

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y
NATURALES



**“EVALUACIÓN QUÍMICA DEL EFECTO DE
LA ACTIVIDAD GANADERA EN LA
REDUCCIÓN DE ARSÉNICO EN EL AGUA
FREÁTICA DEL NE DE MENDOZA”.**

**Seminario de investigación presentado por el alumno
Ricardo Ariel Elia Dazat para optar al grado de
Licenciatura en Ciencias Básicas
Orientación Química.**

Director: Dr. Rodolfo Wuilloud
Codirectora: Dra. Julieta Aranibar

Mendoza - Argentina

-2017-

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores de tesis el Dr. Rodolfo Wuilloud y la Dra. Julieta Aranibar, por su disposición, comprensión y apoyo mostrado durante la realización de esta tesis y por brindarme la oportunidad de realizarme profesionalmente.

Expreso mi agradecimiento al Laboratorio QUIANID de la FCEN por facilitarme las instalaciones y equipos que han permitido realizar este trabajo, en especial a Brenda Canizo por su amabilidad y su ayuda incondicional y a Alexander Castro por su guía durante mi estadía y el entrenamiento recibido en HPLC-HG-AFS.

Agradezco a los integrantes de los laboratorios del CCT-Conicet Mendoza (Fitoquímica, Sedimentología, LEGAN) del IANIGLA por tantos gratos momentos compartidos. En especial a Pablo Meglioli, quien siempre ha estado a mi lado brindándome su apoyo y amistad, a Enrique Mas que siempre estuvo en cada ayuda y percance que tuve en la realización de los ensayos y a Vanesa García que estuvo incondicionalmente ayudando y apoyando en el campo en la recolección de muestras.

A la Universidad Nacional de Cuyo y de manera especial a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales la cual me formó como un buen profesional y en la que obtuve conocimientos invaluable

A mi madre por brindarme su amor y su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos a lo largo de toda mi vida.

A todas las personas que directa o indirectamente han ayudado en la realización de este trabajo.

ÍNDICE TEMÁTICO

Capítulo I

1. Introducción	2
1.1. Caso de estudio: Problemática de la población del NE de Mendoza. Tipo de uso del territorio, disponibilidad y calidad de agua	2
1.2. Arsénico en el medio ambiente	2
1.3. Metabolismo, toxicidad y legislación del arsénico	7
1.4. Necesidad del análisis de especiación	10
1.5. Técnica Analítica para el análisis de especiación de arsénico	13
1.5.1. Cromatografía líquida de alto rendimiento	13
1.5.2. Generación de hidruro	15
1.5.3. Espectrometría de fluorescencia atómica	16
1.5.4. Espectrometría de masas atómicas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo	18
1.6. Demanda Biológica de Oxígeno	19
1.6.1. Importancia de la Demanda Biológica de Oxígeno	19
1.6.2. Factores que influyen en la Demanda Biológica de Oxígeno	20
1.7. Efecto del Nitrato en agua	21
1.8. Importancia del estudio de especiación de As en el agua subterránea del NE de Mendoza	22
1.9. Objetivos	23
1.10. Hipótesis	23

Capítulo II

2. Materiales y Métodos	25
2.1. Muestras	25
2.1.1. Sitio de muestro	25
2.1.2. Sistemática	26
2.1.3. Preservación	26
	27

2.2.	Equipos.....	
2.2.1.	Equipo utilizado para la determinación total de arsénico y su análisis de especiación	27
2.2.2.	Equipo utilizado para las mediciones in situ (temperatura, pH, OD, redox, conductividad)	28
2.2.3.	Equipo utilizado para la determinación de nitratos	28
2.3.	Reactivos	29
2.3.1.	Reactivos utilizados para la determinación de arsénico por HPLC-HG-AFS	29
2.3.2.	Reactivos utilizados para el estudio de DBO	30
2.3.3.	Reactivo empleado para la determinación de nitratos	31
2.4.	Procedimientos	31
2.4.1.	Determinación in situ de parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH, OD, redox, conductividad)	31
2.4.2.	Determinación de Arsénico total y análisis de especiación en agua freática por HPLC-HG-AFS	31
2.4.3.	Determinación de materia orgánica en agua freática a través de la DBO.....	34
2.4.4.	Determinación de nitratos en agua freática	35

Capítulo III

3.	Resultados y Discusiones	37
3.1.	Análisis de especiación de arsénico en muestras de agua por HPLC-HG-AFS.	37
3.2.	Evaluación y análisis de los datos obtenidos por DBO	53
3.3.	Análisis de los datos de nitratos.....	55
3.4.	Evaluación de los datos obtenidos in situ	56
3.5.	Comparación de resultados	62

Capítulo IV

4.	Conclusiones	64
-----------	---------------------------	-----------

Capítulo V

5. Bibliografía 67

Anexo de imágenes 71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagen de San Albertus Magnus.	3
Figura 2. Distribución mundial de acuíferos y cuerpos de agua superficial con altas concentraciones de As.	5
Figura 3. Distribución geográfica del As en el agua subterránea de Argentina.	6
Figura 4. Biotransformación del arsénico.	8
Figura 5. Diagrama Eh-pH de especies acuosas de As en el sistema As-O ₂ -H ₂ O a 25°C y 1 bar de presión total.	11
Figura 6. Especies de As(III) en función del pH.	12
Figura 7. Especies de As(V) en función del pH.	12
Figura 8. Esquema del instrumento HPLC.	15
Figura 9. Esquema del instrumento HG.	16
Figura 10. Esquema de espectrómetro de fluorescencia sin dispersión.	18
Figura 11. Diagrama esquemático de un equipo ICP-MS.	19
Figura 12. Mapa de América del Sur con la extensión del desierto del Monte.	23
Figura 13. Equipo en línea HPLC-HG-AFS.	25
Figura 14. Equipo Thermo Scientific Orion Star A329.	26
Figura 15. Equipo espectrofotómetro HACH DR 2800.	27
Figura 16. Diagrama esquemático del instrumental utilizado para la determinación de las especies de As mediante HPLC-HG-AFS.	30
Figura 17. Diagrama esquemático del procedimiento del método Winkler.	32
Figura 18. Cromatograma obtenido para el análisis de especiación de As de una solución patrón de 200 µg As/L. Caudales de HCl y NaBH ₄ a 5,3 mL/min y caudal de gas Ar a 600 mL/min. 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V)	38
Figura 19. Cromatograma obtenido para el análisis de especiación de As de una solución patrón de 200 µg As/L. Caudales de HCl y NaBH ₄ a 4 mL/min y caudal de gas Ar a 600 mL/min. 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V)	38
Figura 20. Cromatograma obtenido para el análisis de especiación de As de una solución patrón de 200 µg As/L. Caudales de HCl y NaBH ₄ a 4 mL/min y caudal de gas Ar a 800 mL/min. 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V).	39

Figura 21. Cromatogramas típicos de los análisis de especiación de As obtenidos para los diferentes patrones de las especies. Se exponen algunos a manera de ejemplo observados a concentraciones de las especies de: a) 100, b) 200 y c) 500 $\mu\text{g/L}$, 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V).	40
Figura 22. Curvas de calibración de los análisis de especiación de As obtenidos para los diferentes patrones de las especies. a) As(III), b) DMA, c) MMA y d) As(V).	41
Figura 23. Cromatogramas de análisis de especiación de As obtenidos de las aguas freáticas de los pozos balde, HB: hormigas pozo balde, DB: delicias pozo balde y PB: primavera pozo balde. 4) As(V).	44
Figura 24. Cromatogramas de análisis de especiación de As obtenidos de las aguas freáticas de los pozos piezómetros, HP: hormigas pozo piezómetro DP: delicias pozo piezómetro y PP: primavera pozo piezómetro. 1) As(III), 4) As(V).	45
Figura 25. Cromatogramas de análisis de especiación de As obtenidos de las aguas freáticas de los pozos control, Cañas: pozo control hormigas, Aranza: pozo control delicias y Chechu: pozo control primavera. 1) As(III), 4) As(V).	47
Figura 26. Gráfico de barras obtenidas de los ensayos de DBO ₅ , de los pozos controles, puestos y balde	51
Figura 27. Gráfico de barras obtenidas de los ensayos de DBO ₅ con inhibidor, de los pozos controles, puestos y balde	52
Figura 28. Gráfico de barra obtenida de los ensayos de nitrato, de los pozos controles, puestos y baldes	54
Figura 29. Gráfico de barra de ORP, de los pozos controles, puestos y baldes	55
Figura 30. Gráfico de barra de pH, de los pozos controles, puestos y baldes	56
Figura 31. Gráfico de barra de conductividad, de los pozos controles, puestos y baldes	57
Figura 32. Gráfico de barra de OD, de los pozos controles, puestos y baldes	58
Figura 33. Gráfico de barra de temperaturas, de los pozos controles, puestos y baldes	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones instrumentales y de separación cromatográfica para el análisis de especiación de As en las muestras de agua.	31
Tabla 2. Nombres químicos y propiedades de especies de As incluidos en este trabajo	36
Tabla 3. Concentraciones de las especies de As detectadas en las muestras de agua por el equipo HPLC-HG-AFS.	49
Tabla 4. Resultados obtenidos en los ensayos de los distintos pozos	60

GLOSARIO DE TÉRMINOS

AAS	Espectrometría de absorción atómica
AFS	Espectrometría de fluorescencia atómica
As(III)	Arsenito
As(V)	Arsenato
AsB	Arsenobetaína
AsC	Arsenocolina
ATP	Adenosín trifosfato
DB	Delicias pozo balde
DBO	Demanda Biológica de Oxígeno
DMA	Ácido dimetilarsenato
DP	Delicias pozo piezómetro
Eh	Potencial redox
GC	Cromatografía de gases
HACRE	Hydroarsenicismo crónico regional endémico
HB	Hormigas pozo balde
HG	Generación de hidruros
HG-AAS	Espectrómetro de absorción atómica acoplados a generación de hidruros
HG-AFS	Espectrómetros de fluorescencia atómica acoplados a generación de hidruros
HP	Hormigas pozo piezómetro
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento
IARC	Agencia Internacional para Investigación del Cáncer
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
LOD	Límite de detección
MMA	Ácido monometilarsenato
MO	Materia Orgánica
OD	Oxígeno disuelto
ORP	Potencial de óxido-reducción (redox)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PB	Primavera pozo balde
PP	Primavera pozo piezómetro
PPB	Partes por billón
TMA₃O	Oxido de trimetilarsina



CAPÍTULO I

1. Introducción

1.1. Caso de estudio: Problemática de la población del NE de Mendoza. Tipo de uso del territorio, disponibilidad y calidad de agua

En el NE de Mendoza (Lavalle), los pobladores locales se dedican mayormente a la ganadería de subsistencia, con cría predominantemente de cabras, y con alguna proporción de vacas y caballos. La zona es árida, con precipitaciones muy escasas, menores a 200 mm por año, por lo que desarrollan sus actividades utilizando el agua freática. Ésta se encuentra a poca profundidad, de 6 a 15 m en la mayoría de la zona, por lo que los pobladores excavan pozos manualmente, los enmarcan con madera de algarrobo, y extraen agua freática con baldes y la ayuda de un animal (burro o caballo). Aunque recientemente se ha construido un acueducto para proveer con agua potable a los pobladores, muchos puestos ganaderos se encuentran lejos de éste, y solo cuentan con el agua subterránea como fuente de agua para consumo humano y del ganado. El ganado se concentra alrededor de los pozos balde, ya que representa la única fuente de agua. De día pastan o forrajean en los alrededores, pero en general regresan cada noche a tomar agua. Este patrón de concentración de ganado alrededor del puesto genera cambios en la vegetación y suelos, con reducciones en la cobertura vegetal, aumentos de guano, nitrato y humedad en los suelos cerca de los puestos [1]. Estos cambios facilitan el transporte de nitrato y agua desde la superficie hacia el acuífero, disminuyendo la calidad de agua.

Asimismo, el agua subterránea de la zona contiene altas concentraciones de arsénico (As), superando ampliamente los límites máximos permitidos para consumo humano [2]. Por las características de las zonas áridas (escasa materia orgánica), el acuífero es naturalmente oxidante, y favorece la presencia de la especie química inorgánica arsenato (AsO_4^{3-}), de menor toxicidad que arsenito (AsO_3^{3-}). Sin embargo, se encontró la presencia de AsO_3^{3-} en algunas perforaciones, probablemente relacionada a flujos verticales ascendentes, o, alternativamente, a la reducción ante un ingreso de contaminación orgánica desde la superficie. [2].

1.2. Arsénico en el medio ambiente

El As es conocido desde la época de los alquimistas, pero su descubrimiento se atribuye a San Albertus Magnus **Figura 1** en el año 1250 [3].

Aunque se citan varios años para hacer referencia al nacimiento de Magnus, se considera que es 1199 el año más probable de su nacimiento, en la ciudad de Lauingen, Alemania. Es considerado como uno de los científicos, teólogos y filósofos más importantes de la edad media.

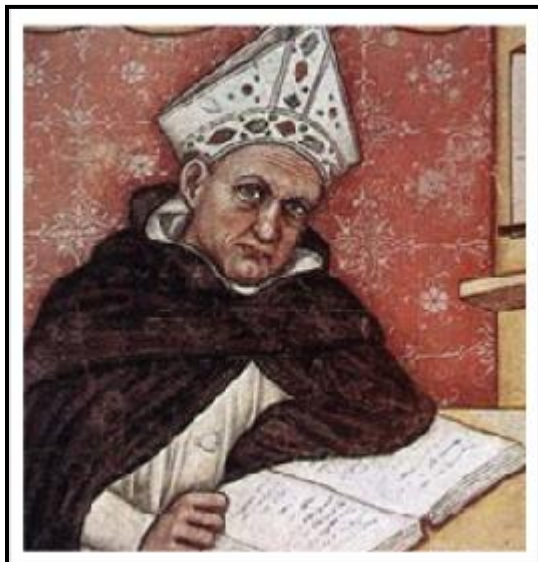


Figura 1: Imagen de San Albertus Magnus.

Se cree que Magnus descubrió el As cuando sometió a calentamiento un jabón junto con oropimente (trisulfuro de diarsénico). Dicho experimento lo condujo a realizar las siguientes observaciones [4]:

“Del oropimente al fuego, junto con jabón, no se obtiene nada similar al oro. Se pierde la coloración amarillenta, y aparece un sólido cristalino de color gris acerado, con brillo metálico. Si se deja al aire, pierde el brillo o lustre volviéndose oscuro y negro. Al calentar esta sustancia nuevamente al fuego, arde con una llama blanco-azulada que produce humo blanco y de olor similar al del ajo. No se puede oler sin notar que los ojos y la nariz se humedecen y uno se siente indispuerto”.

En la naturaleza, el As puede encontrarse en formas químicas orgánicas e inorgánicas y existir en cuatro estados de oxidación: As(0), As(III), As(-III) y As(V) con una abundancia terrestre aproximada de 1,5-3 mg kg⁻¹. Su presencia en el ambiente se encuentra asociada a fuentes naturales incluyendo la corteza terrestre, suelos, sedimentos, aire, agua y organismos vivos, y a fuentes antropogénicas. Su concentración promedio en rocas ígneas y sedimentarias se encuentra comprendida entre 0,5 - 2,5 mg kg⁻¹ lo ubica en el lugar número 20 en términos de abundancia en la corteza terrestre. Más de 200 formas minerales naturales contienen este elemento en su composición de las cuales, 60% aproximadamente corresponden a arsenatos, 20% a sulfuros y el resto a

arseniuros, arsenitos, óxidos, silicatos y arsénico elemental [5]. La arsenopirita (FeAsS), el mineral de arsénico más abundante, constituye su principal fuente de obtención.

La concentración promedio de arsénico en suelos, del orden de 6 mg kg^{-1} , muestra una gran variación dependiendo de las regiones geográfica [6]. Las concentraciones más bajas son atribuibles a suelos arenosos y las más altas a suelos aluviales y orgánicos. El pH y el potencial redox sumado al tipo y concentración de los componentes adsorbentes definen la forma química de las especies de arsénico en los suelos. En general, las formas inorgánicas aparecen como predominantes, aunque también pueden encontrarse enlazadas a materiales orgánicos. Las formas de As(V) inorgánicas predominan en suelos con ambientes aeróbicos de características oxidantes y se encuentran fuertemente absorbidas sobre arcillas, óxidos e hidróxidos de hierro y manganeso y materia orgánica. Por el contrario, las formas de As(III) predominan en suelos con características reductoras. Ambos estados de oxidación están sujetos a reacciones químicas y microbiológicas de óxido-reducción y metilación, lo cual deriva en la formación de compuestos de arsénico metilados, principalmente ácido monometilarsenato (MMA), ácido dimetilarsenato (DMA) y óxido de trimetilarsina (TMA_2O) bajo condiciones oxidantes y metilarsinas volátiles en ambientes anaeróbicos [7].

Las aguas naturales contienen generalmente bajas concentraciones de metales traza de toxicidad variada. Los elementos presentes en forma catiónica, tales como Pb(II), Cd(II), Cu(II), Zn(II), entre otros, disminuyen su solubilidad a medida que aumenta el pH del medio mientras que los elementos que forman oxianiones tales como el As, Se y Cr permanecen disueltos inclusive a pH altos. La solubilidad relativamente elevada del arsénico hace que pueda encontrarse tanto en ambientes reductores como oxidantes [8]. A potenciales redox altos o moderados, se halla estabilizado como una serie de oxianiones pentavalentes H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} , AsO_4^{3-} . Por el contrario, en condiciones más reductoras (ácidas y medianamente alcalinas) predominan las especies de arsénico trivalente H_3AsO_3 . La presencia de As(0) y As(-III) es muy poco frecuente en ambientes acuáticos. Las formas orgánicas pueden ser producidas por actividad biológica, generalmente en aguas superficiales raramente en cantidades importantes [9].

Sin embargo, cuando la presencia de concentraciones elevadas de arsénico alcanza al agua subterránea, el problema adquiere una mayor magnitud, principalmente cuando se trata de reservorios utilizados para suministro de agua de bebida humana. Si bien las concentraciones son inferiores a $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ en su gran mayoría [10], alrededor de 20 países en el mundo padecen de contaminación arsenical en sus acuíferos como Taiwán, Bangladesh, India, Vietnam, Hungría, China, Chile, Estados Unidos, México y Argentina, entre otros, afectando la calidad del suministro hídrico de más de 150 millones de personas [11]. El As es un elemento altamente tóxico y por ello

preocupa su presencia en las aguas de consumo humano. Su disposición es mayor y más común en ambientes naturales, debido a rocas volcánicas y sedimentarias marinas, depósitos minerales hidrotermales y las aguas geotermales asociadas, por lo que grandes poblaciones se vean afectadas y en ciertas zonas del mundo el problema se agudiza más. En la **Figura 2**, se observa la distribución mundial del As en el agua [12].

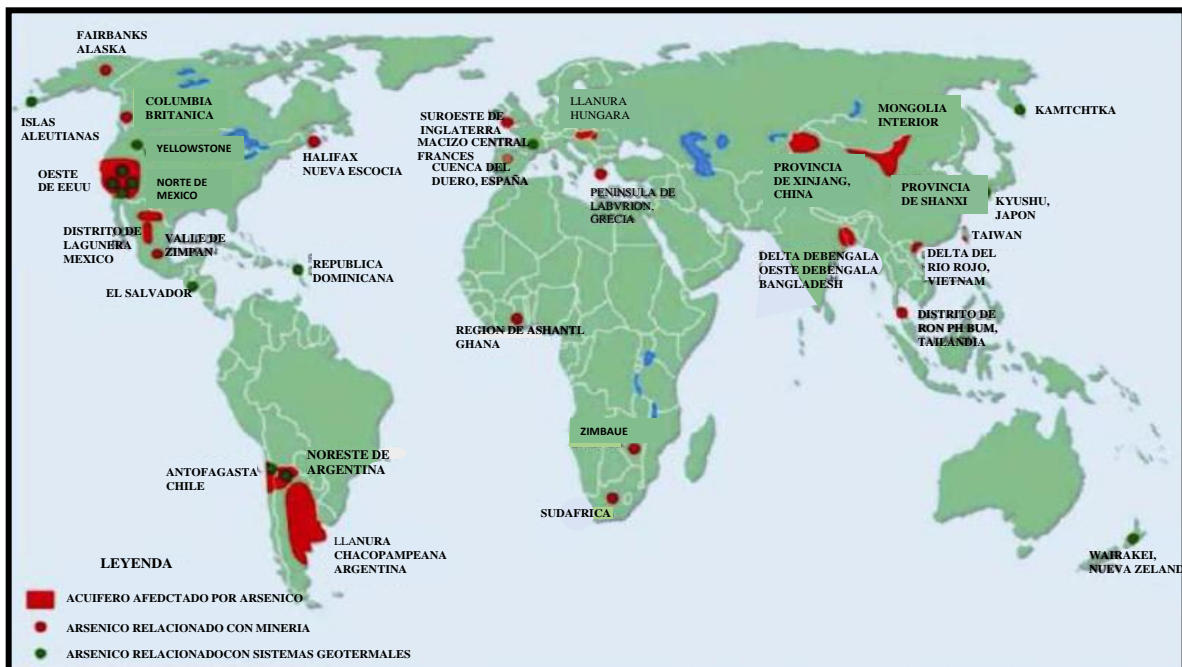


Figura 2. Distribución mundial de acuíferos y cuerpos de agua superficial con altas concentraciones de As.

En Argentina, existen lugares cuyas fuentes de agua poseen un alto contenido de As, por ejemplo, las aguas subterráneas los valores oscilan entre 470 y 770 $\mu\text{g/L}$. Las provincias de Argentina que presentan áreas en las que el agua tiene concentraciones elevadas de As son: Salta, Jujuy, Catamarca, La Rioja, La Pampa, Chaco, Córdoba, San Luis, Mendoza, San Juan, Santa Fe, Buenos Aires, Río Negro, Tucumán, Santiago del Estero y no se descarta que puedan ser más.

En la **Figura 3** se puede observar el mapa de distribución de As en aguas subterráneas de la República Argentina diferenciando las zonas según la concentración del contaminante [12].

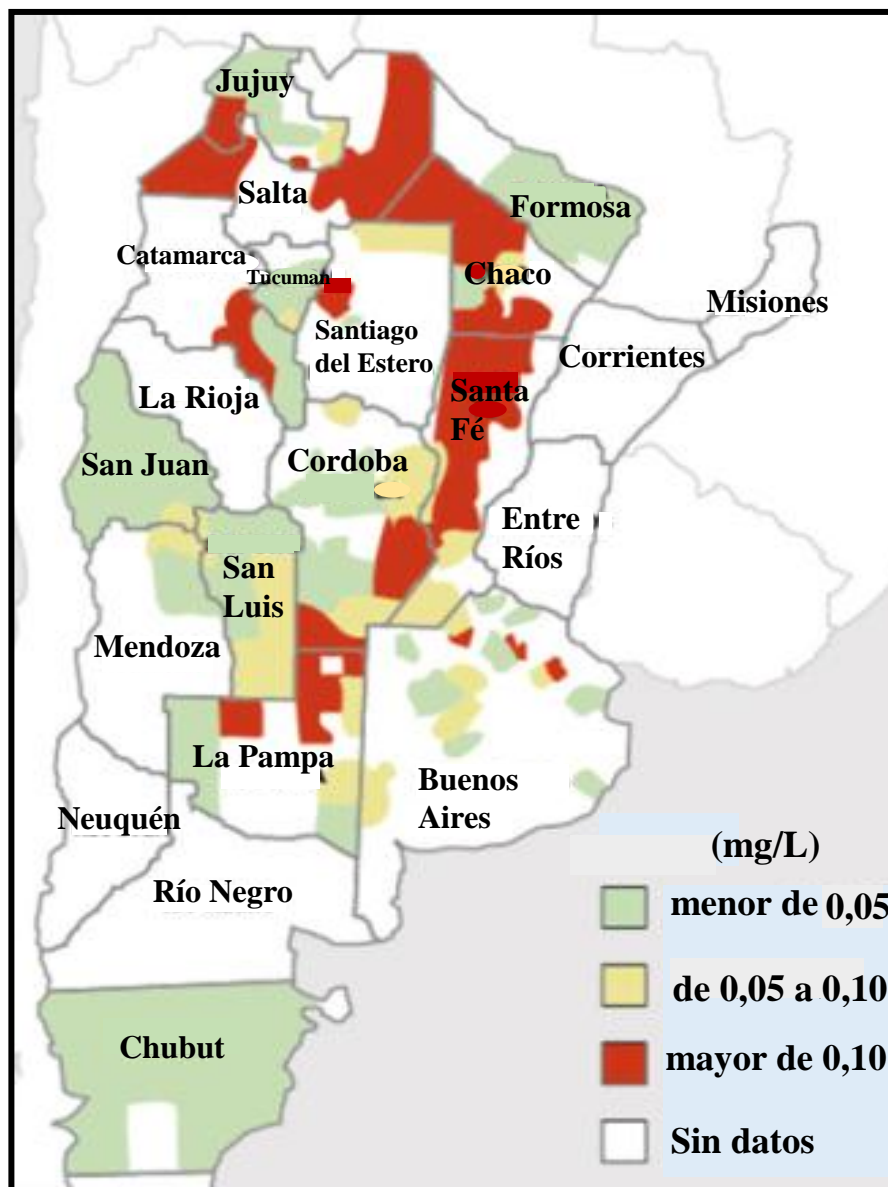


Figura 3. Distribución geográfica del As en el agua subterránea de Argentina.

