaron reposar 45 minutos antes de realizar las mediciones.

Soluciones estándar en medio HCl 1,2N: se tomaron 0,5; 1; 2 y 4 ml de la solución de As inorgánico para fortificación (500 ng ml^{-1}) y se diluyeron a aproximadamente 10 ml con agua. Se agregaron 10 ml de HCl concentrado y 10 ml de solución prerreductora de KI 5% - $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 5%. Se dejaron reposar 45 minutos y se diluyeron a 100 ml con agua, obteniéndose soluciones estándar de trabajo de 2,5; 5,0; 10,0 y $20,0 \text{ ng ml}^{-1}$ de As, respectivamente.

Soluciones de HCl:

Soluciones carrier de HCl 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 y 8M.

Solución de HCl 4,5M.

Soluciones reductoras de NaBH_4 0,0125; 0,025; 0,035; 0,05; 0,10; 0,15; 0,25 y 0,5% estabilizadas en NaOH 0,025%.

Solución de Fe(II): se disolvieron 178 mg de $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ en agua, llevando a un volumen final de 100 ml. La solución se preparó inmediatamente antes de ser usada.

Soluciones prerreductoras:

KI 5% - C₆H₈O₆ 5%: se disolvieron 5 g de KI y 5 g de C₆H₈O₆ en agua, llevando a un volumen final de 100 ml. La adición de C₆H₈O₆ previene la oxidación inevitable del I⁻ por el oxígeno atmosférico.

Solución de KI 15%: se preparó 1 hora antes de ser usada.

Solución de HNO₃ 50%.

Solución de Mg(NO₃)₂ x 6H₂O 25 y 50%.

Material de referencia: Standard Reference Material[®] 1643d National Institute of Standards & Technology NIST. Elementos traza en agua. Concentración certificada de As 56,02 ± 0,73 µg/L.

II.8. Criterios considerados para el control de calidad analítico.

- Determinación del mínimo nivel de detección y cuantificación previo al análisis de las muestras: basada en la definición dada por IUPAC, la cual establece el límite de detección (LD) y de cuantificación (LC) para técnicas espectroscópicas como las concentraciones del analito correspondientes a la señal producida por 3 y 10 veces la desviación estándar resultante de la medición de 10 blancos, respectivamente:

$$LD = k SD/m \text{ (para } k=3)$$

$$LC = k SD/m \text{ (para } k=10)$$

siendo:

k: coeficiente dependiente del nivel de confianza.

SD: desviación estándar de 10 medidas de blancos.

m: pendiente de la curva absorbancia vs. concentración del analito.

- Rango analítico: evaluación de respuestas tanto lineales como de segundo orden, definiendo puntos de las curvas de calibrado comprendidos en la totalidad del rango seleccionado.
- Chequeo de sensibilidad: seguimiento diario de la performance analítica mediante el registro de la concentración característica calculada como el cociente entre 0,0044 unidades de absorbancia y la pendiente de la curva de calibrado.
- Validación de soluciones estándar: chequeo de las soluciones estándar de trabajo preparadas a partir de drogas sólidas con soluciones de As (As_2O_5) Titrisol[®] Merck. Las soluciones de trabajo de As(V) inorgánico fueron reducidas a As(III) previo a las determinaciones analíticas para su validación. Las salidas estadísticas pueden observarse en el Anexo II.
- Validación de métodos: la exactitud de la metodología para la determinación de As total en aguas subterráneas se determina mediante el análisis del contenido de As en una muestra de agua natural con valor certificado para el analito en estudio (Standard Reference Material[®] 1643d National Institute of Standards & Technology NIST. Elementos traza en agua. Concentración certificada de As $56,02 \pm 0,73 \mu\text{g/L}$).
- Duplicados: la precisión de la metodología implementada para la especiación de As(III) inorgánico en aguas subterráneas se analiza mediante el coeficiente de variación porcentual de los resultados obtenidos para las muestras extraídas en campo por duplicado. En el caso de As total en leche se analizan duplicados de un mismo pool de muestras formado en partes iguales por leche de 3 vacas pertenecientes a cada establecimiento.
- Blanco de reactivos: se asumen como reflejo del proceso completo (muy importantes en el caso de no disponer de ambientes bajo condiciones rigurosas “clean bench”). Para los ensayos de As total en leche la determinación de los blancos de reactivos es crítica, por lo que se analiza 1 blanco de reactivos cada 6 muestras.
- Muestras fortificadas: se utilizan para evaluar posibles interferentes de matriz y controlar el proceso. Se preparan mediante la adición de una cantidad conocida de solución estándar de

As inorgánico para fortificación (500 ng ml⁻¹) a muestras elegidas al azar para ambas matrices.

II.9. Plan de muestreo.

La región seleccionada para este estudio comprende los departamentos San Cristóbal y Castellanos, ubicados en el centro-oeste de la provincia de Santa Fe. La identificación de los establecimientos obedece a la cronología de visita a los mismos durante la jornada de trabajo en campo:

Establecimiento 1

Localidad: Virginia

Departamento: Castellanos

Establecimiento 2

Localidad: Sunchales

Departamento: Castellanos

Establecimiento 3

Localidad: La Rubia

Departamento: San Cristóbal

Establecimiento 4

Localidad: Ceres

Departamento: San Cristóbal

Establecimiento 5

Localidad: Ceres

Departamento: San Cristóbal

Establecimiento 6

Localidad: Villa Trinidad

Departamento: San Cristóbal

Establecimiento 7

Localidad: Villa Trinidad

Departamento: San Cristóbal

Establecimiento 8

Localidad: San Guillermo

Departamento: San Cristóbal

Establecimiento 9

Localidad: San Guillermo

Departamento: San Cristóbal

Establecimiento 10

Localidad: Colonia Aldao

Departamento: Castellanos

Establecimiento 11

Localidad: Ramona

Departamento: Castellanos

Establecimiento 12

Localidad: Ramona

Departamento: Castellanos

Se tomaron muestras de agua subterránea de todos los pozos en cada establecimiento, registrándose la profundidad de los mismos (excepto en los casos en que los propietarios o tamberos desconocían dicho dato). Para la toma de muestras de leche se consideró un muestreo al azar de animales libres de enfermedades.

Las muestras de agua subterránea para determinación de As total y especiación se recolectaron en recipientes de polipropileno de 200 ml. Tanto los molinos a viento como las bombas sumergibles utilizadas para extraer el agua de los pozos permanecieron en funcionamiento varios minutos antes de acceder a la toma de muestra para lograr la purga completa de las cañerías. La preservación de las muestras destinadas a la determinación de As total consistió del agregado en campo de 2 ml de HCl concentrado (SOP-18, EPA, 1997), mientras que los duplicados de muestra destinados a especiación fueron adicionados además de 2 ml de solución de Fe(II) (equivalentes a 500 mg de Fe(II) por litro de muestra) (SOP-37, EPA, 1997; Borho y Wilderer, 1997). Las muestras se refrigeraron inmediatamente y una vez arribadas al laboratorio (luego de 24 horas) se colocaron en heladera hasta el momento de su análisis.

Las muestras de leche se recolectaron manualmente en recipientes de polipropileno de 500 ml. En cada establecimiento se entregaron 3 recipientes para la recolección de leche de 3 vacas elegidas al azar. Cada recipiente se llenó con el contenido de los cuatro cuartos en cantidades aproximadamente iguales. Se instruyó al tambero acerca de los recaudos de higiene necesarios al momento de tomar las muestras y se le solicitó la refrigeración de las mismas hasta su recolección para ser derivadas al laboratorio.

II.10. Determinación de As total en aguas subterráneas.

La determinación se realizó mediante la prerreducción del As inorgánico presente en la muestra al estado trivalente. Se colocaron 10 ml de muestra en un matraz de 25 ml; se adicionaron 3 ml de HCl concentrado y 1 ml de solución prerreductora KI 5% - $C_6H_8O_6$ 5%. Las muestras se dejaron reposar 45 minutos para permitir la reducción completa del As inorgánico a la forma de As(III); luego se llevaron a volumen con agua. La concentración de As total en las soluciones ácidas reducidas se midió sobre una curva de calibrado de soluciones estándar de trabajo de As inorgánico. La tabla 3 muestra los parámetros instrumentales seleccionados.

Tabla 3. Parámetros instrumentales para la determinación de As total en aguas subterráneas.

<u>Espectrómetro de absorción atómica</u>		
Longitud de onda	(nm)	193,7
Ancho de banda espectral	(nm)	0,7
Energía	(mA)	44
Tiempo de integración	(s)	15
Tiempo de lectura	(s)	20,0
Flujo de aire	(U)	5
Flujo de acetileno	(U)	2
<u>Sistema de análisis de inyección de flujo</u>		
Flujo de solución carrier	(ml min ⁻¹)	11,0
Flujo de solución reductora	(ml min ⁻¹)	5,6
Flujo de gas carrier (N ₂)	(cm ³ min ⁻¹)	75
Velocidad de bomba peristáltica	(rpm)	100
Volumen de loop de muestra	(μl)	500
Tiempo de prellenado	(s)	30
Tiempo de llenado	(s)	10
Tiempo de inyección	(s)	15

La solución carrier seleccionada para esta experiencia fue una solución de HCl 1,2M y la solución reductora fue NaBH₄ 0,2% en NaOH 0,025% (Recommended analytical conditions and general information for Flow Injection Mercury/Hydride Analyses using the Perkin-Elmer FIAS-100/400).

La posible presencia de interferentes de matriz se examinó mediante la fortificación de las muestras y su consecuente recuperación porcentual. Para ello, se adicionó 1 ml de solución de As inorgánico para fortificación (500 ng ml⁻¹) a 10 ml de muestra y se continuó con el procedimiento descrito anteriormente. La recuperación porcentual se calculó como el cociente porcentual de la diferencia entre la concentración hallada para la muestra fortificada y la muestra sin fortificar sobre la concentración nominal de fortificación (50 ng ml⁻¹).

Parámetros analíticos:

Límite de detección (LD): 0,6 ng ml⁻¹ de As (calculado como $\frac{3 \times 0,0080^{(*)}}{0,0379^{(**)}}$)

Límite de cuantificación (LC): 2,1 ng ml⁻¹ de As (calculado como $\frac{10 \times 0,0080^{(*)}}{0,0379^{(**)}}$)

Rango de trabajo: 0,6 - 45,0 ng ml⁻¹ de As.

Sensibilidad relativa: 0,12 ng ml⁻¹ de As (calculado como $\frac{0,0044 \text{ unidades de absorbancia}}{0,0379^{(**)}}$)

(*) Desviación estándar de 10 medidas de blanco de reactivos.

(**) Pendiente de la curva de calibrado de As calculada mediante algoritmo patente propiedad de Perkin Elmer, incorporado en el microprocesador del instrumento: $C = \frac{k_3 A^2 + k_1 A}{k_2 A - 1}$. La corrida correspondiente a la curva de calibrado se muestra en el Anexo I.

II.11. Especiación de As(III) y As(V) inorgánicos en aguas subterráneas.

La determinación analítica de los duplicados de muestras se realizó el día posterior al muestreo

y sin ningún tratamiento adicional más que la preservación realizada en campo. La concentración de As(III) se calculó sobre una curva de calibrado de soluciones estándar de trabajo de As(III). Los parámetros instrumentales seleccionados se muestran en la tabla 3. Las concentraciones de soluciones carrier y reductora empleadas son las seleccionadas mediante los estudios de especiación desarrollados en el punto III.1.: solución de HCl 2M y solución de NaBH₄ 0,035% en NaOH 0,025%, respectivamente. La concentración de As(V) inorgánico se calcula como la diferencia entre el contenido de As total y As(III) inorgánico.

Parámetros analíticos:

Límite de detección (LD): 1,4 ng ml⁻¹ de As(III) (calculado en el punto III.1.2.1.).

Límite de cuantificación (LC): 4,5 ng ml⁻¹ de As(III) (calculado en el punto III.1.2.1.).

Rango de trabajo: 1,4 - 60,0 ng ml⁻¹ de As(III).

Sensibilidad relativa: 1,10 ng ml⁻¹ de As(III) (calculada en el punto III.1.2.3.).

II.12. Determinación de As total en las muestras de leche.

