

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA



Desarrollo y aplicabilidad de metodologías analíticas  
para la evaluación de contaminantes ambientales de  
especial peligrosidad:

Hidrocarburos aromáticos policíclicos y mercurio

TESIS DOCTORAL

Elena Bernalte Morgado

Badajoz, 2013





Desarrollo y aplicabilidad de metodologías analíticas  
para la evaluación de contaminantes ambientales de  
especial peligrosidad:  
Hidrocarburos aromáticos policíclicos y mercurio

Memoria para optar al Grado de Doctor Internacional  
presentada por

Elena Bernalte Morgado

Los Directores del Trabajo

Dr. D. Eduardo Pinilla Gil

*Profesor Titular del Departamento de  
Química Analítica*

*Facultad de Ciencias*

*Universidad de Extremadura*

Dña. Carmen Marín Sánchez

*Profesora Titular del Departamento de  
Química Analítica*

*Facultad de Ciencias*

*Universidad de Extremadura*



*A mi madre*  
*A mis abuelos Irene y Álvaro*



## Justificación y Objeto del Trabajo





Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y el mercurio son contaminantes cuya presencia en el medioambiente es ubicua, es decir, están muy presentes en el suelo, el aire y el agua. Se consideran a nivel mundial como especies contaminantes tóxicas de especial peligrosidad cuya presencia, por encima de ciertos umbrales, implica un riesgo implícito para la salud humana y los ecosistemas. De ahí la necesidad de llevar a cabo un control eficiente de los niveles de estos contaminantes en el medioambiente.

Por tanto, todas aquellas actividades de investigación orientadas hacia el desarrollo de métodos analíticos cada vez más simples, baratos, rápidos y fiables, como las desarrolladas en esta memoria, resultan de gran interés y, por otro lado, adquieren especial relevancia en el campo de la prevención, vigilancia y control medioambiental.

En este marco, los objetivos específicos planteados para el desarrollo del presente trabajo, pueden resumirse en los siguientes puntos:

1. Desarrollar y validar metodologías de pretratamiento del material particulado atmosférico en suspensión para la extracción y preconcentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos, y optimizar su determinación mediante GC-MS/MS.
2. Desarrollar metodologías electroanalíticas para la monitorización de Hg(II) en diversas matrices ambientales, basadas en el empleo de electrodos serigrafados o impresos de oro y de carbono modificados con nanopartículas de oro.
3. Investigar específicamente el empleo de metodologías de extracción de Hg(II) presente en matrices ambientales sólidas, mediante la aplicación de la energía de ultrasonidos (sonda y baño).
4. Investigar el acoplamiento de las metodologías desarrolladas en el punto 3 con la detección voltamperométrica y los sensores descritos en el punto 2 y con ICP-MS, y su aplicabilidad para la monitorización ambiental de Hg(II).
5. Aplicar técnicas quimiométricas, como herramienta útil para el desarrollo rápido y eficiente de métodos analíticos, y técnicas estadísticas, para la evaluación de las implicaciones medioambientales de los contaminantes estudiados, sus correlaciones con otros parámetros de importancia ambiental, su distribución espacial y su evolución temporal.
6. Aplicar la técnica de impedancia electroquímica para la caracterización superficial de los electrodos impresos mencionados en el punto 2.



## Resumen

---



Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y el mercurio son contaminantes ambientales con un especial interés analítico porque están presentes en el medioambiente a muy bajas concentraciones, sus propiedades toxicológicas los convierten en sustancias de especial peligrosidad para la salud humana y el medio ambiente y, en consecuencia, son especies prioritarias en el control y vigilancia medioambiental a nivel mundial, incluidas en diversos acuerdos internacionales y normas legales de obligado cumplimiento. De modo que las líneas recientes de investigación en Química Analítica, dirigida hacia el desarrollo y aplicación de métodos analíticos sensibles, rápidos, simples y eficaces, resultan de gran interés en el campo medioambiental por su utilidad para la monitorización de dichos contaminantes.

En la primera parte de esta Tesis, *Capítulo 3.1.*, se describe la optimización y validación de una metodología analítica basada en la extracción a reflujo y detección GC-MS/MS para la evaluación de los perfiles de PAH en muestras de aerosoles atmosféricos de áreas urbanas y rurales de Extremadura con un bajo índice de contaminación. Se han utilizado diversas herramientas estadísticas para el estudio de las implicaciones medioambientales de los PAH en el aire ambiente, en relación a su concentración, fuentes de emisión, correlaciones con otros contaminantes, distribución espacial y evolución temporal.

En la segunda parte, *Capítulos 3.2. al 3.5.*, se profundiza en el desarrollo y aplicación de metodologías electroanalíticas, basadas en el empleo de electrodos impresos de oro y carbono modificados con nanopartículas de oro, para la monitorización de Hg(II) en diferentes matrices medioambientales (agua de lluvia, agua residual y polvo atmosférico de interiores). En cada capítulo, se describe detalladamente la optimización de las variables instrumentales involucradas en el desarrollo de dichos métodos. Específicamente, en el *Capítulo 3.2.*, se describe también la utilización de un nuevo diseño de celda electroquímica adaptada para el trabajo con este tipo de electrodos y en los *Capítulos 3.4. y 3.5.*, se demuestra, además, la eficacia de la energía de ultrasonidos (sonda y baño) para la extracción de Hg(II) presente en muestras ambientales sólidas y el ventajoso acoplamiento de estos pretratamientos con las técnicas voltamperométricas para la detección de este analito. En el *Capítulo 3.5.*, se describe la optimización de un diseño de experimentos como herramienta útil para la optimización de las variables que influyen en la extracción de Hg(II) mediante la aplicación de la sonda de ultrasonidos.

En el *Capítulo 3.6.*, se describe la aplicación de la metodología de extracción con sonda de ultrasonidos, desarrollada en el capítulo anterior de esta Tesis, y su acoplamiento con la técnica ICP-MS, para la monitorización de Hg(II) y la evaluación de dicha contaminación en suelos afectados por emisiones industriales en Chile, durante el periodo comprendido entre 2007 y 2011. Se describe, asimismo, el empleo de distintas herramientas estadísticas y quimiométricas para llevar a cabo el estudio ambiental.



## Resumo

---





Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) e o mercúrio são poluentes ambientais com um interesse analítico especial porque estão presentes no ambiente em concentrações muito baixas e as suas propriedades toxicológicas torna-os substâncias particularmente perigosas para a saúde e o ambiente. São, portanto, espécies prioritárias na vigilância ambiental em todo o mundo, conforme estabelecem vários acordos e leis internacionais. Assim, as linhas recentes de investigação em Química Analítica orientam-se para o desenvolvimento e aplicação de métodos analíticos sensíveis, rápidos, simples e eficientes, sendo de um grande interesse na área ambiental pela sua utilidade no control desses poluentes.

Na primeira parte desta Tese, *Capítulo 3.1.*, descreve-se a otimização e validação de um método analítico baseado na extração a refluxo e na deteção GC-MS/MS para avaliar o perfil de PAH em amostras de aerossóis atmosféricos de Extremadura, caracterizadas pelo baixo nível de poluição. Usaram-se várias ferramentas estatísticas para o estudo das implicações ambientais dos PAH no ar, em relação a sua concentração, as fontes de emissão, as suas correlações com outros poluentes, a sua distribuição espacial e a evolução temporal.

Na segunda parte, *Capítulos 3.2. ao 3.5.*, descreve-se pormenorizadamente o desenvolvimento e aplicação de métodos eletroanalíticos, com base na utilização dos elétrodos impressos (screen-printed) de ouro e de carbono modificados com nanopartículas de ouro para o análise do Hg (II) em diferentes amostras ambientais (água da chuva, água residual e pó atmosférico de ambientes interiores). Cada um dos capítulos descreve em detalhe a otimização das variáveis instrumentais envolvidas nos métodos voltamétricos. Nomeadamente, no *Capítulo 3.2.*, descreve-se também a utilização de uma nova célula eletroquímica recentemente concebida e adaptada para funcionar com este tipo de elétrodos. Nos *Capítulos 3.4. e 3.5.*, demonstra-se a eficácia da energia de ultrassom (banho e sonda ultrassónicas) para a extração do Hg (II) presente em amostras ambientais sólidas, além do vantajoso acoplamento destes pretratamentos com as técnicas voltamétricas para a deteção deste analito. No *Capítulo 3.5.*, descreve-se a otimização de um projeto de experimentos (design of experiments) e a sua aplicação na otimização das variáveis que influenciam a extração do Hg (II) com sonda de ultrassom.

No *Capítulo 3.6.*, descreve-se a aplicação da metodologia de extração com sonda ultrassónica, desenvolvida no capítulo anterior desta Tese, e o seu acoplamento com a técnica ICP-MS para a avaliação da poluição pelo Hg(II) em solos afetados por emissões industriais no Chile, entre 2007 e 2011. Além disso, descreve-se a utilização de diferentes ferramentas estatísticas e quimiométricas para cometer o estudo ambiental.

Finalmente, o *Capítulo 3.7.*, faz uma abordagem do estudo de caracterização superficial dos elétrodos impressos de ouro e de carbono modificados com nanopartículas de ouro, utilizados no desenvolvimento deste relatório, utilizando a técnica da espectroscopia de impedância eletroquímica.



## Abstract

---



Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and mercury are environmental pollutants with a special analytical interest because they are present in the environment at very low concentrations, and their toxicological properties become particularly dangerous to human health and ecosystem. Therefore, they are priority species in the worldwide control and environmental monitoring, as established in various international agreements and enforceable laws. So, recent research lines in Analytical Chemistry, lead to the development and application of sensitive, rapid, simple, and efficient analytical methods, are of great interest in the environmental field for their utility in the monitorization of these pollutants.

In the first part of this Thesis, *Chapter 3.1.*, was described the optimization and validation of an analytical methodology based on the reflux extraction and detection by GC-MS/MS for evaluating the PAH profiles in atmospheric aerosol samples from low polluted urban and rural areas located in Extremadura. Several statistical tools were used for studying the environmental implications of PAH in ambient air in relation to its concentration, emission sources, correlation with other pollutants, spatial distribution, and temporal evolution.

In the second part, *Chapters 3.2. to 3.5.*, was carried out the development and application of electroanalytical methods, based on the use of screen-printed gold electrodes and gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrodes for Hg (II) monitoring in different environmental matrices (rainwater, wastewater, and indoor dust). Each chapter describes in detail the optimization of the instrumental variables involved in the development of the analytical methods. Specifically, in the *Chapter 3.2.*, the use of a new design of electrochemical cell, adapted to work with this screen-printed electrodes, was also described, and in the *Chapters 3.4. and 3.5.*, the effectiveness of ultrasonic energy (bath and probe) for the extraction of Hg (II) from solid environmental samples and the advantageous coupling of these pretreatments with voltammetric techniques for detection of this analyte, were also demonstrated. In *Chapter 3.5.*, were described the optimization of a design of experiments as useful tool for the optimization of the variables that influence the extraction of Hg (II) by using an ultrasonic probe.

In the *Chapter 3.6.*, was described the application of the methodology of ultrasonic extraction with a probe developed before and its coupling with ICP-MS for the assessment of mercury pollution in soils affected by industrial emissions in Chile, from 2007 to 2011. It was also described the application of different statistical and chemometric tools to conduct the environmental study.

Finally, in the *Chapter 3.7.*, the characterization of screen-printed gold electrodes and gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrodes was performed by using the electrochemical impedance spectroscopy.



## Capítulo 1. Introducción

---





En este capítulo se presentan las principales características químicas y ambientales de los analitos sobre los que se ha trabajado en la parte experimental: los hidrocarburos aromáticos policíclicos y el mercurio. Se comentan también los principales antecedentes analíticos relativos a la determinación de estas sustancias en matrices ambientales.

## **1.1. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS**

### **1.1.1. GENERALIDADES**

El término hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) engloba a un amplio conjunto de compuestos orgánicos cuya estructura molecular contiene dos o más anillos de benceno fusionados. Tienen una solubilidad en agua relativamente baja, son altamente lipofílicos y poco biodegradables; siendo, por tanto, compuestos con una elevada persistencia en el medioambiente y considerados como altamente tóxicos. (WHO, 2000; Villar et al., 2004).

Debido a sus bajas presiones de vapor, algunos PAH están presentes en el aire a temperatura ambiente tanto en fase gaseosa como adsorbidos sobre las partículas en suspensión (fase aerosol). Los más volátiles se encuentran casi exclusivamente en fase gaseosa, mientras que los PAH de 3 ó 4 anillos (presiones de vapor entre  $10^{-6}$  y  $10^{-8}$  mmHg) pueden tener fracciones en ambas fases. Los más pesados y de mayor potencial carcinógeno (5 y 6 anillos con presiones de vapor de  $10^{-11}$  mmHg) se encuentran predominantemente asociados a las partículas atmosféricas en suspensión (Yusá et al., 2006; Ravindra et al., 2008).

Los PAH unidos al material particulado pueden sufrir fotodescomposición cuando se exponen a la luz ultravioleta procedente de la radiación solar. En la atmósfera, pueden reaccionar con otros contaminantes como ozono, óxidos de nitrógeno y dióxido de azufre, dando lugar a dionas, nitro y dinitro-PAH y ácidos sulfónicos, respectivamente (WHO, 2000).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos están ampliamente distribuidos en la atmósfera y son uno de los primeros contaminantes identificados como carcinógenos. A medida que aumenta su peso molecular, su poder carcinógeno también aumenta. De hecho, el benzo[a]pireno, que tiene una estructura formada por 5 anillos de benceno fusionados, fue el primero de ellos al cual se le atribuyeron propiedades cancerígenas para el ser humano (Ravindra et al., 2008).

Además, los PAH asociados a las partículas en suspensión están considerados como uno de los factores de mayor riesgo para la salud humana debido a que las partículas pueden ser inhaladas e incorporadas directamente al sistema respiratorio. Por eso, en los últimos tiempos se ha prestado especial atención a los estudios realizados en todo el mundo sobre el comportamiento de estos compuestos (especialmente asociados a las partículas) en el aire ambiente (Wai Fon et al., 2007).

La Agencia Estadounidense para las Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades (ATSDR) y la Agencia Estadounidense de Protección Ambiental (EPA) han considerado como prioritarios, en función de su perfil toxicológico, los dieciséis PAH que se presentan en la Tabla 1.1 (ATSDR, 1995). Las razones fundamentales de esta elección son las siguientes:

1. Son los compuestos de los que existe mayor información.
2. Se sospecha que son los más perjudiciales para la salud.
3. Existe un mayor riesgo de exposición.
4. De todos los PAH analizados, son los que están presentes en mayor concentración.

**Tabla 1.1.** 16 PAH prioritarios según US-EPA y ATSDR

PAH	
Naftaleno (NAP)	Benzo[a]antraceno (BaA)
Acenaftileno (ACY)	Criseno (CHR)
Acenafteno (ACE)	Benzo[b]fluoranteno (BbF)
Fluoreno (FLO)	Benzo[k]fluoranteno (BkF)
Fenantreno (PHE)	Benzo[a]pireno (BaP)
Antraceno (ANT)	Indeno[1,2,3-cd]pireno (IcdP)
Fluoranteno (FLA)	Dibenzo[a,h]antraceno (DBA)
Pireno (PYR)	Benzo[g,h,i]perileno (BghiP)

Los términos que figuran entre paréntesis en la Tabla 1.1 corresponden a las abreviaturas utilizadas en esta memoria para cada compuesto y en la Figura 1.1 se han representado sus estructuras moleculares.

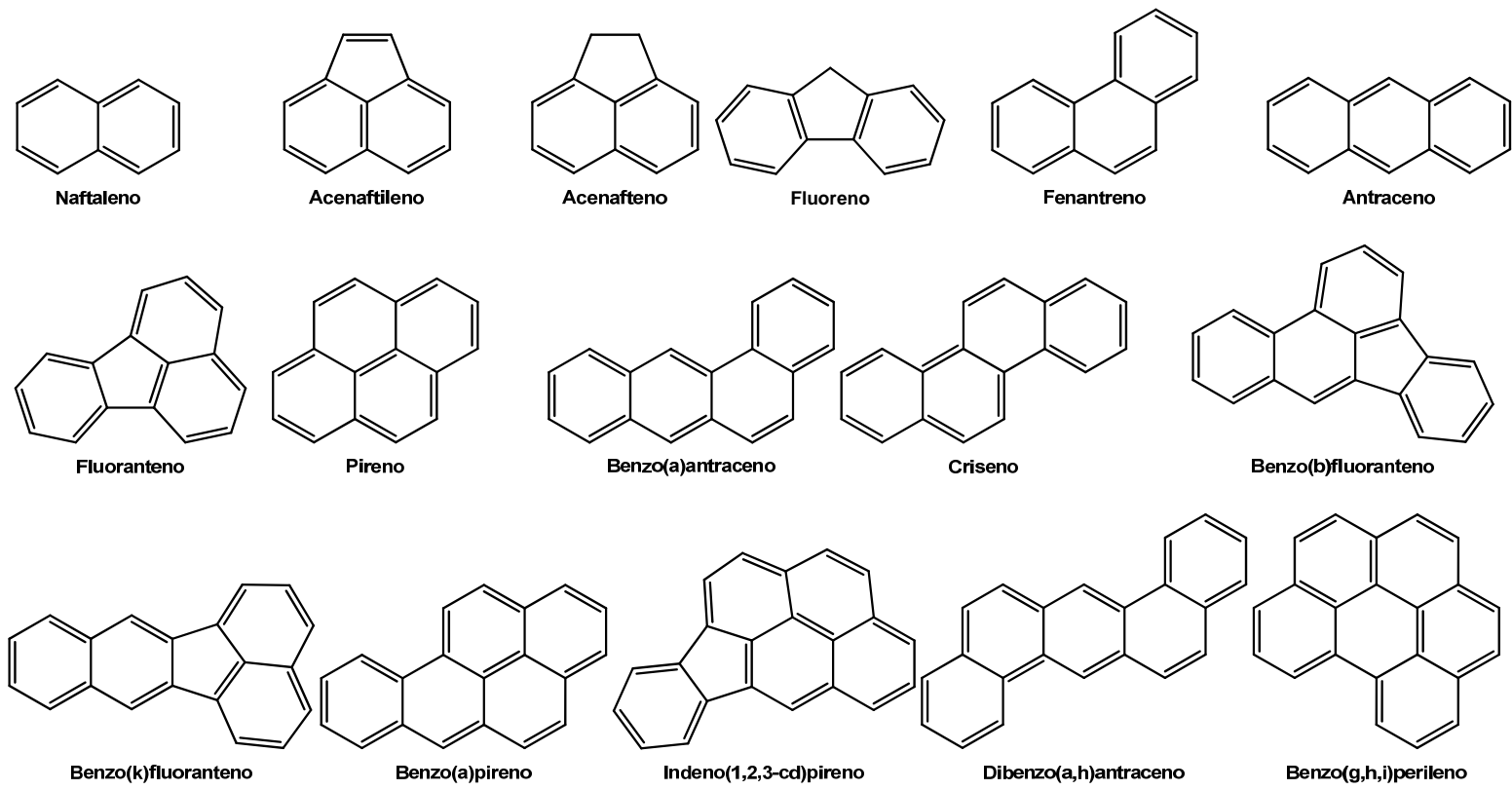


Figura 1.1. Estructuras moleculares de los PAH

### **1.1.2. FUENTES DE EMISIÓN**

Los PAH son la forma más estable de los hidrocarburos que tienen una baja relación hidrógeno/carbono y normalmente se encuentran como mezclas complejas en lugar de cómo compuestos individuales (Ravindra et al., 2008). Su origen es fundamentalmente antropogénico y se forman principalmente como resultado de procesos de pirólisis; especialmente por la combustión incompleta de materiales orgánicos durante las actividades industriales y humanas tales como el procesado del crudo y del carbón, la combustión del gas natural, la incineración de residuos, el tráfico rodado y el consumo de tabaco. También se originan en procesos naturales como pueden ser las erupciones volcánicas y los incendios forestales, aunque su contribución es insignificante (WHO, 2000).

La asignación de fuentes de emisión de PAH a la atmósfera es un tema que continúa en discusión. En la bibliografía, son numerosos los autores que han descrito la influencia que las actividades naturales y antropogénicas tienen en la concentración de los PAH en el aire ambiente. Ravindra et al., en una revisión publicada en 2008, proponen la siguiente clasificación:

#### 1. Fuentes de emisión de origen antropogénico:

- Emisiones domésticas (quema de leña, gasolina, gas, residuos, tabaco, barbacoas, etc.)
- Emisiones debidas al tráfico (rodado, aéreo, tren, máquinas)
- Emisiones industriales (producción de aluminio, cementera, siderúrgica, incineración de residuos, petroquímica etc.)
- Emisiones agrícolas (quema de biomasa)

#### 2. Fuentes de emisión de origen natural:

- Origen terrestre (incendios forestales originados de forma natural, erupciones volcánicas, biosíntesis de microorganismos y plantas)
- Origen cósmico (síntesis a altas temperaturas)

### **1.1.3. EFECTOS SOBRE LA SALUD**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos pueden ser perjudiciales para la salud en determinadas circunstancias. Algunos PAH, tales como benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno, son los causantes de tumores en animales de laboratorio cuando éstos han estado expuestos a su presencia en el aire, en la comida o cuando han estado largos períodos de tiempo en contacto con la piel. Asimismo, algunos estudios han demostrado que la misma exposición en los humanos (respiración y contacto con la piel) a mezclas de PAH y otros compuestos, también pueden originar enfermedades como el cáncer (Menzie et al., 1992; ATSDR, 1995; WHO, 2000; Ravindra et al., 2001). El riesgo principal de estos compuestos es que al estar adsorbidos sobre las partículas, preferentemente en las de menor diámetro aerodinámi-

co (PM<sub>2,5</sub> y PM<sub>1</sub>), penetran fácilmente en el sistema respiratorio siendo causantes también de enfermedades pulmonares crónicas como el asma (Srogi, 2007; Cheng et al., 2007).

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado los dieciséis PAH prioritarios de la EPA en función de su poder carcinógeno según se muestra en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2.** Carácter carcinógeno de los PAH según la IARC

Cancerígenos para los seres humanos	BaA, BaP
Posibles cancerígenos para los seres humanos	BbF, BkF, IcdP
No clasificados por carácter carcinógeno	ANT, BghiP, CHR, FLO, FLA, PHE, PYR

Sin embargo, la clasificación que sugiere la EPA (Tabla 1.3) muestra algunas diferencias.

**Tabla 1.3.** Carácter carcinógeno de los PAH según la EPA

Probables carcinógenos humanos	BaA, BaP, BbF, BkF, CHR, DBA, IcdP
No clasificados por carácter carcinógeno	ACY, ANT, BghiP, FLA, FLO, PHE, PYR

No obstante, la mayor parte de la información disponible sobre los efectos en la salud de los PAH en los seres humanos se refiere a mezclas complejas y no a su actuación individual, como se ha comentado anteriormente (Ravindra et al., 2008).

Por lo tanto, no es posible evaluar la contribución de cualquiera de los PAH al carácter carcinógeno total de estas mezclas debido a la complejidad de las mismas y a la presencia de otras sustancias cancerígenas. La única forma de cuantificar la exposición total de los seres humanos a los PAH con potencial carcinógeno es utilizando el benzo[a]pireno como indicador o marcador del contenido de PAH totales en el aire ambiente, ya que es el hidrocarburo aromático policíclico más estudiado de todos los presentes en el aire y, por tanto, del que se conocen un mayor número de datos cuantitativos acerca de sus propiedades carcinógenas y mutagénicas (WHO, 2000; Position Paper, 2001; Lin et al., 2002; Gutiérrez-Dabán et al., 2005; Srogi, 2007; Ravindra et al., 2008).

Por eso, las leyes que regulan actualmente el contenido de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente, sólo contemplan la determinación del contenido de benzo[a]pireno.

#### 1.1.4. LEGISLACIÓN

La legislación vigente actualmente en relación a la determinación del contenido de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente está recogida en la directiva europea 2004/107/CE (directiva hija de la Directiva 96/62/CE), transpuesta a la legislación española por el Real Decreto 812/2007, de 22 de junio, sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente en relación con el arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Este Real Decreto utiliza como indicador del riesgo cancerígeno de los hidrocarburos aromáticos policíclicos al benzo[a]pireno y establece como valor objetivo una concentración de  $1 \text{ ng/m}^3$ , referida al contenido total en la fracción  $\text{PM}_{10}$  como promedio durante un año natural.

#### 1.1.5. ANTECEDENTES ANALÍTICOS SOBRE PAH EN EL MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

La determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el material atmosférico en suspensión es un problema analítico de gran complejidad debido a la heterogeneidad de la matriz, a la naturaleza química de los compuestos y a las bajas concentraciones en las que se encuentran.

La toma de muestras del material particulado atmosférico para la posterior determinación de estos analitos no presenta una especial dificultad. Se lleva a cabo mediante su retención en filtros (celulosa, vidrio, cuarzo o teflón) a través de los que se fuerza a pasar el aire mediante un sistema de bombeo. Se utilizan impactadores de cascada que se acoplan a los captadores de partículas para separarlas en función de su tamaño. Estos captadores pueden ser de alto o bajo volumen. No obstante, existen ciertas incertidumbres asociadas al muestreo debido a la influencia de algunos contaminantes ( $\text{O}_3$ ,  $\text{NO}_2$ ) en la descomposición de los analitos adsorbidos sobre las partículas (Brorström et al., 1983; Peltonen y Kuljukka, 1995; UNE 77250, 2001). Por eso, se pueden utilizar como alternativa captadores modificados en los que se incorpora una pieza cilíndrica o *denuder* cuya eficacia en la minimización de las pérdidas de analitos (en fase gaseosa y en fase particulada) está descrita en la bibliografía (Temime-Roussel et al., 2004; EN 15549, 2008).

Por las razones expuestas al inicio de este apartado, la gran mayoría de las metodologías de pretratamiento para la determinación de estos compuestos son, muy tediosas y requieren varias etapas de extracción y preconcentración previas al análisis (Liu et al., 2007).

El método más utilizado para la extracción de los PAH es la clásica extracción Soxhlet, empleando como disolventes diclorometano, acetonitrilo, benceno, tolueno, n-hexano, acetona, ciclohexano y/o mezclas de ellos. Es el método más utilizado porque posee una eficacia muy elevada, pero tiene dos inconvenientes importantes, que son el tiempo de extracción y la elevada cantidad de disolvente que se requiere (EPA, 1999; Cecinato et al., 2000; López-Cancio et al., 2002; UNE 77250, 2001; Gutiérrez-Dabán et al., 2005; Christensen et al., 2005; Ströher et al., 2007; Barrero y Cantón, 2007; Callén et al., 2008; EN 15548, 2008).

La extracción con ultrasonidos es otro de los métodos más utilizados. Es una técnica muy eficaz para la separación de los PAH que, a diferencia de la primera, consume poco tiempo y poca cantidad de disolvente (Lodovici et al., 2003; Borrás y Tortajada-Genaro, 2007; Ströher et al., 2007; Sharma et al., 2007; Lee et al., 2008; EN 15548, 2008). En la bibliografía se describen numerosas metodologías llevadas a cabo en baño de ultrasonidos, sin embargo, existe también alguna referencia actual en la que se emplea la sonda ultrasónica (ultrasonidos focalizado) para la separación de estos compuestos en otro tipo de matriz ambiental sólida como el suelo (EPA, 1996a; Capelo et al., 2005).

Es cada vez más habitual encontrar también en la bibliografía otros métodos de extracción de los PAH del material particulado atmosférico basados en el uso de microondas (MAE) (Piñeiro-Iglesias et al., 2000; Bruno et al., 2007; EPA, 2007; EN 15548, 2008; Castro et al., 2009). En base a esto, se han desarrollado diversas metodologías como la extracción dinámica asistida por microondas (DMAE) en la que se va añadiendo secuencialmente disolvente fresco sobre el recipiente de extracción, asegurando así que el proceso sea cuantitativo (Ericsson and Colmsjö, 2002), la extracción mediante el empleo de micro-ondas focalizado (FMAE) (Shu et al., 2003), la extracción con microondas a baja temperatura (Karthikeyan et al., 2006), todas ellas off-line, así como aplicaciones on-line de estas técnicas de pretratamiento para conseguir automatizar el proceso, reducir el tiempo de análisis y minimizar las posibles pérdidas de analito (Chen et al., 2008).

Por otra parte, se describen otras técnicas como extracción con agua subcrítica, extracción con fluidos supercríticos (como el CO<sub>2</sub>), extracción acelerada con disolventes (ASE) y extracción con disolventes a presión (PSE) que también están siendo aplicadas para la extracción de los PAH en muestras atmosféricas (Romero et al., 2002; Ravindra et al., 2006; Liu et al., 2007; EN 15549, 2008).

En cuanto a las técnicas de preconcentración, se recoge en la bibliografía la utilización de equipos Kuderna-Danish, la evaporación rotativa y la concentración bajo corriente de nitrógeno. Las dos primeras se aplican a volúmenes elevados de disolvente, mientras que la última se utiliza para concentrar volúmenes más pequeños. El riesgo de pérdida de analito en esta etapa es elevado, por lo que conviene emplear estas técnicas con mucha precaución (Chang et al., 2001; UNE 77250, 2001; Piñeiro-Iglesias et al., 2002; Gutiérrez-Dabán et al., 2005; Christensen et al., 2005; Liu et al., 2007, Borrás y Tortajada-Genaro, 2007; Ströher et al., 2007; EN 15549, 2008; Castro et al., 2009)

Una de las últimas etapas del tratamiento previo a la determinación analítica, es la limpieza de la muestra. En esencia, esta etapa consiste en una separación de los analitos de interés mediante cromatografía en columna. Generalmente, se utilizan gel de sílice y alúmina como fase estacionaria; esta separación también se puede llevar a cabo utilizando cartuchos C<sub>18</sub>, como en la extracción en fase sólida clásica (Piñeiro-Iglesias et al., 2000; Piñeiro-Iglesias et al., 2002; Gutiérrez-Dabán et al., 2005). La necesidad de realizar este proceso es un tema en discusión en la bibliografía. En la gran mayoría de los artículos esta etapa forma parte del pretratamiento, aunque cada vez se encuentran más estudios donde se obvia este paso, como describen Liu et al. en una revisión realizada en 2007.

La determinación directa de trazas de PAH en aerosoles atmosféricos mediante técnicas cromatográficas modernas de alta eficacia es todavía muy difícil. Las limitaciones están asociadas no sólo con la insuficiente sensibilidad de las técnicas analíticas, sino con las propias interferencias de la matriz. Por esta razón, se requieren técnicas de extracción, preconcentración y limpieza, como las descritas previamente, que involucran un gran número de etapas y que, por tanto, suponen un riesgo en cuanto a las pérdidas de analitos (Liu et al., 2007). A pesar de que son procedimientos muy complejos y difíciles de automatizar, existen en la bibliografía algunas aplicaciones que han conseguido acoplar las técnicas de extracción con los instrumentos de análisis para la determinación de PAH en muestras de suelo, sedimentos y material particulado atmosférico (Ericsson y Colmsjö, 2000; Ericsson y Colmsjö, 2002; Moreira Vaz, 2003; Chen et al., 2008). No obstante, Bente et al., (2008), proponen la determinación directa de los PAH adsorbidos sobre las partículas atmosféricas en suspensión acoplado un sistema de desorción láser a un espectrómetro de masas (LD-REMPI-SP-TOFMS); obviamente, se trata de una metodología punta en la que se emplea una instrumentación de elevado coste.

Por último, debido a la propia naturaleza de los PAH, las técnicas analíticas más utilizadas son la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta resolución. La mayor aplicabilidad de la cromatografía gaseosa en la determinación de estos analitos se basa en la favorable combinación de alta selectividad y resolución, buenas exactitud y precisión, amplio intervalo dinámico lineal de concentraciones y elevada sensibilidad (Santos y Galceran, 2002).

La elección de la fase estacionaria apropiada para la separación de los PAH es un aspecto crítico en el desarrollo del método de análisis. En cromatografía de gases se utilizan generalmente columnas capilares cuya fase estacionaria esté compuesta por polixilosanos ya que no generan mucho ruido de fondo como consecuencia del sangrado de columna, incluso a altas temperaturas. La combinación de polixilosanos de distinta naturaleza en la fase estacionaria de la columna permite obtener distintos intervalos de polaridades que favorezcan la separación y la resolución de los picos cromatográficos de los analitos (Poster et al., 2006).

El cromatógrafo de gases puede ir acoplado a distintos tipos de detectores como un espectrómetro de masas (GC-MS), un detector de ionización en llama (GC-FID), un detector de tiempo de vuelo acoplado a un espectrómetro de masas (GC-TOF-MS) o un espectrómetro de masas de trampa de iones (GC-iontrapMS), siendo los dos primeros los más ampliamente recogidos en la bibliografía. Por su parte, la cromatografía líquida puede ir acoplada a un detector UV (HPLC-DAD) o a un detector fluorescente (HPLC-FL), aprovechando el carácter fluorescente de la mayoría de estos analitos (Santos y Galceran, 2002; Poster et al., 2006).

Con el objetivo de buscar mejoras en la sensibilidad y la selectividad, las tendencias actuales en el análisis de los PAH van encaminadas a llevar a cabo modificaciones tanto en los sistemas de detección como en las partes instrumentales relacionadas con la separación y la inyección. Las perspectivas futuras están orientadas, por tanto, a la utilización de la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas en tándem (GC-MS-MS), a la cromatografía de gases de alta velocidad (HSGC), a la cromatografía de gases en tándem (GCxGC), a la cromatografía de gases de volumen grande de inyección y temperatura programada (PTV-LV-GC) o a la cromatografía líquida con detección de masas (LC-MS). Incluso la combinación de la cromatografía líquida y la gaseosa (LC-GC) es una alternativa potente que combina las mejores características



de ambas técnicas y es ideal para el análisis de muestras complejas (Santos y Galceran, 2002; Poster et al., 2006; Yusá et al., 2006; Bruno et al., 2007).

En relación a la interpretación medioambiental (identificación de fuentes de emisión, comportamiento espacio-temporal, influencia de algunos parámetros meteorológicos y contaminantes ambientales), de los resultados obtenidos del análisis de los PAH unidos al material particulado atmosférico, se recoge en la bibliografía la aplicación de diversas herramientas quimiométricas como el análisis de componentes principales (PCA), análisis de conglomerados o cluster (HCA), la aplicación del test ANOVA o el cálculo de coeficientes de correlación paramétrico (Pearson) y no paramétrico (Spearman) (Lodovici et al., 2003; Ravindra et al., 2006; Sharma et al., 2007; Barrero y Cantón, 2007; Ströher et al., 2007; Hien et al., 2007; Ravindra et al., 2008; Callén et al., 2008; Tham et al., 2008).

## 1.2. MERCURIO

### 1.2.1. GENERALIDADES.

El mercurio es un elemento que está presente de manera natural en el medio ambiente, coexistiendo en diferentes formas según se detalla más adelante (UNEP, 2002). Está reconocido como contaminante global porque puede ser transportado a largas distancias en la atmósfera, es persistente en el medio ambiente, se acumula en la cadena alimentaria, pudiendo plantear graves efectos adversos en la salud humana y en los ecosistemas. Por todo ello, el mercurio es uno de los contaminantes ambientales más estudiados (Drasch et al., 2004; Leopold et al., 2010; Liu et al, 2012).

De entre sus propiedades físico-químicas, cabe mencionar que el mercurio es un metal pesado de color blanco-plateado brillante y es el único que se encuentra en estado líquido a temperatura ambiente. Si no está encapsulado se evapora fácilmente generando vapores incoloros e inodoros que son tóxicos y corrosivos (UNEP, 2002). Posee un número atómico de 80, un peso atómico de 200,59, temperaturas de fusión y ebullición de  $-38,84\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $356,62\text{ }^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, y una densidad de  $13,53\text{ g/cm}^3$  (Handbook, 2004). Es buen conductor de la electricidad y su coeficiente de dilatación es prácticamente constante.

El mercurio se encuentra en la naturaleza en forma de siete isótopos cuyas masas (en orden decreciente de abundancia) son 202, 200, 199, 201, 198, 204, 196, además de un radioisótopo relativamente estable, el 203 (Adriano, 2001; UNEP, 2002). Sus estados de oxidación son 0 ( $\text{Hg}^0$ , metálico), +1 ( $\text{Hg}_2^{2+}$ , mercurioso) y +2 ( $\text{Hg}^{2+}$ , mercúrico) y sus propiedades, muy diferentes, son función de los mismos (Drasch et al., 2004; Liu et al, 2012). Este elemento tiene la capacidad de que algunos metales como el oro, la plata, el cobre o el cinc se disuelven fácilmente en él para formar un líquido o una amalgama sólida (Drasch et al., 2004).

Considerando las diferentes propiedades toxicocinéticas (absorción, distribución fisiológica, metabolismo y eliminación) de cada una de las especies de mercurio a las que están expuestos los organismos vivos y a su comportamiento diferente dentro del ciclo del mercurio en el medio ambiente, dichas especies se pueden agrupar en tres categorías (Drasch et al., 2004):

- Mercurio metálico

El mercurio elemental ( $\text{Hg}^0$ ) es normalmente conocido como vapor de mercurio cuando está presente en la atmósfera o como mercurio metálico en su forma líquida.  $\text{Hg}^0$  es una especie de considerable toxicidad así como importante desde un punto de vista ambiental, ya que tiene una presión de vapor relativamente alta y una cierta solubilidad en agua (aprox.  $60\text{ }\mu\text{g/L}$ ,  $25^{\circ}\text{C}$ ).

- Iones inorgánicos de mercurio

El  $\text{Hg(II)}$  puede formar diferentes sales inorgánicas, como son el óxido de mercurio(II) ( $\text{HgO}$ ), el cloruro de mercurio(II) ( $\text{HgCl}_2$ ) y el sulfuro de mercurio(II) ( $\text{HgS}$ , cinabrio). El  $\text{HgCl}_2$  es un compuesto volátil que puede estar presente como gas atmosférico pero que también se encuentra en la fase acuosa, ya que posee una elevada solubilidad en agua ( $62\text{ g/L}$ ,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) que

lo convierte en una especie altamente tóxica. Por el contrario, la solubilidad en agua del HgS es extremadamente baja (aprox. 10 ng/L) y, consecuentemente, es un compuesto menos tóxico que el HgCl<sub>2</sub>. Por otra parte, la elevada afinidad del Hg(II) por los grupos sulfhidrilos de los aminoácidos (cisteína y metionina) en las enzimas, explica también su alta toxicidad. Su afinidad es incluso mayor por los grupos HSe<sup>-</sup>, lo que explica el rol de protección de este otro elemento frente a la intoxicación por mercurio.

El Hg(I), por su parte, se encuentra exclusivamente formando sales diméricas como Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (calomelanos) que es una sal menos soluble en agua, y por tanto, menos tóxica que HgCl<sub>2</sub>.

- Compuestos orgánicos de mercurio

El Hg(II) se une a través de un enlace covalente (R-Hg-X) o dos (R-Hg-R) con átomos de carbono. A efectos prácticos, los compuestos orgánicos de mercurio se limitan a los alquilmércurios (monometilmercurio, monoetilmercurio y dimetilmercurio), hidroximercurio y arilmércurios (fenilmercurio). Los cationes orgánicos de mercurio (R-Hg<sup>1+</sup>) forman sales con ácidos orgánicos e inorgánicos (por ejemplo, cloruros y acetatos), y reaccionan fácilmente con ligandos biológicos, en particular con los grupos sulfhidrilos. Los compuestos orgánicos de mercurio, fundamentalmente los haluros (por ejemplo, CH<sub>3</sub>HgCl) y los dialquilmércurio, son lipofílicos por lo que tienen la capacidad de atravesar fácilmente las membranas biológicas. Así, la diferencia que existe entre los distintos compuestos orgánicos de mercurio se relaciona directamente con la estabilidad de los enlaces C-Hg *in vivo*. Por esa razón, los alquilmércurios son compuestos más resistentes a la biodegradación que los compuestos hidroxí o arilmércurio.

En definitiva, el mercurio es uno de los elementos más tóxicos que puede estar presente en los diferentes compartimentos medioambientales (atmósfera, agua, suelo, sedimentos y biota) y que además no se puede descomponer ni degradar en sustancias inofensivas. En condiciones ambientales, los compuestos de mercurio más probables de encontrar son las sales inorgánicas de Hg(II) como HgCl<sub>2</sub>, Hg(OH)<sub>2</sub> y HgS; metilmercurio en forma de CH<sub>3</sub>HgCl y CH<sub>3</sub>HgOH; y, en menor proporción, especies como (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Hg o fenilmercurio (Drasch et al., 2004).

## **1.2.2. EL MERCURIO EN EL MEDIOAMBIENTE**

### **1.2.2.1. CICLO DEL MERCURIO**

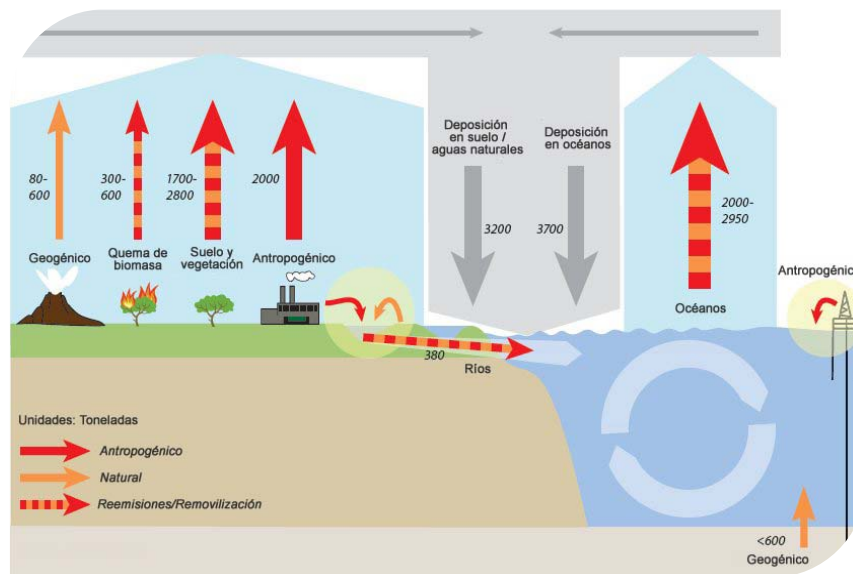
El mercurio está sometido en el medio ambiente a una serie de complicados procesos de transformación y transporte. El desarrollo de su ciclo biogeoquímico está estrechamente relacionado con las formas químicas de mercurio que están presentes en los diferentes compartimentos ambientales (Liu et al, 2012).

Las emisiones de mercurio procedentes tanto de fuentes naturales como antropogénicas son, principalmente, en la forma de mercurio elemental (Hg(0)) que constituye más del 90 % del mercurio total en la atmósfera (Liu et al, 2012). Sin embargo, las transformaciones biogeoquímicas pueden llevar a las especies de mercurio a los estados de oxidación +1 y +2 (Leopold et al., 2010).

La mayoría de los compuestos inorgánicos de Hg(I) son poco solubles en agua y, por tanto, se encuentran principalmente en suelos y sedimentos. Por el contrario, los complejos inorgánicos de Hg(II) o los compuestos con especies inorgánicas y/u orgánicas dependen de las condiciones ambientales propias. Sus tiempos de residencia en el aire son muy cortos (minutos) y son rápidamente removidos por procesos de deposición debido a sus elevadas actividad superficial y solubilidad en agua. Más del 90% de la carga de mercurio de las aguas superficiales resulta de la deposición atmosférica (Leopold et al., 2010).

Por otro lado, la especie inorgánica Hg(II) sufre biometilación dentro de los compartimentos ambientales agua y suelo, dando lugar a la formación de monometilmercurio (MMeHg) y dimetilmercurio (DMeHg) a través de unas reacciones reversibles con desmetilación llevadas a cabo de manera natural por los microorganismos y/o descomposición fotolítica (Leopold et al., 2010).

La movilidad de todas estas especies es muy elevada y su dinámica en el medioambiente se ilustra en la Figura 1.2. Como puede observarse, las emisiones de mercurio a la atmósfera proceden tanto de fuentes naturales y antropogénicas como de las re-emisiones del mercurio que ha sido previamente depositado desde el aire sobre los suelos, las aguas superficiales y la vegetación. Los datos que se presentan en la Figura 1.2, corresponden a las toneladas de mercurio que se estima están involucradas en su ciclo biogeoquímico.



**Figura 1.2.** Ciclo del mercurio en el medioambiente (Fuente: UNEP, 2013)

### 1.2.2.2. EL MERCURIO EN LA ATMÓSFERA

Los procesos que definen la presencia y evolución del mercurio en la atmósfera son las emisiones, las transformaciones en otras especies, el transporte y la deposición.

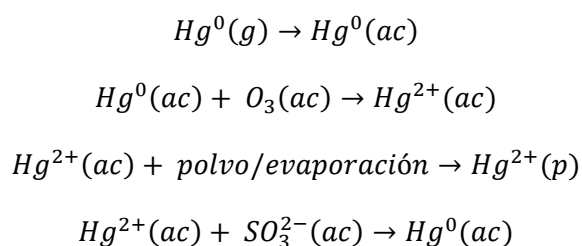
Como se ha comentado anteriormente, las emisiones de mercurio a la atmósfera pueden tener como origen procesos naturales y antropogénicos. Entre los primeros, se encuentran la volatilización del mercurio desde medios acuáticos y marinos, la volatilización a partir de la vegetación, la liberación procedente de las fuentes geológicas y las emisiones volcánicas. To-

das estas emisiones naturales tienen lugar fundamentalmente en forma de mercurio elemental. Algunos modelos recientes de flujo de mercurio a través del medio ambiente sugieren que las fuentes naturales representan alrededor del 10 % de las cerca de 5500 - 8900 toneladas de mercurio que actualmente se emiten y reemiten a la atmósfera a partir de todas las fuentes (UNEP, 2013).

En cuanto a las emisiones antropogénicas, éstas están dominadas por procesos industriales y fuentes de combustión de contenido variable en mercurio, pudiendo darse tanto en fase gaseosa ( $Hg(0)$  u otras especies oxidadas) como en fase particulada (asociado a las partículas atmosféricas en suspensión), donde el mercurio suele encontrarse como especie oxidada (Gaona Martínez, 2004). Según establece la reciente evaluación mundial de mercurio (UNEP, 2013), las fuentes antropogénicas suponen alrededor del 30% de la cantidad total de mercurio emitido a la atmósfera cada año.

Una vez liberado a la atmósfera, el mercurio tiene un tiempo de residencia que varía notablemente en función de la forma en la que se encuentre. Así, el  $Hg(0)$  tiene un tiempo de residencia medio de entre 6 meses y 2 años, mientras que el mercurio oxidado ( $Hg(II)$ ) posee tiempos de residencia que oscilan entre horas y meses, ya que puede ser depositado con relativa facilidad tanto por vía húmeda como por vía seca (Drasch et al., 2004).

Las reacciones químicas que tienen lugar en la atmósfera ocurren tanto en fase gaseosa como en fase acuosa (gotas de lluvia) e implican la oxidación del  $Hg^0$  a  $Hg^{2+}$  y la reducción de esta última especie otra vez a mercurio elemental. En la Figura 1.3 se muestra un esquema de las reacciones del mercurio en la atmósfera.



**Figura 1.3.** Esquema de las reacciones del mercurio en la atmósfera

La vía de oxidación más importante en fase gaseosa es consecuencia de la reacción del mercurio elemental, disuelto en las gotas de agua, con el ozono o los radicales OH. El  $Hg(II)$  generado puede unirse a las partículas atmosféricas en suspensión ( $Hg(II)(p)$ ), abriendo así un camino a la deposición posterior de este metal, o puede reducirse de nuevo a  $Hg(0)$ , con una cinética más lenta que la oxidación, por reacción con iones sulfito ( $SO_3^{2-}$ ) o radicales  $HO_2$  (Drasch et al., 2004; Liu et al, 2012).

### 1.2.2.2.1. FUENTES DE EMISIÓN

Dejando a un lado las fuentes naturales de emisión de mercurio descritas en el apartado anterior, cuyas estimaciones van acompañadas de un alto grado de incertidumbre debido a la propia complejidad espacial y temporal de los procesos geológicos responsables de dichas emisiones, las principales fuentes de emisión de mercurio a la atmósfera tienen un origen antropogénico.

Dentro de este grupo se puede establecer una primera categoría donde, debido a que el mercurio está presente como impureza en los combustibles o en la materia prima, su emisión a la atmósfera es considerada como no intencionada. De entre ellas, la quema de carbón y, en menor medida, el uso de otros combustibles fósiles, son una de las fuentes de emisión antropogénica más significativas (Liu et al, 2012; UNEP, 2013).

Asimismo, la minería, la fundición y la producción de metales férricos y no férricos son también importantes fuentes de emisión de mercurio a nivel mundial. En la minería y el procesamiento de los metales, la mayor parte del mercurio es capturado, almacenado o vendido para su uso en otras actividades. Sin embargo, el volumen relativamente pequeño de la producción primaria de mercurio hace que hoy ésta sea una fuente mucho más pequeña de lo que ha sido en el pasado (UNEP, 2013).

La producción de cemento que, por lo general, consiste en la quema de combustibles fósiles para calentar los materiales necesarios para fabricar cemento, es otra de las principales fuentes antropogénicas de mercurio de origen no intencionado (UNEP, 2013).

Las emisiones y emanaciones de mercurio a la atmósfera durante el refinado del petróleo crudo son también conocidas, aunque se sabe que el mercurio está presente en pequeñas cantidades puesto que se retira de los derivados del petróleo y el gas natural antes de su combustión. La mayor parte del mercurio en el petróleo crudo está asociada a los residuos sólidos que son posteriormente almacenados (UNEP, 2013).

Una segunda categoría de fuentes de emisión incluye sectores donde, por el contrario, el mercurio se utiliza intencionadamente. A ésta pertenece la minería de oro artesanal y a pequeña escala, donde el mercurio es utilizado para extraer oro de las rocas, suelos y sedimentos. Se trata de una fuente importante de liberación de mercurio a escala mundial, aunque las estimaciones de dichas emisiones son todavía un verdadero desafío (UNEP, 2013).

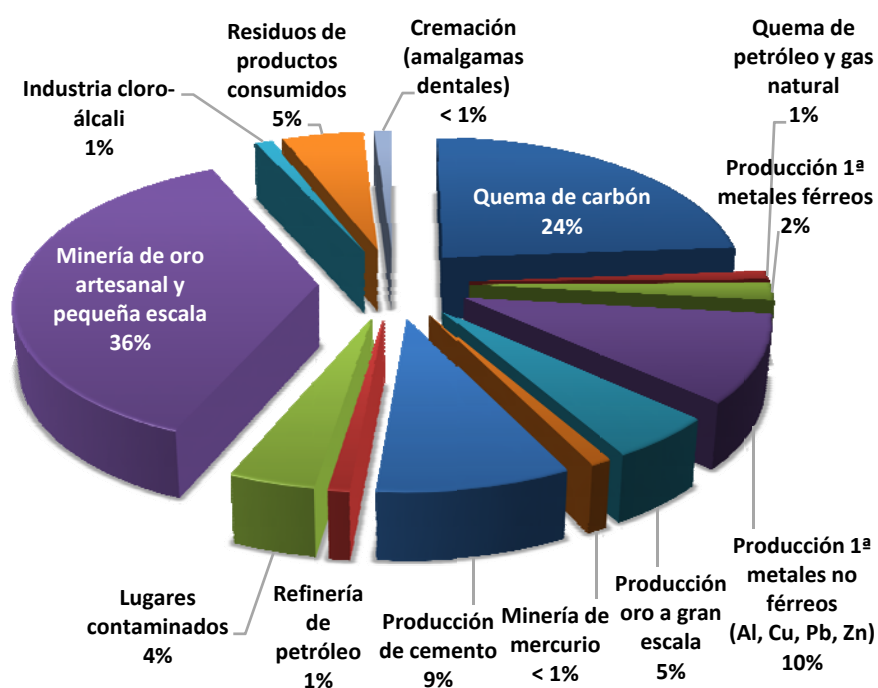
Otra actividad importante es el tratamiento de los residuos procedentes de los productos de consumo que contienen mercurio, cuyo final pueden ser los vertederos o incineradoras (Liu et al, 2012). Debido a que el mercurio posee unas características singulares, entre las que destacan que es líquido a temperatura ambiente, es un buen conductor eléctrico, tiene una densidad elevada y alta tensión superficial, se expande y contrae uniformemente en toda su gama líquida respondiendo a cambios de presión y temperatura, y es tóxico para los microorganismos (incluso los organismos patógenos) y otras plagas (UNEP, 2002), es considerado un excelente material y es utilizado en una amplia gama de productos, aunque cada vez en menor medida. Entre ellos están incluidas las baterías, pinturas, interruptores, dispositivos eléctricos y electrónicos, termómetros, amalgamas dentales, medidores de presión sanguínea, lámparas fluorescentes y de bajo consumo, pesticidas, fungicidas, instrumentación analítica, medicinas y cosméticos, que son desechados como residuos sólidos. De esta manera, el mercurio que se acumula en los vertederos puede movilizarse lentamente en el medio ambiente, mientras que los residuos que se incineran pueden ser una fuente importante de mercurio hacia la atmósfera, especialmente si la incineración no es controlada (Gaona Martínez, 2004, UNEP, 2013).

El mercurio se sigue utilizando como catalizador en algunos procesos industriales para producir cloro y sosa cáustica (en las plantas de cloro-álcali con tecnología de células de mercurio).

rio), para producir el monómero de cloruro de vinilo que se utiliza para fabricar policloruro de vinilo (PVC), y en la producción de espumas de poliuretano (Liu et al, 2012; UNEP, 2013)

La tercera categoría de fuentes de emisión, la cual supone aproximadamente el 60% de las emisiones de este contaminante a la atmósfera, corresponde a la reemisión del mercurio previamente depositado sobre los suelos, las aguas superficiales y la vegetación. Esta recirculación del mercurio de nuevo hacia la atmósfera es el resultado de procesos naturales que convierten las formas inorgánicas y orgánicas de mercurio en mercurio elemental, que es más volátil (Liu et al, 2012; Nelson et al, 2012). Los incendios forestales o la quema de biomasa, por ejemplo, son fenómenos a través de los cuáles el mercurio depositado en las superficies de las plantas puede ser posteriormente reemitido (UNEP, 2013).

En la Figura 1.4 se representan los porcentajes de emisión correspondientes a cada una de las fuentes antropogénicas vinculadas a los distintos sectores ya mencionados, según los datos recientes publicados por la UNEP en el documento de evaluación global de mercurio 2013.



**Figura 1.4.** Contribuciones relativas estimadas para las emisiones de mercurio a la atmósfera procedentes de fuentes antropogénicas en 2010 (Fuente: UNEP, 2013)

Las estimaciones relativas a la emisión de mercurio a la atmósfera están sujetas a incertidumbres elevadas, no sólo considerando las cantidades totales de mercurio emitido, sino también en su especiación (especie elemental u oxidada), y su reparto entre la fase gaseosa y las partículas en suspensión. En definitiva, la química atmosférica, la especiación y la distribución entre fases son aspectos de gran importancia ya que controlan los procesos atmosféricos y la deposición, y, en consecuencia, el destino del mercurio en el medio ambiente (Nelson et al, 2012).

### **1.2.2.3. EL MERCURIO EN EL SUELO**

Una vez depositadas en el suelo, las especies de Hg(II) están sujetas a un amplio abanico de reacciones químicas y biológicas. Las condiciones del suelo (pH, temperatura, contenido en ácidos húmicos) generalmente son favorables para la formación de compuestos inorgánicos y compuestos inorgánicos complejados con aniones orgánicos (Adriano, 2001). Este comportamiento complejante con la materia orgánica del suelo (ácidos fúlvico y húmico) controla en gran medida la movilidad del mercurio dentro de él. Sin embargo, una parte de ese mercurio divalente puede ser adsorbido por ligandos orgánicos solubles u otras formas de carbono orgánico disuelto (DOC) facilitando su reparto hacia la fase acuosa donde puede ser removido por lixiviación (Gaona Martínez, 2004).

Por estas razones, el suelo se comporta como un gran depósito de almacenamiento de mercurio antropogénico que continúa siendo liberado a las aguas superficiales y otros medios durante largos periodos de tiempo. Hay que tener en cuenta que los niveles de mercurio en el suelo varían enormemente con la profundidad, encontrándose las mayores concentraciones de este contaminante en los primeros 20 cm de suelo (Drasch et al, 2004).

Otra especie de mercurio presente en proporciones muy pequeñas en los suelos y sedimentos, pero de gran importancia debido a su toxicidad y capacidad para la bioacumulación, es el metilmercurio, que tal como se ha mencionado con anterioridad, se forma a partir de la acción microbiana sobre las especies de Hg(II). El metilmercurio presenta también una gran afinidad por la materia orgánica lo que limita su movilidad en el medioambiente (Drasch et al., 2004).

### **1.2.2.4. EL MERCURIO EN LOS SISTEMAS ACUÁTICOS**

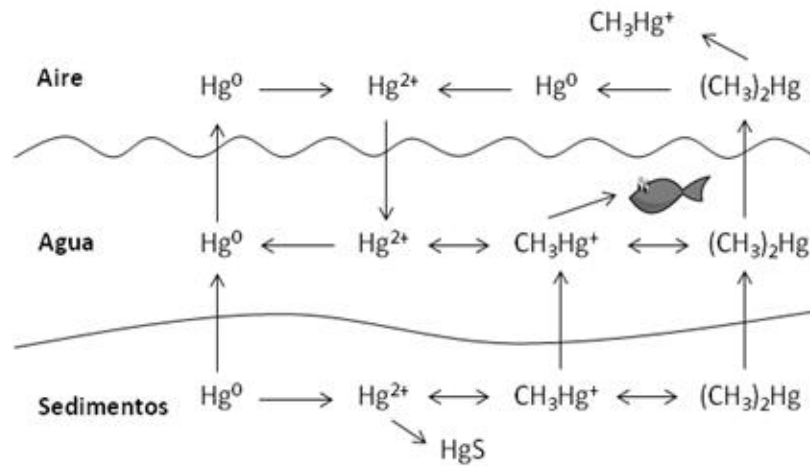
Las principales especies de mercurio disuelto en el agua son mercurio elemental, complejos de Hg(II) con diferentes ligandos orgánicos e inorgánicos y especies orgánicas de mercurio, principalmente monometilmercurio y dimetilmercurio. La forma química de este metal en los sistemas acuáticos está fuertemente influenciada por las condiciones redox y el pH, así como por la concentración de agentes complejantes orgánicos e inorgánicos (Wang et al., 2004).

Existen dos rutas principales de transformación de Hg(II) en los sistemas acuáticos:

- La reducción a mercurio elemental, que es llevada a cabo por microorganismos acuáticos, como las cianobacterias, o por la reducción del Hg(II) o el metilmercurio inducida por la luz.



- La transformación bacteriana *in-situ* de las especies inorgánicas de mercurio a una especie de mayor toxicidad como el metilmercurio, que posee la capacidad de acumularse en los peces (bioconcentración y bioacumulación) con el riesgo posterior de entrar en la cadena trófica (biomagnificación).



**Figura 1.5.** Diagrama de interconversión de las especies de mercurio en aguas naturales  
(Fuentes: Adriano, 2001; Leopold et al, 2010)

En cualquier sistema acuático, el ciclo del mercurio es *a priori* el mismo; sin embargo, el proceso de metilación de esta especie en el mar es normalmente menor que en aguas dulces, lo cual se puede atribuir al contenido salino de las primeras y a la carga de los complejos que forma el mercurio con el azufre y el cloro, que lo hacen menos disponible a las bacterias encargadas del proceso de transformación en metilmercurio (Drasch et al., 2004).

Por otra parte, el dimetilmercurio es la especie metilada predominante en las aguas profundas de los océanos aunque su mecanismo de formación no se conoce con exactitud. El DMeHg abandona rápidamente el sistema acuático por evaporación o degradación fotolítica, por lo que no se considera como una especie disponible para su acumulación en los organismos acuáticos.

#### 1.2.2.4.1. EMISIONES ANTROPOGÉNICAS EN EL MEDIO AMBIENTE ACUÁTICO

A diferencia de las emisiones de mercurio a la atmósfera, que son en su mayoría en forma de mercurio elemental gaseoso, las liberaciones al agua son predominantemente en la forma de mercurio inorgánico (UNEP, 2013). Aunque todavía existe bastante incertidumbre en la estimación de la liberación global de mercurio al agua, las fuentes de contaminación pueden agruparse, independientemente de su carácter puntual o difuso, en seis categorías: deposición atmosférica, erosión de suelos contaminados, vertidos urbanos, agricultura, minería y emisiones industriales (Wang et al., 2004)

De entre ellas, la deposición atmosférica de mercurio es la fuente de contaminación más importante en los sistemas acuáticos. Por otro lado, la erosión de suelos contaminados es la fuente de contaminación más significativa de mercurio asociado a las partículas, debido al transporte de este contaminante a través de las escorrentías de agua o nieve superficiales. La

construcción de carreteras, los vertidos de aguas residuales domésticas e industriales, la minería y la agricultura (pesticidas y fungicidas), entre otras, continúan jugando un papel importante como fuente de emisión de mercurio al medio ambiente (Wang et al., 2004; UNEP, 2013).