Fuente: http://www.femeba.org.ar/archivos/Ars%C3%A9nico%20en%20el%20agua_.pdf

En los acuíferos reductores, caracterizados por condiciones de pH cercanas a la neutralidad, escasez de oxígeno disuelto y de nitratos, y concentraciones de Fe, Mn y NH_4^+ elevadas, las formas de As(III) constituyen una alta proporción del arsénico total. Su movilización se debe principalmente a la desorción desde óxidos minerales y la disolución reductiva (reducción a As(III)) de óxidos de Fe y Mn [13,14].

Los acuíferos oxidantes con altas concentraciones de As se encuentran generalmente en regiones áridas o semiáridas donde la recarga es lenta. Las bajas velocidades de flujo aumentan la

magnitud del problema debido a la restricción de su remoción. Estos acuíferos se caracterizan por su elevada salinidad, presencia de O_2 disuelto y altos valores de pH. La solubilidad de los óxidos minerales bajo estas condiciones es baja por lo que la movilización del arsénico se produce principalmente como resultado de la desorción de los óxidos de Fe y Mn. La forma dominante es As(V) y suele estar asociado a otros aniones y oxianiones (F, HCO_3^- , V, Se, Mo) [15-17].

1.3. Metabolismo, toxicidad y legislación del arsénico

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

La presencia de arsénico en aguas de consumo ha ocasionado la diseminación del hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE), enfermedad crónica que se manifiesta principalmente por alteraciones dermatológicas como melanodermia, leucodermia y/o queratosis palmo-plantar, evolucionando hacia patologías más graves como distintos tipos de cáncer.

Las poblaciones más afectadas por el HACRE habitan, por lo general, en países con bajos niveles de ingreso. En América Latina, se estima que la población en riesgo supera los 14 millones de personas, con elevada incidencia en casi todos los países de la región [18].

Para contraer la enfermedad es preciso haber bebido durante meses o años, aguas con alta concentración de As. Resultan afectados tanto hombre como mujeres, pero es más frecuente en hombres en una proporción de 4:1. La gran mayoría de pacientes son adultos, siendo excepcional la enfermedad en los niños. No todos los que consumen agua con alta concentración de As resultan afectados; debe haber una cierta predisposición para que aquello ocurra, que está determinada por una diferencia en la absorción, depósito en los tejidos y excreción del arsénico en los individuos afectados [19,20].

Comúnmente la metilación se consideraba como la principal ruta de detoxificación del arsénico en mamíferos. El AsO_4^{3-} ingerido es rápidamente reducido a AsO_3^{3-} por el arsenato reductasa (GSH) en el plasma sanguíneo. La metilación parcial del AsO_3^{3-} tiene lugar en el hígado, donde las enzimas metiltransferasas de As realizan el proceso de metilación con S-adenosilmetionina (SAM) como dador de grupos metilo. Los metabolitos intermediarios, MMA y DMA3, son generados durante este proceso, y estos arsenicales trivalentes metilados, se creen son incluso más tóxicos que las especies de arsénico inorgánico.

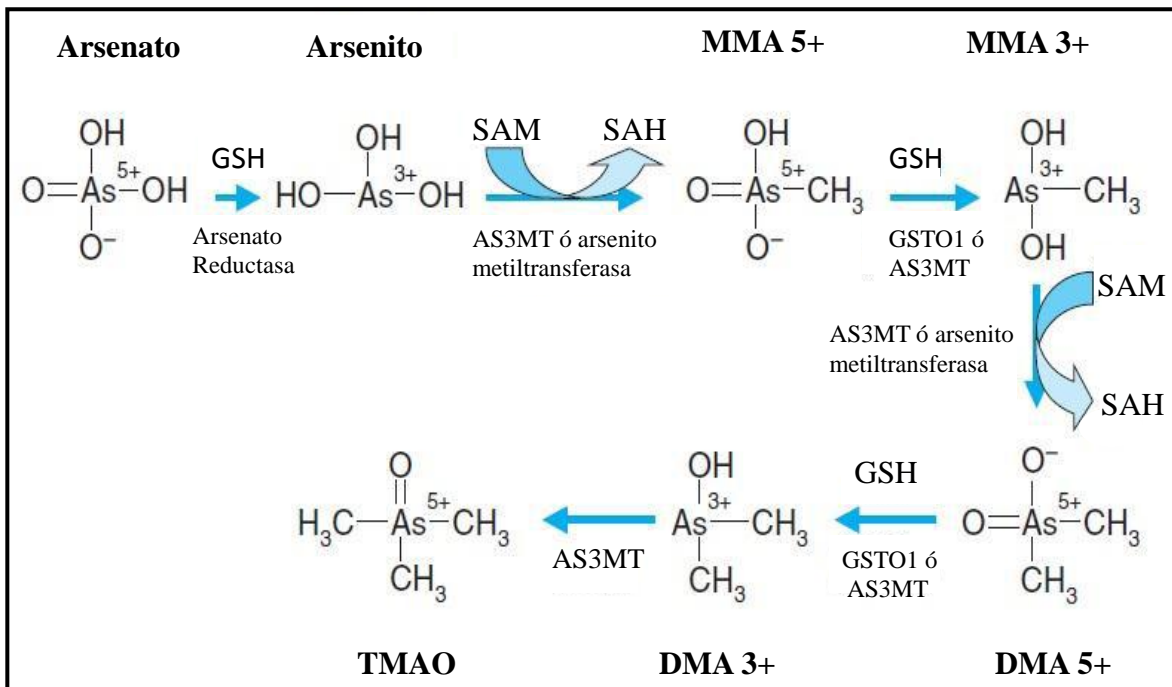


Figura 4. Biotransformación del arsénico

En ausencia de una ingesta excesiva de arsénico inorgánico, el metabolito mayoritario observado en la excreción urinaria es el DMA (~ 60 %). Estudios recientes han mostrado que el DMA y el MMA son reducidos en el organismo a sus ácidos trivalentes dimetil y monometilarsinosos, respectivamente, y excretados a través de la orina [21,22].

La modalidad más frecuente por la cual actúa un elemento tóxico es la inactivación de sistemas enzimáticos. Ha sido sugerido que el arsénico trivalente interacciona con enzimas que contienen grupos $-\text{SH}$ y $-\text{OH}$, especialmente cuando hay dos grupos $-\text{SH}$ adyacentes. La acción inhibitoria se basa en la interrupción de la generación de ATP debido a la inactivación de la dehidrogenasa piruvato por complejación con As(III) . Como consecuencia de este proceso, la cantidad de piruvato en sangre aumenta, la producción de energía disminuye y finalmente la célula es lentamente dañada [23]. En el orden de toxicidad históricamente reconocido para las especies de arsénico, decrece en el siguiente orden: $\text{AsH}_3 > \text{As(III) orgánico} > \text{As(III) inorgánico} > \text{As(V) inorgánico} > \text{As(V) orgánico} > \text{compuestos arsenicales y arsénico elemental}$. La toxicidad del $\text{As(III) inorgánico}$ es 10 veces mayor que la del As(V) , y la dosis letal para adultos es de $1\text{-}4 \text{ mg As kg}^{-1}$ [24,25].

La absorción de As puede producirse a través del tracto gastrointestinal, por vía respiratoria y, en menor proporción, por vía dérmica. La absorción por vía respiratoria dependerá del tamaño de

las partículas inhaladas, de su solubilidad y de la estructura química del compuesto. El As es distribuido fácilmente por todo el cuerpo, a través de la formación de un complejo de [α -globulina-As]. Se acumula principalmente en hígado, riñón, pulmón y bazo, y en menor proporción en tracto digestivo, hueso y piel [26].

Además de la excreción urinaria, las heces constituyen otra vía significativa de eliminación de arsénico. La transpiración, uñas, pelo, piel y en menor medida la leche materna [27], son rutas minoritarias. No obstante, algunas de estas rutas de liberación del contaminante son utilizadas como indicadores de exposición. El biomarcador más usado es el arsénico que se determina en uñas, pelo, sangre y orina. La aparición de arsénico en uñas y pelo es interpretada como exposición lejana ya que el As(III) aparece acumulado en tejidos ricos en queratina. Los niveles normales de arsénico en la orina, el cabello y las uñas son $5\text{-}200\ \mu\text{g L}^{-1}$, $0,8\text{-}5,0\ \text{mg kg}^{-1}$ y $430\text{-}1080\ \mu\text{g kg}^{-1}$, respectivamente. La presencia de arsénico en sangre y orina es un indicador de exposición muy alta o reciente que revela su rápida eliminación por estas rutas [28,29].

Como muchos otros metales, el arsénico es un elemento acumulativo en los organismos vivos. El rango de concentraciones encontradas es verdaderamente amplio dependiendo de las cantidades incorporadas o ingeridas. Los mayores niveles de acumulación se informan en animales marinos, en los que la mayor proporción se encuentra en la forma de compuestos orgánicos como arsenobetaina (AsB) y arsenocolina AsC), muy resistentes a la degradación química, pero de baja toxicidad. En humanos, el arsénico se ubica en el lugar número 12, con una concentración promedio de $0,3\ \text{mg kg}^{-1}$ sobre base húmeda [9]. Su acumulación se manifiesta principalmente en tejidos ectodérmicos ricos en azufre como uñas y pelo.

La profundización del conocimiento epidemiológico y toxicológico asociado a las especies de arsénico sumado al avance de las técnicas analíticas se ha visto reflejado en las reducciones aplicadas de manera sucesiva a los niveles recomendados o permitidos del contaminante. En agua de bebida, el nivel de contaminante máximo (MCL) establecido en la normativa por el Código Alimentario de nuestro país es de $10\ \mu\text{g L}^{-1}$ [30]. Esta concentración fue recomendada como valor de guía provisional por la OMS (Organización Mundial de la Salud) en 1993 luego de que los compuestos de arsénico inorgánico fueran clasificados por la IARC (Agencia Internacional para Investigación del Cáncer) en el Grupo 1, correspondiente a compuestos con evidencias suficientemente comprobadas de carcinogenicidad para humanos [31].

1.4. Necesidad del análisis de especiación

Es evidente que la determinación de la concentración total de arsénico, como sucede con muchos otros elementos, no es suficiente para realizar una evaluación completa de los efectos que produce el elemento en los diferentes compartimentos ambientales y sobre la salud. La movilidad y toxicidad del arsénico es dependiente de la forma química en la que se encuentra, es decir, de su estado de oxidación, naturaleza orgánica e inorgánica y de su asociación orgánica bajo la forma de diversos compuestos organoarsénicales que posee diferentes estructuras y, por ende, diversas propiedades. Así más de 20 especies de arsénico han sido identificadas en los sistemas ambientales y biológicos entre las que se contabilizan especies inorgánicas de As(III) y As(V) como ácidos arseniosos (H_3AsO_3 , H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-}) y ácidos arsénicos (H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-}), respectivamente, y especies orgánicas predominantes tales como dimetilarsinato (DMA), monometilarsinato (MMA), arsenobetaína (AB) y arsenocolina (AC).

El término “especies se asigna a las distintas formas que presenta un analito utilizando diferentes criterios como, su composición isotópica, estado de oxidación (especies redox), forma molecular (compuestos organometálicos), coordinación (formación de complejos), fase en la cual está presente el analito (disuelto, coloidal, absorbido, etc.) o también su solubilidad selectiva en solventes diferentes [32]. De esta manera, la Química Analítica propone un concepto vinculado a las especies químicas, al definir con el “análisis de especiación” a las actividades analíticas destinadas a identificar y cuantificar las diferentes formas químicas o especies de un dado elemento.

Además de la importancia biológica y toxicológica que involucra el término “especiación” de As por el hecho que, las especies arsenicales inorgánicas son más tóxicas que las orgánicas y los compuestos arsenicales en estado de oxidación trivalente son más tóxicos que los pentavalentes, esta definición prioriza el interés en el desarrollo de métodos analíticos para su determinación selectiva, siendo su impacto en el orden tecnológico considerado un aspecto importante [33].

La especiación y movilidad del As en los suelos es afectada por el pH y por las condiciones redox (potencial redox Eh). Ante un alto potencial redox predomina el As(V) y la movilidad del As es baja. A medida que aumenta el pH y el potencial redox disminuye predomina el As(III). La forma reducida de As está más sujeta a la lixiviación porque tiene mayor movilidad, tal como se indica en la **Figura 5**.

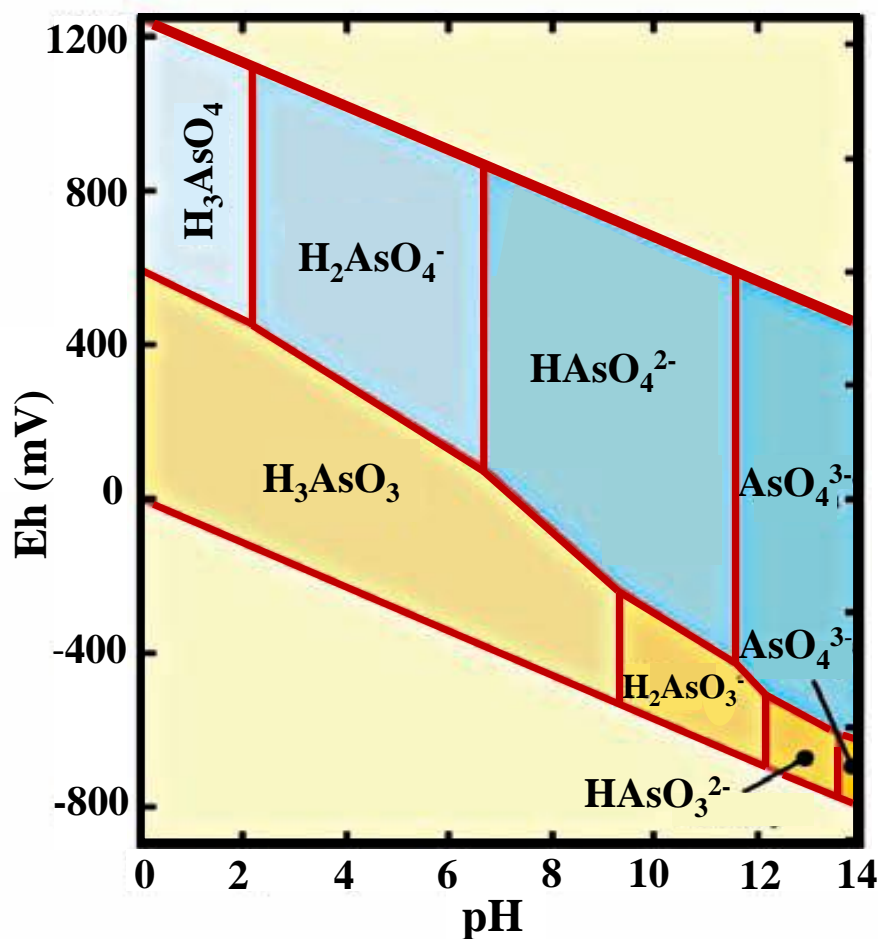


Figura 5. Diagrama Eh-pH de especies acuosas de As en el sistema As-O₂-H₂O a 25°C y 1 bar de presión total. **Fuente:** Iberoarsen, 2008.

El As es un elemento particular entre los elementos traza por su gran tendencia a movilizarse ante los valores de pH típicos de las aguas subterráneas (pH 6,5 – 8,5). En términos generales, bajo condiciones oxidantes (aeróbicas), el estado As(V) predomina sobre el As(III). El ácido arsénico sólo predomina a pH extremadamente bajos (< 2), situación poco común en aguas naturales. Se encuentra fundamentalmente como H_2AsO_4^- a valores de pH menores que 6,9, mientras que, a pH más alto, la especie dominante será HAsO_4^{2-} . En condiciones de extrema basicidad, la especie dominante será AsO_4^{3-} . El ácido arsenioso aparece a bajo pH y condiciones reducidas suaves, pero se transforma en H_2AsO_3^- a medida que aumenta el pH. En condiciones reductoras, a pH inferior a 9,2, predominará la especie neutra. Sólo cuando el pH excede 12 puede estar presente la especie HAsO_3^{2-} , por lo cual no se encontrará esta especie en aguas naturales [34,35].

En las **Figuras 6 y 7** se muestra la especiación de As(III) y As(V) en función del pH.

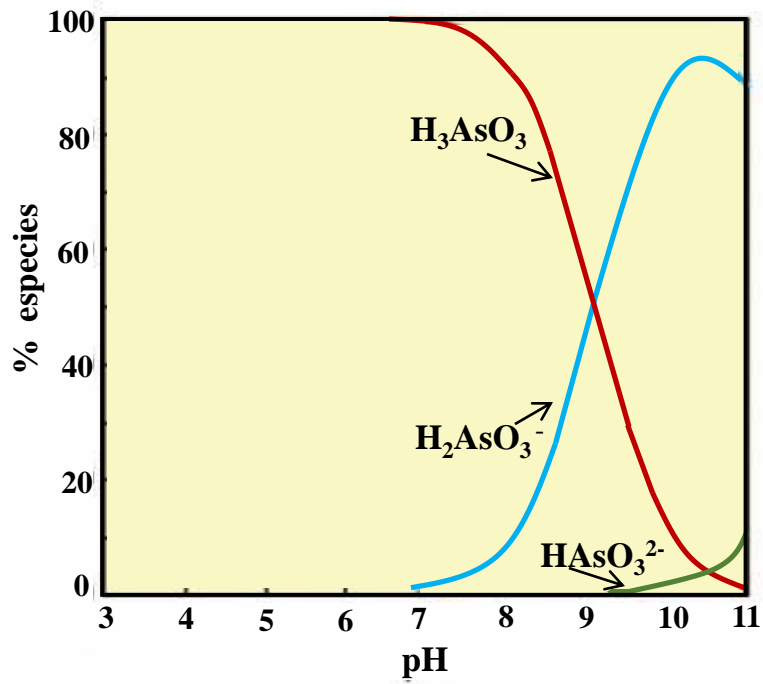


Figura 6. Especies de As(III) en función del pH. **Fuente:** Iberoarsen, 2008

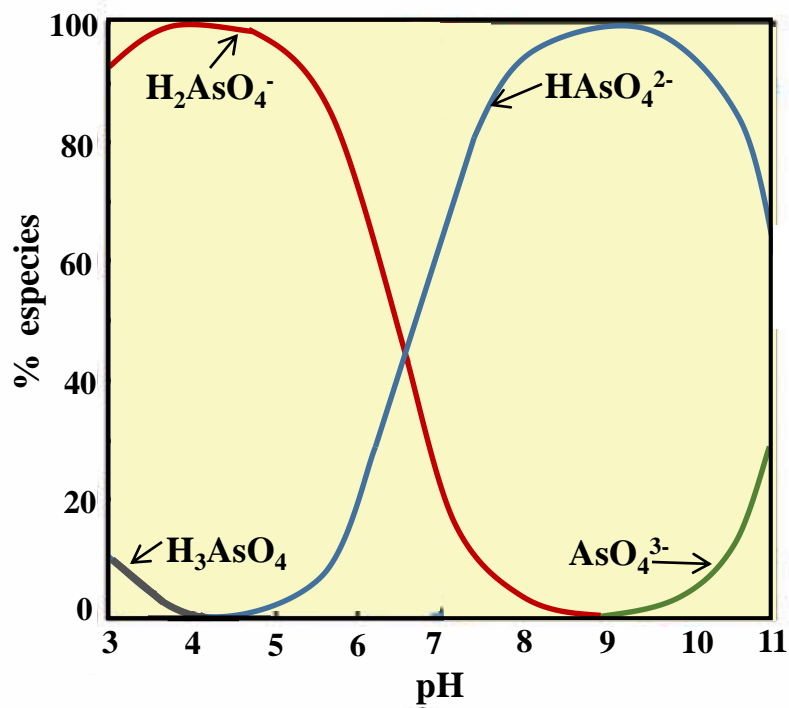


Figura 7. Especies de As(V) en función del pH. **Fuente:** Iberoarsen, 2008

El As(III) puede provenir de la reducción biológica del As(V), y predomina en zonas cercanas a industrias con efluentes ricos en As(III), aguas geotermales y ambientes reductores. En general, en aguas superficiales, el As(V) predomina sobre el As(III). En aguas subterráneas pueden encontrarse ambos estados de oxidación ya que las concentraciones de As(III) y As(V) dependen de la entrada de As al sistema, de las condiciones redox y de la actividad biológica. En aguas marinas, la especie predominante es el As(V) inorgánico, que puede ser transformado a formas orgánicas o reducido biológicamente a As(III) [36].

La eficiencia de los procesos de remoción de As en el agua depende fuertemente de la forma química en la que se encuentra. Tanto para los tratamientos por ósmosis inversa como para el uso de materiales adsorbentes o procesos de coagulación, el As(V) es la especie con mayor facilidad de remoción [37]. Este hecho es sumamente importante a la hora de desarrollar o seleccionar tecnologías para tratamientos de agua de consumo ya que la posibilidad de una etapa de acondicionamiento deberá ser evaluada en función de la forma redox [38].

1.5. Técnica analítica para el análisis de especiación de arsénico

1.5.1. Cromatografía líquida de alto rendimiento

Las separaciones por cromatografía líquida (HPLC) se realizan introduciendo una muestra en una columna cromatográfica rellena con una fase estacionaria sólida, mientras que una fase líquida móvil circula continuamente, por bombeo, a través de la columna. Las fases estacionarias están compuestas generalmente por sílice químicamente modificada o polímeros. Las especies arsenicales presentes en la muestra interactúan tanto con la fase estacionaria como con la fase móvil en su paso a través de la columna; el grado en que cada uno de los analitos interactúe con esas fases determinará el tiempo de residencia de cada analito en la columna. De esta manera, la separación se logra cuando cada uno de los analitos, que tiene un grado de interacción diferente con las fases, salga de la columna a tiempos también diferentes capaces de ser detectados individualmente por el equipo.

La cromatografía líquida de alta resolución presenta un número de ventajas que la convierten en una herramienta única para el análisis de especiación. Esta técnica, a diferencia de la cromatografía gaseosa, posee la capacidad de separar compuestos no volátiles y también aquéllos que se descomponen a elevadas temperaturas. Es extremadamente versátil ya que tanto la fase estacionaria como la fase móvil pueden modificarse, e inclusive pueden agregarse aditivos para lograr una separación efectiva. Existe, por otra parte, una gran variedad de fases estacionarias disponibles comercialmente. Además, puede acoplarse de manera simple a detectores específicos,

como espectrómetros de absorción atómica y fluorescencia atómica acoplados a generación de hidruros (HG-AAS y HG-AFS), espectrómetros de plasma inductivo de argón de emisión y acoplados a detectores de masas, asociados o no a generación de hidruros (ICP-OES, HG-ICP-OES y ICP-MS, HG-ICP-MS) y otros.