El primer paso del procesamiento en el laboratorio consistió en la preparación de un pool con las 3 muestras recibidas de cada establecimiento visitado. Luego se tomaron por duplicado 50 ml de leche de cada pool, se colocaron en vasos de precipitados de 100 ml y se adicionaron a cada muestra 3 ml de solución de Mg(NO₃)₂ x 6H₂O 50% (según se detalla en el punto III.2.). Paralelamente al procesamiento de las muestras se prepararon muestras fortificadas elegidas al azar, considerando que cada mufla (con capacidad para 9 muestras) debía incluir 1 blanco de reactivos y 2 muestras fortificadas en 2 niveles de concentración:

Fortificación 1: 2,5 ng ml⁻¹ de As.

0,250 ml de solución estándar de As inorgánico para fortificación (500 ng ml⁻¹).

Fortificación 2: 5 ng ml⁻¹ de As.

0,500 ml de solución estándar de As inorgánico para fortificación (500 ng ml⁻¹).

Muestras fortificadas, muestras y blancos de reactivos se colocaron en estufa de secado a una temperatura de 110 °C durante 12 horas. Luego se calcinaron en mufla a 500 °C con una rampa de calentamiento de 50 °C/hora, permaneciendo durante 6 horas a la temperatura final; una vez frías, se agregaron 2 ml de HNO₃ 50% y se repitió una segunda etapa de calcinación hasta 500 °C con una rampa de calentamiento de 100 °C/hora.

Para la dilución de las cenizas se emplea solución de HCl 4,5M y para la reducción del As al estado trivalente, 2 ml de solución de KI 15% (USDA, 1991). Las cenizas de muestras fortificadas, muestras y blancos de reactivos se llevaron a un volumen final de 25 ml con HCl 4,5M. La cuantificación del contenido de As se determinó sobre una curva de calibrado de soluciones estándar acuosas preparadas en HCl 1,2M (previo estudio de cuantificación desarrollado en el punto III.2.). Los parámetros instrumentales son los citados en la tabla 3. Las soluciones carrier y reductora utilizadas fueron HCl 1,2M y NaBH₄ 0,2% en NaOH 0,025%, respectivamente.

Parámetros analíticos:

Límite de detección (LD): 1,3 ng ml⁻¹ de As (calculado en el punto III.2.4.).

Límite de cuantificación (LC): 4,3 ng ml⁻¹ de As (calculado en el punto III.2.4.).

Rango de trabajo: 1,3 - 20,0 ng ml⁻¹ de As.

Sensibilidad relativa: 0,14 ng ml⁻¹ de As (calculada como $\frac{0,0044 \text{ unidades de absorbancia}}{0,01598^{(***)}}$)

(***) Pendiente de la curva de calibrado de As en medio HCl 1,2M para determinación de As total en leche. La corrida correspondiente se muestra en el Anexo I.

III. TRABAJO EXPERIMENTAL

III.1. Estudios para la especiación de As(III) y As(V) inorgánicos en aguas subterráneas.

Las pruebas de sensibilidad para la separación de As(III) y As(V) inorgánicos en soluciones preparadas a partir de soluciones estándar involucraron, en una primera instancia, generación de hidruros por pH selectivo. Se estudiaron las respuestas obtenidas con medios proporcionados por soluciones de ácido acético y soluciones buffer de ácido cítrico/citrato de sodio para la determinación específica de As(III) inorgánico y solución de HCl 5M para la determinación de As total (As(III) + As(V) inorgánicos) (Driehaus y Jekel, 1992; Torralba et al., 1994; López et al., 1992). Las experiencias realizadas con soluciones de ácido acético y HCl se estudiaron utilizando diferentes concentraciones de NaBH₄ a los fines de investigar las condiciones que proporcionarían mayor sensibilidad a los ensayos. Estas pruebas indujeron a plantear la posibilidad de utilizar la diferencia de sensibilidad observada entre las dos especies, ya que a concentraciones bajas de NaBH₄ el aporte de As(V) se vuelve insignificante y la señal arrojada por el As(III) mantiene valores claramente cuantificables. Es en este punto donde comienza una segunda etapa en los estudios para la separación de As(III) y As(V) inorgánicos en agua, dado que los intentos realizados primeramente utilizando generación de hidruros por pH selectivo para las especies en medios ácidos diferentes no mostraban resultados satisfactorios en la minimización requerida de las interferencias de As(V) durante la determinación específica de As(III).

Por lo tanto, el método propuesto para la cuantificación de As(III) inorgánico en las muestras de agua subterránea consiste en una reducción selectiva de las especies de As utilizando concentraciones bajas de NaBH₄. La especificidad del método se basa en las intensidades de

reacción extremadamente diferentes del As(III) y del As(V) con este agente de generación de hidruros (Borho y Wilderer, 1997). Esta diferencia de sensibilidad se atribuye a la más baja velocidad de reacción del As(V) con el NaBH₄ (Narsito y Agterdenbos, 1987). Finalmente, la concentración de As(V) inorgánico se calcula como la diferencia entre el contenido de As total y As(III) inorgánico.

La generación de hidruros de arsénico por NaBH₄ en medio de HCl a pH menor a 0 depende de las especies de As presentes y de la concentración de NaBH₄ aplicada. Este pH de trabajo garantiza que el método analítico no sea afectado por la capacidad buffer de las muestras, lo cual es importante ya que la velocidad de descomposición del NaBH₄ es dependiente del pH y por lo tanto, la generación reproducible del hidruro podría ser influenciada por las fluctuaciones del pH. Este punto es ventajoso en comparación con los métodos de generación de hidruros por pH selectivo. Las interferencias producidas por las especies de As orgánicas en la determinación de As(III) mediante reducción selectiva por concentraciones variables de NaBH₄ son mínimas debido al rol insignificante de estas especies en aguas subterráneas (Borho y Wilderer, 1997).

III.1.1. Concentración de solución carrier de HCl.

El modo de generación de hidruros por inyección de flujo presenta ciertas desventajas a la hora de conocer el pH al cual se produce la reacción. Durante las etapas de prellenado y llenado del loop de muestra sólo convergen a la cámara de reacción la solución carrier de HCl y la solución reductora de NaBH₄ con flujos y concentraciones conocidos y constantes. Por lo tanto, en este punto el pH podría evaluarse en el drenaje que emerge del separador gas-líquido. Sin embargo, durante la etapa de inyección, la solución carrier transporta la muestra contenida en el loop a la cámara de reacción y el seguimiento del pH de reacción se torna dificultoso. Una alternativa

para evaluar la variación de sensibilidad al medio ácido es el estudio de las señales para concentraciones de solución carrier variables. Las tablas 4 y 5 muestran las absorbancia promedio de triplicados obtenidos para As(III) y As(V) empleando HCl 1 a 8M y NaBH₄ 0,2%.

Tabla 4. Valores de absorbancia de As(III) para concentraciones variables de HCl.

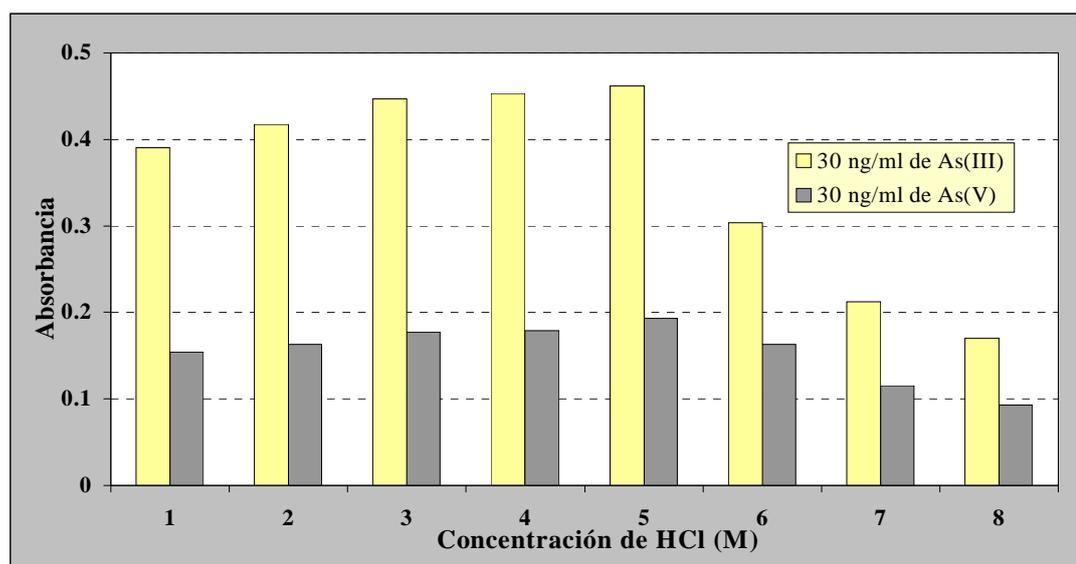
Concentración de HCl (M)	Absorbancia As(III) 15 ng ml ⁻¹	Absorbancia As(III) 30 ng ml ⁻¹	Absorbancia As(III) 60 ng ml ⁻¹
0	0	0,001	0
1	0,264	0,390	0,560
2	0,291	0,417	0,577
3	0,321	0,447	0,596
4	0,326	0,453	0,606
5	0,335	0,462	0,615
6	0,261	0,304	0,473
7	0,208	0,212	0,340
8	0,167	0,170	0,217

Tabla 5. Valores de absorbancia de As(V) para concentraciones variables de HCl.

Concentración de HCl (M)	Absorbancia As(V) 15 ng ml ⁻¹	Absorbancia As(V) 30 ng ml ⁻¹	Absorbancia As(V) 60 ng ml ⁻¹
0	0	0	0
1	0,048	0,154	0,402
2	0,054	0,163	0,426
3	0,058	0,177	0,434
4	0,059	0,179	0,440
5	0,061	0,193	0,456
6	0,056	0,163	0,361
7	0,045	0,115	0,258
8	0,039	0,093	0,205

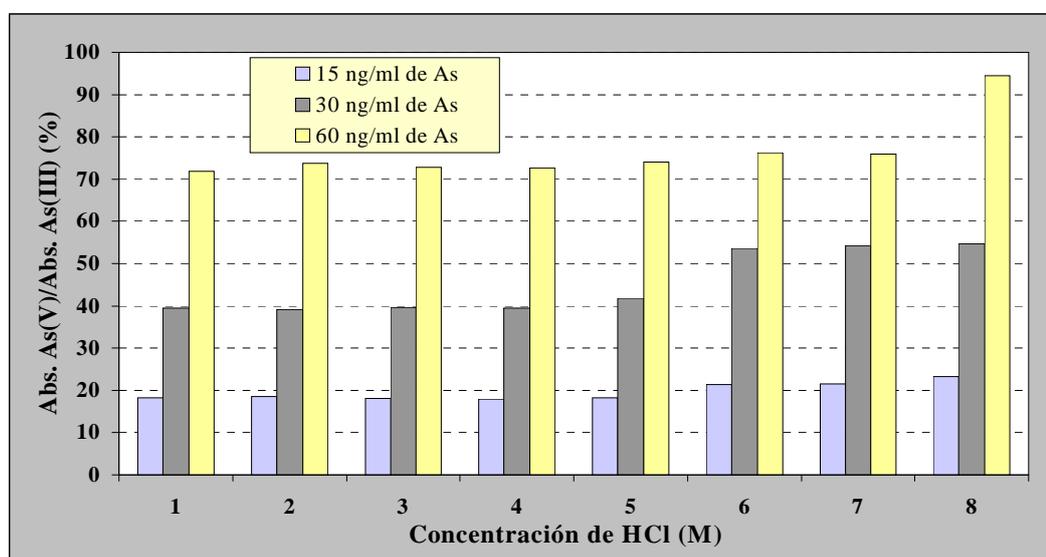
En la figura 5 se grafican las absorbancias de las soluciones estándar de trabajo de As(III) y As(V) 30 ng ml⁻¹ en función de la concentración de HCl.

Figura 5. Absorbancias de As(III) y As(V) 30 ng ml⁻¹ en función de la concentración de HCl.



La figura 6 muestra los valores porcentuales de la relación $\frac{\text{Absorbancia As(V)}}{\text{Absorbancia As(III)}}$ en función de las concentraciones de HCl para cada nivel de concentración de As inorgánico evaluado.

Figura 6. Relación porcentual de las especies As(V)/As(III) vs. concentración de HCl.