### **1.2.3. EFECTOS TÓXICOS EN LOS SERES HUMANOS.**

Los seres humanos pueden estar expuestos al mercurio por inhalación de aire contaminado, por ingestión de alimentos o agua contaminada o a través de la piel. Por eso, cuando se producen intoxicaciones es necesario conocer la vía de incorporación y la forma química en la que se ha introducido el mercurio en el organismo (ATSDR, 1999; Syversen and Kaur, 2012).

Cuando se ingieren pequeñas cantidades de mercurio metálico, sólo una pequeña parte de éste entra al cuerpo a través del estómago o el intestino. Sin embargo, cuando se inhalan vapores de mercurio, casi el 80 % de la cantidad respirada entra desde los pulmones directamente al torrente sanguíneo, que lo extiende rápidamente a otras partes del cuerpo, incluyendo el cerebro y los riñones (ATSDR, 1999; Syversen and Kaur, 2012). Una vez dentro de él, el mercurio metálico puede permanecer semanas o meses. La mayor parte de este mercurio metálico absorbido por el cuerpo finalmente se excreta en la orina y las heces, mientras que las cantidades más pequeñas se eliminan en el aire exhalado (ATSDR, 1999). La exposición prolongada puede inducir desórdenes en el sistema nervioso central, incluyendo temblores, pérdidas de memoria y delirios (Syversen and Kaur, 2012).

Los compuestos inorgánicos de mercurio han sido utilizados en una amplia variedad de productos cosméticos y medicamentos. Esto hace que la exposición accidental o intencionada a los compuestos inorgánicos de mercurio no sea algo excepcional (Syversen and Kaur, 2012). Algunos compuestos, como el  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  y el  $\text{HgCl}_2$ , no tienen la capacidad de incorporarse al organismo por inhalación con tanta facilidad como el mercurio elemental. Cuando se ingieren, menos del 10 % es absorbido por el tracto intestinal, aunque hasta un 40 % podría entrar al cuerpo por esta vía. Algunos de los compuestos inorgánicos de mercurio pueden entrar al organismo a través de la piel. Al igual que el mercurio elemental, el mercurio inorgánico se extiende por el organismo a través del torrente sanguíneo y se acumula en los riñones y el cerebro, aunque en éste último con menos facilidad que el  $\text{Hg}(0)$  (ATSDR, 1999). La exposición prolongada a compuestos de  $\text{Hg}(\text{II})$  puede ocasionar también enfermedades de tipo autoinmune (Syversen and Kaur, 2012).

De entre los compuestos orgánicos de mercurio el interés principal de la investigación epidemiológica y experimental ha estado dirigido hacia el metilmercurio (MeHg) (Syversen and Kaur, 2012). Esta especie orgánica es la forma de mercurio más fácilmente absorbida por el tracto gastrointestinal (cerca del 95 %). Después de comer pescado u otros alimentos que están contaminados con metilmercurio, éste entra fácilmente al torrente sanguíneo y se extiende rápidamente a otras partes del cuerpo (hígado, riñón, cerebro) (ATSDR, 1999). El MeHg también se absorbe fácilmente por inhalación y aproximadamente el 80 % se conserva después de la exposición al vapor. Asimismo, si el MeHg está presente en el aerosol, la tasa de absorción dependerá del tamaño de partícula y de sus características. Después de la exposición a esta especie vía oral, la absorción desde el intestino es prácticamente del 100 % (Syver-

sen and Kaur, 2012). Por otro lado, sólo pequeñas cantidades de metilmercurio entran al sistema circulatorio directamente a través de la piel, aunque otras formas de mercurio orgánico (en particular, el dimetilmercurio) se incorporan rápidamente por esta vía (ATSDR, 1999). El trastorno neurológico grave y permanente causado por envenenamiento por MeHg y cuyos síntomas son ataxia, alteración sensorial en manos y pies, deterioro de la vista y el oído, debilidad y en casos extremos parálisis y muerte, es lo que se conoce como enfermedad de Minamata, denominada así porque la ciudad de Minamata (Japón) fue, en la década de los 50, el centro de una de las tragedias medioambientales más importantes de la historia. Esta enfermedad se desarrolló a causa de un envenenamiento por mercurio procedente de los vertidos continuados de una industria petroquímica, contaminando el pescado y el marisco posteriormente ingeridos por el pueblo de Minamata (NIMD, 2012)

En resumen, en los seres humanos la inhalación de vapor de mercurio en concentraciones superiores a  $1-2 \text{ mg/m}^3$  puede poner en peligro el funcionamiento de los bronquios y los pulmones. Puede generar sabor metálico, náuseas, diarrea, dolor abdominal, bronquitis, alteraciones del sistema nervioso central o taquicardia. La ingestión de sales solubles de Hg(II) da lugar a sabor metálico, hipersalivación, faringitis, disfagia, vómitos, dolor abdominal, diarrea sangrante, pérdida de dientes, problemas de riñón o colapso circulatorio, entre otras enfermedades. En cuanto al metilmercurio, el sistema nervioso central es el principal tejido diana. La visión y la audición, así como aquellas regiones cerebrales relacionadas con la coordinación, son las funciones más afectadas. A diferencia de otras especies de mercurio, la intoxicación por metilmercurio, incluso en dosis letales, se manifiesta varias semanas después y puede derivar en problemas crónicos (Drasch et al., 2004).

#### **1.2.4. LEGISLACIÓN**

Debido a que el mercurio está considerado a escala mundial como una sustancia peligrosa prioritaria en el ámbito del control y la protección medioambiental, existen importantes iniciativas, bajo el liderazgo del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente, que tienen como objetivo proteger la salud humana y el medio ambiente mediante la minimización, y a ser posible eliminación, de las emisiones antropogénicas globales de mercurio. Sin embargo, esto no ha dado lugar todavía a la creación de una normativa y legislación común para la regulación del contenido en mercurio en el medioambiente. No obstante, lejos de ser propuestas adoptadas a nivel global, la Organización Mundial de la Salud y la Agencia Americana de Protección Ambiental coinciden en establecer un valor máximo de Hg(II) en el agua potable de  $2 \text{ ng/mL}$  (OMS, 2011; EPA, 2013). En Europa, la Directiva 2008/105/CE establece una concentración máxima admisible en aguas superficiales comprendido entre  $0,05$  y  $0,07 \text{ ng/mL}$ , referida al contenido total en mercurio.

En España, la legislación en relación a la determinación de mercurio para evaluar la calidad de las aguas destinadas a consumo humano está recogida en la Directiva 98/83/CE, transpuesta a la legislación española a través del Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, dispone como valor paramétrico una concentración de mercurio de  $1 \text{ ng/mL}$ .

En cuanto al mercurio en el aire ambiente, La legislación vigente está recogida en la ya citada directiva europea 2004/107/CE (directiva hija que deriva de la Directiva 96/62/CE), transpuesta a la legislación española por el Real Decreto 812/2007, de 22 de junio, sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente en relación con el arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Este real decreto no estipula un valor objetivo para mercurio, pero indica que el Ministerio de Medio Ambiente, a través de la Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental y en colaboración con las comunidades autónomas, debe establecer puntos de muestreo para la medición indicativa, en el aire ambiente, del arsénico, cadmio, mercurio gaseoso total, níquel, benzo[a]pireno, y de los demás hidrocarburos aromáticos policíclicos regulados, así como de sus depósitos totales. También se medirá el mercurio particulado y el mercurio gaseoso divalente.

### **1.2.5. ANTECEDENTES ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO**

La determinación analítica de metales a niveles traza o ultratrazas es un problema muy importante para las ciencias orientadas a los campos medioambiental, agroalimentario y clínico, debido a la toxicidad de estos analitos cuando se encuentran en concentraciones por encima de cierto umbral. Especial atención se le dedica en la bibliografía al mercurio que, como ya se ha indicado, es particularmente perjudicial para la salud humana y los ecosistemas a muy bajas concentraciones (Giacomino et al., 2008).

La elevada volatilidad, la toxicidad y la naturaleza acumulativa y persistente del mercurio, son las características que sitúan a este metal pesado entre los de mayor preocupación y relevancia medioambiental (Zhang et al., 2011). De esta manera, la determinación de la concentración de este contaminante en muestras ambientales como suelos, sedimentos, plantas, cenizas volantes, polvo atmosférico, polvo de interiores, aguas ambientales, agua de lluvia, nieve o tejidos animales (especialmente el pescado) es un objetivo que adquiere particular importancia, ya que puede proporcionar información sobre el grado de contaminación por mercurio de los diferentes entornos en términos de disponibilidad, movilidad y comportamiento químico (Lu et al., 2003); Collaisol et al., 2004; Elik., 2005; Meucci et al., 2009; Zhang et al., 2011). Todo ello requiere el acoplamiento de metodologías de muestreo y tratamiento de muestras, y métodos analíticos lo suficientemente selectivos y sensibles para garantizar el análisis cuantitativo de las diferentes especies de este elemento que coexisten en el medio ambiente.

La técnica más comúnmente utilizada para determinar mercurio total es la espectrometría de fluorescencia atómica con vapor frío (CV-AFS) (EPA, 2005; Berzas-Nevado et al., 2008.; da Silva et al., 2010). Como etapa previa de pretratamiento, las muestras son digeridas para transformar todas las especies de mercurio a mercurio "reducible" (Hg(II) disuelto) por adición de un oxidante fuerte (cloruro de bromo, permanganato potásico, bromato potásico o luz UV) en recipientes cerrados, para evitar la pérdida del analito por volatilización. Después de la reducción previa del exceso de oxidante, el Hg(II) es reducido a Hg(0) utilizando, en la mayoría de los casos, cloruro de estaño(II) o borohidruro sódico, y es posteriormente purgado fuera de la disolución por un gas inerte (N<sub>2</sub> o Ar). Ese vapor de Hg(0), conocido con el nombre de "vapor frío", se transporta directamente hacia el detector o se preconcentra en una trampa de oro

por formación de amalgama. Posteriormente, la trampa de oro se calienta y se libera el mercurio concentrado que es transportado hacia el detector donde se mide su señal de fluorescencia a una longitud de onda de 253,7 nm (Leopold et al., 2009; Leopold et al., 2010; EPA, 2005). Dependiendo de la pureza de los reactivos y del gas inerte, y de la limpieza del material utilizado, con esta técnica se pueden alcanzar límites de detección para el mercurio de pg/L (Leopold et al., 2010).

Otra de las técnicas más utilizadas para la cuantificación de mercurio es la espectrometría de absorción atómica con vapor frío (CV-AAS) debido a su simplicidad, alta sensibilidad, relativa ausencia de interferencias, bajo coste y rapidez (Balarama Krishna et al., 2005). Esta técnica sólo se utiliza para el análisis de mercurio, el cual posee una presión de vapor elevada y, por tanto, es capaz de emitir vapores monoatómicos a temperatura ambiente sin necesidad de atomizar la muestra. De la misma forma que en la determinación por CV-AFS, el vapor de mercurio (Hg(0)) es arrastrado por un gas inerte hacia una celda de cuarzo interpuesta en el camino óptico de la lámpara de cátodo hueco para mercurio. La señal analítica corresponde a la absorción de radiación medida a una longitud de onda de 253,7 nm (EPA, 1994; Welz y Sperling, 1999; EPA, 2001; EN 13506, 2002). Si además se incorpora a este sistema una etapa de preconcentración basada en la formación de amalgama del vapor de mercurio generado en una trampa de oro, tal como se ha descrito anteriormente, se consigue una mejora adicional de los límites de detección (Balarama Krishna et al., 2005). No obstante, entre ambas técnicas la CV-AFS es más utilizada debido a que posee mayor sensibilidad y un intervalo dinámico lineal de concentraciones más amplio (Drasch et al., 2004; Giacomino et al., 2008).

Con el fin de simplificar estos procedimientos y disminuir los riesgos de contaminación durante el análisis, se describen en la bibliografía algunos métodos que integran el pretratamiento oxidativo de las muestras con una inyección en flujo (FI-CV-AFS y FI-CV-AAS). El inconveniente principal de esta variante es que se necesitan rigurosos procedimientos de limpieza que aseguren bajos niveles de concentración de Hg en los blancos y, por tanto, una buena sensibilidad (Drasch et al., 2004; Leopold et al., 2010). Asimismo, existen también en la bibliografía algunas aplicaciones con ultrasonido (US) acoplado a estas técnicas, como herramienta “verde” para la generación del vapor frío evitando así el uso de agentes reductores (Gil et al., 2006) y obteniéndose incluso mejores límites de detección que en la generación de vapor frío con cloruro de estaño(II) (Ribeiro et al., 2007).

La determinación de mercurio en plasma acoplado por inducción unido a un espectrómetro de masas (ICP-MS) es otra de las herramientas potentes cuya utilización en este tipo de aplicaciones se ha ido incrementando en la última década (Leopold et al., 2010; López et al., 2010; Palomo-Marín et al., 2011). A diferencia de las otras dos técnicas anteriormente descritas, el análisis por ICP-MS tiene la ventaja de que permite la determinación simultánea de mercurio y otros elementos presentes en la muestra. Esta técnica se caracteriza por su elevada precisión y bajos límites de detección y, además, tiene la capacidad de cuantificar isótopos, lo cual es muy interesante desde el punto de vista ambiental. Por otra parte, la introducción de mercurio en forma gaseosa directamente al plasma, mediante la generación de “vapor frío”, es también una alternativa que permite reducir el efecto memoria de este analito que dificulta, significativamente en algunos casos, el uso efectivo de esta técnica analítica (Drasch et al., 2004). Otra estrategia descrita en la bibliografía, con la que se consigue una mayor eficacia en la determi-

nación consiste en la adición de pequeñas cantidades de Au(III) a las muestras previamente a su análisis por ICP-MS. Así, aprovechando la especial afinidad del Hg por el oro, se consigue la estabilización de las señales analíticas y se minimiza también el problema del mencionado efecto memoria (Zhu y Alexandratos, 2007). Incluso, recientemente, el empleo de métodos de dilución isotópica acoplados a esta nueva variante (ID-CV-ICPMS) permiten reducir las incertidumbres que acompañan a la determinación de Hg en muestras ambientales de carácter más complejo (suelo, sedimentos o muestras biológicas) (Reyes et al., 2008; Geng et al., 2008).

El análisis de mercurio en concentraciones algo más elevadas se puede llevar a cabo utilizando también la técnica de plasma acoplado por inducción unido a un espectrómetro de emisión atómica (ICP-AES) (Giacomino et al., 2008), el cual puede combinarse igualmente con un sistema generador de vapor frío (dos Santos et al., 2005).

Por otro lado están las técnicas no destructivas que, por el contrario, no requieren etapas previas de pretratamiento. Se han encontrado algunas referencias bibliográficas que describen la utilización del análisis por activación neutrónica (INAA) (Osawa et al., 2011), la fluorescencia de rayos X (XRF) (Bernaus et al., 2006), la emisión de rayos X inducida por partículas (PIXE) (Pandey et al., 2011), y la espectroscopia de absorción de rayos X (XAS) (Skylberg, 2010) para la determinación de mercurio en matrices ambientales diversas. La primera de ellas se basa en la inducción de radiactividad artificial en la muestra mediante la irradiación con neutrones y en la posterior medida de la radiactividad inducida. Se trata de una técnica muy sensible, aunque los límites de detección para la determinación de Hg son más altos que los obtenidos con ICP-MS, CV-AAS o CV-AFS (Pandey et al., 2011). Como ventajas de la técnica hay que mencionar que permite el análisis multielemental simultáneo, posee un amplio intervalo dinámico lineal de concentraciones y necesita una mínima manipulación de la muestra. La principal desventaja, sin embargo, es que no se puede adaptar para realizar medidas *in situ*. No obstante, se trata de una técnica muy útil como método de referencia para comprobar la exactitud de otros procedimientos (Drasch et al., 2004). Por su parte, la fluorescencia de rayos X es una técnica rápida basada en la emisión de fluorescencia posterior a la activación de la muestra con una fuente de rayos X. Se trata de una metodología sensible, aunque los límites de detección para Hg descritos en la bibliografía son algo mayores que los obtenidos con las anteriores, pero permite llevar a cabo análisis *in situ* (Drasch et al., 2004). De todas ellas, es la técnica más comúnmente utilizada para la determinación directa de contaminantes metálicos, concretamente, en el material particulado atmosférico (Pandey et al., 2011). Asimismo, en el análisis PIXE la muestra se excita con partículas altamente cargadas (protones de 1-4 MeV), midiéndose la emisión característica de los rayos X producidos. Los límites de detección son superiores a los obtenidos con CV-AFS o CV-AAS, aunque se ha demostrado una comparable linealidad con los métodos espectrométricos, específicamente para la determinación de Hg en polvo de interiores (Pandey et al., 2011).

También como técnica no destructiva, se describe en la bibliografía la utilización de analizadores de mercurio para la monitorización de este contaminante en el aire ambiente. Aunque existen numerosos modelos en el mercado con especificaciones diferentes, su funcionamiento está basado en la amalgamación y desorción del mercurio captado en una trampa de oro y su posterior determinación por AAS. Presentan unos límites de detección muy bajos, pero su principal inconveniente es la calibración, la cual no puede ser realizada por el usuario (Pandey

et al., 2011). Estos mismos equipos están también preparados para el análisis de mercurio en muestras de otra naturaleza (líquida, sólida o semi-sólida).

Como se ha comentado en apartados anteriores, la forma química en la que se encuentra un contaminante en cualquiera de los diferentes compartimentos medioambientales va a determinar propiedades tan significativas como su toxicidad, movilidad o biodisponibilidad. El mercurio no es una excepción; por eso, para poder cuantificar de manera independiente sus especies químicas, hay que recurrir al acoplamiento de las técnicas anteriores con técnicas de separación, como son la cromatografía gaseosa, la cromatografía líquida (Drasch et al., 2004; Selid et al., 2009; Abollino et al., 2009; Leopold et al., 2010) y, más recientemente, la electroforesis capilar, que se caracteriza por su velocidad, poder de resolución y gasto mínimo de reactivos y muestras (Martin, et al., 2010). En la bibliografía se encuentran algunas referencias en las que se aplican estas técnicas acopladas a la determinación de especies de mercurio en diversas matrices ambientales, por ejemplo GC-AFS para la determinación de Hg(II) inorgánico y MMeHg en muestras de agua (Stoichev et al., 2004), GC-ICPMS para la determinación de Hg(II), MMeHg y DMeHg en aguas de estuario (Tseng et al., 2000) o para la determinación de MMeHg en muestras de sedimentos (Berzas-Nevado et al., 2008); HPLC-CV-ICPMS para la determinación de Hg<sup>2+</sup> y MMeHg en agua de río (Martínez Blanco et al., 2000), en muestras de suelo (Cattani et al., 2008) y para la determinación del contenido en mercurio total en muestras biológicas de tejidos de mejillones y pescados (López et al., 2010) o plasma humano (de Souza et al., 2013); HPLC-CV-AFS para el análisis Hg(II) y MMeHg en aguas naturales (Gomez-Ariza et al., 2004) y sedimentos (Ramalhosa et al., 2001), ID-HPLC-ICPMS para la determinación de Hg(II) y MMeHg en muestras de pelo humano (Mizanur-Rahman et al., 2009) o MMeHg en muestras de tejido de pescado (Reyes et al., 2009); CE-CV-EQTF-AAS para la determinación de Hg<sup>2+</sup> y MMeHg en muestras biológicas de músculo de pescado (Deng et al., 2009) y CE-ICP-MS para la separación y detección de Hg<sup>2+</sup>, MMeHg y EtHg en músculo de organismos acuáticos (Zhao et al., 2012), entre otras.

La utilidad y eficacia de todo este conjunto de técnicas analíticas en el control medioambiental están ampliamente demostradas, destacando en ellas su elevada sensibilidad y precisión. Sin embargo, su aplicación requiere una instrumentación cara y sofisticada, con el inconveniente de que, en general, no permiten llevar a cabo la detección *in situ* de los contaminantes, ya que sus características propias no les permiten transformarse en una instrumentación portátil (Giacomino et al., 2008; Abollino et al., 2010; Gong et al., 2010a). En el caso concreto de la monitorización de mercurio ambiental, esta desventaja adquiere especial relevancia, ya que este contaminante está presente, por lo general, en concentraciones muy bajas y su determinación a tiempo real minimizaría los errores por contaminación ocurridos durante la recogida y transporte de las muestras al laboratorio (Wang, 1997). Asimismo, la aplicación de estas técnicas necesita personal cualificado, largos tiempos de análisis y, en ocasiones, metodologías de preparación de muestras complicadas.

Por ello, en relación a su excelente sensibilidad, gran precisión, versatilidad, simplicidad, portabilidad, poca necesidad energética y bajo coste, los métodos electroquímicos de redisolución se presentan como una alternativa muy interesante para la monitorización de mercurio (Daniele et al., 2000; Ribeiro et al., 2006; Abollino et al., 2008; Meucci et al., 2009; Zhou et al., 2012). La recomendación de la EPA para la utilización de las técnicas electroanalíticas de redi-

solución en la cuantificación de metales pesados como el mercurio (EPA, 1996c) es un ejemplo representativo de esta aplicación.

A continuación se describen con detalle los antecedentes analíticos sobre la aplicación de estas técnicas, directamente relacionados con los métodos para determinación de mercurio desarrollados en este trabajo.

### **1.2.6. SENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MERCURIO**

La tendencia actual en el campo de la investigación en Química, está cada vez más orientada hacia el cumplimiento de los 12 principios que definen el concepto de Química Verde (Anastas y Warner, 1998), el cual está íntimamente asociado con la prevención de la contaminación mediante el diseño de procesos y productos que no posean propiedades dañinas para el medioambiente. En particular, el principio 11 reconoce *“la necesidad de desarrollar metodologías analíticas para la monitorización y control en tiempo real del proceso, previo a la formación de sustancias peligrosas”*. Es aquí donde adquiere singular importancia el desarrollo de sensores químicos, entre los que se incluyen los electroquímicos, que traduzcan las interacciones químicas de los analitos detectados en señales eléctricas medibles (Brett, 2007).

Así pues, las técnicas electroquímicas han sido utilizadas para el desarrollo de sensores capaces de monitorizar contaminantes en el medioambiente, especialmente las técnicas electroanalíticas de redisolución, que por su elevada sensibilidad y versatilidad, han demostrado ser muy apropiadas para su uso en este campo (Giacomino et al., 2008; Gong et al., 2010b). La característica etapa inicial de preconcentración, en la que los analitos se acumulan en la superficie del electrodo de trabajo, es lo que justifica la elevada sensibilidad de estas técnicas. Son además muy útiles tanto para análisis de contenidos totales de los elementos como para la caracterización de sus distintas especies químicas (Palchetti et al., 2005; Güell et al., 2008; Jena y Raj, 2008).

Las técnicas electroquímicas utilizadas para la determinación de mercurio en el medioambiente están ampliamente reportadas en la bibliografía. La aplicabilidad de la voltamperometría de redisolución anódica (ASV), la voltamperometría de onda cuadrada (SWASV), la voltamperometría diferencial de pulso (DPASV) y la potenciometría de redisolución (PSA) está sobradamente demostrada. Asimismo, se describe extensamente en la bibliografía el uso del oro como el mejor material para la fabricación de los electrodos de trabajo debido a su elevada afinidad por el mercurio, lo que mejora el efecto de preconcentración. Sin embargo, hay que tener en cuenta el principal y más importante inconveniente que presentan estos electrodos con base de Au, y es el conocido fenómeno de cambio estructural en su superficie causado por la formación de amalgama y, como consecuencia, el tiempo empleado en los cuidadosos procedimientos de limpieza necesarios para asegurar la reproducibilidad de las respuestas (Watson et al., 1999; Bonfil et al., 2000; Giacomino et al., 2008).

Con el objetivo de dar solución a dicha desventaja, se describen en la literatura diferentes estrategias basadas en la modificación química de la superficie de los electrodos utilizando otros reactivos que contengan grupos activos que puedan interaccionar con el Hg (II) y, como



consecuencia, mejoren la sensibilidad y la selectividad en la determinación, haciéndolos más adecuados, en muchos casos, para aplicaciones en el campo medioambiental (Fu et al., 2012; Zhou et al., 2012).

Los antecedentes encontrados en relación con la determinación electroquímica de contenidos totales de Hg utilizando diferentes tipos de electrodos de trabajo se encuentran resumidos en la Tabla 1.4.

**Tabla 1.4.** Antecedentes sobre la determinación electroquímica de Hg total

Electrodo	Técnica utilizada	LOD	Deposición		Aplicación	Referencias
			Tiempo	Potencial		
Ferrocenoylpolythia crown ether(FcTC)-Nafion-modified GC electrode	ASV	1·nM	5 min	-0,5 V (vs. SCE)	Pelo, orina, agua natural y residual	Gao et al., 1991
Gold film-GC	PSA	15 ng/L	10 min	-0,25 V (vs. SCE)	Agua de río y de mar	Pinilla y Ostapczuk, 1994
Modified with gold and gold-nafion thick film graphite electrode (MDTFGE)	DPASV		120 s	-0,3 V (vs. Ag/AgCl)	s.a	Stojko et al., 1998
Thick film electrodes modified with a gold (III)/pyrrolidinedithiocarbamate (PDC)	DPASV	5 ng/L	300 s	-1,1 V (vs. Ag/AgCl)	Agua de río	Faller et al., 1999
Rotating gold disk electrode	SWASV	0,05 nM	120 s	-0,4 V (vs. Ag/AgCl)	Orina y agua residual	Bonfil et al., 2000
Gold wire electrode	PSA		3-5 min	-0,3 V (vs. AgAgCl)	Agua de lago ( <i>in situ</i> )	Daniele et al., 2000
	SWASV		2-10 min	-0,4 V (vs. AgAgCl)		
SAM of 2-mercaptobenzimidazole (MBI) - Gold electrode	ASV	Sub-ppm	10 min	-0,7 V (vs. SCE)	s.a	Berchmans et al., 2000
Rotating gold disk electrode	ASV	20 ng/L	10 min	0,0 V (vs. Ag/AgCl)	s.a	Ermakov et al., 2001
	ASV (act.elec)	2 ng/L	5 min			
Calix[4]arene-modified GCE	SWASV	5 ng/mL	360 s	-0,6 V (vs. Ag/AgNO <sub>3</sub> )	Agua de río y residual	Lu et al., 2003

Electrodo	Técnica utilizada	LOD	Deposición		Aplicación	Referencias
			Tiempo	Potencial		
Organo-clay-modified carbon paste electrodes (OCMCPEs)	ASV	78 nM	10 min	-0,6 V (vs. Ag/AgCl)	Agua de río	Tonle et al., 2005
Sonogel-carbon electrode modified with poly-3-methylthiophene	DPASV	1,4 ng/mL	30 min	-0,5 V (vs. Ag/AgCl)	Agua residual	Zejli et al., 2005
Gold ultra-microelectrode	ASV	3,2 ng/mL	30 s	-0,2 V (vs. SCE)	Agua de río	Ordeig et al., 2006
Gold film electrodes	PSA	300 ng/L	300 s	0,3 V (vs. Ag/AgCl)	Orina	Munoz et al., 2006
Gold film electrodes	PSA	5 ng/g	5 min	0,3 V (vs. Ag/AgCl)	Peces y gambas	Augelli et al., 2007
Solid gold electrode	SWASV	0,40 ng/mL	120 s	0,0 V (vs. Ag/AgCl)	s.a	Giacomino et al., 2008
Gold film electrode	DPASV	0,17 ng/mL	60 s	0,2 V (vs. Ag/AgCl)	Sal de mesa	Okçu et al., 2008
Gold electrodes on CD's	PSA	0,30 ng/mL	600 s	0,3 V (vs. SCE)	Pescado	Radulescu y Danet, 2008
Gold nanoparticle-GCE	SWASV	0,15 ng/L	120 s	0,0 V (vs. Ag/AgCl)	Agua potable, sedimentos y medicamentos	Abollino et al., 2008
Gold nanoelectrode ensembles	SWASV	0,02 ng/mL	100 s	-0,35 V (vs. Ag/AgCl)	Agua de río	Jena y Raj, 2008
Gold nanoparticles-carbon nanotubes-GCE (AuNPs-CNTs-GCE)	DPASV	0,02 ng/mL	5 min	0,0 V (vs. Ag/AgCl)	s.a	Xu et al., 2008
Mercury-specific oligonucleotide probe-modified gold nanoparticles	SWASV	100 ng/L	60 min	0,25 V (vs. Ag/AgCl)	s.a	Zhu et al., 2009
Gold nanoparticle-GCE	SWASV	0,15 ng/L	120 s	0,0 V (vs. Ag/AgCl)	Disoluciones sintéticas	Abollino et al., 2009
Bimetallic Au-Pt nanoparticles-organic nanofibers-GCE	SWASV	8 ng/L	5 min	0,5 V (vs. SCE)	Agua de grifo y de río	Gong et al., 2010b

Electrodo	Técnica utilizada	LOD	Deposición		Aplicación	Referencias
			Tiempo	Potencial		
2-mercaptobenzothiazole-3D gold micro/nanopore array electrode	SWASV	2 nM	5 min	-0,7 V (vs. Ag/AgCl)	Agua de grifo	Fu et al., 2010
Gold nanoparticle-GCE	SWASV	0,15 ng/L	120 s	0,0 V (vs. Ag/AgCl)	Sedimento, cenizas, algas marinas, atún, plantas marinas, agua potable y gel ocular.	Abollino et al., 2010
Gold nanoparticles graphene electrode	SWASV	6 ng/L	5 min	-0,2 V (vs. SCE)	Agua de río	Gong et al., 2010a
Thiolated amino acids-gold nanoparticles composite electrodes	SWASV	0,46 ng/mL			Agua de grifo y residual	Safavi y Farjami, 2011
Mercury imprinted polymer sensor	DPASV	0,52 nM			Agua de grifo, de lago y de río	Alizadeh et al., 2011
Vibrating gold microwire electrode	DPASV	0,07 ng/mL	30 s	-1,2 V (vs. Ag/AgCl)	Agua de río	Alves et al., 2011
Carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan	ASV	2,4 nM	240 s	-0,6 V (vs. Ag/AgCl)	Agua natural y residual	Janegitz et al., 2011
Nitro benzoil diphenylmethylen phosphorane-carbon paste electrode	SWASV	8,2 ng/mL	210 s	-0,9 V (vs. Ag/AgCl)	Agua, pelo, pescado y plantas comestibles	Afkhami et al., 2012a
Gold nanoparticles electrodeposited on GCE	SWASV	0,42 nM	300 s	0,0 V (vs. Ag/AgCl)	s.a	Hezard et al., 2012

Electrodo	Técnica utilizada	LOD	Deposición		Aplicación	Referencias
			Tiempo	Potencial		
5-mercapto-1-methyltetrazole carbon paste electrode	SWASV	23 nM	10 min	-0,8 V (vs. Ag/AgCl)	Agua subterránea y de río	Sánchez et al., 2012
Cysteamine covalent functionalization of graphene electrode	SWASV	3 nM			s.a	Zhou et al., 2012
DNA linked-gold nanoparticle electrode	DPASV	7,4 pM			s.a	Tang et al., 2012
Electropolymerized ion imprinting poly(2-mercaptobenzothiazole) film on gold nanoparticles/single-walled CNTs-GCE	DPASV	0.08 nM	12 min	-0,8 V (vs. Ag/AgCl)	Agua natural	Fu et al., 2012
Gold nanoparticles sol-gel modified Pt wire electrode	DPASV	0,06 nM	90 s	0,37 V (vs. Ag/AgCl)	Pescado y arroz	Ensafi et al., 2012
New synthesized Schiff base-multiwalled CNTs-carbon paste electrode	SWASV	0,9 nM	90 s	-1,2 V (vs. Ag/AgCl)	Agua residual y de mar, tabaco y dientes	Afkhami et al., 2012b
Chemically modified multiwalled-CNTs	DPASV	1,0 pM	40 s	-0,6 V (vs. Ag/AgCl)	Agua potable, contaminada e industrial	Kempegowda y Malingappa, 2012
Ion imprinted porphyrin multiwalled-CNTs-GCE	DPASV	5,0 nM	100 s	-1,0 V (vs. Ag/AgCl)	Agua subterránea y residual	Rajabi et al., 2013

s.a: sin aplicación

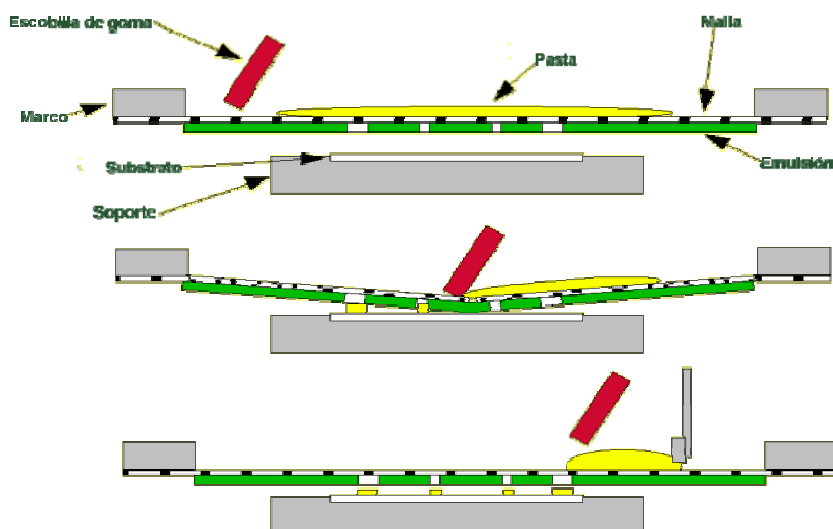
Si se tiene en cuenta que uno de los principales retos a los que se está enfrentando la Química Analítica es al desarrollo de métodos que puedan dar respuesta a la creciente necesidad de realizar análisis rápidos *in situ*, la sustitución de los electrodos convencionales por unos nuevos dispositivos conocidos como electrodos serigrafados o impresos (SPE) (Domínguez-Renedo et al., 2007; Alves et al., 2011) ha abierto nuevas oportunidades para aplicar las técnicas electroquímicas en laboratorios descentralizados (Li et al., 2012). Independientemente de la naturaleza química de las matrices, los SPE están demostrando ser sensores electroquímicos apropiados para el análisis *in situ* debido a su respuesta lineal y rápida, baja demanda de energía, alta sensibilidad, bajo coste y capacidad de funcionar a temperatura ambiente (Li et al., 2012).

Estos electrodos impresos son dispositivos fabricados sobre varios tipos de bases cerámica o plástica donde se serigrafían el electrodo de trabajo, el electrodo auxiliar y el electrodo de referencia (Figura 1.6).



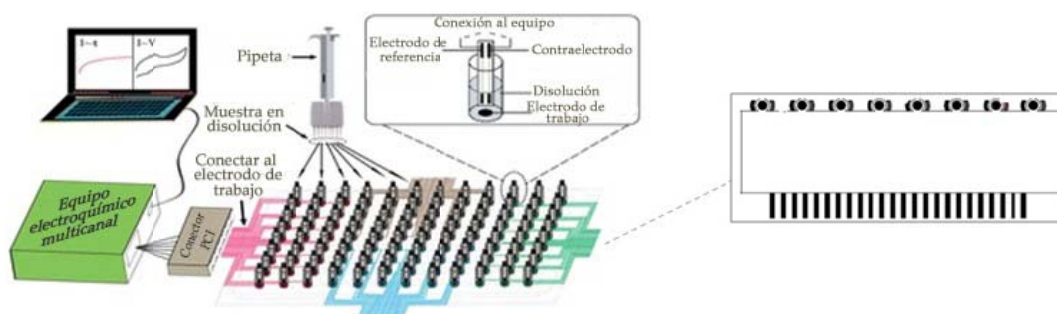
**Figura 1.6.** Diferentes tipos de electrodos impresos comerciales

La composición de dichos electrodos determina la sensibilidad y selectividad necesaria para cada análisis (Domínguez-Renedo et al., 2007). Así, los SPE pueden ser fabricados en el laboratorio o pueden adquirirse comercialmente con alguna de las diferentes configuraciones que existen (Li et al., 2012) (Figura 1.7). Son dispositivos baratos y muy versátiles ya que pueden modificarse, incluso fabricarse modificados, en función de su aplicación o para introducir mejoras en la detección (Domínguez-Renedo et al., 2007; Li et al., 2012). Se conectan a un potenciostato portátil y pueden utilizarse en modo estático (sensor en gota), modo hidrodinámico (celda electroquímica convencional) o dentro de sistemas en flujo (Masawat et al., 2003; Bengoechea-Álvarez et al., 2008).



**Figura 1.7.** Esquema general de fabricación de electrodos impresos

Además de presentar ventajas en cuanto a la rapidez en el análisis, los electrodos impresos ofrecen la posibilidad de llevar a cabo la calibración y el análisis de las muestras con un mismo dispositivo, así como el análisis simultáneo de muestras desconocidas (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Electrodo impreso múltiple para análisis simultáneo de varias muestras

El verdadero potencial que tiene este tipo de electrodos impresos miniaturizados y desechables, está reflejado en la gran cantidad de artículos científicos que se han publicado en los últimos años. Las revisiones realizadas por Honeychurch y Hart, 2006, Domínguez-Renedo et al., 2007 y, más recientemente, Li et al., 2012, son el reflejo de la gran aplicabilidad que han demostrado estos sensores en los campos del análisis medioambiental, biológico, industrial o biomédico para la detección de metales pesados, contaminantes orgánicos o radioisótopos, entre otras muchas sustancias.

En el caso concreto de la aplicación de estos sensores para la determinación de Hg(II) existen en la literatura muy pocas referencias. Wang y Tian (1993) utilizaron electrodos impresos de carbono recubiertos con oro para la determinación de trazas de Hg(II) mediante PSA y más recientemente, Laschi et al (2006) y Meucci et al (2009) han utilizado electrodos impresos de oro (SPGE), con los electrodos auxiliar y de referencia de carbono y plata, respectivamente, para la determinación de Hg (II) en agua y en pescado mediante SWASV. Mandil et al (2010) describen la utilización de electrodos impresos de carbono modificados con película de oro y,

éstos mismos, modificados con tioles asociados a partículas magnéticas sintetizadas en el laboratorio, para la determinación de Hg (II) en agua potable.

Al igual que con los electrodos convencionales, la tendencia en el campo de los electrodos impresos va encaminada a la modificación de la superficie de los electrodos de trabajo para mejorar los límites de detección y abrir aún más sus posibilidades de aplicación. En 2011 Arduini et al., describen la determinación de Hg (II) en muestras de agua potable, asociado con tioles en disolución, utilizando electrodos impresos modificados con una disolución comercial de negro de carbón. Por otro lado, Niu et al., (2011) consiguen mejores límites de detección utilizando electrodos impresos con película de antimonio modificada con nanotubos de carbono, para la determinación de Hg (II) en muestras de agua fortificadas, mediante SWASV.

### **1.2.7. ANTECEDENTES SOBRE LA APLICACIÓN DE ULTRASONIDOS COMO TÉCNICA DE PRETRATAMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE MERCURIO**

A pesar del progreso y la mejora de la instrumentación analítica, la obtención de resultados fiables sigue dependiendo, significativamente todavía, de la etapa previa de preparación de las muestras (Priego-Capote and Luque de Castro, 2007).

Las técnicas convencionales de digestión o extracción de mercurio en medio ácido, que implican altas temperaturas y, a menudo, alta presión, presentan importantes inconvenientes relacionados, principalmente, con el alto riesgo de pérdidas por volatilización, la contaminación de las muestras y la elevada cantidad de reactivos y tiempo que consumen dichos procedimientos (Río-Segade and Bendicho, 1999; Collaisol et al., 2004). Sin embargo, el empleo de metodologías de extracción sólido-líquido asistida por microondas o ultrasonidos ha conseguido dar solución a los inconvenientes de las técnicas convencionales, facilitando y acelerando el proceso de extracción de este analito (Reyes et al., 2008).

La característica principal de la energía ultrasónica como herramienta de pretratamiento en el análisis químico, se basa en el conocido fenómeno de cavitación. Cuando una onda ultrasónica pasa a través de un líquido, la presión oscilante de dicha onda implica la generación e implosión de burbujas de gas en su interior, generándose condiciones extremas de temperatura y presión que dan lugar a la termólisis del soluto y la formación de radicales, induciendo drásticas condiciones reactivas en el medio líquido. Además si hay un sólido presente en disolución, el tamaño de partícula disminuye por ruptura, incrementando la superficie total del sólido en contacto con el disolvente y favoreciendo el proceso de extracción (Collaisol et al., 2004; Capelo et al., 2005; Priego-Capote y Luque de Castro, 2007; Tadeo et al., 2010).

De la instrumentación disponible, el baño de ultrasonidos y la sonda de ultrasonidos son los más comúnmente utilizados. En el primero, las ondas ultrasónicas llegan indirectamente a través de las paredes del recipiente que contiene la muestra, mientras que la sonda, que se introduce dentro de la muestra, lleva a cabo la ultrasonicación directamente sobre la disolución con una mayor eficacia, control y menor consumo de tiempo y reactivos (Zhang et al., 2011). Para llevar a cabo la extracción con ultrasonidos hay que estudiar también la influencia de otros parámetros, como el reactivo utilizado para la extracción, cuya concentración es crítica.



ca en el desarrollo del proceso, y las propiedades de la matriz que se va a someter al proceso de extracción, como son la homogeneidad de la muestra y el tamaño de partícula (Capelo et al., 2005)

Así pues, la técnica de extracción asistida por ultrasonidos es especialmente atractiva para la extracción de mercurio al permitir el pretratamiento de las muestras de un modo eficaz, simple, barato y a temperatura ambiente, capaz de evitar el problema bien documentado de volatilización de mercurio durante esta etapa. En este sentido, la aplicación de la energía de ultrasonidos puede ser una alternativa más apropiada en comparación con otros procedimientos más sofisticados basados en la digestión en recipientes cerrados que, por el contrario, se llevan a cabo a presión y temperatura elevadas. En concreto, se encuentran descritos en la bibliografía algunos métodos de extracción en medio ácido del Hg inorgánico presente en muestras de orina (Munoz et al., 2006) y pescado (Reyes et al., 2008), utilizando el baño de ultrasonidos. Asimismo, se describe también el desarrollo y aplicación de métodos que utilizan la sonda de ultrasonidos para la extracción de Hg a partir de tejidos de mejillón (Bendicho et al., 2012), suelo y sedimentos (Collaisol et al., 2004), orina humana (Capelo et al., 2006), varios tipos de pescado (López et al., 2010), y muestras de polvo atmosférico (Palomo-Marín et al., 2011), previamente a su determinación mediante las técnicas espectrométricas anteriormente descritas.

### **1.2.8. LA ESPECTROSCOPIA DE IMPEDANCIA ELECTROQUÍMICA COMO HERRAMIENTA PARA LA CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL**

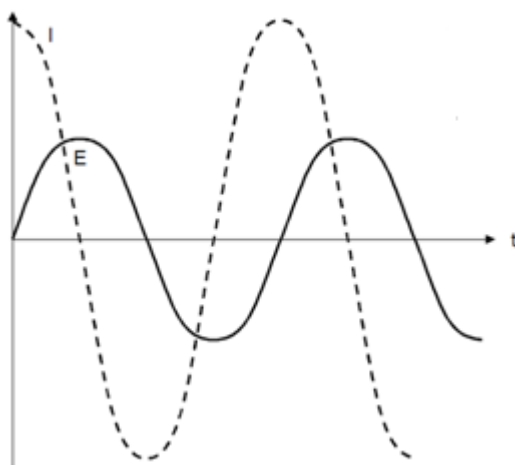
En el campo de la investigación en electroquímica, las características propias de las técnicas aplicadas, que ya se han mencionado en apartados anteriores, es lo que hace que continúe existiendo un interés especial por el desarrollo de sensores para la detección de una gran variedad de analitos. La comercialización o fabricación en el laboratorio de electrodos impresos ha abierto nuevas oportunidades para la aplicación de estas técnicas *on site*, en unas condiciones distintas a las utilizadas comúnmente en el laboratorio con los electrodos más convencionales.

A pesar de que el éxito en la aplicación de estos sensores depende de la composición y estabilidad de su compleja superficie, las cuales se pueden ver afectadas por los tratamientos y temperaturas involucradas en el propio proceso de impresión, poco se sabe todavía acerca de la naturaleza de las reacciones que ocurren en ella. Tal como se describe en la bibliografía, la voltamperometría cíclica (CV) y la microscopía de barrido electrónico (SEM) son las técnicas más utilizadas en la caracterización superficial de dichos electrodos (Fanjul-Bolado et al., 2008; García-González et al., 2008; Kadara et al., 2009a; Kadara et al., 2009b). Sin embargo, estos sistemas electroquímicos pueden ser estudiados también con métodos basados en mediciones de impedancia (Pejčić and De Marco, 2006; Chang and Park, 2010), que aunque ha sido extensamente aplicada para llevar a cabo estudios de corrosión de materiales, en los últimos años se ha visto incrementada su utilización en la caracterización de sensores electroquímicos (Gouveia-Caridade, 2008).

La técnica de la espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS) se basa en la aplicación de una pequeña perturbación al electrodo en forma de corriente alterna. Normalmente, la

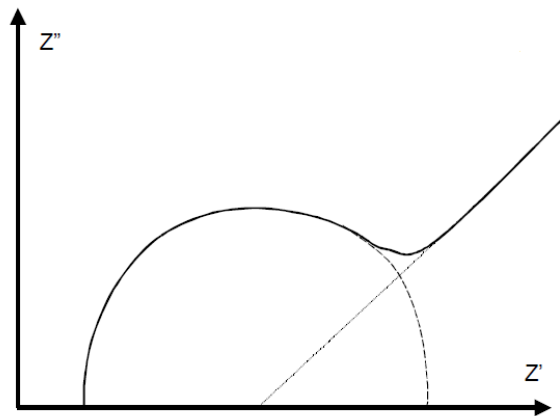
perturbación es aplicada en el potencial, siendo medida posteriormente la corriente resultante, a diferentes frecuencias. No obstante, dicha perturbación puede corresponder a la corriente aplicada o a la velocidad de convección cuando se trabaja con sensores en modo hidrodinámico. La ventaja principal de que la perturbación aplicada sea pequeña es que se simplifican las ecuaciones matemáticas que describen los fenómenos implicados en EIS, ya que se pueden utilizar formas límite de estas ecuaciones, que son típicamente lineales (Oliveira-Brett and Brett, 1996).

La impedancia ( $Z$ ) no es más que un término que va a describir la resistencia, en este caso del sensor electroquímico, cuando se aplica una señal en un circuito de corriente alterna. Es lo que correspondería al término de resistencia ( $R$ ) en la Ley de Ohm, que define los circuitos de corriente continua. La respuesta obtenida es de tipo sinusoidal y puede diferir en fase y amplitud con respecto al potencial aplicado. La medida de esas diferencias permite el análisis de los procesos que tienen lugar en la superficie del electrodo. Como se observa en la Figura 1.9, la impedancia correspondería con el factor de proporcionalidad entre  $E$  (potencial aplicado) e  $I$  (corriente resultante), donde hay variación con el tiempo (Gouveia-Caridade, 2008).



**Figura 1.9.** Representación del potencial ( $E$ ) y la corriente ( $I$ ) con el tiempo, en un circuito de corriente alterna

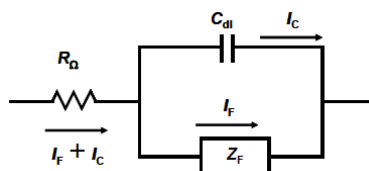
La impedancia, por su parte, depende de la frecuencia de la perturbación aplicada; por eso, se va a obtener una respuesta para cada frecuencia seleccionada dentro de un determinado intervalo, dando lugar a gráficos de impedancia en el plano complejo (o diagrama de Argand) donde se consideran sus términos real (eje de ordenadas,  $Z'$ ) e imaginario (eje de abscisas,  $-Z''$ ) según establecen las ecuaciones matemáticas que la definen (Figura 1.10).



**Figura 1.10.** Gráfico de impedancia en el plano complejo para un sistema electroquímico simple

En sistemas electroquímicos reales, la impedancia experimental es siempre obtenida como resultados de la combinación, en serie o en paralelo, de una resistencia y una capacitancia (Oliveira-Brett and Brett, 1996). En principio, cualquiera de estos sistemas puede ser representado por un modelo eléctrico. Así, una interfase electrodo/electrolito donde ocurra una determinada reacción electroquímica puede asemejarse a un circuito eléctrico formado por un conjunto de resistencias, condensadores e inductores. Es en esta analogía donde reside una de las principales ventajas de la impedancia electroquímica, ya que permite la caracterización de un sistema electroquímico a través de un circuito eléctrico equivalente (Gouveia-Caridade, 2008). A estos circuitos pueden adicionarse otros elementos como pueden ser el elemento de Warburg o el de fase constante, según las características del sistema estudiado.

El objetivo de esta técnica será, por tanto, medir los valores de  $Z'$  y  $Z''$  para perturbaciones con varias frecuencias y proponer un circuito equivalente lo más cercano posible a la realidad física que se ajuste a la misma respuesta. No obstante, hay que tener en cuenta que un determinado sistema puede originar varios circuitos equivalente válidos, bien porque dos o más circuitos presentaran respuestas idénticas o porque los resultados obtenidos de las experiencias en EIS pudieran ser ajustados a varios circuitos eléctricos equivalentes. Por esta razón, es importante escoger siempre aquel circuito en el que los elementos seleccionados tengan sentido físico. En la Figura 1.11 se muestra un ejemplo de un circuito eléctrico equivalente (o circuito de Randles) para un proceso de electrodo simple.



**Figura 1.11.** Circuito eléctrico equivalente para un proceso de electrodo simple  
(Fuente: Oliveira-Brett and Brett, 1996)

Por lo general, los procesos de electrodos reales son más complejos y su análisis a través de EIS se hace más complicado de lo que se ha descrito hasta ahora. Así, otro factor que hay que tener en cuenta está relacionado con la dependencia de la impedancia de una interfase con su estructura microscópica, que es especialmente importante en el caso de los electrodos sólidos,

y que puede influir significativamente en la forma de los espectros de impedancia obtenidos. En este tipo de electrodos se observan desviaciones de la idealidad, por lo que el circuito eléctrico equivalente asociado no puede estar compuesto tan solo por una resistencia y una capacitancia. La impedancia en estos casos pasa a ser descrita por un elemento de fase constante, CPE, que representa un condensador no ideal cuyo valor depende de un parámetro de rugosidad  $\alpha$ , que puede variar entre 0.5 y 1, siendo  $\alpha = 1$  el valor asociado con un electrodo liso de comportamiento ideal (Gouveia-Caridade, 2008).

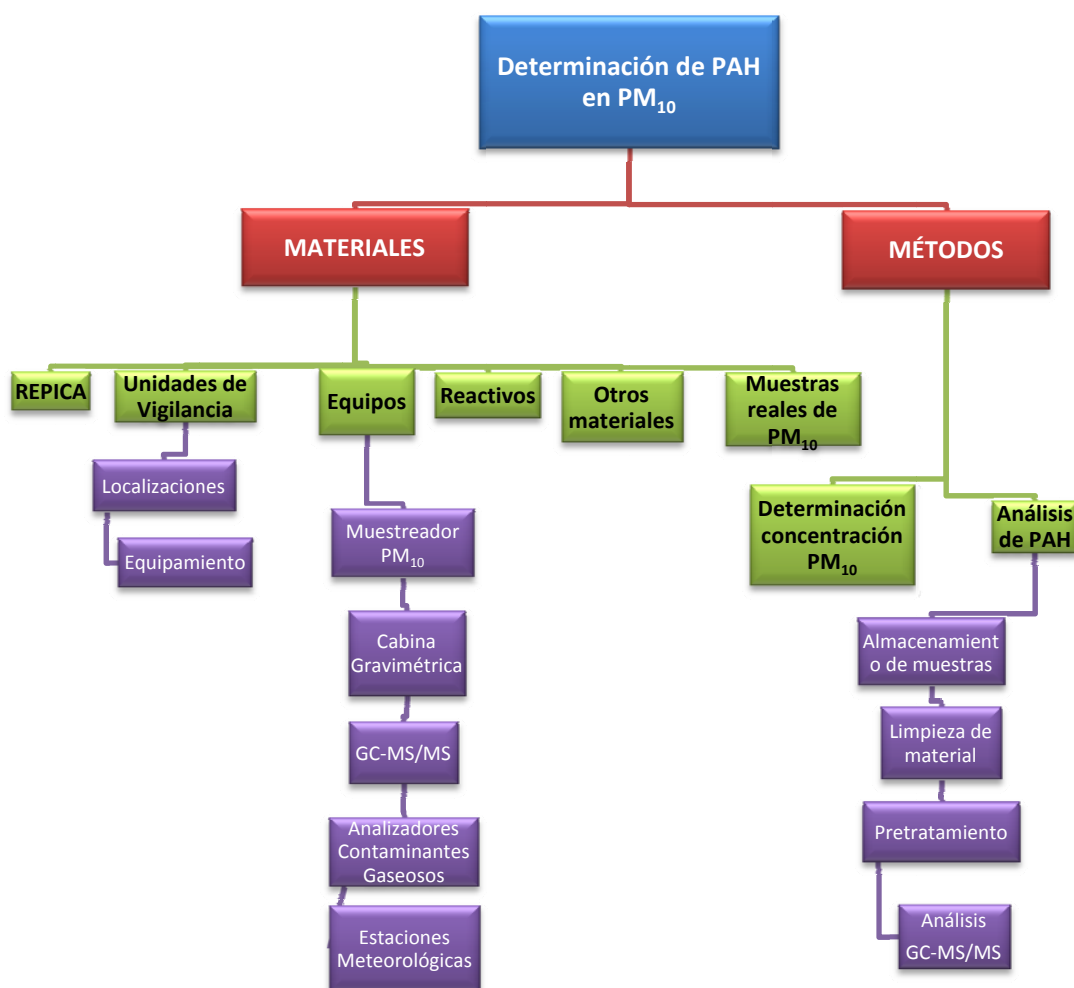
## Capítulo 2. Materiales y Métodos



En este capítulo se presentan los materiales y métodos utilizados para la determinación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el material particulado atmosférico y para la determinación de Hg(II) en diversas matrices ambientales. El capítulo se ha estructurado en dos partes diferenciadas, donde se detallan el material e instrumentación utilizada y las diferentes metodologías aplicadas para cada uno de los analitos estudiados.

## 2.1. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN EL MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

Esta primera parte del capítulo describe los materiales y métodos utilizados en el presente trabajo para la determinación de los PAH en el material particulado atmosférico. A continuación, se muestra un esquema global donde se resumen los principales apartados que se van a desarrollar.



## 2.1.1. MATERIALES

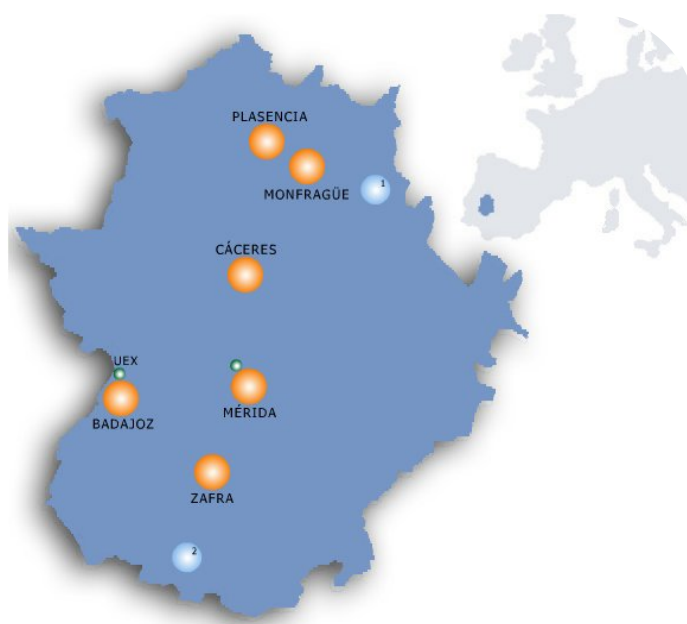
### 2.1.1.1. LA RED EXTREMEÑA DE PROTECCIÓN E INVESTIGACIÓN DE LA CALIDAD DEL AIRE (REPICA)

Las muestras de aerosoles analizadas en este trabajo proceden de cinco de las unidades fijas y de las dos unidades móviles de monitorización atmosférica pertenecientes a la Red Extremeña de Protección e Investigación de la Calidad del Aire (REPICA).

En la actualidad, la red está constituida por:

- Seis unidades fijas para la monitorización continua de la calidad del aire. Cinco están ubicadas en entornos urbanos (Badajoz, Cáceres, Mérida, Zafra y Plasencia) y una en entorno rural (Parque Nacional de Monfragüe).
- Dos unidades móviles de vigilancia atmosférica con las mismas características técnicas que las unidades fijas, para permitir la monitorización del aire en otras localidades o entornos rurales de la región mediante campañas periódicas.
- Un centro de procesamiento de datos, situado en la Consejería de Industria, Energía y Medioambiente de la Junta de Extremadura (Mérida).
- Dos laboratorios analíticos localizados en el Departamento de Química Analítica de la UEx y en el Servicio de Protección Ambiental, sección de Sostenibilidad Ambiental de la Junta de Extremadura, respectivamente.

En la Figura 2.1, se han representado en verde los laboratorios analíticos, en azul las unidades móviles y en naranja las estaciones fijas.



**Figura 2.1.** Mapa de la estructura de REPICA



## 2.1.1.2. UNIDADES DE VIGILANCIA ATMOSFÉRICA: LOCALIZACIONES

### BADAJOZ

Ciudad situada al noroeste de la provincia, de la que es capital, y a escasa distancia de la frontera portuguesa. Su término municipal ocupa una superficie de 1.470 km<sup>2</sup> siendo el tercero más extenso de España (Mora Aliseda, 2001).

Cuenta con 151.214 habitantes (INE, 2011), lo que representa el 21,4 % de la población total de su provincia y el 13,3 % de la comunidad extremeña.

El sector servicios es el dominante en la ciudad. El comercio se nutre de clientes de la provincia y de Portugal, debido a importancia de las relaciones comerciales con este país. También representa un importante nudo de comunicaciones con el país vecino, estando prevista la construcción de una plataforma logística y la llegada del tren de alta velocidad. La ciudad cuenta, asimismo, con un aeropuerto, situado a unos 14 km de distancia (Diputación de Badajoz, 2008).

El análisis de los datos climáticos en Badajoz revela la confluencia de características generales de varios dominios climáticos peninsulares. La influencia continental se manifiesta en la inexistencia de estaciones intermedias bien definidas pero se ve atenuada por una evidente influencia atlántica que suaviza las temperaturas invernales (temperaturas raras veces menores de 0 °C). La influencia del dominio climático mediterráneo queda patente en unos veranos muy calurosos (temperaturas cercanas a los 45 °C) y la irregularidad del régimen de precipitaciones, con una media anual de 476 mm. La humedad relativa del aire no es elevada. Los vientos más frecuentes son del oeste-suroeste y generalmente son suaves. No obstante, es frecuente la aparición de nieblas por la proximidad del río Guadiana (Mora Aliseda, 2001).



Figura 2.2. Ubicación de la unidad de Badajoz

La unidad fija de vigilancia atmosférica de Badajoz (Figura 2.2) está clasificada como una estación suburbana de fondo y está situada en las Instalaciones Deportivas de la Universidad de Extremadura en la Avenida de Elvas s/n. Sus coordenadas geográficas, se muestran en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** Datos geográficos de la unidad fija de vigilancia atmosférica de Badajoz

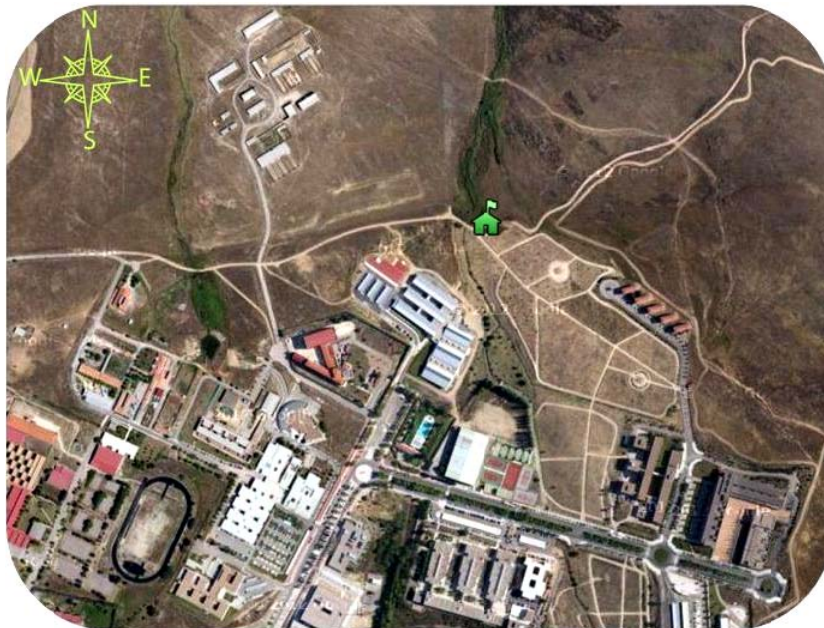
Latitud	Longitud	Altitud (m)
38°53' 12" N	6°58' 15" O	185

## CÁCERES

Ciudad situada en la zona central de Extremadura. Su término municipal ocupa una superficie total de 1.768 km<sup>2</sup>, siendo el segundo más extenso de España (Mora Aliseda, 2001).