Los tamaños de partículas de las fases estacionarias típicas de las columnas comerciales usadas en HPLC son de entre 3 y 5 μm . La fase móvil se bombea a muy altas presiones a través de la fase estacionaria y los distintos tipos de separaciones por HPLC se subdividen de acuerdo a los tipos de fases estacionarias que se utilicen.

Para llevar a cabo una adecuada separación cromatográfica de las especies arsenicales, se deben ajustar una serie de parámetros y variables. Es necesario conocer las estructuras de esos analitos ya que las separaciones de las especies entre la fase estacionaria y la fase móvil están basadas en interacciones dipolo-dipolo, interacciones electrostáticas y fuerzas de dispersión. La selección de la fase móvil a utilizar está íntimamente relacionada con las características de los analitos a separar. En el caso del arsénico, en las cuales el metaloide está presente en forma de especies aniónicas, éstas deberían ser separadas usando una columna con una fase estacionaria de intercambio aniónico.

Asimismo, la fase móvil constituye otro factor crítico al optimizar una separación, y para el caso del arsénico consiste generalmente en un solvente o mezcla de ellos. Generalmente, se trata de soluciones acuosas a un dado pH, tales como soluciones tampón, en las que las especies sean solubles. El control del pH es esencial para obtener una separación efectiva de las especies. La composición de la fase móvil puede mantenerse constante a lo largo de toda la separación (separación isocrática) o usar elución con gradientes, variando la composición de la fase móvil, con lo que logran disminuirse los tiempos de corrida.

Otro punto a tener en cuenta es el caudal de la fase móvil, ya que aumentándolo pueden disminuirse los tiempos de corrida, pero esto puede ser en detrimento de la eficiencia de la separación y además ocasionar la pérdida de la correlación entre los volúmenes aportados por el sistema cromatográfico y los aceptados por el sistema al que está asociado el detector específico.

La temperatura puede influir en las separaciones causando variaciones en los tiempos de retención de las especies arsenicales, por lo que es conveniente mantenerla controlada en un compartimiento que se encuentre a temperatura constante.

Finalmente, es conveniente hacer hincapié en el elemento fundamental para la separación, “la columna cromatográfica”, es lo que define el tipo de cromatografía. Para la separación de especies arsenicales, que frecuentemente se encuentran en formas ionizadas, se utiliza comúnmente la cromatografía de intercambio iónico, indicada para separar átomos libres y especies que forman

iones fácilmente [39]. La cromatografía de intercambio iónico se divide en aniónica y catiónica, dependiendo de los grupos funcionales presentes en la fase estacionaria, siendo la primera de ellas la elegida para la separación de especies arsenicales, debido a la forma en que se encuentran en solución. Los sitios iónicos en la fase estacionaria tienen la carga opuesta a los analitos que se van a separar. Los contraiones de la fase móvil (generalmente soluciones acuosas de sales inorgánicas) mantienen la neutralidad eléctrica dentro de la columna cromatográfica, y las especies con carga opuesta a la del grupo funcional interactúan electrostáticamente con la fase estacionaria. El tiempo de retención de una especie dada se incrementa con el aumento de la fuerza electrostática [40].

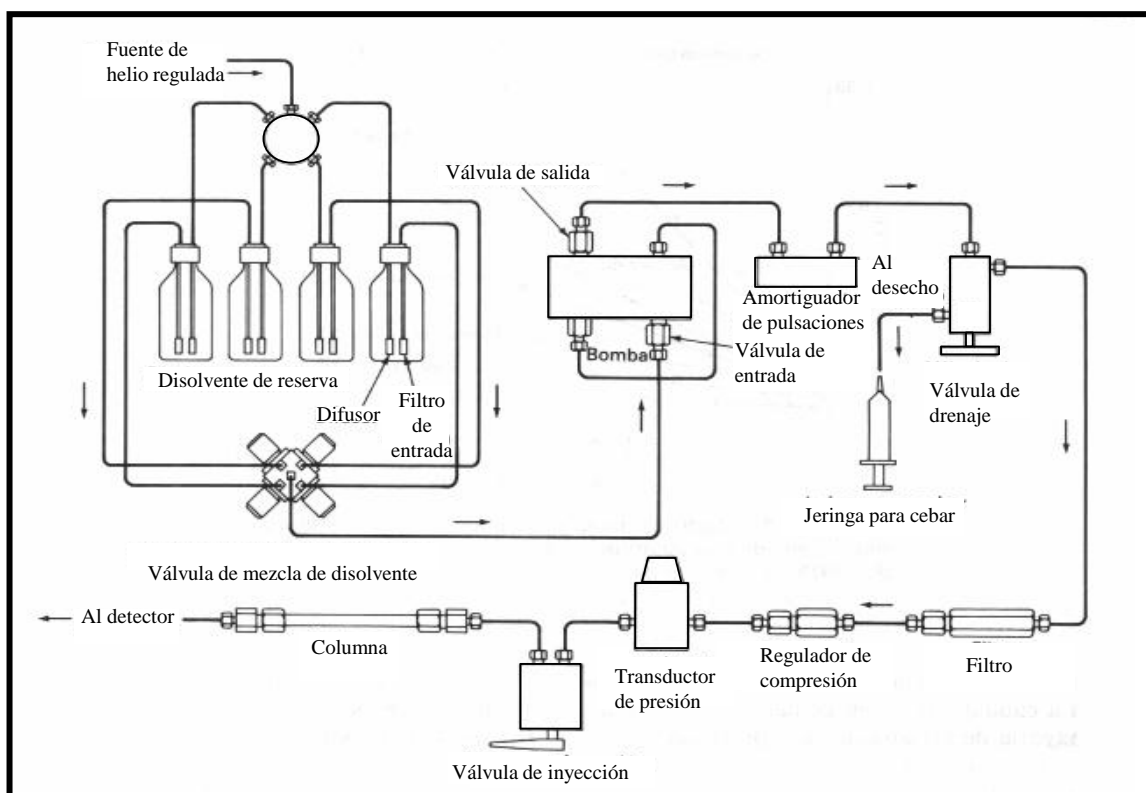


Figura 8. Esquema del instrumento HPLC.

1.5.2. Generación de hidruro

La generación de hidruros (HG), es una de las técnicas de derivatización más utilizadas para la detección de As, especialmente de especies inorgánicas. Inicialmente fue desarrollada para AAS y el agente reductor más empleado para la producción de arsina es el borohidruro de sodio en media ácido. Es decir, el borohidruro en medio ácido es empleado como agente reductor para el As(V) y

como generador del hidruro con el As(III). El proceso de generación de hidruro puede ser empleado también para la determinación selectiva de As(III) y As(V), ya que el As(III) reacciona con el borohidruro a un pH más alto que As(V).

Además, el sistema de HG se puede implementar en sistemas de análisis en flujo, lo cual permite obtener importantes ventajas con respecto a los métodos analíticos discontinuos o en “batch”, tales como incremento importante en la sensibilidad analítica y disminución significativa de las interferencias [41]. El incremento en la sensibilidad se debe a la mayor eficiencia de introducción de analito en el sistema de atomización de la técnica espectrométrica atómica a la cual se ha acoplado el sistema HG. De esta manera, las especies de As se derivatizan en otras especies volátiles por reacción con el borohidruro de sodio, siendo más eficiente el proceso de atomización, cuando se introducen analitos en estado gaseoso que en solución.

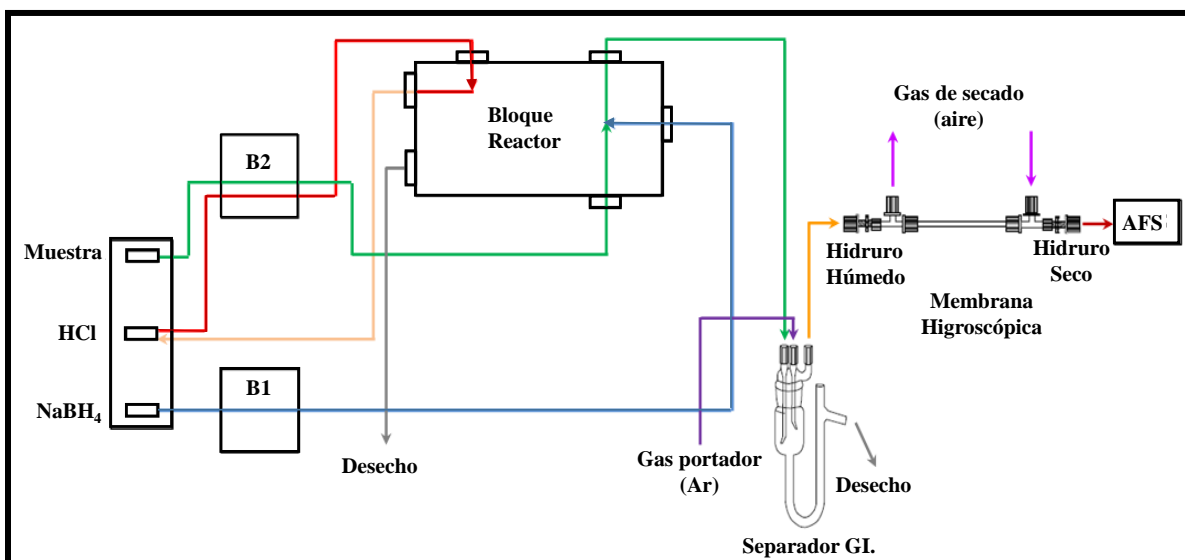


Figura 9. Esquema del instrumento HG.

1.5.3. Espectrometría de fluorescencia atómica

La espectrometría de fluorescencia atómica (AFS) es una técnica de emisión, por lo que requiere una foto excitación previa de las especies volátiles de As. La activación o excitación de los átomos del analito, seguida de la desactivación con la consecuente emisión de la radiación fluorescente, puede tener lugar a la misma longitud de onda. Esto se conoce como fluorescencia resonante. La concentración de As en la muestra puede ser determinada en función de su relación con la intensidad de la fluorescencia atómica. Esta técnica es una de las técnicas más utilizadas para la determinación de arsénico inorgánico. La alta selectividad, baja susceptibilidad a interferencias

de la matriz, robustez y relativa facilidad de operación sumadas a costos de inversión y operaciones accesibles constituyen las razones principales por las cual AFS ha alcanzado una amplia difusión en la mayoría de los laboratorios.

El proceso básico de fluorescencia atómica consiste en:

- Creación de átomos libres de muestra
- Absorción de la radiación por parte de los átomos libres y excitación
- Emisión de la radiación cuando los átomos (electrones exteriores) regresan del estado excitado a un nivel de energía menor, que generalmente es el estado basal o fundamental. Emite en la región visible y ultravioleta (190-850 nm).

El empleo de solución de tetrahidrobórato de sodio (NaBH_4) en sustitución del sistema metal/ácido (generalmente Zn/HCl) antiguamente utilizado para generar los hidruros [42], aumentó enormemente la popularidad de esta técnica dada su relativa simplicidad y rapidez en el proceso de derivatización [43]. La técnica de generación de hidruros puede ser empleada como una herramienta sumamente útil en el análisis de “especiación” ya que, bajo condiciones de pH controladas, sólo ciertos estados de oxidación como las formas trivalentes de As y Sb y tetravalentes de Se y Te, forman sus respectivos hidruros permitiendo su determinación selectiva. Resulta oportuno notar que las especies formadoras de hidruros mencionadas, son precisamente las formas más tóxicas de cada elemento. Para el caso particular del arsénico, el NaBH_4 o THB volatiliza el As(III) entre pH -1 a 7 y el As(V) a pH menores de 0,3 para formar arsina. Las especies orgánicas del tipo $\text{Me}_n\text{AsO}(\text{OH})_{3-n}$ ($n= 1$ a 3) forman hidruros de metilarsénico (III) y trimetilarsénico (III) para valores de pH entre 0,3 y 1 [44].

Las diferentes velocidades de reacción que presentan las especies inorgánicas tri y pentavalentes con el NaBH_4 para formar hidruros pueden entonces ser utilizadas con buenos resultados para su determinación selectiva.

El acoplamiento de HPLC con HG-AFS aprovecha tanto el poder de separación ofrecida por HPLC y de la buena selectividad y la sensibilidad obtenible mediante el uso de HG-AFS. Los límites de detección del orden de los sub-microgramos por litro se han conseguido para la especiación de arsénico [45,46].

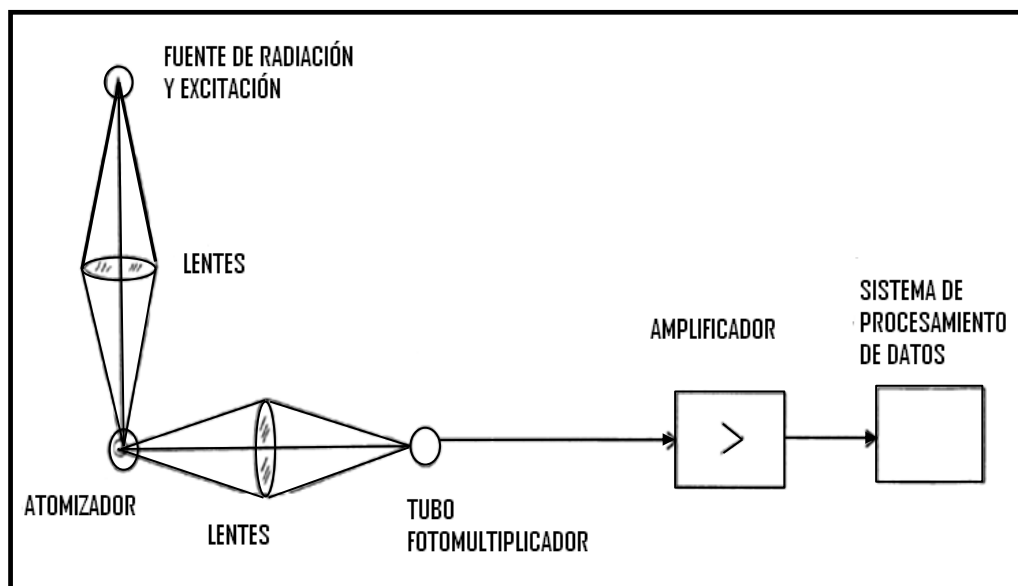


Figura 10. Esquema de espectrómetro de fluorescencia sin dispersión.

1.5.4. Espectrometría de masas atómicas con fuente de plasma de acoplamiento inductivo

La espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado (ICP-MS) utiliza un plasma para ionizar los átomos de la muestra que llega acidificada en forma de aerosol.

La alta temperatura del plasma atomiza y ioniza todas las formas de arsénico de manera que, a diferencia de AAS, es posible alcanzar alta sensibilidad para todas las especies. La técnica ICP-MS se caracteriza por su capacidad de detección multielemental, elevada sensibilidad, amplio rango dinámico de trabajo y posibilidad de análisis absoluto por dilución isotópica. Los nebulizadores neumáticos son los más utilizados para la introducción de la muestra debido a su simplicidad de operación y bajo costo. Sin embargo, cuando el objetivo es la determinación de arsénico, el empleo de estos dispositivos presenta ciertas desventajas, esto es, a la baja eficiencia de transporte del analito hacia el plasma (< 5%) se suman las interferencias producidas por los altos niveles de cloruro que dan lugar a la formación del ión poliatómico $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ de igual masa que el ^{75}As [47,48]. Como resultado, los límites de detección se ven empobrecidos. La incorporación de la HG previo a la entrada del ICP-MS aporta ventajas significativas en este sentido. La introducción de la muestra en forma gaseosa aumenta en aproximadamente un 100% la eficiencia de transporte del analito al ICP, lo que se traduce en un incremento de la sensibilidad y una reducción de los niveles de detección. Además, la liberación del hidruro desde la matriz de muestra elimina las interferencias originadas por la presencia de cloruros.

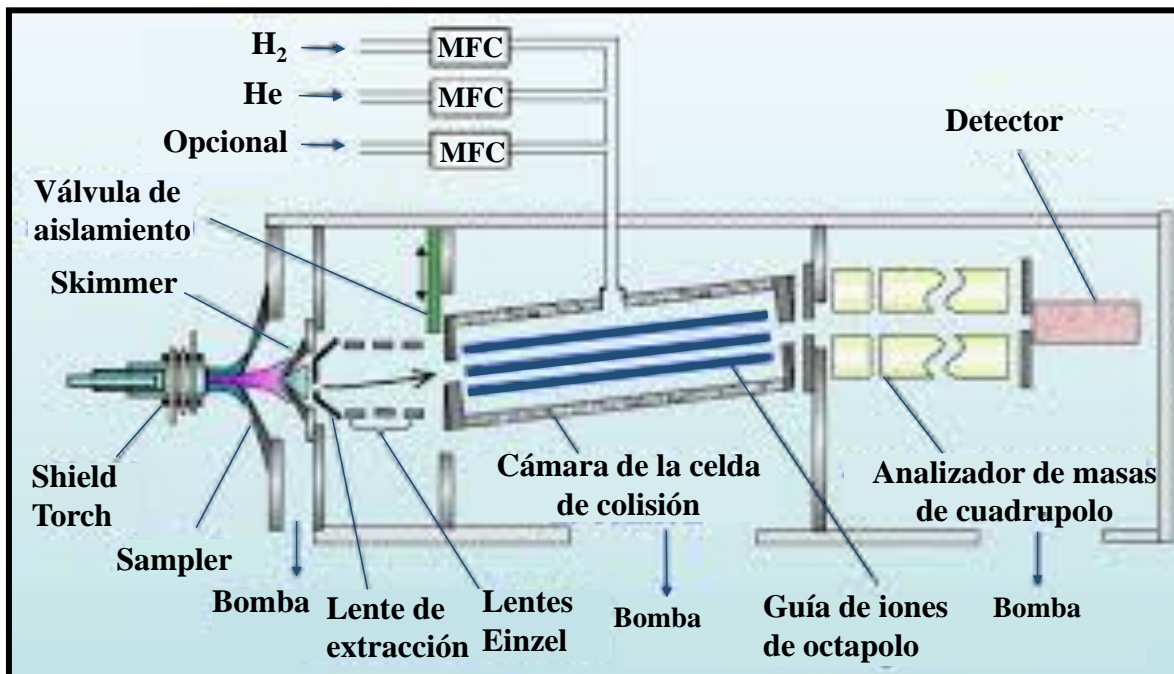


Figura 11. Diagrama esquemático de un equipo ICP-MS

El acoplamiento HPLC-ICP-MS aparece en la actualidad como la herramienta analítica más moderna y poderosa para la determinación de niveles traza de especies metálicas elementales.

La alta eficiencia de separación de HPLC sumada a la sensibilidad extremadamente alta, capacidad multielemental y multiisotópica y amplio rango dinámico de detección de ICPMS son las principales ventajas de esta exitosa combinación. La desventaja más importante que presenta al momento es sin dudas su elevado costo, a lo que se suma también el requerimiento de extensos tiempos de análisis cromatográfico [49].

1.6. Demanda Biológica de Oxígeno

1.6.1. Importancia de la Demanda Biológica de Oxígeno

La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) es el parámetro de contaminación orgánica más ampliamente empleado, aplicable tanto a aguas residuales como a aguas superficiales.

La DBO_5 es la cantidad de oxígeno disuelto requerido por los microorganismos para la oxidación aerobia de la materia orgánica biodegradable presente en el agua. Se mide a los cinco días. Su valor indica la materia orgánica biodegradable presente en el agua [50].

El agua residual contiene cierta flora bacteriana, que, tras un tiempo de incubación, actúa degradando la materia orgánica contenida en el agua residual. Si cierta cantidad de agua a analizar

se introduce en un recipiente, y este se cierra herméticamente, se crea un sistema que contiene el agua a analizar, con su flora bacteriana y aire, el cual contiene 21% de oxígeno. En un tiempo determinado, los microorganismos consumen todo o parte del oxígeno contenido en el sistema al degradar la materia orgánica [51]

La oxidación bioquímica es un proceso lento cuya duración es en teoría infinita. En un período de 20 días se completa la oxidación del 95 al 99% de la materia carbonosa, y en los 5 días se alcanzan valores cercanos al 70-75%. Se asume la temperatura de 20°C como un valor medio representativo de temperatura que se da en los cursos de agua que circulan a baja velocidad en climas suaves, y es fácilmente duplicada en una incubadora. Los resultados obtenidos a diferentes temperaturas serán distintos debido a que las velocidades de las reacciones bioquímicas son función de la temperatura [52].

1.6.2. Factores que influyen en la Demanda Biológica de Oxígeno

Los factores más importantes que afectan el crecimiento biológico son la temperatura, la disponibilidad de nutrientes, el suministro de oxígeno, el pH y la presencia de tóxicos.

Los principales factores que influyen en la medición de la DBO son: la temperatura, el pH, la aclimatación de los microorganismos y la toxicidad.

Temperatura

El incremento de temperatura acelera los procesos bacteriológicos y la tasa de utilización del oxígeno. Es decir, la tasa de velocidad de la reacción biológica es función de la temperatura. Generalmente se determina la DBO de una muestra de agua a 20°C [53].

pH

Antes de inocular el agua de dilución, se debe tener especial cuidado en ajustar el pH del agua residual al rango de 6.5 a 7.5 para obtener valores confiables de la DBO. Ya que los microorganismos se desarrollan o sobreviven mejor en condiciones de pH neutro.

Toxicidad

La presencia de materia tóxica altera el curso de la Demanda Bioquímica de Oxígeno, por lo que los resultados de la prueba no son reales y por lo tanto no aceptables.

Algunos compuestos metálicos causan una deflexión en el periodo inicial del progreso de la DBO. Esta varía con los diferentes metales, en el que probablemente los microorganismos se aclimatan a las condiciones particulares [54].

El contenido de sustancias tóxicas en las muestras de agua, puede tener un efecto biotóxico en los organismos del agua, cuyo efecto se manifiesta incrementándose los valores de la

DBO al aumentar la dilución de la muestra. El efecto en la DBO, depende de la cantidad de materia tóxica contenida en la dilución apropiada. Para evitar interferencias en los resultados, se debe eliminar de la muestra de agua, el cloro residual y otras sustancias bactericidas [55].

1.7. Efecto del Nitrato en agua

E general, los nitratos (sales del ácido nítrico, HNO_3) son muy solubles en agua debido a la polaridad del ión, la estructura de éste es plana y de alta estabilidad, con el nitrógeno en el centro y los oxígenos en la esquinas de un triángulo equilátero y, en ella, cada uno de los enlaces N-O es un híbrido de enlace sencillo y uno doble. Esta es la forma del nitrógeno más estable termodinámicamente en presencia de oxígeno, por lo que, en los sistemas acuáticos y terrestres, los materiales nitrogenados tienden a transformarse en nitratos.

Los nitritos (sales del ácido nitroso, HNO_2) son solubles en agua y, por lo general, más estables que el ácido del que proviene. Se forman naturalmente a partir de los nitratos, ya sea por oxidación bacteriana incompleta del nitrógeno en los sistemas acuáticos y terrestres o por reducción bacteriana.

El ión nitrito es menos estable que el ión nitrato, es muy reactivo y puede actuar como agente oxidante y reductor, por lo que sólo se encuentra en cantidades apreciables en condiciones de baja oxigenación. Esta es la causa de que los nitritos se transforman rápidamente para dar nitratos, y de que, en general, estos últimos predominan en las aguas, tanto superficiales como subterráneas, así como en el ambiente. Esta reacción de oxidación se puede efectuar en los sistemas biológicos y por factores abióticos.