Como se observa en la figura 6, las interferencias de As(V) sobre la señal de As(III) comienzan a tomar significancia a partir de concentraciones de HCl mayores a 4M. Para estas concentraciones la determinación de As(III) inorgánico pierde especificidad y por lo tanto no se consideran en el análisis siguiente: la mayor acidez de las soluciones de HCl más concentradas ofrecen mayor garantía de que la capacidad buffer de las muestras no afecte los resultados, aunque como contrapartida exponen al sistema de análisis por inyección de flujo con generador de hidruros a condiciones más agresivas que disminuyen la durabilidad de sus componentes y viceversa, optándose como solución de compromiso HCl 2M.

III.1.2. Concentración de solución reductora de NaBH₄.

Se evaluaron las absorbancias de las soluciones estándar de trabajo de As(III) y As(V) para varias concentraciones de NaBH₄ en NaOH 0,025%, utilizando HCl 2M como solución carrier. En las tablas 6 y 7 se muestran las absorbancias promedio de triplicados obtenidas.

Tabla 6. Valores de absorbancia de As(III) para concentraciones variables de NaBH₄.

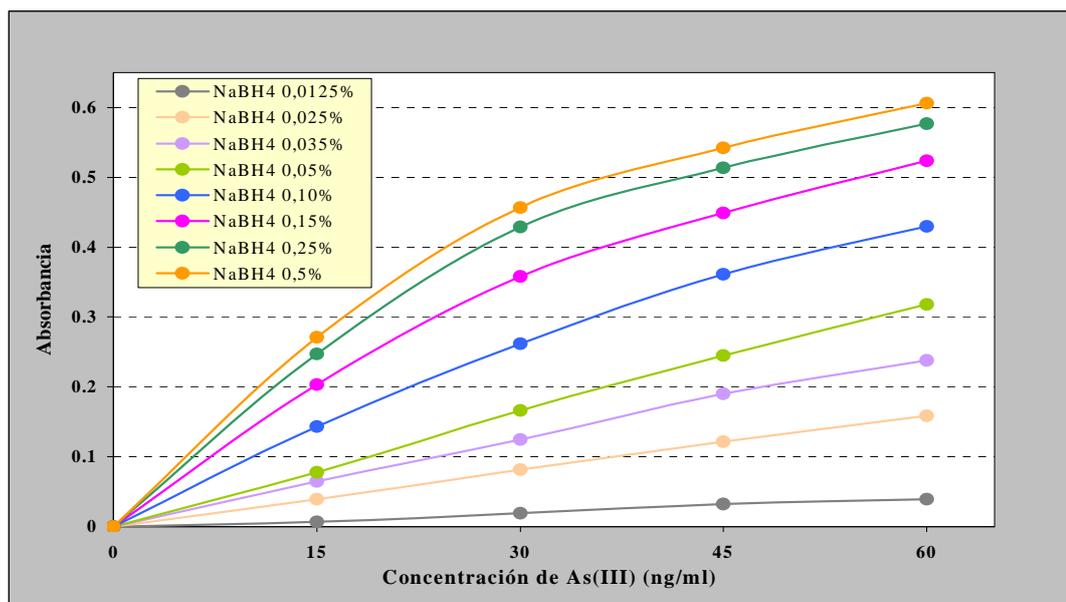
Concentración de NaBH ₄ (%)	Absorbancia As(III) 15 ng ml ⁻¹	Absorbancia As(III) 30 ng ml ⁻¹	Absorbancia As(III) 45 ng ml ⁻¹	Absorbancia As(III) 60 ng ml ⁻¹	Coefficiente de correlación lineal	Pendiente x 10 ⁻⁴
0,0125	0,007	0,019	0,032	0,039	0,994	6,9
0,025	0,039	0,082	0,122	0,159	1,00	26,7
0,035	0,065	0,125	0,190	0,238	0,999	40,1
0,05	0,078	0,166	0,245	0,318	1,00	53,5
0,10	0,143	0,262	0,361	0,430	0,991	71,9
0,15	0,203	0,358	0,449	0,524	0,978	86,3
0,25	0,247	0,429	0,514	0,577	0,963	94,7
0,5	0,271	0,457	0,542	0,606	0,958	98,9

Tabla 7. Valores de absorbancia de As(V) para concentraciones variables de NaBH₄.

Concentración de NaBH ₄ (%)	Absorbancia As(V) 15 ng ml ⁻¹	Absorbancia As(V) 30 ng ml ⁻¹	Absorbancia As(V) 45 ng ml ⁻¹	Absorbancia As(V) 60 ng ml ⁻¹	Coefficiente de correlación lineal	Pendiente * 10 ⁻⁴
0,0125	0,002	0	0,001	0	-0,177	-6 10 ⁻²
0,025	0	0	0,001	0	0,354	6 10 ⁻²
0,035	0	0,001	0,003	0,001	0,646	3 10 ⁻¹
0,05	0	0,001	0,003	0,008	0,894	1,3
0,10	0,007	0,014	0,023	0,031	0,999	5,2
0,15	0,012	0,035	0,056	0,077	0,996	13,2
0,25	0,035	0,078	0,114	0,162	0,999	26,9
0,5	0,068	0,141	0,199	0,254	0,998	42,6

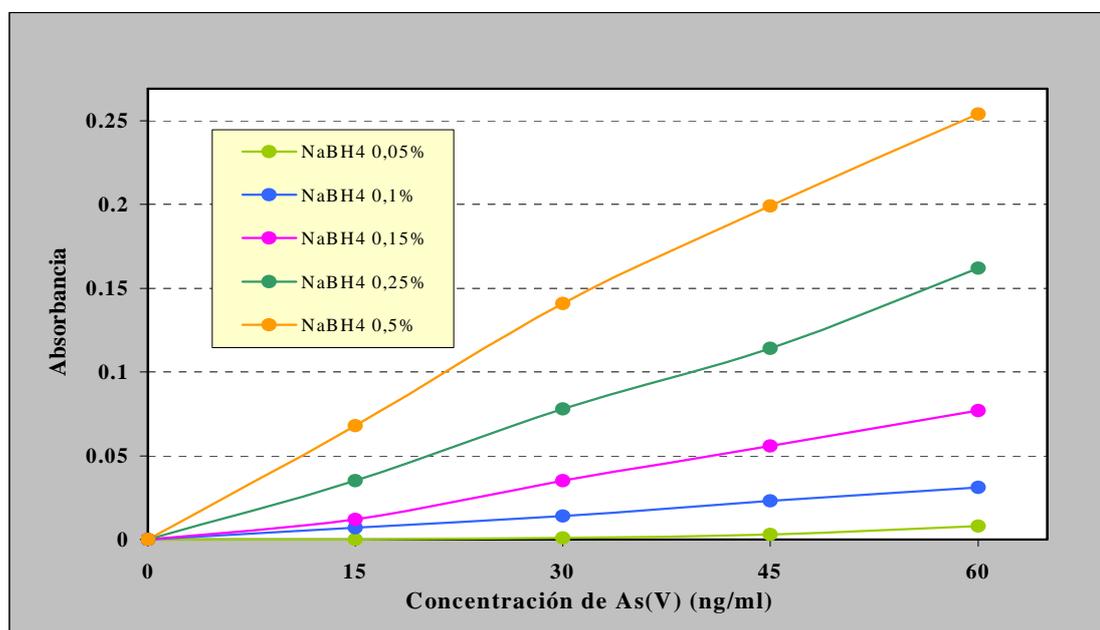
Como se observa en la tabla 7, el coeficiente de correlación para las curvas de As(III) es mayor a 0,99 utilizando concentraciones de NaBH₄ menores a 0,10% inclusive, pero a concentraciones superiores las curvas de calibrado comienzan a perder linealidad. En la figura 7 se representan las curvas de calibrado de As(III) para todas las concentraciones de NaBH₄ evaluadas.

Figura 7. Curvas de calibrado de As(III) para concentraciones variables de NaBH₄.

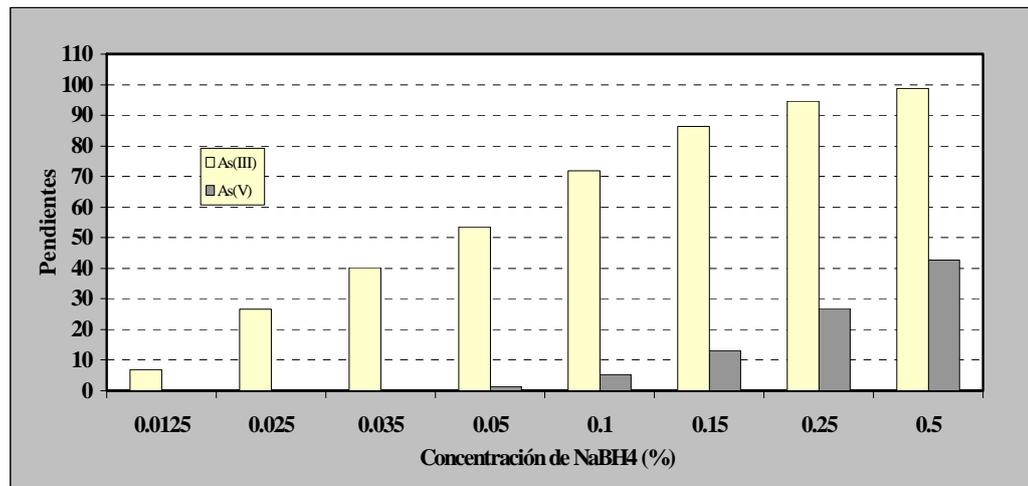


Por su parte, las curvas de As(V) muestran un coeficiente de correlación mayor a 0,99 a partir de una concentración de NaBH₄ 0,10%. La determinación de As(III) incluye un alto potencial de interferencia de As(V) empleando estas concentraciones de NaBH₄, ya que para éstas el As(V) aporta una respuesta lineal medible. En la figura 8 se representan las curvas de calibrado de As(V) en función de las concentraciones de NaBH₄ estudiadas.

Figura 8. Curvas de calibrado de As(V) para concentraciones variables de NaBH₄.



La disminución de las diferencias entre las señales de As(III) y As(V) a medida que aumenta la concentración de NaBH₄ puede observarse en la figura 9.

Figura 9. Pendientes de las curvas de calibrado de As(III) y As(V) vs.concentración de NaBH₄.

La tabla 8 indica los valores porcentuales de la relación Pendiente As(V) para las concentraciones

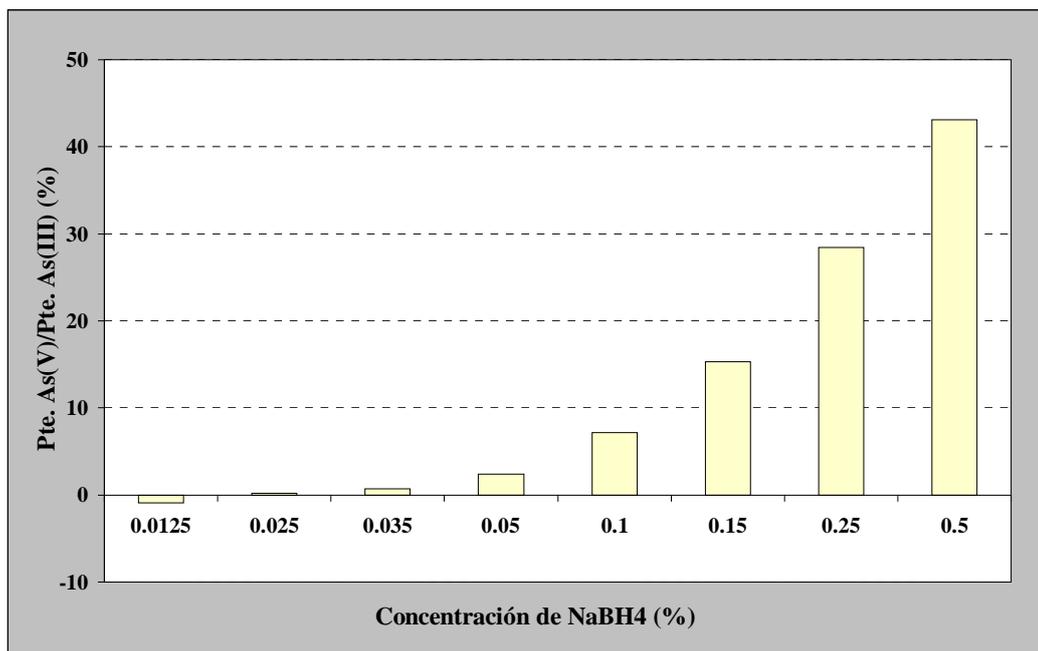
Pendiente As(III)

de NaBH₄ monitoreadas. La representación gráfica de los resultados se observa en la figura 10.