Cuenta con 95.616 habitantes (INE, 2011) por lo que es la ciudad más poblada de la provincia, acumulando el 21,8 % de la población total de la misma. Es el principal centro comercial, administrativo y eje económico de la provincia y primer centro turístico de Extremadura en número de visitantes. Su economía se basa principalmente en el sector servicios, en el turismo y la construcción, con una creciente aportación del sector industrial centrado en industrias alimenticias, textiles, cerámicas y productos derivados del caucho (Diputación de Cáceres, 2008).

El clima de Cáceres es de tipo continental suavizado por la cercanía del Océano Atlántico. Muestra veranos secos y cálidos (con máximas de 35 °C y mínimas de 20 °C) e inviernos templados y húmedos (máximas de 10 °C y mínimas de -5 °C), mientras que las estaciones intermedias presentan una mayor variabilidad (Mora Aliseda, 2001).



**Figura 2.3.** Ubicación de la unidad de Cáceres

La unidad fija de vigilancia atmosférica de Cáceres (Figura 2.3) está clasificada también como una estación suburbana de fondo y está situada en las inmediaciones de la Facultad de

Ciencias del Deporte, Campus Universitario (carretera de Trujillo). Sus coordenadas geográficas, se muestran en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2.** Datos geográficos de la unidad fija de vigilancia atmosférica de Cáceres

Latitud	Longitud	Altitud (m)
39°29' 01" N	6°20' 37" O	365

## MÉRIDA

Ciudad situada al norte de la provincia de Badajoz. Es la capital autonómica y el núcleo institucional de Extremadura. Fue declarada Patrimonio de la Humanidad por la UNESCO en el año 1993. Su término municipal ocupa 865,6 km<sup>2</sup> (Mora Aliseda, 2001). Según los últimos datos, Mérida cuenta con una población de 57.810 habitantes (INE, 2011)

Está ubicada estratégicamente en el centro de las comunicaciones entre el norte y el sur a través de la vía de la plata. Posee una excelente red de transportes que se verán ampliadas próximamente con la línea ferroviaria del AVE que unirá Madrid con Lisboa. Es además una ciudad muy activa en relación al turismo, siendo el sector servicios la actividad predominante (Diputación de Badajoz, 2008).

El clima es del tipo mediterráneo continental con influencia atlántica, debido a la proximidad de la costa portuguesa. Tanto las precipitaciones como las temperaturas presentan una acusada estacionalidad. La temperatura media anual se sitúa en los 16,65 °C, siendo los meses de diciembre y enero los más fríos, mientras que las máximas se registran en julio y agosto (Mora Aliseda, 2001).



**Figura 2.4.** Ubicación de la unidad de Mérida

Al igual que las dos anteriores, la unidad fija de vigilancia atmosférica de Mérida (Figura 2.4) está clasificada como una estación suburbana de fondo y se encuentra situada en el Centro

Universitario, en la calle Santa Teresa de Jornet, 38. Sus coordenadas geográficas, se muestran en la Tabla 2.3.

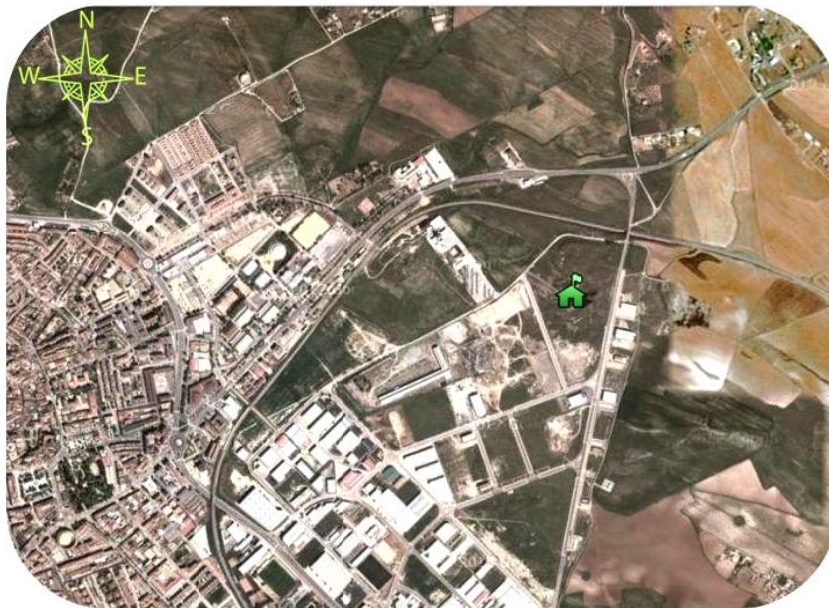
**Tabla 2.3.** Datos geográficos de la unidad fija de vigilancia atmosférica de Mérida

Latitud	Longitud	Altitud (m)
38°54' 23" N	6°20' 18" O	214

## ZAFRA

Ciudad situada al suroeste de la provincia de Badajoz, es uno de los municipios más importantes de ésta. Topográficamente está localizada entre la llanura propia de la comarca de Tierra de Barros y la penillanura sur de la región (Mora Aliseda, 2001). Su término municipal ocupa 62,6 km<sup>2</sup> y cuenta con una población de 16.677 habitantes (INE, 2011).

Zafra está ubicada también estratégicamente en el centro de un importante nudo de comunicaciones que unen varias capitales provinciales y regionales (Badajoz, Mérida, Sevilla, Huelva y Córdoba). El sector servicios es la actividad predominante, seguida de la construcción y la industria (Diputación de Badajoz, 2008).



**Figura 2.5.** Ubicación de la unidad de Zafra

En lo que se refiere al clima, Zafra posee un clima mediterráneo templado, cuya característica principal es la inexistencia de estaciones intermedias, dando lugar a una brusca sucesión del verano, muy cálido y seco, y el invierno con suaves temperaturas y cierta humedad, fruto de la presencia de borrascas de origen atlántico. En cuanto a la pluviometría, los periodos secos se mezclan con las lluvias torrenciales (Mora Aliseda, 2001).

La unidad fija de vigilancia atmosférica de Zafra (Figura 2.5) está clasificada también como una estación suburbana de fondo, aunque la densidad de población y la extensión geográfica sea notablemente menor que en el resto de estaciones urbanas pertenecientes a REPICA. Se

encuentra situada en el Polígono Industrial Los Caños. Sus coordenadas geográficas, se muestran en la Tabla 2.4.

**Tabla 2.4.** Datos geográficos de la unidad fija de vigilancia atmosférica de Zafra

Latitud	Longitud	Altitud (m)
38°25' 41" N	6°23' 50" O	551

## MONFRAGÜE

La comarca de Monfragüe está situada en el valle del Tajo, en el centro de la provincia de Cáceres. El global de la mancomunidad cuenta con una población de unos 8.701 habitantes (INE, 2008). Se trata de una zona muy simple orográficamente y muy importante en la región porque es donde se localiza el Parque Nacional de Monfragüe (BOE núm. 54, del 03/03/07).



**Figura 2.6.** Ubicación de la unidad de Monfragüe

A diferencia de las cuatro anteriores, la unidad fija de vigilancia atmosférica de Monfragüe (Figura 2.6) está clasificada como una estación rural regional de fondo y se encuentra situada en el Parque Nacional, concretamente en la finca Las Cansinas. Sus coordenadas geográficas, se muestran en la Tabla 2.5.

**Tabla 2.5.** Datos geográficos de la unidad fija de vigilancia atmosférica de Monfragüe

Latitud	Longitud	Altitud (m)
39°50' 37" N	5°56' 30" O	376



**Figura 2.7.** Modelo de unidad fija de monitorización de la calidad del aire

## **UNIDADES MÓVILES**

La Red Extremeña de Protección e Investigación de la Calidad del Aire dispone también de dos unidades móviles de vigilancia atmosférica (Figura 2.8) que recorren toda la región y que permiten monitorizar la calidad del aire en otras localidades o entornos rurales mediante campañas de medida. Así, la unidad móvil 1 se desplaza por la provincia de Cáceres, mientras que la unidad móvil 2 lo hace por la provincia de Badajoz. Como se ha comentado anteriormente, estas unidades móviles poseen el mismo equipamiento que el resto de estaciones fijas.



**Figura 2.8.** Modelo de unidad móvil de monitorización de la calidad del aire

En las Tablas 2.6 y 2.7 se resumen las campañas realizadas por las unidades móviles 1 y 2, respectivamente, durante el tiempo de muestreo seleccionado en este trabajo.

**Tabla 2.6.** Campañas realizadas por la unidad móvil 1

Ubicación	Inicio campaña	Final campaña
Ecoparque Mirabel	24/06/2008	27/06/2008
Jarandilla de la Vera	03/07/2008	31/08/2008
Navalmoral de la Mata	01/09/2008	19/01/2009

**Tabla 2.7.** Campañas realizadas por la unidad móvil 2

Ubicación	Inicio campaña	Final campaña
Llerena	01/07/2008	24/09/2008
Castuera	25/09/2008	02/03/2009

### 2.1.1.3. UNIDADES DE VIGILANCIA ATMOSFÉRICA: EQUIPAMIENTO

Todas las estaciones de vigilancia, tanto fijas como móviles, están equipadas con:

- Analizador de monóxido de carbono (excepto Monfragüe).
- Analizador de dióxido de azufre.
- Analizador de óxidos de nitrógeno.
- Analizador de ozono.
- Analizador de benceno, tolueno y xileno.

- Analizador de metano e hidrocarburos no metánicos.
- Monitor de partículas PM<sub>10</sub>, PM<sub>2,5</sub> y PM<sub>1</sub>.
- Captador de alto volumen para partículas.
- Sensor de dirección de viento.
- Sensor de velocidad de viento.
- Sensor de temperatura del aire.
- Sensor de humedad del aire.
- Sensor de presión atmosférica.
- Sensor de radiación solar.
- Sensor de ruido ambiental (sólo unidades móviles).
- Pluviómetro.
- Ordenador de adquisición de datos.
- Estabilizador de tensión.
- Dos equipos de aire acondicionado.
- Generador de aire cero.
- Calibrador.

#### **2.1.1.4. EQUIPOS UTILIZADOS**

##### **2.1.1.4.1. MUESTREADOR DE AEROSOL**

Para la captación de las partículas atmosféricas en suspensión se utilizó un muestreador automático de alto volumen Digitel (Digitel Elektronik AG, Hegnau, Suiza) modelo DAH-80, que opera con un flujo de aire de 30 m<sup>3</sup>/h, y un cabezal de corte para PM<sub>10</sub> (Figura 2.9).





**Figura 2.9.**Muestreador de alto volumen para PM<sub>10</sub>

Estos muestreadores consisten en unidades totalmente automáticas que permiten recoger con precisión muestras de aire dosificadas. El intervalo de caudales de aspiración, en ejecución normal, es de 100 a 1000 litros por minuto (de 6 a 60 metros cúbicos por hora). Las características principales de este muestreador son que permite el cambio automático de filtros, teniendo capacidad para 15 filtros en trabajo continuo, y que puede captar un caudal exacto de aire.

#### **2.1.1.4.2. CABINA GRAVIMÉTRICA**

El acondicionamiento y pesada de los filtros (fracción PM<sub>10</sub>) se realizó en una cabina según los criterios establecidos por la norma UNE-EN 12341, en la que se recogen las condiciones de trabajo para la determinación gravimétrica del material particulado en suspensión.

La cabina gravimétrica (Figura 2.10), según esta norma, tiene que estar acondicionada a una temperatura de  $20 \pm 1$  °C y una humedad relativa de  $50 \pm 5$  %. Para ello dispone de un sistema de aire acondicionado y un deshumidificador de aire, con los que se aseguran estas condiciones. Para controlar el grado de cumplimiento, la cabina cuenta también con un termohigrómetro Gemini Data Loggers, modelo Tinyview Plus (Reino Unido), que mide continuamente la temperatura y la humedad relativa y que está conectado a un ordenador donde se van descargando temporalmente los datos.



**Figura 2.10.** Cabina para la determinación gravimétrica del material particulado

Para la pesada de los filtros, la cabina está equipada con una microbalanza Mettler Toledo modelo AX205 Delta Range® con una precisión de 10 µg.

Por último, la cabina gravimétrica dispone de unas estanterías con rejillas en las que se colocan los filtros para su acondicionamiento. Estos, tal como exige la norma, tienen que permanecer en ella al menos 48 horas antes de ser pesados para su instalación en el muestreador.

#### **2.1.1.4.3. CROMATÓGRAFO DE GASES**

La determinación analítica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos extraídos de la fracción PM<sub>10</sub> del material particulado atmosférico, se lleva a cabo en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones Varian Saturn2000 (Varian, Inc., EE.UU) (Figura 2.11)



**Figura 2.11.** Cromatógrafo de gases utilizado para el análisis de los PAH

El equipo está formado por:

- Cromatógrafo de gases Varian modelo 3800.
- Inyector automático Varian modelo 8200 con capacidad para 48 viales.
- Detector trampa de iones Varian modelo Saturn2000.
- Columna capilar Varian Factor Four™ VF-5ms (30 m×0,25 mm×0,25 μm) cuya fase estacionaria es 5 %difenil-95 % dimetilpolisiloxano
- Pre-columna Varian CP8009 (2,5 m×0,53 mm)
- Bomba de vacío Edwards (Edwards High Vacuum International, Crawley Sussex, England).
- Trampa de oxígeno Varian CP17973.
- Helio (Air Liquide, pureza ≥ 99,999 %).
- Software que controla todos los componentes del sistema para llevar a cabo el análisis de forma automatizada.

#### **2.1.1.4.4. ANALIZADORES EN CONTINUO DE CONTAMINANTES GASEOSOS**

Para medir en continuo las concentraciones de algunos contaminantes gaseosos en el aire, las estaciones de vigilancia atmosférica están equipadas con analizadores específicos, tales como:

- Analizador de fluorescencia molecular para evaluar la concentración de dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) en el aire ambiente, del modelo SIR S-5001 (S.I.R., S.A., Grupo Bergé, España). Esta técnica se basa en la excitación electrónica de las moléculas del gas por incidencia de una radiación ultravioleta de longitud de onda específica. Cuando las moléculas de SO<sub>2</sub> vuelven al estado normal, emiten una radiación fluorescente característica que es proporcional al número de moléculas de SO<sub>2</sub> excitadas.
- Analizador quimioluminiscente para evaluar la concentración de óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) en el aire ambiente, del modelo SIR S-5012 (S.I.R., S.A., Grupo Bergé, España). Esta técnica se basa en la medida fotométrica de la quimioluminiscencia resultante de la reacción del NO con el O<sub>3</sub>. Se forma una molécula excitada (NO<sub>2</sub><sup>\*</sup>) que al volver a su estado fundamental, emite una radiación característica.
- Analizador de absorción infrarroja para evaluar la concentración de monóxido de carbono (CO) en el aire ambiente, del modelo SIR S-5006 (S.I.R., S.A., Grupo Bergé, España). Se trata de un analizador fotométrico no dispersivo basado en la absorción de radiación IR específica por el CO, la cual genera calor de forma proporcional al número de moléculas de CO presentes en la muestra.

- Analizador de absorción molecular UV para evaluar la concentración de ozono (O<sub>3</sub>) en el aire ambiente, del modelo SIR S-5014 (S.I.R., S.A., Grupo Bergé, España). El analizador mide directamente la concentración de ozono mediante la atenuación de la radiación UV monocromática producida por las moléculas de ozono en una celda óptica.

#### 2.1.1.4.5. ESTACIONES METEOROLÓGICAS

Las unidades de vigilancia atmosférica disponen de estaciones meteorológicas equipadas con:

- Sensor de temperatura y humedad del aire (marca Vaisala, modelo TH-010).
- Sensor de presión atmosférica (marca SIR, modelo PB-100).
- Sensor de precipitación (marca Young, modelo 52203).
- Sensor de radiación solar (marca Skye, modelo SKS-1110).
- Sensor de velocidad y dirección del viento (marca Young, modelo 3002).

#### 2.1.1.5. REACTIVOS

Los reactivos utilizados durante el proceso completo de extracción y análisis de los hidrocarburos aromáticos policíclicos son los siguientes:

- Multipatrón (LGC Promochem, Wesel, Alemania): 100 ± 1 µg/mL de cada analito en tolueno (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno).
- Patrones internos:
- 1-metilpireno (Ultra Scientific, North Kingstown, EE.UU): 10 ± 0,1 µg/mL en tolueno.
- Acenaftileno-d<sub>8</sub> (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, EE.UU): 200 µg/mL en isooctano
- Pireno-d<sub>10</sub> (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, EE.UU): 200 µg/mL en isooctano.
- Material de referencia certificado: NCS ZC 78002 PAH in Coal FlyAsh, aprobado por China National Analysis Center for Iron and Steel (Beijing, China) y suministrado por LGC Promochem (Wesel, Alemania).
- Tolueno para análisis de residuos por CG (Scharlau).
- Acetona multisolvent<sup>®</sup>, grado HPLC ACS ISO UV Vis (Scharlau).

- n-hexano, 96% multisolvent<sup>®</sup>, grado HPLC ACS ISO UV Vis (Scharlau).
- Acetonitrilo multisolvent<sup>®</sup>, grado HPLC ACS ISO UV Vis (Scharlau).
- Diclorometano estabilizado con aproximadamente 50 ppm de amileno multisolvent<sup>®</sup>, grado HPLC ACS ISO UV Vis (Scharlau).
- Agua Ultrapura (Equipo Ultramatic System, Wasserlab, Spain).

#### **2.1.1.6. OTROS MATERIALES**

- Material de vidrio: Balones de destilación de 250 y 500 mL, matraces de 2, 5 y 10 mL con tapón de vidrio, sistema refrigerante de doble camisa de 40 cm, perlas de ebullición, pipetas graduadas de 1, 5 y 10 mL con émbolo de vidrio, equipo de filtración, viales cónicos de micro-reacción de 5 mL, vasos de precipitados de 100 mL, sistema de evaporación en corriente de nitrógeno, columnas de vidrio para limpieza con llave de teflón, viales ámbar de 2mL e insertos de vidrio de 200 µL.
- Microjeringas: 10 µL y 50 µL (Agilent Technologies, EE.UU); 100 µL (Hamilton Company, Suiza).
- Manta calefactora PILZ<sup>®</sup> con regulación de energía y capacidad para matraces de 250 mL (IsopadTM, Tyco Termal Control, EE.UU).
- Evaporador rotativo Nahita serie 9200, equipado con baño termostatzado y bomba de vacío con membrana y cabezal de PTFE, con un caudal máximo de 20 L/min y un vacío final de 8 mbar (KNF Laboport, EE.UU).
- Bomba de membrana para filtración a vacío marca Nahita.
- Lana de vidrio lavada (Scharlau).
- Gel de sílice tipo 60, 0,06-0,2 mm y 0,04-0,06 mm para cromatografía en columna (Scharlau).
- Nitrógeno (Air Liquide, pureza ≥ 99,999%).
- Filtros de fibra de vidrio Albet circulares de 150 mm de diámetro.
- Filtros de fibra de cuarzo Schleicher&Schuell circulares de 150 mm de diámetro.

#### **2.1.1.7. MUESTRAS REALES**

En este trabajo se han analizado un total de 72 muestras de material particulado atmosférico (PM<sub>10</sub>) recogido durante 24 horas consecutivas, con un flujo de aire de 30 m<sup>3</sup>/h, sobre filtros de fibra de cuarzo en los captadores de partículas de alto volumen situados en las estaciones fijas de vigilancia atmosférica de Badajoz, Cáceres, Mérida, Monfragüe y Zafra, y en las dos unidades móviles que recorren las dos provincias. La toma de muestras se realizó durante el periodo de tiempo comprendido entre marzo de 2008 y enero de 2009.

## 2.1.2. MÉTODOS

### 2.1.2.1. MUESTREO Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PM<sub>10</sub>

La toma de muestras se llevó a cabo sobre filtros de fibra de cuarzo de la marca Schleicher&Schuell en captadores de partículas con cabezal para PM<sub>10</sub> colocados en las unidades fijas y móviles de vigilancia atmosférica de REPICA.

El procedimiento estándar utilizado para la pesada de los filtros, según la norma UNE-EN 12341, es el siguiente:

- Se eliminan, mediante agitación suave, los posibles restos de fibra que pudieran quedar adheridos sobre los filtros blancos.
- A continuación, se colocan los filtros sobre la estantería de rejillas en la cabina gravimétrica para su acondicionamiento a una temperatura de  $20 \pm 1$  °C y una humedad relativa de  $50 \pm 5$  % controladas. Los filtros se mantienen en esas condiciones al menos 48 horas antes de la pesada y su retirada para el muestreo.
- Los filtros acondicionados se pesan en una balanza analítica, instalada en la cabina gravimétrica, con una resolución de al menos 10 µg y se anota la pesada en una ficha de control junto con su código de referencia.
- Finalmente, los filtros pesados y envueltos en papel de aluminio se introducen en sobres previamente identificados y se almacenan en la cabina hasta su recogida.

Una vez que los filtros son transportados a las estaciones de vigilancia atmosférica, se colocan en el portafiltros del captador de PM<sub>10</sub> donde comienza la toma de muestras. El tiempo total de muestreo por filtro es de 24 horas consecutivas y el volumen final de aire que pasa a través de ellos es, aproximadamente, 750 m<sup>3</sup>.

Finalizado el muestreo, los filtros se recogen, se almacenan doblados por la mitad en los sobres con sus referencias y se devuelven al laboratorio, donde se inicia de nuevo el procedimiento estándar para la pesada (colocación, acondicionamiento y pesada de filtros con partículas) establecido por la norma UNE-EN 12341.

Durante todo el procedimiento se utilizan guantes libres de polvo y pinzas para manipular los filtros, con el objetivo de evitar, en la medida de lo posible, contaminaciones.

Por diferencia de pesada entre el filtro en blanco y el filtro con partículas recogido de las estaciones de vigilancia atmosférica, se puede conocer la masa neta de partículas contenida en el filtro. Al dividir esta masa por el volumen de aire que ha pasado por el filtro durante el tiempo de muestreo (dato obtenido del propio captador de PM<sub>10</sub>) se determina la concentración de partículas en el aire ambiente. El resultado se expresa en µg/m<sup>3</sup>.

## **2.1.2.2. DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN MUESTRAS DE AEROSOLAS ATMOSFÉRICOS**

### **2.1.2.2.1. ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

Durante el muestreo, almacenamiento, pretratamiento y análisis de los PAH hay que evitar su exposición al calor, al ozono, al dióxido de nitrógeno y a la luz ultravioleta, ya que pueden degradarlos (EPA, 1999; UNE 77250, 2001; Liu et al., 2007; EN 15549, 2008). Por eso, después de llevar a cabo el análisis gravimétrico de las muestras de PM<sub>10</sub>, los filtros destinados para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos se separan y se almacenan a una temperatura  $\leq 4$  °C. Las muestras de PAH se mantendrán almacenadas en frío y sin contacto con la luz durante un tiempo máximo aproximado de dos meses (EN 15549, 2008). Así mismo, una vez extraídas las muestras, se recomienda que sean analizadas en un plazo no superior a siete días (EPA, 1999).

### **2.1.2.2.2. LIMPIEZA DEL MATERIAL**

La limpieza del material es muy importante en este tipo de análisis, ya que las interferencias existentes debido a las impurezas contenidas en los disolventes, reactivos, material de vidrio y otros equipos utilizados en el pretratamiento de las muestras, producen una elevación de la línea base en la respuesta del detector. Por eso, se tiene que demostrar de manera rutinaria que todo el material está libre de estas interferencias bajo las condiciones de análisis, lo que se lleva a cabo mediante la realización de “blancos de proceso” (EPA, 1999; UNE 77250, 2001).

El material de vidrio debe limpiarse escrupulosamente. Es recomendable que todo el material utilizado se lave inmediatamente después de su uso.

Para lavar el material de vidrio que se utiliza en este procedimiento, se sigue en el laboratorio un estricto protocolo:

1. Sumergir en un baño de agua con detergente líquido todo el material de vidrio utilizado en el pretratamiento. Mantener al menos 24 horas en esas condiciones.
2. Enjuagar, en primer lugar, con agua del grifo todo el material para eliminar los restos de detergente que pudieran quedar y, en segundo lugar, con agua ultrapura. Dejar secar al aire.
3. Enjuagar con acetona y dejar secar.
4. Enjuagar con n-hexano y dejar secar.
5. Enjuagar con tolueno y dejar secar.
6. Una vez que esté todo seco, se almacenan adecuadamente hasta su posterior utilización.

Con el objetivo de eliminar posibles trazas orgánicas que permanecen después del lavado habitual, se recomienda, en primer lugar, lavar con los disolventes en orden decreciente de polaridades y, en segundo lugar, calentar el material de vidrio (excepto el material volumétrico) en una estufa a 450 °C durante 8 horas (EPA, 1999).

La manipulación del material destinado a este fin debe llevarse a cabo siempre con guantes libres de polvo y pinzas metálicas. Se debe trabajar bajo campana extractora y en un ambiente de laboratorio limpio.

### **2.1.2.2.3. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

El procedimiento utilizado para la extracción de los hidrocarburos aromáticos policíclicos del material particulado atmosférico (Figura 2.12) se describe detalladamente a continuación:

1. Se corta por la mitad el filtro de fibra de cuarzo que contiene el material particulado (PM<sub>10</sub>) con unas tijeras metálicas limpias.
2. En un balón de destilación limpio de 250 mL, se añaden 150 mL de tolueno, dos perlas de ebullición y la mitad del filtro de fibra de cuarzo. Se pipetea 50 µL de una disolución de 1-metilpireno, que es el patrón interno utilizado para evaluar las pérdidas de analitos durante la extracción (EN 15549, 2008). Estudios preliminares demuestran la ausencia de este compuesto en las muestras a analizar, lo que hace posible su utilización como estándar interno.

Finalmente, se coloca el balón de destilación en el refrigerante y se inicia el calentamiento a la máxima potencia que permite la manta calefactora. Cuando comience el reflujo, se disminuye la potencia a la mitad y se mantiene durante una hora. Para favorecer la extracción y a su vez minimizar el contacto de la muestra con la luz, se tapa el balón de destilación con papel de aluminio limpio durante el proceso.

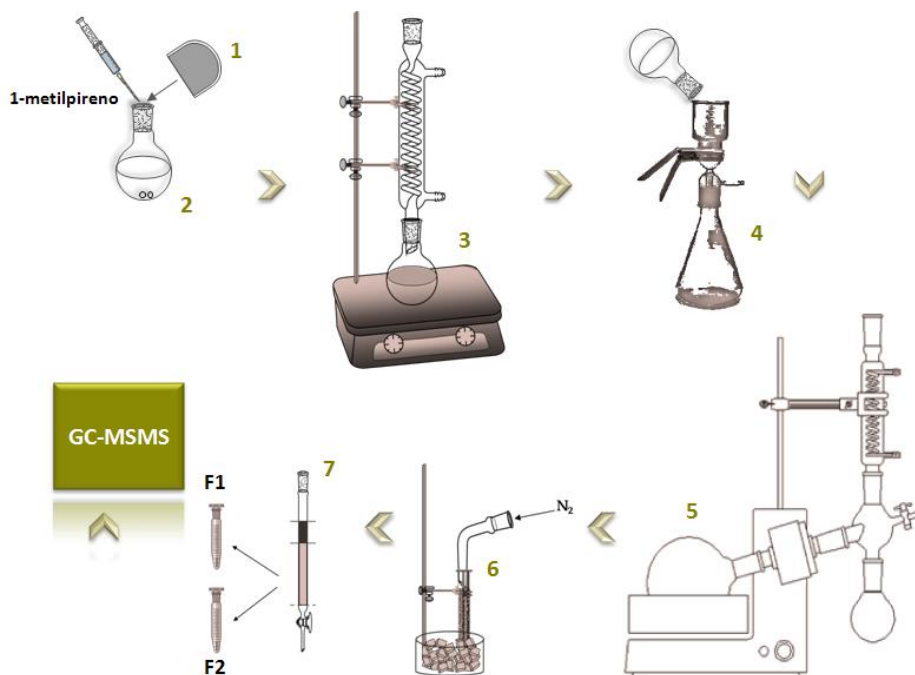
3. Finalizado el tiempo de extracción a reflujo, se deja enfriar el balón de destilación hasta que alcance la temperatura ambiente.
4. El siguiente paso es la filtración del extracto en un sistema de filtración a vacío cuyo filtro debe ser de teflón. El balón de destilación de 250 mL, donde está el filtro extraído, se lava a continuación con tres porciones de tolueno para asegurar que el arrastre sea cuantitativo. La muestra ya filtrada (aproximadamente 300 mL) se transvasa a un balón de destilación de 500 mL.
5. El siguiente paso es la concentración del filtrado hasta un volumen final aproximado de 1 mL. Esta operación se lleva a cabo en el rotavapor, manteniendo la temperatura del baño entre 30 y 35 °C.
6. El extracto de muestra obtenido de la evaporación se transvasa a un vial cónico de micro-reacción (5 mL) de forma cuantitativa utilizando acetonitrilo como disolvente.



7. A continuación se concentra la muestra hasta casi sequedad utilizando para ello una corriente suave y constante de nitrógeno manteniendo el vial sumergido en hielo durante el proceso. El tratamiento posterior de la muestra puede realizarse por dos vías:
  - a. Sin limpieza: La muestra concentrada se redisuelve en 100  $\mu\text{L}$  de tolueno, se le adicionan los patrones internos deuterados (acenaftileno- $\text{d}_8$  y pireno- $\text{d}_{10}$ ) y se inyecta en el GC-MS/MS para su análisis.
  - b. Con limpieza: La muestra concentrada se redisuelve en 50  $\mu\text{L}$  de tolueno y se purifica eluyendo los extractos correspondientes en una columna de vidrio empaquetada con gel de sílice de dos tamaños de poro diferentes. La segunda fracción, que es la que contiene los PAH, se eluye con una mezcla de n-hexano-diclorometano (4:1).

Las dos fracciones obtenidas de la etapa limpieza se concentran utilizando una corriente suave de nitrógeno, con los viales sumergidos en un baño de hielo, hasta casi sequedad. Las muestras así obtenidas se redisuelven en 100  $\mu\text{L}$  de tolueno, se les adicionan los patrones internos deuterados (acenaftileno- $\text{d}_8$  y pireno- $\text{d}_{10}$ ) y se inyectan en el GC-MS/MS para su análisis en las condiciones optimizadas que figuran en la Tabla 2.11.

El material de referencia certificado (aproximadamente 15 mg) se extrae siguiendo este mismo procedimiento.



**Figura 2.12.** Descripción del proceso de extracción de los PAH del material particulado atmosférico

#### 2.1.2.2.4. ANÁLISIS DE LOS HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS MEDIANTE GC-MS/MS.

La determinación analítica de los PAH extraídos del material particulado atmosférico se lleva a cabo mediante GC-MS/MS. Las condiciones finales optimizadas para el análisis de los PAH se muestran en la Tabla 2.8.

**Tabla 2.8.** Parámetros cromatográficos optimizados

Inyección	On-column, modo splitless
Split ratio	Inicio on (20) 0,01 off (off) 5,00 on (100)
Programa de temperaturas del inyector	60 °C (0,5 min) 300 °C (100 °C/min; 20,0 min)
Volumen de inyección	5 µL
Flujo de columna	1,0 mL/min
Programa de temperaturas del horno	60 °C (5,0 min) 170 °C (25 °C/min; 6,0 min) 240 °C (5 °C/min; 0,0 min) 300 °C (25 °C/min; 6,0 min) 310 °C (10 °C/min; 2,6 min)
Temperaturas:	
Trampa de iones	200 °C
Línea de transferencia	280 °C
Manifold	60 °C

El modo de inyección *on-column* requiere una simple modificación instrumental que consiste en la utilización de una pre-columna de sílice fundida (sin fase estacionaria) que se conecta por un lado con la columna analítica, a través de una pieza de vidrio de 24 mm, y por el otro con el inyector, a través de un *liner* de vidrio específico para este tipo de aplicaciones. La inyección en columna se acopló con el modo *splitless* también para asegurar la transferencia completa de la muestra, esencial cuando ensayo de analitos de ultra traza.

En la Tabla 2.9 se muestran las condiciones MS/MS finalmente optimizadas para la cuantificación de los PAH, y el patrón interno utilizado en cada caso para dicha cuantificación.

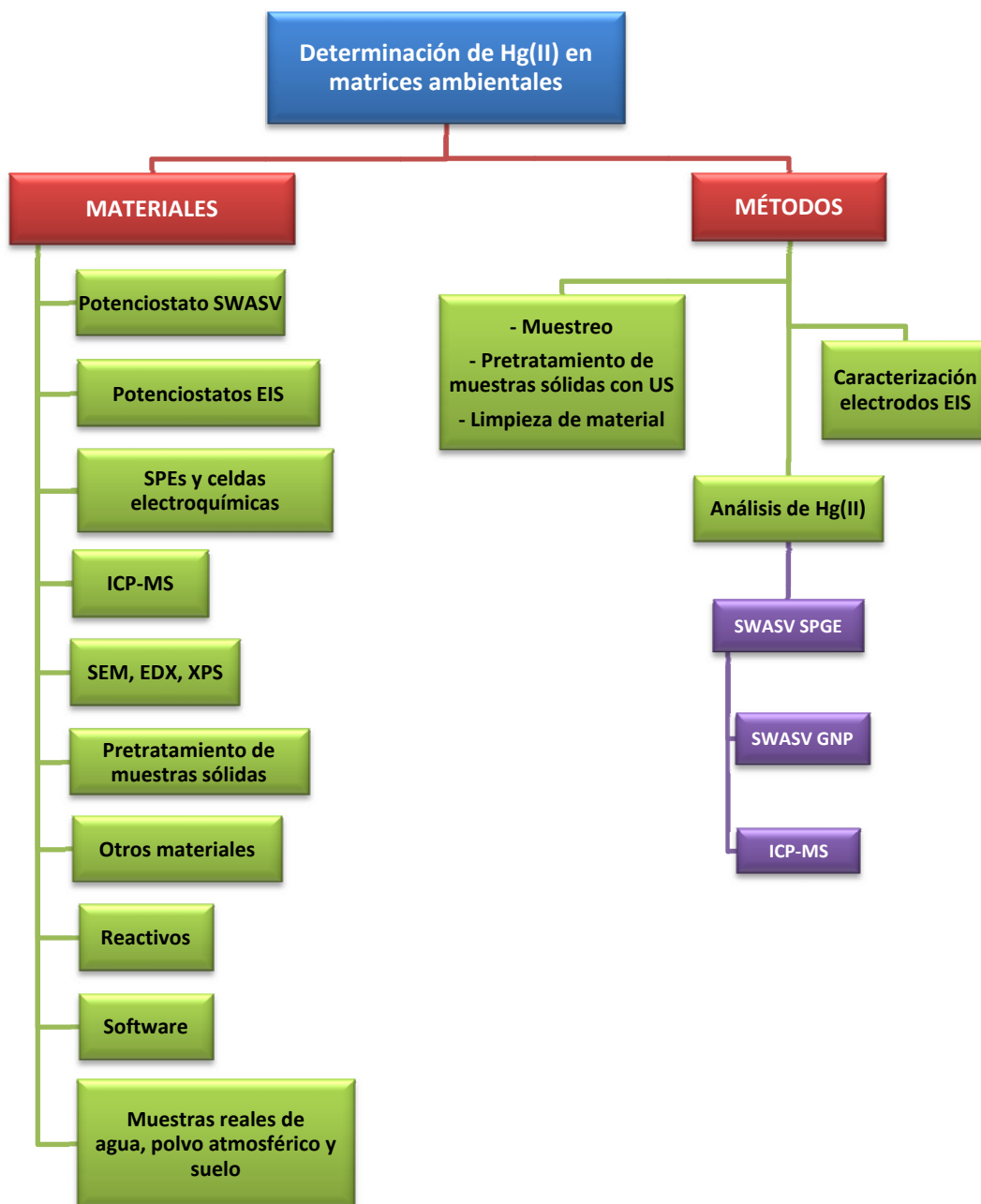
**Tabla 2.9.** Condiciones MS/MS para la cuantificación de los PAH

Segmento	Analito	t <sub>R</sub> (min)	Ión cuantificación (m/z)	Patrón interno
2	Naftaleno	9,5	102,0	Acenaftileno-d <sub>8</sub>
3	Acenaftileno-d <sub>8</sub> /Acenaftileno	11,5/11,6	158,0/150,1	
4	Acenafteno	11,8	152,2	
5	Fluoreno	13,1	163,1	
6	Fenantreno/Antraceno	17,2/17,6	176,2	
7	Fluoranteno	23,3	200,2	
8	Pireno-d <sub>10</sub> /Pireno	24,3/24,4	210,3/200,2	
9	1-metilpireno	27,3	215,0	
10	B[a]A/Criseno	30,4/30,6	226,3	
11	B[b]F/B[k]F/B[a]P	34,1/34,2/34,8	250,5	
12	I[1,2,3-cd]P/DiB[a,h]A/B[g,h,i]Pe	38,2/38,3/39,1	274,5/276,7	



## 2.2. MERCURIO EN MATRICES AMBIENTALES

Esta segunda parte del capítulo describe los materiales y métodos utilizados en el presente trabajo para la determinación de Hg(II) en diferentes matrices medioambientales. A continuación, se muestra un esquema global donde se resumen los principales apartados que se van a desarrollar.



## 2.2.1. MATERIALES

### 2.2.1.1. POTENCIOSTATO PARA VOLTAMPEROMETRÍA

La optimización y aplicación de la voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada (SWASV) para la determinación de mercurio en muestras de agua, se llevó a cabo utilizando un potenciostato/galvanostato portátil PalmSens (Figura 2.13) que funciona de manera autónoma con batería y que se conecta a través de un cable USB a un ordenador portátil equipado con el software específico (Palm Instruments BV, The Netherlands).



**Figura 2.13.** Potenciostato/galvanostato PalmSens

El equipo utilizado en este trabajo está compuesto por:

- Potenciostato/galvanostato PalmSens, que tiene unas dimensiones de 155 mm x 85 mm x 35 mm, un peso de 0,43 kg y cuenta con un *display* con iluminación para el seguimiento de los cambios en las distintas variables instrumentales así como botones para su manejo manual. Permite trabajar en un rango de potenciales-dc de  $\pm 2,000$  V, amplitudes entre 1 mV y 250 mV, rango de corriente entre 1 nA y 10 mA y una precisión  $\leq 0,2$  %.
- Batería de NiMH de 2,4 V y 2500 mAh, que permite hasta 8 horas de trabajo autónomo.
- Cargador de batería (6 V–1500 mA) que puede permanecer conectado al equipo durante su funcionamiento.
- Adaptador serie-USB específico para conectar el potenciostato con el ordenador.
- Cable flexible DRP-CAC de 1m de largo que actúa como interfase entre los electrodos impresos y el potenciostato (DropSens, España).
- Agitador magnético automático modelo HI 190M, adaptado para control remoto de la agitación durante las etapas de acondicionamiento y deposición por el potenciostato PalmSens (Hanna Instruments, EE.UU).

- Software PStTrace versión 1.1 que controla el funcionamiento del equipo, detecta automáticamente los picos mostrando los valores de potencial, altura, anchura y superficie de pico y permite llevar a cabo también el suavizado y la sustracción de curvas (Palm Instruments BV, The Netherlands).
- Test Sensor que se conecta con el potenciostato y es utilizado para comprobar el nivel de ruido del instrumento (Palm Instruments BV, The Netherlands).

### 2.2.1.2. POTENCIOSTATOS PARA LAS MEDIDAS DE IMPEDÁNCIA ELECTROQUÍMICA

Los espectros de impedancia electroquímica (EIS) se obtuvieron utilizando un equipo CH Instruments modelo 660D controlado por el software proporcionado por el proveedor (CH Instruments, Inc., EE.UU.) y un equipo Solartron 1250 (Frequency Response Analyzer) acoplado a la interfaz electroquímica Solartron 1286 (Solartron Analytical, UK), controlado por el software ZPlot 3.2. El ajuste de los datos a los circuitos equivalentes se llevó a cabo utilizando el software correspondiente CHI y ZView 3.2.

### 2.2.1.3. ELECTRODOS IMPRESOS Y CELDAS ELECTROQUÍMICAS

Se han utilizado como sensores electroquímicos para el análisis de Hg(II) en agua, electrodos impresos comerciales fabricados sobre un soporte cerámico de dimensiones 33 x 10 x 0,5 mm (largo x ancho x alto) donde se encuentran serigrafiados los tres electrodos (trabajo, auxiliar y referencia). Concretamente, en este trabajo los electrodos impresos utilizados (Figura 2.14) fueron proporcionados por DropSens (Oviedo, España) y sus características se describen a continuación:

- DRP-220AT : WE y CE: oro curado a alta temperatura; RE: plata
- DRP-220 BT: WE y CE: oro curado a baja temperatura; RE: plata
- DRP-110GNP: WE: carbono modificado con nanopartículas de oro; CE: carbono; RE: plata.



**Figura 2.14.** Electrodos impresos utilizados (de izquierda a derecha 220AT, 220BT, 110GNP)

Los electrodos de trabajo en todos los sensores son circulares de 4 mm de diámetro, lo que corresponde a una superficie activa de superficie de  $0,13 \text{ cm}^2$ . Los contactos eléctricos también están fabricados en plata y se encuentran separados del área de trabajo por una capa de aislamiento. Los electrodos impresos se reciben ordenados en cajas de plástico con 70 unidades perfectamente aisladas del exterior para evitar su deterioro y posibles fuentes de contaminación.

Las experiencias realizadas en el desarrollo de este trabajo, se llevaron a cabo en una celda comercial (Figura 2.15) preparada para trabajar con electrodos impresos y en un nuevo diseño de celda electroquímica (Figura 2.16), recientemente descrito por nuestro grupo de investigación (Granado-Rico et al., 2008).

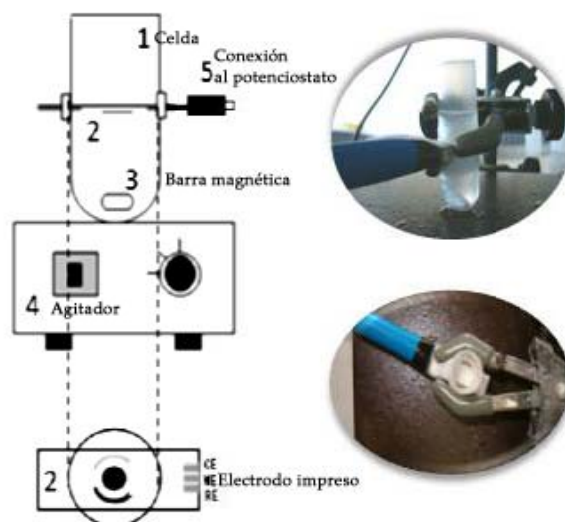
La celda comercial (DropSens, España) está fabricada en metacrilato y está diseñada, especialmente, para trabajar con electrodos impresos utilizando volúmenes de entre 5 y 10 mL. Los electrodos se insertan por una abertura que hay en la tapa superior, colocándose en dirección perpendicular a la base y dejando las conexiones eléctricas fuera. Este diseño de celda electroquímica permite trabajar con agitación, realizar adiciones patrón e incluso desairear, si fuese necesario, ya que la tapa superior presenta dos perforaciones a los lados de la abertura por donde se insertan los electrodos.



**Figura 2.15.** Celda comercial de metacrilato para trabajar con electrodos impresos

Por otro lado, la celda convectiva fabricada en nuestro laboratorio está diseñada con una configuración hidrodinámica donde la superficie del electrodo impreso se coloca de forma paralela al plano descrito por el movimiento de la barra magnética agitadora para conseguir una rápida y más eficiente acumulación por convección. El soporte cerámico donde están serigrafiados los electrodos se inserta boca abajo a través de un corte de aproximadamente 1 mm de espesor realizado a un tubo de ensayo de polipropileno (celda electroquímica) de 16 mm de diámetro (10 mL volumen), dejando fuera las conexiones eléctricas. La barra magnética agitadora se coloca, antes de introducir el electrodo, en el fondo del tubo de tal forma que quede próxima y en posición paralela a la superficie del electrodo de trabajo de oro para asegurar que el transporte de los analitos por convección sea eficaz y las señales obtenidas sean repetibles. Una vez colocado el sistema, se sellan con *parafilm* los cortes por donde se introdujo el electrodo impreso para evitar pérdidas de disolución y asegurar la posición del electrodo en la celda electroquímica. Se trata, por tanto, de un diseño portátil y de fácil montaje que permite trabajar con un volumen mínimo de 5 mL con la posibilidad, además, de llevar a cabo análisis por adición patrón como en las celdas voltamétricas clásicas.





**Figura 2.16.** Diseño experimental para acumulación convectiva en voltamperometría de redisolución utilizando electrodos impresos (Fuente: Granado-Rico et al., 2008)

#### 2.2.1.4. ESPECTRÓMETRO DE MASAS CON FUENTE DE PLASMA ACOPLADO POR INDUCCIÓN

Para la validación de los resultados electroanalíticos obtenidos, se utiliza un espectrómetro de masas con fuente de plasma acoplado por inducción (ICP-MS) modelo ELAN 9000 (Perkin Elmer, EE.UU) de la Figura 2.17.



**Figura 2.17.** Equipo ICP-MS Elan 9000

Los principales componentes de este equipo son:

- Muestreador automático modelo ASX-520, que trabaja bajo campana de flujo laminar Telstar Mini H.
- Bomba peristáltica automática.
- Nebulizador tipo Cross Flow, resistente al HF y al bloqueo con partículas o sólidos en suspensión.
- Cámara de Scott, como cámara de spray para separar y desechar las gotas de diámetro superior a 10  $\mu\text{m}$  generadas durante la nebulización, de tal forma que sólo las pequeñas se mantengan en suspensión en el gas que llega al plasma.
- Antorcha de cuarzo y espiral de radiofrecuencia para la generación del plasma.
- Conos (de muestreo y skimmer) fabricados en níquel.
- Lentes, responsables de dirigir los iones generados hacia el espectrómetro de masas.
- Espectrómetro de masas tipo cuadrupolo fabricado de material cerámico recubierto de oro.
- Detector SimulScan, que trabaja en dos etapas y tiene un funcionamiento similar a los fotomultiplicadores, transformando el conteo producido por los iones al chocar contra él en señales eléctricas medibles.
- Sistema de vacío compuesto por dos bombas (turbomolecular y mecánica) modelos DS602 y DS302 (Varian, EE.UU).
- Sistema de refrigeración Polyscience (Perkin Elmer, EE.UU).
- Software Elan® versión 1.7 que controla todos los componentes del sistema para llevar a cabo análisis de forma casi completamente automática.
- Central de reposición manual de gases marca Air Liquide, modelo CLSA-1, que proporciona un suministro de gas continuo a un circuito mediante la transición automática de la fuente de argón en uso, próxima a agotarse, a la fuente de reserva.

#### **2.2.1.5. SEM, EDX Y XPS**

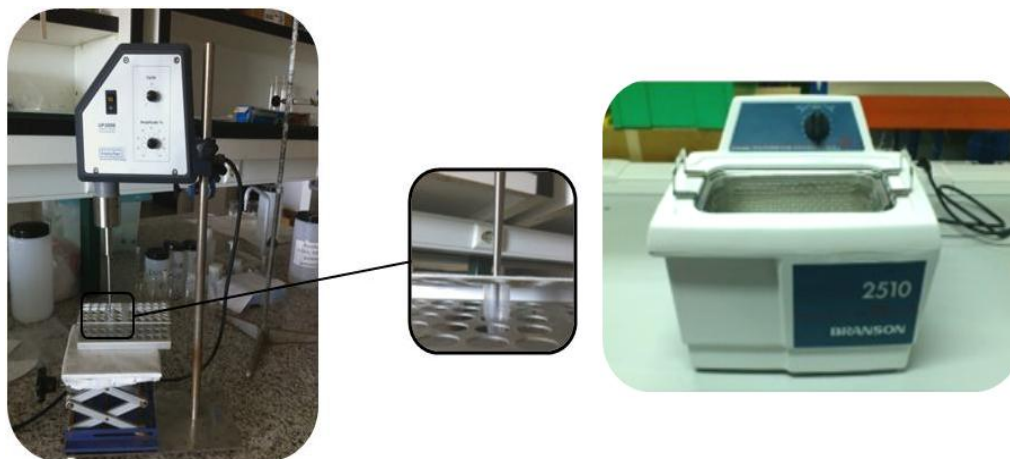
Las imágenes SEM de las superficies de los electrodos de trabajo fueron obtenidas con el microscopio electrónico de barrido FE-SEM Hitachi S-4800II (Tokio, Japón). Este equipo se utilizó también para obtener las imágenes SEM y los espectros EDX de las muestras de polvo atmosférico analizadas en este trabajo.

Para obtener los espectros de rayos X de los SPEs, se utilizó un espectrómetro de rayos X de fotoelectrones (XPS) K-alfa (ThermoScientific, EE.UU.).

### 2.2.1.6. EQUIPOS PARA EL PRETRATAMIENTO DE MUESTRAS SÓLIDAS

Para la molienda de las muestras sólidas, se utilizó un molino planetario de bolas modelo Fritsch Pulverisette 6 (Alemania) equipado con recipiente y bolas de dióxido de zirconio.

La extracción de Hg en las muestras sólidas, se llevó a cabo utilizando una sonda de ultrasonidos, modelo UP200S Hielscher (Alemania), equipada con un generador de alta frecuencia (200 W, 24 kHz), un sonotrodo de titanio tipo S1 (1mm de diámetro) adecuado para volúmenes entre 0,1 y 5,0 mL y control manual de la amplitud de sonicación, y un baño de ultrasonidos Branson 2510 (EE.UU), con una frecuencia fija de 40 kHz (Figura 2.18).



**Figura 2.18.** Sonda y baño de ultrasonidos para el pretratamiento de muestras sólidas

Para la separación de los residuos sólidos después de las extracciones con ultrasonidos, se utilizó una centrífuga Ortoalresa Digicen 21 (España), equipada con un rotor de cierre hermético y un soporte de 24 microtubos de muestra tipo *Eppendorf* de 1,5 mL.

### 2.2.1.7. OTROS MATERIALES

- Micropipetas Eppendorf y Kartell.
- Matracas de vidrio de 5, 10, 25, 50 y 100 mL.
- Vasos de precipitados de 500 y 5000 mL.
- Destilador de ácido nítrico de cuarzo (Kürner, Alemania).

### 2.2.1.8. REACTIVOS

Los reactivos utilizados en este trabajo son los siguientes:

- Disolución patrón Hg, calidad ICP (Perkin Elmer, EE.UU): 10 mg/L en ácido nítrico al 5%.
- Disolución patrón In, calidad ICP (Panreac, España): 1 g/L en ácido nítrico 2-5 %.
- Disolución patrón Y, calidad ICP (Panreac, España): 1 g/L en ácido nítrico 2-5 %.

- HCl al 35%, grado Hiperpur Plus (Panreac, España).
- HNO<sub>3</sub> suprapuro destilado a partir de ácido nítrico al 69 %, grado PA-ACS-ISO (Panreac, España).
- Material de referencia: NCS ZC 76303 Mercury in Water, aprobado por China National Analysis Center for Iron and Steel (Pekín, China) y suministrado por LGC Standards (Barcelona).
- Material de referencia: NIST Standard Reference Material® 1641d Mercury in water, suministrado por LGC Standards (Barcelona).
- Material de referencia: NIST Standard Reference Material® 2583 Trace Elements in Indoor Dust, suministrado por LGC Standards (Barcelona).
- Material de referencia: NIST Standard Reference Material® 2710A Montana Soil I, suministrado por LGC Standards (Barcelona).
- Agua ultrapura (Equipo Ultramatic System, Wasserlab, Spain).

#### **2.2.1.9. SOFTWARE**

El software utilizado ha sido *The Unscrambler* versión 9.7 CAMO Software AS (Trondheim, Noruega) para la realización del diseño de experimentos en la optimización de la extracción de Hg(II) con sonda de ultrasonidos, y el programa *XLSTAT* 2009.1.02 para la realización de la clasificación ascendente jerárquica en la evaluación del contenido de Hg(II) en el suelo.

#### **2.2.1.10. MUESTRAS REALES**

Para la aplicación de estos sensores electroquímicos, basados en electrodos impresos de oro y de carbono modificados con nanopartículas de oro, en la determinación de Hg(II) en matrices acuosas reales, se analizaron dos muestras de agua de lluvia recogidas en la ciudad de Badajoz y una muestra de agua procedente de la planta depuradora de aguas residuales de la industria A. G. Siderúrgica Balboa situada en Jerez de los Caballeros. Asimismo, estos dispositivos se utilizaron para la determinación de Hg(II) en polvo de interiores, recogidos manualmente en un laboratorio electroquímico y un garaje privado, y en la monitorización de Hg(II) en suelos recogidos en un área industrial (Puchuncaví, Chile) en diferentes campañas realizadas entre 2007 y 2011.

## 2.2.2. MÉTODOS

### 2.2.2.1. TOMA DE MUESTRAS DE AGUA DE LLUVIA Y AGUA RESIDUAL INDUSTRIAL

Las muestras de agua de lluvia fueron recogidas en dos lugares diferentes dentro de la ciudad de Badajoz y, para ello, se utilizaron dos vasos de precipitados de 500 mL, convenientemente acondicionados (Figura 2.19), que se colocaron durante 48 horas continuas a una altura de unos 150 cm. del suelo para evitar la resuspensión de material particulado hacia el interior del recipiente. Las muestras fueron acidificadas hasta pH 2 en el sitio de muestreo por adición de la cantidad adecuada de ácido nítrico suprapuro. A continuación, los recipientes se taparon con *parafilm*, fueron transportados al laboratorio y almacenados en frío (-4°C) hasta su análisis, que se llevó a cabo al día siguiente del muestreo.



**Figura 2.19.** Colector pasivo de agua de lluvia

La muestra de agua residual procede de la planta de tratamiento de aguas residuales de la industria A. G. Siderurgia Balboa situada en Jerez de los Caballeros (Badajoz). La muestra de agua fue facilitada por la empresa la cual llevó a cabo su recogida en botes de polietileno previamente acondicionados, que fueron posteriormente transportados al laboratorio y almacenados en frío (-4 °C). Una vez depositado en el fondo el material en suspensión, se separó un volumen determinado del sobrenadante que se acidificó hasta pH 2 con ácido nítrico suprapuro y se almacenó adecuadamente hasta su análisis.

No se realizó ningún tipo de pretratamiento a las muestras de agua (lluvia y residual) previo a la determinación de Hg(II).

### 2.2.2.2. TOMA DE MUESTRAS DE POLVO DE INTERIORES

Las muestras de polvo fueron recogidas en ambientes interiores, en concreto, en uno de nuestros laboratorios de investigación y en un garaje privado. Para ello, se fue barriando con un pincel el polvo, depositado en zonas poco perturbadas por la actividad humana, hacia el interior de unas bolsas pequeñas de cierre hermético. Las muestras se guardaron en frío (-4 °C) hasta su pretratamiento y análisis.

### 2.2.2.3. TOMA DE MUESTRAS DE SUELOS

Para el muestreo de suelo, se delimitó, en primer lugar, 1 m<sup>2</sup> de superficie y se eliminaron de la zona piedras, hojas, semillas y raíces. A continuación, utilizando un taladro de mano de polipropileno, se recogieron las muestras de suelo a una profundidad de 5-10 cm de la superficie. Con una pala de plástico, se extrajeron, aproximadamente 3 kg de muestra que fue almacenada en un contenedor grande de plástico, previamente acondicionado, que se cerró herméticamente para su transporte hacia el laboratorio (Figura 2.20).



**Figura 2.20.** Toma de muestras de suelo en el área industrial de Puchuncaví (Chile)

### 2.2.2.4. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS SÓLIDAS

Debido a que las muestras polvo de interiores presentaban un aspecto algodonoso, se tuvieron que llevar a cabo procesos de molienda manual, con una cuchilla de acero inoxidable, y su posterior tamizado en malla de 2 mm, para homogeneizar las muestras.

Las muestras de suelo recogidas en las distintas zonas del entorno industrial, una vez que llegaron al laboratorio, se secaron en estufa a 50 °C durante 72 horas y se llevó a cabo un primer tamizado más grueso, utilizando una malla de polipropileno de 2 mm. Posteriormente, se separaron diferentes submuestras de suelo para su posterior pretratamiento. Dichas muestras fueron homogeneizadas mecánicamente en un molino planetario de bolas, a 500 rpm durante 15 min, y, a continuación, fueron tamizadas manualmente utilizando una malla de acero inoxidable de 0,2 mm. Estas muestras de suelo fueron guardadas en bolsas de cierre hermético, convenientemente etiquetadas y almacenadas en frío.

Para la extracción de Hg(II) de las muestras de polvo de interiores y de suelo, se aplicó la energía de ultrasonidos en dos modalidades diferentes: la sonda y el baño de ultrasonidos. El reactivo extractante seleccionado en todos los casos fue HCl.

Los parámetros de extracción involucrados en el tratamiento de las muestras sólidas con la sonda de ultrasonidos (tiempo y amplitud de sonicación, y concentración de HCl) fueron optimizados utilizando un diseño central compuesto centrado en las caras (FCCD), del cual se obtuvieron unos valores de 3,2 min, 55 % y 8,13 M, respectivamente. Para la extracción, se utili-

zaron 20 mg de muestra. Los blancos y los materiales de referencia fueron procesados siguiendo la misma metodología.

Por otro lado, la extracción en baño de ultrasonidos se llevó a cabo utilizando un baño convencional de frecuencia fija, adaptado para trabajar con viales *Eppendorf* de micro-reacción. La concentración de HCl seleccionada, en función de los datos descritos previamente en la bibliografía, fue 6 M y el tiempo de sonicación 60 min. Al igual que la extracción con sonda, se utilizaron 20 mg de muestra, ya homogeneizada, y los blancos y los materiales de referencia fueron procesados aplicando la misma metodología.

### **2.2.2.5. LIMPIEZA DEL MATERIAL**

Esta etapa es de especial importancia en el análisis de elementos en concentraciones traza y tiene una influencia directa en la calidad de los resultados. Por eso, todo el material utilizado en este trabajo fue sometido al siguiente procedimiento de lavado:

- Se sumerge el material durante 48 horas en un baño de HNO<sub>3</sub> al 10 % en caliente.
- Se enjuaga con agua ultrapura hasta asegurar que no quedan restos de ácido.
- Finalmente, se seca en estufa y se guarda en bolsas de polietileno de cierre hermético hasta su utilización.

Durante todo el procedimiento de limpieza, el material se manipula con guantes de vinilo libres de polvo y desechables.

### **2.2.2.6. DETERMINACIÓN DE MERCURIO MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ANÓDICA DE ONDA CUADRADA (SWASV) UTILIZANDO ELECTRODOS IMPRESOS DE ORO (SPGE)**

Una vez colocados los electrodos en la celda, la superficie de los electrodos impresos de oro se acondiciona electroquímicamente para obtener una buena línea base y una respuesta estable del analito, mediante la aplicación de 5 ciclos en voltamperometría cíclica (CV) utilizando las siguientes condiciones: rango de potenciales entre 0,0 y +0,7 V, velocidad de barrido de 50 mV/s y potencial de paso de 3 mV. Esta activación se lleva a cabo en medio HCl 0,1 M.

Una vez que el electrodo ha sido acondicionado, se introducen 5 mL de muestra en la misma celda, se ajusta la concentración de cloruros en las muestras hasta 0,1 M, añadiendo la cantidad apropiada de HCl, y se inicia la determinación de mercurio mediante SWASV, sin necesidad de desaireación. Las condiciones optimizadas para la determinación son las siguientes: potencial de acondicionamiento, previo a cada medida, de +0,7 V durante 15 s, potencial de deposición de +0,2 V durante 60 s, tiempo de equilibrio de 10 s, amplitud de 40 mV, potencial de paso de 6 mV y frecuencia de 20 Hz. Los potenciales inicial y final fueron +0,1 V y +0,7 V. Como señal analítica se emplea la intensidad de pico.

### 2.2.2.7. DETERMINACIÓN DE MERCURIO MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA DE REDISOLUCIÓN ANÓDICA DE ONDA CUADRADA (SWASV) UTILIZANDO ELECTRODOS IMPRESOS DE CARBONO MODIFICADOS CON NANOPARTÍCULAS DE ORO (GNP)

A diferencia de los SPGE, los experimentos de voltamperometría con los electrodos impresos modificados con nanopartículas de oro no fue necesario ningún procedimiento de activación electroquímica.

Por tanto, se introducen 10 mL de muestra en la celda, se ajusta la concentración de cloruros en las muestras hasta 0,1 M, añadiendo la cantidad apropiada de HCl, y se inicia la determinación de mercurio mediante SWASV, sin necesidad de desaireación. Las condiciones optimizadas para la determinación son las siguientes: potencial de acondicionamiento, previo a cada medida, 0,7 V durante 15 s, potencial de deposición +0,2 V durante 120 s, tiempo de equilibrio de 5 s, 40 mV de amplitud, potencial paso de 6 mV y frecuencia de 25 Hz. Los potenciales inicial y final fueron +0,15 V y +0,7V, respectivamente. Para lograr respuestas estables no se llevó a cabo agitación durante el análisis.