El uso excesivo de fertilizantes nitrogenados, incluyendo el amoníaco, así como la contaminación causada por la acumulación de excretas humanas y animales pueden contribuir a elevar la concentración de nitratos en agua. Generalmente, los nitratos son solubles y no se adsorben a los componentes del suelo, por lo que son movilizados con facilidad por las aguas superficiales y subterráneas.

Toxicocinética

En los humanos, el nitrato ingerido se absorbe rápidamente en el intestino delgado y se distribuye en el organismo, el nitrato llega al intestino grueso a través de la sangre y ahí se convierte rápidamente, en parte por los microorganismos fecales en nitrito, el cual es muy reactivo y se reabsorbe a la sangre. Esta reducción requiere la acción de nitrato reductasa, enzima presente en la plantas y en varios organismos. Una vez en la sangre, el nitrito reacciona con el ión ferroso (Fe^{2+})

de la desoxihemoglobina, formando metahemoglobina en el cual el hierro se encuentra en estado férrico (Fe^{3+}), por lo que es incapaz de transportar el oxígeno.

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS) los criterios de calidad para agua potable establecen una concentración máxima de nitratos de $45 \text{ mg NO}_3^-/\text{L}$.

1.8. Importancia del estudio de especiación de As en el agua subterránea del NE de Mendoza

En el NE de Mendoza (Lavalle), los pobladores locales se dedican mayormente a la ganadería de subsistencia, con cría predominantemente de cabras, con alguna proporción de vacas y caballos. La zona es árida, con precipitaciones muy escasas, menores a 200 mm por año, por lo que desarrollan sus actividades utilizando el agua freática. Ésta se encuentra a poca profundidad, de 6 a 15 m en la mayoría de la zona, por lo que los pobladores excavan pozos manualmente, los enmarcan con madera de algarrobo, y extraen agua freática con baldes y la ayuda de un animal (burro o caballo). Aunque recientemente se ha construido un acueducto para proveer de agua potable a los pobladores, muchos puestos ganaderos se encuentran lejos de éste, y solo cuentan con el agua subterránea como fuente de agua para consumo humano y del ganado. El ganado se concentra alrededor de los pozos balde, ya que este representa la única fuente de agua. De día pastan o forrajean en los alrededores, pero en general regresan cada noche a tomar agua. Este patrón de concentración de ganado alrededor del puesto genera cambios en la vegetación y suelos, con reducciones en la cobertura vegetal, aumentos de guano, nitrato y humedad en los suelos cerca de los puestos [1]. Estos cambios facilitan el transporte de nitrato y agua desde la superficie hacia el acuífero, disminuyendo la calidad de agua.

El agua subterránea de la zona contiene altas concentraciones de arsénico (As), superando ampliamente los límites máximos permitidos para consumo humano [2]. Por las características de las zonas áridas (escasa materia orgánica), el acuífero es naturalmente oxidante, y favorece la presencia de la especie química inorgánica arsenato (AsO_4^{3-}), de menor toxicidad que arsenito (AsO_3^{3-}). Sin embargo, se encontró la presencia de AsO_3^{3-} en algunas perforaciones, probablemente relacionada a flujos verticales ascendentes, o, alternativamente, a la reducción ante un ingreso de contaminación orgánica desde la superficie [2].

1.9. Objetivos

En este trabajo se planteó como objetivo investigar la especiación y transformaciones químicas de As en el agua subterránea de un ecosistema natural en relación con diversos parámetros fisicoquímicos y biológicos, en especial, aquellos que puedan ser afectados por las actividades humanas desarrolladas en la zona de estudio, como la ganadería de subsistencia. Por ello, es necesario evaluar la concentración total y de las distintas especies químicas de As (ej. AsO_3^{-3} , AsO_4^{-} y orgánicas de As), pH, la demanda biológica de oxígeno, el potencial redox y las concentraciones de materia orgánica, nitrato y oxígeno disuelto, en agua de 3 perforaciones de puestos ganaderos, 3 perforaciones en bosques con bajas intensidades de disturbio, y 3 pozos balde, en el área no irrigada del departamento de Lavalle, Mendoza.

1.10. Hipótesis

La remoción de la vegetación y acumulación de guano en los puestos ganaderos ocasionan lixiviación y transporte vertical de nitrato y materia orgánica al acuífero, generando condiciones reductoras y facilitando la reducción de AsO_4^{-3} a AsO_3^{-3} . El ingreso de materia orgánica en pozos balde, como consecuencia del transporte eólico e hídrico, incrementaría las condiciones reductoras y reducción de As. Para evaluar esta hipótesis se plantean las siguientes predicciones: En el agua de perforaciones de puestos ganaderos, comparados con aquellas en bosques relativamente sin disturbar, se encontrarán mayores proporciones de AsO_3^{-3} , en relación al As total, mayores concentraciones de materia orgánica y nitrito, mayor demanda biológica de oxígeno (DBO), menores concentraciones de oxígeno disuelto, y menores potenciales de óxido reducción. El agua de pozos balde, utilizada por los pobladores, presentará las más altas proporciones de AsO_3^{-3} .



CAPÍTULO II

2. Materiales y Métodos

2.1. Muestras

2.1.1. Sitio de muestreo

Las muestras de agua subterránea utilizadas en este estudio para análisis de especiación de arsénico y de DBO fueron colectadas a partir de nueve pozos encamisados de profundidades variables entre 8 y 10 metros, Se utilizaron perforaciones construidas por el grupo de trabajo en 3 puestos de Lavalle (La Primavera, Las Delicias, Las Hormigas) y en 3 áreas boscosas de baja intensidad de disturbio. Además, se muestrearon aguas de los pozos balde construidos por los pobladores en los puestos mencionados, en la reserva natural de Telteca, en el departamento de Lavalle, provincia de Mendoza, Argentina (32°S, 67°–68°W; 500 – 550 m de elevación s.n.m.). El área corresponde al Monte central y se caracteriza por un clima árido, con una precipitación media anual de 156 mm. Tiene una temperatura extrema de -10°C en invierno y 48°C en verano.

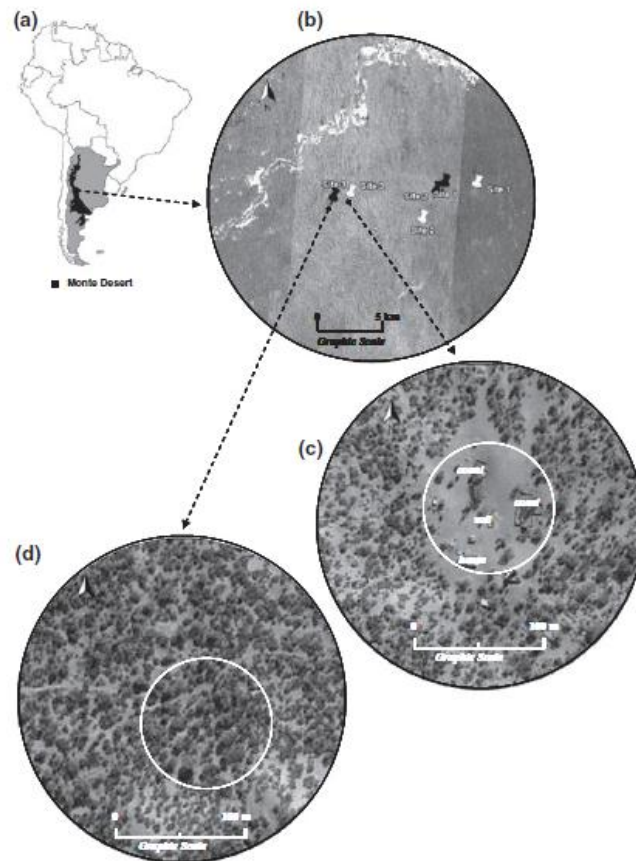


Figura 12. (a) Mapa de América del Sur con la extensión del desierto del Monte. (b) Imagen del satélite marca la ubicación de las estaciones de ganado (marca blanca) y los

bosques de control (punto negro) en la Reserva Telteca (Lavalle – Mendoza) (c) Imagen de satélite con zoom de un área de alta concentración de ganado, donde el uso del suelo tiene una intensidad mayor (d) bosques relativamente intactos. Fuente de las imágenes de satélite de Google earth fue <http://earth.google.es>. Reproducido de Meglioli et. al., 2014.

2.1.2. Sistemática

El objetivo del muestreo es recoger una muestra representativa para el análisis, de forma que el resultado obtenido proporcione un diagnóstico realista del universo investigado.

Los frascos y tapas para muestreo utilizados, fueron opacos color caramelo para evitar la alteración de las muestras de agua, como por ejemplo evitar la oxidación de As(III) en presencia de hierro, o la fotosíntesis de las bacterias por la luz que pudiera haber incidido. Para la descontaminación de los frascos y tapas que fueron empleados en la recolección de las muestras de agua, se lavaron con ácido nítrico al 10% v/v dejándolo en inmersión durante 24 horas, luego se vaciaron y enjuagaron por lo menos cinco veces con agua destilada.

Los pasos que se realizaron para el muestreo fueron los siguiente:

- Depuración del pozo, se extrajo el agua contenida en el pozo y se desechó
- Se dejó que el acuífero recargara el pozo
- Se extrajo el agua después de la recarga y se enjuagaron los frascos con agua freática
- Luego se procedió al llenado de los frascos con agua freática, evitando una extracción agitada para que no haya aireación, ni sedimentos o ingreso de cualquier material accidental
- Se taparon una vez llenados y resguardados del alcance de la luz solar

Es importante mencionar que, durante la etapa de muestreo, se evitó la acidificación de las muestras a los efectos de evitar posibles transformaciones químicas de las especies de As que pudieran conducir a errores posteriores en los análisis de laboratorio.

2.1.3. Preservación

Las muestras recolectadas en los frascos fueron conservadas en refrigeración a 4 °C (evitando el congelamiento) para evitar la alteración del volumen por evaporación, y al abrigo de la luz para evitar actividad microbiana y reacciones químicas indeseables, durante el transporte en la recolección, y hasta las determinaciones en el laboratorio.

Las muestras destinadas para la determinación de arsénico se filtraron a través de filtros de membrana con tamaño de poro de 0,22 μm .

2.2. Equipos

2.2.1. Equipo utilizado para la determinación total de arsénico y su análisis de especiación

El análisis de especiación de As se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) marca YL9100 de Young Lin Instrument, que contiene un desgacificador al vacío. Acoplada a la generación de hidruros (HG) con detección por espectrometría de fluorescencia atómica (AFS) marca AF-640A, Beijing Rayleigh Analytical Instrument corp. El acoplamiento instrumental HPLC-HG-AFS es el óptimo para el análisis de especiación, aportando alta separación de las especies químicas y límites de detección en el ámbito de concentraciones de unos pocos ng/L. La separación de las especies de As se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna tipo PRP-X100 de 250 x 4,1 mm de la marca Hamilton con fases móviles conteniendo aniones intercambiadores típicos como NO_3 y precolumna correspondiente (25 x 2.3 mm, 12-20 μm) marca Hamilton.

La técnica HG se aplicó como paso intermedio a la detección por AFS, para lo cual se utiliza NaBH_4 (Borohidruo de sodio) como agente reductor y formador de las especies volátiles de As.



Figura 13. Equipo en línea HPLC-HG-AFS.

2.2.2. Equipo utilizado para las mediciones in situ (temperatura, pH, OD, redox, conductividad)

Se utilizó un equipo multiparamétrico Thermo Scientific Orion Star A329 Portable, con electrodos específicos para la medición de pH, ISE, conductividad, RDO, OD.



Figura 14. Equipo Thermo Scientific Orion Star A329.

2.2.3. Equipo utilizado para la determinación de nitratos

El equipo que se usó para la determinación de nitratos es un espectrofotómetro HACH DR 2800, del espectro visible, con un rango de longitud de onda de 340 a 900 nm.



Figura 15. Equipo espectrofotómetro HACH DR 2800.

2.3. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de la máxima pureza disponible y como mínimo de calidad analítica. Las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua bidestilada-desionizada.

2.3.1. Reactivos utilizados para la determinación de arsénico por HPLC-HG-AFS

- Las soluciones de ácido clorhídrico (HCl) usadas como soluciones de transporte fueron preparadas por dilución de HCl concentrado al 10% (v/v) completando con agua bidesilada.
- Las soluciones de fosfato disódico (Na_2HPO_4) usadas de buffer fueron preparadas por disolución de Na_2HPO_4 a 0,5 M, a un pH de 5,9 llevado con HCl 5 M.
- Las soluciones de NaBH_4 usadas como agente reductor fueron preparadas por disolución de cantidades apropiadas de NaBH_4 “Sigma-Aldrich” al 1,1% (m/v) en solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 0,05% (v/v).
- Las soluciones de metanol 80/20 usadas para la purga, fueron preparadas con metanol 80% (v/v) y agua bidestilada 20% (v/v).

- Las soluciones de metanol 10/90 usadas para la purga, fueron preparadas con metanol 10% (v/v) y agua bidestilada 90% (v/v).
- La solución patrón de 100 ppb para la determinación de la curva patrón, fue preparada con soluciones de: 100 µl As(III), 100 µl As(IV), 100 µl MMA, 100 µl DMA. se le agregó 400 µl de Na₂HPO₄ 0,5 M y se llevó a 10 ml con agua bidestilada.
- La solución patrón de 200 ppb para la determinación de la curva patrón, fue preparada con soluciones de: 200 µl As(III), 200 µl As(IV), 200 µl MMA, 200 µl DMA. se le agregó 400 µl de Na₂HPO₄ 0,5 M y se llevó a 10 ml con agua bidestilada.
- La solución patrón de 500 ppb para la determinación de la curva patrón, fue preparada con soluciones de: 500 µl As(III), 500 µl As(IV), 500 µl MMA, 100 µl DMA. se le agregó 400 µl de Na₂HPO₄ 0,5 M y se llevó a 10 ml con agua bidestilada.
- Las soluciones muestras, para la determinación de la especiación de As, fueron preparadas con 400 µl de Na₂HPO₄ 0,5M y se llevaron a 10 ml con agua de muestra.

2.3.2. Reactivos utilizados para el estudio de DBO

- La solución de 100 ml de buffer de fosfato usado para nutrientes, fue preparada con 0,85 g de fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) “Alkemit”; 2,175 g de fosfato de potasio dibásico (K₂HPO₄) “Mallinckrodt”; 3,34 g fosfato de sodio dibásico (Na₂HPO₄) “E. Merck”; 0,17 g de cloruro de amonio (NH₄Cl) “Timper”; se diluyó y completó el volumen con agua destilada.
- La solución de 100 ml de sulfato de magnesio (MgSO₄), usado para nutrientes, fue preparado con 2,25 g de MgSO₄ “Mallinckrodt” se diluyó y completó el volumen con agua destilada.
- La solución de 100 ml de cloruro de calcio (CaCl₂), usado para nutrientes, fue preparado con 2,75 g de CaCl₂ “Mallinckrodt” se diluyó y completó el volumen con agua destilada.
- La solución de 100 ml de cloruro férrico (FeCl₃), usado para nutrientes, fue preparado con 2,75 g de FeCl₃·6H₂O “Merck” se diluyó y completó el volumen con agua destilada.
- La solución de nutrientes se preparó con la mezcla en partes iguales de solución buffer de fosfato, solución de MgSO₄, solución de CaCl₂ y la solución de FeCl₃
- Inhibidor de nitrificación “Hach”.

- La solución de 100 ml de sulfato de manganeso (MnSO_4), usado para el método Winkler, fue preparada con 46,4 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ “Merck”, se diluyó y completó el volumen con agua destilada.
- La solución de 100 ml de álcali-yoduro-azida, usado para el método Winkler, fue preparado con 50 g de NaOH “Alkemit” y 15 g de KI “Cicarelli”, se diluyó y completó el volumen con agua destilada.
- La solución de tiosulfato sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), usado para el método Winkler, fue preparado con disolución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ “E. Merck” a 0,025M.

2.3.3. Reactivo empleado para la determinación de nitratos

- Reactivo almohada de polvo, NitraVer® 5 Nitrato.

2.4. Procedimientos

2.4.1. Determinación in situ de parámetros fisicoquímicos (temperatura, pH, OD, redox, conductividad)

La primera extracción de agua recargada del acuífero se utilizó para la medición de los parámetros fisicoquímicos, utilizando los electrodos correspondientes para cada uno en el equipo multiparametrico Thermo Scientific Orion Star A329 Portable, se procuró que la medición se realizara inmediatamente y que no hubiera modificaciones al agua extraída como movimientos que pueda producir aireación o pérdida de temperatura.

2.4.2. Determinación de Arsénico total y análisis de especiación en agua freática por HPLC-HG-AFS

El acoplamiento HPLC-HG-AFS se realizó por conexión de la salida de la columna analítica al sistema generador de hidruros del equipo AFS, a través de tubos capilares. En primer lugar, se realizó un purgado de agua bidestilada durante 5 minutos, luego con metanol 80/20 durante 10 minutos, posteriormente con metanol 10/90 durante 10 minutos y finalizando con fase móvil de NaBH_4 durante 30 minutos, todos a un caudal de 2 ml/min.

Se evaluó la sensibilidad del equipo AFS mediante la determinación de la relación señal/ruido mediante calibración convencional, empleando tres soluciones patrón de As(III), As(V), MMA y DMA con concentraciones de 100 ppb, 200 ppb y 500 ppb.

La separación cromatográfica de las especies As(III), As(V), MMA y DMA se llevó a cabo por inyección de las disoluciones de las muestras sobre la columna analítica (Hamilton PRP-X100), empleando una disolución acuosa de NaHPO_4 0,5 M como fase móvil, a un caudal de 1,0 mL/min., accedieron al sistema generador de hidruros, así como las disoluciones de HCl 0,05% (p/v) y NaBH_4 1,1% (m/v), ambos a un caudal de 4,0 mL/min., se impulsaron a través de una bomba peristáltica, confluyendo en la cámara de mezcla o reactor, produciéndose la reacción de generación de la arsina. Los productos de la reacción se condujeron hasta el separador gas-líquido de vidrio en forma de U, que permite la eliminación de la fase líquida por drenaje, mientras que los gases producidos en la reacción se condujeron hacia la celda de atomización del equipo AFS, con ayuda de una corriente de Ar. De forma previa a la entrada en el atomizador, las especies volátiles se hicieron pasar a través de una membrana semipermeable, que permite su desolvatación, evitando así la condensación del vapor de agua y la extinción de la llama de difusión de hidrógeno, generada durante la reacción de formación de hidruros. Esta membrana permite la eliminación de la humedad a través de una corriente de aire (gas de secado) que circula en contracorriente. El flujo de especies volátiles, una vez desecado, accedió al atomizador, recogiendo la señal de radiación de fluorescencia en el detector.

Las señales cromatográficas obtenidas se evaluaron en términos de área de pico y mediante calibración convencional.

En la **Figura 16** puede observarse el diagrama esquemático de la metodología propuesta, mientras que en la **Tabla 1** se detallan las condiciones experimentales.

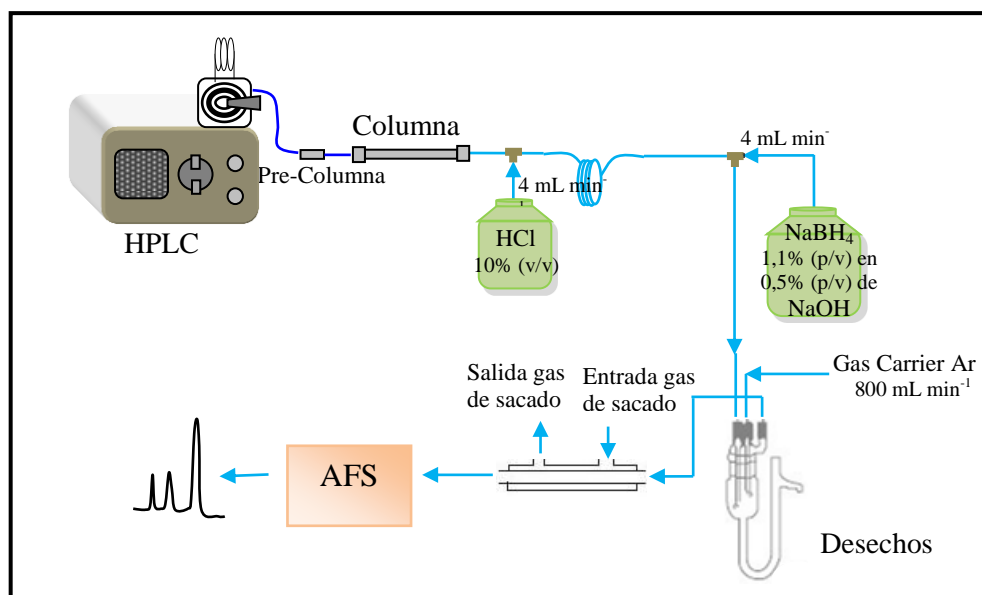


Figura 16. Diagrama esquemático del instrumental utilizado para la determinación de las especies de As mediante HPLC-HG-AFS.

Tabla 1. Condiciones instrumentales y de separación cromatográfica para el análisis de especiación de As en las muestras de agua.

HPLC	
Columna	Hamilton PRP-X100 (4,1 mm i.d ×250 mm×10 μm)
Guarda columna	Hamilton PRP X-100
Fase móvil	20 mmol/L fosfato de sodio, pH 5,9
Flujo de la fase móvil	1,0 mL min ⁻¹
Volumen de inyección	100 μL
Temperatura de la columna	25 °C
Modo cromatográfico	Isocrático
HG-AFS	
Lámpara y longitud de onda	Lámpara de cátodo hueco de alta intensidad de As, 197,3 nm
Corriente principal	40 Ma
Corriente auxiliar	0 Ma
Voltaje del detector fotomultiplicador	- 270 V
Agente reductor	NaBH ₄ 1,1% (p/v) en NaOH 0,05% (p/v)
Agente transportador	HCl 10% (v/v)
Caudales de reductor y transportador	Ambos a 4,0 mL min ⁻¹
Caudal de argón	800 mL min ⁻¹
Temperatura de atomización	300 °C

2.4.3. Determinación de materia orgánica en agua freática a través de la DBO

Para la estimación de materia orgánica (MO) se utilizó el método Winkler para determinar la demanda biológica de oxígeno, basada en la cantidad de oxígeno disuelto al principio y después de la incubación de las muestras en 5 días. Para ello se utilizaron botellas de 300 ml específicas para el método, se realizaron por triplicado a cada muestra de agua por pozo con y sin inhibidor de la nitrificación.

Para ello se colocó 200 ml de agua de muestra de pozo en las botellas para Winkler, luego se colocó 800 µl de solución de nutrientes que contenía KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , Na_2HPO_4 , NH_4Cl , MgSO_4 , CaCl_2 y FeCl_3 , posteriormente se completó el volumen de la botella con agua destilada aireada.

A las muestras que se le realizó el agregado del inhibidor nitrificante se le colocó a cada botella 0,2 g de dicho inhibidor.

Se tapó cada frasco con su tapón esmerilado y se las colocó en cámara a 20°C durante cinco días, al abrigo de la luz.

Método Winkler

A cada muestra en las botellas de 300 ml se le añadió 1 ml de solución de MnSO_4 y 1 ml de reactivo álcali-yoduro-azida. Se tapó cuidadosamente para excluir las burbujas de aire y se mezcló por inversión varias veces. Una vez que el precipitado se depositó suficientemente se añadió 1 ml de H_2SO_4 concentrado para dejar un sobrenadante claro por encima del hidróxido de manganeso floculado. Se volvió a tapar y se mezcló invirtiendo varias veces hasta la disolución completa. Se tituló un volumen correspondiente a 200 ml de la solución anterior.

Para la titulación se empleó la solución $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ hasta color amarillo pálido, luego se añadieron unas gotas de almidón y se continuó valorando hasta la primera desaparición del color azul. Se tomó la lectura de los ml consumidos de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, por cada ml es equivalente a 1 mg/L de OD (oxígeno disuelto).