Tabla 8. Relación porcentual Pendiente As(V) para concentraciones variables de NaBH₄.
Pendiente As(III)

Concentración de NaBH ₄ (%)	Relación Pendiente As(V) Pendiente As(III) (%)
0,0125	-0,9
0,025	0,2
0,035	0,7
0,05	2,4
0,10	7,2
0,15	15,3
0,25	28,4
0,5	43,1

Figura 10. Relación porcentual $\frac{\text{Pendiente As(V)}}{\text{Pendiente As(III)}}$ en función de la concentración de NaBH_4 .



Por lo tanto, las concentraciones de NaBH_4 superiores a 0,05% se consideran desfavorables a los fines de la separación de As(III) y As(V) inorgánicos, descartándose en los cálculos de límite de detección necesarios para proseguir con la optimización del sistema.

III.1.2.1. Límites de detección y cuantificación.

Los límite de detección de As(III) inorgánico acorde al punto II.8. para cada una de las concentraciones de NaBH_4 seleccionadas en esta primera etapa son los siguientes:

Para NaBH₄ 0,0125%:

$$LD_{0,0125} = \frac{3 \times 0,0019^*}{6,9 \times 10^{-4}}$$

$$LD_{0,0125} = 8,3 \text{ ng ml}^{-1} \text{ de As(III).}$$

$$LC_{0,0125} = \frac{10 \times 0,0019^*}{6,9 \times 10^{-4}}$$

$$LC_{0,0125} = 27,5 \text{ ng ml}^{-1} \text{ de As(III).}$$

Para NaBH₄ 0,025%:

$$LD_{0,025} = \frac{3 \times 0,0019^*}{26,7 \times 10^{-4}}$$

$$LD_{0,025} = 2,1 \text{ ng ml}^{-1} \text{ de As(III).}$$

$$LC_{0,025} = \frac{10 \times 0,0019^*}{26,7 \times 10^{-4}}$$

$$LC_{0,025} = 7,1 \text{ ng ml}^{-1} \text{ de As(III).}$$

Para NaBH₄ 0,035%:

$$LD_{0,035} = \frac{3 \times 0,0019^*}{40,1 \times 10^{-4}}$$

$$LD_{0,035} = 1,4 \text{ ng ml}^{-1} \text{ de As(III).}$$

$$LC_{0,035} = \frac{10 \times 0,0019^*}{40,1 \times 10^{-4}}$$

$$LC_{0,035} = 4,7 \text{ ng ml}^{-1} \text{ de As(III).}$$

Para NaBH₄ 0,05%:

$$LD_{0,05} = \frac{3 \times 0,0019^*}{53,5 \times 10^{-4}}$$

$$LD_{0,05} = 1,1 \text{ ng ml}^{-1} \text{ de As(III).}$$

$$LC_{0,05} = \frac{10 \times 0,0019^*}{53,5 \times 10^{-4}}$$

$$LC_{0,05} = 3,6 \text{ ng ml}^{-1} \text{ de As(III).}$$

(*) Desviación estándar de 10 medidas de blancos utilizando NaBH₄ 0,05%.

Considerando la revisión y posible disminución del nivel máximo de contaminante (MLC) para As llevada a cabo actualmente por U.S. EPA, la determinación de As(III) inorgánico con una concentración de NaBH₄ 0,0125%, no es lo suficientemente sensible para análisis de agua de bebida. Por lo tanto descartamos esta concentración para la siguiente y última etapa de selección.

III.1.2.2. Interferencias de As(V) sobre la señal de As(III).

En una primera instancia, estas interferencias se estudiaron en forma predictiva, tomando como base las ecuaciones de las curvas de calibrado de las soluciones estándar de trabajo independientes de As(III) y As(V).

Para ello se consideraron soluciones mezclas de As(III) y As(V) conteniendo 1; 2; 5; 10; 20; 35 y 50 % de As(III) y 99; 98; 95; 90; 80; 65 y 50 % de As(V), respectivamente. Esta suposición se basa en la tendencia de los datos mundiales a un valor guía de 10% de As(III) en relación al As total en aguas subterráneas.

Para explicar la modalidad de cálculo empleada tomamos como ejemplo la solución mezcla conteniendo As(III) 10% y As(V) 90%:

Ecuación de la curva de calibrado de As(III) para NaBH₄ 0,025%:

$$y_{\text{III}} = 2 \cdot 10^{-4} + 26,7 \cdot 10^{-4} x_{\text{III}}$$

Ecuación de la curva de calibrado de As(V) para NaBH₄ 0,025%:

$$y_{\text{V}} = 0 + 6 \cdot 10^{-6} x_{\text{V}}$$

Reemplazando por las cantidades relativas correspondientes de As(III) y As(V) en la solución mezcla obtenemos las siguientes ecuaciones:

$$y_{\text{III}} = 2 \cdot 10^{-4} + 26,7 \cdot 10^{-4} \cdot 10$$

$$y_{\text{III}} = 2,69 \cdot 10^{-2}$$

$$y_{\text{V}} = 0 + 6 \cdot 10^{-6} \cdot 90$$

$$y_{\text{V}} = 5,4 \cdot 10^{-4}$$

Para un valor de As(III) en porcentaje de la concentración de As total igual a 10%, el valor de interferencias de As(V) en porcentaje de la absorbancia de As(III) es:

$$(5,4 \cdot 10^{-4} / 2,69 \cdot 10^{-2}) \cdot 100\% = 2,0\%.$$

De manera análoga se procede para las concentraciones de NaBH₄ 0,035% y 0,05%:

Ecuación de la curva de calibrado de As(III) para NaBH₄ 0,035%:

$$y_{III} = 3,4 \cdot 10^{-3} + 40,1 \cdot 10^{-4} x_{III}$$

Ecuación de la curva de calibrado para As(V) para NaBH₄ 0,035%:

$$y_V = 0 + 3 \cdot 10^{-5} x_V$$

Ecuación de la curva de calibrado de As(III) para NaBH₄ 0,05%:

$$y_{III} = 8 \cdot 10^{-3} + 53,5 \cdot 10^{-4} x_{III}$$

Ecuación de la curva de calibrado para As(V) para NaBH₄ 0,05%:

$$y_V = -1,4 \cdot 10^{-3} + 1,3 \cdot 10^{-4} x_V$$

En la tabla 9 se muestran los porcentajes de interferencias de As(V) en porcentaje de la absorbancia de As(III) para todas las soluciones mezclas consideradas.

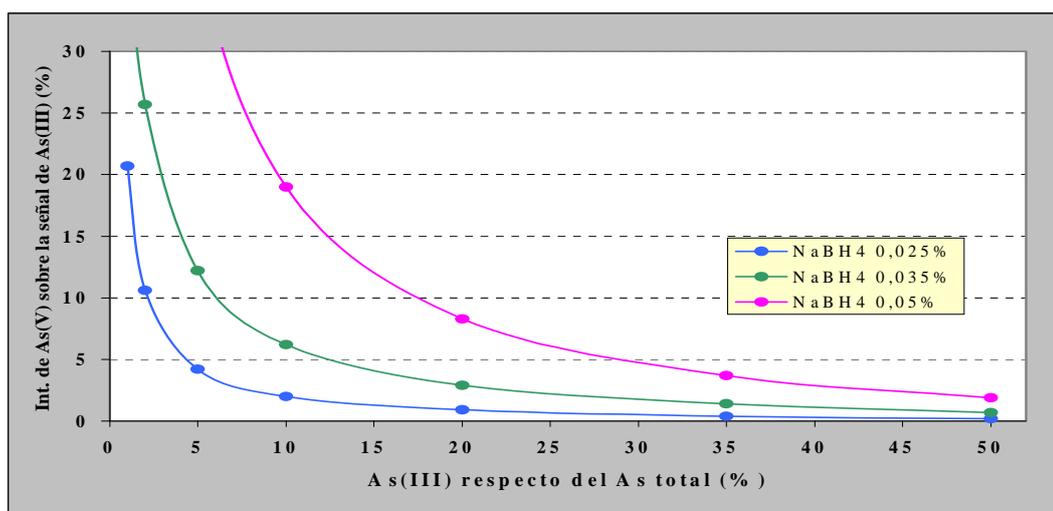
Tabla 9. Estudio de interferencias de As(V) sobre la señal de As(III).

As(III) respecto del de As total (%)	Interferencia de As(V) sobre la señal de As(III) (%) NaBH ₄ 0,025%	Interferencia de As(V) sobre la señal de de As(III) (%) NaBH ₄ 0,035%	Interferencia de As(V) sobre la señal de de As(III) (%) NaBH ₄ 0,05%
1	20,7	40,1	186,5
2	10,6	25,7	98,6
5	4,2	12,2	39,7
10	2,0	6,2	19,0
20	0,9	2,9	8,3

35	0,4	1,4	3,7
50	0,2	0,7	1,9

La figura 11 es una representación gráfica del aporte a la señal de As(III) por interferencias de As(V) para soluciones mezcla cuyo contenido de As(III) varía del 0 al 50% de As total.

Figura 11. Interferencias As(V) sobre la señal de As(III).



III.1.2.3. Selección de la concentración de NaBH₄.

En la tabla 10 se presentan los valores de los parámetros analíticos analizados para la especiación de As(III) inorgánico en aguas subterráneas.

Tabla 10. Valores de los parámetros analíticos para la selección de la concentración de NaBH₄.

Concentración de NaBH ₄ (%)	Sensibilidad relativa (*)	Límite de detección (ng ml ⁻¹ de As(III))	Interferencia de As(V) sobre la señal de As(III) (**) (%)
0,025	1,65	2,1	2,0
0,035	1,10	1,4	6,2
0,05	0,82	1,1	19,0

(*) Concentración del analito que produce una señal de 0,0044 unidades de absorbancia (0,0044/pendiente).

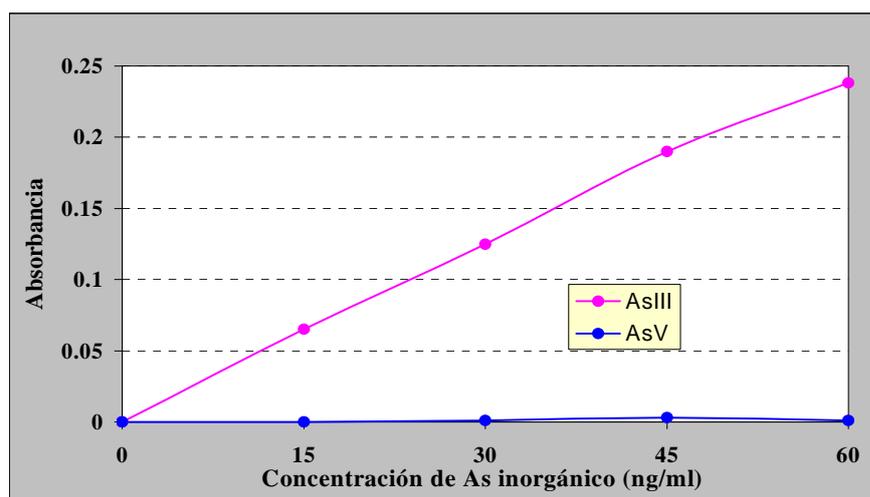
(**) Relación As(III):As total (1:10).

La concentración de NaBH_4 0,05% se considera inadecuada para la determinación específica de As(III) inorgánico en aguas naturales debido a la incidencia importante de las interferencias de As(V) para muestras que contienen el valor guía de 10% de As(III) inorgánico respecto al As total.

Los valores de sensibilidad relativa y límite de detección empleando la solución de NaBH_4 0,035% muestran una mejor performance que para la solución de NaBH_4 0,025%. Por otro lado, si bien para concentración de NaBH_4 0,035% las interferencias de As(V) tienen un aporte superior a las correspondientes para NaBH_4 0,025%, es relativamente bajo ya que estaría indicando que para aguas conteniendo 10% de As(III) respecto al As total, el incremento en la absorbancia de As(III) producido por interferencias de As(V) sería menor al 10%.

Por lo tanto, la concentración de NaBH_4 seleccionada para la determinación de As(III) inorgánico mediante esta metodología analítica es 0,035%. La figura 12 muestra las curvas de calibrado de As(III) y As(V) para las condiciones seleccionadas.