Como señal analítica se emplea la intensidad de pico y la cuantificación de Hg(II) en las muestras reales se llevó a cabo por calibración externa y por el método de adición patrón.

### 2.2.2.8. DETERMINACIÓN DE MERCURIO POR ICP-MS

Se emplea la técnica ICP-MS para la validación de los resultados obtenidos de la determinación de mercurio mediante SWASV en las muestras problema. Para la cuantificación del analito se utilizaron los elementos In(III) e Y(III) como patrones internos de concentración 10 ng/mL para la cuantificación de Hg(II). El isótopo más abundante,  $^{202}\text{Hg}$ , fue seleccionado para la cuantificación.

Para llevar a cabo una calibración con patrón interno, se construyen, en primer lugar, las rectas de calibrado individuales del analito y el patrón interno utilizando concentraciones de 0,1, 1, 10 y 100 ng/mL obtenidas por dilución automática de la disolución madre de 100 ng/mL que contiene ambos elementos. En segundo lugar, se calcula el factor de respuesta del mercurio (FR) como el cociente entre las pendientes de las rectas de calibrado del patrón interno y del analito, de forma que la concentración de éste en cada muestra se calcula de acuerdo con la expresión (1):

$$x_i = \frac{10 \cdot y_i \cdot F_R}{y_{PI}} \quad (2.1)$$

Donde  $x_i$  es la concentración de mercurio en cada muestra en ng/mL, 10 es la concentración del patrón interno (In o Y) en cada muestra en ng/mL,  $y_i$  es la señal de mercurio en cada muestra (cuentas por segundo) y  $y_{PI}$  es la señal del patrón interno en cada muestra (cuentas por segundo).

Las condiciones instrumentales y los parámetros de medida más relevantes utilizados en la determinación analítica son los que se muestran en la Tabla 2.10.



**Tabla 2.10.** Condiciones instrumentales y parámetros de medida para el equipo ICP-MS

Potencia de la radiofrecuencia	1000 W
Velocidad del gas portador	1 L/min
Voltaje de las lentes	7,25 V
Tiempo de lavado	35 s
Número de réplicas por muestra	3

### **2.2.2.9. ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÁNCIA ELECTROQUÍMICA**

En ambos equipos empleados para el registro de los espectros de impedancia electroquímica de los electrodos impresos utilizados en este trabajo, se escaneó de forma logarítmica el rango de frecuencias comprendido entre 65 kHz y 0,1 Hz, con una perturbación sinusoidal aplicada de 10 mV de amplitud con 12-10 repeticiones por frecuencia superpuesta al potencial aplicado, respectivamente.

Para realizar las medidas de EIS se utilizó la celda electroquímica comercial.



## Capítulo 3. Resultados y Discusión

---



### 3.1. Artículo I.

An Exploratory Study of Particulate PAHs in Low Polluted Urban and Rural Areas of Southwest Spain: Concentrations, Source Assignment, Seasonal Variation, and Correlations with Other Air Pollutants

---

---



# **An Exploratory Study of Particulate PAHs in Low Polluted Urban and Rural Areas of Southwest Spain: Concentrations, Source Assignment, Seasonal Variation, and Correlations with Other Air Pollutants**

*Water Air & Soil Pollution (2012) 223:5143–5154*

Elena Bernalte<sup>1\*</sup>, Carmen Marín Sánchez<sup>1</sup>, Eduardo Pinilla Gil<sup>1</sup>,  
Francisco Cereceda Balic<sup>2</sup>, Víctor Vidal Cortez<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Departamento de Química Analítica  
Universidad de Extremadura, Avda. de Elvas, s/n, E-06006 Badajoz, Spain*

<sup>2</sup> *Laboratorio de Química Ambiental (LQA), Centro de Tecnologías Ambientales (CETAM)  
Universidad Técnica Federico Santa María, Casilla 110-V, Valparaíso, Chile*

## **Abstract**

A set of 72 PM<sub>10</sub> samples from low polluted urban and rural locations belonging to the regional air monitoring network of Extremadura (Spain) were collected in a one year sampling period. Sample pre-treatment and analytical determination by GC-ion trap MS were optimised and validated for the analysis of the priority 16 US EPA PAHs. The influence of meteorological conditions (T, HR, SR) and other atmospheric pollutants (O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, PM<sub>10</sub>) has been covered in detail and Pearson correlation test were used for this purpose. Spatial distribution of particulate PAHs was evaluated and the comparison with other European sites was also established. Possible emission sources were identified and assigned by using molecular diagnostic criteria.

**Keywords:** *PAHs; PM<sub>10</sub>; Emission sources; Seasonal variation; Air pollutant correlations; Low polluted urban and rural areas.*





## 1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a large group of toxic and persistent organic pollutants (WHO 2000; Villar et al. 2004). Since many PAHs have been classified as probable or possible human carcinogens, they have received widespread interest in recent decades in air pollution studies. Both the United States Environmental Protection Agency (US EPA) and the European Environment Agency (EEA) categorize PAHs as priority pollutants (Tsapakis and Stephanou 2005; Vardar et al. 2008).

Because of their low vapour pressure, some PAHs are present at ambient temperature in air both in the gaseous phase and associated with particulate matter (aerosol phase) (Ravindra et al. 2008a). The most volatile compounds are present almost exclusively in the gas phase, while 3 or 4 rings PAHs (vapour pressure between  $10^{-6}$  and  $10^{-8}$  Torr) can have significant fractions in both phases. The largest and stronger carcinogenic PAHs (5 and 6 rings with vapour pressures of  $10^{-11}$  Torr) are predominantly associated with airborne particles (Yusà et al. 2006). These have received special attention because they can be inhaled directly into the human respiration tract and possibly induce health effects (Tham et al. 2008; Li et al. 2011).

The origin of PAHs in the atmosphere is mainly anthropogenic since they are formed primarily as products of incomplete combustion of organic materials of human and industrial activities (processing of oil and coal, natural gas combustion, waste incineration, biomass burning vehicular traffic, liquid and gaseous hydrocarbon combustion). They can also be emitted to the atmosphere through various natural processes (non-anthropogenic burning of forests and woodland, volcanic eruptions) (Position Paper 2001; Ravindra et al. 2008b). Ratios of individual PAHs species are frequently employed as a diagnostic tool to identify and characterise PAHs emission sources to the ambient air. This tool should be used with caution because they are often difficult to discriminate between different sources, moreover when natural sources are involved (Ravindra et al. 2008b; Sienra et al. 2005; Cheng et al. 2007; Dvorská et al. 2011).

Benzo[a]pyrene has been regarded as a marker of the total PAHs and for quantifying the carcinogenic risk of PAHs in ambient air, predominantly for particle-bound PAHs (European Directive 2004; Srogi 2007). For this reason, the European Union and Spanish legislation recently defined a target value for benzo[a]pyrene:  $1 \text{ ng/m}^3$  for the total content in the  $\text{PM}_{10}$  fraction averaged over a calendar year (Gutiérrez-Dabán et al. 2005; Real Decreto 2007; Castro et al. 2009; European Standard EN-15549 2008).

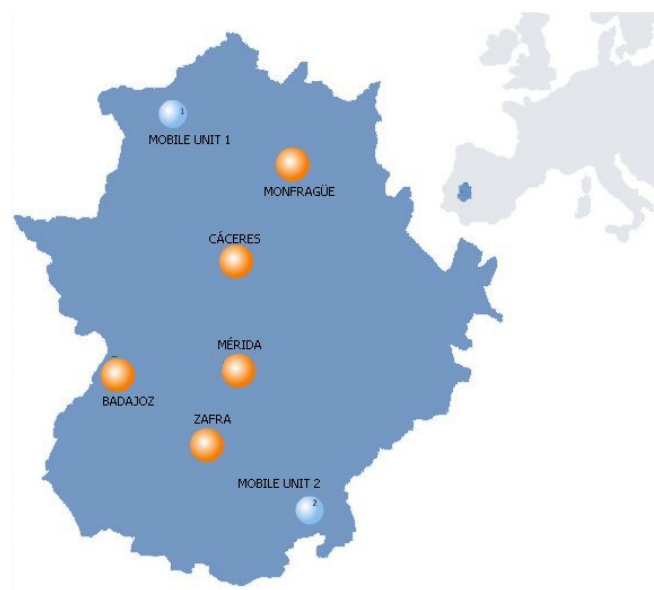
The study of the occurrence of particulate PAHs and the processes governing their fate is of great importance. Heterogeneous reactions including photo-oxidation and gas-particle partitioning appear to be major transformation processes of particulate PAHs. However, the atmospheric behaviour of particulate PAHs has yet to be understood due to the intrinsic complexity of aerosol characteristics and the interaction with various reactive air pollutants and meteorological conditions (Li et al. 2011). Studying the correlations of atmospheric pollutants such as ozone, nitrogen oxides or sulphur dioxide, with PAHs is important for a better understanding of their transformation processes in the atmosphere. Also, the influence of meteorological parameters such as temperature, relative humidity or solar irradiation is of great importance due to changing weather conditions in different seasons that causes the reported seasonal variation of particulate PAHs (Tsapakis and Stephanou 2005; Li et al. 2011).

Specifically in Spain, several studies have been published about atmospheric PAHs concentrations in some urban and rural locations as Barcelona (Aceves 1993), Mallorca (Simó et al. 1991), Zaragoza (Callén et al. 2008), Sevilla (Gutiérrez-Dabán et al. 2005), Las Palmas (Vera Castellano et al. 2003), Rentería (Barrero Mazquiarrán and Cantón Ortiz de Pinedo 2007), Madrid (Barrado et al. 2011) or Jinámar (López-Cancio et al. 2002). Others as Roquetas de Mar, Toledo, Logroño, Noia or Mahon have been selected by EMEP (European Monitoring and Evaluation Programme) as continuous monitoring stations of airborne PAHs. However, there are no studies about the characterisation of atmospheric PAHs profiles from low polluted areas in western and south-western Spain. The present work is the first study carried out in a region located in South-western Spain (Extremadura) for the identification and quantification of the profiles of PAHs associated with PM<sub>10</sub> fraction of particulate matter. This low populated and low industrialised area has been selected as an interesting model to test the reliability of standard PAHs monitoring methodologies when operating close to detection limits. Optimisation of sample pretreatment, method validation, data interpretation and correlation with other pollutants and meteorological conditions is discussed.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Study area and sampling protocol**

Five specific sampling sites and several rural locations (mobile air monitoring campaigns) in the region of Extremadura (southwest Spain) were chosen to characterise the profile of PAHs bound to atmospheric particulate matter. A total of 72 PM<sub>10</sub> samples were collected at urban and rural sampling points belonging to the air quality network of Extremadura, as detailed in Figure 1 and Table 1. Extremadura is a low populated and low industrialised inland region located in the south-western Spain under Mediterranean climate domain, with Continental and Atlantic climate modifications that produce wide spatial and temporal climate variability. Minimum temperatures are usually reached in January (mean values ranging from 4.5 to 9.5 °C), whereas maximum temperatures are usually recorded in July (mean values ranging from 21.5 to 28 °C). Wet precipitation is also variable, with minimum mean annual values around 400 L/m<sup>2</sup> in the plains and maximum values around 1,600 L/m<sup>2</sup> in elevated zones. Analysis of wind back-trajectories shows that wind circulation is mainly dominated by Atlantic low pressure fronts influence (57 % of the days, W and NW, occasionally SW). Influence of S winds from North Africa, with associated transport of desert particulate matter, is also registered (19 % of the days). Winds from continental Europe are dominant only 4 % of the days and regional trajectories are encountered 14 % of the days. Badajoz (150,376 inhabitants) is the largest and most industrialised city in the region. Cáceres (94,179 inhabitants) and Mérida (57,127 inhabitants) are medium size cities for the region standards. Mérida has a special dynamism due to its strategic location as a communications hub in the region. Zafra (16,433 inhabitants) is a relatively small village that is also situated in a strategic position of communication with the south Spain. The monitoring unit of Monfragüe is located in the Monfragüe National Park area, with minimum or no human activity in the surrounding. Two mobile atmospheric surveillance units routinely carry out monitoring campaigns in other rural locations within the region area.



**Figure 1.** Map showing aerosol sampling locations in Extremadura, Spain

**Table 1.** Sampling areas in Extremadura, southwest Spain

Sampling point	Location	Sample number	Type
Badajoz	38° 53' 41" N, 6° 58' 11" W	12	Urban
Cáceres	39° 28' 57" N, 6° 21' 28" W	10	Urban
Mérida	38° 54' 22" N, 6° 20' 22" W	11	Urban
Zafra	38° 25' 41" N, 6° 23' 50" W	12	Rural
Monfragüe National Park	39° 50' 37" N, 5° 56' 30" W	12	Remote rural
Mobile units (two)	Field campaigns	15	Rural

24 hour aerosol samples were obtained by high volume DAH-80 Digitel (Digitel Elektronik AG, Hegnau, Switzerland) equipments with a PM<sub>10</sub> head inlet, operated at 30 m<sup>3</sup>/h air flow rate (sample volume ~ 750 m<sup>3</sup>). Sampling campaigns were carried out from March 2008 to January 2009. Before sampling, the quartz filters (Ø 15 cm, Schleicher & Schuell) were conditioned following the criteria established by UNE-EN 12341:1999 standard method. So, the filters were placed in a gravimetric cabin at 20 ± 1 °C and 50 ± 5 % relative humidity for 48 hours, weighed on a high precision balance (10 µg, Mettler Toledo AX205 Delta Range), packed in aluminium foil and paper envelopes, and transferred to the field units. After sampling, the filters went back to the lab and they were similarly conditioned and weighed for gravimetric determination of PM<sub>10</sub> mass concentration (µg/m<sup>3</sup>). Finally, the filters were stored in a fridge at -18 °C for no longer than two months. Sample extracts were analysed within 7 days after extraction and purification. Light, temperature and chemical reactions with air components can degrade PAHs in the samples (European Standard EN-15549 2008), so special attention was paid to prevent this risk.

## 2.2. Sample pre-treatment

For blanks and PM<sub>10</sub> samples, half quartz filter was pretreated using a methodology based on reflux extraction for 1 h with 150 mL boiling toluene (Cereceda-Balic et al. 2002). At the beginning, 10 µL of 100 mg/L 1-methylpyrene (Ultra scientific, USA) was also added as internal standard to inspect analyte losses through the sample preparation process. After cooling, the extract was filtered under vacuum on a Teflon filter and evaporated to nearly 1 mL in a rotary evaporator (30-35 °C). The concentrated extract was transferred to an ice-refrigerated 5 mL micro-reaction vial and carefully evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream. In order to avoid possible interferences co-extracted with interested PAHs and preserve detector cleanliness during MS detection, a clean-up fractionation procedure was optimized. Thus, the residue was dissolved in 50 µL toluene and purified by chromatography on glass columns (175 mm length, 12 mm internal diameter) packed and conditioned as follows: a small amount of glass wool was first inserted to retain the stationary phase. Then, ~ 700 mg of 0.06-0.2 mm silica gel and ~ 650 mg of 0.04-0.6 silica gel (both in a n-hexane slurry) were sequentially added. After eluting the n-hexane remains, the column was conditioned by adding and eluting 2.5 mL of n-hexane: dichloromethane (4:1 v/v) and finally 2.5 mL n-hexane for three times. Next, proper clean-up steps were carried out in a two stage fractionation with n-hexane and n-hexane: dichloromethane (4:1 v/v), respectively. First fraction was eluted in 5 mL and was for removing interfering compounds. Second fraction for complete analytes elution was carried out using 10 mL of solvent. Finally, both fractions were evaporated to dryness under a gentle nitrogen stream and dissolved in 1 mL toluene. The deuterated internal standards acenaphthylene-d<sub>8</sub> and pyrene-d<sub>10</sub> (Cambridge Isotope Laboratories, USA) were then added and the sample was injected in the GC-MS/MS.

Special attention to glassware and other material cleaning is essential to avoid contamination and losses when analysing ultratrace PAHs in aerosol samples coming from low polluted areas. Therefore, we tested different cleaning protocols, inspecting the blank levels at the end of the process, and finally selected the following: preliminary cleaning by immersing in lab liquid detergent solution (24 hours), rinsing with ultrapure water, drying, sequentially rinsing with acetone, n-hexane and toluene. Drying for 8 hours to 450 °C and stored wrapped with aluminium foil until used.

### 2.3. Analysis of PAHs

A Varian 3800 GC system with a model 8200 autosampler and an ion trap Varian Saturn 2000 MS detector was used for PAH detection and quantification. The chromatographic separation was carried out on a Varian Factor Four<sup>TM</sup> VF-5ms column (30 m×0.25 mm×0.25 µm) with 5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane stationary phase, coupled with a Varian CP8009 (2.5 m×0.53 mm) pre-column. Helium carrier gas was used at 1.0 mL/min constant flow. Chromatographic parameters were optimized in the SCAN mode. The on-column injection mode (5 µL) required a simple instrumental modification that was made by connecting the injector to the analytical column via a 24 mm dedicated glass liner. It is a critical point that affects peak resolution, sensitivity and retention times, so a daily inspection for leaks was carried out. The on-column injection was coupled with the splitless mode also to ensure complete sample transfer, essential when assaying ultra trace analytes. The injector was operated at 60 °C (5 min) and 300 °C (100 °C/min, 20 min). The GC oven was programmed from 60 °C (hold for 5 min), 170 °C (25 °C/min, hold for 6 min), 240 °C (5 °C/min), 300 °C (25 °C/min, hold for 6 min)

and ramped to 310 °C (10 °C/min, hold for 2.6 min). The transfer line and ion trap temperatures were 208 °C and 200 °C, respectively. Retention times were identified and quantification ions were selected according to multistandard injections results and previously published data. MS conditions were optimized in the SIM mode. Using the current method, we achieved full chromatographic separation of these sixteen analytes: naphthalene (NAP), acenaphthylene (ACY), acenaphthene (ACE), fluorene (FLO), phenanthrene (PHE), anthracene (ANT), fluoranthene (FLA), pyrene (PYR), benz[a]anthracene (BaA), chrysene (CHR), benzo[b]fluoranthene (BbF), benzo[k]fluoranthene (BkF), benzo[a]pyrene (BaP), indeno[1,2,3-cd]pyrene (IcdP), Dibenz[a,h]anthracene (DBA) and benzo[g,h,i]perylene (BghiP). Quantification was performed by standard addition method using acenaphthylene-d<sub>8</sub> and pyrene-d<sub>10</sub> as deuterated internal standards.

Calibration data of 16 PAHs were obtained by analysing in triplicate multistandard solutions (LGC Promochem, Germany) of increasing concentrations from 5 to 200 ng/mL. Good correlation coefficients ( $R^2$ ) were obtained for the regression curves. Eight half blank filters were assayed to estimate the detection limits, which were calculated according to the IUPAC definition considering the sampled volume. LODs obtained ranged from 0.0013 ng/m<sup>3</sup> (FLO and PYR) to 0.0042ng/m<sup>3</sup> (IcdP), low enough for measuring the expected concentrations in the low polluted real samples. For statistics, data below the detection limit were substituted by a half of the detection limit value. Blank samples spiked with PAH multistandard solution were assayed and gave recoveries ranged from 50 to 110 %. Certified reference material NCS ZC 78002 "PAH in Coal Fly Ash" were also analysed using the proposed methodology. Mean extraction recovery of PAHs was 70 % ranging from 45 % (PHE) to 97 % (ANT). Mean recovery obtained for BaP was 80 % and for 1-methylpyrene, added as internal standard for control, was around 80 %.

## **2.4. Meteorological parameters and atmospheric pollutants**

Each monitoring unit is equipped with a standard meteorological station for registering temperature, relative humidity, atmospheric pressure, rainfall and wind direction and speed. Likewise, the monitoring units are equipped with standard analysers for other atmospheric pollutants. SO<sub>2</sub> was monitored with a UV fluorescence analyser, NO<sub>x</sub> with a chemiluminescence analyser, CO was continuously measured with an infrared absorption analyser and O<sub>3</sub> with a UV absorption analyser. These equipments were calibrated according to regular quality protocols of atmospheric monitoring networks.

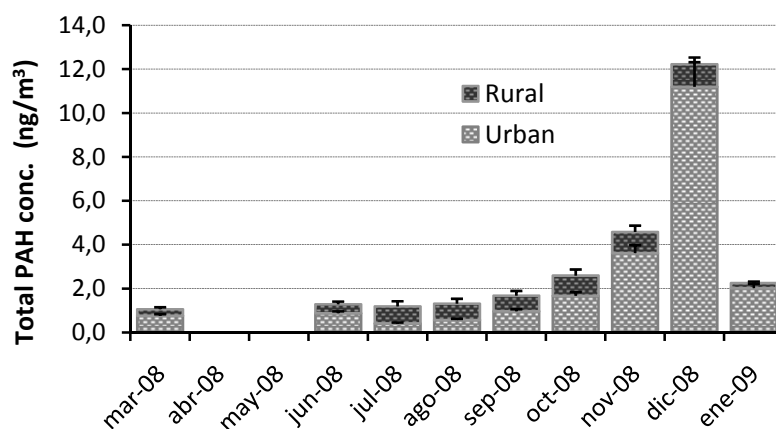
## **2.5. Statistical analysis**

All statistical analyses (descriptive statistics and correlations) were performed by using the SPSS 15.0 software and XLSTAT 7.5.2 software for Windows Excel. Results were considered statistically significant for a p-value less than 0.05 unlike otherwise stated.

# **3. Results and discussion**

## **3.1. PAH levels in PM<sub>10</sub> and seasonal variation**

Figure 2 shows particulate PAH concentrations (sum of the averages obtained per month and sampling area) for the sampling period. As seen, total PAH levels varied from 1.1 ng/m<sup>3</sup> (minimum value obtained in March-08) to 12.2 ng/m<sup>3</sup> (maximum value obtained in Dec-08). In general terms, a seasonal behaviour was observed for total particulate PAHs in Extremadura, registering the highest total values during the cold months (from Oct-08 to Jan-09) as represent the bar diagram in the Figure 2.



**Figure 2.** Specific contributions of urban and rural locations to the total PAH evolution in Extremadura

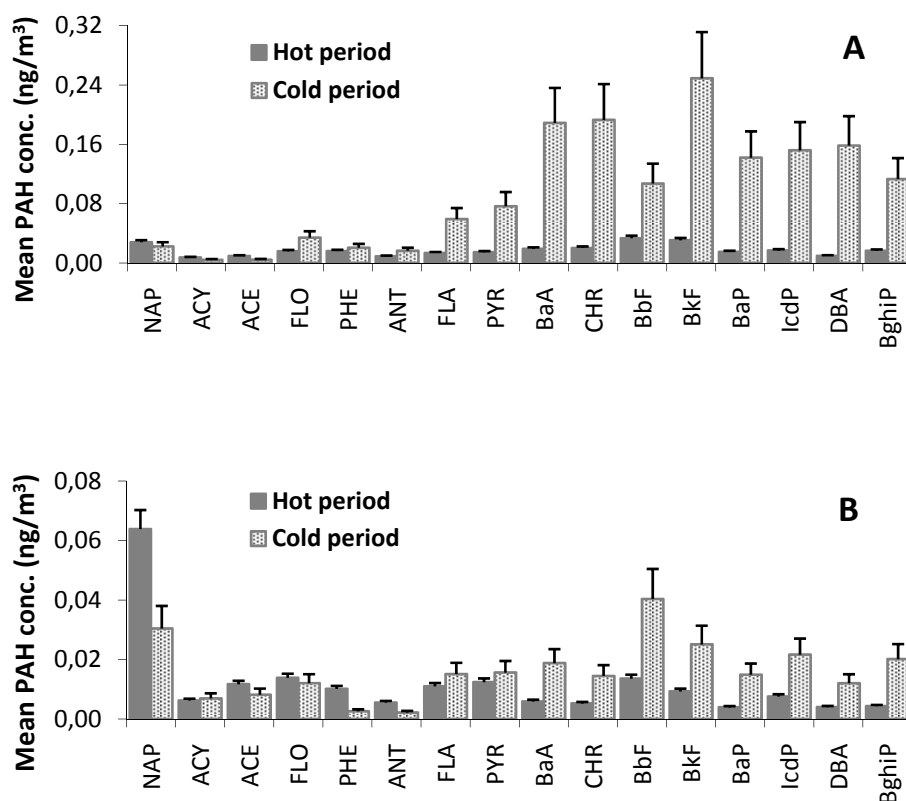
The increase in particulate PAH concentration during the cold period and the dependence of PAH concentration on atmospheric temperature have been reported in a number of previously published studies (Tsapakis and Stephanou 2005; Li et al. 2011; Li et al. 2009; Vestenius et al. 2011). Several factors may contribute to the seasonal evolution. Reduced atmospheric dispersion resulting from lower mixing height as well as reduced photochemical degradation of PAHs by solar radiation in cold season. Also, reduced atmospheric reaction can lead to higher pollutant concentrations in ambient air during cold period. The distribution of PAHs between the gas and particle phases is affected by low atmospheric temperature and results in a relatively higher portion of PAH remain in the particle phase. In addition to temperature effects on the physicochemical properties of atmospheric PAHs, anthropogenic factors can also lead to seasonal variation of particulate PAHs (Li et al. 2009). As described in the literature, PAH emissions from heating sources increase during the cold season (Li et al. 2011; Li et al. 2009; Vestenius et al. 2011). PAH emissions from automobile exhaust are higher and biomass burning or even fireplace usage are also likely to contribute to elevated PAH emission in this period. These factors could explain also the sharp increase in total PAH levels we found in December (Figure 2), as was previously considered by Li et al, 2009. In contrast, the lowest concentrations of particulate PAHs in hot months were attributable to absence of seasonal sources and notably photochemical degradation (Li et al. 2011) because of the high summer temperatures reached in Extremadura. Seasonal behaviour of the individual particulate PAHs in the whole region is highlighted. As was expected, significant differences between hot and cold periods was observed ( $p=0.001$ ). It also showed that the seasonal differences are more noticeable for higher molecular weight analytes which tend to be associated with the particulate phase.

Within the abundant literature about PAH concentrations, few reports include in the same study the monitorisation of areas with different characteristics i.e. urban, suburban or rural areas. Therefore, the results obtained in the present work are directly comparable with the study reported by Ravindra et al, 2006, where PAHs were also determined in particulate samples collected in urban, suburban and rural areas of Flandes (Belgium). The total average content of the particle-bound PAHs in the current study was  $0.45 \text{ ng/m}^3$ . In contrast, the value of total average concentration of PAH reported in Flandes was  $5.5 \text{ ng/m}^3$  (Ravindra et al. 2006). These remarkable differences are indicative of low pollution in Extremadura.

### 3.2. Spatial distribution of particulate PAH

Total average content of the particle-bound PAHs measured in the whole period in urban aerosol samples (mean  $0.73 \text{ ng/m}^3$ ) was significantly higher ( $p=0.028$ ) than the level measured in rural samples (mean  $0.21 \text{ ng/m}^3$ ). Specific contributions of urban and rural locations to the total PAH evolution in Extremadura are represented in Figure 2. As seen, urban PAHs present a major contribution to the PAH content and determine the concentration of the analytes associated with  $\text{PM}_{10}$  in the region. The highest average of the total PAHs was calculated for the urban site of Badajoz ( $0.80 \text{ ng/m}^3$ ) and in contrast, the lowest average value was obtained for the rural area of Monfragüe Natural Park ( $0.18 \text{ ng/m}^3$ ).

About individual PAHs, a comparison between urban and rural sites has been established. For all the analytes, significant differences ( $p<0.05$ ) has been found with the exception of acenaphthylene ( $p=0.925$ ) and acenaphthene ( $p=0.483$ ). On the other hand, significant differences between hot and cold periods ( $p=0.000$ ) were clearly observed for individual PAHs within urban sites (Figure 3A). Nevertheless, these significant differences were not found for rural sites ( $p=0.309$ ) because of the PAHs concentrations were, in many cases, below the detection limit (Figure 3B).



**Figure 3.** Diagram of individual PAHs evolution in the A)urban and B) rural locations

Benzo[a]pyrene has been demonstrated to be one of the most potent carcinogenic and genotoxic PAHs, it is therefore used as a marker for quantifying the carcinogenic risk of PAHs in ambient air, predominantly particle-bound PAHs (WHO 2000; Tham et al. 2008; European Directive 2004). For this reason, the European Union and Spanish legislation have defined a target value for benzo[a]pyrene of  $1 \text{ ng/m}^3$ , for the total content in  $\text{PM}_{10}$  fraction averaged over a calendar year (European Directive 2004; Real Decreto 2007).

The mean concentration of BaP in all locations was  $0.032 \text{ ng/m}^3$ , well below the  $1 \text{ ng/m}^3$  annual mean established as an objective value in the legislation. As expected, significant differences ( $p=0.009$ ) were found between BaP in urban locations (mean value  $0.062 \text{ ng/m}^3$ ) and rural locations (mean value  $0.008 \text{ ng/m}^3$ ), both average values also lower than the established limit. In Table 2, the annual mean values of BaP obtained in the present study are compared with other European background concentrations (EMEP, 2008), considering the differences among the study areas, the matrices and the analytical techniques. The concentrations of BaP at urban and rural areas monitored in this work (Badajoz, Cáceres, Mérida, Monfragüe and Zafra) are within the lowest data described. Only the values reported at Pallas (Finland), Birkenes (Norway), Spitsbergen, Zeppelinfjell (Norway) and Råö (Sweden) are below the values obtained in our study area.

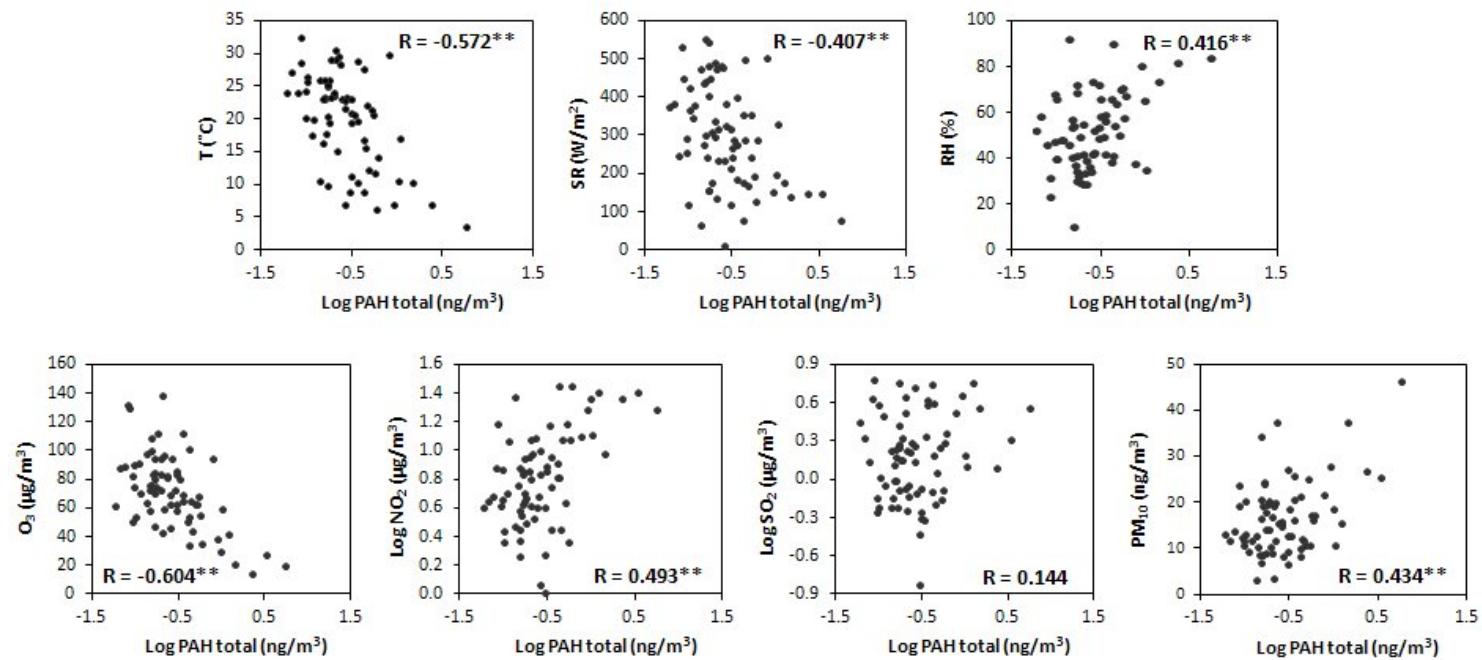


**Table 2.** Annual mean values of BaP in the present study area and other European background concentrations (EMEP, 2008)

Station	Country	Matrix	Sampling	Analysis	BaP (ng/m <sup>3</sup> )
Niembro	Spain	PM <sub>10</sub>	HVS		0.148
Kosetice	Czech Republic	air+aerosol	HVS	GC-MS	0.271
Westerland	Germany	air+aerosol	HVS	GC-ECD	0.113
Schauinsland	Germany	air+aerosol	HVS	GC-ECD	0.050
Schmücke	Germany	air+aerosol	HVS	GC-ECD	0.117
Zingst	Germany	air+aerosol	HVS	GC-ECD	0.195
Lahemaa	Estonia	air+aerosol			0.171
Pallas (Matorova)	Finland	air+aerosol	HVS	GC-MS	0.005
Rucava	Latvia	aerosol			0.105
Zoseni	Latvia	aerosol			0.095
Birkenes	Norway	air+aerosol	HVS	GC-MS	0.028
Spitsbergen, Zeppe- linfjell	Norway	air+aerosol	HVS	GC-MS	0.002
Diabla Gora	Poland	PM <sub>10</sub>	HVS		0.456
Aspvreten	Sweden	air+aerosol	HVS	GC-MS	0.059
Råö	Sweden	air+aerosol	HVS	GC-MS	0.041
Iskrba	Slovenia	PM <sub>10</sub>	LVS		0.229
<b>Badajoz</b>	Spain	PM <sub>10</sub>	HVS	GC-MS/MS	<b>0.047</b>
<b>Cáceres</b>	Spain	PM <sub>10</sub>	HVS	GC-MS/MS	<b>0.081</b>
<b>Mérida</b>	Spain	PM <sub>10</sub>	HVS	GC-MS/MS	<b>0.058</b>
<b>Monfragüe</b>	Spain	PM <sub>10</sub>	HVS	GC-MS/MS	<b>0.009</b>
<b>Zafra</b>	Spain	PM <sub>10</sub>	HVS	GC-MS/MS	<b>0.008</b>

### 3.3. Correlations of PAH levels with meteorological parameters and other atmospheric pollutants

Meteorological parameters, such as ambient temperature (T), solar radiation (SR) and relative humidity (RH), strongly affect PAH concentrations because chemical reactions involved in the atmosphere depends on weather conditions (Ravindra et al. 2006; Park et al. 2002). Correlations between these parameters and the total particulate PAH concentrations were evaluated using Pearson correlation method. The Pearson correlation coefficients obtained for total PAH concentrations in Extremadura with the meteorological parameters are plotted in Figure 4.



**Figure 4.** Correlations of total particle-bound PAH levels in Extremadura with the meteorological parameters (T, SR, RH) and atmospheric pollutants (O<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub> and PM<sub>10</sub>)

Particulate PAH levels show a significant negative correlation with temperature, indicating there is strong temperature dependence and seasonal behaviour for PAHs, as previously reported (Tsapakis and Stephanou 2005; Tham et al. 2008; Ravindra et al. 2006; Hien et al. 2007), and according with the results described in section 3.1. Also, solar radiation is negatively correlated with particulate PAH concentration. Higher solar irradiation is associated with lower particulate PAH levels because PAHs were found to be photo-sensitive and they could undergo chemical degradation under the irradiation of sunlight in the environment (Chetwittayachan et al. 2002). The result is in good agreement with previous studies (Tham et al. 2008; Park et al. 2002). On the other hand, a moderate and positive correlation was found with relative humidity and total particulate PAHs, in opposite to some reported data (Tsapakis and Stephanou 2005; Ravindra et al. 2006; Park et al. 2002). However, our experimental data are in agreement with the result reported by López-Cancio et al. 2002. This group has argued that an increase of the relative humidity favours the gas-particle conversion through condensation, resulting in a higher content of PAHs associated to the particulate phase.

Correlations of total particle-bound PAH levels with other atmospheric pollutants in Extremadura ( $O_3$ ,  $NO_2$ ,  $SO_2$  and  $PM_{10}$ ) were also investigated. Results are shown in Table 3 and represented in Figure 4. Ozone is a reactive atmospheric pollutant mainly originated from the photochemical reactions among  $NO_x$  and VOC in the presence of heat and sunlight (Tham et al. 2008). This study found a meaningful negative correlation between  $O_3$  and total particulate PAHs that could be explained by gas-particle partitioning. Highest mean value of  $O_3$  ( $85.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) was reached in Extremadura during summer season; it suggests that the reaction with  $O_3$ , favoured by temperature and solar irradiation, could be the most important atmospheric process responsible of the photo-degradation of particulate PAHs and consequently, the lowest concentrations observed during the hot period. Similar negative correlations were reported by other researchers (Tsapakis and Stephanou 2005; Tham et al. 2008; Park et al. 2002; Lodovici et al. 2003). Nitrogen dioxide is mainly a secondary pollutant originating from vehicular emissions (Tham et al. 2008). In this work, particulate PAH levels show a positive correlation with  $NO_2$ . The result is in good agreement with previous findings (Tsapakis and Stephanou 2005; Tham et al. 2008; Park et al. 2002). The observed correlation may indicate that both atmospheric pollutants are coming from common emission sources, with low temperatures favouring the high atmospheric concentrations of  $NO_2$  and the partitioning of PAHs in particulate phase (Tham et al. 2008). Sulfur dioxide is other atmospheric pollutant generally emitted by combustion sources such as fossil fuel combustion, wood burning or natural gas combustion (Tham et al. 2008). The very low concentrations of  $SO_2$  measured in Extremadura (mean value during the sampling period  $1.88 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) are probably the reason of no correlation with particulate PAHs. Correlation between particulate PAHs and  $PM_{10}$  was also investigated. Significant correlation was found, probably indicating that both pollutants are sharing a common emission source.

Correlation's studies of particulate PAHs with meteorological parameters and air pollutants were also performed independently for urban and rural locations. Results are summarised in Table 3. As expected, urban particulate PAHs show a similar behaviour than the total particulate PAHs in the region. According to the seasonal variation explained in section 3.1, urban particulate PAHs present a significant negative correlations with ambient temperature and solar radiation, and consequently, with ozone pollutant. Therefore, significant positive correla-

tions are found with the relative humidity, NO<sub>2</sub> and PM<sub>10</sub>, as expected. On the other hand, rural particulate PAHs levels are significantly correlated with the ambient temperature and ozone those are the most relevant parameter and pollutant in the study area. Significant correlation at 0.05 level was also found with the relative humidity. Other correlations were not established because of the concentrations of particulate PAHs and the rest of variables monitored in rural locations were very low.

**Table 3.** Specific Pearson's correlation coefficients of particulate PAHs with meteorological parameters and air pollutants in urban and rural locations

Pearson's correlation	T (°C)	SR (W/m <sup>2</sup> )	RH (%)	SR (W/m <sup>2</sup> )	O <sub>3</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	NO <sub>2</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	SO <sub>2</sub> (µg/m <sup>3</sup> )	PM <sub>10</sub> (ng/m <sup>3</sup> )
<b>Log PAH urban (ng/m<sup>3</sup>)</b>	-0.631**	-0.631**	0.530**	-0.631**	-0.662**	0.539**	-0.034	0.522**
<b>Log PAH rural (ng/m<sup>3</sup>)</b>	-0.516**	-0.291	0.377*	-0.291	-0.465**	0.260	-0.291	-0.137

\* Correlation is significant at the 0.05 level.

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level.

### 3.4. Diagnostic ratios for source assignment

To identify the origin of atmospheric PAHs in ambient air, emission sources were estimated by exploring diagnostics ratios of individual PAHs based on previously published works. The ratios should be used with caution since PAHs are emitted by a variety of sources and they are often difficult to discriminate. Moreover, the ratio can be altered due to the reactivity of some PAH species under certain environmental conditions and the presence of other atmospheric species (Ravindra et al. 2008a; Cheng et al. 2007). Table 4 summarised the main findings obtained from the calculated ratios and the corresponding references. Due to the differences found between urban and rural particulate PAH concentrations, the emission sources were assigned separately. In urban locations, six significant diagnostic ratios were found. Diesel and gasoline were characterised using different ratios and even road dust could be assigned; so, it might indicate that the traffic is the main source in urban locations. On the other hand, four diagnostic ratios were found significant in rural locations. Results include several sources related with traffic emissions and others with biomass burning. Road dust was also identified in rural locations because of the traffic is an important activity in them. A specific diagnostic ratio related with the emissions of a cement plant was also assigned, probably due to a similar activity developed in the area.

**Table 4.** Source identification of PAHs in urban and rural PM<sub>10</sub> samples of Extremadura, Spain

Sites	Diagnostic ratios	This study	Published values	Sources
URBAN	IcdP/(IcdP+BghiP)	0.52 ± 0.17	0.35-0.70 <sup>(1,2,3)</sup>	Diesel vehicles
			0.60-0.70 <sup>(4)</sup> ; 0.46 <sup>(5)</sup> ; 0.43 <sup>(6)</sup> ; < 0.5 <sup>(1,2,3)</sup>	Diesel vehicles
			0.47 <sup>(2)</sup> ; 0.40 <sup>(7)</sup> ; 0.41 <sup>(8)</sup>	Catalyst equipped cars
	FLO/(FLO+PYR)	0.44 ± 0.23	0.62 <sup>(6)</sup>	Oil burning
			0.42-0.52 <sup>(6)</sup>	Road dust
			0.21-0.26 <sup>(9)</sup>	Industrial furnaces
	BaP/(BaP+CHR)	0.49 ± 0.23	0.46 <sup>(2)</sup> ; 0.73 <sup>(10)</sup> ; 0.38-0.65 <sup>(8)</sup> ; 0.5 <sup>(1)</sup>	Diesel vehicles
			0.33 <sup>(11)</sup> ; 0.49 <sup>(10)</sup> ; 0.44 <sup>(12)</sup>	Catalyst equipped cars
	FLA/(FLA+PYR)	0.45 ± 0.17	0.5 <sup>(13)</sup>	Gasoline
			0.42 <sup>(14)</sup>	Fireplace
	*CPAH/**TPAH	0.58 ± 0.15	0.60 <sup>(2)</sup> ; 0.51 <sup>(7)</sup> ; 0.73 <sup>(6)</sup>	Catalyst equipped cars
			0.41 <sup>(7)</sup> ; 0.73 <sup>(6)</sup>	Non-catalyst cars
			0.72 <sup>(6)</sup>	Oil burning
			0.4-0.5 <sup>(15)</sup>	Vehicles
			0.38-0.64 <sup>(4)</sup> ; 0.37 <sup>(6)</sup>	Diesel vehicles
BaA/(BaA+CHR)	0.50 ± 0.17	0.22-0.55 <sup>(17)</sup>	Catalyst equipped cars	
		0.58 <sup>(6)</sup>	Non-catalyst cars	
		0.43 <sup>(18)</sup>	Wood combustion	
		0.38 <sup>(19)</sup>	Road dust	
RURAL	IcdP/(IcdP+BghiP)	0.55 ± 0.14	0.23-0.89 <sup>(9)</sup> ; 0.50 <sup>(8)</sup>	Industrial furnaces
			0.62 <sup>(1,3)</sup>	Wood combustion
			0.59 <sup>(14)</sup>	Woodstove
			0.61 <sup>(14)</sup>	Fireplace
			0.38-0.64 <sup>(4)</sup> ; 0.37 <sup>(5)</sup>	Diesel vehicles
	BaA/(BaA+CHR)	0.58 ± 0.17	0.22-0.55 <sup>(17)</sup>	Catalyst equipped cars
			0.58 <sup>(6)</sup>	Non-catalyst cars
			0.43 <sup>(18)</sup>	Wood combustion
			0.38 <sup>(19)</sup>	Road dust
			0.23-0.89 <sup>(9)</sup> ; 0.50 <sup>(8)</sup>	Industrial furnaces
	BghiP/BaP	0.97 ± 0.62	0.58 <sup>(3)</sup>	Cement plant
			1.2-2.2 <sup>(7)</sup>	Diesel vehicles
			0.4 <sup>(6)</sup>	Catalyst equipped cars
			0.8 <sup>(18)</sup>	Oil burning
			0.91 <sup>(6)</sup>	Road dust
FLO/(FLO+PYR)	0.44 ± 0.21	0.85 <sup>(15)</sup>	Shrub land fires	
		0.60-0.70 <sup>(4)</sup> ; 0.46 <sup>(5)</sup> ; 0.43 <sup>(6)</sup> ; < 0.5 <sup>(1,2,3)</sup>	Diesel vehicles	
		0.47 <sup>(2)</sup> ; 0.40 <sup>(7)</sup> ; 0.41 <sup>(8)</sup>	Catalyst equipped cars	
		0.62 <sup>(6)</sup>	Oil burning	
		0.42-0.52 <sup>(6)</sup>	Road dust	
		0.21-0.26 <sup>(9)</sup>	Industrial furnaces	

\*CPAH (Combustion PAHs) = FLO+PYR+BaA+BbF+BkF+BaP+IcdP+BghiP; \*\*TPAH = total PAHs

<sup>1</sup>Ravindra et al. 2008a; <sup>2</sup>Sienra et al. 2005; <sup>3</sup>Cheng et al. 2007; <sup>4</sup>Sicre et al. 1987; <sup>5</sup>Mantis et al. 2005; <sup>6</sup>Manoli et al. 2004; <sup>7</sup>Rogge et al. 1993; <sup>8</sup>Kavouras et al. 1999; <sup>9</sup>Yang et al. 1998; <sup>10</sup>Khalili et al. 1995; <sup>11</sup>Gogou et al. 1996; <sup>12</sup>Guo et al. 2003; <sup>13</sup>Vardar et al. 2008; <sup>14</sup>Gonçalves et al. 2011; <sup>15</sup>Vicente et al. 2011; <sup>16</sup>Alves et al. 2011; <sup>17</sup>Simcik et al. 1999; <sup>18</sup>Li et al. 1993; <sup>19</sup>Oda et al. 2001.

#### **4. Conclusions**

An analytical methodology based on reflux solvent extraction and GC-MS/MS has been optimised and validated for performing a first exploratory evaluation of PAH profiles in aerosol samples from low polluted urban and rural areas of Extremadura, Spain. Low detection limits, which can be only attained by extreme cautions to prevent contamination risks, allow the determination of 16 PAHs well below the Spanish and European legal reference concentration values (1 ng/m<sup>3</sup> for benzo[a]pyrene). A very low total average content of the particle-bound PAHs was obtained in the current study (0.45 ng/m<sup>3</sup>).

A typical seasonal variation was confirmed for total particulate PAHs in Extremadura, with maximum concentrations during the cold months. It was found that the total PAH concentration had a good negative correlation with ambient temperature and solar radiation, and positive correlation with the relative humidity, suggesting that gas-particle partitioning may be an important factor governing the aerosol concentration. As to the influence of other atmospheric pollutants, NO<sub>2</sub> and PM<sub>10</sub> are significantly correlated with the total PAHs determined in the whole studied area, suggesting that the analytes are emitted from the same source, while O<sub>3</sub> had a good negative correlation, indicating that ozonolysis plays an important role in the transformation of the analytes in the atmosphere. No correlations were found with SO<sub>2</sub> found in very low concentrations in the area.

A remarkable spatial influence was found between urban and rural locations. PM<sub>10</sub>-bound PAH concentrations were higher at the urban sites, monitoring the highest level in Badajoz, and were lower at the rural sites, registering the lowest mean level in Monfragüe National Park.

Source assignment based on PAH diagnostic ratios have shown that vehicular emissions are the most relevant sources in the atmosphere of urban and rural locations. An important contribution of sources related with biomass burning was also found in rural sites.

These results have important implications in PAH pollution control and public health as well as for increased knowledge of ambient PAH levels in extreme low polluted urban and remote rural locations in the south-western Spain.

#### **Acknowledgements**

We acknowledge the air quality surveillance network of Extremadura, Spain (Junta de Extremadura, Consejería de Industria Energía y Medioambiente) for financial support and for providing the aerosol samples. Financial support was also received from Agencia Española de Cooperación Internacional al Desarrollo (AECID), project D/023184/09. E. Bernalte acknowledges a grant from Junta de Extremadura, Spain (PRE09107).

## References

- Aceves, M., 1993. Seasonally dependent size distributions of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols from densely populated areas. *Environmental Science Technology* 27, 2896-2908.
- Alves, C. A., Vicente, A., Monteiro, C., Gonçalves, C., Evtugina, M., Pio, C., 2011. Emission of trace gases and organic components in smoke particles from a wildfire in a mixed-evergreen forest in Portugal. *Science of the Total Environment* 409, 1466-1475.
- Barrado, A. I., García, S., Barrado, E., Pérez, R. M., 2011. PM<sub>2.5</sub>-bound PAHs and Hydroxy-PAHs in atmospheric aerosol samples: Correlations with season and with physical and chemical factors. *Atmospheric Environment*, in press.
- Barrero Mazquiarán, M. A., Cantón Ortiz de Pinedo, L., 2007. Organic composition of atmospheric urban aerosol: Variations and sources of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmospheric Research* 85, 288-299.
- Callén, M. S., De la Cruz, M. T., López, J. M., Murillo, R., Navarro, M. V., Mastral, A. M., 2008. Long-range atmospheric transport and local pollution sources on PAH concentrations in a south European urban area. Fulfilling of the European Directive. *Water, Air and Soil Pollution* 190, 271-285.
- Castro, D., Slezakova, K., Oliva-Teles, M. T., Delerue-Matos, C., Conceição Alvim-Ferraz, M., Morais, S., Carmo Pereira, M., 2009. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate samples by microwave-assisted extraction and liquid chromatography. *Journal of Separation Science* 32, 501-510.
- Cereceda-Balic, F., Kleist, E., Prast, H., Schlimper, H., Engel, H., Günther, K., 2002. Description and evaluation of a sampling system for long-time monitoring of PAHs wet deposition. *Chemosphere* 49, 331-340.
- Cheng, J., Yuan, T., Wu, Q., Zhao, W., Xie, H., Ma, Y., Ma, J., Wang, W., 2007. PM<sub>10</sub>-bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Cancer Risk Estimation in the Atmosphere Surrounding an Industrial Area of Shanghai, China. *Water, Air and Soil Pollution* 183, 437-446.
- Chetwittayachan, T., Shimazaki, D., Yamamoto, K., 2002. A comparison of temporal variation of particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons (pPAHs) concentration in different urban environments: Tokyo, Japan, and Bangkok, Thailand. *Atmospheric Environment* 36, 2027-2037.
- Dvorská, A., Lammel, G., Klánová, J., 2011. Use of diagnostic ratios for studying source apportionment and reactivity of ambient polycyclic aromatic hydrocarbons over Central Europe. *Atmospheric Environment* 45, 420-427.
- European Directive 2004/107/EC. Official Journal of the European Union.

- European Standard EN-15549 Air Quality, 2008. Standard method for the measurement of the concentration of benzo[a]pyrene in ambient air.
- Gonçalves, C., Alves, C., Fernandes, A. P., Monteiro, C., Tarelho, L., Evtyugina, M., Pio, C., 2011. Organic compounds in PM<sub>2.5</sub> emitted from fireplace and woodstove combustion of typical Portuguese wood species. *Atmospheric Environment* 45, 4533-4545.
- Gogou, A., Stratigakis, N., Kanakidou, M., Stephanou, E. G., 1996. Organic aerosols in Eastern Mediterranean: components source reconciliation by using molecular markers and atmospheric back trajectories. *Organic Geochemistry* 25, 79-96.
- Guo, H., Lee, S. C., Ho, K. F., Wang, X. M., Zou, S. C., 2003. Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air of Hong Kong. *Atmospheric Environment* 37, 5307-5317.
- Gutiérrez-Dabán, A., Fernández Espinosa, A. J., Ternero Rodríguez, M., Fernández Álvarez, F., 2005. Particle-size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air in southern Spain. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381, 721-736.
- Hien, T. T., Nam, P. P., Yasuhiro, S., Takayuki, K., Norimichi, T., Hiroshi, B., 2007. Comparison of particle-phase polycyclic aromatic hydrocarbons and their variability causes in the ambient air in Ho Chi Minh City, Vietnam and in Osaka, Japan, during 2005-2006. *Science of the Total Environment* 382, 70-81
- Kavouras, I. G., Lawrence, J., Koutrakis, P., Stephanou, E. G., Oyola, P., 1999. Measurement of particulate aliphatic and polynuclear aromatic hydrocarbons in Santiago de Chile: source reconciliation and evaluation of sampling artifacts. *Atmospheric Environment* 33, 4977-4986.
- Khalili, N. R., Scheff, P. A., Holsen, T. M., 1995. PAH source fingerprints for coke ovens, diesel and, gasoline engines, highway tunnels, and wood combustion emissions. *Atmospheric Environment* 29, 533-542.
- Li, C. K., Kamens, R. M., 1993. The use of polycyclic aromatic hydrocarbons as source signatures in receptor modelling. *Atmospheric Environment* 27, 523-532.
- Li, W., Peng, Y., Shi, J., Qiu, W., Wang, J., Bai, Z., 2011. Particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban Northeast Region of China: Profiles, distributions and sources. *Atmospheric Environment* 45, 7664-7671.
- Li, Z., Porter, E. N., Sjöden, A., Needham, L. L., Lee, S., Russell, A. G., Mulholland, J. A., 2009. Characterization of PM<sub>2.5</sub>-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in Atlanta-Seasonal variations at urban, suburban, and rural ambient air monitoring sites. *Atmospheric Environment* 43, 4187-4193.
- Lodovici, M., Venturini, M., Marini, E., Grechi, D., Dolara, P., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Florence, Italy, and their correlation with other air pollutants. *Chemosphere* 50, 377-382.



- López-Cancio, J. A., Vera Castellano, A., Navarro Trujillo, R., Corujo Jiménez, J., 2002. Particle phase concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmospheric environment of Jinámar, Gran Canaria. *Water, Air and Soil Pollution* 136, 93–103.
- Manoli, E., Kouras, A., Samara, C., 2004. Profile analysis of ambient and source emitted particle-bound polycyclic aromatic hydrocarbons from three sites in northern Greece. *Chemosphere* 56, 867-878.
- Mantis, J., Chaloulakou, A., Samara, C., 2005. PM10-bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Greater Area of Athens, Greece. *Chemosphere* 59, 593-604.
- Oda, J., Nomura, S., Yasuhara, A., Shibamoto, T., 2001. Mobile sources of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in a roadway tunnel. *Atmospheric Environment* 35, 4819-4827.
- Park, S. S., Kima, Y. J., Kang, C. H., 2002. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Seoul, Korea. *Atmospheric Environment* 36, 2917–2924.
- Position Paper, 2001. Ambient air pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). European Communities, Luxembourg.
- Ravindra, K., Bencs, L., Wauters, E., De Hoog, J., Deutsch, F., Roekens, E., Bleux, N., Berghmans, P., Van Grieken, R., 2006. Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. *Atmospheric Environment* 40, 771-785.
- Ravindra, K., Wauters, E., Van Grieken, R., 2008a. Variation in particulate PAHs level and their relation with the transboundary movement of their masses. *Science of the Total Environment* 396, 100-110.
- Ravindra, K., Sokhi, R., Van Grieken, R., 2008b. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmospheric Environment*, 42, 2895-2921.
- Real Decreto 812/2007 sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente en relación con el arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos.
- Sicre, M.A., Marty, J.C., Saliot, A., Aparicio, X., Grimalt, J., Albaiges. J., 1987. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in different sized aerosols over the Mediterranean Sea: Occurrence and origin. *Atmospheric Environment* 21, 2247-2259.
- Rogge, W. F., Mazurek, M. A., Hildemann, L. M., Cass, G. R., Simoneit, B. R. T., 1993. Quantification of urban organic aerosols at a molecular level: Identification, abundance and seasonal variation. *Atmospheric Environment*. 27, 1309-1330.
- Sienra, M. R., Rosazza, N. G., Préndez, M., 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their molecular diagnostic ratios in urban atmospheric respirable particulate matter. *Atmospheric Research* 75, 267-281.

- Simcik, M. F., Eisenreich, S. J., Lioy, P. J., 1999. Source apportionment and source/sink relationships of PAHs in the coastal atmosphere of Chicago and Lake Michigan. *Atmospheric Environment* 33, 5071-5079.
- Simó, R., Colom-Altes, M., Grimalt, J.O., Albaiges, J., 1991. Background levels of atmospheric hydrocarbons, sulphate and nitrate over the western Mediterranean. *Atmospheric Environment* 25, 1463-1471.
- Srogi, K., 2007. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters* 5, 169-195.
- Tham, Y. W. F., Takeda, K., Sakugawa, H., 2008. Exploring the correlation of particulate PAHs, sulfur dioxide, nitrogen dioxide and ozone. A preliminary study. *Water, Air and Soil Pollution* 194, 5-12.
- Tsapakis, M., Stephanou, E. G., 2005. Occurrence of gaseous and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere: study of sources and ambient temperature effect on the gas/particle concentration and distribution. *Environmental Pollution* 133, 147-156.
- Vardar, N., Esen, F., Tasdemir, Y., 2008. Seasonal concentrations and partitioning of PAHs in a suburban site of Bursa, Turkey. *Environmental Pollution* 155, 298-307.
- Vera Castellano, A., López Cancio, J., Santana Alemán, P., Santana Rodríguez, J., 2003. Polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air particles in the city of Las Palmas de Gran Canaria. *Environment International* 29, 475-480.
- Vestenius, M., Leppänen, S., Anttila, P., Kyllönen, K., Hatakka, J., Hellén, H., Hyvärinen, A-P., Hakola, Hannele., Background concentrations and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in south-eastern Finland. *Atmospheric Environment* 45, 3391-3399.
- Vicente, A., Alves, C., Monteiro, C., Nunes, T., Mirante, F., Evtugina, M., Cerqueira, M., Pio, C., 2011. Measurement of trace gases and organic compounds in the smoke plume from a wildfire in Penedono (central Portugal). *Atmospheric Environment* 45, 5172-5182.
- Villar, P., Callejón, M., Alonso, E., Jiménez, J. C., Guiraúm, A., 2004. Optimization and validation of a new method of analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge by liquid chromatography after microwave assisted extraction. *Analytica Chimica Acta* 524, 295-304.
- WHO, 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons in air. Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
- Yang, H-H., Lee, W-J., Chen, S-J., Lai, S-O., 1998. PAH emission from various industrial stacks. *Journal of Hazardous Materials* 60, 159-174.

Yusà, V., Quintas, G., Pardo, O., Pastor, A., de la Guardia, M., 2006. Determination of PAHs in airborne particles by accelerated solvent extraction and large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 69, 807-815.



## 3.2. Artículo II.

Determination of Mercury in Ambient Water Samples by Anodic Stripping Voltammetry on Screen-printed Gold Electrodes

---

---



# DETERMINATION OF MERCURY IN AMBIENT WATER SAMPLES BY ANODIC STRIPPING VOLTAMMETRY ON SCREEN-PRINTED GOLD ELECTRODES

*Analytica Chimica Acta 689 (2011) 60–64*

E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil\*

*Department of Analytical Chemistry, University of Extremadura*

*Av.de Elvas, s/n, E-06071 Badajoz, Spain*

## **Abstract**

The applicability of commercial screen-printed gold electrodes (SPGE) for the determination of Hg(II) in ambient water samples by square wave anodic stripping voltammetry has been demonstrated. Electrode conditioning procedures, chemical and instrumental variables have been optimized to develop a reliable method capable of measuring dissolved mercury in the low ng/mL range (detection limit 1.1 ng/mL), useful for pollution monitoring or screening purposes. The proposed method was tested with the NIST 1641d Mercury in Water Standard Reference Material (recoveries 90.0 – 110 %) and the NCS ZC 76303 Mercury in Water Certified Reference Material (recoveries 82.5 – 90.6 %). Waste water samples from industrial origin and fortified rain water samples were assayed for mercury by the proposed method and by a reference ICP-MS method, with good agreement. Screen printing technology thus opens a useful way for the construction of reliable electrochemical sensors for decentralized or even field Hg(II) testing.

**Keywords:** *Hg(II); SWASV; Screen-printed gold electrodes; Rain water; Waste water.*





## 1. Introduction

Mercury remains as the most worrying heavy metal pollutant at the global scale. Atmospheric emission of elemental mercury can disperse great distances and stay in the atmosphere for between six months and two years. In aquatic environments, atmospherically deposited inorganic mercury and direct anthropogenic emissions can be converted to organic forms of mercury, particularly methylmercury, which is bioaccumulative and toxic. The United States Comprehensive Environmental Response, Compensation, and Liability Act (CERCLA) lists mercury and its compounds in third place on the "Priority List of Hazardous Substances" and the European Water Framework Directive (2000/60/EG) classifies mercury as one of 30 "precarious dangerous pollutants".