Para realizar los cálculos de DBO se utilizó la siguiente ecuación:

$$\text{DBO}_5 = (\text{D1}-\text{D2}) / \text{P}$$

D1: OD de la muestra diluida inmediatamente después de la preparación (mg/L)

D2: OD de la muestra diluida después de 5 días de incubación a 20°C (mg/L)

P: fracción volumétrica decimal de la muestra empleada.

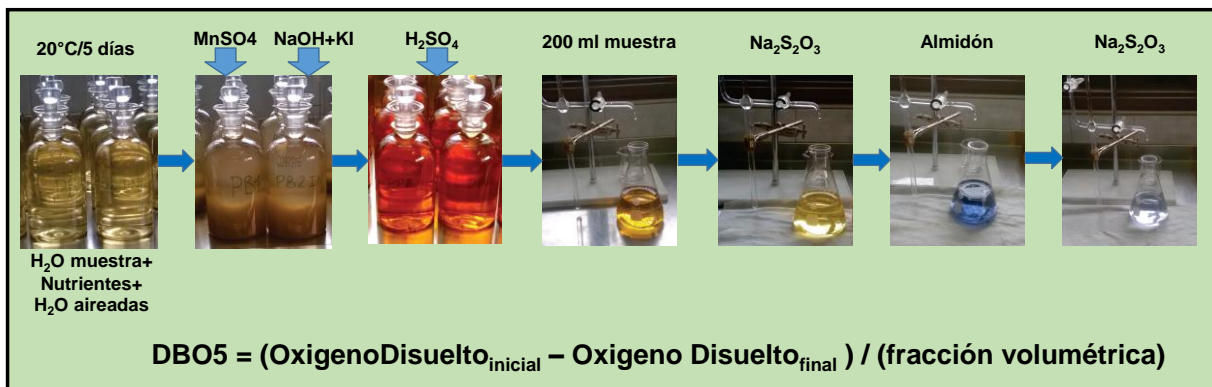


Figura 17. Diagrama esquemático del procedimiento del método Winkler

2.4.4. Determinación de nitratos en agua freática

La determinación de nitratos se realizó con un espectrofotómetro HACH DR 2800

- Se seleccionó el test, 353 N, Nitrate MR PP.
- Luego se llenó una celda con 10 ml de muestra, utilizándose como blanco. Se insertó el blanco en el portacelda, se presionó ZERO, la pantalla mostró 0.0 mg/L NO₃⁻.
- Preparación de la muestra: se agregó a la muestra usada como blanco, el contenido de 1 sobre de reactivo de nitrato, NitraVer5® en polvo. El cual consiste en la reducción de nitrato a nitrito por el cadmio presente en el reactivo de NitraVer5®.
- Se presionó TIMER>OK, empezó una reacción de 1 minuto, se agitó la celda vigorosamente hasta que el temporizador terminó.
- Cuando se detuvo el temporizador se presionó TIMER>OK, empezó una reacción de 5 minutos. Un color ámbar se desarrolló al tener presencia de nitratos.
- Dentro de los 2 minutos luego de que el temporizador se detuvo, se insertó la muestra preparada en el portacelda, se presionó READ. Dando los resultados en mg/L de NO₃⁻.



CAPÍTULO III

3. Resultados y Discusiones

3.1. Análisis de especiación de arsénico en muestras de agua por HPLC-HG-AFS

El As es un metaloide tóxico que está presente en la corteza terrestre a niveles tan altos como $3,4 \text{ mg kg}^{-1}$ y que se puede encontrar en diferentes intervalos de concentración en agua, suelo, aire, alimentos, plantas y animales [56]. La toxicidad del As depende fuertemente de su asociación química, determinándose que las especies inorgánicas son más tóxicas que las orgánicas [57]. Por lo tanto, la concentración total de As no proporciona información completa sobre los riesgos toxicológicos reales vinculados a la presencia de este elemento en alimentos, el ambiente y sistemas biológicos. En consecuencia, el desarrollo de metodologías modernas para el análisis de especiación de As es una práctica de alta demanda, especialmente para evaluar la calidad de bebidas altamente consumidas como el agua y los alimentos incluidos en la dieta humana [58,59]. El As puede estar presente en aguas, debido al uso de herbicidas o insecticidas residuales de los cultivos. Otras fuentes potenciales de contaminación de As pueden ser de origen natural y encontrarse presente en suelos ricos en dicho elemento, contaminándose el agua subterránea por contacto con estos. Las normativas establecen una concentración máxima de As total en agua potable de $10 \text{ }\mu\text{g/L}$ [30], pero en muestras de aguas naturales como las subterráneas las concentraciones pueden ser más elevadas. Este límite máximo residual plantea algunos inconvenientes para los químicos analíticos debido a que se requieren técnicas de análisis altamente sensibles para la determinación de As. Por otra parte, esta situación puede resultar mucho más compleja cuando el análisis de especiación es requerido, debido a que la concentración de las especies de As representa una fracción de las ya bajas concentraciones totales en las que pueden hallarse el As en las muestras de agua. Consecuentemente, se han propuesto diferentes métodos analíticos sensibles para la especiación de As utilizando técnicas híbridas que involucran acoplamientos instrumentales como la cromatografía líquida de alta resolución con (HPLC-ICP-MS) [60,61]. Del mismo modo, se han utilizado técnicas no cromatográficas utilizando cartuchos de intercambio aniónico o de adsorción [57]. Normalmente, los métodos basados en cromatografía utilizan detectores caros, como ICP-MS, mientras que los no cromatográficos requieren mucho tiempo debido a varias etapas experimentales implicadas y tienen limitaciones para separar un gran número de especies. Por otro lado, la técnica HPLC acoplada a detectores menos costosos y altamente sensibles, como AFS, es una alternativa valiosa para el análisis de especiación de As, con un tiempo de análisis razonable que permite a los laboratorios de análisis de rutina lograr una frecuencia analítica aceptable.

Las principales especies de As que se han encontrado en muestras de origen ambiental como las aguas han sido As(III), As(V), MMA y DMA [57,62]. Técnicas cromatográficas híbridas tales como HPLC-ICP-MS y HPLC-AFS han sido muy útiles para la separación y determinación de todas estas especies de As en una sola inyección de cromatografía [63]. Sin embargo, la alta concentración de etanol en muestras de bebidas que están compuestas por matrices altamente complejas, como es el del vino, debe tenerse en cuenta, en especial cuando se utilizan detectores tales como AFS o ICP-MS debido a un aumento significativo de la señal de fondo y los efectos de pérdida de sensibilidad causados por la introducción de solventes orgánicos [64,65]. Por lo tanto, la técnica cromatográfica más utilizada para el análisis de especiación de As ha sido la de intercambio aniónico (AEC), ya que los solventes orgánicos no son requeridos normalmente en la fase móvil.

En el presente trabajo de seminario de investigación se optimizó una metodología analítica para la especiación de As basada en el acoplamiento HPLC-HG-AFS. Para ello, el trabajo se fundamentó en metodologías ya desarrolladas y reportadas en la literatura [62,66]. De esta manera, la separación de las especies de As (As(III), DMA, MMA y As(V)) se realizó mediante cromatografía de intercambio aniónico debido a la naturaleza aniónica de las especies a determinarse Tabla 2.

Tabla 2. Nombres químicos y propiedades de especies de As incluidos en este trabajo.

Especie	Abreviatura	Formula	Estructura	pK _a	Ref.
Arsenito	As(III)	As(OH) ₃		pK _{a1} = 9,23 pK _{a2} = 12,1 pK _{a3} = 13,4	[67]
Arsenato	As(V)	AsO(OH) ₃		pK _{a1} = 2,25 pK _{a2} = 7,25 pK _{a3} = 12,3	[67]
Monometilarsenato	MMA	CH ₅ O ₃ As		pK _{a1} = 4,26 pK _{a2} = 8,25	[67]
Dimetilarsenato	DMA	C ₂ H ₇ O ₂ As		pK _a = 6,25	[67]

El desarrollo experimental de la metodología analítica utilizada para el análisis de especiación de As ya se ha indicado en el punto 2.4.2., en donde además se mencionan las condiciones más adecuadas para alcanzar la máxima detección y separación de las especies. Sin embargo, es importante destacar que previamente se evaluaron dichas condiciones experimentales a través de un estudio de optimización univariante.

Las condiciones experimentales seleccionadas en HPLC, especialmente la composición de la fase móvil, puede influenciar en forma notoria tanto la separación como la sensibilidad de la detección por AFS, por este motivo se evaluó la composición de la fase móvil, su caudal a través de la columna cromatográfica y el pH de trabajo para la separación de las especies. Los resultados obtenidos en cuanto a la separación de las especies fueron los esperados y se encontraron en concordancia con los reportados previamente [68]. De esta manera, se observó que el pH más adecuado para la completa separación de las especies de As en la columna PRP-X100 fue de 5,9, pH al cual todas las especies, a excepción del As(III), se encuentran diprotonadas total o parcialmente y forman aniones. Dichas especies aniónicas pueden ser entonces retenidas sobre la columna de intercambio aniónico. Además, para el ajuste del pH se utilizó un buffer de $\text{H}_2\text{PO}_4^{3-}/\text{HPO}_4^{2-}$, cuya concentración también debió evaluarse puesto que podría influenciar la separación de las especies de As. Así, una baja concentración del buffer sería insuficiente para eluir las especies desde la columna, mientras que, por otro lado, una concentración muy elevada eluiría las especies rápidamente y sin resolución de la mezcla de especies. De esta manera, luego de la optimización de las condiciones de la fase móvil, la separación completa de las especies de As y su elución dentro de un tiempo de retención total de sólo 8 min, se obtuvo a una concentración de fosfato de sodio de 20 mmol/L y pH 5,9.

Paralelamente, el flujo de la fase se fijó en 1 ml/min y el volumen de inyección en 100 μL de muestra o patrón. Estas condiciones permitieron además una detección sensible de las especies de As en el detector HG-AFS. Con respecto a las condiciones para la generación de los hidruros de As en HG-AFS, se utilizó una concentración del reductor NaBH_4 de 1,1% (p/v) en NaOH 0,05% (p/v) y del agente transportador HCl de 10% (v/v). Estas condiciones fueron las indicadas como óptimas en el manual del equipo de HG-AFS utilizado.

Durante la optimización, se estudió también el efecto de algunas variables críticas para la obtención de una alta sensibilidad de detección de las especies de As con la técnica HPLC-HG-AFS. En este caso, se evaluaron los caudales de los agentes reductor y transportador, así como el caudal del gas utilizado para el transporte de los hidruros generados. A continuación, se expone el efecto de dichas variables sobre la detección de las especies de As por HPLC-HG-AFS.

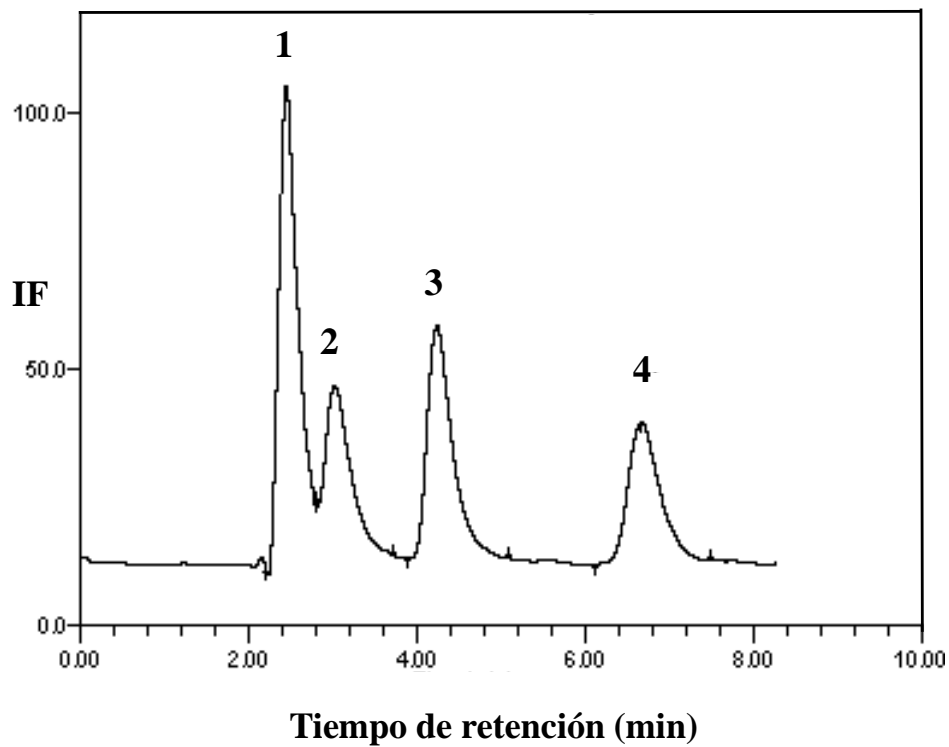


Figura 18. Cromatograma obtenido para el análisis de especiación de As de una solución patrón de 200 μg As/L. Caudales de HCl y NaBH_4 a 5,3 mL/min y caudal de gas Ar a 600 mL/min. 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V).

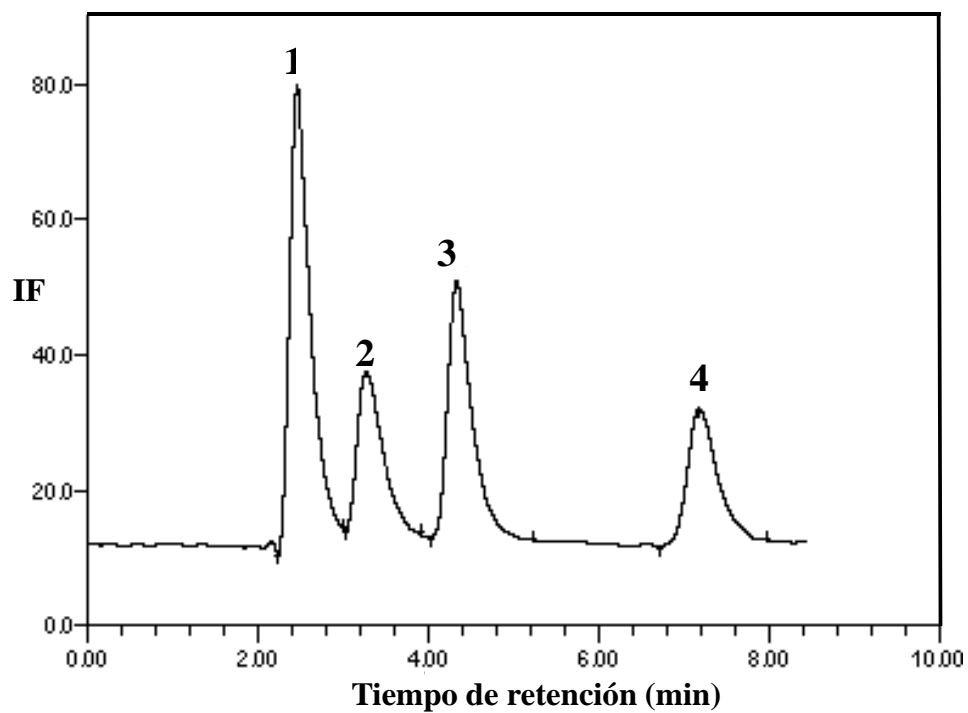


Figura 19. Cromatograma obtenido para el análisis de especiación de As de una solución patrón de 200 μg As/L. Caudales de HCl y NaBH_4 a 4 mL/min y caudal de gas Ar a 600 mL/min. 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V).

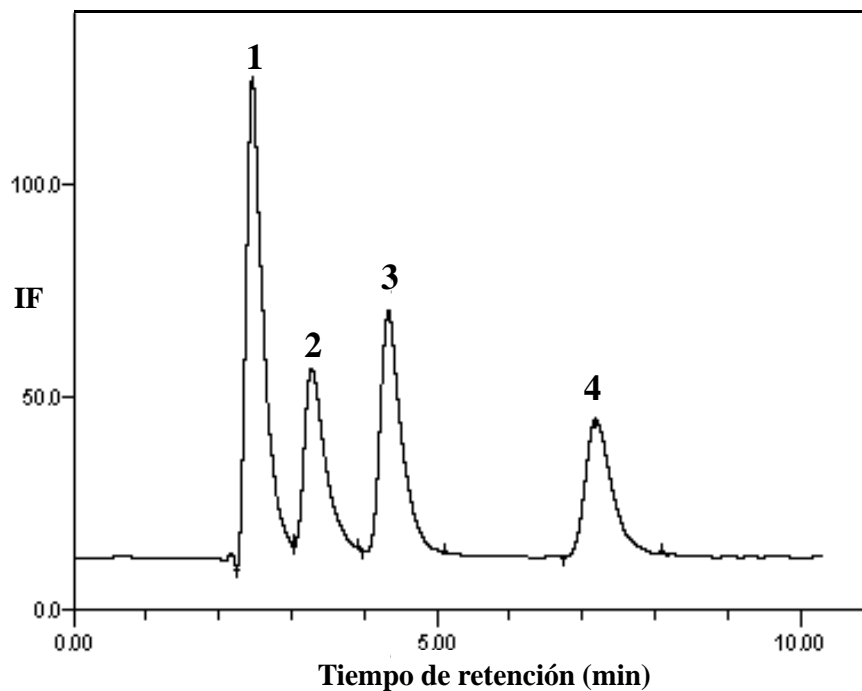
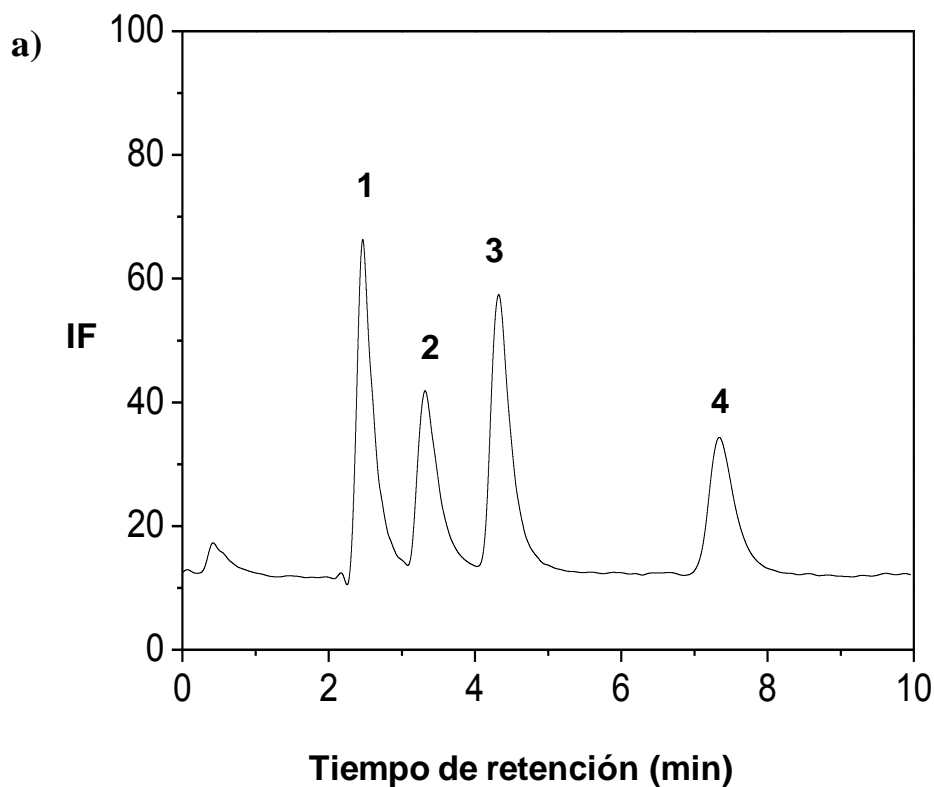


Figura 20. Cromatograma obtenido para el análisis de especiación de As de una solución patrón de 200 $\mu\text{g As/L}$. Caudales de HCl y NaBH_4 a 4 mL/min y caudal de gas Ar a 800 mL/min. 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V).

En función de los resultados obtenidos, y que pueden apreciarse en los diferentes cromatogramas presentados anteriormente, se seleccionó un caudal de 4 mL/min para el agente reductor y el transportador. Asimismo, el caudal de gas transportador fue de 800 mL/min.

Luego de la optimización de las condiciones experimentales para la separación y detección de las especies de As en HPLC-HG-AFS, se procedió al trazado de las curvas de calibración. Los cromatogramas obtenidos luego de la inyección de los patrones mezclas de las especies de As estudiadas a diferentes concentraciones y las curvas de calibración correspondientes en las figuras siguientes.