Figura 12. Curvas de calibrado de As(III) y As(V) empleando solución carrier HCl 2M y solución reductora NaBH_4 0,035% en NaOH 0,025%.



En el Anexo I se muestra la corrida correspondiente a una curva de calibrado de As(III) para estas condiciones.

III.1.3. Verificación de interferencias de As(V) sobre la señal de As(III) en muestras sintéticas.

Las muestras sintéticas se prepararon por dilución de alícuotas de soluciones estándar intermedias de As(III) y As(V) en medio HCl 1% y solución de Fe(II) equivalente a 500 mg de Fe(II) por litro de muestra sintética. Se consideró un contenido de As total (As(III) + As(V)) de 60 ng ml⁻¹. La tabla 11 resume los resultados obtenidos para las concentraciones de soluciones carrier y reductora seleccionadas.

Tabla 11. Verificación de interferencias de As(V) sobre la señal de As(III).

As(III) respecto del As total (%)	Concentración teórica de As(III) (ng ml ⁻¹)	Concentración hallada de As(III) (ng ml ⁻¹)	Interferencia hallada de As(V) respecto del As(III) (%)
5	3	3,4	13
10	6	6,5	8,3
20	12	12,5	4,2
30	18	18,4	2,2
40	24	24,6	2,5
50	30	30,5	1,7

Las interferencias observadas de As(V) respecto a la concentración teórica de As(III) caracteriza la capacidad discriminativa de la metodología propuesta en la especiación As(III) y As(V) inorgánicos en aguas subterráneas.

III.1.4. Presencia de organoarsenicales. Riesgo de error sistemático.

Si bien la presencia de organoarsenicales no ha sido documentada en aguas subterráneas, es conveniente considerar la importante fuente de error en la medición de As(III) por concentraciones variables de NaBH_4 que ocasionaría su presencia. La contaminación de la fuente por microorganismos capaces de producir metilación biológica del As combinada con pozos de extracción que permiten condiciones aeróbicas podrían ser la causa más relevante. En el presente trabajo se estudiaron las señales aportadas por las soluciones estándar de trabajo de MMA y DMA a los fines de conocer la importancia cuantitativa que representa la presencia de estas especies organoarsenicales, consideradas las más comunes en aguas superficiales. En la tabla 12 se muestran los valores de interferencias porcentuales obtenidos para las soluciones de MMA y DMA respecto a la señal producida por una concentración igual de As(III), empleando HCl 2M y NaBH_4 0,035% en NaOH 0,025% como soluciones carrier y reductora, respectivamente.

Tabla 12. Interferencias organoarsenicales.

Concentración de MMA y DMA (ng ml^{-1} de As)	Interferencia de MMA sobre la señal de As(III) (%)	Interferencia de DMA sobre la señal de As(III) (%)
15	21,7	60,0
30	23,3	61,7
45	26,0	63,3
60	32,1	66,7

Es evidente que la presencia de MMA y DMA en las muestras de agua subterránea podrían conducir a un serio error sistemático propio de la metodología.

III.2. Estudios para la cuantificación de As total en leche.

En el punto I.6.2. se discute acerca de la dificultad que presenta la determinación de elementos traza en materiales biológicos. Este factor sumado a las condiciones de equilibrio termodinámico no alcanzadas (típicas del modo inyección de flujo y muy afectadas por los medios de soluciones estándar y muestras) y a la falta de material de referencia disponible para calibración, condujo a la necesidad de encontrar las condiciones más favorables para una cuantificación confiable y sensible del contenido de As total en las muestras de leche.

Para ello se seleccionó en una primera instancia el proceso de digestión de las muestras haciendo un análisis minucioso de la bibliografía disponible y considerando la experiencia laboral en el tema. Las conclusiones fueron las siguientes:

- Destrucción de la materia orgánica por digestión vía seca preferida a la digestión vía húmeda, debido a las condiciones extremadamente oxidantes resultantes de los ataques realizados con la mayoría de los ácidos minerales. La posterior reducción del As presente al estado de oxidación trivalente puede resultar muy tediosa y muchas veces muy poco eficiente en estas condiciones (Dedina y Tsalev, 1995).
- Volumen de muestra de 50 ml como alícuota adecuada para un proceso de concentración práctico y sin dificultades (Cervera et al., 1994a).
- Cantidad en exceso de fundente $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ para evitar pérdidas por volatilización de AsCl_3 . Se experimentó con soluciones de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 25 y 50% (USDA, 1991).

III.2.1. Curvas de calibración para la cuantificación de As total en muestras de leche.

Se compararon las curvas de absorbancia en función de la concentración de As total obtenidas con tres grupos diferentes de soluciones estándar:

Soluciones preparadas por adición estándar:

Las adiciones se realizaron sobre 50 ml de muestra y se prosiguió en la forma descrita en el punto II.12:

Adición estándar 1: 0,125 ml de solución estándar de As inorgánico para fortificación 500 ng ml⁻¹.

Adición estándar 2: 0,250 ml de solución estándar de As inorgánico para fortificación 500 ng ml⁻¹.

Adición estándar 3: 0,500 ml de solución estándar de As inorgánico para fortificación 500 ng ml⁻¹.

Adición estándar 4: 1,000 ml de solución estándar de As inorgánico para fortificación 500 ng ml⁻¹.

Todas las muestras adicionadas, matriz de muestra y blanco de reactivos se procesaron por duplicado y se llevaron a un volumen final de 25 ml.

Soluciones estándar en medio HCl 4,5M: preparadas en condiciones de reactivos similares a las muestras.

Soluciones estándar en medio HCl 1,2M: preparadas en condiciones ácidas menos agresivas y con agregado de C₆H₈O₆ para lograr soluciones más estables.

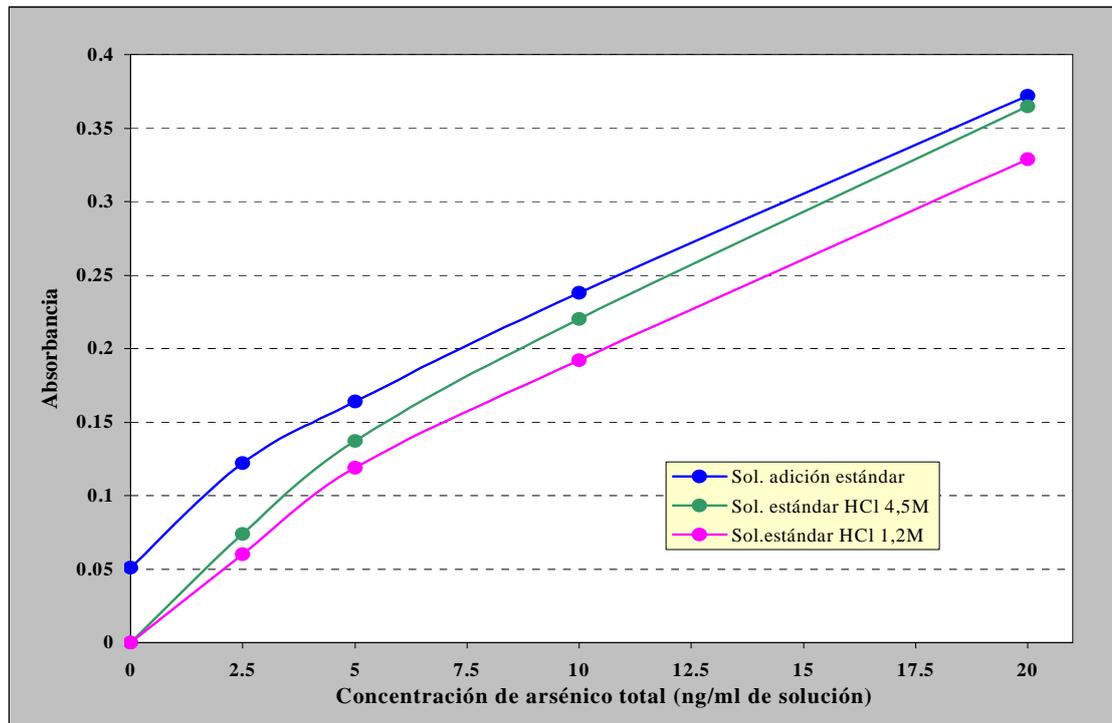
La tabla 13 muestra los valores de absorbancias promedio de tres réplicas obtenidos para cada caso.

Tabla 13. Valores de absorbancia de las soluciones estándar de As total.

Concentración de As total (ng ml ⁻¹)	Absorbancia Soluciones preparadas por adición estándar	Absorbancia Soluciones estándar en medio HCl 4,5M	Absorbancia Soluciones estándar en medio HCl 1,2M
0	0,051	0	0
2,5	0,122	0,074	0,060
5,0	0,164	0,137	0,119
10,0	0,238	0,220	0,192
20,0	0,372	0,365	0,329

La figura 13 muestra la representación gráfica de las curvas de calibrado. Las salidas del análisis estadístico pueden observarse en el Anexo II.

Figura 13. Curvas de absorbancia en función de la concentración de As total obtenidas para cada grupo de soluciones estándar.



La comparación de las curvas permite suponer que la cuantificación del contenido de As total en muestras de leche se ajusta mejor a la curva de calibración de soluciones estándar en medio HCl 1,2M que en HCl 4,5M, pese a la mayor similitud de estas últimas con las soluciones preparadas por adición estándar. Esto podría ser atribuible a un efecto buffer producido por las sales presentes en las cenizas de las muestras, de manera que las condiciones ácidas proporcionadas por las soluciones de muestra digeridas sean más compatibles con las soluciones estándar en medio HCl 1,2M que en HCl 4,5M.

La posibilidad de cuantificación de As total en leche sobre una curva de calibrado de soluciones estándar acuosas preparadas en medio HCl 1,2M simplifica considerablemente la metodología analítica. En el Anexo I se muestra la corrida correspondiente a una curva de calibrado de soluciones estándar acuosas de As preparadas en medio HCl 1,2M.

III.2.2. Pérdidas por volatilización. Cantidad de fundente.

La cantidad de fundente constituye un punto crítico durante la eliminación de la materia orgánica por vía seca en la determinación de As, debido a la volatilización de haluros arsenicales. Esta experiencia muestra los porcentajes de recuperación de As adicionado sobre muestras de leche, empleando concentraciones diferentes de soluciones de fundente.

Se adicionaron en forma paralela dos grupos de muestras con 0,125; 0,250 y 0,375 ml de solución estándar de As inorgánico para fortificación (500 ng ml^{-1}). Un grupo recibió el agregado de 3 ml de solución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 25% y el otro grupo el agregado de una solución del mismo fundente 50%. Las muestras se sometieron al procedimiento indicado en el punto II.12. y se cuantificaron sobre una curva de calibrado de soluciones estándar de As en medio de HCl 1,2M. La tabla 14 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos para los dos grupos de muestras.

Tabla 14. Recuperación porcentual de As en leche en función de la cantidad de fundente utilizada.

Concentración de As total (ng ml^{-1} de leche)	Recuperación Sol. $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 25% (%)	Recuperación Sol. $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 50% (%)
2,5	75	96
5,0	64	100
7,5	75	99

Por lo tanto, se considera adecuado el agregado de una cantidad de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ equivalente a 3 ml de solución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 50% para evitar las pérdidas de As por volatilización.