Efficient control of mercury environmental levels in remote places (e.g. air, wet deposition, natural waters), requires simple, fast and reliable analytical protocols. Most standardized approaches for environmental mercury monitoring, based on cold vapour atomic fluorescence or atomic absorption [1] are problematic for environmental measurements, since related instrumentation is expensive and hardly portable, and thus requires special care by skilled personnel.

Electroanalytical approaches appear as attractive alternatives for environmental monitoring of mercury. Several types of solid electrodes have been so far reported for the voltammetric stripping analysis of mercury, such as gold disk [2], gold film [3, 4] and gold microelectrode arrays [5]. In recent literature, chemical modification of the surface of the gold electrodes is proposed to improve the sensitivity in mercury determination and has become a useful option for environmental applications [6]. Gold is described in the literature as the best electrode material used for mercury determination by different electroanalytical techniques i.e. ASV, SWASV, DPASV or PSA, because of its high affinity for mercury enhances the preconcentration effect. The major drawback of gold electrodes is the well-known phenomenon of structural changes of their surface, caused by amalgam formation, and the time-consuming cleaning treatments that are needed to achieve reproducibility [7].

Taking into account that the ideal analytical strategy for analyzing toxic elements in the environment consist of their direct and rapid in situ determination, new electrochemical devices based on gold screen-printing technology have been designed as an attractive alternative to substitute conventional solid or gold film electrodes [8]. The increasing availability of low-price homemade and commercial screen-printed electrochemical platforms has open new fields for decentralized electroanalytical measurements in a variety of samples [9, 10]. Screen-printed electrodes are made on plastic or ceramic substrates where working, counter and reference electrodes are printed. They are commercially available and they present a great versatility, because they can be manufactured depending on the application. They can be connected to the portable potentiostat and can be operated in static mode (drop sensor), hydrodynamic mode (common electrochemical cell) or in flowing systems.

About the application of screen-printed sensors for anodic stripping Hg(II) determination, a few references are reported in the literature. Chiu et al [11] proposed a new method for determination of mercury in cosmetic samples using silver ink screen-printed electrodes. Wang

and Tian [12] described the basic electrochemical behaviour of Hg(II) on screen-printed carbon electrodes coated with a gold film. The same approach has been described by Adil et al [13] for analysis of mercury in tap water by SWASV. Recently available gold screen printed electrodes (SPGE) are more attractive since no need of preplating steps are needed. Laschi et al [14] and Meucci et al [15] have explored three electrode strips made on plastic substrate and based on gold working electrode, carbon counter electrode and silver reference electrode for determination of some heavy metals, including mercury, with some applications described to mercury detection in fish tissues [15]. No report has been found about the application of commercial SPGEs to the routine measurement of mercury in water samples, so the main objective of our work has been the investigation of this possibility, as a means for decentralized or “in situ” Hg(II) testing in environmental water samples.

## **2. Experimental**

### **2.1. Reagents**

All chemicals used for the preparation of stock and standard solutions were of analytical grade. 10 mg/L stock solution of Hg(II) (ICP quality) was supplied by PerkinElmer (Spain). Working solutions were prepared by dilution with ultrapure water obtained from a MilliQ (Millipore) system. Dilute standards were adjusted to pH 2 with subboiled HNO<sub>3</sub> obtained from a quartz distiller (Kürner, Germany). Hiperpur grade HCl was purchased from Panreac (Spain). All other reagents were of analytical grade.

### **2.2. Reference materials and real samples**

Samples of the NIST Standard Reference Material® 1641d Mercury in Water and NCS ZC 76316 Mercury in Water were used as received for accuracy evaluation.

The rain water samples were collected in glass beakers previously conditioned for trace analysis (immersed in hot acid nitric at 10%, rinsed with ultrapure water, dried in stove and kept in hermetic plastic bags). The beakers were exposed to rain for 48 hours in the top of a pole (150 height). The collected samples were acidified to pH 2 at the sampling site by adding minute amounts of subboiled nitric acid. The recipients were then closed, transferred to the lab and stored in a fridge (4° C) until analysis. The determination was carried out same day or the next. No further pretreatment was applied to the samples before Hg(II) determination.

Waste water samples from an industrial water treatment plant serving a smelting facility was provided by A. G. Siderurgia Balboa (Jerez de los Caballeros, Spain). The samples were acidified to pH 2 with subboiled nitric acid and stored in a fridge (4° C) until assayed.

### **2.2. Instrumentation**

Square wave voltammetric measurements were taken by a computerized hand-held, battery-powered PalmSens potentiostat/galvanostat (Palm Instruments BV, The Netherlands) interfaced with a laptop. The whole analytical procedure is controlled by the PalmSens PC software, including stirring of the samples by a standard stirrer and magnetic bar. Screen-

printed three electrode strips were purchased from DropSens (Spain). They include a three electrode configuration printed on the same strip. The dimensions of the strips are 3.4 x 1.0 x 0.05 cm (length x width x height) and they present a 4 mm diameter disk gold working electrode (SPGE) and counter electrode, both printed on alumina substrate using heat curing composite inks, and a silver pseudo-reference electrode. An insulating layer serves to delimit the working area and electric contacts. Ink formulation and production characteristics of commercial SPGEs are regarded by the manufacturers as proprietary information. A specific connector allows the connection of the electrochemical strip to the potentiostat. The electrochemical strips were mounted on a novel cell configuration recently described by our group [16], for fast and highly efficient convective accumulation by conventional stirring. Briefly, the gold screen-printed strip is inserted face down through a partially cut 16 mm diameter (10 mL volume) plastic tube, leaving the electrical connection out of the tube. The stirring bar is placed in the bottom of the tube, close and parallel to the working electrode surface for highly effective and repeatable convection transport of analytes.

A standard ICP-MS protocol for Hg(II) determination was used for accuracy check of the electrochemical results on a Perkin Elmer ELAN 9000 equipment.

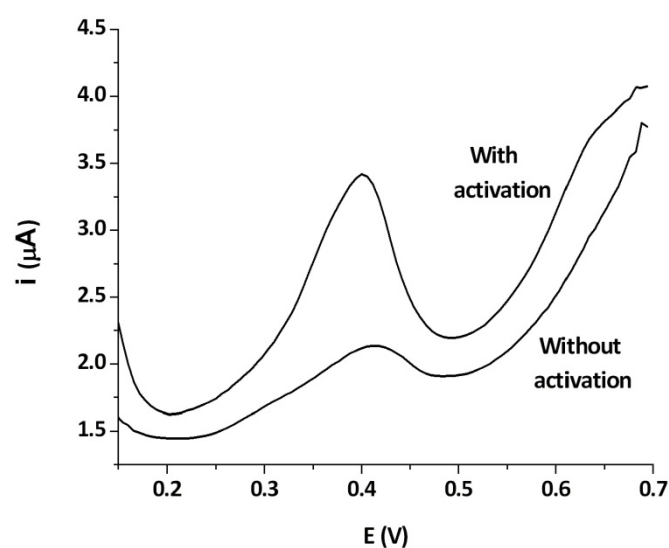
### **2.3. Experimental procedure**

A new screen-printed strip was inserted into the convective cell and the system was sealed with a plastic film. The gold surface was conditioned to obtain a proper baseline and stable response, by applying five cycles of cyclic voltammetry (CV) using the following conditions: potential range between 0.0 and +0.7 V, scan rate 50 mV/s, step potential 3 mV and conditioning potential +0.7 V for 15 s which was carried out in HCl 0.10 M. Once the electrode was conditioned, 5 mL of sample was placed in the convective cell and the SWASV determination was started (no deaeration needed). The chloride concentration of the samples was adjusted to 0.10 M by adding the appropriate amount of HCl. The measurements were performed using these conditions: conditioning potential +0.7 V for 15 s, deposition potential +0.3 V for 60 s, equilibration time 10 s, amplitude 40 mV, step potential 6 mV, frequency 20 Hz and stirring rate 600 rpm. Initial and final potentials were +0.1 V and +0.7V. Bulk stripping voltammetric signals (without blank subtraction) were used for peak current measurement. Hg(II) quantification in the real samples was performed by external calibration.

## **3. Results and discussion**

### **3.1. Electrode activation and supporting electrolyte**

Gold electrode activation, connected with a proper selection of the supporting electrolyte, is essential to obtain sharp and reproducible signals in voltammetric stripping measurements of Hg(II), as described by several authors [2, 3, 5, 7, 14]. The need of the electrochemical activation procedure using SPGE is clearly demonstrated by comparing the square wave anodic stripping voltammogram of 50 ng/mL of mercury in 0.1 M HCl obtained before and after activation by five cycles of cyclic voltammetry (CV) [14], using the following conditions: potential range 0/+0.7V, scan rate 50 mV/s (Figure 1).



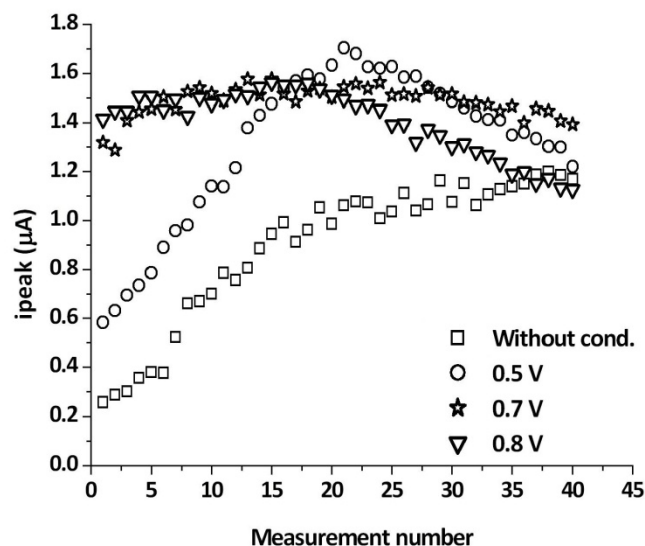
**Figure 1.** Square wave anodic stripping voltammograms of 50 ng/mL of Hg(II) in HCl 0.1 M on an activated and on a non-activated SPGE. Activation by five cycles of cyclic voltammetry (CV) using the following conditions: potential range 0/+0.7V, scan rate 50 mV/s. Square-wave voltammetric stripping signals performed in a convective cell with a frequency of 20 Hz, step potential 6 mV, amplitude 40 mV, deposition potential + 0.3 V and deposition time 60 s.

According to the previous literature reports, hydrochloric acid was chosen as supporting electrolyte not only because it is widely used for the electrochemical detection of mercury [3; 7; 13], also because a constant concentration of chloride ions in the medium is very important to ensure the stability of the screen-printed Ag pseudo-reference electrode [14]. Particularly for Hg(II) determination, the chloride ions present in the solution enhance the shift of the mercury stripping peak to more negative potentials, probably due to the formation of mercury chloro-complexes, decreasing the background current and improving the sensitivity [2, 7, 17].

The influence of HCl concentration on the sensitivity of 50 ng/mL of Hg(II) voltammetric signals was evaluated. The experiments were performed at 0.05 M, 0.10 M and 0.15 M of HCl, using the following procedure: SPGE activation (5 cycles between 0 and +0.7 V, scan rate 50 mV/s, step potential 3 mV and conditioning potential +0.7 V for 15 s) and SWASV analysis of Hg(II) (conditioning potential +0.7 V for 15 s, deposition potential +0.3 V for 60 s, amplitude 40 mV, step potential 6 mV, frequency 20 Hz and equilibration time 10 s). Better responses in terms of sensitivity, repeatability and reproducibility were obtained at 0.10 M HCl, as reported in the literature [14].

From the cyclic voltammetry methodology proposed by Laschi et al [14] for the conditioning of the SPGE, the influence of the number of cycles and the conditioning potential applied were carefully investigated. Measurements of 50 ng/mL of Hg(II) were performed using the same method described above using HCl 0.10 M as supporting electrolyte. In the first case, the most repeatable and reproducible voltammetric signals were obtained at 5 cycles versus 10 cycles, in agreement with the author's publication. In the second, the influence of the conditioning potential, not reported in the paper, was evaluated performing the experiments without conditioning and at potentials 0.5, 0.7 and 0.8 V. The results are shown in Figure 2. As it can be

seen, this parameter is very important for the sensitivity and stability of the voltammetric signals of Hg(II). From these results, a potential of 0.7 V, applied for 15 s, was chosen for further experiments.



**Figure 2.** Effect of conditioning potential for screen-printed gold electrode activation by cyclic voltammetry on the mercury (50 ng/mL) peak height in HCl 0.1 M. Cyclic voltammetry activation with 5 cycles between 0 and +0.7 V, scan rate 50 mV/s, step potential 3 mV and square-wave voltammetric stripping measurements with a frequency of 20 Hz, step potential 6 mV, amplitude 40 mV, deposition potential + 0.3 V and deposition time 60 s.

### 3.2 Instrumental variables

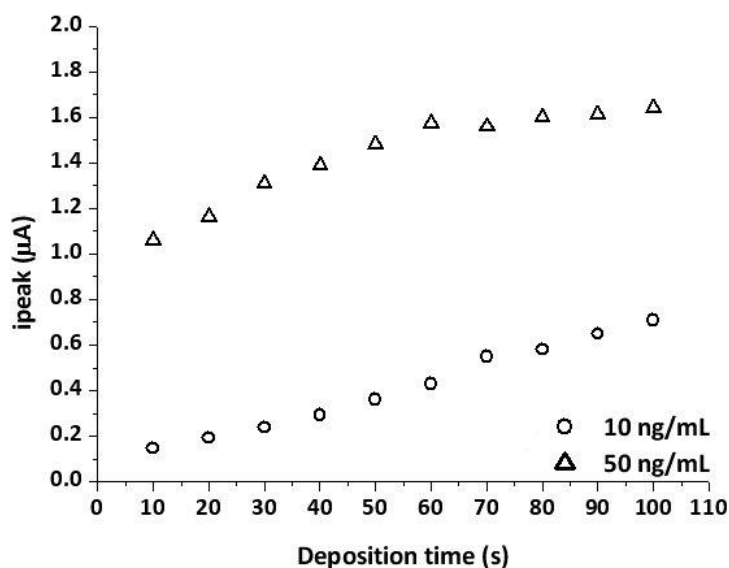
The effects of different instrumental variables (modulation amplitude, frequency, step potential, deposition potential and deposition time) for Hg(II) determination by SWASV were investigated. For this purpose, measurements of 50 ng/mL Hg(II) solutions were performed in duplicate. Deposition time was 60 s.

Modulation amplitude influence was investigated in the range 10-70 mV. According to the theoretical predictions [18], the Hg(II) stripping signal increased up to 40 mV, then decreased due to peak broadening. A similar behaviour was observed when frequency varied from 5 to 35 Hz (optimal value 20 Hz). Step potential was varied in the range 1-10 mV. The analytical signal increased up to 6 mV, a slight decrease of the signal was observed for higher values. Optimal measurement parameters were: modulation amplitude 40 mV, frequency 20 and step potential 6 mV.

The effect of deposition potential was evaluated in the range from -0.1 V to peak potentials reported by other researchers. The highest voltammetric signal was obtained with a deposition potential of +0.3 V, which is chosen as optimal value. The optimization process of this parameter was performed in this narrow potential range because no usable voltammetric signals were obtained at deposition potentials under -0.1 V. At these low potentials, other small signals appeared in the voltammogram and irreversible changes were produced on the surface of the

gold working electrode. These unreported findings are probably related to the SPGE manufacturing process.

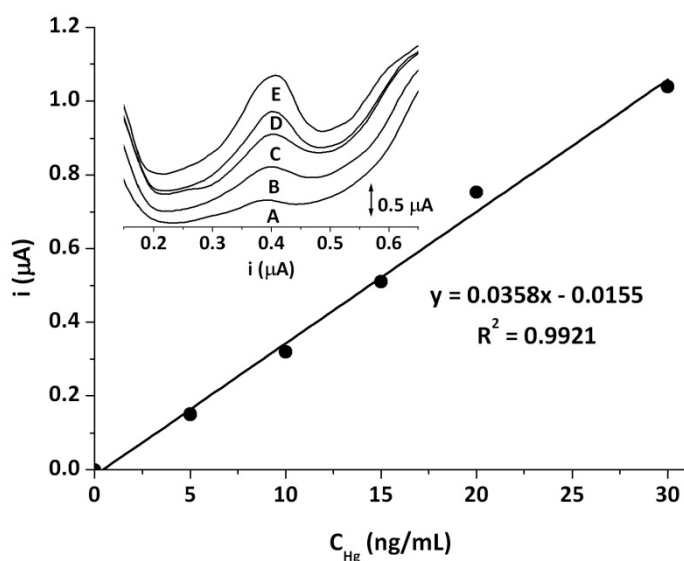
Finally, the influence of deposition time on the peak currents was tested. The deposition time was varied from 0 to 100 s in increments of 10 s; experiments were conducted on 10 and 50 ng/mL Hg(II) solutions. The results are shown in the Figure 3. It is noticeable that the linearity of the response with deposition time is limited to about 60 s. Early surface saturation is probably derived from the nature of the gold ink used for screen printing of the commercial electrodes used, in contrast to thicker solid gold surfaces previously used for mercury accumulation [7, 19].



**Figure 3.** Influence of deposition time on stripping responses of 10 and 50 ng/mL of Hg(II) in HCl 0.1 M at the screen-printed gold electrode. Square-wave voltammetric stripping measurements performed in a convective cell with a frequency of 20 Hz, step potential 6 mV, amplitude 40 mV and deposition potential + 0.3 V.

### 3.3. Calibration data

Calibration data for Hg(II) by using screen-printed gold electrodes were estimated by analyzing standard solutions of increasing concentrations from 5 to 30 ng/mL as shown in Figure 4.



**Figure 4.** Calibration curve and respective voltammetric curves for increasing concentrations of Hg(II) in HCl 0.1 M by using the SWASV optimized method at the screen-printed gold electrode performed in a convective cell (A: 5 ng/mL; B: 10 ng/mL; C: 15 ng/mL; D: 20 ng/mL; E: 30 ng/mL).

The detection limit, calculated according to the IUPAC definition, was 1.1 ng/mL for a deposition time of 60 s. This is enough to meet the requirements of the U.S. EPA regulations for acceptable  $Hg^{2+}$  levels in drinking water (2 ng/mL). Our detection limit compares favourably with previously described voltammetric methods for mercury at gold film on screen printed electrodes, with the additional advantage of employing a ready to use device instead of a pre-deposited gold film. Wang and Tian [12] found a detection limit of 0.5 ng/mL but using 4 min deposition time. Mandil et al [13] calculated a detection limit of 1.5 ng/mL for 120 s deposition time. About screen printed gold electrodes, Laschi et al [14] described a detection limit of 0.9 ng/mL with 120 s deposition time.

Other relevant analytical parameters evaluated were the linearity (97.8 %) and the analytical sensitivity (0.94 ng/mL). The reproducibility different SPGE sensors was verified by analyzing a 50 ng/mL of Hg(II) solution on five different electrodes, the relative standard deviation was 3.7 % in agreement with previous results [13, 14]. The repeatability of the measurements on a single SPGE was also examined with 40 repetitive measurements of a 50 ng/mL Hg(II) solution, a relative standard deviation of 4.3 % was obtained. These results show the good stability of the electrode surface, despite of the disposable nature of these low cost electrodes, thus allowing continuous monitoring of Hg(II) with a single electrode.

### 3.4. Certified reference materials and real samples

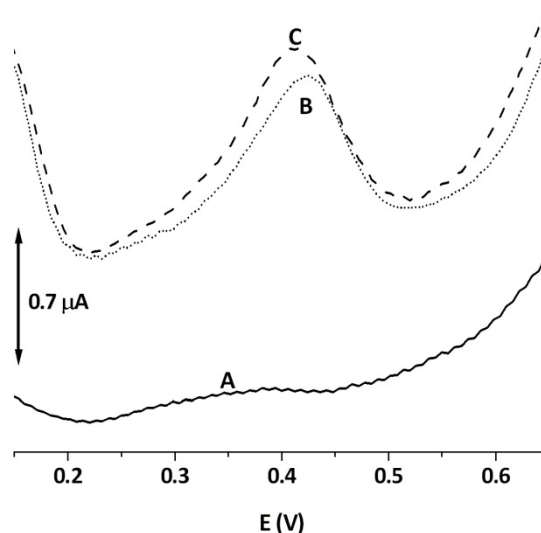
The proposed voltammetric stripping method was applied to certified and real water samples. All measurements for each sample, including blanks and sample run, were performed on the same screen-printed strip mounted on the previously described convective cell. The proposed method was tested with the NIST 1641d Mercury in Water Standard Reference Material and the NCS ZC 76303 Mercury in Water Certified Reference Material. Results are summarized

in Table 1, showing the capability of the method for the proper measurement of mercury in real water matrices for different concentration ranges.

**Table 1.** Determination of Hg(II) on screen-printed gold electrodes in standard reference materials. Square-wave voltammetric stripping measurements with a frequency of 20 Hz, step potential 6 mV, amplitude 40 mV, deposition potential + 0.3 V and deposition time 60 s.

Reference Materials	Certified values	Experimental values	Recovery (%)
NIST 1641 d	1.557 ± 0.020 mg/kg	1.558 ± 0.156 mg/kg	90.0 – 110
NCS ZC 76303	10.0 ± 0.4 ng/g	8.7 ± 0.4 ng/g	82.5 – 90.6

A waste water sample from the effluent of an industrial wastewater treatment plant was assayed for mercury by the proposed method and by a standard reference ICP-MS method, with good agreement (SWASV value, 1.73 ± 0.11 ng/mL; ICP-MS value, 1.70 ± 0.04 ng/mL). The method was then tested on rain water collected at the city of Badajoz. As expected, Hg(II) was undetectable so it was fortified with Hg(II) to 15 and 20 ng/mL. Voltammograms of some real water samples are shown in the Figure 5.



**Figure 5.** Stripping voltammograms for waste water sample (A) and rain water samples fortified with 15 ng/mL of Hg(II) (B) and 20 ng/mL of Hg(II) (C) on screen-printed gold electrode in HCl 0.1 M. Square-wave voltammetric stripping measurements performed in a convective cell with a frequency of 20 Hz, step potential 6 mV, amplitude 40 mV, deposition potential + 0.3 V and deposition time 60 s.

The proposed method gave recoveries ranging from 81.5 to 102.9 % at the 15 ng/mL fortification level, and the recoveries for the 20 ng/mL fortification level were 97.1 to 111.1 %. These results demonstrate the applicability of the method to Hg(II) monitoring in real water samples without noticeable matrix effects. This is the first report about application of commercial disposable screen printed electrode to mercury monitoring in environmental waters by voltammetric stripping.



#### 4. Conclusions

Commercial screen-printed gold electrodes combined with a dedicated convective cell and a portable potentiostat have proven to be useful for SWASV monitoring of inorganic mercury in ambient water samples, with potential application to in situ monitoring thanks to miniaturization and portability of the whole equipment, combined with the very stable response observed for repeated (up to 40) measurements on the same screen printed electrode. Detection limits in the low ng/mL range are enough for pollution control measurements in ambient waters, as we have demonstrated by testing certified reference materials and real waste water from industrial origin with good recoveries. Potential applicability to rain water has been demonstrated accurate results obtained for fortified samples analysis. Our present work is focused on chemical and electrochemical electrode modification to improve the detection limits for mercury determination in unpolluted wet deposition or natural waters, and for matrix interference prevention in more complex samples.

#### Acknowledgements

This work is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (project CTQ2008-06657/BQU). E. Bernalte acknowledges a grant from Junta de Extremadura, Spain (PRE09107).

#### References

- [1] K. Leopold, M. Foulkes, P. Worsfold, *Anal. Chim. Acta* 663 (2010) 127
- [2] Y. Bonfil, M. Brand, E. Kirowa-Eisner. *Anal. Chim. Acta* 424 (2000) 65
- [3] E. Pinilla Gil and P. Ostapczuk. *Anal. Chim. Acta* 293 (1994) 55
- [4] R. A.A. Munoz, F.S. Felix, M.A. Augelli, T. Pavesi, L. Angnes. *Anal. Chim. Acta* 571 (2006) 93
- [5] O. Ordeig, C.E. Banks, J. del Campo, F.X. Muñoz, R.G. Compton. *Electroanalysis* 18 (2006) 573
- [6] J. Gong, T. Zhou, D. Song, L. Zhang, X. Hu. *Anal. Chem.* 82 (2010) 567
- [7] A. Giacomino, O. Abollino, M. Malandrino, E. Mentasti. *Talanta* 75 (2008) 266
- [8] J.P. Hart, A. Crew, E. Crouch, K.C. Honeychurch, R.M. Pemberton. *Anal. Lett.* 37 (2004) 789
- [9] O. Domínguez Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos Martínez, *Talanta* 73 (2007) 202
- [10] K.C. Honeychurch and J.P. Hart. *Trac-Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 456
- [11] M.-H. Chiu, J.-M. Zen, A. Kumar, D. Vasu, Y. Shih. *Electroanalysis* 20 (2008) 2265
- [12] J. Wang and B. Tian. *Anal. Chim. Acta* 274 (1993) 1
- [13] A. Mandil, L. Idrissi, A. Amine. *Microchim. Acta* 170 (2010) 299
- [14] S. Laschi, I. Palchetti, M. Mascini. *Sens. Actuators B* 114 (2006) 460

- [15] V. Meucci, S. Laschi, M. Minunni, C. Pretti, L. Intorre, G. Soldani, M. Mascini. *Talanta* 77 (2009) 1143
- [16] M.A. Granado Rico, M. Olivares-Marín, E. Pinilla Gil, *Electroanalysis* 20 (2008) 2608
- [17] F. Okçu, H. Ertaş, F. Nil Ertaş. *Talanta* 75 (2008) 442
- [18] J.M. Pingarrón Carrazón and P. Sánchez Batanero. Ed. Síntesis S.A. Madrid, 1999
- [19] P. Masawat, S. Liawruangrath, J.M. Slater. *Sens. Actuators B* 91 (2003) 52

### 3.3. Artículo III.

Gold Nanoparticles-modified Screen-printed Carbon Electrodes for Anodic Stripping Voltammetric Determination of Mercury in Ambient Water Samples

---



# **GOLD NANOPARTICLES-MODIFIED SCREEN-PRINTED CARBON ELECTRODES FOR ANODIC STRIPPING VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF MERCURY IN AMBIENT WATER SAMPLES.**

*Sensors and Actuators B: Chemical 161 (2012) 669– 674*

E. Bernalte\*, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil

*Departamento de Química Analítica, Universidad de Extremadura  
Avda. de Elvas, s/n, E-06006 Badajoz, Spain*

## **Abstract**

We present here a simple, fast and cheap procedure for the determination of Hg(II) by square wave anodic stripping voltammetry (SWASV) at a commercial gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes (AuNPs-SPCEs), as a tool for environmental waters monitoring. The advantages of electrode nanostructuration are exploited, e.g. no stirring for the deposition step is needed. The surface of the gold nanostructured screen-printed carbon electrodes were characterized using SEM, XPS and electrochemical methods. All experimental variables involved in the voltammetric stripping method were optimized to develop a reliable method capable of measuring dissolved mercury in the low ng/mL range. The proposed method was tested with the NIST 1641d Mercury in Water Standard Reference Material with good agreement. The applicability of the AuNPs-SPCEs for Hg(II) determination in real ambient water samples, namely rain water, river water and industrial waste water, without any sample pre-treatment, was successfully demonstrated.

**Keywords:** *Hg(II); SWASV; Screen-printed electrodes; Gold nanoparticles; Water*



## 1. Introduction

Mercury is considered to be one of the most hazardous heavy metal pollutants because of the toxicity and mobility of its species in the different environmental compartments, their bioaccumulation and, therefore, their impact on human health and ecosystems [1].

Standardized analytical methods for mercury determination in environmental samples, mainly based on cold vapour atomic absorption spectrometry (CVAAS) [2], cold vapour atomic fluorescence spectrometry (CVAFS) [3] or inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) [4], have certain disadvantages because they require rather complicated and expensive instrumentation and time-consuming procedures, especially for in situ applications or in decentralized laboratories. Electroanalytical stripping techniques however appear as a valid alternative in these situations. They are attractive for the determination of trace heavy metals because of the low cost associated with them, the short analysis time, the low power consumption and the ease of use, without compromise the sensitivity or reliability of the measures [5-6].

The literature has so far reported different electroanalytical approaches for mercury determination. They are mainly based in the anodic stripping voltammetry technique and the use of gold as the best material for the working electrodes (solid, film, wire) due to its high affinity for Hg, which enhances the preconcentration effect [7-10].

On the other hand, in recent years the study of nanoscale materials is increasing, particularly with respect to metallic nanoparticles (NPs) and also has become one of the most active areas in environmental analysis [11]. Owing to unique capabilities, such as high active surface area, increased mass transport, low detection limit, and better signal-to-noise ratio, nanosized metal particles, especially AuNPs, assembled on conventional electrodes, have emerged as a promising alternative for the stripping voltammetry analysis of Hg(II) [5, 6, 12].

Moreover, the recent trend to replacement of conventional electrodes by screen-printed electrodes (SPEs) is making possible to explore other options in this field [13]. The great versatility presented by the SPEs is based in the wide range of ways in which the electrodes may be modified (directly modifying the composition of printing ink or just depositing the substances on the surface) as demonstrated in recent published papers for Hg(II) determination [14-17]. Furthermore, nanoparticles-modified SPEs are already commercially available; so, it is avoided to waste long time in the synthesis and stabilization of gold nanoparticles on the electrode, in contrast to conventional electrodes.

Few papers concerning the use of gold nanoparticles-modified glassy carbon electrodes in electrochemical analysis of mercury were published. Abollino et al [5] described the development of a procedure for the determination of Hg(II) by SWASV at a homemade gold nanoparticle electrode focusing in the study of the instrumental variables involved and the applicability for Hg(II) detection in drinking water, sediments and pharmaceutical samples. Based on this previous paper, Abollino et al [12] have reported also the methodology for the anodic stripping voltammetric determination of methylmercury and inorganic mercury at the same electrode. Recently graphene-based materials have been highly concerned for constructing electrochemical sensors. Gong et al [6] described a method for the preparation of a sensor with a monodis-

persed gold nanoparticles assembled on graphene nanosheet matrix for Hg(II) determination in water samples. No reports have been found so far about the application of gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes to the measurement of mercury. So, the main objective of this work was the development of a procedure for the determination of Hg(II) by square wave anodic stripping voltammetry (SWASV) using a commercial gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes (AuNPs-SPCE). All experimental variables involve in the stripping method were investigated in detail in order to identify the best working conditions. The applicability to environmental water samples is also discussed.

## **2. Experimental**

### **2.1. Reagents**

All chemicals used for the preparation of stock and standard solutions were of analytical grade. 10 mg/L stock solution of Hg(II) (ICP quality) was supplied by PerkinElmer (Spain). Dilute standards for calibration were prepared directly into the voltammetric cell. Hiperpur grade HCl purchased from Panreac (Spain) was used for the preparation of supporting electrolyte. The ultrapure water (18.2 M $\Omega$ ·cm, 25 °C) was obtained from an Ultramatic system (Wasserlab, Spain). Real samples were adjusted to pH 2 until assayed with subboiled HNO<sub>3</sub> obtained from a quartz distiller (Kürner, Germany). Glassware and polyethylene containers were thoroughly conditioned for trace analysis i.e. soaked in hot nitric acid at 10% for 48 h, rinsed with ultrapure water, dried in stove and kept in hermetic plastic bags. Methacrylate voltammetric cell was similarly immersed in nitric acid at 10% for 24 h, rinsed in ultrapure water and air dried before use.

### **2.2. Reference material and real samples**

Sample of the NIST Standard Reference Material® 1641d Mercury in Water was used as received for accuracy evaluation.

A glass beaker for rain water sampling was exposed to rain for 4 days in the top of a pole (150 heights), outside our lab in the University of Extremadura campus in Badajoz. The collected sample was acidified at the sampling site by adding minute amounts of subboiled nitric acid. The recipient was then closed, transferred to the lab and stored in a fridge (4° C) until analysis. The determination was carried out same day or the next.

River water sample was collected in the River Plate running through the Argentinian city of Buenos Aires in a polyethylene recipient and carried to the lab where a sub-sample was taken. It was then acidified to pH 2 with subboiled nitric acid and also kept cold until assay within a period around two weeks.

Waste water sample from an industrial water treatment plant serving a smelting facility was provided by A. G. Siderurgia Balboa (Jerez de los Caballeros, Spain) in a suitable plastic container. Likewise, the samples were acidified and stored in a fridge.



No further pretreatment was applied to the samples before Hg(II) determination. They were only filtered through a 0.20  $\mu\text{m}$  disposable syringe Teflon units to remove the suspended particles.

### 2.3. Apparatus

Square wave voltammetric measurements were performed on a computerized hand-held, battery-powered PalmSens potentiostat/galvanostat (Palm Instruments BV, The Netherlands) interfaced with a laptop and controlled by the PalmSens PC software. Screen-printed electrode strips were purchased from DropSens (Spain). They are designed in a three electrode configuration printed on the same platform. Working electrode ( $\varnothing$  4 mm), counter electrode and pseudo-reference electrode are made of gold nanoparticles-on-carbon, carbon and silver, respectively. An insulating layer serves to delimit the working area and silver electric contacts. Ink formulation and production characteristics of commercial AuNPs-SPCEs are regarded by the manufacturers as proprietary information. A specific connector allows the direct connection of the electrochemical strip to the potentiostat. A methacrylate voltammetric cell (DropSens, Spain) is used to perform the analysis. It is especially suitable for SPEs and is designed to perform batch analysis with volume of solution between 5 to 10 mL, allowing optional stirring by means of a magnetic stirrer. The screen-printed strip is immersed in the solution through a cut on the top lid and is placed in parallel direction to the sides of the cell, leaving the electrical connections outside. Deaeration process and standard additions are also able to perform in this configuration.

A standard ICP-MS protocol for Hg(II) determination was used for accuracy check of the electrochemical results on a Perkin Elmer ELAN 9000 equipment.

The images of the surface of the AuNPs-SPCE were obtained by scanning electron microscopy (SEM) using a FE-SEM S-4800II instrument (Hitachi, USA). A K-alpha X-ray photoelectron spectrometer (XPS) system (Thermo Scientific, USA) was used to obtain the X ray spectra of the AuNPs-SPCE.

### 2.4. Stripping voltammetric detection of mercury at AuNPs-SPCE

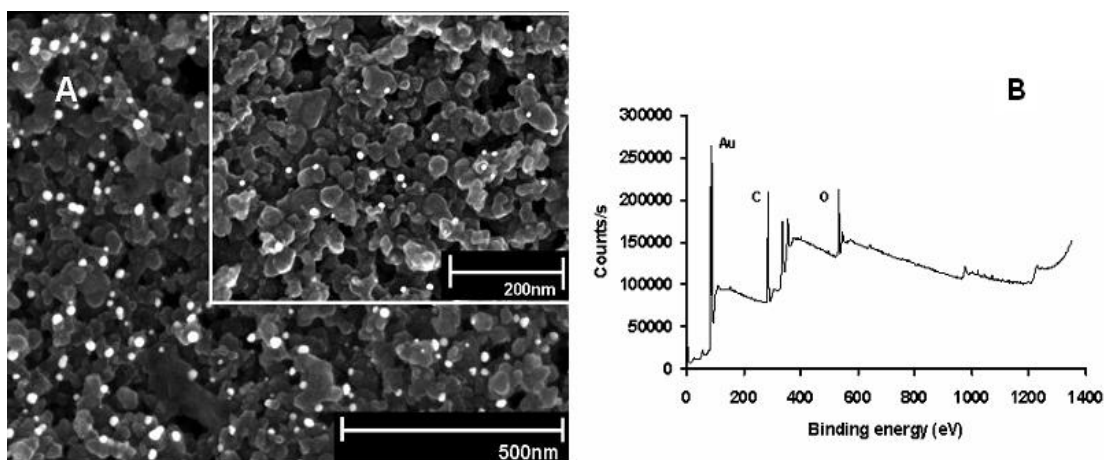
10 mL of sample was placed in the cell and the SWASV determination was started. No electrochemical activation procedure and no deaeration before voltammetric determination were needed. The appropriate amount of HCl was added to adjust the chloride concentration of the samples (0.1 M). The voltammetric measurements were performed with optimized parameters: conditioning potential +0.7 V for 15 s, deposition potential +0.2 V for 120 s, equilibration time 5 s, amplitude 40 mV, step potential 6 mV and frequency 25 Hz. Initial and final potentials were +0.15 V and +0.7V. To achieve stable responses the solutions were not stirred during mercury deposition step.

Bulk stripping voltammetric signals (without blank subtraction) were used for peak current measurement. Hg(II) quantification in the real samples was performed by external calibration and standard addition method. All experiments were performed in triplicate, unless otherwise stated.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Characterisation of the AuNPs-SPCE surface: SEM, XPS and Cyclic Voltammetry

SEM images were used to evaluate the physical appearance and surface characteristics of gold nanoparticles immobilized on screen-printed carbon electrodes (Figure 1A). The gold nanoparticles present an average diameter of  $24.4 \pm 1.8$  nm. They appear as similar size bright spheres homogeneously distributed onto the rough carbon sheet. Electrode morphology seems appropriate for the voltammetric stripping sensing of Hg(II). Quantitative analysis of AuNPs-SPCEs by X-ray photoelectron spectroscopy (Figure 1B) confirmed also the presence and purity of gold nanoparticles, as expected. Carbon and oxygen signals are due to the nature of sensor supporting material.



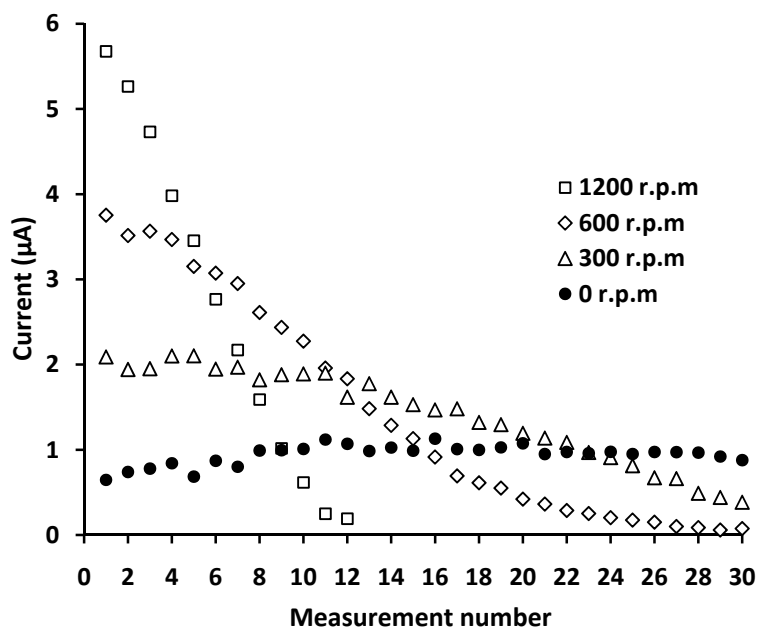
**Figure 1.** A) Scanning electron microscopy (SEM) image of the gold nanoparticles-modified screen-printed carbon working electrode surface; B) X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) spectra of the gold nanoparticles-modified screen-printed carbon working electrode surface.

Cyclic voltammetry experiments performed in 0.1 M HCl show that AuNPs-SPCEs allow a potential window limited to the potential of gold oxidation (+0.8 V) and the potential of hydrogen reduction (-0.1 V). Reduction signal of unknown nature was observed in the cyclic voltammogram of blank at potential -0.4 V, possibly related to sensor materials. It does not affect the analytical signal of Hg(II) which is an oxidation.

#### 3.2. Influence of stirring speed on signal stability

Screen printed electrodes, and especially those modified by adsorbed metal nanoparticles, have delicate surfaces prone to degradation, for example by samples friction during mechanical stirring. Under the experimental conditions reported in our previous study for the determination of Hg(II) by SWASV on bare SPGE [17], signal stability was first inspected as a key parameter to test the practical use of commercial gold nanoparticle sensors. Consecutive measurements at different stirring speeds in the range from 0 to 1200 r.p.m. were carried out on the same modified screen-printed electrode on a 0.1 M HCl electrolyte containing 50 ng/mL of Hg(II), without previous surface activation process. Voltammetric signal stability using AuNPs-SPCE was found to be strongly dependent on stirring speed variable (Figure 2). Significant differences in terms of peak height were observed at different stirring speed values, but the best

compromise with the electrode stability was only observed in absence of stirring during the deposition step.



**Figure 2.** Influence of stirring speed on voltammetric responses of 50 ng/mL of Hg(II) in 0.1 M HCl using the gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes. Square-wave voltammetric stripping measurements performed with a frequency of 20 Hz, step potential 6 mV, amplitude 40 mV, deposition potential +0.2 V and deposition time 60s.

Without stirring, the working electrode showed a stable behaviour along 30-35 runs, in agreement with the relative standard deviation of 6 % obtained for a single AuNPs-SPCE. The good stability of the electrode surface, despite of the disposable nature of these low cost electrodes, allows continuous monitoring of Hg(II) with a single electrode. Therefore, no hydrodynamic accumulation of the analyte was applied in further experiments. Efficient analyte deposition in absence of stirring is a typical advantage of nanostructured electrodes in stripping analysis, probably due to enhanced mass transfer to the gold nanoparticles by diffusion [11]. This can be viewed as an analytical advantage due to the simplification of the equipment.

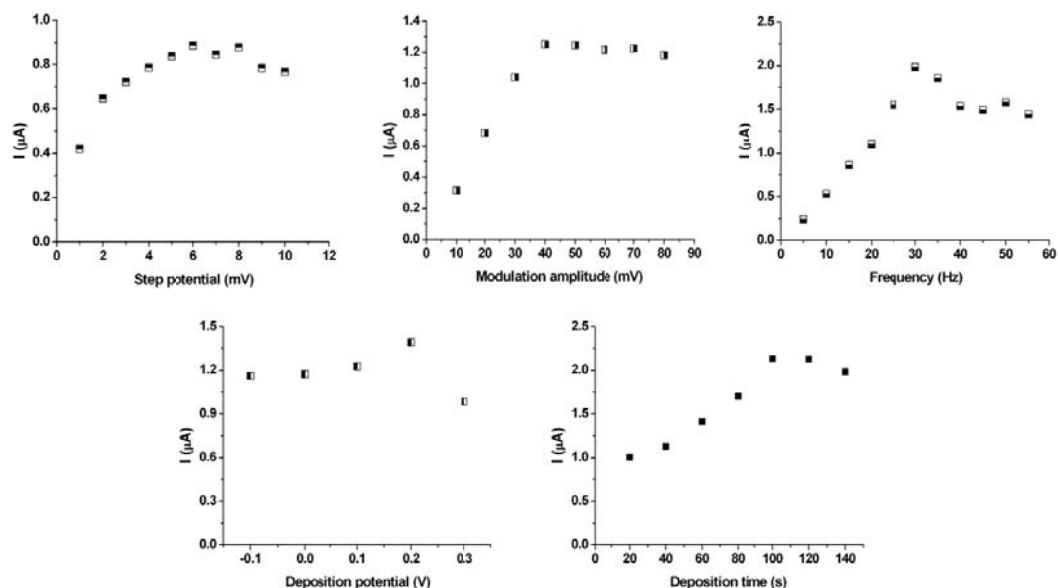
### 3.3. Optimisation of experimental variables

The influence of the experimental variables (step potential, modulation amplitude, frequency, deposition potential and deposition time) involve in the SWASV determination of Hg(II) was investigated (Figure 3). Measurements of 50 ng/mL Hg(II) standard solution spiked in 0.1 M HCl were performed for evaluating the heights and the shapes of the signals obtained. Deposition time was 60 s.

Step potential was studied in the range from 1 to 10 mV. The stripping signal underwent an increase of 50 % up to 6 mV, where the highest peak intensity was obtained. A slight decrease of the signal was observed for higher values. Modulation amplitude influence was investigated in the range from 10 to 80 mV. As expected, a significant increase of the signal intensity was

observed up to 40 mV. From this value, the Hg(II) signal was remained stable. More similar behaviour in comparison with SPGE was observed for variable frequency [17] that was varied in the range from 5 to 55 Hz. The signal increased up to 30 Hz, then decreased due to peak broadening and the signal noise increase. In agreement with the high peak current values, good shapes of the signal and better signal to noise ratio, the selected optimal values were 6 mV, 40 mV and 25 Hz for step potential, modulation amplitude and frequency respectively.

The effect of deposition potential was evaluated in the range from -0.1 V to +0.3 V. The highest voltammetric signal was obtained with a deposition potential of + 0.2 V, which is chosen as optimal value. As reported in our previous work with SPGE [17], the optimization process of this parameter was only able to perform in this narrow potential range because no usable voltammetric signal appeared in the voltammogram at 0.1 V, probably associated with sensor manufacturing process. In this case, no irreversible changes were observed on the surface of the modified working electrode when more negative potentials were applied but the Hg(II) signal intensity was seen affected as a result of the height peak increase of the undesirable signal.



**Figure 3.** Influence of the experimental variables (step potential, modulation amplitude, frequency, deposition potential and deposition time) involve in the SWASV method. Response to Hg(II) 50 ng/mL in 0.1 M HCl at the gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrode. No stirring during the deposition step.

Using the optimized parameter values, the influence of deposition time on the peak currents was finally tested in the range from 0 to 140 s. As seen in Figure 3, the height of the mercury peak increased with increasing deposition time, up to 100 s; longer deposition times resulted in smaller signals probably due to electrode saturation.

### 3.4. Calibration data

Calibration data for Hg(II) by using gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes were estimated by analyzing in triplicate standard solutions of increasing concentrations from 5 to 20 ng/mL. A good correlation coefficient ( $R^2$ ) of 0.9946 was obtained for the regression curve. The detection limit, calculated according to the IUPAC definition, was 0.8 ng/mL for a deposition time of 120 s. In recent publications, Abollino et al [5, 12] reported a value of the detection limit of 0.15 ng/mL for the anodic voltammetric determination for Hg(II) at AuNPs-glassy carbon electrodes in 0.06M HCl. This difference might be due to the different characteristics of the ready to use devices, the different concentration of the supporting electrolyte employed, and also because of the accumulation process was not favoured for convective mass transport. Otherwise, the value of the detection limit obtained improves the value previously reported on SPGE [17], as expected. Similarly, this LOD is even better than those reported for Laschi et al [14] (0.9 ng/mL), Meucci et al [15] (0.9 ng/mL) and Abdil et al [16] (1.5 ng/mL) after 120 s deposition time, using a SPGE and a gold film-SPCE, respectively.

Other relevant analytical parameters evaluated were the linearity (97.6 %) and the analytical sensitivity (0.65 ng/mL). As described in 3.2, the repeatability of the measurements on a single AuNPs-SPCE was examined with 35 repetitive measurements of a 50 ng/mL Hg(II) standard solution and a relative standard deviation of 6 % was obtained. The reproducibility was also evaluated by using a set of 5 different electrodes. Relative standard deviation was found to be 4.2 % for 50 ng/mL Hg(II), an acceptable results considering the disposable nature of these low cost modified electrodes.

### 3.5. Certified reference materials and real samples

The NIST Standard Reference Material® 1641d Mercury in Water was assayed to test the applicability of AuNPs-SPCEs and the proposed voltammetric method. Five replicates with a supporting electrolyte adjusted to 0.1 M HCl were analyzed after blanks measurements using the same AuNPs-SPCE. A concentration of  $1.52 \pm 0.06$  mg/kg Hg(II) was measured using the optimized experimental conditions. Relatively good agreement with the certified value ( $1.56 \pm 0.02$  mg/kg) demonstrates the capability of the method for the proper measurement of mercury in real water matrices.

A rain water sample collected at the city of Badajoz was assayed for mercury by the proposed method. The only treatment was supporting electrolyte addition to 0.1 M HCl. Hg(II) was undetectable so the sample was fortified adding the appropriate amounts of Hg(II) standard solution to 12 ng/mL. Three replicates were analyzed using the same strip. The proposed method gave the recoveries summarized in Table 1.

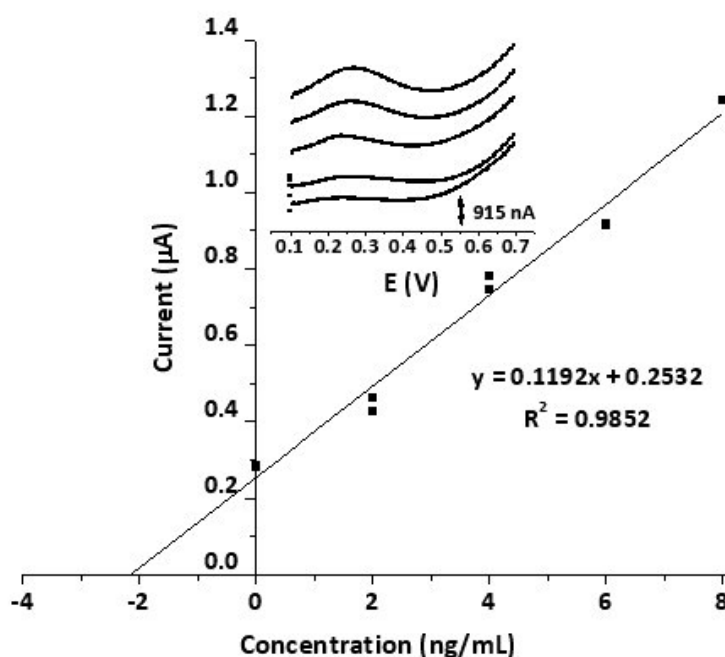
A river water sample was also analyzed to test the proposed method. The sample also needs fortification due to undetectable levels of Hg(II). Appropriate amount of standard was added to a final concentration of 12 ng/mL. HCl concentration was also adjusted directly in the voltammetric cell. Three replicates of the sample were also analyzed. The recoveries obtained with the optimized method are summarized in Table 1. Lower recoveries obtained for the river water sample respect to the rainwater are probably related with the presence of organic mat-

ter, because no sample pretreatment was carried out. Hg(II) was quantified in both samples using external calibration.

**Table 1.** Determination of Hg(II) on gold nanoparticles-modified screen-printed electrodes in rain water and river water samples. Square-wave voltammetric stripping measurements with a frequency of 25 Hz, step potential 6 mV, amplitude 40 mV, deposition potential +0.2 V and deposition time 120 s.

Real samples	Experimental results (ng/mL)	Recovery (%)
Rain water	12.0 ± 0.2	98.3 – 101.7
River water	10.6 ± 0.7	82.5 – 94.2

The method was finally tested on a waste water sample from the effluent of an industrial wastewater treatment plant. Using the proposed method, Hg(II) was quantified by the standard additions method (Figure 4). Two replicates of each were analyzed. Hg(II) concentration measured by SWASV methodology was 2.1 ± 0.7 ng/mL, in good agreement with the result obtained using ICP-MS as the reference technique (2.34 ± 0.06 ng/mL). These results show the applicability of the proposed method in presence of a wide range of interfering ions which were detected by ICP-MS in the sample.



**Figure 4.** Calibration curve and respective stripping voltammograms for increasing concentrations of Hg(II) from 2 to 8 ng/mL in HCl 0.1 M by using the SWASV optimized method at the AuNPs-modified screen-printed carbon electrode. Step potential 6 mV, amplitude 40 mV, frequency 25 Hz, deposition potential +0.2 V and deposition time 120 s.

These results demonstrate the potential applicability of the method to Hg(II) determination in a diverse range of water samples without noticeable matrix effects.

#### 4. Conclusions

Commercial disposable Au nanoparticles modified screen-printed electrodes have been demonstrated as useful tools for mercury monitoring in environmental waters by voltammetric stripping. The specific advantages of screen-printed platforms (miniaturization and low price) coupled with the unique properties of electrode nanostructuring (no stirring for the deposition step needed) and square wave sweep (no deaeration needed) are combined in a versatile and sensitive method for anodic stripping determination of Hg(II) in ambient water samples. The electrodes show a stable response for repeated measurements (up to 35). The renewable active surface of the AuNPs-SPCEs minimizes the problem of memory effects, resulting in enhanced method flexibility for routine work. The detection limit obtained in the low ng/mL range was better than previously reported for screen printed gold electrodes, suitable for pollution monitoring in water samples, as it was demonstrated by testing certified reference material and waste water sample with good recoveries. Potential applicability to rain water and river water has been demonstrated, with accurate results obtained for fortified samples.

#### Acknowledgements

This work is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (project CTQ2011-25388). The authors thank to technical and human support provided by Facility of Analysis and Characterization of Solids and Surfaces of SAIUEx (financed by UEx, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER and FSE) for their assistance to work with SEM and XPS. We thank A.G. Siderurgia Balboa for providing waste water samples, and P. López and F. Hutter for providing the river water sample. E. Bernalte acknowledges a grant from Junta de Extremadura, Spain (PRE09107).

#### References

- [1] K. Leopold, M. Foulkes, P. Worsfold, Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters-A review, *Anal. Chim. Acta* 663 (2010) 127-138.
- [2] J.L. Capelo, I. Lavilla, C. Bendicho, Room temperature sonolysis-based advanced oxidation process for degradation of organomercurials: Application to determination of inorganic and total mercury in waters by flow injection-cold vapor atomic absorption spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4979-4984.
- [3] J.J. Berzas Nevado, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, F.J. Guzmán Bernardo, M. Jiménez Moreno, Determination of monomethylmercury in low- and high-polluted sediments by microwave extraction and gas chromatography with atomic fluorescence detection, *Anal. Chim. Acta* 608 (2008) 30-37.
- [4] I. López, S. Cuello, C. Cámara, Y. Madrid, Approach for rapid extraction and speciation of mercury using a microtip ultrasonic probe followed by LC-ICP-MS. *Talanta* 82 (2010) 594-599.
- [5] O. Abollino, A. Giacomino, M. Malandrino, G. Piscioneri, E. Mentasti, Determination of mercury by anodic stripping voltammetry with a gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode, *Electroanalysis* 20 (2008) 75-83.

- [6] J. Gong, T. Zhou, D. Song, L. Zhang, Monodispersed Au nanoparticles decorated graphene as an enhanced sensing platform for ultrasensitive stripping voltammetric detection of mercury (II), *Sens. Actuators B* 150 (2010) 491-497.
- [7] E. Pinilla Gil, P. Ostapczuk. Potentiometric stripping determination of mercury(II), selenium(IV), copper(II) and lead(II) at a gold film electrode in water samples, *Anal. Chim. Acta* 293 (1994) 55.
- [8] Y. Bonfil, M. Brand, E. Kirowa-Eisner, Trace determination of mercury by anodic stripping voltammetry at the rotating gold electrode, *Anal. Chim. Acta* 424 (2000) 65-76.
- [9] O. Ordeig, C.E. Banks, J. del Campo, F.X. Muñoz, R.G. Compton, Trace detection of mercury(II) using gold ultra-microelectrode, *Electroanalysis* 18 (2006) 573-578.
- [10] A. Giacomino, O. Abollino, M. Malandrino, E. Mentasti, Parameters affecting the determination of mercury by anodic stripping voltammetry using a gold electrode, *Talanta* 75 (2008) 266-273.
- [11] F.W. Campbell, R.G. Compton, The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 241-259.
- [12] O. Abollino, A. Giacomino, M. Malandrino, S. Marro, E. Mentasti, Voltammetric determination of methylmercury and inorganic mercury with an home made gold nanoparticle electrode, *J. Appl. Electrochem.* 39 (2009) 2209-2216.
- [13] O. Domínguez Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos Martínez, Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications, *Talanta* 73 (2007) 202-219.
- [14] S. Laschi, I. Palchetti, M. Mascini, Gold-based screen-printed sensor for detection of trace lead, *Sens. Actuators B* 114 (2006) 460-465.
- [15] V. Meucci, S. Laschi, M. Minunni, C. Pretti, L. Intorre, G. Soldani, M. Mascini, An optimized digestion method coupled to electrochemical sensor for the determination of Cd, Cu, Pb and Hg in fish by square wave anodic stripping voltammetry, *Talanta* 77 (2009) 1143-1148.
- [16] A. Mandil, L. Idrissi, A. Amine, Stripping voltammetric determination of mercury(II) and lead(II) using screen-printed electrodes modified with gold films, and metal ion preconcentration with thiol-modified magnetic particles, *Microchim. Acta* 170 (2010) 299-305.
- [17] E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil, Determination of mercury in ambient water samples by anodic stripping voltammetry on screen-printed gold electrodes, *Anal. Chim. Acta* 689 (2011) 60-64.



### 3.4. Artículo IV.

High-throughput Mercury Monitoring in Indoor Dust Microsamples by Bath Ultrasonic Extraction and Anodic Stripping Voltammetry on Gold Nanoparticles-modified Screen-printed Electrodes

---

---



# HIGH-THROUGHPUT MERCURY MONITORING IN INDOOR DUST MICROSAMPLES BY BATH ULTRASONIC EXTRACTION AND ANODIC STRIPPING VOLTAMMETRY ON GOLD NANOPARTICLES-MODIFIED SCREEN-PRINTED ELECTRODES

*Electroanalysis* 25 (2013) 289-294

E. Bernalte\*, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil

*Departamento de Química Analítica, Universidad de Extremadura  
Avda. de Elvas, s/n, E-06006 Badajoz, Spain*

## Abstract

A simple strategy based on the combination of a high-throughput bath ultrasonic extraction with portable electrochemical determination was developed for fast Hg(II) monitoring in dust samples, with potential applicability to decentralized atmospheric pollution assessment. Square-wave anodic stripping voltammetry (SWASV) on gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes (AuNPs-SPCEs) coupled to the extraction procedure resulted in a convenient method for sensitive, reliable, and reproducible mercury detection. The proposed combination of techniques was evaluated with good agreement by using NIST Standard Reference Material® 2583 Trace Elements in Indoor Dust. The method was successfully applied for Hg monitoring in complex and heterogeneous indoor dust samples collected at different indoor ambients. ICP-MS was used to contrast the voltammetric measurements.

**Keywords:** *Hg(II); SWASV; Screen-printed electrodes; Gold nanoparticles; Ultrasound.*

*Devoted to the Memory of Professor Lucas Hernández.*

*Presented at the 14<sup>th</sup> International Conference on Electroanalysis, ESEAC 2012, Portorož, Slovenia.*



## 1. Introduction

Mercury is an important global pollutant due to its accumulative and persistent nature in the environment [1]. The concentration of this pollutant in environmental samples like soils, sediments, plants, fly ash, street and indoor dust, natural waters, snow or animal tissues (especially fish) can give information about the mercury pollution degree of the different environments in terms of its availability, mobility, and chemical behaviour [1-6].

Particularly, indoor dust is a heterogeneous and complex environmental indicator, its composition being dependent on numerous factors i.e. season, ventilation, or owner activities. Because of the indoor dust is spontaneously deposited on the surfaces, a simple sampling methodology (brushing or swiping) can be used for collecting. Contaminants associated with indoor dust particles have the potential to persist and accumulate in the matrix and consequently, interact with the human body causing adverse health effects. Mercury has been especially tested as a relevant air pollutant in indoor dust samples at workplaces. So, these facts support the interest of indoor dust as a matrix for environmental analysis aimed to estimate exposure of the general population and workers.

The general knowledge of the implications of mercury in the environment has encouraged the development of very sensitive methods for its determination, mainly based on cold vapour atomic absorption spectrometry (CVAAS) [7], cold vapour atomic fluorescence spectrometry (CVAFS) [8], inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) [9] or inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) [10], which are unsuitable for in-situ monitoring and require expensive instrumentation, skilled personnel, and long analysis times. Recently, electroanalytical techniques are an attractive alternative in connection with low-cost, low-powder, fast analysis, and even, sensitive field analysis since the recent trends are aimed at using disposable bare or modified screen-printed electrodes (SPEs) coupled to portable electrochemical analyzers [4, 6, 11, 12].

Despite the significant progress in the quality of mercury analysis instruments, reliable results are still remarkably dependent on sample preparation procedures [13]. As compiled by Gao et al [14] in a current review, a number of pre-treatments are described in the literature for total mercury and mercury speciation analysis in environmental and biological samples. Pre-treatment methodologies are generally based on microwave assisted acid leaching or alkaline dissolution methods [15, 16], enzymatic hydrolysis [17] and ultrasonic extraction in a bath [13, 18-20], with a probe [21, 22] or combinations of them [1]. Also, some recent applications about simple slurry preparation for Hg determination are reported [9, 23, 24].

Among the pre-treatment techniques mentioned above, bath or probe ultrasonic solid-liquid extraction is emerging as an effective way of sample treatment for elemental analysis [25] and is increasingly applied for the extraction of Hg species from different samples as a low cost, rapid, and efficient tool [1]. The cavitation bubble implosion and the consequent increasing of the temperature and pressure combined with the oxidative energy of radicals created during sonolysis of the solvent is the ground of the high capability of extraction of this technique [2]. The ultrasonic bath is by far the most widely available and cheapest source of ultrasonic irradiation [25]. In comparison with the extraction with ultrasonic probe, the main

drawbacks of the ultrasonic bath is the fact that the ultrasound wave needs to cross the vessel sample container, which results in less powerful cavitation process and more time consuming [1, 25]. However, ultrasonic bath instrument has a temperature control function which can increase the extraction yields. Sample throughput is generally superior for ultrasonic bath treatment, which permits simultaneous extraction of a large number of samples, comparing with the sequential nature of ultrasonic probe treatment. Other advantage of ultrasonic bath is that the indirect irradiation can be applied to closed vessels, avoiding the pollution of the samples and reducing the risks of analyte loss [1] which is a critical factor during the extraction of volatile trace elements like mercury.