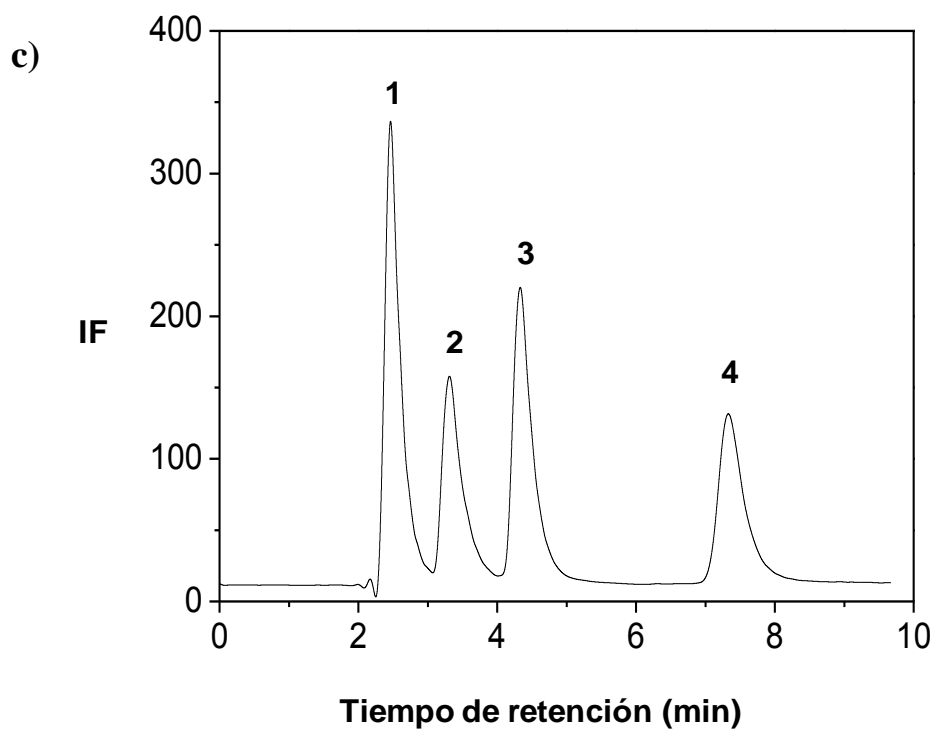
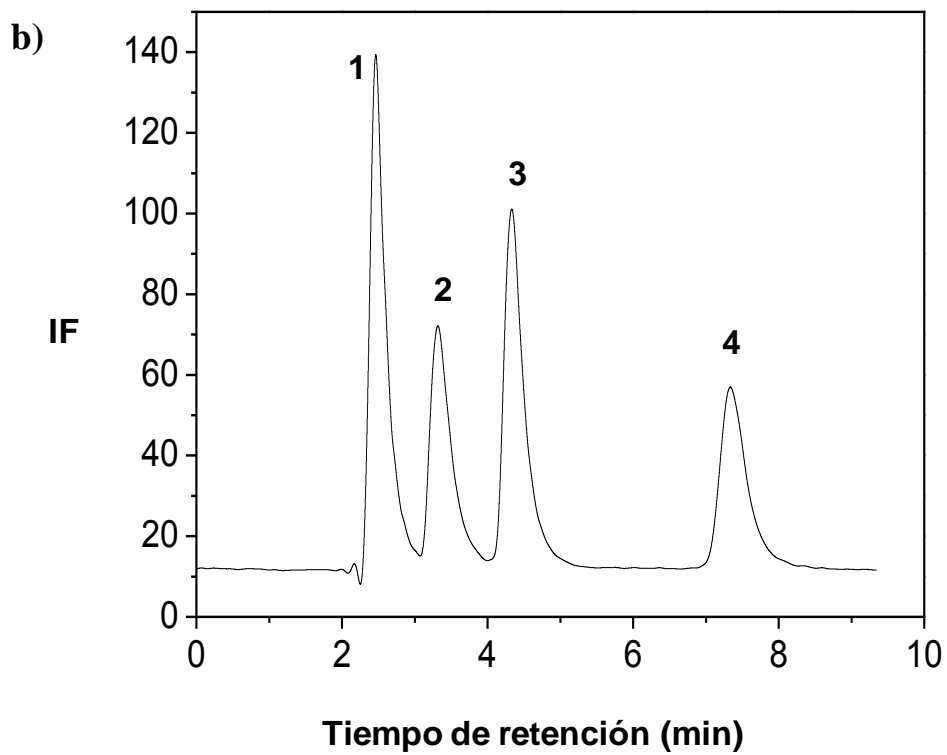
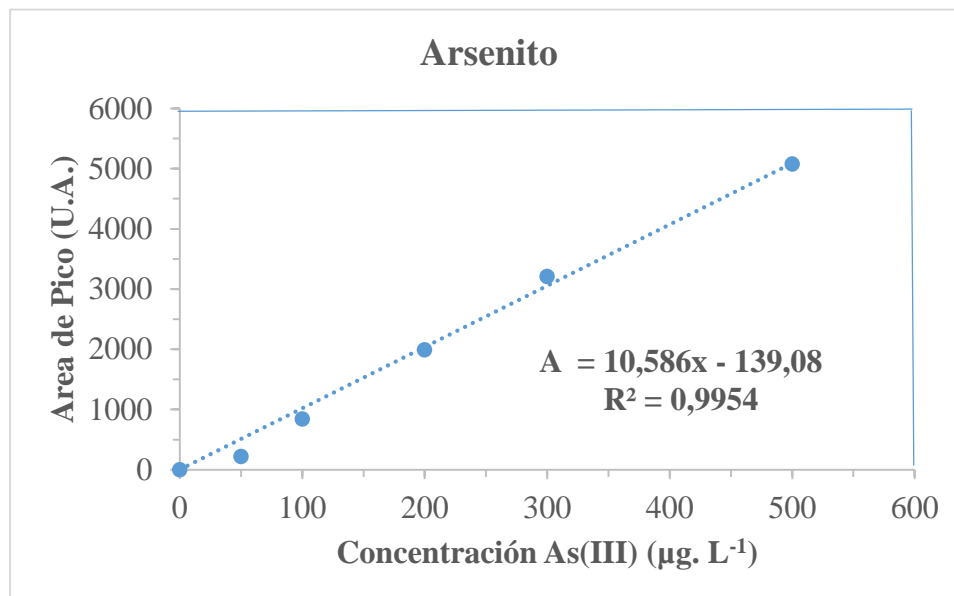


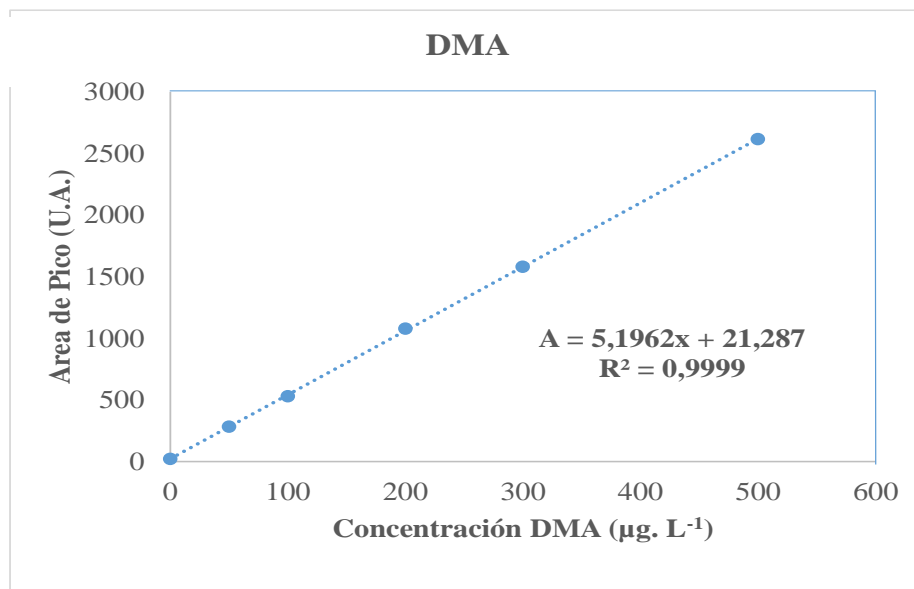
Figura 21. Cromatogramas típicos de los análisis de especiación de As obtenidos para los diferentes patrones de las especies. Se exponen algunos a manera de ejemplo observados a

concentraciones de las especies de: a) 100, b) 200 y c) 500 $\mu\text{g/L}$., 1) As(III), 2) DMA, 3) MMA, 4) As(V).

a)



b)



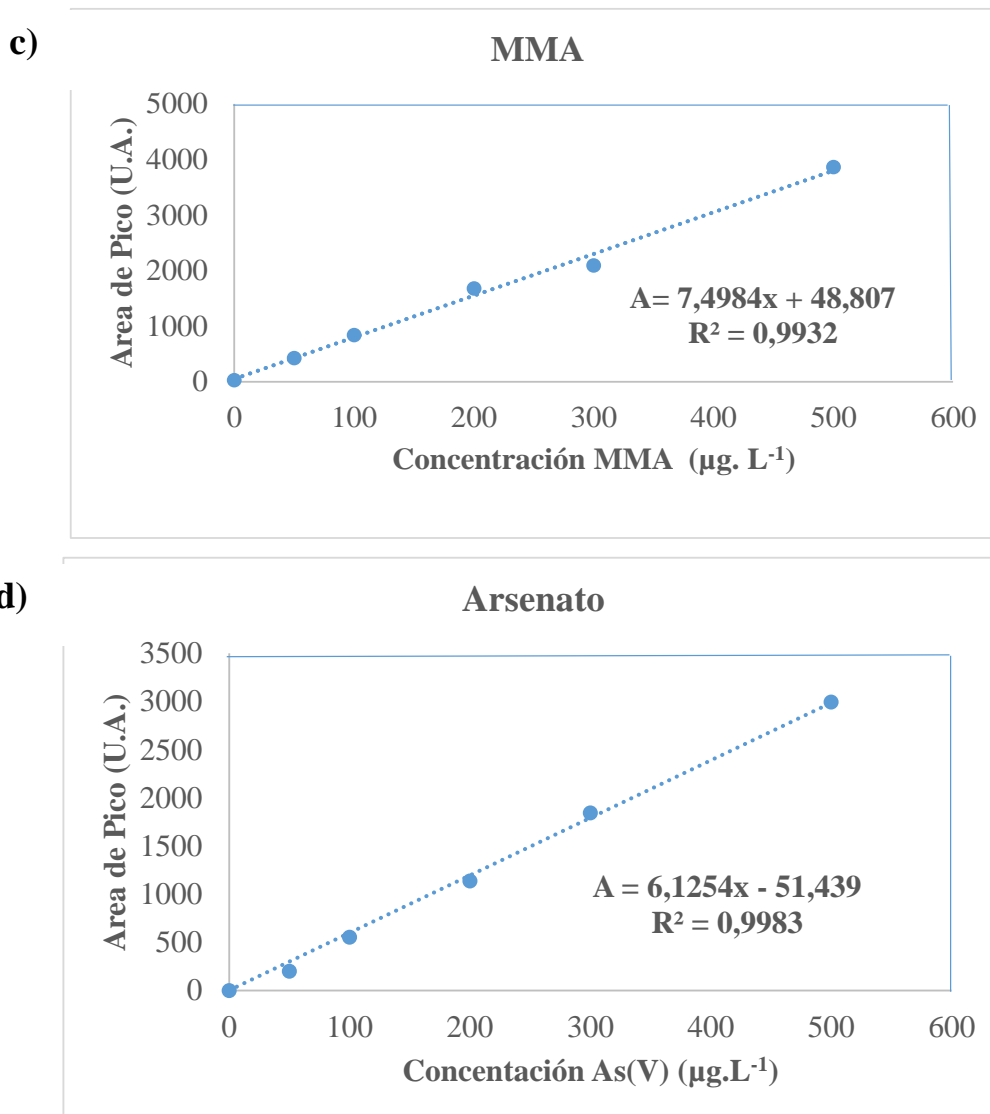


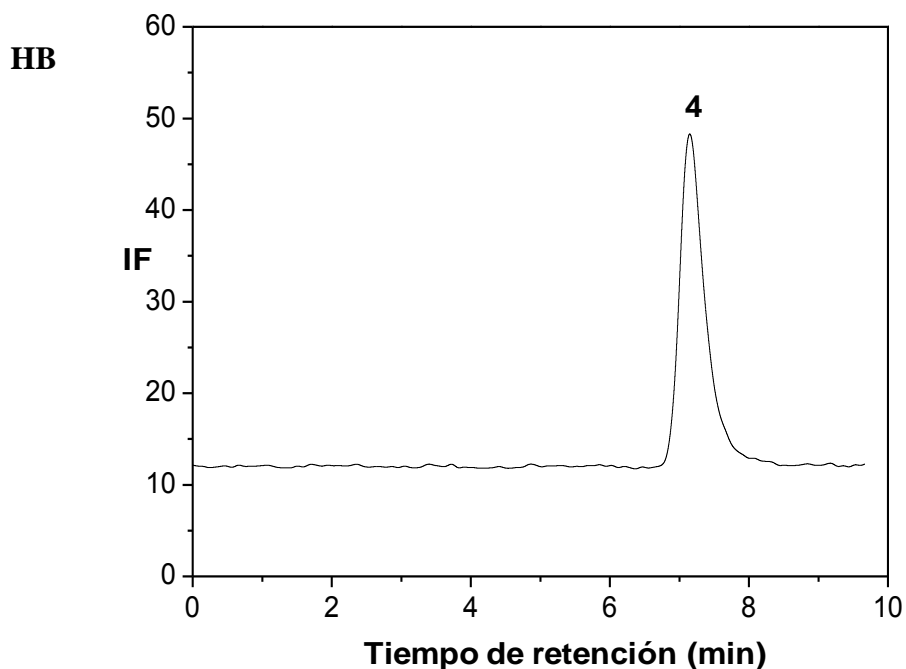
Figura 22. Curvas de calibración de los análisis de especiación de As obtenidos para los diferentes patrones de las especies. a) As(III), b) DMA, c) MMA y d) As(V).

Se evaluaron también las cifras o valores de mérito analítico de la metodología optimizada en el presente seminario de investigación. Los límites de detección (LODs), calculados en base a 3 veces la desviación estándar de la señal de fondo (3σ), fueron $0,2 \mu\text{g}$ de As/L para As(III), $0,4 \mu\text{g}$ de As/L para DMA, $0,3 \mu\text{g}$ de As/L para MMA y $0,4 \mu\text{g}$ de As/L para As(V). Las curvas de calibración mostraron una satisfactoria linealidad para las diferentes especies, en un rango de concentración desde valores cercanos al LOD y hasta el máximo valor de concentración de las especies de As evaluado en este trabajo que fue de $500 \mu\text{g}$ de As/L.

También puede observarse que los coeficientes de correlación de las curvas de calibración para cada una de las especies de As fueron realmente satisfactorios y fueron 0,9954 para As(III), 0,9999 para DMA, 0,9932 para MMA y 0,9983 para As(V).

Con respecto a la reproducibilidad, se observó que los tiempos de retención fueron reproducibles a través de una jornada laboral de análisis (8-12 horas). Las desviaciones estándar relativa (RSD %) fueron calculadas para 6 réplicas de 10 µg de As/L para cada una de las especies variando entre 3,1% y 4,8%.

Luego del estudio de las condiciones experimentales que podían influir en la separación y detección de las especies de As por HPLC-HG-AFS, se procedió a la aplicación de la metodología para el análisis de las diferentes muestras de aguas colectadas siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2.4.2. Los cromatogramas obtenidos del análisis de especiación de As en las muestras de agua se detallan a continuación:



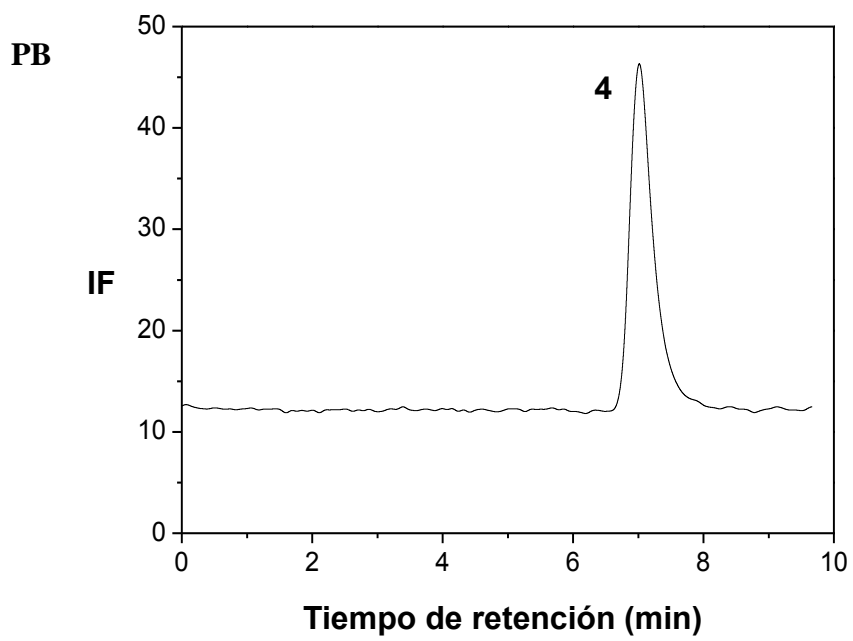
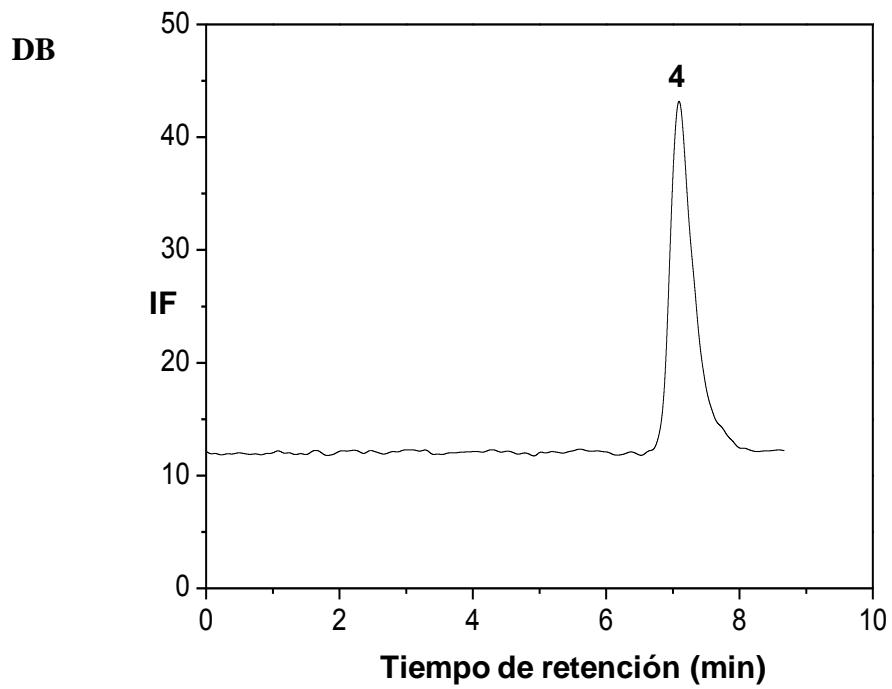
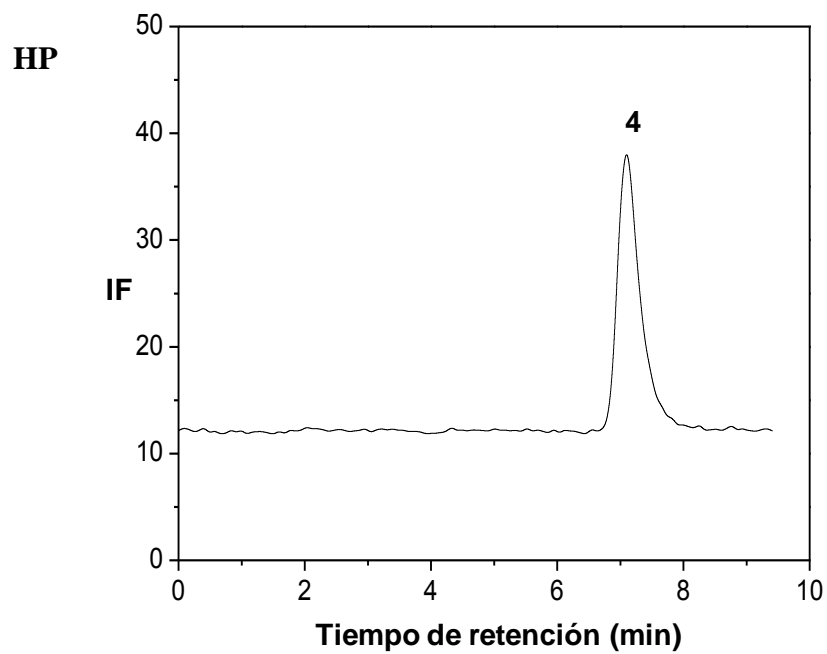


Figura 23. Cromatogramas de análisis de especiación de As obtenidos de las aguas freáticas de los pozos balde, HB: hormigas pozo balde, DB: delicias pozo balde y PB: primavera pozo balde. 4) As(V).



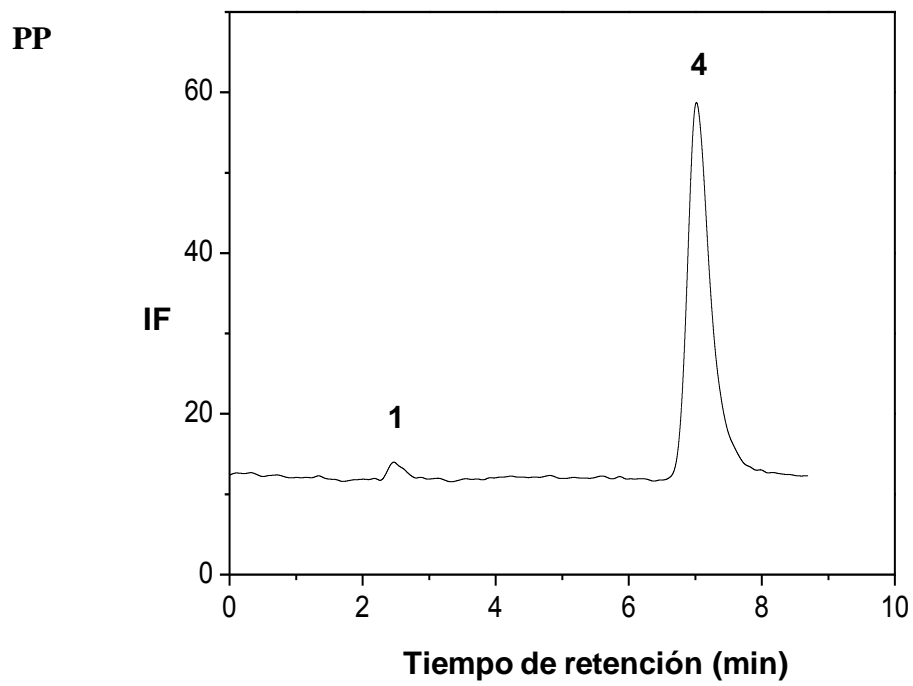
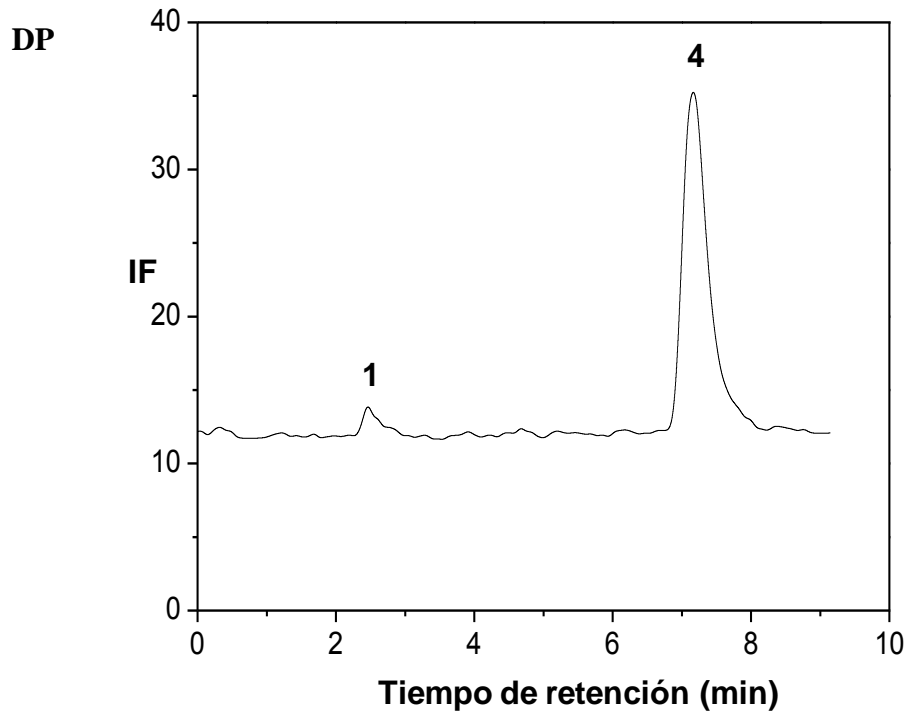
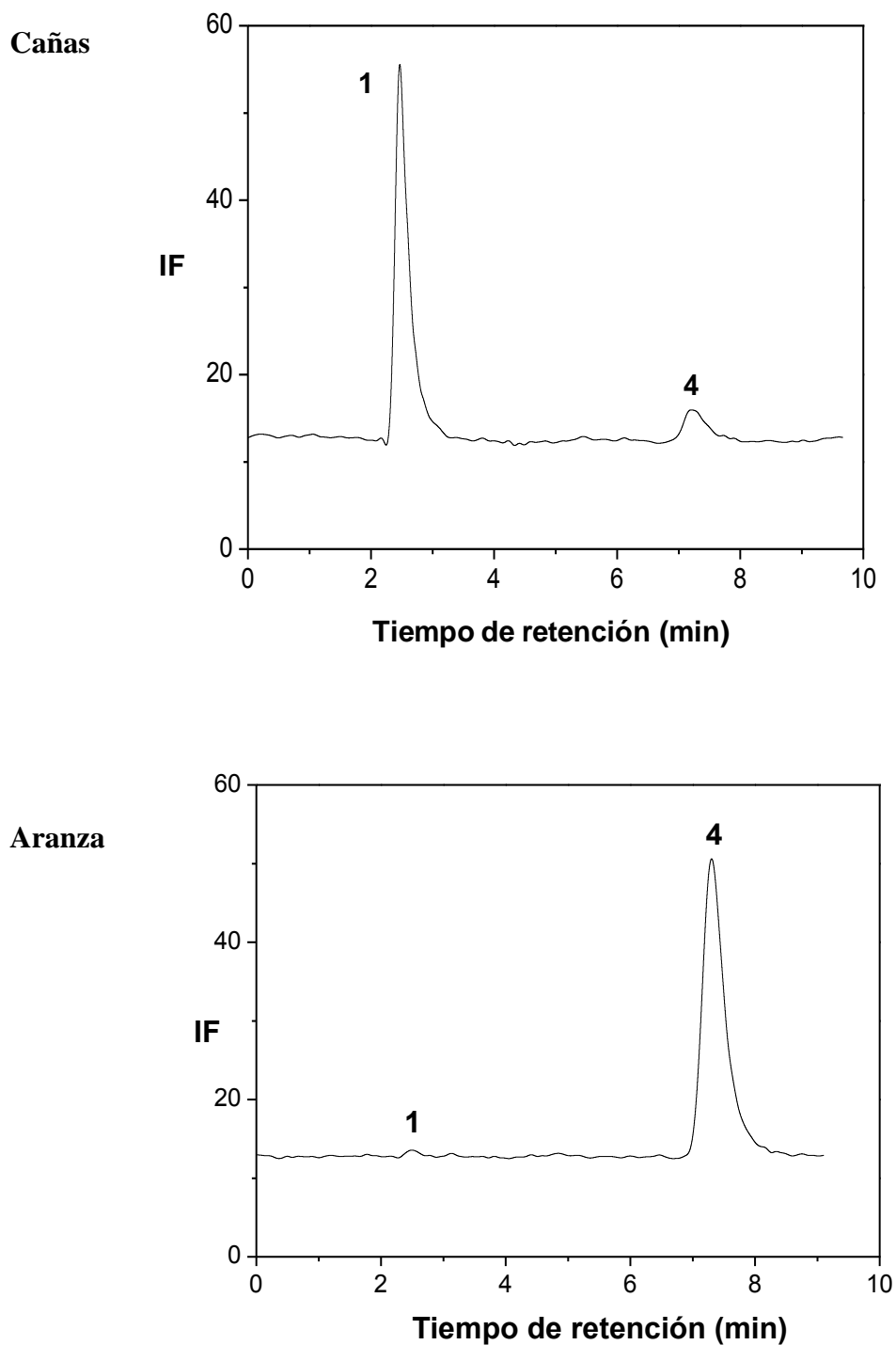


Figura 24. Cromatogramas de análisis de especiación de As obtenidos de las aguas freáticas de los pozos piezómetros, HP: hormigas pozo piezómetro DP: delicias pozo piezómetro y PP: primavera pozo piezómetro. 1) As(III), 4) As(V).