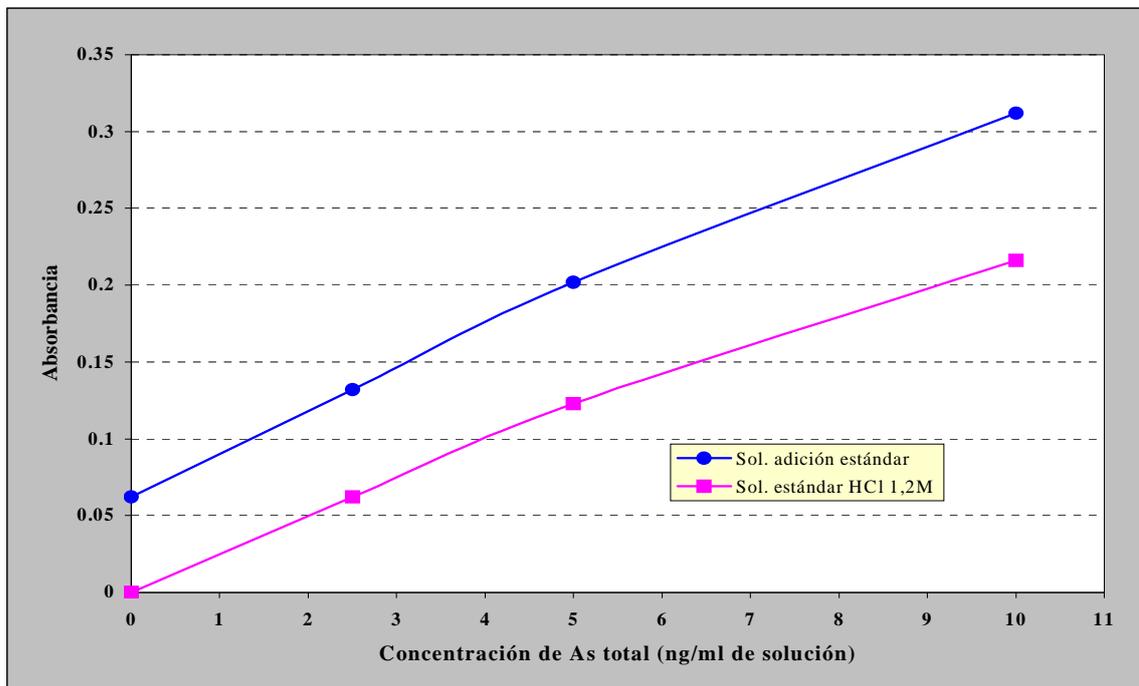
III.2.3. Curvas de calibración para la cuantificación de As total en blancos de reactivos.

Los blancos de reactivos constituyen un punto de importancia relevante en la determinación de metales a nivel de trazas. Por lo tanto, un criterio similar al del punto III.2.1. se aplicó para la cuantificación de los blancos de reactivos, solamente considerando las soluciones de As preparadas por adición estándar sobre blancos reactivos y las soluciones estándar de As en medio de HCl 1,2M. La tabla 15 muestra los valores de absorbancia promedio de triplicados obtenidos para las soluciones preparadas por adición estándar y para las soluciones estándar acuosas (pendientes 0,02491 y 0,02150, respectivamente). Las representaciones gráficas de las curvas pueden observarse en la figura 14.

Tabla 15. Valores de absorbancia de las soluciones estándar de As total.

Concentración de As total (ng ml^{-1})	Absorbancia Soluciones preparadas por adición estándar	Absorbancia Soluciones estándar en medio HCl 1,2M
0	0,062	0
2,5	0,132	0,062
5,0	0,202	0,123
10,0	0,312	0,216

Figura 14. Curvas de absorbancia en función de la concentración de As total obtenidas para cada grupo de soluciones estándar.



Los resultados de estos ensayos indican la concentración de As en los blancos de reactivos puede medirse sobre una curva de calibrado de soluciones estándar acuosas de As preparadas en medio de HCl 1,2M, simplificando la metodología.

III.2.4. Límites de detección y cuantificación.

Los límites de detección y cuantificación de As total en leche se definieron acorde al punto II.8.:

$$LD = \frac{3 \times 0,0069^{(*)}}{15,98 \cdot 10^{-3}}$$

$$LD = 1,3 \text{ ng ml}^{-1} \text{ de As total.}$$

$$LC = \frac{10 \times 0,0069^{(*)}}{15,98 \cdot 10^{-3}}$$

$$LC = 4,3 \text{ ng ml}^{-1} \text{ de As total.}$$

^(*) Desviación estándar de 10 medidas de blanco de reactivos. La corrida correspondiente se muestra en el Anexo I.

III.3. Resultados y Discusión.

III.3.1. Valores de As total y especies inorgánicas As(III) y As(V) obtenidos en aguas subterráneas.

El contenido de As total se determinó mediante el procedimiento descrito en el punto II.10.. Para las muestras cuya concentración de As en la dilución inicial excedió al rango analítico de trabajo, se tomaron 5 ml de muestra original, se agregaron 5 ml de agua y se continuó con el mismo procedimiento. La recuperación porcentual de As total para la metodología implementada, calculada por fortificación de la muestra número 11, fue del 96%. La exactitud evaluada mediante material de referencia se presenta en el punto III.3.2., reflejando una imprecisión analítica del 2,2%. Las corridas correspondientes a la curva de calibrado, muestras, recuperado y material de referencia se muestran en el Anexo I.

La determinación de las especies de As(III) y As(V) inorgánicas se realizó según el procedimiento descrito en el punto II.11. sobre muestras extraídas en campo por duplicado. La precisión de la metodología de especiación se evaluó mediante la desviación estándar relativa porcentual (DER%) de las concentraciones halladas para los duplicados de muestra, cuya corrida se presenta en el Anexo I.

La tabla 16 muestra los valores de As total, As(III) y As(V) inorgánicos obtenidos para las muestras de agua subterránea.

Tabla 16. Resultados de As total y especies inorgánicas As(III) y As(V) en agua subterránea.

<i>n</i>	Identificación de establecimiento	Identificación de muestra (profundidad de napa de agua subterránea)	As total (ng ml ⁻¹)	As(III) inorgánico (ng ml ⁻¹)			As(V) inorgánico ^(**) (ng ml ⁻¹)
				Duplicado	DER%	Media	
1	1	1 (22 m)	167,4	20,7-19,6	3,8	20,2	147,2
2	2	2 (18 m)	34,7	12,8-11,9	5,1	12,4	22,3
3		2' (36 m)	38,2	8,2-8,6	3,4	8,4	29,8
4	3	3 (3 m)	83,1	11,4-10,7	4,5	11,0	73,1
5		3' (16 m)	32,5	12,7-10,8	11,4	11,8	20,7
6	4	4 (4 m)	128,2	13,7-13,6	0,5	13,6	114,6
7		4' (4 m)	159,6	15,2-15,3	0,5	15,2	144,4
8	5	5 ^(*)	307,6 ^(*)	16,0-18,2	9,1	17,1	290,5
9		5' ^(*)	207,8	14,9-14,0	4,4	14,4	193,4
10		5'' ^(*)	163,2	17,3-17,3	0	17,3	145,9
11	6	6 (9 m)	130,7	10,3-10,3	0	10,3	120,4
12		6' (10 m)	72,2	12,0-13,4	7,8	12,7	59,5
13	7	7 (18 m)	44,5	ND (1,4)-ND (1,4)	-	ND (1,4)	43,1
14		7' (18 m)	195,6	6,7	-	6,7	118,9
15	8	8 ^(*)	109,5	16,4-15,2	5,4	15,8	93,7
16	9	9 (24 m)	63,9	NC (4,7)-NC (4,7)	-	NC (4,7)	59,2
17	10	10 (6 m)	61,8	6,4	-	6,4	55,4
18		10' (6 m)	29,8	ND (1,4)-ND (1,4)	-	ND (1,4)	28,4
19	11	11 (10 m)	71,4	NC (4,7)-NC (4,7)	-	NC (4,7)	66,7
20	12	12 (10 m)	56,9	NC (4,7)-NC (4,7)	-	NC (4,7)	52,2

^(*) Dilución de muestra en la solución: 2:25.

ND significa no detectado. La concentración hallada es menor al límite de detección del método expresado entre paréntesis.

NC significa no cuantificado. La concentración hallada es mayor al límite de detección y menor al límite de cuantificación del método expresado entre paréntesis.

^(**) Para las muestras con As(III) ND o NC, el As total se sustrae del valor expresado entre paréntesis.

III.3.2. Validación del método de determinación de As total en aguas subterráneas.

La tabla 17 muestra la exactitud metodológica evaluada mediante el análisis del contenido de As en una muestra de agua natural con valor certificado para el analito de $56,02 \pm 0,73 \text{ ng ml}^{-1}$ (material de referencia certificado NIST 1643d).

Tabla 17. Resultados de evaluación de exactitud para la determinación de As total en agua subterránea.

Corrida	Valor hallado ^(*) (ng ml ⁻¹)	Media (ng ml ⁻¹)	Desviación Estándar	DER %	Intervalo de confianza 95,0 %
1	56,33	55,62	0,824	1,5	53,57 - 57,66
	54,71				
	55,81				
2	54,95	56,03	1,637	2,9	51,97 - 60,10
	57,91				
	55,23				

^(*) Valores corregidos por la recuperación porcentual.

Las corridas correspondientes se presentan en el Anexo I. Los test de hipótesis para comparación de las medias con el valor de referencia permite verificar, con un nivel de confianza estadístico del 95%, que no existen diferencias entre las medias de ambas corridas y el valor certificado (las salidas estadísticas pueden observarse en el Anexo II), demostrándose así la exactitud de los resultados obtenidos con la metodología empleada en condiciones de repetibilidad.

III.3.3. Presencia de As(III).

Los niveles de As(III) oscilan entre 0 y 36 % respecto del contenido de As total con una media del 12 %, lo que implica que una baja proporción del As presente se encuentra en su forma más tóxica. Estos valores se corresponden con la información proveniente de estudios anteriores que revelan un valor guía para As(III) del 10% del As total (Torralba et al., 1994).

En el rango de pH 6,5 - 8, correspondiente a las muestras analizadas, los diagramas de equilibrio para las formas iónicas de As en función del pH, muestran la coexistencia de las especies AsO_3H_3 y $\text{AsO}_4\text{H}_2^-/\text{AsO}_4\text{H}^-$. La escasa variación del pH en el conjunto de muestras analizado permite descartar su influencia sobre posibles alteraciones del equilibrio de oxidación/reducción entre las especies.

III.3.4. Parámetros de caracterización. Correlaciones.

Paralelamente a las determinaciones de As total y especies inorgánicas As(III) y As(V) se determinaron el pH, contenido de Fe, dureza total y alcalinidad total de las muestras. El pH de las 20 muestras analizadas estuvo comprendido en el rango de 6,5-8. La cantidad de Fe presente no superó en ningún caso el nivel de 0,05 ppm.. Los resultados obtenidos para dureza total y alcalinidad total se muestran en la tabla 18.

Tabla 18. Valores de dureza total y alcalinidad total en las muestras de agua subterránea.

<i>n</i>	Identificación de muestra	Dureza total (ppm)	Alcalinidad total (ppm)
1	1	89,6	554,4
2	2	212,2	352,8
3	2'	273,5	319,2
4	3	301,8	336,0
5	3'	608,2	358,4
6	4	235,8	397,6
7	4'	169,7	425,6
8	5	179,2	358,4
9	5'	188,6	408,8
10	5''	179,2	375,2
11	6	292,3	285,6
12	6'	811,0	380,8
13	7	848,7	235,2
14	7'	226,3	302,4
15	8	273,5	352,8
16	9	419,6	498,4
17	10	2546,1	705,6
18	10'	1744,6	184,8
19	11	862,8	257,6
20	12	424,4	336,0

Las correlaciones obtenidas mediante un análisis de variables múltiples, con transformación logarítmica de todas las variables como ajuste del sistema para distribución normal, pueden observarse en la tabla 19. Las salidas estadísticas correspondientes se presentan en el Anexo II.

Tabla 19. Correlación entre parámetros logarítmicos de caracterización de las muestras.

	As total	As(III)	Dureza	Alcalinidad
As total		0,5555 (17) 0,0206	-0,6742 (17) 0,0030	0,4887 (17) 0,0465
As(III)	0,5903 (20) 0,0061		0,7712 (17) 0,0003	0,8940 (17) 0,0000
Dureza	-0,6383 (20) 0,0025	-0,7032 (20) 0,0005		-0,7445 (17) 0,0006
Alcalinidad	0,3072 (20) 0,1876	0,5638 (20) 0,0096	-0,2099 (20) 0,3744	

Coefficiente de correlación muestral r
(Tamaño de muestra)
Valor de P

En la tabla se expresan los valores de los coeficientes de correlación muestral r (coeficiente de correlación producto-momento de Pearson), indicando entre paréntesis, el número de pares de datos utilizados para computar cada coeficiente. Los valores de P menores de 0,05 indican correlación distinta de 0 con significación estadística en el nivel de 95% de confianza.

Los análisis estadísticos presentados difieren en sus tamaños de muestra. Para $n = 20$ se incluyen la totalidad de los datos obtenidos, mientras que para $n = 17$ se excluyen las muestras con valores de alcalinidad total elevados (mayores \cong a 500 ppm), identificadas como muestra 1; 9 y 10. Este último análisis muestra un incremento de los coeficientes de correlación entre las variables (excepto para la relación As total y As(III)). La relación negativa hallada entre el contenido de As total y la dureza total (reflejada por $r = -0,6383$; $P = 0,0025$) se corresponde con la información disponible de las aguas subterráneas de la región (Curso de agua potable, 1999).