Only one work combining bath ultrasonic extraction with potentiometric stripping determination of mercury on a conventional gold film electrode has been described in the literature [20], and our research group has recently published the successful combination of ultrasonic probe extraction and anodic stripping on screen printed electrodes [22]. We report in the present work a simplified high sample throughput strategy for mercury determination in indoor dust samples, based on a standard ultrasonic bath extraction procedure of multiple sets of microsamples (15 mg), combined with square-wave anodic stripping voltammetry at new commercial gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes (AuNPs-SPCEs). The method is validated by the analysis of standard reference material and successfully applied for mercury analysis in real samples collected in different indoor environments.

## **2. Experimental**

### **2.1. Chemicals and solutions**

10 mg/L ICP quality stock solution of Hg(II) was supplied by PerkinElmer (Spain). Diluted standards for calibration were prepared directly into the voltammetric cell. Hiperpur grade HCl purchased from Panreac (Spain) was used for the preparation of supporting electrolyte for SWASV measurements. Bath ultrasonic extractions of the samples were carried out in solutions of analytical grade HCl (Scharlab, Spain). Ultrapure water (18.2 M $\Omega$ -cm, 25 °C) obtained from an Ultramatic system (Wasserlab, Spain) was used throughout. Samples and diluted standard solutions were adjusted to desired pH with subboiled HNO<sub>3</sub> obtained from a quartz distiller (Kürner, Germany) before analyzed by ICP-MS. Glassware and polyethylene containers were thoroughly conditioned for trace analysis i.e. soaked in hot nitric acid at 10% (v/v) for 48 h, rinsed with ultrapure water, dried in stove and kept in hermetic plastic bags. Methacrylate voltammetric cell was similarly immersed in nitric acid at 10% (v/v) for 24 h, rinsed in ultrapure water, and air dried before use.

### **2.2. Reference material and real samples**

NIST Standard Reference Material® 2583 Trace Elements in Indoor Dust was used for the validation of the methodology and for accuracy check.

Dust samples were collected in indoor ambient, specifically in our research laboratory and in a private garage, into polyethylene auto sealable bags by sweeping with a small brush. The

samples presented a cottony aspect so they had to be manually homogenized (grinding with a stainless steel scraper and sieved through 2 mm). They were kept in a fridge (4°C) until analysis.

### **2.3. Instrumentation and software**

An ultrasonic bath Branson 2510 (Danbury, USA) that works at a frequency of 40 kHz was employed for mercury extraction process. The instrument was adapted for ultrasonic extraction in safe-lock conical tubes of 1.5 mL (Eppendorf ibérica, Spain), allowing the simultaneous treatment of 30 samples. A centrifuge equipped with a hermetic closure rotor and a 24 micro tubes sample holder (Ortoalresa Digicen 21, Madrid, Spain) was used for separation of solid residues after ultrasonic extractions.

Stripping voltammetric measurements were performed on a computerized hand-held, battery-powered PalmSens potentiostat/galvanostat (Palm Instruments BV, The Netherlands) interfaced with a laptop and controlled by the PStTrace 1.1 software. Gold nanoparticles-modified screen-printed electrode strips (AuNPs-SPCEs) were purchased from DropSens (Oviedo, Spain). They were designed in three electrode configuration printed on the same platform. Working electrode ( $\varnothing$  4 mm), counter electrode, and pseudo-reference electrode were made of gold nanoparticles-on-carbon, carbon, and silver, respectively. An insulating layer serves to delimit the working area and silver electrical contact (which are situated in the opposite extremity). Ink formulation and production characteristics of commercial AuNPs-SPCEs are regarded by the manufacturers as proprietary information. A specific connector was used to connect the electrochemical strip to the potentiostat. A methacrylate voltammetric cell (DropSens, Spain) was used to perform the analysis. It was especially suitable for SPEs and it was designed to perform batch analysis with volume of solution between 5 to 10 mL allowing optional stirring by means of a magnetic stirrer. The screen-printed strip was immersed in the solution through a cut on the top lid and was placed in perpendicular direction to the bottom of the cell, leaving the electrical connections outside.

A PerkinElmer ELAN 9000 (Massachusetts, USA) quadrupole ICP-MS equipped with a cross flow nebulizer, a demountable quartz torch, a nickel skimmer and sampler cones, and a Rytan Scott spray chamber was used for mercury determination by a standard methodology, to test the electroanalytical results.

### **2.4. Analytical procedures**

#### **2.4.1. Bath ultrasonic extraction method**

An appropriate amount of about 15 mg sample was accurately weighed in 1.5 mL safe-lock conical bottom Eppendorf micro centrifuge tubes. 1 mL of 5 M HCl [13] was added to the micro tubes and their caps were sealed with Teflon tape. The tubes were placed in the ultrasonic bath and extracted for 60 min. After application of the extraction method, the samples were centrifuged for 15 min at 5000 r.p.m. For the determination of Hg(II) on AuNPs-SPCEs by SWASV, the appropriate volume of supernatant was transferred to a 10 mL flask and the pH was adjusted to 1 with concentrated NaOH. For the analysis of Hg(II) by ICP-MS, the desired amount of supernatant liquid was transferred to a flask and the final volume was made up to

10 mL with 5 % HNO<sub>3</sub> and 5 ng/mL In(III) was added as internal standard. Blanks were treated in the same ways.

#### 2.4.2. SWASV determination of mercury at AuNPs-SPCEs

Square-wave Anodic Stripping Voltammetry was applied for mercury determination in treated samples (10 mL) at disposable gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes. The applied voltammetric parameters are summarized in Table 1.

**Table 1.** SWASV parameters for the electrochemical measurements of mercury on AuNPs-SPCE

Electrochemical parameters	SWASV
Conditioning potential (V)	+0.7
Conditioning time (s)	15
Deposition potential (V)	+0.2
Deposition time (s)	120
Equilibration time (s)	5
Amplitude (mV)	40
Step potential (mV)	6
Frequency (Hz)	25
Potential interval (V)	+0.1 to +0.7

As described in previous studies [6], no electrochemical activation procedure of the working electrode and no deaeration of the solution were needed before the voltammetric determination. Also, it was possible to carry out the deposition step without stirring due to the enhanced accumulation efficiency of the analyte on the nanostructured AuNPs-SPCEs. This is a significant practical benefit in terms of equipment simplification (no magnetic stirrer needed) and protection of the working electrode against degradation by convective forces [6]. Bulk stripping voltammetric signals were used for peak current measurement. Hg(II) quantification in the real samples and standard reference material was performed by the standard additions method. All experiments were performed in duplicate.

#### 2.4.3. ICP-MS determination of mercury

The sample extracts were analyzed by a standard ICP-MS protocol for the determination of total mercury as follows: RF power 1000 W, Ar plasma flow rate 1 L/min, washing time 35 seconds (s) and 3 replicates per sample. The most abundant mercury isotope <sup>202</sup>Hg was used for data evaluation. Quantification was performed by internal standard method using In(III).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Bath ultrasonic extraction of Hg(II)

Sample preparation is a key step for the accurate determination of mercury in different sample matrix and consequently, the reagents involve in the extraction process [14]. A variety of acid media is reported in the literature for Hg(II) extraction from biological, environmental, and food samples using ultrasonic bath [26], as is summarized in Table 2.



**Table 2.** Acid media reported in the literature for Hg(II) extraction from biological, environmental, and food samples using ultrasonic bath

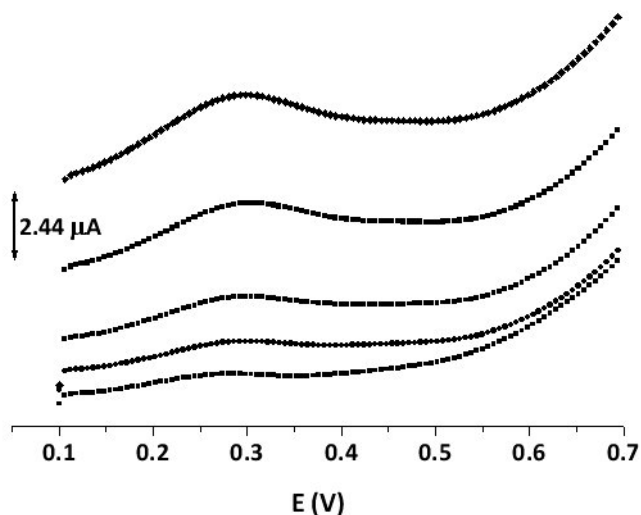
Hg species	Samples	Extraction procedure	Analysis	References
Hg	Seafood	0.5M HNO <sub>3</sub> +2.2-2.4M HCl, 10 min	CV-AAS	[28]
Hg	Sediments and soil	30% (v/v)HNO <sub>3</sub> +20% (v/v)KCl, 180 min	CV-AAS	[2]
Hg	Milk	Aqua regia, 10 min	ICPMS	[18]
Hg	Biological, sediments, sludge	Aqua regia, 30 min	CV-ICPOES	[9]
Hg	Sediment	Aqua regia, 30 min	CVG-ICPOES	[23]
Hg	Urine	1M HCl+1M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 15 min	PSA, CV-AAS	[20]
Hg(II), MeHg	Soil	7.6% (v/v)HCl+10%(v/v)mercaptoethanol, 45 min	HPLC-ICPMS (HPLC) ICP- MS	[10] [13]
Hg(II), MeHg	Tuna fish	5M HCl, 5 min	ICP-OES	[29]
Hg	Cotton	1M HNO <sub>3</sub> +1MHCl+water, 10 min	(HPLC) ICP- MS	[19]
Hg(II), MeHg	Human hair	2% (v/v)HCl+10% (v/v)Ethanol, 7 min	ICP-OES	[24]
Hg	Fluorescent lamp	50% (v/v)HNO <sub>3</sub> +10% (v/v)H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 60 min		
Hg(II), MeHg	Seafood	0.10% (v/v)HCl+0.05% (m/v)L-cysteine+0.10% (v/v) 2-mercaptoethanol, 15 min	LC-ICPMS	[27]
Hg	Seafood	6M HNO <sub>3</sub> , 1min x 2	CV-AFS	[1]

Nitric and chloride acid, and also aqua regia are the most extended reagents used for Hg extraction in ultrasonic bath but others are also described. Collaisol et al [2] demonstrated the efficiency of a mixture 30% (v/v) HNO<sub>3</sub> – 0.15% KCl (m/m) from the extraction of Hg from soil and sediment. Munoz et al, [20] reported the bath ultrasonic extraction of Hg from urine samples using 1M HCl and 1M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and dos Santos et al [24] used the 50% (v/v) HNO<sub>3</sub> and 10% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the extraction of Hg from fluorescent lamps. Rahman et al [19] established a method for Hg extraction from human hair samples using 2% (v/v) HCl and 10% (v/v) ethanol. A mixture of HCl with mercaptoethanol and L-cysteine are described also as an optimal medium for bath ultrasonic extraction of mercury from soil and seafood respectively [10, 27]. In the present work, the ultrasonic bath extractions of mercury from dust samples were carried out in 5M HCl for 60 min. This acid medium was selected for efficient extraction and suitability for Hg(II) determination by anodic stripping voltammetric at AuNPs-SPCE, as previously described by our research group [6, 22].

To evaluate the accuracy of the bath ultrasonic extraction method, two blank samples and four sub-samples (15 mg) of the certified standard reference material (NIST SRM 2583, Trace Elements in Indoor Dust) were extracted simultaneously and Hg(II) were quantified by a standardized ICP-MS methodology. A relatively good agreement between certified concentration of Hg ( $1.56 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$ ) and measured concentration ( $1.39 \pm 0.08 \mu\text{g/g}$ ) was found.

### **3.2. Determination of Hg(II) in indoor dust standard reference material by ASV**

In order to achieve a high-throughput methodology for Hg(II) analysis in the indoor dust samples, the bath ultrasonic extraction procedure was coupled to square wave anodic stripping voltammetric method on commercial AuNPs-SPCEs [6]. The methodology was first tested on the NIST SRM 2583, Trace Elements in Indoor Dust standard reference material. This way, two samples of 15 mg were simultaneously extracted and Hg(II) was sequentially analyzed by ASV. Standard additions of 3, 6, 9, and 12 ng/mL of Hg(II) were used for calibration. A set of voltammetric curves for the extraction protocol is represented in Figure 1.



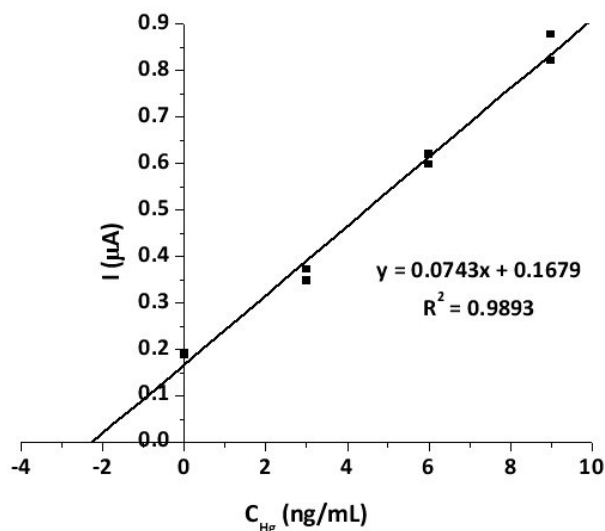
**Figure 1.** Voltammetric curves obtained by the standard addition method for the determination of Hg(II) in indoor dust standard reference material extracted in ultrasonic bath at AuNPs-SPCE. Square-wave voltammetric stripping measurements performed in 0.1 M HCl and in a convective cell with a frequency of 25 Hz, step potential 6 mV, amplitude 40 mV, deposition potential +0.1 V and deposition time 120 s.

The goodness of fit of the experimental results to the calibration curve is demonstrated in the value of  $R^2 = 0.9902$ . So, the experimental value obtained for the reference material by SWASV ( $1.71 \pm 0.71 \mu\text{g/g}$ ) was in agreement with the certified value ( $1.56 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$ ). The relatively high confidence interval measured by the proposed method can be assigned to proximity to the detection limit.

### 3.3. Determination of Hg(II) in indoor dust samples

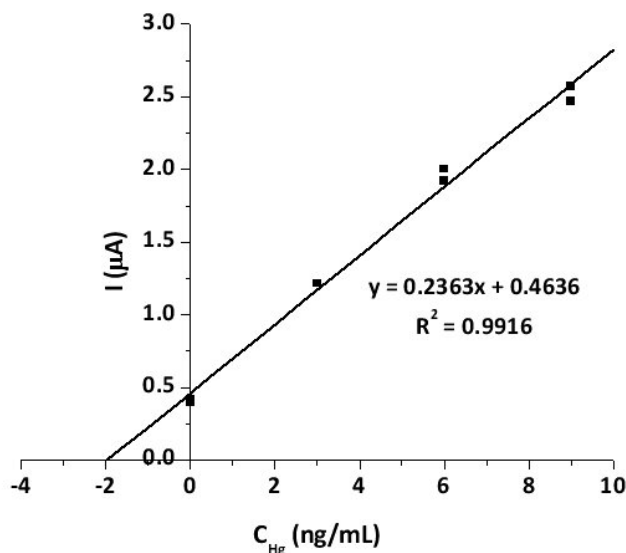
The proposed analytical procedure was finally applied to mercury monitoring in dust samples collected at different indoor ambients, specifically in a private garage and a research laboratory. The samples were homogenized and stored as previously described in section 2.2.

To quantify mercury in the lab dust samples (15 mg), bath ultrasound-assisted extraction was carried out using the experimental conditions described in the previous sections and the extracts were analyzed by SWASV on AuNPs-SPCE. Standard addition method of 3, 6 and 9 ng/mL Hg(II) was used for calibration. The regression curve presented a coefficient  $R^2 = 0.9893$  and a linearity of 95.8 % (Figure 2).



**Figure 2.** Regression curve obtained for standard addition determination of Hg(II) in lab dust samples extracted using an ultrasonic bath and analyzed by SWASV on AuNPs-SPCE. Experimental conditions as in Figure 1.

Experimental concentration obtained for Hg(II) in the laboratory dust samples is summarized in Table 3. In the same way, the concentration of Hg(II) in the garage dust samples was also determined by coupling the bath ultrasonic method with voltammetric determination on AuNPs-SPCE and ICP-MS. Sub-samples of 50 mg were needed to achieve measurable voltammetric signals. Quantification of Hg(II) in the garage dust sample were carried out also by standard addition method of 3, 6 and 9 ng/mL Hg(II). The regression curve obtained for Hg(II) presented a coefficient  $R^2 = 0.9916$  and a linearity of 96.2 % (Figure 3).



**Figure 3.** Regression curve obtained for standard addition determination of Hg(II) in garage dust samples extracted using an ultrasonic bath and analyzed by SWASV on AuNPs-SPCE. Experimental conditions as in Figure 1.

Stripping voltammetric analysis of Hg(II) in garage dust gave the concentration summarized in Table 3 which shows also the results of ICP-MS assay of the extracts. As seen in Table 3, a good agreement between experimental data obtained by stripping voltammetry and the determined by ICP-MS was found.

**Table 3.** Hg(II) concentration in real indoor dust samples extracted using the proposed ultrasonic bath method and measurement by SWASV and ICP-MS

Sample	Conc. Hg SWASV ( $\mu\text{g/g}$ )	Conc. Hg ICP-MS ( $\mu\text{g/g}$ )
Lab dust	$144 \pm 50$	$132 \pm 31$
Garage dust	$0.77 \pm 0.27$	$0.68 \pm 0.15$

Concentrations of dust mercury taken from the laboratory and the garage were considerably different, and correspondingly the measured confidence intervals. The somewhat high mercury concentration value determined in the laboratory dust sample was probably related to its long term use for polarography research. Concentration of dust mercury found in the garage is in the range of previously reported data for similar samples [5].

These results demonstrate the applicability of the simple and fast bath ultrasonic methodology proposed and the stripping voltammetry on recently commercialized nano-gold modified SPEs for Hg(II) detection and quantification in crude extracts from a complex dust samples from different environments, with potential application for decentralized analysis.

#### 4. Conclusions

Electrochemical detection, based on SWASV with disposable gold nanoparticles-modified screen-printed electrodes, coupled to portable instrumentation has been successfully combined with high-throughput bath ultrasonic extraction for Hg(II) determination in indoor dust samples, allowing the simultaneous treatment of 30 samples. The combination of stripping analysis with bath ultrasonic extraction results in a fast, reliable, simple, inexpensive, reproducible, and selective methodology for Hg(II) analysis in complex dust samples. The effectiveness of the proposed methodology has been demonstrated by assaying a certified indoor dust standard reference material (NIST 2583) and real dust samples collected in different indoor ambients. The portability of the miniaturized electroanalytical instrumentation together with simple ultrasonic bath sample pre-treatment shows the potential of this approach as a monitoring tool in decentralized pollution assessment applications.

#### Acknowledgements

This work is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (project CTQ2011-25388). E. Bernalte acknowledges a grant from Gobierno de Extremadura, Spain (PRE09107).

## References

- [1] W.B. Zhang, J.J. Xue, X.A. Yang, S.B. Wang, *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, *26*, 2023.
- [2] A. Collaisol, D. Pozebon, S.M. Maia, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *518*, 157.
- [3] A. Elik, *Talanta* **2005**, *66*, 882.
- [4] V. Meucci, S. Laschi, M. Minunni, C. Pretti, L. Intorre, G. Soldani, M. Mascini, *Talanta* **2009**, *77*, 1143.
- [5] M.R. Palomo Marín, E. Pinilla Gil, L. Calvo Blázquez, J.L. Capelo-Martínez, *Talanta* **2011**, *84*, 840.
- [6] E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil, *Sens. Actuators B* **2012**, *161*, 669.
- [7] J.L. Capelo, C. Maduro, A.M. Mota, *Ultrason. Sonochem.* **2006**, *13*, 98.
- [8] J.J. Berzas Nevado, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, F.J. Guzmán Bernardo, M. Jiménez Moreno, *Anal. Chim. Acta* **2008**, *608*, 30.
- [9] E.J. dos Santos, A.B. Herrmann, M.A. Vieira, V.L.A. Frescura, A.J. Curtius, *Spectrochim. Acta Part B* **2005**, *60*, 659.
- [10] I. Cattani, S. Spalla, G.M. Beone, A.A.M. Del Re, R. Boccelli, M. Trevisan, *Talanta* **2008**, *74*, 1520.
- [11] S. Laschi, I. Palchetti, M. Mascini, *Sens. Actuators B* **2006**, *114*, 460.
- [12] E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *689*, 60.
- [13] L.H. Reyes, G.M. Mizanur Rahman, T. Fahrenholz, H.M. 'Skip' Kingston, *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 2123.
- [14] Y. Gao, Z. Shi, Z. Long, P. Wu, C. Zheng, X. Hou, *Microchem. J.* **2012**, *103*, 1.
- [15] A.I. Cabañero Ortiz, Y. Madrid Albarrán, C. Cámara Rica, *J. Anal. At. Spectrom.* **2002**, *17*, 1596.
- [16] J.J. Berzas Nevado, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, F.J. Guzmán Bernardo, M. Jiménez Moreno, *J. Chromatog. A* **2005**, *1093*, 21.
- [17] M. Lemes, F. Wang, *J. Anal. At. Spectrom.* **2009**, *24*, 1118.
- [18] P. Cava-Montesinos, M.L. Cervera, A. Pastor, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* **2005**, *531*, 111.
- [19] G. M. Mizanur Rahman, Timothy Fahrenholz, H. M. 'Skip' Kingston, *J. Anal. At. Spectrom.* **2009**, *24*, 83.
- [20] R.A.A. Munoz, F.S. Felix, M.A. Augelli, T. Pavesi, L. Angnes, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *571*, 93.

- [21] I. López, S. Cuello, C. Cámara, Y. Madrid, *Talanta* **2010**, *82*, 594.
- [22] E. Bernalte, C. Marín Sánchez and E. Pinilla Gil, *Talanta*, **2012**, *97*, 187.
- [23] E.J. dos Santos, A.B. Herrmann, V.L.A. Frescura, A.J. Curtius, *J. Anal. At. Spectrom.* **2005**, *20*, 538.
- [24] E.J. dos Santos, A.B. Herrmann, F. Vieira, Ch.S. Sato, Q.B. Corrêa, T.A. Maranhão, L. Tormen, A.J. Curtius, *Microchem. J.* **2010**, *96*, 27.
- [25] J.L. Capelo, C. Maduro, C. Vilhena, *Ultrason. Sonochem.* **2005**, *12*, 225.
- [26] C. Bendicho, I. De La Calle, F. Pena, M. Costas, N. Cabaleiro, I. Lavilla, *TrAC*. **2012**, *31*, 50.
- [27] B.L. Batista, J.L. Rodrigues, S.S. de Souza, V.C.O. Souza, F. Barbosa Jr., *Food Chem.* **2011**, *126*, 2000.
- [28] P. Bermejo-Barrera, O. Muniz-Naveiro, A. Moreda-Piñeiro, A. Bermejo-Barrera, *Anal. Chim. Acta* **2001**, *439*, 211.
- [29] I. Rezić, *Ultrason. Sonochem.* **2009**, *16*, 63.





### 3.5. Artículo V.

Determination of Mercury in Indoor Dust Samples by Ultrasonic Probe Microextraction and Stripping Voltammetry on Gold Nanoparticles-modified Screen-printed Electrodes

---

---



# DETERMINATION OF MERCURY IN INDOOR DUST SAMPLES BY ULTRASONIC PROBE MICROEXTRACTION AND STRIPPING VOLTAMMETRY ON GOLD NANOPARTICLES-MODIFIED SCREEN-PRINTED ELECTRODES

*Talanta* 97 (2012) 187–192

E. Bernalte\*, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil

*Departamento de Química Analítica, Universidad de Extremadura  
Avda. de Elvas, s/n, E-06006 Badajoz, Spain*

## **Abstract**

A miniaturized, fast, and efficient ultrasonic probe assisted method for Hg(II) extraction from indoor dust samples, in hydrochloric acid medium, was developed. The combination of the extraction method with the electrochemical determination of mercury by square-wave anodic stripping voltammetry (SWASV) on gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes (AuNPs-SPCEs) resulted in a convenient method for rapid, sensitive, and reliable mercury monitoring. Parameters involved in the extraction such as acid concentration, sonication amplitude, and sonication time were optimized using a Face-centred cube Central Composite Design. ICP-MS was also used to contrast the methodology and good agreement with electrochemical results was verified. Optimization and validation of the procedure were carried out by using NIST Standard Reference Material® 2583 Trace Elements in Indoor Dust. Finally, the proposed methodology was successfully applied for Hg(II) determination in dust samples collected at different indoor ambients.

**Keywords:** *Hg(II); SWASV; Screen-printed electrodes; Gold nanoparticles; Ultrasound; ICP-MS; Response surface methodology; Indoor dust samples*



## 1. Introduction

Indoor dust is a heterogeneous and complex mixture including fibres from clothing and furnishings, mites, hair, chemical contaminants (e.g., pesticides, PAHs, heavy metals, plasticizers and flame retardants), combustion products (e.g., carbon monoxide, environmental tobacco smoke, nitrogen dioxide) and others. The composition of indoor dust samples is a function of numerous factors including environmental and seasonal factors, ventilation and air filtration, owner activities, and indoor and outdoor sources. These contaminants have the potential to persist and accumulate in indoor dust as they are not subjected to the same degradation processes that occur outdoors. Compounds associated with indoor dust particles are protected from sunlight, fluctuations in temperature and humidity and the overall effects of weathering [1].

Routes of human exposure to indoor dust consist mainly of inhalation, non-dietary ingestion, and dermal adsorption [2]. Allergenic and immune system effects, respiratory, cardiovascular, nervous effects, and irritating effects of the skin and mucous membrane or cancer, are described as possible adverse health impacts [1]. These facts support the interest of indoor dust as a matrix for environmental analysis aimed at estimate exposure of the general population (homes) and workers (labour places). Trace element profiles in indoor dust are valuable tools for risk assessment and source apportionment [3]. Within this pollutant class, mercury has been specifically tested as a relevant air pollutant in indoor dust samples at workplaces [4].

About sampling of indoor dust, the optimal collection method will depend on the surface to be sampled and the goal of study. Nevertheless, simple active sampling of passively deposited material like surface wiping or brushing, press sampling or sweeping can be used, thus avoiding the need of sophisticated active samplers [5].

About sample pre-treatment for analyte solubilization, ultrasonic irradiation has been explored as an alternative for solid-liquid extraction since ultrasound facilitates an auxiliary energy and it accelerates some steps [6]. As described by Capelo et al [7], when an ultrasonic wave passes through a liquid sample, the wave's oscillating pressure can cause a cavitation phenomenon which involves the generation and implosions of gas bubbles. Extreme temperature and pressure are generated at the centred of each collapsed bubble as well as radicals during sonolysis of the solvent. Therefore, ultrasonic techniques can also overcome the disadvantages of conventional extraction procedures in terms of time, efficiency, and solvent consumption [8, 9]. Optimization of the extraction methods involves the selection of several variables. If the optimization is carried out by monitoring the influence of one factor at a time on the analytical signal, the interactive effects of the variables on the response is ignored, and the number of experiments increase. Trying to solve these drawbacks, the more recent trend is performing the optimization of pre-treatments by using multivariate statistic techniques. Response Surface Methodology (RSM) is one of the most relevant multivariate technique used [10]. It allows generation of an adequately fitting second order polynomial equation that contains the significant factors affecting the responses as well as the interactions between the parameters to obtain the best system performance [11].

Many applications about the ultrasonic extraction of trace metals from biological and environmental matrixes have been reviewed [7, 12]. The ultrasonic approach is especially attractive for mercury extraction by allowing a simple and cheap but highly effective room temperature and ambient pressure treatment, capable of preventing the well documented problem of mercury volatilization during sample treatment. In this sense, ultrasonic treatment can be an appropriate alternative compared with more sophisticated procedures based on high pressure and elevated temperature digestion in closed vessels to minimize volatilization, e.g. microwave assisted extraction. Specifically, for inorganic Hg methods based on bath ultrasonic extraction from urine [13] and tuna fish samples [12] have been published. Also, different research papers have been described the development of methods based on ultrasound probe assisted extraction of Hg from mussel tissues [8], soil and sediments [14], human urine [15], several kinds of fish [16], and street dust samples [17] employing different acid media for the ultrasonic extraction which several spectrometric techniques for Hg detection have been used (CV-AAS, AFS or ICP-MS). Also, a number of research works have been published on the electrochemical determination of Hg (usually, by Anodic Stripping Voltammetry, ASV) at different gold electrodes (micro, film, rotating disk) [18-22] and gold nanoparticles-modified carbon electrodes [23-24]. Moreover, the applicability of the recent technology based on gold screen-printed sensors [25-28] and gold nanoparticles-modified screen-printed carbon sensors [29-30] has been demonstrated successfully for this purpose. Surprisingly, a single reference which combines the ultrasonic extraction method with electrochemical determination of mercury was found in the literature. Munoz et al [13] describe in that work an efficient, fast, and reliable bath ultrasonic-assisted treatment of urine samples for chronopotentiometric stripping determination of mercury at gold film electrodes. No reference has been found about the combination of ultrasonic probe for extraction and screen-printed electrodes for mercury determination by ASV.

In the present work, we have aimed at explore a simplified strategy for mercury determination in indoor dust samples, based on the development of miniaturized, fast, and efficient ultrasound probe assisted extraction method and electrochemical detection by a previously optimized Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry (SWASV) methodology [29] on commercial gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes (AuNPs-SPCEs). A Face-Centred Central Composite Design (FCCD), which comes under RSM approach, was employed for the optimization of the parameters involved in the probe ultrasonic extraction of mercury, such as extraction media, sonication amplitude, and sonication time. Optimization and validation of the procedures were carried out by using standard reference material. The proposed combination of methods was applied to Hg(II) measurement in dust samples collected at different indoor ambients.

## **2. Experimental**

### **2.1. Chemicals and solutions**

All chemicals for the preparation of stock and standard solutions were used of analytical grade. 10 mg/L stock solution of Hg(II) (ICP quality) was supplied by PerkinElmer (Spain). Dilute standards for calibration were prepared directly into the voltammetric cell. Hiperpur grade HCl

purchased from Panreac (Spain) was used for the preparation of supporting electrolyte and also, for ultrasonic extraction of the samples. The ultrapure water (18.2 M $\Omega$ ·cm at 25 °C) was obtained from an Ultramatic system (Wasserlab, Spain). Samples and dilute standard solutions were adjusted to desirable pH with subboiled HNO<sub>3</sub> obtained from a quartz distiller (Kürner, Germany) before ICP-MS analysis. NaOH (Scharlau, Spain) was used to adjust the pH when needed for electrochemical determinations. Glassware and polyethylene containers were thoroughly conditioned for trace analysis i.e. soaked in hot nitric acid at 10% (v/v) for 48 h, rinsed with ultrapure water, dried in stove, and kept in hermetic plastic bags. The methacrylate voltammetric cell was similarly immersed in nitric acid at 10% (v/v) for 24 h, rinsed in ultrapure water, and air dried before use.

## 2.2. Reference material and real samples

NIST Standard Reference Material® 2583 Trace Elements in Indoor Dust was used for the optimization of the probe ultrasonic extraction procedure through the surface response methodology.

Dust samples were collected in indoor ambient, specifically, in a research laboratory and in a private garage by brush sweeping into polyethylene auto sealable bags. The samples presented a cottony aspect so they had to be manually homogenized (grinding with a stainless steel scraper and sieved through 2 mm). They were kept in a fridge (4° C) until analysis.

## 2.3. Instrumentation and software

Ultrasound probe assisted extraction experiments were carried out with a Hielscher (Teltow, Germany) UP200S stand mounted ultrasonic device, fitted with a 200 W, 24 kHz high-frequency generator and equipped with a S1 1 mm diameter titanium probe suitable for volumes from 0.1 to 5 mL. An Ortoalresa Digicen 21 (Madrid, Spain) centrifuge equipped with a hermetic closure rotor and a 24 microtubes sample holder was used for separation of solid residues after ultrasonic extractions.

Square wave voltammetric measurements were performed on a computerized hand-held, battery-powered PalmSens potentiostat/galvanostat (Palm Instruments BV, The Netherlands) interfaced with a laptop and controlled by the PStTrace 1.1 software. Gold nanoparticles-modified screen-printed electrode strips were purchased from DropSens (Oviedo, Spain). They were designed in three electrode configuration printed on the same platform. Working electrode ( $\varnothing$  4 mm), counter electrode, and pseudo-reference electrode were made of gold nanoparticles-on-carbon, carbon, and silver, respectively. An insulating layer serves to delimit the working area and silver electric contacts. Ink formulation and production characteristics of commercial AuNPs-SPEs are regarded by the manufacturers as proprietary information. A specific connector was used to connect the electrochemical strip to the potentiostat. A methacrylate voltammetric cell (DropSens, Spain) was used to perform the analysis. It was especially suitable for SPEs and it was designed to perform batch analysis with volume of solution between 5 to 10 mL allowing optional stirring by means of a magnetic stirrer. The screen-printed strip was immersed in the solution through a cut on the top lid and was placed in parallel direction to the sides of the cell, leaving the electrical connections outside.

A Perkin Elmer ELAN 9000 (Massachusetts, USA) quadrupole ICP-MS equipped with a cross flow nebulizer, a demountable quartz torch, a niqel skimmer and sampler cones, and a ryton scott spray chamber was used for mercury determination. It was also used for accuracy check of the electrochemical results.

The images of the dust samples were obtained by scanning electron microscopy (SEM) using a Hitachi FE-SEM S-4800II instrument (Tokyo, Japan) which was also used for registering EDX spectra.

The software package The Unscrambler<sup>®</sup> v9.7 CAMO Software AS (Trondheim, Norway) was used for the application of chemometrics.

## **2.4. Procedures**

### **2.4.1. Ultrasonic probe-assisted extraction method**

Ultrasound probe assisted extractions was carried out for the extraction of Hg(II) from the dust samples and reference materials, before determination of mercury by ASV and ICP-MS.

An appropriate amount of sample was weighed in a 1.5 mL conical bottom Eppendorf micro centrifuge tube with snap cap. 1 mL of extraction reagent (HCl) was added and the titanium ultrasonic probe was immersed. Then, the sonication of the samples was started at room temperature. Optimal conditions of the extraction with ultrasonic probe were achieved through the surface response methodology derived of the application of a face-centred cube central composite design of experiments (FCCD). After application of the extraction method, the samples were centrifuged for 15 min at 5000 r.p.m. For the determination of Hg(II) on AuNPs-SPCEs by SWASV, the appropriate volume of supernatant was transferred to 10 mL flask and the pH was adjusted to 1 with concentrated NaOH as previously described [29]. Although for the analysis of Hg(II) by ICP-MS, the desired amount of supernatant liquid was transferred to a flask and the final volume was made up to 10 mL with 5 % HNO<sub>3</sub> and 5 ng/mL In(III) as internal standard. Blanks were treated in the same ways.

### **2.4.2. Determination of mercury by ICP-MS**

The sample extracts were analyzed by a standard ICP-MS protocol for the determination of total mercury as follows: RF power 1000 W, Ar plasma flow rate 1 L/min, washing time 35 seconds (s) and 3 replicates per sample. The most abundant mercury isotope <sup>202</sup>Hg was used for data evaluation. Quantification was performed by internal standard method using In(III).

### **2.4.3. Determination of mercury by anodic stripping voltammetry on AuNPs-SPCEs**

The sample extracts were placed in the voltammetric cell (10 mL) and the SWASV determination was started. No electrochemical activation procedure and no deaireation before voltammetric determination were needed. The applied voltammetric parameters were as described previously [29]: conditioning potential +0.7 V for 15 s, deposition potential +0.2 V for 120 s (without stirring), equilibration time 5 s, amplitude 40 mV, step potential 6 mV, and frequency 25 Hz. Initial and final potentials were +0.15 V and +0.7V. Bulk stripping voltammetric



signals were used for peak current measurement. Hg(II) quantification in the real samples and standard reference material was performed by the standard additions method. All experiments were performed in duplicate.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Optimization of ultrasonic probe-assisted extraction by the Response Surface Methodology

The optimization of the probe ultrasonic extraction procedure of Hg was performed by analyzing the NIST Standard Reference Material® 2583 Trace Elements in Indoor Dust by ICP-MS. Different acid media have been reported in the literature for the ultrasonic extraction of mercury. Río-Segade and Bendicho [8] and López et al [16] demonstrated the efficiency of HCl, in concentration of 5 and 7 M respectively, for the extraction of Hg (II) from mussel tissue samples, swordfish, and zebra fish using an ultrasonic probe. Reyes et al [12] established a comparison of methods including an ultrasonic bath assisted extraction of Hg from tuna fish using 5M HCl as acid medium. About solid environmental samples, Collasiol et al [14] used the mixture 30 % (v/v) HNO<sub>3</sub>-0.15 % KCl for the extraction of Hg from soil and sediment by ultrasonic bath treatment. Recently, Marín et al [17] reported an ultrasonic probe assisted leaching of Hg, among other elements from street dust samples using concentrated aqua regia (HNO<sub>3</sub>-HCl 1:3, v/v). In the present work, the previous experiments of probe ultrasonic extraction were performed in HNO<sub>3</sub> and HCl media. In both cases, quantitative recoveries of Hg(II) were obtained, but HCl was finally selected because the determination of Hg by anodic stripping voltammetry on AuNPs-SPCE was optimal in this medium [28, 29]. Anyway, several authors have investigated which parameters are involved directly in the extraction of heavy metals from several kinds of matrices with a microtip ultrasonic probe [8, 14, 16, 17]. Taking these in account the variables included in the experimental design carried out in the present work were the acid concentration, the sonication time, and the sonication amplitude.

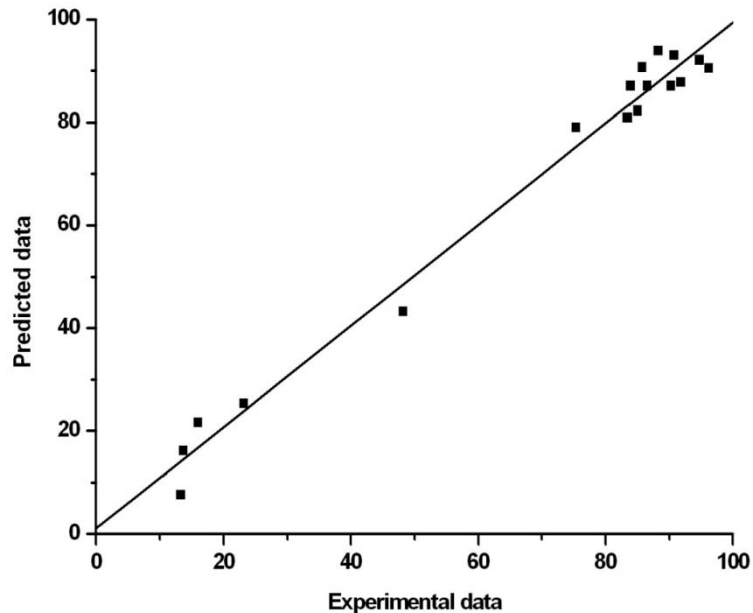
In order to reach the optimum values for the three factors mentioned before, a face-centred cube central composite design, 2<sup>3</sup>, with three central points was used [11, 28]. This design included 17 experiments performed in random order and it was used with the aim of calculating simultaneously the effect of the change in each one of the variables and also their possible interactions. The assayed levels for each one of the variables were: 1, 5 and 10 M for [HCl]; 1, 3 and 5 min for sonication time; and 20, 50 and 80 % for sonication amplitude. Table 1 shows the regression coefficients (also named, B-coefficients) of the proposed accuracy model and their p-values, which are used to determine the significant parameters (p-value < 0.05). An empirical relationship between the selected variables and the response function (percentage of recovery) was obtained that can be represented by the following regression equation:

$$\% \text{ Recovery} = 87.11 + 0.179 A + 7.427 C - 3.719 BC - 17.74 C^2$$

**Table 1.** Estimate regression coefficients and their significance (p-values) obtained of the proposed method

Coefficients	Estimated values	p-values
A (Sonication amplitude)	0.179	0.028
B (Sonication time)	2.170	0.061
C ([HCl])	7.427	0.000
AB	2.047	0.176
AC	-1.359	0.350
BC	-3.719	0.029
A <sup>2</sup>	0.352	0.885
B <sup>2</sup>	-2.305	0.359
C <sup>2</sup>	-17.74	0.000

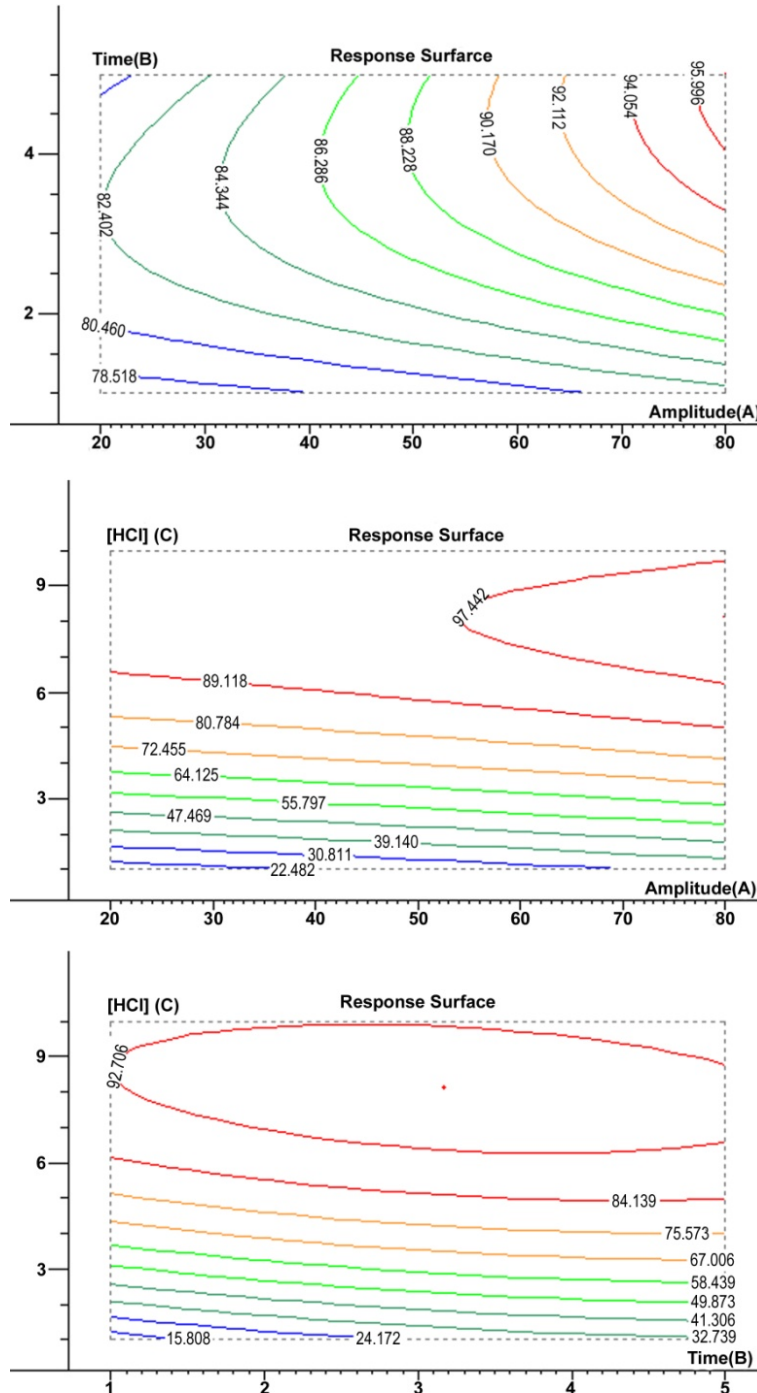
The correlation's plot between experimental and predicted data obtained from the application of the model equation is represented in Figure 1. In the corresponding analysis of variance (ANOVA) a second-grade quadratic model is assumed (p-value of model (95%) = 0.000). A multiple correlation value (R) of 0.992 and coefficient of determination (R<sup>2</sup>) of 0.984 is obtained. They is closer to +1 which is in accordance with good predictive ability of the model; specifically, the value of R<sup>2</sup> indicates that the model could explain 98.4 % of the variability in the response. Furthermore, the p-value (95%) calculated for lack of fit is 0.179 which means that the model described the true shape of the response surface.



**Figure 1.** Correlation of experimental and predicted values of Hg peak intensity

Figure 2, shows the response surfaces (contour plots) estimated by the model for each pair of variables. The information extracted of these plots indicates that the optimum values of the variables correspond to 55 % sonication amplitude, 3.2 min sonication time, and 8.13 M hydrochloric acid concentration. It is noticeable that the saddle point observed in the contour plot of time vs. sonication amplitude indicates that the optimal value of the variable is not in

the chosen range and also it does not correspond to the maximum value. In spite of this, the selection of the sonication amplitude optimal value is not affected because very good recoveries are observed when the variable is different to the maximum selected in the established range. Moderate amplitude is beneficial for long term protection of the titanium tip of the US probe also.

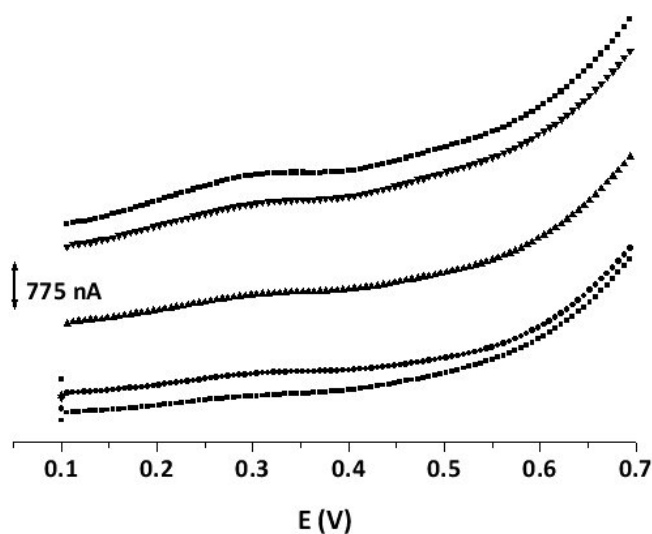


**Figure 2.** Contour plots estimated for each pair of variables after model fit (A: Time vs. Amplitude; B: [HCl] vs. Amplitude; C: Time vs. [HCl])

To evaluate the accuracy of the response surface model, four experiments were carried out using the optimal conditions. Two blank samples and four sub-samples (15 mg) of the Trace Elements in Indoor Dust standard reference material were extracted consecutively by the ultrasound probe treatment and analyzed by a standardized ICP-MS methodology. A very good agreement between certified concentration of Hg ( $1.56 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$ ) and measured concentration ( $1.47 \pm 0.67 \mu\text{g/g}$ ) was found. In terms of percentage of recovery, the values obtained were in the range of 90 to 99 %.

### 3.2. SWASV determination of Hg(II) in the ultrasonic extracts. Indoor dust standard reference material.

In order to achieve a reliable, fast, reproducible, and miniaturized methodology for the analysis of Hg(II) in the indoor dust samples, the optimized ultrasonic probe microextraction was coupled to square wave anodic stripping voltammetric determination on AuNPs-SPCE [29]. This way, a sample (15 mg) of the indoor dust standard reference material was extracted and Hg(II) was sub sequentially analyzed by SWASV on AuNPs-SPCE. A set of voltammetric curves for the extraction protocol are represented in Figure 3. The experimental value obtained by SWASV ( $1.68 \pm 1.03 \mu\text{g/g}$ ) was in good agreement with the certified value ( $1.56 \pm 0.19 \mu\text{g/g}$ ). The relatively high confidence interval measured by the proposed method can be assigned to proximity to the detection limit.

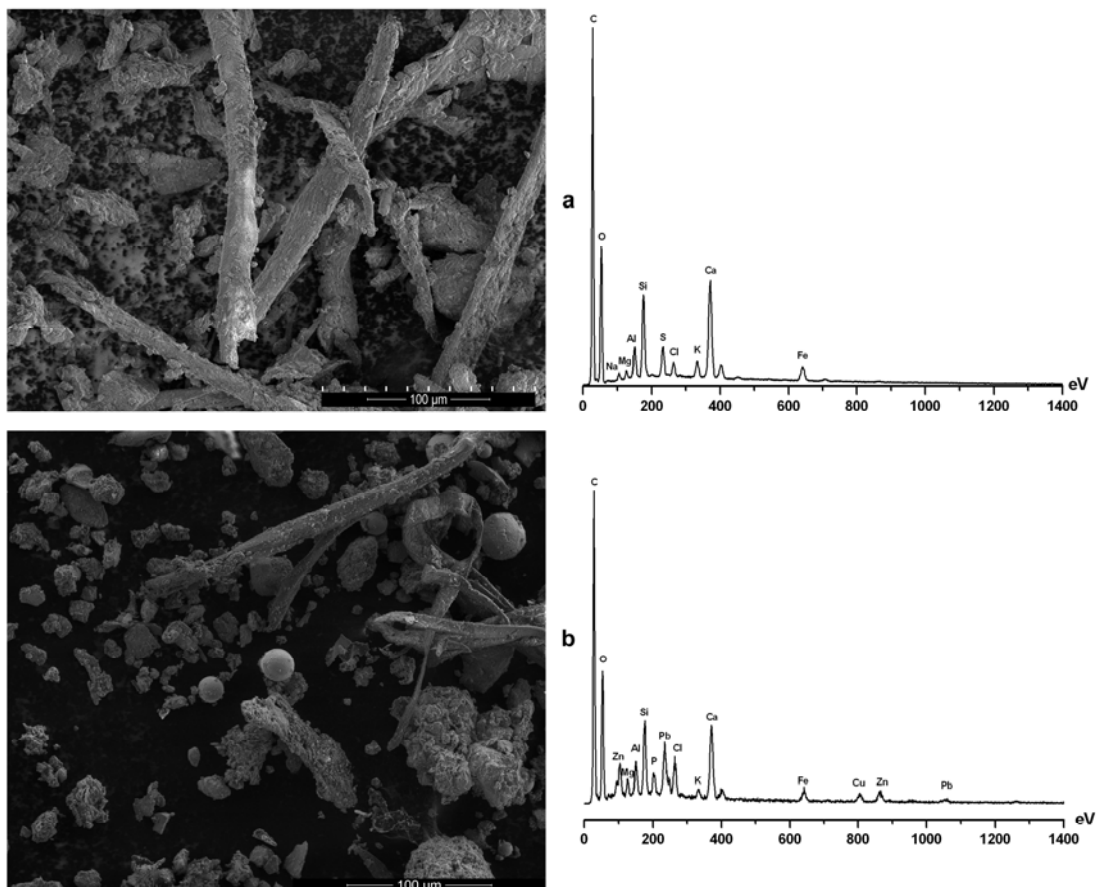


**Figure 3.** Voltammetric curves obtained by the standard addition method for the determination of Hg(II) in indoor dust standard reference material using an ultrasonic probe on AuNPs-SPCE. Square-wave voltammetric stripping measurements performed in 0.1 M HCl and in a convective cell with a frequency of 25 Hz, step potential 6mV, amplitude 40 mV, deposition potential +0.1 V and deposition time 120 s.

### 3.3. SWASV determination of Hg(II) in real indoor dust samples

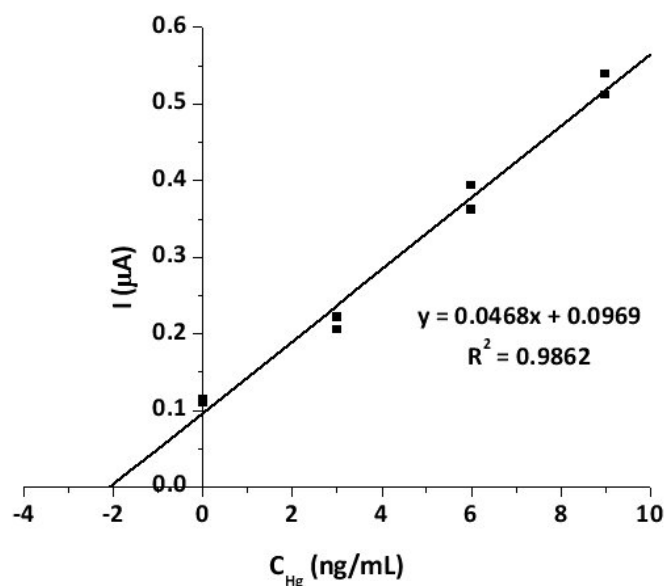
Indoor dust samples collected in a private garage and a research laboratory were previously characterized using SEM and EDX techniques (Figure 4). After drying, reduction of particle size and sieving, an appropriate portion of each dust sample was placed on an adhesive tape for surface analysis. The SEM images showed in both cases random distribution of microparticles

but significantly different morphological structures. The physical appearance of lab dust (Figure 4a) was like cotton, so, the SEM analysis highlighted the most elongated aspect of the particles. On the other hand, finer particles, spherical, and fibrous structures predominate in the SEM image of the garage dust (Figure 4b). EDX analysis showed several metal and metalloid peaks. Cu, Pb, and Zn were observed only in the EDX spectrum of the garage dust probably, derived from vehicle exhaust. Sensitivity of x-ray spectroscopy was not enough to detect mercury on the dust samples.

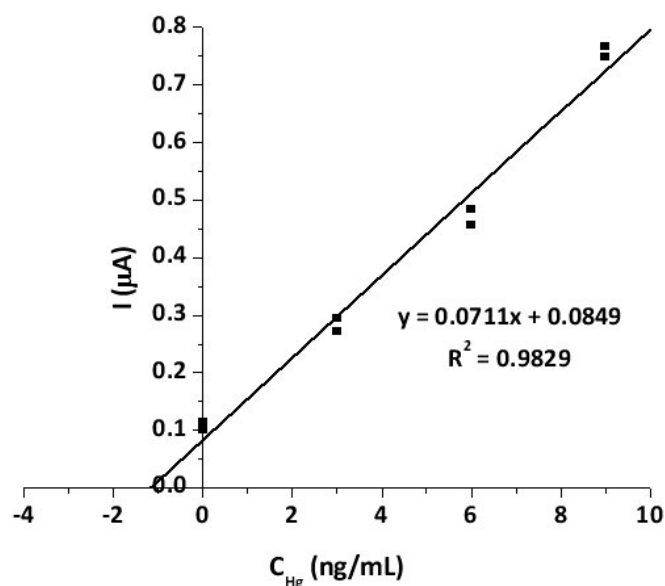


**Figure 4.** SEM and EDX analysis of indoor dusts in samples taken from a research laboratory (a) and a private garage (b)

To quantify mercury in the indoor dust samples, probe ultrasound-assisted extraction was carried out using the optimal experimental conditions described in the previous sections and the extracts were analyzed by SWASV on AuNPs-SPCE. Standard addition method of 3, 6, and 9 ng/mL Hg(II) was used for calibration. Sample regressions are shown in Figure 5 and 6 for the lab dust and the garage dust, respectively.



**Figure 5.** Regression curve obtained for standard addition determination of Hg(II) in lab dust samples extracted using an ultrasonic probe and analyzed by SWASV on AuNPs-SPCE



**Figure 6.** Regression curve obtained for standard addition determination of Hg(II) in garage dust samples extracted using an ultrasonic probe and analyzed by SWASV on AuNPs-SPCE

Measured concentrations of Hg(II) in the real dust samples are summarized in Table 2, which shows also the results of ICP-MS assay of the extracts.

**Table 2.** Hg(II) concentration in real indoor dust samples extracted using ultrasonic probe

Sample	Conc. Hg SWASV (µg/g)	Conc. Hg ICP-MS (µg/g)
Lab dust	131 ± 55	134 ± 32
Garage dust	0.78 ± 0.50	0.69 ± 0.15

As seen in Table 2, the proposed method gave results in good agreement with ICP-MS determinations. Concentrations of dust mercury taken from the laboratory and the garage were considerably different, and also the measured confidence intervals. The somewhat high value determined in the laboratory dust sample was probably related to the long term use for polarography research. Concentration of dust mercury found in the garage is in the range of previously reported data for similar samples [17]. Both values are lower than others reported by Y. Liu et al [4] in indoor dust collected at incineration plants from the district of Taiyuan city (China). These authors measured concentrations of dust mercury from 547 to 866  $\mu\text{g/g}$  in the municipal solid waste incineration plant and over 1100  $\mu\text{g/g}$  in the workplace of the hospital waste incineration plant, respectively.

These results demonstrate the potential applicability of the proposed ultrasonic methodology combined with stripping voltammetry for the determination of Hg(II) in complex dust samples from different environments.

#### **4. Conclusions**

Ultrasonic probe assisted extraction optimized by response surface methodology offers a fast, easy, efficient, and miniaturized sample preparation for the determination of Hg(II) in dust samples. The combination of the probe ultrasonic extraction with SWASV determination of Hg(II) on Au nanoparticles modified screen-printed electrodes results in a reliable, simple, inexpensive, reproducible, and selective methodology for Hg(II) analysis in complex dust samples. The effectiveness of the proposed methodology has been demonstrated by assaying a certified indoor dust standard reference material and real dust samples collected in different indoor ambients.

#### **Acknowledgements**

This work is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (project CTQ2011-25388). E. Bernalte acknowledges a grant from Junta de Extremadura, Spain (PRE09107).

#### **References**

- [1] R.M. Maertens, J. Bailey, P.A. White, *Mutat. Res.* 567 (2004) 401-425.
- [2] Y. Kang, K.Ch. Cheung, M.H. Wong, *Environ. Int.* 37 (2011) 637-643.
- [3] S. Charlesworth, E. de Miguel, A. Ordoñez, *Environ. Geochem. Health* 33 (2011) 103-123.
- [4] Y. Liu, Z. Zhan, F. Du, S. Kong, Y. Liu, *Chemosphere* 75 (2009) 266-271.
- [5] P.J. Liroy, N.C. Freeman, J.R. Millete, *Environ. Health Perspect.* 110 (2002) 969-983.
- [6] A. Elik, *Talanta* 66 (2005) 882-888.
- [7] J.L. Capelo, C. Maduro, C. Vilhena, *Ultrason. Sonochem.* 12 (2005) 225-232.
- [8] S. Río-Segade, C. Bendicho, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 263-268.

- [9] C. Bendicho, I. de la Calle, F. Pena, M. Costas, N. Cabaleiro, I. Lavilla, *Trenes Anal. Chem.* 31 (2012) 50-59)
- [10] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escaleira, *Talanta* 76 (2008) 965-977.
- [11] M.Balachandran, S. Devanathan, R. Muraleekrishnan, S.S. Bhagawan, *J. Mater. Design* (2011), doi:10.1016/j.matdes.2011.03.077.
- [12] L.H. Reyes, G.M. Mizanur Rahman, T. Fahrenholz, H.M. Skip Kingston, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 2123-2132.
- [13] R.A.A. Munoz, F.S. Felix, M.A. Augelli, T. Pavesi, L. Angnes, *Anal. Chim. Acta*, 571 (2006) 93-98.
- [14] A. Collaisol, D. Pozebon, S.M. Maia, *Anal. Chim. Acta*, 518 (2004) 157-164.
- [15] J.L. Capelo, C. Maduro, A.M. Mota, *Ultrason. Sonochem.* 13 (2006) 98-106.
- [16] I. López, S. Cuello, C. Cámara, Y. Madrid, *Talanta* 82 (2010) 594-599.
- [17] M.R. Palomo Marín, E. Pinilla Gil, L. Calvo Blázquez, J.L. Capelo-Martínez, *Talanta* 84 (2011) 840-845.
- [18] Y. Bonfil, M. Brand, E. Kirowa-Eisner, *Anal. Chim. Acta* 424 (2000) 65-76.
- [19] O. Ordeig, C.E. Banks, J. del Campo, F.X. Muñoz, R.G. Compton, *Electroanalysis* 18 (2006) 573-578.
- [20] M.A. Augelli, R.A.A. Munoz, E.M. Richter, M.I. Cantagallo, L. Angnes, *Food Chem.* 101 (2007) 579-584.
- [21] A. Giacomino, O. Abollino, M. Malandrino, E. Mentasti, *Talanta* 75 (2008) 266-273.
- [22] B.K. Jena and C.R. Raj, *Anal. Chem* 80 (2008) 4836-4844.
- [23] O. Abollino, A. Giacomino, M. Malandrino, G. Piscioneri, E. Mentasti, *Electroanalysis* 20 (2008) 75-83
- [24] J. Gong, T. Zhou, D. Song, L. Zhang, X. Hu, *Anal. Chem* 82 (2010) 567-573.
- [25] S. Laschi, I. Palchetti, M. Mascini, *Sens. Actuators B* 114 (2006) 460-465.
- [26] V. Meucci, S. Laschi, M. Minunni, C. Pretti, L. Intorre, G. Soldani, M. Mascini, *Talanta* 77 (2009) 1143-1148.
- [27] A. Mandil, L. Idrissi, A. Amine, *Microchim. Acta* 170 (2010) 299-305.
- [28] E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil, *Anal. Chim. Acta* 689 (2011) 60-64.
- [29] E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil, *Sens. Actuators B* 161 (2012) 669-674.



[30] G. Aragay, J. Pons, A. Merkoçi, Chem. Rev 111 (2011) 3433-3458.