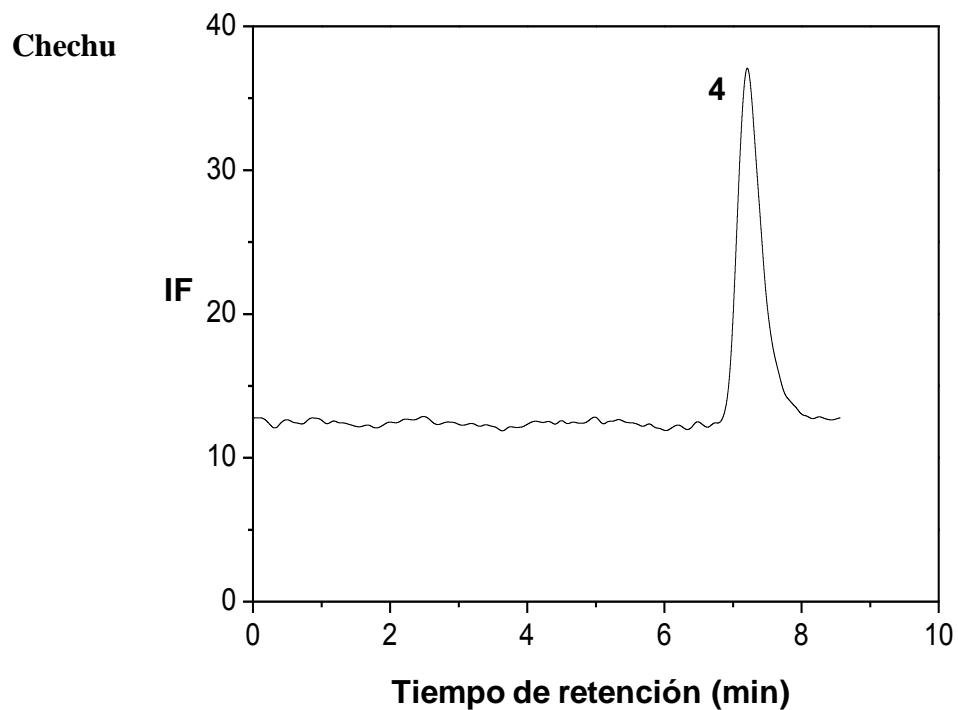


Figura 25. Cromatogramas de análisis de especiación de As obtenidos de las aguas freáticas de los pozos control, Cañas: pozo control de Hormigas, Aranza: pozo control de Delicias y Chechu: pozo control Primavera. 1) As(III), 4) As(V).

Las concentraciones de las diferentes especies de As detectadas en las muestras de agua analizadas se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones de las especies de As detectadas en las muestras de agua por el equipo HPLC-HG-AFS.

Muestra	Concentración ($\mu\text{g As/L}$)				
	As(III)	DMA	MMA	As(V)	Arsénico Total
HB	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	161,75	161,75
DB	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	141,61	141,61
PB	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	151,19	151,19
HP	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	117,73	117,73
DP	19,04	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	110,31	129,35
PP	18,84	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	201,49	220,33
Cañas	83,11	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	25,75	108,86
Aranza	17,11	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	170,72	187,83
Chechu	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	$\leq\text{LOD}$	113,23	113,23

Puede observarse de los cromatogramas y de la tabla de especiación de los diferentes pozos, que en todos se encontró As(V), pero solo en cuatro se encontró As(III), y en ninguno se detectó DMA ni MMA.

En comparación con los distintos pozos se ve que en los pozos baldes solo se encontró As(V), en los pozos piezómetro y control se encontraron en dos de tres As(III) respectivamente. Además, solo en el puesto de las Delicias se obtuvo As(III) en los pozos piezómetro y control. También cabe destacar que en el pozo de las Cañas (relativamente poco disturbado, control del puesto de Las Hormigas) es donde mayor cantidad de arsenito se encontró y además este valor es mayor que el de arsenato.

En todos los casos en los que se determinó especies de As, se obtuvieron valores por encima al establecido al Código Alimentario Argentino y a la OMS.

3.2. Evaluación y análisis de los datos obtenidos por DBO

Dado que la materia orgánica no sólo está compuesta por carbohidratos, una manera más práctica de analizar el consumo de oxígeno en la degradación de la materia orgánica en general, es medir los parámetros de DBO.

La DBO expresa la materia orgánica en términos generales, pero no indican su composición, la cual es muy variada. Como su origen proviene de organismos, y sus productos de degradación o de metabolismo, se puede afirmar que la componen proteínas, carbohidratos y lípidos y/o sus productos de degradación: aminoácidos, monosacáridos, hidrocarburos, ácidos grasos, alcoholes, más otros componentes propios de los vegetales como pigmentos.

La DBO es afectada por la temperatura del medio, por las clases de microorganismos presentes, por la cantidad y tipo de elementos nutritivos presentes. Si estos factores son constantes, la velocidad de oxidación de la materia orgánica se puede expresar en términos del tiempo de vida media (tiempo en que descompone la mitad de la cantidad inicial de materia orgánica) del elemento nutritivo.

La DBO de una muestra de agua expresa la cantidad de miligramos de oxígeno disuelto por cada litro de agua, que se utiliza conforme se consumen los desechos orgánicos por la acción de las bacterias en el agua. La DBO se expresa en partes por millón (ppm) de oxígeno y se determina midiendo el proceso de reducción del oxígeno disuelto en la muestra de agua manteniendo la temperatura a 20 °C en un periodo de 5 días. Una DBO grande indica que se requiere una gran cantidad de oxígeno para descomponer la materia orgánica contenida en el agua.

Se definen tres rangos de concentración de DBO5:

- 0 - 3 mg/L (ppm): el nivel de contaminación orgánica es bajo.
- 3 - 10 mg/L (ppm): el nivel de contaminación orgánica es medio.
- > 10 mg/L (ppm): el nivel de contaminación orgánica es alto.

Los métodos de medición se fundamentan en la hipótesis de que la cantidad de materia orgánica contenida en la muestra, es directamente proporcional a la cantidad de oxígeno que requiere una población bacteriana para digerirla. Así, si hay mucha materia orgánica fácilmente biodegradable en la muestra, y suficiente oxígeno, entonces habrá un crecimiento grande en una población de microorganismos aeróbicos que se adiciona a las muestras, y si hay un crecimiento grande en una población de microorganismos aeróbicos, entonces habrá un descenso en la concentración del oxígeno disuelto del sistema. La magnitud de este descenso es lo que se conoce como DBO.

El desarrollo experimental de la metodología analítica utilizada para el análisis de materia orgánica ya se ha indicado en el punto 2.4.3., en donde además se mencionan las condiciones más adecuadas. Sin embargo, es importante destacar que previamente se evaluaron dichas condiciones experimentales a través de un estudio de optimización univariante.

Las condiciones experimentales seleccionadas para el cultivo de agua de muestra, puede influenciar en forma notoria en la detección del oxígeno consumido por los microorganismos, ya que una cantidad deficiente de muestra no alcanzaría para poder tener registros del consumo de oxígeno (límite mínimo detectable de 2 ml) y una elevada cantidad de muestra podría consumir toda o casi toda la cantidad de oxígeno disuelto (límite mínimo de oxígeno residual 1 ml) y no se tendría una lectura correcta. Por este motivo se realizó la puesta a punto de la técnica de DBO5 por el método Winkler, en donde se realizó incubación de agua de muestras de pozo de 25,50,75,100,125,175, 200, 225 y 250 ml en las distintas botellas para el análisis, se encontró que la mejor para realizar los ensayos definitivos era una incubación de 200 ml de agua de muestra de pozo.

Luego del estudio de las condiciones experimentales que podían influir en la detección de la materia orgánica, se procedió a la aplicación de la metodología para el análisis de las diferentes muestras de aguas colectadas siguiendo el procedimiento descrito en el punto 2.4.3. A continuación se muestran los gráficos obtenidos de los análisis de DBO5 con y sin inhibidor de la nitrificación:

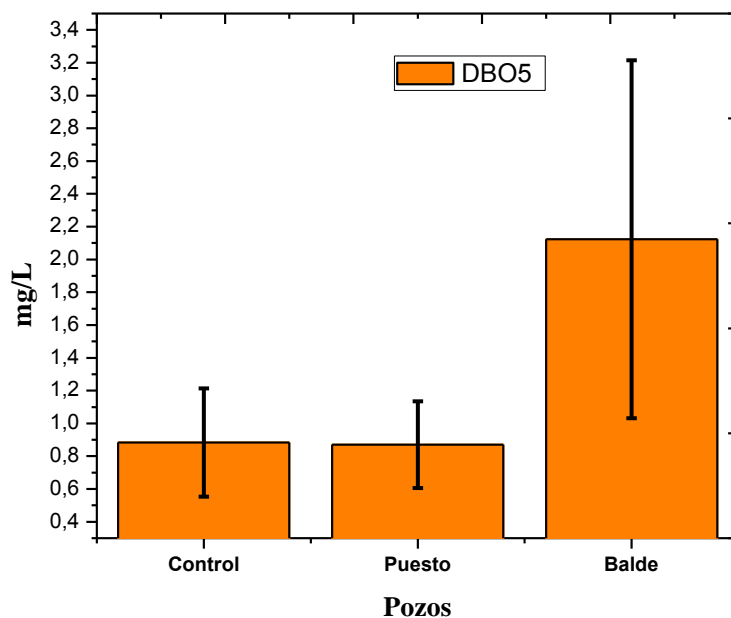


Figura 26. Gráfico de barras obtenidas de los ensayos de DBO5, de los pozos controles, puestos y balde.

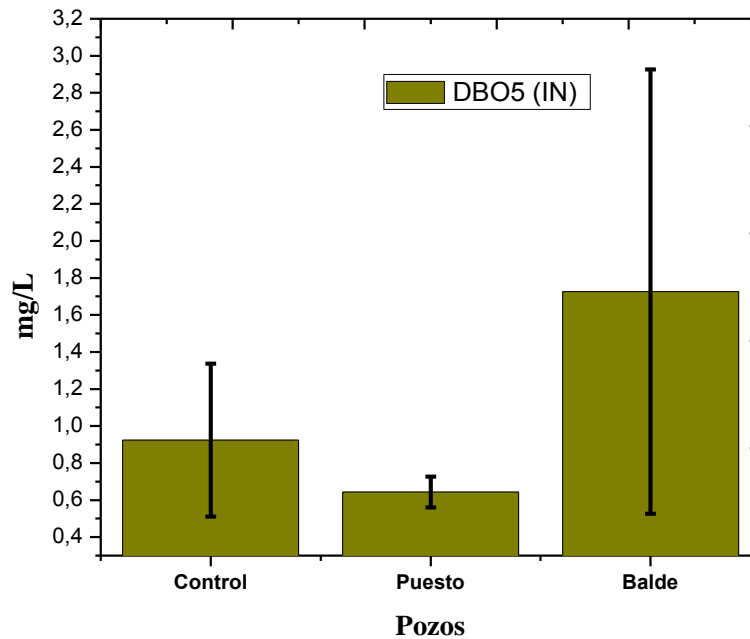


Figura 27. Gráfico de barras obtenidas de los ensayos de DBO5 con inhibidor, de los pozos controles, puestos y baldes.

Como se puede observar se encontró mayor demanda biológica de oxígeno, indicadora de la cantidad de materia orgánica en los pozos baldes comparada con los pozos control y los pozos de los puestos, pero en todos los casos en nivel de contaminación orgánico es bajo ($< 3 \text{ mg/L}$) como se mencionó anteriormente en los rangos de concentración

3.3. Análisis de los datos de nitratos

El desarrollo experimental de la metodología analítica utilizada para el análisis de nitratos ya se ha indicado en el punto 2.4.4.

En la siguiente figura se muestra el gráfico con los datos obtenidos de nitratos de los distintos pozos.

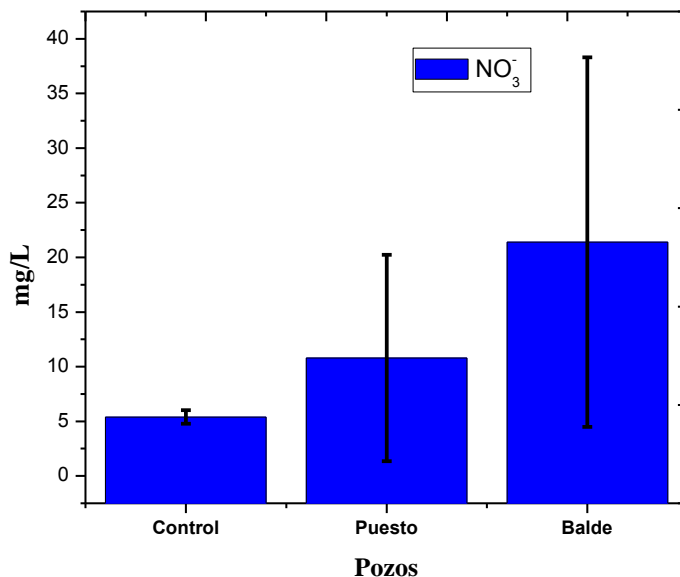


Figura 28. Gráfico de barra obtenida de los ensayos de nitrato, de los pozos controles, puestos y baldes

Como se puede apreciar en los gráficos tiene una mayor cantidad de nitratos el agua subterránea de los pozos baldes, en menor cantidad en los pozos puestos y mucho menor en los pozos control, en todos los casos está por debajo de lo establecido por la OMS (45 $\mu\text{g/L}$)

3.4. Evaluación de los datos obtenidos in situ

➤ El ORP (potencial de oxidación – reducción) es una forma de medir la energía química de oxidación – reducción mediante un electrodo, convirtiéndola en energía eléctrica. El potencial redox es positivo cuando se produce una oxidación y negativo cuando se produce una reducción. La Organización Mundial de la Salud adoptó en 1971 un valor de 650 mV como valor adecuado para el agua potable.

En la siguiente figura se muestra el gráfico con los datos obtenidos de ORP de los distintos pozos.

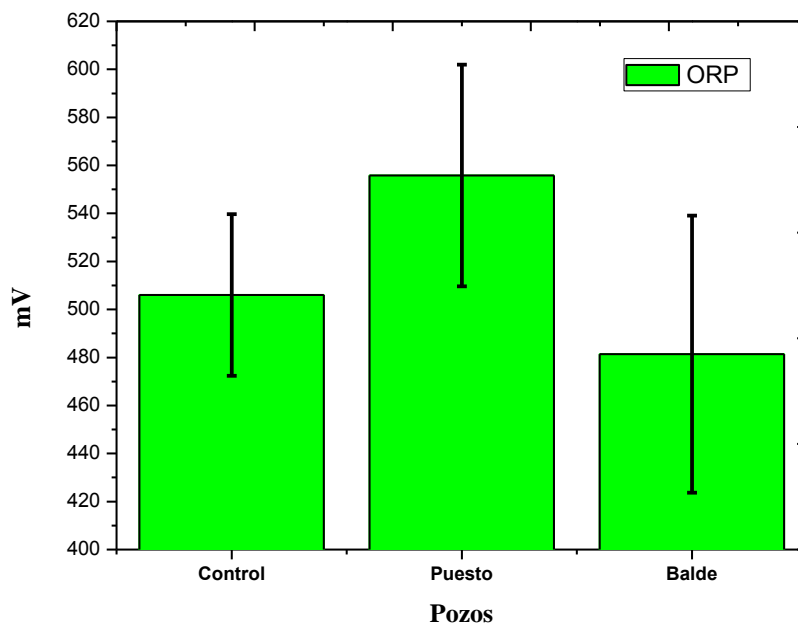


Figura 29. Gráfico de barra de ORP, de los pozos controles, puestos y baldes

➤ El pH es el valor que determina si una sustancia es ácida, neutra o básica, calculando el número de iones de hidrógeno presentes. Se mide en una escala que va de 0 a 14, donde el 7 indica una sustancia neutra. Los valores de pH por debajo de 7 indican que una sustancia es ácida y los valores por encima de 7 indican que es básica.

Cuando una sustancia es neutra, el número de átomos de hidrógeno y de oxhidrilos son iguales. Cuando el número de átomos de hidrógeno (H^+) excede el número de átomos del oxhidrilo (OH), la sustancia es ácida. El pH recomendado por la OMS es de 6.5 a 9.5.

En la siguiente figura se muestra el gráfico con los datos obtenidos de pH de los distintos pozos.

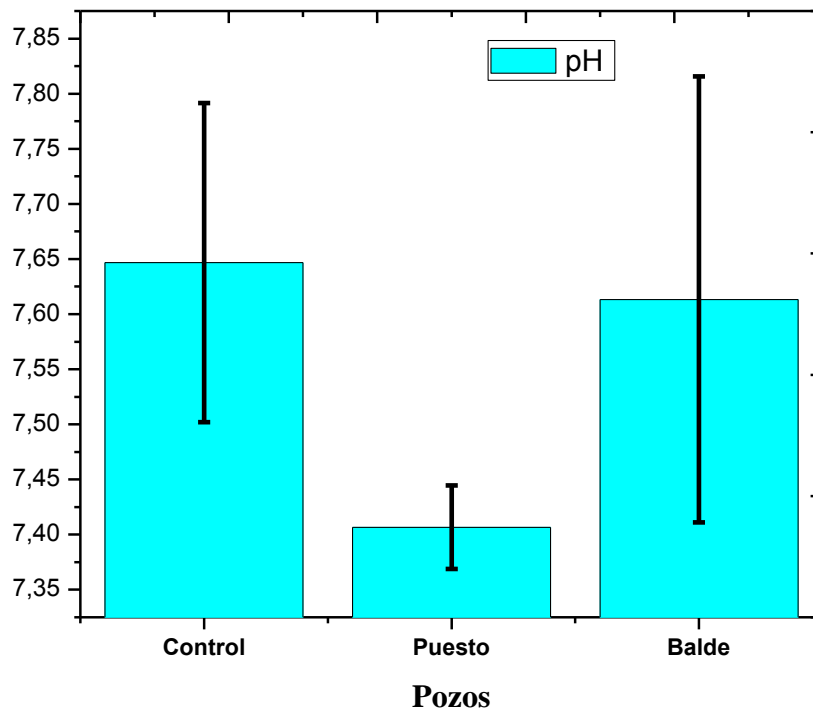


Figura 30. Gráfico de barra de pH, de los pozos controles, puestos y baldes

➤ La conductividad eléctrica es una medida de la capacidad de una solución acuosa para conducir una corriente eléctrica; depende de la presencia de iones, su concentración total, movilidad, valencia, concentración relativa y temperatura de medición y se expresa en miliSiemens por centímetro (mS/cm). El agua pura tiene una conductividad eléctrica muy baja.

El agua natural tiene iones en disolución y su conductividad es mayor y proporcional a la cantidad y características de esos electrolitos. Por esto se usan los valores de conductividad como índice aproximado de concentración de solutos. Los niveles máximos permitidos en agua segura para consumo humano son: $\leq 1,50$ mS /cm.

Los riesgos del agua de riego con alta Conductividad Eléctrica son:

- Precipitación de sales: en la solución de riego con obstrucción de los goteros
- Daño al cultivo: por una solución demasiado concentrada en sales que produce interferencias en la absorción radical. Normalmente la concentración de sales es mayor dentro de la célula que en el agua del suelo. Si esto no ocurre, no se produce absorción de agua y la planta se marchita.
- Salinización del suelo.

En la siguiente figura se muestra el gráfico con los datos obtenidos de conductividad de los distintos pozos.

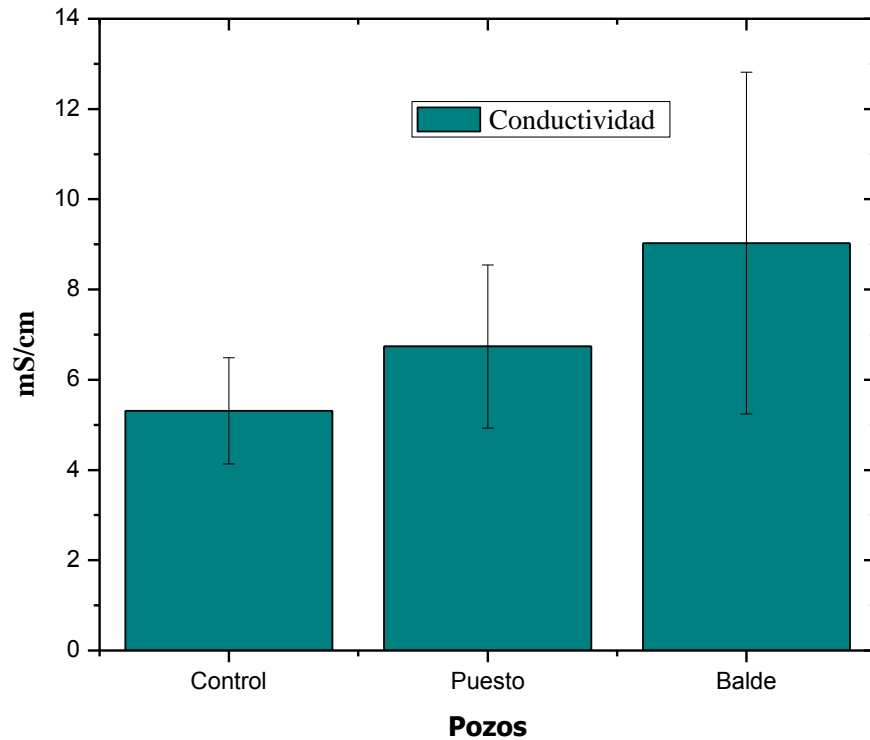


Figura 31. Gráfico de barra de conductividad de los pozos controles, puestos y baldes.