Las concentraciones de As(III) también aparecen relacionadas significativamente con la dureza total ($r=-0,7032$; $P=0,0005$). La correlación entre el As(III) y la alcalinidad total ($r= 0,8940$; $P=0,0000$) resulta particularmente significativa. La información aportada por esta última experiencia podría corresponderse con las investigaciones llevadas a cabo en la India en regiones con aguas subterráneas altamente contaminadas con As, donde la relación As(III):As(V) hallada es 1:1. (Chatterjee et al., 1995; Das et al., 1995). Los autores sugieren la presencia de carbono orgánico en las napas estudiadas, reflejado en el aumento de HCO_3^- ; la mayor alcalinidad podría entonces estar relacionada con el incremento de As(III).

Los resultados de las experiencias inducen a la continuidad de los estudios para ampliar su significación estadística mediante un mayor número de datos.

III.3.5. Resultados de As total en leche. Comparación entre contenidos de As total en agua subterránea y leche.

Se evaluó el contenido de As total en 36 muestras de leche agrupadas en pooles formados por 3 muestras pertenecientes a un mismo establecimiento. En la tabla 20 se presenta un resumen de los valores obtenidos para duplicados de muestras analizadas (pooles).

Tabla 20. Resumen de resultados obtenidos durante la determinación de As total en leche.

Identificación de muestra	Conc. de la solución en HCl 4,5N (25 ml)		Conc. de la solución - Blanco promedio (*) (ng ml ⁻¹)	Conc. de As en las muestras (50 ml) (ng ml ⁻¹ leche)		Recuperación (%)
	Absorbancia	Concentración (ng ml ⁻¹)		Duplicados	Promedio	
Bachada 1						
1	0,070	3,1	0,8	0,4	ND (1,3)	
1d	0,078	3,6	1,3	0,6		
2	0,060	2,5	0,2	0,1	ND (1,3)	
2d	0,052	2,0	-	-		
6	0,076	3,5	1,2	0,6	ND (1,3)	
6d	0,081	3,8	1,5	0,8		
Rec. 6 -2,5 ppb	0,165	9,1	6,8	3,4	3,4	108
Rec. 6 -5,0 ppb	Pérdida de cenizas. Rotura de vaso de precipitados.		-	-		
Blanco 1	0,043	1,4	-	-		
Blanco 2	0,056	2,2	-	-		
Bachada 2						
4	0,079	3,7	1,4	0,7	ND (1,3)	
4d	0,081	3,8	1,5	0,8		
5	0,122	6,4	4,1	2,0	NC (4,3)	
5d	0,096	4,7	2,4	1,2		
7	0,075	3,4	1,1	0,6	ND (1,3)	
7d	0,072	3,2	0,9	0,4		
8	Réplicas sin repetitividad.		-	-	ND (1,3)	
8d	0,079	3,7	1,4	0,7		
Rec.8 -2,5 ppb	0,164	9,0	6,7	3,4		108
Rec.8 -5,0 ppb	0,215	12,2	9,9	5,0		82
Blanco 1	0,090	4,4	-	-		
Blanco 2	0,047	1,7	-	-		

Continuación de tabla.

Identificación de muestra	Conc. de la solución en HCl 4,5N (25 ml)		Conc. de la solución - Blanco promedio ^(*) (ng ml ⁻¹)	Conc. de As en las muestras (50 ml) (ng ml ⁻¹ leche)		Recuperación (%)
	Absorbancia	Concentración (ng ml ⁻¹)		Duplicados	Promedio	
Bachada 3						
9	0,068	3,0	0,7	0,4	ND (1,3)	
9d	0,056	2,2	-	-		
10	0,054	2,1	-	-	ND (1,3)	
10d	Material carbonoso en disolución de cenizas.		-	-		
12	0,060	2,5	0,2	0,1	ND (1,3)	
12d	0,061	2,6	0,3	0,2		
Rec.10 -2,5 ppb	0,138	7,4	5,1	2,6		94
Rec.12 -5,0 ppb	0,235	13,4	11,1	5,6		109
Blanco 1	0,063	2,7	-	-		
Blanco 2	0,053	2,0	-	-		
Bachada 4						
3	0,058	2,4	0,1	-	ND (1,3)	
3d	0,062	2,6	0,3	0,2		
11	0,053	2,0	-	-	ND (1,3)	
11d	0,058	2,4	0,1	-		
Rec.11 -2,5 ppb	0,149	8,1	5,8	2,9		116
Rec.11 -2,5 ppb	0,152	8,2	5,9	3,0		120
Rec.11 -5,0 ppb	0,210	11,9	9,6	4,8		96
Rec.11 -5,0 ppb	0,216	12,2	9,9	5,0		100
Blanco 1	0,070	3,1	-	-		
Blanco 2	0,038	1,1	-	-		

^(*) Concentración del blanco promedio (n=8): 2,3 ng ml⁻¹ de As total.

Los valores puntuales de recuperación porcentual arrojan un promedio del 104%. A excepción de la muestra 5, las concentraciones de As total para todas las muestras están por debajo del límite de detección estimado para la metodología empleada.

Sin embargo, la comparación del contenido promedio de As total en las muestras de agua subterránea para cada establecimiento y los promedios de las señales de As total para las muestras de leche, asumiendo las concentraciones obtenidas como valores válidos a los fines del análisis estadístico, muestra una muy fuerte correlación positiva ($r > 0,90$; $r^2 > 80\%$; $P = 0,0000$) con significación estadística en el nivel de 99% de confianza. Los datos de la regresión lineal simple se presentan en el Anexo II.

Se plantea así, el interrogante de una relación potencial, cuya comprobación se convierte en objeto de estudios posteriores con una metodología que contemple los problemas de muestreo y de análisis inherentes a mejorar la detección del analito.

IV. CONCLUSIONES

Los estudios desarrollados en el presente trabajo de tesis aportan nuevos conocimientos sobre aspectos vinculados a la ocurrencia de As en las aguas subterráneas de una amplia zona de la provincia de Santa Fe, la presencia de As(III) caracterizando su toxicidad y el impacto de esta contaminación natural sobre la producción láctea de la cuenca lechera establecida en la región.

La metodología empleada para la determinación de As total en aguas subterráneas por espectrometría de absorción atómica con inyección de flujo y generación de hidruros por NaBH_4 , es ampliamente aceptada y recomendada por analistas y organismos reguladores a nivel mundial. Sin embargo, su aprovechamiento y profundización en la determinación de especies de As es escaso, pese a que se trata de una técnica económica, sensible, rápida y confiable. No se ha expuesto hasta el momento un desarrollo adecuado para que la técnica empleada en la determinación de As total pueda incorporar la especiación de As inorgánico con la misma eficiencia.

La determinación de As total en aguas subterráneas con la metodología empleada alcanza valores satisfactorios para sus parámetros analíticos, registrándose un límite de detección de $0,6 \text{ ng ml}^{-1}$ y una sensibilidad relativa de $0,12 \text{ ng ml}^{-1}$. La fortificación adecuada de las muestras indica una recuperación de As del 96% y el análisis de material de referencia en el nivel de $55,82 \text{ ng ml}^{-1}$ (valor certificado $56,02 \pm 0,73 \text{ ng ml}^{-1}$) verifica la exactitud de las medidas. La velocidad de muestreo asciende a 60 muestras por hora.

Las concentraciones de As total en las aguas subterráneas de la región centro-oeste de la provincia de Santa Fe, seleccionada para este estudio por el conocimiento histórico de la

contaminación natural de As que presentan sus napas y la importancia de su producción lechera, están comprendidas en el rango de 28,1 a 307,6 ng ml⁻¹ de As. La mayoría de las muestras supera los límites máximos permitidos para agua de bebida, contemplados en la legislación vigente a nivel nacional e internacional y todos están ampliamente por encima del valor propuesto recientemente por U.S. EPA de 5 ng ml⁻¹ de As (valor dado a conocer el 24 de Mayo del 2000). La Academia Nacional de Ciencias de ese país (NAS) finalizó en Marzo de 1999 la revisión de los datos existentes sobre arsénico y recomendó al organismo disminuir a la brevedad el estándar de arsénico de 50 ng ml⁻¹ establecido en 1975. U.S. EPA estima que esta reducción protegerá a más de 22,5 millones de habitantes de cánceres de piel, pulmón, vejiga y otros problemas, entre ellos deficiencias cardiovasculares y diabetes. La correlación negativa importante ($r=-0,6383$; $P=0,0025$) entre el As total y la dureza total de las muestras se corresponde a estudios realizados con anterioridad.

La especiación de As(III) y As(V) por concentraciones variables de NaBH₄ se caracteriza por su simplicidad, considerando que el único cambio de variables involucrado para la determinación específica de As(III) respecto de la determinación de As total (necesaria para el cálculo de As(V) por diferencia), consiste en la concentración más baja del agente reductor. El límite de detección de 1,4 ng ml⁻¹, correspondiente a la metodología, es aceptable en el marco de las experiencias comprendidas en la tesis, aunque es aconsejable su disminución en trabajos futuros a los fines de estudiar el comportamiento de las especies arsenicales inorgánicas. Por otro lado, se requiere mayor investigación respecto de la posibilidad de eliminación de las interferencias de organoarsenicales por ajustes a la técnica. Los valores de DER% obtenidos para las muestras extraídas por duplicado muestran un nivel de reproducibilidad aceptable, dando cierta garantía respecto de la integridad de las especies que se miden al final de un proceso de extracción, transporte y conservación de muestras.

La fuerte correlación positiva ($r=0,8940$; $P=0,0000$) observada entre el As(III) y la alcalinidad total para las muestras de aguas subterráneas parece encontrar asidero en investigaciones recientes que estudian el comportamiento del arsénico en este medio asociado a todo el sistema hidrogeológico circundante, atribuyendo el aumento de alcalinidad a la formación de HCO_3^- , producto de la oxidación de carbono orgánico.

Las proporciones porcentuales del contenido de As(III) respecto del As total encontrado en las muestras de agua subterránea oscila entre 0 y 36%. Este rango comprende el valor guía de 10% revelado en numerosos estudios. La presencia de As(III) indica un aumento en el riesgo a la exposición del analito por esta vía, dada la mayor toxicidad de esta especie respecto del As(V). La continuación de los estudios relacionados a la caracterización de la toxicidad de los recursos de agua en la provincia y el país en general, constituye un punto de extrema necesidad.

En cuanto a la evaluación del impacto provocado por las condiciones ambientales descriptas sobre la producción láctea de la región en estudio, un total de 36 muestras de leche extraídas, analizadas en pools formados por 3 muestras pertenecientes a un mismo establecimiento, mostraron niveles muy bajos de As total en leche, 2 órdenes menor al límite máximo permisible en la legislación de nuestro país. La inyección de flujo acoplada a la espectrometría de absorción atómica con generación de hidruros como modo de inyección de muestra para la determinación del analito en leche, aportó las ventajas analíticas propias de la técnica como ser repetitividad y alta velocidad de muestreo (60 muestras por hora), adjudicándose un límite de detección igual a $1,3 \text{ ng ml}^{-1}$ y una sensibilidad relativa de $0,14 \text{ ng ml}^{-1}$.

La recuperación porcentual de As en las muestras de leche fortificadas en los niveles de 2,5 y 5 ng ml^{-1} arrojó un valor promedio para 8 muestras del 104%. La utilización de 3 ml de solución

de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 50%, como fundente durante la eliminación de la materia orgánica presente en la matriz por calcinación a 550 °C, resultó adecuada a los fines de evitar las pérdidas de As por volatilización de haluros del analito. Las pruebas realizadas con el mismo volumen de solución de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 25%, mostraron una recuperación porcentual menor (aproximadamente 70%). El modo de cuantificación estudiado y seleccionado para As total en las muestras de leche utilizando soluciones estándar acuosas simplifica la medición instrumental.