### 3.6. Artículo VI.

Fast and Miniaturized Ultrasonic-probe Extraction Coupled to ICP-MS  
Detection for the Assessment of Mercury Pollution in Soils Affected by  
Industrial Emissions

---

---



# FAST AND MINIATURIZED ULTRASONIC-PROBE EXTRACTION COUPLED TO ICP-MS DETECTION FOR THE ASSESSMENT OF MERCURY POLLUTION IN SOILS AFFECTED BY INDUSTRIAL EMISSIONS

*Environmental Chemistry (2013). Sent*

E. Bernalte<sup>1</sup>, S. Salmanighabeshi<sup>1</sup>, F. Rueda-Holgado<sup>1</sup>, M. R. Palomo-Marín<sup>1</sup>,  
C. Marín-Sánchez<sup>1</sup>, F. Cereceda-Balic<sup>2</sup>, E. Pinilla-Gil<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> *Departamento de Química Analítica  
Universidad de Extremadura, Avda. de Elvas, s/n, E-06006 Badajoz, Spain.*

<sup>2</sup> *Laboratorio de Química Ambiental (LQA), Centro de Tecnologías Ambientales (CETAM)  
Universidad Técnica Federico Santa María, Casilla 110-V, Valparaíso, Chile.*

## **Abstract**

A combination of probe ultrasonic extraction, optimized by surface response methodology, and ICP-MS detection is described in this work as an effective methodology for mercury monitoring in soils affected by industrial emissions. Minute amounts of samples (typically 20 mg) can be extracted in 3 min by 1 mL of HCl based extracting solution, without risk of mercury losses, and sub sequentially assayed by ICP-MS. The method was successfully tested on soil standard reference materials, and then applied to mercury monitoring in a large set of real soil samples collected during a long term monitoring survey (2007-2011) around the industrial area of Puchuncaví, Chile. The method proved to be useful for investigation of spatial and temporal mercury variability in the area, showing and intermediate to high mercury contamination with potential impact on the surrounding ecosystem.

**Keywords:** *Mercury; Soil; Ultrasonic extraction; ICP-MS; HCA; Contamination Indexes*



## 1. Introduction

Mercury is regarded as one of the major hazardous trace metal impacting on the environment and public health because of its high volatility, toxicity, mobility, and great ability of bioaccumulation. It is released into the different environmental compartments from both natural and anthropogenic sources, where mercury in several chemical forms undergo many biological, chemical, and photochemical reactions [1-3]. Natural sources include volcanoes [4], geothermal activities [5], wild fires [6], soil erosion, and oceans [7], whereas fossil fuel combustion [7], waste incineration, metal mining, refining and manufacturing [8], electronic, paper, pharmaceutical industries [9], and chlor-alkali plants [10] are identified as the major sources of anthropogenic emission of Hg in the industrialized world. Currently, mercury pollution is recognized as a geographically widespread and persistent environmental problem [11].

Soil is the primary terrestrial reservoir of persistent contaminants, playing an important role in the biogeochemical cycle of mercury, and acting both as a sink and a source of this metal to biota, atmosphere, and hydrological compartments [12]. These facts make soil a useful matrix for the evaluation of the environmental impact of this element.

The need of accurate determination of mercury at the typically low levels found in environmental samples has prompted the development of a variety of highly sensitive and reliable analytical methodologies [11]. Cold vapour atomic absorption spectrometry (CV-AAS) has been most widely used because of its speed, simplicity, relative freedom from interferences, low operations costs, and high sensitivity, especially when mercury vapour is pre-concentrated on gold by amalgamation [13]. Other sensitive spectrometric techniques as cold vapour atomic fluorescence spectrometry (CV-AFS) [14] or inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES) [15] are frequently used for Hg determination. Also, many published methods are based on inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), because of its excellent detection limits [16]. On the other hand, stripping electroanalytical techniques are recently re-emerging as an attractive alternative for Hg determination in connection with low-cost, short analysis time, miniaturization, and even, suitability for field analysis [17-19]. Other techniques that enable direct analyses without sample pretreatment, as instrumental neutron activation analysis (INAA) [20], X-ray absorption spectroscopy (XAS) or X-ray fluorescence (XRF) [21] are also cited in the literature for Hg determination.

Special attention is currently paid to the analytical sample preparation procedures in order to reduce solvent amounts, overall time employed, and cost [22]. As a consequence, ultrasonic probe assisted extraction has emerged as an effective way of sample treatment for elemental analysis in the environmental samples and is increasingly applied for the efficient, fast, and economic extraction of metal species. The focused cavitation reached by the ultrasonic energy around the probe increases the temperature, the pressure, and the oxidative energy of solvent radicals producing favorable extraction conditions when comparing with microwave assisted extraction [22], enzymatic hydrolysis [23], slurry preparation [24] or bath ultrasonic extraction [25]. The ultrasonic probe has been scarcely studied as a pretreatment tool for mercury extraction from environmental samples, with some published results about applicability to dust [16, 19] and biological samples [26]. A single application to soil and sediment samples, with final detection by CV-AAS, has been reported [27].

In the present work, we have aimed to explore a simplified strategy based on the application of a miniaturized, fast, and efficient ultrasound probe assisted extraction method coupled to ICP-MS for the determination of total mercury in large sets of soil samples. Applicability is demonstrated by the use of the method for mercury monitoring in soil samples collected at different locations around the industrial area of Puchuncaví-Ventanas (Chile) from 2007 to 2011. Previously unreported temporal and spatial variabilities of mercury content in these polluted areas, relevant for health and environmental risk assessment, are described.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Chemicals and materials**

All chemicals used for the preparation of stock and standard solutions were of analytical grade. 10 mg/L stock solution of Hg(II) (ICP quality) was supplied by PerkinElmer (Spain). Working solutions were prepared by dilution with ultrapure water (18.2 M $\Omega$ ·cm at 25 °C) obtained from an Ultramatic system (Wasserlab, Spain). Samples and dilute standard solutions were adjusted to desired pH with subboiled HNO<sub>3</sub> obtained from a quartz distiller (Kürner, Germany) before ICP-MS analysis. Glassware was thoroughly conditioned for trace analysis by cleaning with hot nitric acid (10%), rinsing with ultrapure water, drying and keeping in hermetic plastic bags before use.

A Fritsch Pulverisette 6 planetary balls mill (Germany) equipped with zirconium dioxide vessels and balls was used for soil samples milling.

Ultrasound assisted extraction experiments were carried out with a Hielscher (Teltow, Germany) UP200S stand mounted ultrasonic device, fitted with a 200 W, 24 kHz high-frequency generator and equipped with a S1 1 mm diameter titanium sonotrode suitable for volumes between 0.1 and 5 mL. The amplitude control of the ultrasonic processor allowed the vibrations at the probe to be set any desired level in the range of the nominal power from 10 to 100 %.

An Ortoalresa Digicen 21 (Madrid, Spain) centrifuge equipped with a hermetic closure rotor and a 24 microtubes sample holder was used for separation of solid residues after ultrasonic extractions.

A Perkin Elmer ELAN 9000 (Massachusetts, USA) quadrupole ICP-MS equipped with a cross flow nebulizer (resistant to HF and particle clogging), a ryton scott spray chamber, a demountable quartz torch, a nickel skimmer and sampler cones, and a gold plated ceramic quadrupole mass analyzer was used for mercury determination.

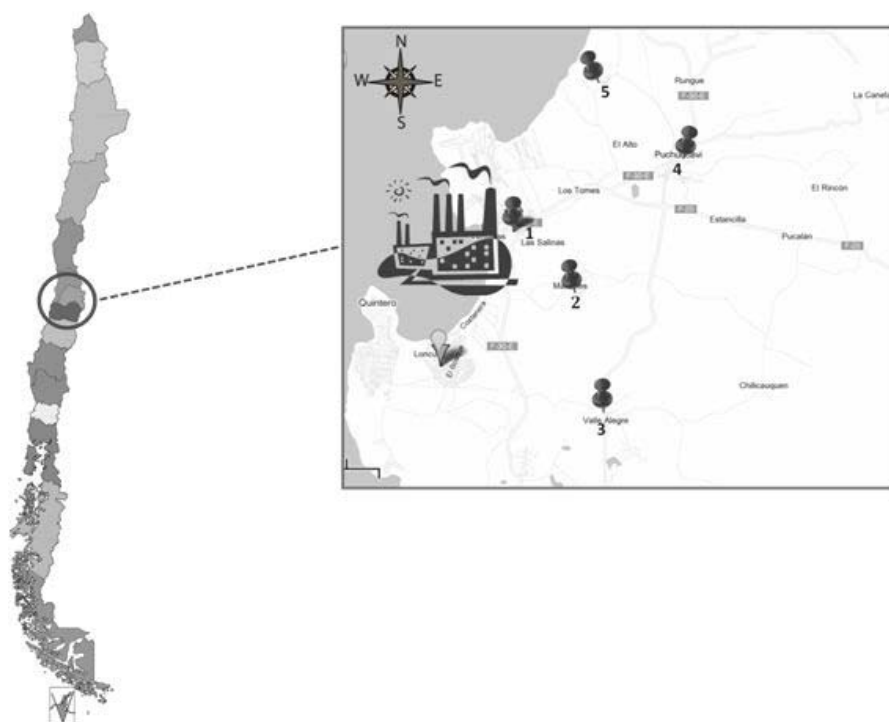
NIST Standard Reference Material® 2710a Montana Soil I was used for accuracy check.

The software package XLSTAT 2009.1.02 was used for performing the hierarchical cluster analysis.

### **2.2. Study site description**



The study area was located around the industrial complex of Puchuncaví-Ventanas. The Puchuncaví valley, a Mediterranean climate region placed in the coastal area of central Chile (71°24'S, 32°40'N), is characterized by marked pollution due to the historical discharge of gaseous pollutants and atmospheric particulates, and deposition of metal-rich particles from diverse industrial facilities including coal-fired power plants, a copper refinery and smelter, natural gas terminals, and cement companies [28, 29]. Apart from the industrial activity, the study area is mainly agricultural, with scarce rural population living in small villages. Five sampling areas were selected to evaluate the impact of mercury in soils surrounding the industrial complex. As depicted in Figure 1, La Greda (LG), Los Maitenes (LM), Puchuncaví (PU), and Valle Alegre (VA) sampling sites are located around the industrial complex at different distances and different degrees of influence from the prevalent SW winds in the zone. The sampling points were located in the vicinity of small villages. A reference rural area was selected north to the study site (RF).



**Figure 1.** Soil sampling locations at the Puchuncaví Valley, Chile: 1, La Greda; 2, Los Maitenes; 3, Valle Alegre; 4, Puchuncaví; 5, Reference area

### 2.3. Sample collection and preparation

A total of 125 surface soil samples were collected in the study area (LG, LM, PU, VA, RF) during five monitoring campaigns carried out in summer 2007, 2008, 2009, 2010 and 2011. 5 samples were taken around each sampling zone for each sampling campaign. These activities are in the frame of a large scale and long term ongoing environmental monitoring program in the area. For sampling, 1 m<sup>2</sup> surface was delimited and the extraneous matter (stones, leaves, seeds or roots) was eliminated. Soil samples were collected to a depth of 5-10 cm by using a hand polypropylene drill. Approximately 3 kg of sample was extracted with a plastic spade, placed into a conditioned plastic cube. The cube was closed and transferred to the lab.

In the laboratory, soil samples were appropriately dried in stove by heating at 50 °C for 72 h and then sieved through a polypropylene 2 mm mesh. Soil sub-samples were mechanically homogenized in a planetary mill at 500 r.p.m for 15 min, and manually sieved to 0.2 mm using a stainless steel mesh. The samples were then stored in the fridge (4 °C) until analysis.

For the ultrasonic extraction, an appropriate amount of soil sample (20 mg) was accurately weighed in a 1.5 mL conical bottom Eppendorf micro centrifuge tube with snap cap. 1 mL of extraction reagent (HCl) was added and the titanium ultrasonic probe was immersed. Then, the sonication of the samples was started at room temperature. The focused ultrasonic extraction of Hg was carried out under the experimental conditions developed in a previous published work [19]. Briefly, the optimization of the sonication parameters was achieved through the application of a Face-Centred Cube Central Composite design of experiments (FCCD), and the optimum values were as follows: 55% sonication amplitude, 3.2 min sonication time, and 8.13 M hydrochloric acid concentration. After sonication, the samples were centrifuged for 15 min at 5000 r.p.m. For the final determination of Hg by ICP-MS, 0.5 mL of the supernatant was transferred to a volumetric flask and the final volume was made up to 10 mL with 5 % HNO<sub>3</sub>. Certified Reference Material and blank samples were treated in the same way.

#### 2.4. Determination of mercury by ICP-MS

The sample extracts were assayed by a standard ICP-MS protocol for the determination of total mercury as follows: RF power 1000 W, Ar plasma flow rate 1 L/min, washing time 35 seconds (s) and 3 replicates per sample. The most abundant mercury isotope <sup>202</sup>Hg was used for data evaluation. Quantification was performed by calibration with mercury standard solutions. Blank samples were placed among the extracts of the soil samples throughout the analysis by ICP-MS to check the possible memory effect described for routine analysis of mercury [13], and no significant concentrations of mercury were finally quantified in blank samples. Mercury concentrations in soil samples are expressed in dry soil weight terms.

#### 2.5. Contamination indexes

The index of geoaccumulation ( $I_{geo}$ ), the enrichment factor (EF), and the contamination factor ( $C_f$ ) were calculated according to the definition given by Loska et al [30]. The index of geoaccumulation was computed from Eq. (1):

$$I_{geo} = \log_2(C_n/1.5 B_n) \quad (1)$$

where  $C_n$  is the measured concentration of the element in the soil sampled and  $B_n$  is the geochemical background value in the Earth's crust. Reference background values used were average mercury levels in the upper crustal crust as described by Wedepohl [31]. The  $I_{geo}$  classifies the sampling locations into seven classes, as follows: ( $I_{geo} \leq 0$ ) practically uncontaminated; ( $0 < I_{geo} < 1$ ), uncontaminated to moderately contaminated; ( $1 < I_{geo} < 2$ ) moderately contaminated; ( $2 < I_{geo} < 3$ ) moderately to heavily contaminated; ( $3 < I_{geo} < 4$ ) heavily contaminated; ( $4 < I_{geo} < 5$ ) heavily to extremely contaminated, and ( $5 \leq I_{geo}$ ) extremely contaminated.

The enrichment factor (EF) was based on the standardization of a tested element against a reference element, characterized by low occurrence variability. In this study, soil concentration

of Sr, measured in all samples during a multielemental soil monitoring campaign carried out in the study area, was used. The value of the enrichment factor was calculated according to Eq. (2):

$$EF = \frac{\frac{C_n (\text{sample})}{C_{ref} (\text{sample})}}{\frac{B_n (\text{background})}{B_{ref} (\text{background})}} \quad (2)$$

Where  $C_n$  (sample) is the content of the examined element in the examined environment,  $C_{ref}$  (sample) is the content of the reference element in the examined environment,  $B_n$  (background) is the content of the examined element in the reference environment and  $B_{ref}$  (background) is the content of the reference element in the reference environment.

Five contamination categories are recognized on the basis of the enrichment factor:  $EF < 2$  (deficiency to minimal enrichment),  $EF = 2-5$  (moderate enrichment),  $EF = 5-20$  (significant enrichment),  $EF = 20-40$  (very high enrichment) and  $EF > 40$  (extremely high enrichment).

The contamination factor ( $C_f$ ) was calculated by Eq. (3):

$$C_f = \frac{C_n (\text{sample})}{B_n (\text{background})} \quad (3)$$

Four contamination categories are defined for  $C_f$ :  $C_f < 1$  (low contamination factor indicating low contamination);  $1 \leq C_f < 3$  (moderate contamination factor);  $3 \leq C_f < 6$  (considerable contamination factor) and  $C_f > 6$  (very high contamination factor).

Human risk assessment with attention to metal contaminated soil by ingestion was performed calculating the non-cancer toxic risk. Average daily dose (ADD) was calculated as USEPA's suggested [32] by Eq. (4):

$$ADD = [C * IngR * EF * ED] / [BW * AT] \quad (4)$$

Where C is the contaminant content in soil ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), conservative estimates of ingestion rates (IngR) were chosen for children ( $200 \text{ mg day}^{-1}$ ) and adults ( $100 \text{ mg day}^{-1}$ ). Average body weight (BW) was chosen 60 kg for adults and 16 kg for children. Exposure frequency (EF) was 350 days  $\text{year}^{-1}$ , exposure duration (ED) was 6 years, and average time (AT) was 2190 days.

So, non-cancer toxic risk was calculated by calculating the hazard quotient (HQ) by Eq. (5):

$$HQ = \frac{ADD}{RFD} \quad (5)$$

Where RFD is the toxicity value for estimating non-cancer effects from oral exposure, which is an estimate of the highest dose that adverse non-cancer effect. In this study, considering the chloride mercury oral RFD was used  $0.0003 \text{ mg kg}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , as standard value. Therefore,  $HQ \leq 1$  suggests unlikely adverse health effects,  $HQ > 1$  suggests the probability of adverse health effects, and  $HQ > 10$  is considered to be high chronic risk [33].

### 3. Results and discussion

### **3.1. Validation of the methodology**

As mentioned above, the ultrasonic probe extraction method used in this work was previously optimized by response surface methodology and successfully applied for the determination of Hg in indoor dust samples [19]. To ensure the reliability of the methodology for the extraction of the analyte from soil samples, a certified reference material was selected to test the extraction protocol. Therefore, a set of 9 subsamples of the standard reference material NIST 2710a Montana Soil was extracted and analyzed by using a standardized ICP-MS methodology for accuracy check. A very good agreement between certified concentration of Hg ( $9.88 \pm 0.21$  mg/kg) and measured concentration ( $10.62 \pm 0.31$  mg/kg) was found. In terms of percentage of recovery, the results obtained were in the range of 88 to 118 %.

The limit of detection (LOD) of the method was calculated according to the IUPAC definition by processing a set of 10 blank samples in the same way as the standard reference material, and a value of 0.25 ng/mL was obtained. This value is similar to previously reported detection limits for the determination of mercury in soil and sediments by ultrasonic probe extraction followed by CV-AAS, 0.2 ng/mL [27], and low enough for measuring the expected concentrations in polluted and unpolluted soils.

### **3.2. Application to soil samples.**

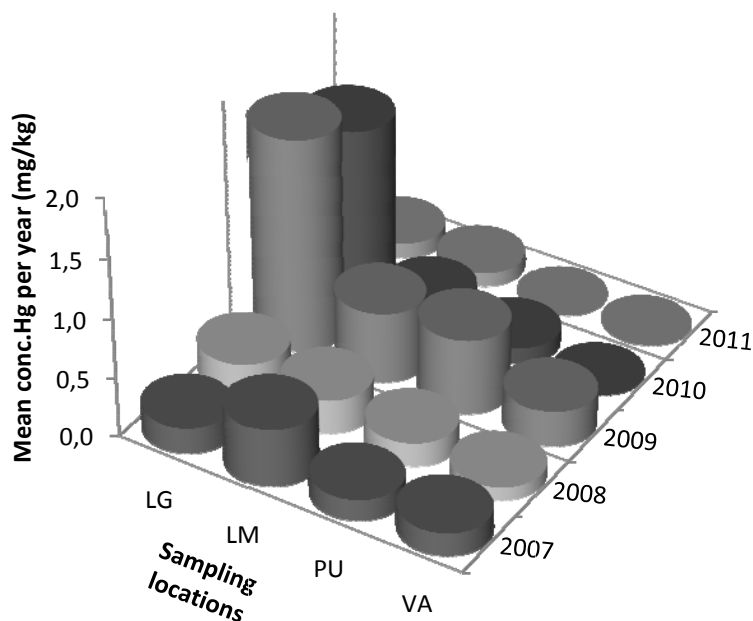
The optimized probe ultrasonic-assisted extraction was applied to the 125 soil samples collected within the Puchuncaví industrial zone and reference areas, and soil extracts were analyzed by ICP-MS as previously described. The results obtained from the samples collected around the industrial zone are summarized in Table 1. The 25 samples collected at the reference area gave values of mercury concentration below the LOD.

**Table 1.** Concentration of mercury in soils from the study areas. LG: La Greda; LM: Los Maitenes; PU: Puchuncaví; VA: Valle Alegre. 5 samples per sampling campaign in each location.

Year	Hg (mg/kg)	LG	LM	PU	VA	Whole study area
2007	Range	<LOD-0.332	<LOD-0.851	<LOD-0.125	<LOD-0.329	<LOD-0.851
	Mean	0.217	0.488	0.178	0.193	0.269
2008	Range	<LOD-0.722	0.122-0.696	<LOD-0.301	0.089-0.125	<LOD-0.722
	Mean	0.321	0.285	0.199	0.109	0.228
2009	Range	0.714-3.458	0.287-1.450	0.338-1.410	0.163-0.563	0.163-3.458
	Mean	1.810	0.597	0.638	0.301	0.836
2010	Range	0.308-3.777	0.141-0.337	<LOD-0.159	<LOD	<LOD-3.777
	Mean	1.496	0.246	0.138	<LOD	0.627
2011	Range	0.124-0.153	0.080-0.125	<LOD	<LOD	<LOD-0.153
	Mean	0.129	0.117	<LOD	<LOD	0.123
Whole period	Range	<LOD-3.777	<LOD-1.450	<LOD-1.410	<LOD-0.563	<LOD-3.777
	Mean	0.795	0.346	0.288	0.201	0.408

Considering the whole sampling period and the four locations around the industrial complex (LG, LM, PU and VA), the mean Hg concentration in the sampled soils was 0.408 mg/kg (range from <LOD to 3.777 mg/kg). Highest values of Hg were measured in La Greda soils (mean of all samples 0.795 mg/kg), probably due to its geographical situation in the vicinity to the emission sources from the industrial area and under the influence of the dominant SW winds. Relatively high concentrations of Hg were also found in the soil samples collected from Los Maitenes (mean 0.346 mg/kg) and Puchuncaví (mean 0.288 mg/kg) locations. Los Maitenes is closer to the industrial complex than Puchuncaví (Figure 1), but the last is more affected by pollutant transport by the dominant winds. The lowest Hg values found in the soils around the industrial complex were measured in Valle Alegre samples (mean 0.201 mg/kg), located 8 km south to the industrial complex.

The distribution of mercury in the selected sampling points along the study period 2007-2011 is presented in Figure 2. A significant temporal variability in soil mercury concentration is observed in each sampling location during the period studied (2007-2011), with maximum values observed in 2009 and 2010 at the most polluted place (La Greda). Mercury concentration at Los Maitenes, Puchuncaví and Valle Alegre also shows a maximum in 2009. The decay of mercury concentrations in all locations during the 2010–2011 sampling campaigns could be assigned to contamination prevention policies that are progressively being implemented in the industrial area.



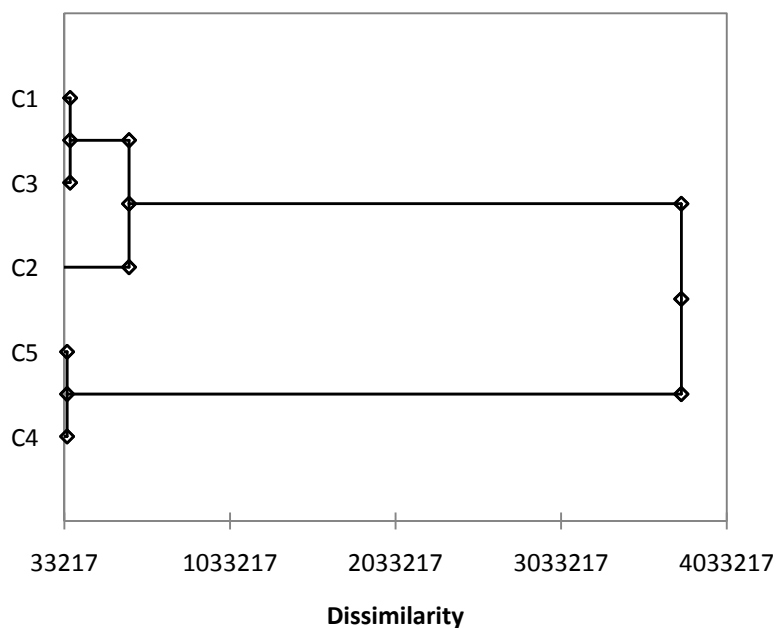
**Figure 2.** Mercury concentration in soils at the Puchuncaví industrial area

In order to explore spatial and temporal correlations of the soil samples attending to the mercury content, hierarchical cluster analysis (HCA) of the yearly mean of mercury concentration in each location was performed by using Euclidean distance and the Ward agglomerative algorithm. For this statistical analysis, the concentration of mercury in samples below the LOD limit was assumed to be one-half of the calculated LOD.

As shown in Table 2 and Figure 3, the HCA test classified the sampling campaigns in five groups. Groups C4 and C5 are formed by the 2009 and 2010 sampling campaigns in La Greda (LG09 and LG10), which provided the highest mercury levels. Group C2 aggregate sampling campaigns where intermediate mercury levels were measured, including the 2009 sampling campaigns at Los Maitenes (LM09) and Puchuncaví (PU09), and also the 2007 sampling campaign at Los Maitenes (LM07). Groups C1 and C3 include the samples with the lower mercury levels, including all the Valle Alegre and reference area sampling campaigns.

**Table 2.** Classification of sampling campaigns by hierarchical cluster analysis of mercury concentrations (yearly mean on each location)

Groups				
C1	C2	C3	C4	C5
LG07	LM07	RF07	LG09	LG10
PU07	LM09	VA08		
VA07	PU09	RF08		
LG08		RF09		
LM08		PU10		
PU08		VA10		
VA09		RF10		
LM10		LG11		
		LM11		
		PU11		
		VA11		
		RF11		



**Figure 3.** Dendrogram depicting the hierarchical clustering of yearly average of mercury concentration at the sampling locations. See Table 2 for explanation of categories.

### 3.3. Mercury pollution assessment

A significant degree of heavy metal pollution around the Puchuncaví industrial area has been demonstrated by different authors along a wide set of experimental studies on rainwater [34], soils [35, 36] and biomonitors [29, 37]. Typical heavy metal pollutants have been investigated including lead, cadmium, copper, zinc, selenium, arsenic and antimony, but no results have been published to date about mercury pollution in the area. Our experimental results were compared with mercury levels in topsoils from rural, industrial and mercury related industrial locations around the world, as measured in recent studies by different authors (Table

3). The Puchuncaví Valley soils mercury contents are higher than the levels measured in rural areas [38-41], but roughly similar to recently measured values in comparable industrial areas from China and Turkey [42-45]. The soil mercury contents measured in the study area are however lower than those found at locations with industrial activities implying mercury use, like chlor-alkali plants [46, 47] or artisanal gold mining [48]. The mercury concentrations found at Puchuncaví Valley soils don't exceed threshold levels established for soil pollution assessment, e.g. by The Netherlands (intervention value, 36 mg/kg) [49], US EPA (screening value for residential soils, 23 mg/kg) [50] or Canada (guideline value for residential soils, 6.6 mg/kg) [51].

**Table 3.** Mercury concentrations in topsoils from some rural, industrial and mercury related industrial activities around the world

Location	Activity	Mean (mg/kg)	Range (mg/kg)	Refs.
<i>Rural areas</i>				
South Carolina (USA)	Farmland	0.04	0 - 0.19	[37]
Europe	Random	0.061	0.005 - 1.35	[38]
Zhengding County (China)	Farmland	0.08	0.02-0.37	[39]
World	Background		0.01 - 0.03	[40]
<i>Industrial areas</i>				
Guangdong (China)	Petrochemical complex	0.61	0.028 - 2.4	[41]
Beijing (China)	Chemical industries	4.85	0.22 - 76.27	[42]
Gebze (Turkey)	Industrial complex	0.102	0.009 - 2.721	[43]
Shenyang (China)	Industrial complex	0.39	0.06 - 1.34	[44]
<i>Hg related industrial areas</i>				
Grenoble (France)	Chlor-alkali plant		0.05 - 10	[45]
Estarreja (Portugal)	Chlor-alkali plant		0.010 - 91	[46]
Apolobamba (Bolivia)	Small scale gold mining		0.5 - 48.6	[47]
<i>This study</i>				
Whole study area		0.408	<LOD - 3.777	
La Greda		0.795	<LOD - 3.777	
Los Maitenes		0.346	<LOD - 1.450	
Puchuncaví		0.288	<LOD - 1.410	
Valle Alegre		0.201	<LOD - 0.563	

Mercury pollution in the study area soils was further explored by using common contamination indexes: the index of geoaccumulation ( $I_{geo}$ ), the enrichment factor (EF), and the contamination factor ( $C_f$ ). The calculated indexes and corresponding contamination categories are summarized in Table 4.  $I_{geo}$  values range from heavy contamination in La Greda sampling location to moderate in Puchuncaví and Valle Alegre locations, and a moderate to heavy contamination is assigned to Los Maitenes and to the whole study area. The mercury EF values are significant in all locations. The  $C_f$  values indicate very high contamination in La Greda and Los



Maitenes, and also for the whole study area, whereas Puchuncaví and Valle Alegre are classified as moderately contaminated. Due to the potential risk of mercury pollution in the soils of Puchuncaví Valley, with potential impact to the whole ecosystem, pollution prevention and remediation measurements seem essential, especially in the areas close to the industrial facilities.

**Table 4.** Indexes of Geoaccumulation ( $I_{geo}$ ), Enrichment Factors (EF) and Contamination Factors ( $C_f$ ) for mercury in soils at the Puchuncaví Valley

Index		Sampling locations				Whole study area
		LG	LM	PU	VA	
$I_{geo}$	Value	3.30	2.06	1.70	1.06	2.03
	Contamination	Heavy	Moderate to heavy	Moderate	Moderate	Moderate to heavy
EF	Value	17.05	9.01	8.76	6.17	10.25
	Enrichment	Significant	Significant	Significant	Significant	Significant
$C_f$	Value	14.76	6.24	4.88	3.12	7.25
	Contamination	Very high	Very high	Considerable	Considerable	Very high

Assessment of non-cancer risk carried out by using the HQ parameter determines that in the whole study area there are no health effects for children and adults because of the results obtained for HQ were less than 1. HQ parameter calculated for evaluating the children exposure of Hg in La Greda (0.03) was substantially higher comparing with the other locations (0.01), in spite of the result shows also unlikely health affects in the area.

#### 4. Conclusions

Ultrasonic probe assisted extraction optimized by response surface methodology offers a fast, easy, efficient, and miniaturized sample preparation for the determination of mercury in soil samples. The combination of the probe ultrasonic extraction with ICP-MS determination results in a reliable and effective methodology for mercury monitoring in soils. The effectiveness of the proposed methodology has been demonstrated by the analysis of standard reference materials and by application to mercury pollution assessment in a long term industrial soil monitoring campaign in the Puchuncaví Valley, Chile. Intermediate to high levels of mercury contamination have been detected, indicating an ecological risk of mercury pollution in the area.

#### Acknowledgements

This work is supported by the Spanish Agency of International Cooperation for Development (AECID project A1/037813/11) and the Spanish Ministry of Science and Innovation (project CTQ2011-25388). E. Bernalte acknowledges a grant from Junta de Extremadura, Spain (PRE09107). The authors thank N. Ríos for her technical assistance with soil samples processing.

## References

- [1] W. Geng, T. Nakayima, H. Takanashi, *Journal of Hazardous Material* 154 (2008) 325-330.
- [2] A. García-Sánchez, A. Murciego, E. Álvarez-Ayuso, I. Santa Regina, M.A. Rodríguez-González, *Journal of Hazardous Material* 168 (2009) 1319-1324.
- [3] Y. Gao, Z. Shi, Z. Long, P. Wu, C. Zheng, X. Hou, *Microchemical Journal* 103 (2012) 1-4.
- [4] R. Ferrara, B. Mazzolai, E. Lanzillotta, E. Nucaro, N. Pirrone, *Science of the Total Environment* 259 (2000) 115-121.
- [5] S. Loppi, *Chemosphere* 45 (2001) 991-995.
- [6] H.R. Friedli, L.F. Radke, J.Y. Lu, C.M. Banic, W.R. Leitch, J.I. Macpherson, *Atmospheric Environment* 37 (2003) 253-267.
- [7] S. Grangeon, S. Guéron, J. Asta, G. Sarret, L. Charlet, *Ecological Indicators* 13 (2012) 178-183.
- [8] Y. Wu, S. Wang, D. Streets, J. Hao, M. Chan, J. Jiang, *Environmental Science and Technology* 40 (2006) 5312-5318.
- [9] F.M.G. Tack, T. Vanhaesebroeck, M.G. Verloo, K.V. Rompaey, E.V. Ranst, *Environmental Pollution* 134 (2005) 173-9.
- [10] G.R. Southworth, S.E. Lindberg, H. Zhang, F.R. Ansbre, *Atmospheric Environment* 38 (2004) 597-611.
- [11] E. Pereira, S.M. Rodrigues, M. Otero, M. Válega, C.B. Lopes, P. Pato, J.P. Coelho, A.I. Lillebo, M.A. Pardal, R. Rocha, A.C. Duarte, *Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008) 959-970.
- [12] A.T. Reis, S.M. Rodrigues, C.M. Davidson, E. Pereira, A.C. Duarte, *Chemosphere* 81 (2010) 1369-1377.
- [13] A. Krata and E. Bulska, *Spectrochimica Acta B* 60 (2005) 345-350.
- [14] J.L. Guzmán-Mar, L. Hinojosa-Reyes, A.M. Serra, A. Hernández-Ramírez, V. Cerdà, *Analytica Chimica Acta* 708 (2011) 11-18.
- [15] Hamta Shoaee, Mina Roshdi, Nasibeh Khanlarzadeh, Asadollah Beiraghi, *Spectrochimica Acta A* 98 (2012) 70-75.
- [16] M.R. Palomo Marín, E. Pinilla Gil, L. Calvo Blázquez, J.L. Capelo-Martínez, *Talanta* 84 (2011) 840-845.
- [17] E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil, *Analytica Chimica Acta* 689 (2011) 60-64.
- [18] E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil, *Sensor and Actuators B* 161 (2012) 669-674.
- [19] E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil, *Talanta* 97 (2012) 187-192.

- [20] T. Osawa, Y. Hatsukawa, P.W.U. Appel, H. Matsue, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B 268 (2011) 717-720.
- [21] A. Bernaus, X. Gaona, D. van Ree, M. Valiente, Analytica Chimica Acta 565 (2006) 73-80.
- [22] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, B. Albero, A.I. García-Valcárcel, Journal of Chromatography A 1217 (2010) 2415-2440.
- [23] J.J. Berzas Nevado, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, F.J. Guzmán Bernardo, M. Jiménez Moreno, Journal of Chromatography. A 1093 (2005) 21-28.
- [24] M. Lemes, F. Wang, Journal of Analytical Atomic Spectrometry 24 (2009) 663-668.
- [25] E.J. dos Santos, A.B. Herrmann, F. Vieira, Ch.S. Sato, Q.B. Corrêa, T.A. Maranhão, L. Tormen, A.J. Curtius, Microchemical Journal 96 (2010) 27-31.
- [26] I. López, S. Cuello, C. Cámara, Y. Madrid, Talanta 82 (2010) 594-599.
- [27] A. Collasiol, D. Pozebon, S.M. Maia, Analytica Chimica Acta 518 (2004) 157-164.
- [28] A. Neaman, L. Reyes, F. Trolard, G. Bourrié, S. Sauvé, Geoderma 150 (2009) 359-366.
- [29] A. Neaman, S. Huerta, S. Sauvé, Ecotoxicology and Environmental Safety 80 (2012) 386-392.
- [30] K. Loska, D. Wiechula, I. Korus, Environment International 30 (2004) 159-165.
- [31] K.H. Wedepohl, Geochimica and Cosmochimica Acta 59 (1995) 1217-1232.
- [32] U.S. EPA. Reference dose (RfD): description and use in health risk assessments, background document 1A, Integrated Risk Information System (IRIS). Washington, D.C.: United States Environmental Protection Agency; 1993.
- [33] ] M.M. Merza-Montenegro, A.J. Gandolfi, M. Ernestina Santana- Alcántar, W.T. Klmecki, A. Gómez, H. Mendivil-Quijada, M. Valencia, D. Merza-Figueroa, Science of the Total Environment 433(2012) 472-481.
- [34] I. De Gregori, M.G. Lobos, H. Pinochet, Water Research 36 (2002) 115-122.
- [35] I. De Gregori, E. Fuentes, M. Rojas, H. Pinochet, M. Potin-Gautier, Journal of Environmental Monitoring 5 (2003) 287-295.
- [36] R. Ginocchio, G. Carvalho, I. Toro, E. Bustamante, Y. Silva, N. Sepúlveda, Environmental Pollution 127 (2004) 343-352.
- [37] R. Ginocchio, Chemosphere 41 (2000) 15-23.
- [38] C.M. Aelion, H.T. Davis, S. McDermott, A.B. Lawson, Science of the Total Environment 402 (2008) 149-156.
- [39] R. Salminen, M.J. Batista, M. Bidovec, et al., 2005. Geochemical Atlas of Europe. Part 1 - Background Information, Methodology and Maps. Geological Survey of Finland, Espoo.

- [40] P. Yang, R. Mao, H. Shao, Y. Gao, *Journal of Hazardous Materials* 167 (2009) 1246-1251.
- [41] G.S. Senesi, G. Baldassarre, N. Senesi, R. Radina, *Chemosphere* 39 (1999) 343-377.
- [42] J. Li, Y. Lu, W. Yin, H. Gan, C. Zhang, X. Deng, J. Lian, *Environmental Monitoring and Assessment* 153 (2009) 365-375.
- [43] W. Luo, Y. Lu, B. Wang, X. Tong, G. Wang, Y. Shi, T. Wang, J.P. Giesy, *Environmental Monitoring and Assessment* 158 (2009) 507-517.
- [44] G. Yailali-Abanuz, *Microchemical Journal* 99 (2011) 82-92.
- [45] X. Li, L. Liu, Y. Wang, G. Luo, X. Chen, X. Yang, M.H.P. Hall, R. Guo, H. Wang, J. Cui, X. He, *Geoderma* 192 (2013) 50-58.
- [46] S. Grangeon, S. Guédron, J. Asta, G. Sarret, L. Charlet, *Ecological Indicators* 13 (2012) 178-183.
- [47] A.T. Reis, S.M. Rodrigues, C. Araújo, J.P. Coelho, E. Pereira, A.C. Duarte, *Science of the Total Environment* 407 (2009) 2689-2700.
- [48] T.A. Terán-Mita, A. Faz, F. Salvador, J.M. Arocena, J.A. Acosta, *Environmental Pollution* 173 (2013) 103-109.
- [49] Rijkswaterstaat Leefomgeving, *Soil Remediation Circular*, 2009.
- [50] US EPA, *Regional Screening Level (RSL) for chemical contaminants, Summary Table November 2012*.
- [51] Canadian Council of Ministers of the Environment, *Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health, update 7.0, 2007*.

### 3.7. Artículo VII.

CHARACTERISATION OF SCREEN-PRINTED GOLD AND GOLD NANO-PARTICLES-MODIFIED CARBON SENSORS BY ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY

---

---



# CHARACTERISATION OF SCREEN-PRINTED GOLD AND GOLD NANOPARTICLES-MODIFIED CARBON SENSORS BY ELECTROCHEMICAL IMPEDANCE SPECTROSCOPY

*Paper in preparation*

Elena Bernalte<sup>1</sup>, Carmen Marín-Sánchez<sup>1</sup>,  
Eduardo Pinilla-Gil<sup>1</sup>, Christopher M.A Brett<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Química Analítica  
Universidad de Extremadura, Avda. de Elvas, s/n, E-06006 Badajoz, Spain*

<sup>2</sup>*Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia  
Universidade de Coimbra, 3004-535 Coimbra, Portugal*

## **Abstract**

Gold-based screen-printed electrodes have been characterised by electrochemical impedance spectroscopy (EIS) to better understanding of their behaviour in the electroanalytical applications, particularly in anodic stripping voltammetry of Hg(II). After a first exploration by cyclic voltammetry, impedance spectra of screen-printed sensors were recorded in 0.1 M HCl electrolyte solution with the presence of dissolved oxygen, and with no electrochemical pretreatment of the surface. Fitting of spectra by using the equivalent circuits demonstrated the differences in the interfacial characteristics of each sensor. Structural changes in the surface of SPGE caused by the amalgam formation in the presence of Hg(II) have been investigated by EIS. The results obtained have been used to elucidate the implications for using the sensor in the stripping voltammetric determination of Hg(II) in environmental samples.

**Keywords:** *Gold-based screen-printed electrodes; EIS; Hg*





## 1. Introduction

In the field of electroanalysis, the increasing availability of low-price homemade and commercial screen-printed electrochemical platforms has opened new exciting opportunities to apply electrochemical techniques outside a centralised laboratory [1-3]. Miniaturisation is today an unquestionable trend of Analytical Chemistry [4]. In this context, the great utility and versatility presented by screen-printed electrodes (SPEs) lies in the wide range of ways in which the disposable strips may be employed [5].

Despite the great practical use of SPEs, little is known about the nature of electrode reactions at their complex surface [6]. Since differences in the composition of commercial printing inks, the pre-treatment procedures and the temperature conditions during the curing of the printing layer can affect their electrochemical behaviour, several studies have been performed with the aim of their characterisation [4, 6-8]. In these papers, cyclic voltammetry (CV) and scanning electron microscopy (SEM) techniques have been used for this purpose. However, changes in the interfacial region of sensing electrodes which may not be seen by CV or by pulse techniques, such as square wave voltammetry, are seen by electrochemical impedance spectroscopy (EIS), owing to the wide range of timescales which is probed [9]. Thus, EIS can represent a powerful tool in the electrochemical scope [10-14].

In previous works, we have successfully demonstrated the applicability of screen printed gold electrodes (SPGE) and gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrodes (GNP) for monitoring Hg(II) in different environmental samples [2, 15-17]. As properly described, gold is the best electrode material used for the electroanalytical determination of mercury but it presents an important drawback that is the well-known phenomenon of structural changes of their surface, caused by amalgam formation with mercury [15].

Therefore, the first purpose of the present work was to characterise by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy, three types of commercial screen-printed electrodes: high and low temperature cured screen-printed gold electrodes (SPGE-AT, SPGE-BT) and gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes (GNP). Also, the characterisation of the surface of SPGE-AT were also characterised by EIS in presence of Hg(II) to evaluate the influence of the amalgam formation. Finally, the observation and characterisation of the gold working electrodes surfaces were carried out also by scanning electron microscopy (SEM).

## 2. Experimental

### 2.1. Reagents and solutions

All stock and standard solutions were made from analytical grade reagents. 10 mg/L stock solution of Hg(II) was supplied by PerkinElmer (Spain) and working solutions were prepared before measurements by dilution with ultrapure water (resistivity > 18.2 M $\Omega$ ·cm at 25 °C) obtained from an Ultramatic system (Wasserlab, Spain). The supporting electrolyte was 0.1 M HCl (Panreac, Spain) that was demonstrated suitable for ASV measurements of mercury [2, 15-17].

Glassware and electrochemical cell was thoroughly conditioned by cleaning with hot nitric acid (10%), rinsing with ultrapure water, drying, and keeping in hermetic plastic bags before use.

Experiments were conducted at room temperature ( $25 \pm 1$  °C) without deoxygenation.

## 2.2. Electrodes and electrochemical cell

Screen-printed electrodes (models DRP-110, 220AT, 220BT, and 110GNP) were purchased from DropSens (Oviedo, Spain). They were designed in a three electrode configuration constructed on the same ceramic platform. They were received in a plastic box with 70 units perfectly isolated from the outside. Working electrodes ( $A_{\text{geom}} = 0.126 \text{ cm}^2$ ) were composed of carbon, high and low temperature curing gold inks, and gold nanoparticles-on-carbon, respectively. Ink formulation and production characteristics of commercial SPEs are regarded by the manufacturers as proprietary information. In all of them counter and pseudo-reference printed electrodes were made of carbon or gold, and silver, respectively. An insulating layer served to delimit the working area and silver electric contacts, and a specific connector allowed the direct connection of the electrochemical strips to the potentiostat. A methacrylate voltammetric cell (DropSens, Spain) was used to perform voltammetric and EIS measurements. It is especially suitable for SPEs and is designed to perform batch analysis with volume of solution between 5 to 10 mL, allowing optional stirring by means of a magnetic stirrer. The screen-printed strips were immersed in the solution through a cut on the top lid and were placed in parallel direction to the sides of the cell, leaving the electrical connections outside.

## 2.3. Instrumentation and methods

Voltammetric experiments were performed on a computerized hand-held, battery-powered PalmSens potentiostat/galvanostat (Palm Instruments BV, The Netherlands) interfaced with a laptop and controlled by the PalmSens PC software (PS Trace 2.5.2.0). For square-wave anodic stripping voltammetry (SWASV) the conditioning potential was +0.7 V for 15 s, deposition potential +0.2 V for 60 s, amplitude 40 mV, step potential 6 mV, frequency 20 Hz, equilibration time 10 s, and stirring rate 600 rpm [15].

Electrochemical impedance spectra were recorded using a CH Instruments 660D equipment controlled by the software provided by the supplier (CH Instruments, Inc., USA) and a Solartron 1250 Frequency Response Analyser coupled to a Solartron 1286 Electrochemical Interface (Solartron Analytical, UK), controlled by ZPlot software. The frequency range from 65 kHz to 0.1 Hz was scanned logarithmically with an applied sinusoidal perturbation of 10 mV rms amplitude in 12 steps per frequency decade, superimposed on the chosen applied potential. Data fitting to equivalent circuits was performed also with CHI analyzer program and ZView software, respectively. Four replicates per potential applied were done to ensure the reproducibility of the responses.

SEM images of the working electrode surfaces were obtained by using a Hitachi FE-SEM S-4800II field emission scanning electron microscope (Tokyo, Japan). A K-alpha X-ray photoelectron spectrometer (XPS) system (Thermo Scientific, USA) was used to obtain the X ray spectra of the SPEs.

### **3. Results and discussion**

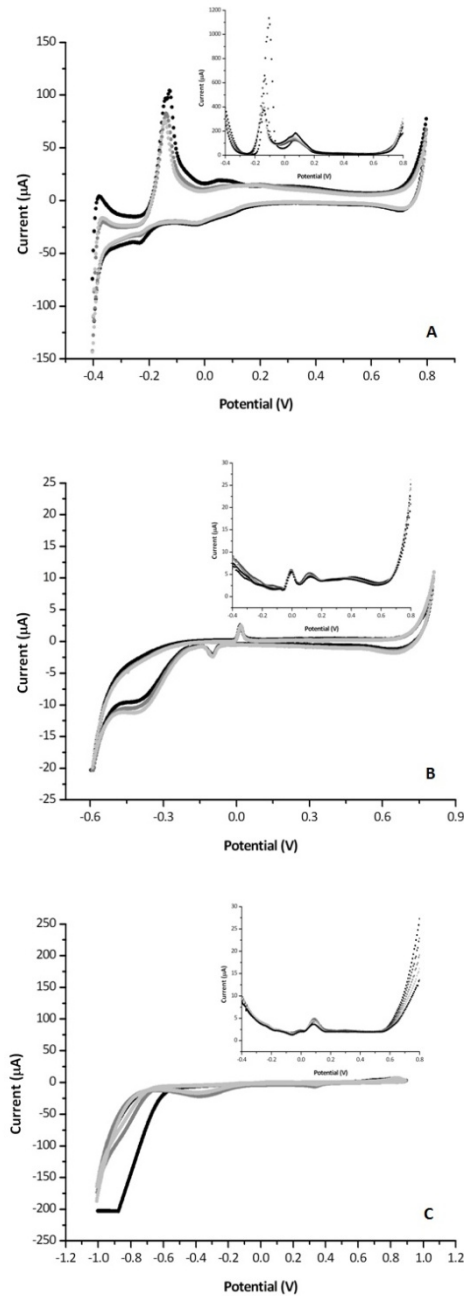
The electrochemical characterisation of the high and low temperature cured screen-printed gold electrodes (SPGE-AT, SPGE-BT) and gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes (GNP) were done by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The observation and characterisation of the working electrodes surfaces were carried out by scanning electron microscopy (SEM) that provided morphological and microstructural information. The principal results will be discussed below.

#### **3.1. Electrochemical characterisation of the SPEs**

##### **3.1.1. Cyclic voltammetry**

The behaviour of bare screen-printed electrodes was firstly investigated by cyclic voltammetry (CV) in order to examine their potential window and the magnitude of the background currents. The information obtained was also used to establish the potentials applied in the subsequent impedance experiments, considering the demonstrated applicability of gold-based SPEs for the SWASV determination of mercury [2, 15].

Cyclic voltammograms were recorded in 0.1 M chloride acid solution and no pretreatment of the surface of working electrodes were carried out before. As expected, changes in the potential windows were significant between SPEs (Figure 1). A wide potential window was observed in this order: GNP (1.9 V)>SPGE-BT (1.4 V)>SPGE-AT (1.2 V) that is attributed to the metal modifications of the electrode surface and therefore it is related to the higher percentage of carbon presents in the composition of the surface of working electrodes (GNP (69.9 %C)>SPGE-BT (68.04 %C)>SPGE-AT (27.5 %C)), as studied by XPS. In all SPEs, the positive potential limit remains stable around 0.8 V but the negative potential shifts to more positive potentials when increases the percentage of gold in the printing ink composition of the working electrode. Additionally, the background current was significantly higher for SPGE-AT.



**Figure 1.** Cyclic voltammograms in 0.1 M HCl at A) SPGE-AT, B) SPGE-BT, and C) GNP. Scan rate  $100 \text{ mVs}^{-1}$ . Inset square-wave anodic stripping voltammograms of blanks samples (0.1 M HCl). SWASV conditions: frequency 20 Hz, step potential 6 mV, amplitude 40 mV, deposition potential +0.2 V and deposition time 60 s.

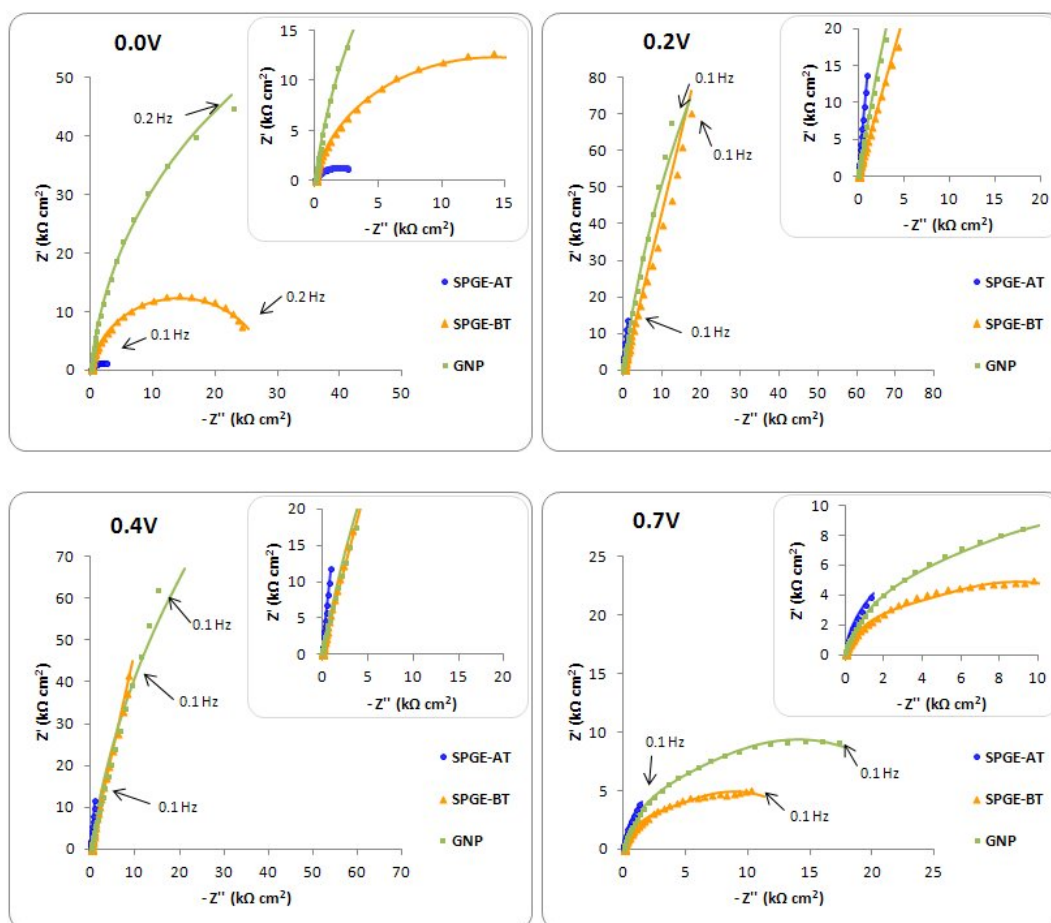
As shown in Figure 1, cyclic voltammograms of GNP remind to typical behaviour of carbon electrodes. However, voltammograms of SPGE-BT and SPGE-AT show unusual quantifiable peaks around 0.0 V, maybe attributed to interference species that could be part of the gold ink formulation. So, square wave anodic stripping voltammograms of 0.1 M HCl blank samples were recorded and the results are also shown in Figure 1. As can be observed, the same peak appeared at 0.1 V in the three SPEs. In the voltammogram of GNP other significant signal at 0.0 V was detected, with lower current for SPGE-BT, probably due to oxidative process of the carbon-based film. However, a very high signal was measured in SPGE-AT at -0.1 V that could be

attributed, at first, to the presence of an unknown analyte involved in the manufacturing of SPGE. Also, only anodic potentials can be sweep using screen printed gold electrodes because irreversible changes were produced on the surface of the working electrode, as reported [15].

Finally, based on these considerations the applied potential for recording impedance spectra were 0.0 V (initial potential without interference signals), 0.2 V (deposition potential for Hg by SWASV), 0.4 V (stripping potential for Hg by SWASV) and 0.7 V (final potential).

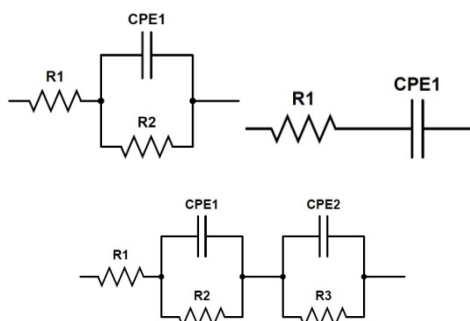
### **3.1.2. Electrochemical impedance spectroscopy**

For EIS experiments, solutions were no deoxygenated in order to be closer to the situation in the electroanalytical experiments focused on Hg determination. Experimental and simulated complex plane plots obtained for the bare SPGE-AT, SPGE-BT, and GNP are shown in Figure 2. The low relative errors assigned to each parameter indicate that a good fits were obtained. As seen in Figure 2, the shape of impedance spectra depends on the applied potential. So, the lineal response of impedance spectra at 0.2 V and 0.4 V indicates a predominance of the capacitive component in contrast to the semicircular complex plane plots obtained at 0.0 V and 0.7 V that means the resistive component dominates the behaviour of gold-based SPEs. Therefore, the differences between the SPEs are more clearly observed in the complex plane plots obtained at 0.0 V and 0.7 V.



**Figure 2.** Complex plane impedance plots at 0.0, 0.2, 0.4, and 0.7 V (vs. pseudo Ag/AgCl) for SPGE-AT, SPGE-BT, and GNP in 0.1 M HCl. Inset plots: “High” frequency complex plane plots (meaning of the symbols as in the order spectra and lines represent fitting to the equivalent circuit described).

Fitting of spectra was done using an equivalent electrical circuit which comprised the three configurations showed in Figure 3.  $R_1$  represents the cell resistance,  $R_2$  and  $R_3$ , represent the charge transfer resistances, and  $CPE_1$  and  $CPE_2$  are the constant phase elements assumed to be a non-ideal capacitors of capacity  $C_{1-2}$  with a roughness factor  $\alpha$ , varying from 0.5 to 1, where an  $\alpha$  value of 1 represents a perfectly smooth surface [11]. The CPEs were necessary due to the depressed semi-circle character of the responses. The results obtained are shown in Table 1.



**Figure 3.** Equivalent circuits for fitting impedance spectra at different applied potentials

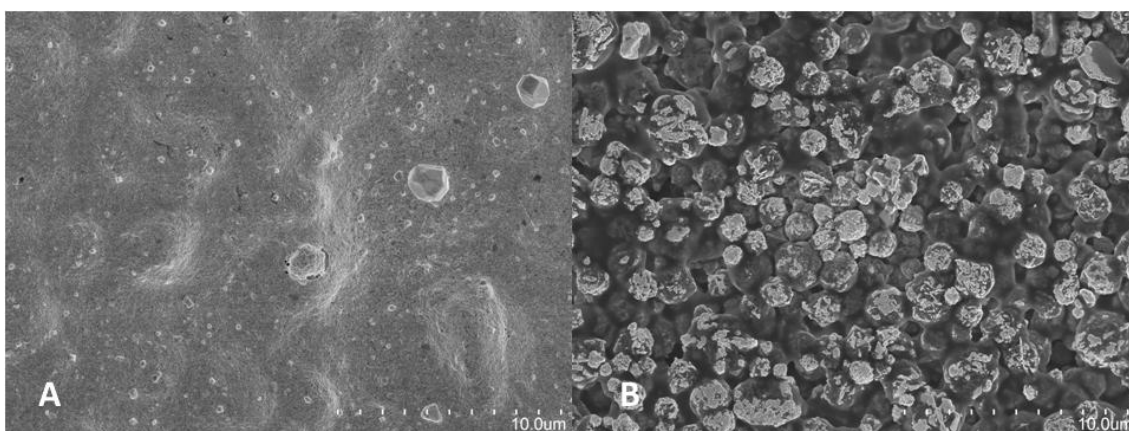
**Table 1.** Data obtained from analysis of the impedance spectra for SPGE-AT, SPGE-BT, and GNP in 0.1 M HCl and in the absence of oxygen

Electrode	E (V) (vs. pseudoAg/AgCl)	R <sub>1</sub> (Ω cm <sup>2</sup> )	CPE <sub>1</sub> (μS cm <sup>-2</sup> s <sup>α</sup> )	α <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> (kΩ cm <sup>2</sup> )	CPE <sub>2</sub> (μS cm <sup>-2</sup> s <sup>α</sup> )	α <sub>2</sub>	R <sub>3</sub> (kΩ cm <sup>2</sup> )
SPGE-AT	0.0	2.8	1032.9	0.8428	4.1	210.9	0.8931	1.93
	0.2	2.9	118.2	0.9541				
	0.4	2.9	136.3	0.9481				
	0.7	2.7	343.4	0.9571	16.4	4133.3	0.7130	0.002
SPGE-BT	0.0	3.0	12.58	0.9130	22.3			
	0.2	2.9	18.41	0.8627				
	0.4	3.3	32.94	0.8683				
	0.7	3.0	30.32	0.8720	4.0	91.01	0.8686	10.73
GNP	0.0	55.8	23.72	0.9022	140.3			
	0.2	56.6	19.81	0.9252	678.0			
	0.4	56.5	19.63	0.9186	439.5			
	0.7	55.8	43.45	0.9165	26.4	34.83	0.9529	5.44

Similar values of the cell resistance,  $R_1$ , were observed for SPGE-AT and SPGE-BT at all applied potentials, in contrast to the higher values obtained for GNP that demonstrated a noticeable influence of the electrolyte medium (0.1 M HCl). As seen in Table 1, the values of the charge transfer resistance,  $R_2$ , were also significantly higher for GNP in comparison with the other SPGEs. Because of the immobilisation of gold nanoparticles on the surface of screen-printed carbon electrode, the charge transfer resistance ( $R_2$ ) increased by a factor of a hundred, and the capacitance ( $CPE_1$ ) decreased. The increase in  $R_2$  can indicate a partially blocked surface with gold nanoparticles adsorbed, which hinder the electron transfer between the electroactive species present in the solution and the SPE surface. This observation is similar to the behaviour of the protein-modified electrodes described in the literature (Moulton et al., 2004; Ferreira et al., 2009) since access of the redox species to the electrodes is impeded by the SAM, increasing the value of the cell resistance. On the other hand, the effects of the modification of the SPE surface with gold nanoparticles can be explained from the equivalent circuit are adjusted to GNP data at 0.7 V. Therefore, a cell resistance in series with two parallel RCPE, demonstrates the existence of a double layer on the surface of SPE corresponding with the gold nanoparticles deposited on carbon-based electrode (Table 1).

Also, the equivalent circuit that explains the behaviour of SPGE-AT at 0.0 V consists of a cell resistance in series with two parallel RCPE. A priori, this fitting is unexpected for solid gold screen-printed electrodes. However, in agree with the results obtained from the cyclic voltammetry and anodic stripping voltammetry, this behaviour of SPGE-AT could be due to the presence of some interference involved in the printing ink manufacturing process that is regarded as proprietary information.

The values of  $\alpha$  obtained for SPGE-AT and GNP were around 0.9, suggesting that the current distribution on the electrode surface is not very different to that for an ideal capacitor. On the other hand, the lower values of factor  $\alpha$  were obtained for SPGE-BT probably because of the curing process of gold at low temperature influences the structural characteristics of the electrode. In the Figure 4 are shown the SEM images obtained for SPGE-AT and SPGE-BT for comparing the differences in the structure of the gold working electrode caused by the curing ink process. As seen, the microscopic images of SPGE-BT show a clear roughness aspect that can explain the results obtained from the impedance experiments.