Como se puede observar en todos los pozos sobrepasan considerablemente el valor máximo permisible (1,50 mS /cm), debido a la alta concentración de sales en las agua freática.

➤ El oxígeno disuelto es necesario para la respiración de los microorganismos aerobios, así como para otras formas de vida. Sin embargo, el oxígeno es sólo ligeramente soluble en agua. La cantidad real de oxígeno y otros gases que pueden estar presentes en la solución, viene acondicionada por los siguientes aspectos: (1) solubilidad del gas, (2) presión parcial del gas en la atmósfera; (3) temperatura, y (4) pureza del agua (salinidad, sólidos en suspensión, etc)

Dado que evita la formación de olores desagradables en las aguas residuales, es deseable y conveniente disponer de cantidades suficientes de oxígeno disuelto.

Las deficiencias de oxígeno disuelto posibilitan el desprendimiento de hierro y manganeso y su disolución causando, posibles problemas en el tratamiento de las aguas. El sabor y olor son también un riesgo en ausencia de oxígeno disuelto, a causa de la potencial producción de sulfuro de hidrogeno y otros compuestos de azufre.

En la siguiente figura se muestra el grafico con los datos obtenidos de OD de los distintos pozos.

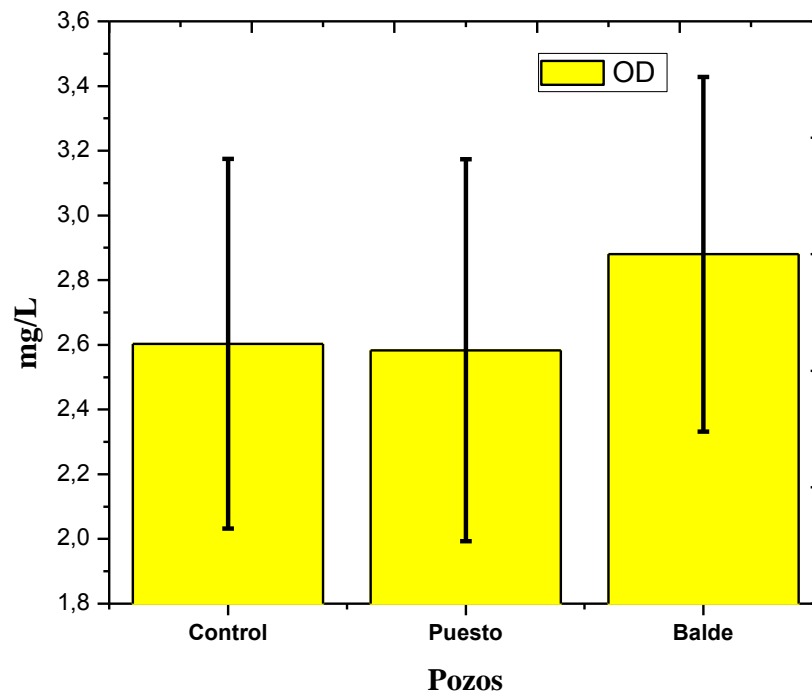


Figura 32. Gráfico de barra de OD, de los pozos controles, puestos y baldes

➤ La temperatura del agua es un parámetro muy importante dada su influencia, tanto sobre el desarrollo de la vida acuática como sobre las reacciones químicas y velocidades de reacción, así como la aptitud del agua para ciertos usos útiles.

La temperatura es un indicador de la calidad del agua, que influye en el comportamiento de otros indicadores de la calidad del recurso hídrico, como el pH, el déficit de oxígeno, la conductividad eléctrica y otras variables fisicoquímicas.

Características

- El oxígeno es menos soluble en agua caliente que en agua fría.
- El aumento en las velocidades de las reacciones químicas que produce un aumento de la temperatura, combinado con la reducción de oxígeno presente en las aguas superficiales.
- Es causa frecuente del oxígeno presente en las aguas superficiales, reduciéndose más en los meses de verano
- Un cambio brusco de temperatura puede conducir a un aumento en la mortalidad de la vida acuática.
- Las temperaturas elevadas pueden dar lugar conducir a un aumento en la mortalidad de la vida acuática.
- La temperatura óptima para el desarrollo de las actividades se detienen cuando se alcanza los 50°C a temperaturas de alrededor de 15°C, las bacterias productoras de metano cesan su actividad.

En la siguiente figura se muestra el grafico con los datos obtenidos de temperatura de los distintos pozos, obtenida en el mes de Mayo del 2016.

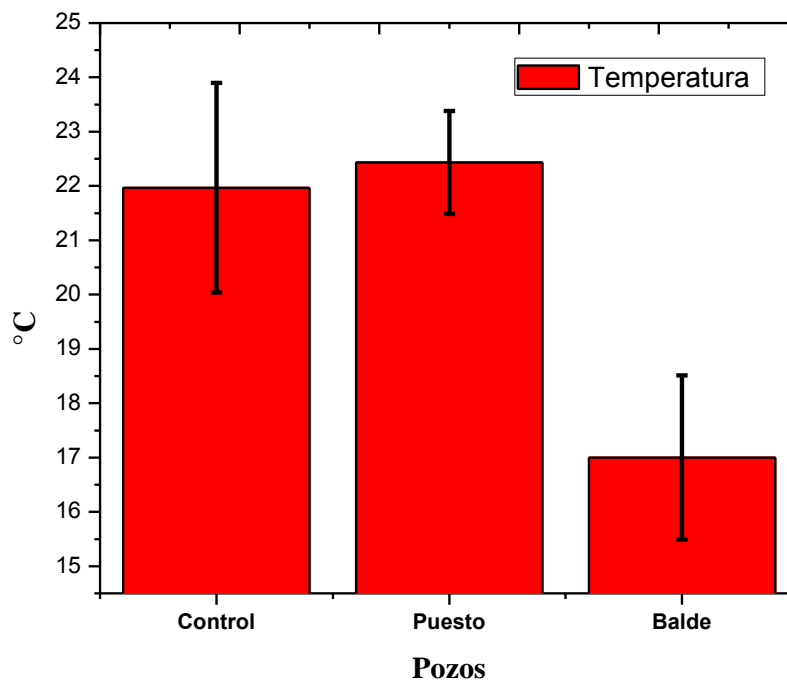


Figura 33. Gráfico de barra de temperatura, de los pozos controles, puestos y baldes

3.5. Comparación de resultados

A continuación se muestra una tabla con todos los datos obtenidos de los distintos ensayos realizados a las aguas de los pozos de los puestos: Las Hormigas, Las Delicias y La Primavera; separados en tres columnas principales de los pozos: Baldes, Piezómetros y Controles.

Tabla 4. Resultados obtenidos en los ensayos de los distintos pozos

	Baldes			Piezómetros			Controles		
	HB	DB	PB	HP	DP	PP	CA	AR	CH
ORP (mV)	506,1	472,4	539,7	555,8	509,6	602	414,7	514,5	514,8
Conductividad (mS/cm)	5,928	7,904	13,250	4,674	8,056	7,481	4,622	4,643	6,67
OD (mg/L)	2,51	2,62	3,51	1,94	2,71	3,1	2,65	2,01	3,15
pH	7,38	7,74	7,72	7,45	7,38	7,39	7,48	7,74	7,72
Temperatura (°C)	17,2	18,4	15,4	23,4	22,4	21,5	23,5	22,6	19,8
NO ₃ ⁻ (mg/L)	14,3	40,7	9,2	5,1	21,7	5,6	5,1	5	6,1
DBO5 (mg/L)	3,25	0,6	2,05	0,97	0,57	1,07	1,24	0,59	0,82
DBO5 c/IN (mg/L)	2,94	0,54	1,7	0,67	0,71	0,55	1,21	0,45	1,11
As(III) (ppb)	0	0	0	0	19,036	18,84	83,11	17,11	0
As(V) (ppb)	161,746	141,61	151,185	117,732	110,309	201,488	25,748	170,723	113,226
As total (ppb)	161,746	141,61	151,185	117,732	129,345	220,328	108,858	187,833	113,226



CAPÍTULO IV

4. Conclusiones

Este capítulo resume los principales resultados obtenidos en este estudio, considerando en particular los objetivos e hipótesis de trabajo considerados (ver 1.9 y 1.10)

✚ La especiación de arsénico mediante la técnica HPLC-HG-AFS, permitió la determinación de As(III) y As(V), en el cual en todos los pozos se encontró As(V) por encima de lo establecido por la OMS, pero el As(III) se encontró en dos pozos piezómetros y en dos pozos controles y en ninguno de los pozos baldes, donde se esperaba encontrar mayor cantidad debido a la actividad humana de la ganadería de subsistencia, al esperarse mayor ingreso de materia orgánica ocasionando condiciones más reductoras.

✚ La materia orgánica se determinó por medio de la DBO con el método Winkler, con dos variantes una con inhibidor nitrificante y el otro sin inhibidor nitrificante, del cual se obtuvo una mayor cantidad de materia orgánica en los pozos baldes, en una cantidad mayor al doble comparada con los pozos control y puestos, también una mayor DBO sin inhibidor de la nitrificación, comparada con los ensayos que contenían inhibidor. Se observó esta mayor diferencia en los pozos baldes y puestos, no tanto así en los de control, indicando que hay organismos nitrificantes debido tal vez a la mayor actividad ganadera en la zona; por otro lado en ningún pozo se encontró una contaminación orgánica alta, es por ello que tal vez no se encontró un medio lo suficientemente reductor para facilitar la reducción de AsO_4^{-3} a AsO_3^{-3} .

✚ La determinación de nitratos se realizó por espectrofotometría, obteniendo una mayor cantidad de nitratos en los pozos baldes, luego en los piezómetro y en menor cantidad en los controles, debido a la mayor lixiviación y transporte vertical de nitratos, por la remoción de vegetación y acumulación de guanos en los puestos. Es mayor en los pozos baldes debido a la mayor exposición que tiene la entrada al transporte eólico e hídrico de MO.

✚ Cuando se realizó la recolección de las muestras de aguas se realizaron mediciones in situ de parámetros fisicoquímicos, como la temperatura que se obtuvieron datos alrededor de los 22,5°C en los pozos controles y piezómetros, altos comparados con los 17°C en los pozos baldes. Esto es debido a que los pozos baldes, al tener una mayor abertura y estar permanentemente destapados permiten la mayor circulación del aire y el intercambio de calor con el medio, en el mes de muestreo de Junio enfriaría el agua.

Otro parámetro fue el del pH en el cual se obtuvieron mediciones entre los 7,4 a los 7,65 en promedio, estando las aguas moderadamente en medio básicos y en condiciones normales permitidas.

El OD medido estuvo entre 2,6 a 2,9 en promedio, en mayor concentración en los pozos baldes tal vez debido a la mayor circulación de aire, al contrario de lo que se esperaba, al tener en cuenta que una mayor cantidad de microorganismos por el mayor ingreso de materia orgánica habría un menor cantidad de OD al ser consumido por los microorganismos.

El potencial óxido reducción (ORP), fue menor en los pozos baldes, pero según la figura 5, entre el potencial redox obtenido y el pH medido, el medio predominante es el oxidativo, no llegando ser suficiente bajo el ORP para que hubiese prevalencia de medio reductor.

Implicancias:

En base a los resultados encontrados, se infiere que la presencia de As(III) no está siendo afectada por el uso del suelo (ganadería extensiva), contrario a la hipótesis planteada. A pesar de encontrarse evidencia del transporte de nitrato desde la superficie al agua subterránea en los puestos ganaderos, y una tendencia de mayor concentración de materia orgánica en los pozos balde, las condiciones de óxido reducción y pH favorecen la estabilidad y dominancia del As(V).

Sin embargo, se encontró As(III) que puede deberse a otros factores, ajenos a la actividad humana de la zona. De esta forma, los resultados coinciden con el modelo hidrogeológico de Gómez et al (2014), que sugiere la existencia de flujos verticales ascendentes, que transportarían As(III) desde acuíferos profundos, donde las condiciones de óxido reducción permitieron la formación de esta especie química, la cual persiste en el acuífero, afectando la calidad para consumo humano.



CAPÍTULO V

5. Bibliografía

- [1] Meglioli, P., Aranibar, J., Villagra, P., Alvarez, J., Jobbágy E.. Livestock stations as foci of groundwater recharge and nitrate leaching in a sandy desert of the Central Monte, Argentina. *Ecohydrol.* 7 2014, 600-611.
- [2] Gomez, M., Aranibar, J., Wuilloud, R., Rubio, C., Martinez, D., Soria, D., Monasterio, R., Villagra, P., Goirán. S.. Hydrogeology and hidrogeochemical modeling in phreatic aquifer of NE Mendoza, Argentina. *Journal of Iberian Geology* 40 (3) 2014, 521-538.
- [3] Emsley, J.. *Natures Building Blocks: An A-Z Guide to the Elements*, Oxford. 2001.
- [4] Castillo, M.. *La ciencia de los filósofos* 1996, 1, 91.
- [5] WHO Arsenic Compounds, *Environmental Health Criteria* 224, 2nd ed., World Health Organization, 2001, Geneva.
- [6] Collourn, P., Alloway, B., Thornton, I.. *Sci. Total Environ*, 1975, 4, 359.
- [7] Davidson, C., Goold, W., Mathison, T., Wiersma, G., Brown, K., Reilly, M., *Environ. Sci. Technol.*, 1985, 19, 27
- [8] Smedley, P., Kinniburgh, D., Huq, I., Zhen-Dong, L., Nicolli, H., Chappell, W., Albernathy, C., Calderon, R.. *Arsenic Exposure and Health Effects IV*, Elsevier Science, 2001, 9.
- [9] Mandal, B., Suzuki, K.. *Talanta*, 2004, 58, 201.
- [10] Chen, M., Ma, L., Hoogeweg, C., Harris, W.. *Environ. Forensics*, 2001, 2, 117.
- [11] Tseng, W., Chu, H., How, S., Fong, J., Lin, C., Yeh, S., *Natl. J. Cancer Inst.*, 1968, 40, 453.
- [12] Lillo, J.. *Peligros geoquímicos: Arsénico de origen natural en las aguas*. Grupo de Estudios de Minería y Medio Ambiente (Textos y cursos on-line), 2002.
- [13] Chatterjee, A., Das, D., Mandal, B., Chowdhury, T., Samanta, G., Chakraborti, D.. *Analyst*, 1995, 120, 643.
- [14] Chen, S., Dzenk, S., Yang, M., Chiu, K., Shieh, G., Wai, C.. *Environ. Sci. Technol.*, 1994, 28, 877.
- [15] Smedley, P., Nicolli, N., Macdonald, D., Barros, A., Tullio, J.. *Applied Geochemistry*, 2002, 17, 259.
- [16] Nicolli, H., Suriano, J., Peral, M., Ferpozzi, L., Baleani, O.. *Environ. Geol. Water Sci.*, 1989, 14, 3.
- [17] Smedley, P., Kinniburgh, D., Macdonald, J., Nicolli, H., Barros, A., Tullio, J., Pearce, J., Alonso, M.. *Applied Geochemistry*, 2005, 20, 989.
- [18] Bundschuh, J., Pérez Carrera, A., Litter, M.. *Distribución del arsénico en la región Ibérica e Iberoamericana*, CYTED, Buenos Aires, Argentina, 2008.

- [19] Grinspan, D.. Hidroarsenicismo crónico regional endémico (HACRE). Las manifestaciones de la intoxicación arsenical por el agua de consumo. 1985. *Med. Cut. I.L.A.* Vol. XIII: 85-109.
- [20] Tello, E.. 1981. Las manifestaciones del Hidroarsenicismo crónico regional endémico argentino (HACREA). *Arch Argent Dermatol.* 2001, 27-40.
- [21] Mandal, B., Ogra, Y., Suzuki, K.. *Chem. Res. Toxicol.*, 2001, 14, 371.
- [22] Le, X., Lu, X., Ma, M., Cullen, W., Aposhian, H., Zeng, B.. *Anal. Chem*, 2000, 72, 5172.
- [23] Belton, J., Benson, N., Hanna, M., Taylor, R.. *Environ. Sci. Health*, 1985, 20A, 37.
- [24] United Nations Synthesis Report on Arsenic in Drinking Water, 2001.
- [25] Maeda, S.. J.O. Nriagu (Ed.), *Arsenic in the Environment. Part I: Cycling and Characterization*, John Wiley and Sons, Inc, New York, 1994, 155.
- [26] Beaudoin, A.. *Teratology* (1974) 10, 153.
- [27] Grandjean, P., Weihe, P., Needham, L., Burse, V., Patterson, D., Sampson, E., Jorgensen, P., Vather, M., *Environ. Res.*, 1995, 71, 29.
- [28] National Research Council, *Arsenic in Drinking Water*, National Academy Press, Washington, 1999.
- [29] Saha, K., Chappell, W., Abernathy, C., Calderon, R.. *Arsenic Exposure and Health Effects*, Elsevier Science, Ámsterdam, Lausanne, New Cork, Oxford, Tokio, 2001, 387.
- [30] Código Alimentario Argentino. Capítulo XII. Modificación 2007.
- [31] WHO. *Guidelines for drinking water quality. Volume 1: Recommendations*, 2nd. Ed. WHO, Geneva. 1993.
- [32] Gong, Z., Lu, X., Ma, M., Watt, C., Le, X., *Talanta*, 2002, 58, 77.
- [33] Kumaresan, M., Riyazuddin, P., *Current Science*, 2001, 80/7, 837.
- [34] Brookins, D.. Eh-pH diagrams for geochemistry. En: C.R. (ed): *Arsenic exposure and health. Science and Technology Letters*. Springer-Verlag, Berlín, Alemania, 1988, 91–100.
- [35] Yan, X., Kerrich, R., Hendry, M.. Distribution of arsenic(III), arsenic(V) and total inorganic arsenic in pore-waters from a thick till and clay-rich aquitard sequence, Saskatchewan, Canada. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, 2000, 2637–2648.
- [36] Das A., de la Guardia M., Cervera M.. Literature survey of on-line elemental speciation in aqueous solutions. *Talanta* 55, 2001, 1–28.
- [37] Walker, M., Seiler, R., Meinert, M.. *Sci. Total Environm.*, 2008, 389, 245.
- [38] Westerhoff, P., Benn, Y., Chen, A., Wang, A., Cumming, L.. EPA/600/R-08/051, 2008, U.S. EPA, Cincinnati.

- [39] Wang, J., Tomlinson, M., Caruso, J.. Extraction of Trace Elements in Coal Fly Ash and Subsequent Speciation by High- Performance Liquid Chromatography with ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.* 10, 1995, 601-607.
- [40] Cornelis, R., Crews, H., Caruso, J., Heumann. K.. *Handbook of Elemental Speciation. Techniques and Methodologies.* John Willey and Sons Ltd., Chichester, Reino Unido, 2003.
- [41] Nakara, T.. Applications of hydride generation techniques in atoms absorption, atomic fluorescence and plasma atomic emission spectroscopy. *Pure & Appl. Chem*, 1983, vol. 6, n^o3, pp. 163-223
- [42] Gutzeit, M.. *Pharm. Ztg.*, 1879, 24, 263.
- [43] Howard, A.. *Journal of analytical atomic spectrometry.* 1997, 12, 267.
- [44] Dedina, J., Tsalev, D.. *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, 1995, Wiley, New York.
- [45] Howard, A., Salou, C.. *Anal. Chim. Acta*, 1996, 333, 89.
- [46] Howard, A., Arbab-Zavar, M.. *Analyst*, 1981, 106, 213.
- [47] Sheppard, B., Shen, W., Caruso, J., Heitkemper, D., Fricke, F.. *Anal. At. Spectrom.* 1990, 5, 431.
- [48] Wei, X., Brockhoff-Schwegel, C., Creed, J.. *Anal. At. Spectrom.*, 2001, 16,12.
- [49] Olson, L., Vela, N., Caruso, J.. *Spectrochimica Acta Part B*, 1995, 50, 355.
- [50] Echarri,L.. *Ciencia de la tierra y del medio ambiente. Teide.* 1998.
- [51] Jesús, F.. *Métodos analíticos para aguas residuales. Proyecto Life.* 2005
- [52] Sawyer, C., Mc Carty, P.. *Chemistry for Environmental Engineering.* Mc Graw Hill, New York, 2006
- [53] Rivas Mijares, G.. *Tratamiento del agua residual, Tipografía Vargas S.A.,*1967.
- [54] Stones, T.. M.Sc., Ph.D., C.Chem. F.R.S.C., A resumé of the kinetics of the BOD test, *Water Pollution Control J.*, Vol. 80 No. 4, 512-521, (1981).
- [55] American Public Health Association, *Métodos Estándar para el examen de aguas y aguas de desecho, incluyendo sedimentos bentales y lodos"*, Undécima edición, Edit. Interamericana S.A., 1960.
- [56] Nordberg, G., Fowler, B., Nordberg, M.. *Handbook on the Toxicology of Metals: Fourth Edition*, 2014.
- [57] Cornelis, R., Caruso, J., Crews, H., Heumann, K.. *Handbook of Elemental Speciation II - Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*, 2005.
- [58] Melucci, D., Locatelli, M. , Locatelli, C.. *Food Chem. Toxicol.*, 62 (2013) 901.
- [59] Locatelli, C., Melucci, D., Locatelli, M.. *Curr. Bioact. Compd.*, 10 (2014) 181.

- [60] Lindermann, T., Prange, A., Dannecker, W., Neidhart, B.. Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC/ICP-MS. *Fresenius J Anal Chem* (2000) 368 :214–220.
- [61] Rottmann, L., Heumann, K.. Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC/ICP-MS for the accurate determination of elemental species. *Fresenius J Anal Chem* (1994) 350:221–227.
- [62] Segura, M., Muñoz, J., Madrid, Y., Cámara, C.. Stability study of As(III), As(V), MMA and DMA by anion exchange chromatography and HG-AFS in wastewater samples. *Anal Bioanal Chem* (2002) 374 :513–519.
- [63] Sadee, B., Foulkes, M., Hill, J. *Anal. At. Spectrom.*, 30 (2015) 102.
- [64] Moreira, C., Duarte, F., Lebherz, J., Pozebon, D., Flores, E., Dressler, V.. *Food Chem.*, 126 (2011) 1406.
- [65] Karadjova, I., Lampugnani, L., Onor, M., D'Ulivo, A., Tsalev, D.. *Spectrochim. Acta B*, 60 (2005) 816.
- [66] E. Moreno, E., Cámara, C. , Corns, W., Bryce, D., Stockwell, P.. Arsenic speciation in beverages by direct injection-ion chromatography- hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Automated Methods & Management in Chemistry*, Vol. 22, No. 2, (2000) pp. 33–39.
- [67] Huang, J., Hu, K., Ilgen, J., Ilgen, G., Alewell, C.. *Processing and Impact on Active Components in Food*, 2015, p. 509.
- [68] Gómez Ariza, J., Sánchez Rodas, D., Giráldez, I., Morales, E.. A comparison between ICP-MS and AFS detection for arsenic speciation in environmental samples. *Talanta* 51 (2000) 257–268.

Anexo de imágenes

Imágenes: a) Ubicación de un puesto ganadero en el valle inter-médano; b) Reserva Telteca, bosques de algarrobos sin disturbar acoplados al acuífero freático; c) Obtención de muestras de agua subterránea en el pozo piezómetro de Las Hormigas; d) Obtención de muestras de agua subterránea en el pozo piezómetro de Las Delicias; e) Obtención de muestras de agua subterránea en el pozo control Chechu.



Imágenes: f) pozo balde La Primavera para la utilización del agua subterránea; g) pozo balde Las Delicias para la utilización del agua subterránea



Imágenes: h) Botellas para DBO con agua de muestras de los distintos pozos muestreados; i) Calibración del equipo Thermo Scientific Orion Star A329; j) Titulación por el método Winkler de las muestras de agua de los pozos después de la incubación a 20°C durante 5 días; k) Puesta a punto y calibración del equipo HPLC-HG-AFS.