La comparación del contenido promedio de As total en las muestras de agua subterránea para cada establecimiento y los promedios de las señales de As total para las muestras de leche, muestran una correlación positiva mayor a 0,90, con lo que el modelo estaría explicando más del 80% de la variabilidad del As total presente en la leche con una significación estadística del 99%. Las 36 muestras de leche analizadas presentaron valores bajos del analito (muy inferiores al límite máximo de 100 ng ml⁻¹ de As total permitido por la legislación de nuestro país), independientemente de las concentraciones de As total en las muestras de agua subterránea de los establecimientos correspondientes. Esta afirmación conduce al cuestionamiento acerca de la situación de aquellos establecimientos rurales o tambos con aguas para consumo animal que superan el nivel de 200 ng ml⁻¹ de As, establecido por la legislación nacional para este rubro. Es evidente el requerimiento de mayor investigación en el tema, considerando la situación particular de esta importante cuenca lechera del país que soporta el rigor de una elevada contaminación natural de As en sus aguas subterráneas.

GLOSARIO

AAS	Espectrometría de absorción atómica.
AES	Espectrometría de emisión atómica.
ASTM	American Society for Testing and Materials.
β_g	Eficiencia de la generación de hidruros.
β_r	Eficiencia de liberación de hidruros.
β_t	Eficiencia de transporte del hidruro.
c_0	Concentración del analito en la muestra.
c_{max}	Concentración máxima del analito en la corriente ácida.
c_t	Concentración del analito en la corriente ácida.
D	Coefficiente de dispersión.
DMA	Acido dimetilarsínico.
F	Velocidad total del flujo de gas.
F_0	Velocidad del flujo de gas carrier.
f_0	Velocidad del flujo de borohidruro.
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
FDA	Administración de Drogas y Alimentos (Estados Unidos de Norteamérica).
FI	Inyección de flujo.
FIL-IDF	Federación Internacional de Lechería.
f_s	Flujo constante de carrier ácido.
GHS	Glutathiol.
HG	Generación de hidruros.
ICP	Plasma acoplado por inducción.
LC	Límite de cuantificación.

LD	Límite de detección.
MCL	Nivel de contaminante máximo.
MCLG	Nivel de contaminante máximo global.
MMA	Acido monometilarsónico.
MS	Espectrometría de masa.
N_0	Número total de átomos del analito suministrados en la forma de hidruro al atomizador.
NC	No cuantificado.
ND	No detectado.
N_d	Número de átomos del analito presentes como hidruros en V_d .
NIST	National Institute of Standards & Technology.
$N_{liberado}$	Número total de átomos del analito liberados a partir de la muestra en la forma de hidruros.
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud.
PHS	Servicio de Salud Pública (Estados Unidos de Norteamérica).
RfD	Dosis de referencia.
SAM	S-adenosilmetionina.
SD	Desviación estándar muestral.
SDWA	Ley de Seguridad de Agua de Bebida (Estados Unidos de Norteamérica).
SENASA	Servicio de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (Argentina).
SM	Standard Methods.
S_{max}	Función máxima de suministro de hidruro.
$S_{(t)}$	Función de suministro de hidruro.
s_{max}	Función máxima de suministro de analito líquido.
$s_{(t)}$	Función de suministro de analito líquido.

τ_s	Constante de tiempo característica.
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norteamérica.
U.S. EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de Norteamérica.
USGS	U.S. Geological Survey.
V_d	Volumen del separador gas-líquido.
V_h	Volumen de hidrógeno liberado por unidad de masa de borohidruro.
V_s	Volumen inyectado de muestra.
WHO/OMS	Organización Mundial de la Salud.

REFERENCIAS

- Alfassi, Z.V. (ed). 1994. Determination of trace elements. VCH, Weinheim, República Federal de Alemania.
- Amiqas PC-Program. Method Evaluation Quality Control Proficiency Testing. 1988.
- Anderson, R.K., Thompson, M. and Culbart, E. 1986. Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation. Part I. Reaction media. *Analyst*, 111, p.p. 1143-1152.
- Anderson, R.K., Thompson, M. and Culbart, E. 1986. Selective reduction of arsenic species by continuous hydride generation. Part II. Validation of Methods for application to Natural Waters. *Analyst*, 111, p.p. 1153-1158.
- AOAC Official Methods of Analysis. 1990. Arsenic in food. p.p. 243-246.
- Borho, M. and Wilderer, P. 1997. A reliable method for preservation and determination of arsenate(III) concentrations in groundwater and water works samples. *J. Water SRT-Aqua*, 46 (3), p.p. 138-143.
- Borum, D.R. and Abernathy, C.O. 1994. Human oral exposure to inorganic arsenic. In: W.R. Chappell, C.O. Albernathy and C.R. Cothorn (eds), *Arsenic Exposure and Health Effects*, 16, p.p 30-31.
- Burriel Marti, F.; Arribas Jimeno, S.; Lucena Conde, F. and Hernández Ménez, J. 1985.

Química Analítica Cuantitativa. Duodécima edición. Paraninfo S.A.

Cervera, M.L. and Montoro, R. 1994. Critical review of the atomic absorption spectrometry analysis of arsenic in food. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 348, p.p. 331-340.

Cervera, L.M., López, J.C. and Montoro, R. 1994. Arsenic content of Spanish cow's milk determined by dry ashing hydride generation atomic absorption spectroscopy. *Journal of Dairy Research*, 61, p.p. 83-89.

Cervera, M.L.; Montoro, R.; Uría Sánchez, J.E.; Menéndez García, A. and Sanz Medel, A. 1995. Determination of As in foods by dry ashing, tandem on-line continuous separation, and ICP-OES analysis. *Atomic Spectroscopy*.

Chatterjee, A., Das, D., Mandal, B.K., Roy Chowdhury, T., Samanta, G., Chakraborti, D. 1995. Arsenic in groundwater in six districts of West Bengal, India: The biggest arsenic calamity in the world. Part I. Arsenic species in drinking water and urine of the affected people. *Analyst*, 120, p.p. 643-650

Das, D., Chatterjee, A., Mandal, B.K., Samanta, G., Chanda, B., Chakraborti, D. 1995. Arsenic in ground water in six districts of West Bengal, India: The biggest arsenic calamity in the world. Part II. Arsenic concentration in drinking water, hair, nail, urine, skin-scale and liver tissue (biopsy) of the affected people. *Analyst*, 120, p.p. 917-924.

Curso sobre agua potable. 1999. ENRESS (Ente Regulador de Servicios Sanitarios - Provincia de Santa Fe) - Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Litoral.

- Dedina, J. and Tsalev, D.L. 1995. Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry. John Wiley & Sons.
- Donard, O.F.X. and Martin, F.M. 1992. Hyphenated techniques applied to environmental speciation studies. *Trends in Analytical Chemistry*, 11 (1), p.p. 17-26.
- Driehaus, W. and Jekel, M. 1992. Determination of As(III) and total inorganic arsenic by on-line pretreatment in hydride generation atomic absorption spectroscopy. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 343, p.p. 352-356.
- Fang, Z. 1993. Flow Injection Separation and Preconcentration. VCH, Weinheim, República Federal de Alemania.
- Fennema, O.R. 1993. Química de los Alimentos. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España.
- Flaschka H.A.; Barnard, A.J. Jr. and Sturrock, P.E.. 1982. Química Analítica Cuantitativa. Vol. II. Compañía Editorial Continental.
- Grandjean, P. and Weihe, P. 1995. Relation of a seafood diet to mercury, selenium, arsenic and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentrations in human milk. *Environmental Research*, 71, p.p. 29-38.
- Guo, T., Erler, W., Schulze, H. and McIntosh, S. 1990. Determination of hydride-forming elements with the FIAS-200 Flow Injection-Mercury/Hydride System. *Atomic Spectroscopy*, 11 (1), p. 24.

- Harnett, D.L. and Murphy, J.L. 1987. Introducción al análisis estadístico. Addison-Wesley Iberoamericana.
- Haswel, S.J. 1985. Arsenic speciation in soil-pore waters from mineralized and unmineralized areas of South-West England. *Talanta*, 32 (1), p.p. 69-72.
- Howard, A.G. and Arbab-Zavar, M.H. 1981. Determination of inorganic arsenic(III) and arsenic(V), methylarsenic and dimethylarsenic species by selective hydride evolution atomic absorption spectroscopy. *Analyst*, 106, p.p. 213-220.
- Jiménez de Blas, O., Vicente González, S. Seisedos Rodríguez, R. and Hernández Méndez, J. 1994. Determination and speciation of arsenic in human urine by ion-exchange chromatography/ flow injection analysis with hydride generation/atomic absorption spectroscopy. *Journal of AOAC International*, 77 (2), p.p. 441-445.
- Lin, L. and Wang, J. 1995. Arsenic speciation using capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection. *Journal of Chromatographic Science*, 33, p.p. 177-180.
- López, A., Torralba, R., Palacios, M.A. and Cámara, C. 1992. Generation of AsH₃ from As(V) in the absence of KI as pre-reducing agent: speciation of inorganic arsenic. *Talanta*, 39 (10), p.p. 1343-1348.
- López Pérez, C. 1996. Econometría y análisis estadístico multivariable con STAT GRAPHICS. Técnicas avanzadas. RA-MA.

- Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Deming, S.N.; Michotte, Y. and Kaufman, L. 1988. Elsevier.
- Mueller, J. 1999. Determination of inorganic arsenic(III) in ground water using hydride generation coupled to ICP-AES (HG-ICP-AES) under variable sodium boron hydride (NaBH_4) concentrations. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363, p.p. 572-576.
- Mushak, P. 1983. Mammalian biotransformation processes involving various toxic metalloids and metals. *Chemical Toxicology and Clinical Chemistry of Metals*, ISBN 0.12.137520.X.
- Narsito and Agterdenbos, J. 1987. A study of arsenic(III) and arsenic(V) reduction and of arsine decomposition in hydride-generation atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 197, p.p. 315-321.
- Recommended analytical conditions and general information for Flow Injection Mercury/Hydride Analyses using the Perkin-Elmer FIAS-100/400. *Perkin Elmer*, order No. TSAA-10C.
- Research Plan for Arsenic in Drinking Water. 1998. U.S.EPA.
- Rodricks, J.V. and Pholand, A.E. 1981. Toxicidad natural de los alimentos. In: Howards R. Roberts (ed), *Sanidad Alimentaria*. Zaragoza, España. (5), p. 157.
- Ruzicka, J. and Hansen, E.H. 1987. Flow Injection Analysis. Segunda edición. John Wiley & Sons.

Schoof, R.A., Yost, L.J., Eickhoff, J., Crecelius, E.A., Cragin, D.W., Meacher, D.M. and Menzel, D.B. 1999. A market basket survey of inorganic arsenic in food. *Food and Chemical Toxicology*, 37, p.p. 839-846.

SOP-04: Field sample filtration. U.S. EPA.

SOP-18: Gound water sampling. U.S. EPA. 1997.

SOP-37: Field method for sampling water for arsenic speciation. U.S. EPA. 1997.

SOP-42: Grounwater sampling. U.S. EPA. 1997.

Talmi, Y. and Bostick, D.T. 1975. The determination of arsenic and arsenicals. *Journal of Chromatographic Science*, 13, p.p. 231-237.

Torralba, R., Bonilla, M., Palacios, M.A. and Cámara, C. 1994. Flow injection analysis and continuous flow systems to determine As(III) and As(V) by dyhydride generation atomic absorption spectrometry. *Analisis*, 22, p.p. 478-482.

Ulman, C., Gezer, S., Anal, Ö., Ruhi Töre, I. and Kirca, Ü. 1998. Arsenic in human and cow's milk: a reflection of enviromental pollution. *Water, Air and Soil Pollution*, 101, p.p. 411-416.

Vasken Aposhian, H., Zakharyan, R.A., Wildfang, E.K., Healy, S.M., Gailer, J., Radabaugh, T.R., Bogdan, G.M., Powell, L.A. and Aposhian M.M. 1999. How is inorganic arsenic

detoxified? In: W.R. Chappell, C.O. Albernathy and Calderon, R.L. (eds), *Arsenic Exposure and Health Effects*, p.p 289-297.

Vather, M. 1999. Variation in human metabolism of arsenic. In: W.R. Chappell, C.O. Albernathy and Calderon, R.L. (eds), *Arsenic Exposure and Health Effects*, p.p 267-279.

Vélez, D., Ybáñez, N. and Montoro, R. 1996. Optimization of the extraction and determination of monomethylarsonic and dimethylarsinic acids in seafood products by coupling liquid chromatography with hydride generation atomic absorption spectrometry. *Journal Analytical Atomic Spectrometry*, 11, p.p. 271-277.

Walpole, R.E. and Myers, R.H. 1992. Probabilidad y Estadística. Cuarta edición. Mc Graw-Hill/Interamericana de México.