**Figure 4.** SEM images obtained for SPGE-AT (A) and SPGE-BT (B)

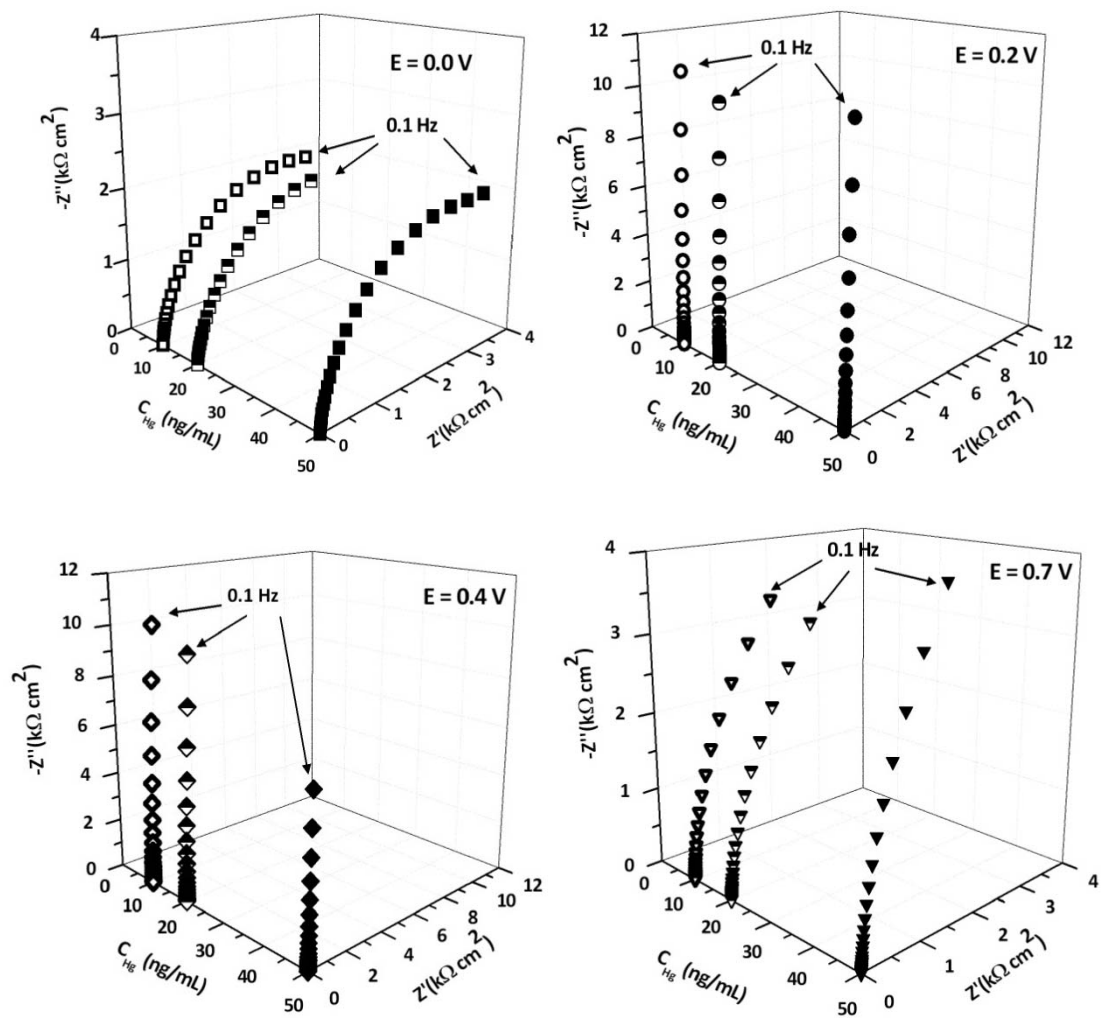


### 3.2. Impedance in the presence of Hg(II)

As widely described in the literature, the principal inconvenient of the electrochemical determination of Hg(II) by using gold solid electrodes is the well-known structural change of the surface due to the amalgam formation with mercury. Consequently, after stripping voltammetric determination of this analyte, the memory effect caused by amalgamation brings to hard electrochemical cleaning to get back the low background currents in blank samples. Therefore, electrochemical impedance spectroscopy was used as a tool to elucidate the reversible or irreversible alterations in SPGE-AT behaviour after the application of SWASV in the presence of Hg(II).

The experiments were performed as follows: 10 repetitions of SWASV method, without cleaning step from one another, in the presence of 10, 20, and 50 ng/mL of Hg(II) were carried out successively. After that, EIS experiments (4 replicates) were done at 0.0 V, 0.2 V, 0.4 V, and 0.7 V, and impedance spectra were recorded in 0.1 M HCl.

Spectra obtained are shown in Figure 5 and the analysis of the results is given in Table 2 using a Randles circuit consist of a cell resistance in series with a parallel RCPE. In a general point of view, no significant changes in the impedance values were observed after SWASV of Hg(II) on SPGE (compare Tables 1 and 2). It suggests that the amalgamation of Hg with the gold working electrode doesn't caused important structural disorders in the surface of SPGE. However, some alterations carried out in the presence of metal ion, because of the equivalent circuit obtained has just one RCPE in series, in contrast to the 2 parallel RCPEs that described the fitting of data without mercury. On the other hand, an increase of charge transfer resistance and a decrease of CPE were observed for 50 ng/mL of Hg in comparison with other concentrations. Despite of irreversible changes doesn't take place in the surface of SPGE in the presence of Hg, is remarkably that high concentration of this analyte can modify the surface of the electrode since access to the electrode is partially blocked by the amalgam of Hg with gold, as shown in Table 2. This observations suggests also that excessive metal deposition may lead to wear down the gold surface and loss of accurately and reproducibility of the responses.



**Figure 5.** Complex plane impedance plots at 0.0, 0.2, 0.4, and 0.7 V (vs. pseudo Ag/AgCl) for SPGE-AT in 0.1 M HCl after SW measurements in the presence of 10, 20, and 50 n/mL Hg(II)

**Table 2.** Data obtained from analysis of the impedance spectra for SPGE-AT in 0.1 M after SW measurements in the presence of 10, 20, and 50 ng/mL of Hg(II)

[Hg] (ng/mL)	E (V) (vs. pseudo- Ag/AgCl)	R <sub>1</sub> (Ω cm <sup>2</sup> )	CPE <sub>1</sub> (μS cm <sup>-2</sup> s <sup>α</sup> )	α <sub>1</sub>	R <sub>2</sub> (kΩ cm <sup>2</sup> )
10	0.0	2.58	167.5	0.93	4.4
	0.2	2.59	145.2	0.98	
	0.4	2.57	152.4	0.98	
	0.7	2.53	369.8	0.97	10.6
20	0.0	2.48	232.5	0.92	4.3
	0.2	2.53	157.1	0.98	
	0.4	2.51	164.3	0.98	
	0.7	2.48	384.9	0.97	9.1
50	0.0	2.62	169.8	0.94	4.4
	0.2	2.63	147.6	0.98	
	0.4	2.62	156.3	0.98	
	0.7	2.59	337.3	0.97	13.8

#### 4. Conclusions

Screen-printed electrodes based on gold cured at high and low temperature and carbon-modified with gold nanoparticles, used for stripping voltammetry of Hg(II), were characterised by EIS. Cyclic voltammetry were successfully applied for establishing the optimal potential windows for performing EIS experiments.

EIS data show evidence of the differences in the behaviour of the screen-printed sensors at different potentials monitored. GNP shows an increase in magnitude of charge transfer resistance and a decrease of capacitance indicating a partially block of the surface with gold nanoparticles which hinder the electron transfer. Unexpected EIS results, in agree with the observations from CV, were obtained for SPGE-AT that can be related to the manufacturing process of printing ink.

No significant changes to the surface of SPGE-AT caused by Hg(II) deposition by SWASV were demonstrated by EIS. Also, the disorder observed in the surface of the electrode by deposition of a high concentration of Hg(II) were explained by EIS.

This approach based on the application of impedance spectroscopy is very useful for studying the behaviour and the properties of the gold-based screen-printed electrodes employed for *in situ* monitoring of mercury in the environment.

## Acknowledgements

This work is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (project CTQ2011-25388). The authors thank to technical and human support provided by Facility of Analysis and Characterization of Solids and Surfaces of SAIUEx (financed by UEx, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER and FSE) for their assistance to work with SEM and XPS. E. Bernalte acknowledges a grant from Junta de Extremadura, Spain (PRE09107).

## References

- [1] J. P. Metters, R. O. Kadara, C. E. Banks. New directions in screen printed electroanalytical sensors: an overview of recent developments. *Analyst* 136 (2011) 1067-1076.
- [2] E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil. Gold nanoparticles-modified screen-printed carbon electrodes for anodic stripping voltammetric determination of mercury in ambient water samples. *Sensors and Actuators B: Chemical* 161 (2012) 669– 674.
- [3] M. Li, Y-T. Li, D-W. Li, Y-T. Long. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays-A review. *Analytica Chimica Acta* 734 (2012) 31-44.
- [4] R. García-González, M. T. Fernández-Abedul, A. Pernía, A. Costa-García. Electrochemical characterization of different screen-printed gold electrodes. *Electrochimica Acta* 53 (2008) 3242-3249.
- [5] O. Domínguez-Renedo, M. A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez. Recent developments in the Field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta* 73 (2007) 202-219.
- [6] P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, P. J. Lamas-Ardisana, A. Martín-Pernía, A. Costa-García. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Electrochimica Acta* 53 (2008) 3635-3642.
- [7] R. O. Kadara, N. Jenkinson, C. E. Banks. Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms. *Sensors and Actuators B: Chemical* 138 (2009) 556-562.
- [8] R. O. Kadara, N. Jenkinson, C. E. Banks. Characterization and fabrication of disposable screen printed microelectrodes. *Electrochemistry Communications* 11 (2009) 1377-1380.
- [9] C. M. A. Brett. Electrochemical impedance spectroscopy for characterization of electrochemical sensors and biosensors. 213th ECS Meeting, Abstract #904, Arizona (2008).
- [10] C. Gouveia-Caridade, C. M. A. Brett. Electrochemical impedance characterization of nafion-coated carbon film resistor electrodes for electroanalysis. *Electroanalysis* 17 (2005) 549-555.
- [11] C. Gouveia-Caridade, C. M. A. Brett. The influence of Triton-X-100 surfactant on the electroanalysis of lead and cadmium at carbon film electrodes-An electrochemical impedance study. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 592 (2006) 113-120.

- [12] A. P. P. Ferreira, C. S. Fugivara, S. Barrozo, P. H. Suegama, H. Yamanaka, A. V. Benedetti. Electrochemical and spectroscopic characterization of screen-printed gold-based electrodes modified with self-assembled monolayers and Tc85 protein. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 634 (2009) 111-122.
- [13] A. Bonanni, M. Pumera, Y. Miyahara. Influence of gold nanoparticles size (2-50 nm) upon its electrochemical behavior: an electrochemical impedance spectroscopic and voltammetric study. *Physical Chemistry Chemical Physics* 13 (2011) 4980-4986.
- [14] A. Mandil, R. Pauliukaite, A. Amine, C. M. A. Brett. Electrochemical characterization of and stripping voltammetry at screen-printed electrodes modified with different brands of multiwall carbon nanotubes and bismuth films. *Analytical Letters* 45 (2012) 395-407.
- [15] E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil. Determination of mercury in ambient water samples by anodic stripping voltammetry on screen-printed gold electrodes. *Analytica Chimica Acta* 689 (2011) 60–64.
- [16] E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil. Determination of mercury in indoor dust samples by ultrasonic probe microextraction and stripping voltammetry on gold nanoparticles-modified screen-printed electrodes. *Talanta* 97 (2012) 187–192.
- [17] E. Bernalte, C. Marín Sánchez, E. Pinilla Gil. High-throughput mercury monitoring in indoor dust microsamples by bath ultrasonic extraction and anodic stripping voltammetry on gold nanoparticles-modified screen-printed electrodes. *Electroanalysis* 25 (2013) 289-294.
- [18] S. E. Moulton, J. N. Barisci, A. Bath, R. Stella, G.G. Wallace. Studies of double layer capacitance and electron transfer at a gold electrode exposed to protein solutions. *Electrochimica Acta* 49 (2004) 4223-4230.



## Capítulo 4. Conclusiones

---





Del presente trabajo se obtienen las siguientes conclusiones:

- 1.** Se ha optimizado y validado una metodología analítica basada en la extracción a reflujo con tolueno y análisis por GC-MS/MS, para la determinación de los 16 PAH propuestos por la EPA, en muestras de material en suspensión atmosférico. Se han obtenido buenos límites de detección, suficientes para la cuantificación de los PAH a muy bajas concentraciones.
- 2.** La metodología se ha aplicado a muestras de PM<sub>10</sub> recogidas en zonas urbanas y rurales de Extremadura con bajo índice de contaminación, para llevar a cabo una primera evaluación del perfil de estos contaminantes en el aire de la región. Se ha encontrado una influencia espacial y los resultados han puesto de manifiesto una mayor contaminación en las zonas urbanas que en las rurales. La ciudad de Badajoz es la que presenta mayores niveles de estos analitos.
- 3.** En concordancia con lo descrito en la bibliografía, se ha observado una clara estacionalidad de la concentración de PAH en el aire ambiente, siendo los valores más elevados los correspondientes a las estaciones más frías, hecho que concuerda con las buenas correlaciones negativas obtenidas con parámetros tales como la temperatura y la radiación solar. En consecuencia, se ha observado también una correlación negativa directa con el O<sub>3</sub> y una correlación positiva con otros contaminantes atmosféricos como NO<sub>2</sub> y PM<sub>10</sub>.
- 4.** Se ha llevado a cabo la asignación de fuentes de emisión de los PAH a la atmósfera utilizando como herramienta las ratios de diagnóstico descritas en la bibliografía. Se ha determinado que, tanto en las áreas urbanas como en las rurales, el tráfico rodado es la fuente de emisión de PAH más importante, encontrándose también una contribución significativa de la quema de biomasa en las áreas rurales muestreadas.
- 5.** Se ha desarrollado un método electroanalítico para la determinación de Hg(II) mediante SWASV sobre electrodos impresos de oro. Se ha demostrado la necesidad de activación de los electrodos antes de su utilización mediante la aplicación de CV y utilizando como electrolito soporte HCl 0.1 M. El número de ciclos y el potencial aplicado han demostrado ser parámetros importantes en el proceso de acondicionamiento del electrodo. Por otro lado, se han observado cambios determinantes en la superficie de los electrodos impresos de oro cuando se aplican potenciales de deposición inferiores a -0.1 V y se ha demostrado la ausencia de respuesta lineal del electrodo a partir de un tiempo de deposición de 60 s, debido a la saturación del electrodo impreso cuyas propiedades son información del fabricante. Se ha obtenido un buen valor del límite de detección (1.1 ng/mL), comparable con los descritos en la bibliografía.
- 6.** Se ha demostrado la utilidad de la combinación de dichos electrodos con un nuevo diseño de celda electroquímica para la monitorización de Hg(II) en muestras de agua de lluvia y agua residual, sin necesidad de llevar a cabo pretratamiento de las muestras. La eficacia del método se ha contrastado mediante el análisis de materiales de referencia certificados y mediante el análisis comparativo de las muestras reales con ICP-MS.
- 7.** Se ha desarrollado un nuevo método electroanalítico para la determinación de Hg(II) mediante SWASV, utilizando electrodos impresos de carbono modificados con nanopartículas de oro. Se ha demostrado que para estos electrodos no es necesaria ninguna etapa previa de activación y que, para asegurar la estabilidad de las nanopartículas de oro en el electrodo, es

imprescindible llevar a cabo los experimentos sin agitación. A diferencia de lo observado con los electrodos impresos de oro, no se han detectado cambios superficiales cuando se aplican potenciales inferiores a  $-0.1$  V, pero sí la aparición de una señal intensa que interfiere en la cuantificación del Hg. Como era predecible por la propia naturaleza del electrodo, se ha conseguido un valor del límite de detección más bajo ( $0.8$  ng/mL) que el del método mencionado en la conclusión 5.

**8.** Este método se ha aplicado con éxito para el análisis de Hg(II) en muestras de aguas ambientales (lluvia y río) que no fueron sometidas a ningún tratamiento previo. El contraste con materiales de referencia certificados y la utilización de la técnica ICP-MS, demostró el potencial y la idoneidad de este método para la determinación de bajas concentraciones de Hg en matrices ambientales acuosas.

**9.** Se ha diseñado una nueva metodología de pretratamiento de polvo atmosférico recogido en ambientes interiores, basado en el empleo del baño de ultrasonidos para la extracción sencilla y eficaz de Hg(II). Se ha acoplado con éxito a la detección mediante SWASV utilizando electrodos impresos de oro modificados con nanopartículas de oro, obteniéndose buena concordancia con los valores contrastados por ICP-MS para las muestras reales. Los resultados obtenidos del análisis del material de referencia certificado, han demostrado la validez y utilidad de este método.

**10.** Se ha desarrollado una novedosa metodología de pretratamiento asistida por sonda de ultrasonidos para la extracción rápida y cuantitativa de Hg(II) presente en muestras de polvo en suspensión de interiores. Las variables instrumentales involucradas en el proceso de extracción fueron optimizadas mediante un diseño de experimentos, al cual se le aplicó la metodología de la superficie de respuesta. La validez del método se ha verificado a partir de los buenos porcentajes de recuperación obtenidos de su aplicación para la extracción de Hg del material de referencia certificado.

**11.** Se ha llevado a cabo el acoplamiento de la metodología basada en la extracción con sonda de ultrasonidos y la detección mediante SWASV, utilizando electrodos serigrafados de carbono modificados con nanopartículas de oro, y se ha demostrado su eficacia contrastando las concentraciones de Hg(II) obtenidas por voltamperometría con las determinadas paralelamente por ICP-MS, tanto para el material de referencia certificado como para las muestras reales.

**12.** Se ha demostrado que la combinación de la extracción con sonda de ultrasonidos y la determinación por ICP-MS es una metodología fiable y eficaz para la monitorización de Hg(II) en suelos, lo que se ha justificado a partir de los resultados obtenidos para el material de referencia certificado.

**13.** La metodología descrita en la conclusión 12 se ha aplicado con éxito en la evaluación de la contaminación por Hg en suelos del área industrial de Puchuncaví (Chile), durante una dilatada campaña de vigilancia de 5 años consecutivos de duración. Se ha estudiado la variabilidad espacial y temporal del mercurio monitorizado en dichos suelos, utilizando la clasificación ascendente jerárquica o cluster.

**14.** Se han seleccionado y evaluado diferentes índices de evaluación de la contaminación por mercurio de los suelos muestreados ( $I_{geo}$ , EF,  $C_f$ ), y de los resultados obtenidos se ha deducido que existe riesgo de contaminación del área industrial por mercurio, siendo La Greda la zona más impactada, muy probablemente debido a su proximidad al complejo industrial y a la influencia de los vientos dominantes. Asimismo, se ha evaluado el riesgo humano (adultos y niños) por exposición al suelo contaminado por mercurio y el parámetro HQ ha determinado que no existe riesgo alguno para ninguna de las poblaciones.

**15.** Se ha llevado a cabo la caracterización de los electrodos impresos de oro y de carbono modificados con nanopartículas de oro descritos en las conclusiones 5, 7, 9 y 11, mediante la aplicación de la espectroscopia de impedancia electroquímica. Las experiencias se han llevado en HCl 0.1 M y se han monitorizado los potenciales 0.0, 0.2, 0.4 y 0.7 V, observando concordancias con los resultados previamente obtenidos por voltamperometría cíclica (CV).

**16.** Se ha estudiado el cambio en la superficie de los electrodos impresos de oro como consecuencia de la formación de amalgama involucrada en la determinación de Hg(II), mediante la aplicación de EIS, después de la acumulación y redisolución de diferentes concentraciones de este analito, utilizando el método voltamperométrico descrito en la conclusión 5. Se ha demostrado que la formación de amalgama no implica unos cambios superficiales significativos en la superficie de los electrodos impresos, aunque se han detectado cambios apreciables cuando se depositan concentraciones elevadas (50 ng/mL).



## Capítulo 5. Bibliografía

---



- Abollino, O., Giacomino, A., Malandrino, M., Piscioneri, S., Mentasti, E., (2008). Determination of mercury by anodic stripping voltammetry with a gold nanoparticle-modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis* 20, 75-83.
- Abollino, O., Giacomino, A., Malandrino, M., Marro, S., Mentasti, E., (2009). Voltammetric determination of methylmercury and inorganic mercury with a homemade gold nanoparticles electrode. *Journal of Applied Electrochemistry* 39, 2209-2216.
- Abollino, O., Giacomino, A., Ginepro, M., Malandrino, M., Zelano, I., (2010). Analytical applications of a nanoparticles-based sensor for the determination of mercury. *Electroanalysis* 22, 1-8.
- Adriano, D. C., (2001). *Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals* (2<sup>nd</sup> Edition). Ed. Springer-Verlag, EE.UU.
- Afkhami, A., Madrakian, T., Sabounchei, S. J., Rezaei, M., Samiee, S., Pourshahbaz, M., (2012a). Construction of a modified carbon paste electrode for the highly selective simultaneous electrochemical determination of trace amounts of mercury(II) and cadmium(II). *Sensors and Actuators B: Chemical* 161, 542-548.
- Afkhami, A., Bagheri, H., Khoshsafar, H., Saber-Tehrani, M., Tabatabaee, M., Shirzadmehr, A., (2012b). Simultaneous trace-levels determination of Hg(II) and Pb(II) ions in various samples using a modified carbon paste electrode based on multi-walled carbon nanotubes and a new synthesized Schiff base. *Analytica Chimica Acta* 746, 98-106.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (1995). *Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons*. U.S. Department of health and human services. Public health service, Atlanta.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (1999). *Toxicological profile for mercury*. U.S. Department of health and human services. Public health service, Atlanta.
- Air Quality Guidelines for Europe (2000). WHO Regional Publications, European Series, No 91.
- Arduini, F., Majorani, C., Amine, A., Moscone, D., Palleschi, G., (2011). Hg<sup>2+</sup> detection by measuring thiol groups with a highly sensitive screen-printed electrode modified with a nanostructured carbon black film. *Electrochimica Acta* 56, 4209-4215.
- Alizadeh, T., Ganjali, M. R., Zare, M., (2011). Application of an Hg<sup>2+</sup> selective imprinted polymer as a new modifying agent for the preparation of a novel highly selective and sensitive electrochemical sensor for the determination of ultratrace mercury ions. *Analytica Chimica Acta* 689, 52-59.
- Alves, G. M. S., Magalhães, J. M. C. S., Salaün, S., van den Berg, C. M. G., Soares, H. M. V. M., (2011). Simultaneous electrochemical determination of arsenic, copper, lead and mercury in unpolluted fresh waters using a vibrating gold microwire electrode. *Analytica Chimica Acta* 703, 1-7.

- Anastas, P. T., Warner, J. C., (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York.
- Augelli, M. A., Munoz, R. A. A., Richter, E. M., Cantagallo, M. I., Angnes, L., (2007). Analytical procedure for total mercury determination in fishes and shrimps by chronopotentiometric stripping analysis at gold film electrodes after microwave digestion. *Food Chemistry* 101, 579-584.
- Balarama Krishna, M. V., Karunasagar, D., Rao, S. V., Arunachalam, J., (2005). Preconcentration and speciation of inorganic and methyl mercury in waters using polyaniline and gold trap-CVAAS. *Talanta* 68, 329-335.
- Barrero Mazquiarán, M. A., Cantón Ortiz de Pinedo, L., (2007). Organic composition of atmospheric urban aerosol: Variations and sources of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmospheric Research* 85, 288-299.
- Bendicho, C., De La Calle, I., Pena, F., Costas, M., Cabaleiro, N., Lavilla. I., (2012). Ultrasound-assisted pretreatment of solid samples in the context of green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* 31, 50-60.
- Bengochea-Alvarez, M. J., Fernández-Abedul, M. T., Costa-García, A., (2008). Electrochemical characterization of different screen-printed gold electrodes. *Electrochimica Acta* 53, 3242-3249.
- Bente, M., Sklorz, M., Streibel, T., Zimmermann, R., (2008). Online laser desorption-multiphoton postionization mass spectrometry of individual aerosol particles: molecular source indicators for particles emitted from different traffic-related and wood combustion sources. *Analytical Chemistry* 80, 8991-9004.
- Berchmans, S., Arivukkodi, S., Yegnaraman, V., (2000). Self-assembled monolayers of 2-mercaptobenzimidazole on gold: stripping voltammetric determination of Hg(II). *Electrochemistry Communications* 2, 226-229.
- Bernaus, A., Gaona, X., van Ree, D., Valiente, M., (2006). Determination of mercury in polluted soils surrounding a chlor-alkali plant: Direct speciation by X-ray absorption spectroscopy techniques and preliminary geochemical characterisation of the area. *Analytica Chimica Acta* 565, 73-80.
- Berzas-Nevaldo, J. J., Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C., Guzmán Bernardo, F. J., Jiménez Moreno, M., (2008). Determination of monomethylmercury in low and high-polluted sediments by microwave extraction and gas chromatography with atomic fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta* 608, 30-37.
- Bonfil, Y., Brand, M., Kirowa-Eisner, E., (2000). Trace determination of mercury by anodic stripping voltammetry at the rotating gold electrode. *Analytica Chimica Acta* 424, 65-76.
- Borrás, E., Tortajada-Genaro, L. A., (2007). Characterisation of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric aerosols by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 583, 566-276.



- Brett, C. M. A., (2007). Novel sensor devices and monitoring strategies for green and sustainable chemistry processes. *Pure and Applied Chemistry* 79, 1969-1980.
- Brorström, E., Grennfelt, P., Lindskog, A., (1983). The effect of nitrogen dioxide and ozone on the decomposition of particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons during sampling from the atmosphere. *Atmospheric Environment* vol.17, No.3, 604-605.
- Bruno, P., Caselli, M., De Gennaro, G., Tutino, M., (2007). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in particulate matter collected with low volume samplers. *Talanta* 72, 1357-1361.
- Callén, M. S., De la Cruz, M. T., López, J. M., Murillo, R., Navarro, M. V., Mastral, A. M., (2008). Long-range atmospheric transport and local pollution sources on PAH concentrations in a south European urban area. Fulfilling of the European Directive. *Water, Air and Soil Pollution* 190, 271-285.
- Capelo, J. L., Galesio, M. M., Felisberto, G. M., Vaz, C., Costa Pessoa, J., (2005). Micro-focused ultrasonic solid-liquid extraction ( $\mu$ FUSLE) combined with HPLC and fluorescence detection for PAHs determination in sediments: optimization and linking with the analytical minimalism concept. *Talanta* 66, 1272-1280.
- Capelo, J. L., Maduro, C., Mota, A. M., (2006). Evaluation of focused ultrasound and ozonolysis as sample treatment for direct determination of mercury by FI-CV-AAS. Optimization of parameters by full factorial design. *Ultrasonics Sonochemistry* 13, 98-106.
- Castro, D., Slezakova, K., Oliva-Teles, M. T., Delerue-Matos, C., Conceição Alvim-Ferraz, M., Morais, S., Carmo Pereira, M., (2009). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate samples by microwave-assisted extraction and liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, 32, 501-510.
- Cattani, I., Spalla, S., Beone, G. M., Del Re, A. A. M., Boccelli, R., Trevisan, M., (2008). Characterization of mercury species in soils by HPLC-ICP-MS and measurement of fraction removed by diffusive gradient in thin films. *Talanta* 74, 1520-1526.
- Cecinato, A., Mabilia, R., Marino, F., (2000). Relevant organic components in ambient particulate matter collected at Svalbard Islands (Norway). *Atmospheric Environment* 34, 5061-5066.
- Cereceda-Balic, F., Kleist, E., Prast, H., Schlimper, H., Engel, H., Günther, K., (2002). Description and evaluation of a sampling system for long-time monitoring of PAHs wet deposition. *Chemosphere* 49, 331-340.
- Chang, B-Y., Park, S-M., (2010). Electrochemical impedance spectroscopy. *Annual Review of Analytical Chemistry* 3, 207-229.
- Chang, F-H., Lin, T-Ch., Chao, H-R., Chao, M-R., (2001). A study on losses of PAHs during sample concentration for chromatographic analysis: evaporation with a stream of nitrogen. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 80, 13-26.

- Chen, L., Song, D., Tian, Y., Ding, L., Yu, A., Zhang, H., (2008). Application of on-line microwave sample preparation techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 27, No. 2.
- Cheng, J., Yuan, T., Wu, Q., Zhao, W., Xie, H., Ma, Y., Ma, J., Wang, W., (2007). PM10-bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Cancer Risk Estimation in the Atmosphere Surrounding an Industrial Area of Shanghai, China. *Water, Air and Soil Pollution* 183, 437-446.
- Christensen, A., Östman, C., Westerholm, R., (2005). Ultrasound-assisted extraction and on-line LC-GC-MS for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in urban dust and diesel particulate matter. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381, 1206-1216.
- Collaisol, A., Pozebon, D., Maia, S. M., (2004). Ultrasound assisted mercury extraction from soil and sediment. *Analytica Chimica Acta* 518, 157-164.
- da Silva, M. J., Paim, A. P.S., Pimentel, M. F., Cervera, M. L., de la Guardia, M., (2010). Determination of mercury in rice by cold vapor atomic fluorescence spectrometry after microwave-assisted digestion. *Analytica Chimica Acta* 667, 43-48.
- Daniele, S., Bragato, C., Baldo, M. A., Wang, J., Lu, J., (2000). The use of a remote stripping sensor for the determination of copper and mercury in the Lagoon of Venice. *Analyst* 125, 731-735.
- de Souza, S. S., Campiglia, A. D., Barbosa Jr., F., (2013). A simple method for methylmercury, inorganic mercury and ethylmercury determination in plasma samples by high performance liquid chromatography-cold-vapor-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 761, 11-17.
- Deng, B., Xiao, Y., Xu, X., Zhu, P., Liang, S., Mo, W., (2009). Cold vapor generation interface for mercury speciation coupling capillary electrophoresis with electrothermal quartz tube furnace atomic absorption spectrometry: Determination of mercury and methylmercury. *Talanta* 79, 1265-1269.
- Domínguez Renedo, O., Alonso-Lomillo, M. A., Arcos Martínez, M. J., (2007). Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta* 73, 202-219.
- dos Santos, E. J., Herrmann, A. B., Vieira, M. A., Frescura, V. L. A., Curtius, A. J., (2005). Evaluation of slurry preparation procedures for the determination of mercury by axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry using on-line cold vapor generation. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 60, 659-665.
- Diputación de Badajoz (2008). <http://www.dip-badajoz.es/>
- Diputación de Cáceres (2008). <http://www.dip-caceres.es/>
- Drasch G., Horvat M., Stoepler M., (2004). Mercury. En: *Elements and their Compounds in the Environment (Volume 2)*. Editores: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoepler M. Ed. Wiley-VCH, Alemania, 931-1005.

- Elik, A., (2005). Ultrasound assisted pseudo-digestion of street dust samples prior to determination by atomic absorption spectrometry. *Talanta* 66, 882-888.
- Ensafi, A. A., Allafchian, A. R., Saraji, M., Farajmand, B., (2012). In-situ differential pulse anodic stripping voltammetry combined with hollow fiber-based liquid-three phase micro extraction for determination of mercury using Au-nanoparticles sol-gel modified Pt-wire. *Talanta* 99, 335-341.
- EPA, (1994). Determination of mercury in water by cold vapor atomic absorption spectrometry. Method 245.1, third revision. Environmental Protection Agency, Cincinnati.
- EPA, (1996a). Ultrasonic extraction. Method 3550B, second revision. Environmental Protection Agency, Washington DC.
- EPA, (1996b). Silica gel clean-up. Method 3630C, third revision. Environmental Protection Agency, Washington DC.
- EPA, (1996c). Mercury in aqueous samples and extracts by anodic stripping voltammetry (ASV). Method 7472. Environmental Protection Agency, Washington DC.
- EPA, (1999). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in ambient air using gas chromatography /mass spectrometry (GC/MS). Method TO-13A, second revision. Compendium of methods for determination of toxic organic compounds in ambient air. Environmental Protection Agency, Washington DC.
- EPA, (2001). Measurement of Mercury in Water. Method 1631, third revision. Environmental Protection Agency, Washington DC.
- EPA, (2005). Mercury in water by cold vapor atomic fluorescence spectrometry. Method 245.7, second revision. Environmental Protection Agency, Washington DC.
- EPA, (2007). Microwave extraction. Method 3546. Environmental Protection Agency, Washington DC.
- Ericsson, M., Colmsjö, A., (2000). Dynamic microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A* 877, 141-151.
- Ericsson, M., Colmsjö, A., (2002). Dynamic microwave-assisted extraction coupled on-line with solid-phase extraction: determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment and soil. *Journal of Chromatography A* 964, 11-20.
- Ermakov, S. S., Borzhitskaya, A. V., Moskvina, L. N., (2001). Electrochemical polishing of the surface of a gold electrode and its effect on the sensitivity of the stripping voltammetric determination of mercury(II). *Journal of Analytical Chemistry* 56, 542-545.
- EN-13506, European Standard Water quality (2002). Determination of mercury by atomic fluorescence spectrometry.
- EN-15549, European Standard Air Quality (2008). Standard method for the measurement of the concentration of benzo(a)pyrene in ambient air.

- Faller, C., Stojko, N. Yu., Henze, G., Brainina, Kh. Z., (1999). Stripping voltammetric determination of mercury at modified solid electrodes. Determination of mercury traces using PDC/Au(III) modified electrodes. *Analytica Chimica Acta* 396, 195-202.
- Fanjul-Bolado, P., Hernández-Santos, D., Lamas-Ardisana, P. J., Martín-Pernía, A., Costa-García, A., (2008). Electrochemical Characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Electrochimica Acta* 53, 3635-3642.
- Fu, X-Ch., Chen, X., Guo, Z., Kong, L-T., Wang, J., Liu, J-H., Huang, X-J., (2010). Three-dimensional gold micro-/nanopore arrays containing 2-mercaptobenzothiazole molecular adapters allow sensitive and selective stripping voltammetric determination of trace mercury (II). *Electrochimica Acta* 56, 463-469.
- Fu, X-Ch., Wu, J., Nie, L., Xie, Ch-G., Liu, J-H., Huang, X-J., (2012). Electropolymerized surface ion imprinting films on a gold nanoparticles/single-wall carbon nanotube nanohybrids modified glassy carbon electrode for electrochemical detection of trace mercury(II) in water. *Analytica Chimica Acta* 720, 29-37.
- Gao, Z., Li, P., Zhao, Z., (1991). Anodic stripping voltammetric determination of traces of mercury with a chemically modified electrode. *Microchemical Journal* 43, 121-132.
- Gaona Martínez, X., (2004). El mercurio como contaminante global. Desarrollo de metodologías para su determinación en suelos contaminados y estrategias para la reducción de su liberación al medioambiente. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Barcelona.
- García-González, R., Fernández-Abedul, M. T., Pernía, A., Costa-García, A., (2008). Electrochemical Characterization of different screen-printed gold electrodes. *Electrochimica Acta* 53, 3242-3249.
- Geng, W., Nakajima, T., Takanashi, H., Ohki, A., (2008). Determination of mercury in ash and soil samples by oxygen flask combustion method–Cold vapor atomic fluorescence spectrometry (CVAFS). *Journal of Hazardous Materials* 154, 325-330.
- Giacomino, A., Abollino, O., Malandrino, M., Mentasti, E., (2008). Parameters affecting the determination of mercury by anodic stripping voltammetry using a gold electrode. *Talanta* 75, 266-273.
- Gil, S., Lavilla, I., Bendicho, C., (2006). Ultrasound-promoted cold vapour generation in the presence of formic acid for the determination of mercury by atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry* 78, 6260-6264.
- Gómez-Ariza, J. L., Lorenzo, F., García-Barrera, T., (2004). Simultaneous determination of mercury and arsenic species in natural freshwater by liquid chromatography with on-line UV irradiation, generation of hydrides and cold vapor and tandem atomic fluorescence detection". *Journal of Chromatography A* 1056, 139-144.
- Gong, J., Zhou, T., Song, D., Zhang, L., (2010a). Monodispersed Au nanoparticles decorated graphene as an enhanced sensing platform for ultrasensitive stripping voltammetric detection of mercury(II). *Sensors and Actuators B: Chemical* 150, 491-497.

- Gong, J., Zhou, T., Song, D., Zhang, L., Hu, X., (2010b). Stripping voltammetric detection of mercury(II) based on a bimetallic Au-Pt inorganic-organic hybrid nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Analytical Chemistry* 82, 567-573.
- Gouveia-Caridade, C., (2008). Eléctrodos de filme de carbono. Caracterização e aplicação em sensores e biosensores electroquímicos. Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra.
- Granado-Rico, M. A., Olivares-Marín, M., Pinilla-Gil, E., (2008). A Novel Cell Design for the Improved Stripping Voltammetric Detection of Zn(II), Cd(II), and Pb(II) on Commercial Screen-Printed Strips by Bismuth Codeposition in Stirred Solutions. *Electroanalysis* 20, 2608-2613.
- Güell, R., Aragay, G., Fontàs, C., Anticó, E., Merkoçi, A., (2008). Sensitive and stable monitoring of lead and cadmium in seawater using screen-printed electrode and electrochemical stripping analysis. *Analytica Chimica Acta* 627, 219-224.
- Gutiérrez-Dabán, A., Fernández Espinosa, A. J., Ternero Rodríguez, M., Fernández Álvarez, F., (2005). Particle-size distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air in southern Spain. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381, 721-736.
- Handbook of Chemistry and Physics, 85<sup>th</sup> Edition (2004). Editor: David R. Lide. CRC Press. Florida, EE.UU.
- Hezard, T., Fajerweg, K., Evrard, D., Collière, V., Behra, P., Gros, P., (2012). Gold nanoparticles electrodeposited on glassy carbon using cyclic voltammetry: Application to Hg(II) trace analysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 664, 46-52.
- Hien, T. T., Nam, P. P., Yasuhiro, S., Takayuki, K., Norimichi, T., Hiroshi, B., (2007). Comparison of particle-phase polycyclic aromatic hydrocarbons and their variability causes in the ambient air in Ho Chi Minh City, Vietnam and in Osaka, Japan, during 2005–2006. *Science of the Total Environment* 382, 70-81.
- Honeychurch, K. C., Hart, J. P., (2003). Screen-printed electrochemical sensors for monitoring metal pollutants. *Trends in Analytical Chemistry* 22, 456-469.
- Instituto Nacional de Estadística. Cifras oficiales de población, 2011. <http://www.ine.es/>
- Janegitz, B. C., Figueiredo-Filho, L. C. S., Marcolino-Junior, L. H., Souza, S. P. N., Pereira-Filho, E. R., Fatibello-Filho, O., (2011). Development of a carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan for cadmium(II) and mercury(II) determination. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 660, 209-216.
- Jena, B. K., Raj, C. R., (2008). Gold nanoelectrode ensembles for the simultaneous electrochemical detection of ultratrace arsenic, mercury, and copper. *Analytical Chemistry* 80, 4836-4844.
- Kadara, R. O., Jenkinson, N., Banks, C. E., (2009a). Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms. *Sensors and Actuators B: Chemical* 138, 556-562.
- Kadara, R. O., Jenkinson, N., Banks, C. E., (2009b). Characterization and fabrication of disposable screen printed microelectrodes. *Electrochemistry Communications* 11, 1377-1380.

- Karthikeyan, S., Balasubramanian, R., See, S. W., (2006). Optimization and validation of a low temperature microwave-assisted extraction method for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulate matter. *Talanta* 69, 79-86.
- Kempegowda, R. G., Malingappa, P., (2012). Covalently modified multiwalled carbon nanotubes as a new voltammetric interface for the determination of mercury at picomolar level. *Electrochemistry Communications* 25, 83-86.
- Laschi, S., Palchetti, I., Mascini, M., (2006). Gold-based screen printed sensor for detection of trace lead. *Sensors and Actuators B: Chemical* 114, 460-465.
- Lee, J. Y., Shin, H. J., Bae, S. Y., Kim, Y. P., Kang, Ch-H., (2008). Seasonal variation of particle size distributions of PAHs at Seoul, Korea. *Air Quality, Atmosphere and Health* 1, 57-68.
- Leopold K., Foulkes M., Worsfold P., (2009). Preconcentration techniques for the determination of mercury species in natural waters. *Trends in Analytical Chemistry* 28, 426-435.
- Leopold K., Foulkes M., Worsfold P., (2010). Methods for the determination and speciation of mercury in natural waters-A review. *Analytica Chimica Acta* 663, 127-138.
- Li, M., Li, Y-T., Li, D-W., Long, Y-T., (2012). Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays-A review. *Analytica Chimica Acta* 734, 31-44.
- Lin, T. C., Chang, F. H., Hsieh J. H., Chao, H. R., Chao, M. R., (2002). Characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons and total suspended particulate in indoor and outdoor atmosphere of a Taiwanese temple. *Journal of Hazardous Materials A* 92, 1-12.
- Liu, G., Cai, Y., O'Driscoll, N., (2012). *Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury*. Ed. Wiley-VCH, EE.UU.
- Liu, L-b., Liu, Y., Lin, J-m., Tang, N., Hayakama, K., Maeda, T., (2007). Development of analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particulates: A review. *Journal of Environmental Sciences* 19, 1-11.
- Lodovici, M., Venturini, M., Marini, E., Grechi, D., Dolara, P., (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Florence, Italy, and their correlation with other air pollutants. *Chemosphere* 50, 377-382.
- López, I., Cuello, S., Cámara, C., Madrid, Y., (2010). Approach for rapid extraction and speciation of mercury using a microtip ultrasonic probe followed by LC-ICP-MS. *Talanta* 82, 594-599.
- López-Cancio, J. A., Vera Castellano, A., Navarro Trujillo, R., Corujo Jiménez, J., (2002). Particle phase concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmospheric environment of Jinámar, Gran Canaria. *Water, Air and Soil Pollution* 136, 93-103.
- Lu, J. Y., Schroeder, W. H., Keeler, G., (2003). Field intercomparison studies for evaluation and validation of the AESminiSampIR™ technique for sampling and analysis of total particulate mercury in the atmosphere. *Science of the Total Environment* 304, 115-125.

- Mandil, A., Idrissi, L., Amine, A., (2010). Stripping voltammetric determination of mercury(II) and lead(II) using screen-printed electrodes modified with gold films, and metal ion preconcentration with thiol-modified magnetic particles. *Microchimica Acta* 170, 299-305.
- Martin, L. G., Jongwana, L. T., Crouch, A. M., (2010). Capillary electrophoretic separation and post-column electrochemical detection of mercury and methyl mercury and applications to coal samples. *Electrochimica Acta* 55, 4303-4308.
- Martinez Blanco, R., Tagle Villanueva, M., Sánchez Uría, J. E., Sanz-Medel, A., (2000). Field sampling, preconcentration and determination of mercury species in river waters. *Analytica Chimica Acta* 419, 213-240.
- Masawat, P., Liawruangrath, S., Slater, J. M., (2003). Flow injection measurement of lead using mercury-free disposable gold-sputtered screen-printed carbon electrodes (SPCE). *Sensors and Actuators B: Chemical* 91, 52-59.
- Mastral, A. M., Callén, M. S., López, J. M., Murillo, R., García, T., Navarro, M. V., (2003). Critical review on atmospheric PAH. Assessment of reported data in the Mediterranean basin. *Fuel Processing Technology* 80, 183-193.
- Menzie, C. A., Potocki, B. B., Santodonato, J., (1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environmental Science and Technologies* 26, 1278-1284.
- Meucci, V., Laschi, S., Minunni, M., Pretti, C., Intorre, L., Soldani, G., Mascini, M., (2009). An optimized digestion method coupled to electrochemical sensor for the determination of Cd, Cu, Pb and Hg in fish by square wave anodic stripping voltammetry. *Talanta* 77, 1143-1148.
- Miller J. N., Miller, J. C., (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*, 4ª edición. Ed. Prentice Hall, Madrid.
- Mizanur Rahman, G. M., Fahrenholz, T., Skip Kingston, H. M., (2009). Application of speciated isotope dilution mass spectrometry to evaluate methods for efficiencies, recoveries, and quantification of mercury species transformations in human hair. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24, 83-92.
- Mongay Fernández, C., (2005). *Quimiometría*. Ed. PUV, Universitat de València.
- Mora Aliseda, J., (2001). *Extremadura Fin de Siglo*. Editorial Hoy Diario de Extremadura, Badajoz.
- Moreira Vaz, J., (2003). Screening direct analysis of PAHS in atmospheric particulate matter with SPME. *Talanta* 60, 687-693.
- Munoz, R. A. A., Felix, F. S., Augelli, M. A., Pavesi, T., Angnes, L., (2006). Fast ultrasound-assisted treatment of urine samples for chronopotentiometric stripping determination of mercury at gold film electrodes. *Analytica Chimica Acta* 571, 93-98.
- National Institute for Minamata Disease (2012). Ministry of the Environment, Japan. [www.nimd.go.jp/english/index.html](http://www.nimd.go.jp/english/index.html)

- Nelson, P. F., Morrison, A. L., Malfroy, H. J., Cope, M., Lee, S., Hibberd, M. L., Meyer, C. P. (M.), McGregor, J., (2012). Atmospheric mercury emissions in Australia from anthropogenic, natural and recycled sources. *Atmospheric Environment* 62, 291-302.
- Niu, X., Zhao, Z., Lan, M., (2011). Disposable screen-printed antimony film electrode modified with carbon nanotubes/ionic liquid for electrochemical stripping measurement. *Electrochimica Acta* 56, 9921-9925.
- Okçu, F., Ertaş, H., Nil Ertaş, F., (2008). Determination of mercury in table salt samples by on-line medium exchange anodic stripping voltammetry. *Talanta* 75, 442-446.
- Oliveira Brett, A. M., Brett, C. M. A., (1996). *Electroquímica. Princípios, métodos e aplicações*. Ed. Almedina, Coimbra, Portugal.
- Ordeig, O, Banks, C. E., del Campo, J., Muñoz, F. X., Compton, R. G., (2006). Trace Detection of Mercury(II) Using Gold Ultra-Microelectrode Arrays. *Electroanalysis* 18, 573-578.
- Osawa, T., Hatsukawa, Y., Appel, P. W. U., Matsue, H., (2011). Mercury and gold concentrations of highly polluted environmental samples determined using prompt gamma-ray analysis and instrument neutron activation analysis. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 269, 717-720.
- Palchetti, I., Laschi, S., Mascini, M., (2005). Miniaturised stripping-based carbon modified sensor for in field analysis of heavy metals. *Analytica Chimica Acta* 530, 61-67.
- Palomo-Marín, M. R., Pinilla-Gil, E., Calvo-Blázquez, L., Capelo-Martínez, J. L., (2011). Determination of trace and major elemental profiles in street dust samples by miniaturized ultrasonic probe extraction and ICP-MS. *Talanta* 84, 840-845.
- Pandey, S. K., Kim, K. H., Brown, R. J. C., (2011). Measurement techniques for mercury species in ambient air. *Trends in Analytical Chemistry* 30, 899-917.
- Park, S. S., Kima, Y. J., Kang, C. H., (2002). Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Seoul, Korea. *Atmospheric Environment* 36, 2917-2924.
- Pejčić, B., De Marco, R., (2006). Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization. *Electrochimica Acta* 51, 6217-6229.
- Peltonen, K., Kuljukka, T., (1995). Air sampling and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A* 710, 93-108.
- Pinilla Gil, E., Ostapczuk, P., (1994). Potentiometric stripping determination of mercury( II), selenium( IV), copper( II) and lead( II) at a gold film electrode in water samples. *Analytica Chimica Acta* 293, 55-65.
- Piñeiro-Iglesias, M., Lopez-Mahía, P., Vázquez-Blanco, E., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Fernández-Fernández, E., (2000). Microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from atmospheric particulate samples. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 367, 29-34.



- Piñeiro-Iglesias, M., Miñones-Vázquez, M., Vázquez-Blanco, E., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P., Prada-Rodríguez, D., (2002). Concentration and clean-up of trace hydrocarbons from atmospheric particulate matter. *Chromatographia* 56, 483-488.
- Position Paper (2001). Ambient air pollution by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH). European Communities, Luxembourg.
- Poster, D. L., Schantz, M. M., Sander, L. C., Wise, S. A., (2006). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental samples: a critical review of gas chromatography (GC) methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 386, 859-881.
- Priego Capote, F., Luque de Castro, M. D., (2007). Ultrasound in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387, 249-257.
- Radulescu, M. C., Danet, A. F., (2008). Mercury Determination in Fish Samples by Chronopotentiometric Stripping Analysis Using Gold Electrodes Prepared from Recordable CDs. *Sensors* 8, 7257-7171.
- Rajabi, H. R., Roushani, M., Shamsipur, M., (2013). Development of a highly selective voltammetric sensor for nanomolar detection of mercury ions using glassy carbon electrode modified with a novel ion imprinted polymeric nanobeads and multi-wall carbon nanotubes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 693, 16-22.
- Ramalhosa, E., Río Segade, S., Pereira, E., Vale, C., Duarte, A., (2001). Simple methodology for methylmercury and inorganic mercury determinations by high-performance liquid chromatography-cold vapour atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 439, 211-227.
- Ramis Ramos, G., García Álvarez-Coque, M. C., (2001). *Quimiometría*. Ed. Síntesis, Madrid.
- Ravindra, K., Mittal A. K., Van Grieken, R., (2001). Health Risk Assessment of Urban Suspended Particulate Matter with Special Reference to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review. *Review on Environmental Health* 16, 169-189.
- Ravindra, K., Bencs, L., Wauters, E., De Hoog, J., Deutsch, F., Roekens, E., Bleux, N., Berghmans, P., Van Grieken, R., (2006). Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. *Atmospheric Environment* 40, 771-785.
- Ravindra, K., Wauters, E., Van Grieken, R., (2008). Variation in particulate PAHs level and their relation with the transboundary movement of their masses. *Science of the Total Environment* 396, 100-110.
- Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. B.O.E número 45, de 21 de febrero de 2003, 7228-7245.

- Real Decreto 812/2007 sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente en relación con el arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos. B.O.E número 150, de 23 de junio de 2007, 27171-27177.
- Red Extremeña de Protección e Investigación de la Calidad del Aire (REPICA). <http://xtr.extremambiente.es/repica/index.html>
- Riewagen, M., Müller, A., Massolo, L., Herbath, O., Ronco, A., (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. *Science of Total Environment* 348, 199-210.
- Reyes, L. H., Mizanur Rahman, G. M., Fahrenholz, T., Skip Kingston, H. M., (2008). Comparison of methods with respect to efficiencies, recoveries, and quantitation of mercury species in interconversions in food demonstrated using tuna fish. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390, 2123-2132.
- Reyes, L. H., Mizanur Rahman, G. M., T., Skip Kingston, H. M., (2009). Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues. *Analytica Chimica Acta* 631, 121-128.
- Ribeiro, A. S., Vieira, M. A., Willie, S., Sturgeon, R. E., (2007). Ultrasound-assisted vapour generation of mercury. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 388, 849-857.
- Ribeiro, F., Neto, M. M. M., Rocha, M. M., Fonseca, I. T. E., (2006). Voltammetric studies on the electrochemical determination of methylmercury in chloride medium at carbon microelectrodes. *Analytica Chimica Acta* 579, 227-234.
- Río-Segade, S., Bendicho, C., (1999). Ultrasound-assisted extraction for mercury speciation by the flow injection-cold vapor technique. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14, 263-268.
- Romero, R., Sienra, R., Richter, P., (2002). Efficient screening method for de-termination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particles. Application in real samples of Santiago-Chile metropolitan area. *Atmospheric Environment* 36, 2375-2381.
- Safavi, A., Farjami, E., (2011). Construction of a Carbon Nanocomposite Electrodebased on Amino Acids Functionalized Gold Nanoparticles for Trace Electrochemical Detection of Mercury. *Analytica Chimica Acta* 688, 43-48.
- Sánchez, A., Morante-Zarcelero, S., Pérez-Quintanilla, S., Sierra, I., del Hierro, I., (2012). Determination of Hg(II) in natural waters using a carbon paste electrode modified with hybrid mesostructured silica nanoparticles. *Sensors and Actuators B: Chemical* 163, 38-43.
- Santos, F. J., Galceran, M. T., (2002). The application of gas chromatography to environmental analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 21, 672-685.
- Selid, P. D., Xu, H., Collins, E. M., Face-Collins, M. S., Zhao, J. X., (2009). Sensing mercury for biomedical and environmental monitoring. *Sensors* 9, 5446-5459.

- Sharma, H., Jain, V. J., Khan, Z. H., (2007). Characterisation and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the urban environment of Delhi. *Chemosphere* 66, 302-310.
- Shu, Y. Y., Tey, S. Y., Wu, D. K. S., (2003). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particles using open-vessel focused microwave-assisted extraction. *Analytica Chimica Acta* 495, 99-108.
- Sienra, M. R., Rosazza, N. G., Préndez, M., (2005). Polycyclic aromatic hydrocarbons and their molecular diagnostic ratios in urban atmospheric respirable particulate matter. *Atmospheric Research* 75, 267-281.
- Skylberg, U., (2010). Chapter 13 – Mercury Biogeochemistry in Soils and Sediments. *Developments in Soil Science* 34, 379-410.
- Srogi, K., (2007). Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters* 5, 169-195.
- Stoichev, T., Rodriguez Martín-Doimeadios, R. C., Tessier, E., Amouroux, D., Donard, O. F. X., (2004). Improvement of analytical performances for Mercury speciation by on-line derivatization, cryofocussing and atomic fluorescence spectrometry. *Talanta* 62, 433-438.
- Stojko, N. Yu., Brainina, Kh. Z., Faller, C., Henze, G., (1998). Stripping voltammetric determination of mercury at modified solid electrodes. I. Development of the modified electrodes. *Analytica Chimica Acta* 371, 145-153.
- Ströher, G. L., Poppi, N. R., Raposo Jr., J. L., Batista Gomes de Souza, J., (2007). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry and source identifications by methods of diagnostics ratio in the ambient air of Campo Grande, Brazil. *Microchemical Journal* 86, 112-118.
- Syversen, T., Kaur, P., (2012). The toxicology of mercury and its compounds. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 26, 215-226.
- Tadeo, J. L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., García-Valcárcel, A. I., (2010). Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples. *Journal of Chromatography A* 1217, 2415-2440.
- Temime-Roussel, B., Monod, A., Massiani, C., Wortham, H., (2004). Evaluation of an annular denuder tubes for atmospheric PAH partitioning studies—1: evaluation of the trapping efficiency of gaseous PAHS. *Atmospheric Environment* 38, 1913-1924.
- Tham Y. W. F., Takeda, K., Sakugawa, H., (2008). Exploring the correlation of particulate PAHs, sulfur dioxide, nitrogen dioxide and ozone. A preliminary study. *Water, Air and Soil Pollution* 194, 5-12.
- Tang, X., Liu, H., Zou, B., Tian, D., Huang, He., (2012). A fishnet electrochemical Hg<sup>2+</sup> sensing strategy based on gold nanoparticles-bioconjugate and thymine-Hg<sup>2+</sup>-thymine coordination chemistry. *Analyst* 137, 309-311.

- Tonle, I. K., Ngameni, E., Walcarius, A., (2005). Preconcentration and voltammetric analysis of mercury(II) at a carbon paste electrode modified with natural smectite-type clays grafted with organic chelating groups. *Sensors and Actuators B: Chemical* 110, 195-203.
- Tsapakis, M., Stephanou, E. G., (2005). Occurrence of gaseous and particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmosphere: study of sources and ambient temperature effect on the gas/particle concentration and distribution. *Environmental Pollution* 133, 147-156.
- Tseng, C. M., Amouroux, D., Brindle, I. D., Donard, O. F. X., (2000). Field cryofocussing hydride generation applied to the simultaneous multi-elemental determination of alkyl-metal(loid) species in natural waters using ICP-MS detection. *Journal of Environmental Monitoring* 2, 603-612.
- UNE-77250, (2001). Norma de Calidad Del Aire. Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos totales (fase gaseosa y partículas). Captación en filtros de adsorción y análisis por cromatografía de gases/espectrometría de masas.
- UNE-EN 12341, (1999). Norma de Calidad Del Aire. Determinación de la fracción PM<sub>10</sub> de la materia particulada en suspensión. Método de referencia y procedimiento de ensayo de campo para demostrar la equivalencia de los métodos de medida al de referencia.
- UNEP, Evaluación mundial sobre el mercurio (2002). PNUMA Productos Químicos, Ginebra (Suiza).
- UNEP, Global Mercury Assessment (2013). Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland.
- Vardar, N., Esen, F., Tasdemir, Y., (2008). Seasonal concentrations and partitioning of PAHs in a suburban site of Bursa, Turkey. *Environmental Pollution* 155, 298-307.
- Vera Castellano, A., López Cancio, J., Santana Alemán, P., Santana Rodríguez, J., (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air particles in the city of Las Palmas de Gran Canaria. *Environment International* 29, 475-480.
- Villar, P., Callejón, M., Alonso, E., Jiménez, J. C., Guiraúm, A., (2004). Optimization and validation of a new method of analysis for polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge by liquid chromatography alter microwave assisted extraction. *Analytica Chimica Acta* 524, 295-304.
- Wai Fon, T. Y., Noriatsu, O., Hiroshi, S., (2007). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the aerosol of Higashi Hiroshima, Japan: Pollution Scenario and Source Identification. *Water, Air and Soil Pollution* 182, 235-243.
- Wang, J., Tian, B., (1993). Screen-printed electrodes for stripping measurements of trace mercury. *Analytica Chimica Acta* 274, 1-6.
- Wang, J., (1997). Remote electrochemical sensors for monitoring inorganic and organic pollutants. *Trends in Analytical Chemistry* 16, 84-88.

- Wang, Q., Kim, D., Dionysiou, D. D., Sorial, G. A., Timberlake, D., (2004). Sources and remediation for mercury contamination in aquatic systems—a literature review. *Environmental Pollution* 131, 323-336.
- Watson, C. M., Dwyer, D. J., Andle, J. C., Bruce, A. E. Mitchell, M. R. M., (1999). Stripping analyses of mercury using gold electrodes: irreversible adsorption of mercury. *Analytical Chemistry* 71, 3181-3186.
- Welz, B., Sperling, M., (1999). *Atomic Absorption Spectrometry*. Ed. Wiley-VCH. Alemania.
- WHO (2000). *Polycyclic aromatic hydrocarbons in air*. Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
- Xu, H., Zeng, L., Xing, S., Shi, G., Xian, Y., Jin, L., (2008). Microwave-radiated synthesis of gold nanoparticles/carbon nanotubes composites and its application to voltammetric detection of trace mercury(II). *Electrochemistry Communications* 10, 1839-1843.
- Yusà, V., Quintas, G., Pardo, O., Pastor, A., de la Guardia, M., (2006). Determination of PAHs in airborne particles by accelerated solvent extraction and large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 69, 807-815.
- Zejli, H., Sharrock, P., Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J. L., Naranjo-Rodriguez, I., Tamsamani, K. R., (2005). Voltammetric determination of trace mercury at a sonogel–carbon electrode modified with poly-3-methylthiophene. *Talanta* 68, 79-85.
- Zhang, Ch. C., (2007). *Fundamentals of Environmental Sampling and Analysis*. Ed. John Wiley and Sons, New Jersey.
- Zhang, S., Zhang, W., Wang, K., Shen, Y., Hu, L., Wang, X., (2009). Concentration, distribution and source apportionment of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in the south-east suburb of Beijing, China. *Environmental Monitoring Assessment* 151, 197-207.
- Zhang, W-b., Xue, J-j., Yang, X-a., Wang, S-b., (2011). Determination of inorganic and total mercury in seafood samples by a new ultrasound-assisted extraction system and cold vapor atomic fluorescence spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 26, 2023-2029.
- Zhao, Y. Q., Zheng, J. P., Fang, L., Lin, Q., Wu, Y. N., Xue, Z. M., Fu, F. F., (2012). Speciation analysis of mercury in natural water and fish samples by using capillary electrophoresis–inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 89, 280-285.
- Zhou, H., Wang, X., Yu, P., Chen, X., Mao, L., (2012). Sensitive and selective voltammetric measurements of  $\text{Hg}^{2+}$  by rational covalent functionalization of graphene oxide with cysteamine. *Analyst* 137, 305-308.
- Zhu, X., Alexandratos, S. D., (2007). Determination of trace levels of mercury in aqueous solutions by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: Elimination of the ‘memory effect’. *Microchemical Journal* 86, 37-41.

Zhu, Z., Su, Y., Li, J., Li, D., Zhang, J., Song, S., Zhao, Y., Li, G., Fan, C., (2009). Highly Sensitive Electrochemical Sensor for Mercury(II) Ions by Using a Mercury-Specific Oligonucleotide Probe and Gold Nanoparticle-Based Amplification. *Analytical Chemistry* 81, 7660-7666.