



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Especiación de arsénico en aguas subterráneas de la Cuenca del
Duero**

Autor: María Polo Gutiérrez

Tutor/es: María del Sol Vega Alegre



Universidad de Valladolid

Departamento de
Química Analítica

UVa

María del Sol Vega Alegre, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid, en relación con la SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN DEL TRABAJO FIN DE GRADO según el Reglamento sobre la Elaboración y Evaluación del Trabajo Fin de Grado aprobado en Consejo de Gobierno de 18 de enero de 2012 (BOCyL 15 de febrero de 2012), COMO TUTOR del trabajo “Especiación de arsénico en aguas subterráneas de la Cuenca del Duero” realizado por Dña. María Polo Gutiérrez,

INFORMO QUE:

Dicho trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid bajo mi supervisión. El trabajo tiene como fin ahondar en la comprensión de los mecanismos que provocan la presencia de elevados niveles de arsénico en las aguas subterráneas de algunos sectores de la Cuenca del Duero. Para ello, la alumna ha optimizado algunos parámetros del método analítico y lo ha aplicado a la determinación y especiación de arsénico en muestras de agua procedentes de las provincias de Segovia y Ávila. También ha determinado otras variables hidroquímicas en las aguas y ha interpretado los resultados por técnicas estadísticas multivariantes para buscar relaciones entre las variables que permitan elucidar los mecanismos de movilización de este elemento tóxico en los acuíferos.

La alumna María Polo Gutiérrez ha realizado el trabajo satisfactoriamente, con dedicación, demostrando poseer una gran cualificación y capacidad de trabajo y de análisis. Considero que tanto el tema del trabajo como los aspectos científicos desarrollados en el mismo reúnen las condiciones para ser defendidos, ante la correspondiente Comisión Evaluadora, como Trabajo Fin de Grado, por lo que AUTORIZO a la alumna a proceder a su defensa.

Valladolid 30 de junio de 2014

Fdo. María del Sol Vega Alegre

UVa

Universidad de Valladolid. Campus Miguel Delibes. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica.
47011 Valladolid, Spain. Tel.: +34 983 184248; Fax: +34 983 423013. E-mail: solvega@qa.uva.es; www.uva.es

A mis padres por hacer de este mundo algo mejor.

A mis hermanos por ser lo mejor.

Agradecimientos

De forma muy especial, quiero expresar mi agradecimiento a mi tutora Marisol Vega Alegre, por su apoyo, confianza y ayuda prestados no solo en el desarrollo de este trabajo sino también en mi formación como química.

Quiero dar las gracias al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valladolid por hacer posible la realización de este trabajo ofreciéndome los recursos necesarios para llevarlo a cabo; de forma particular agradezco a Paco de la Rosa su ayuda y paciencia a la hora del manejo de algunos equipos utilizados durante el proyecto.

Expreso mi agradecimiento al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid por facilitarme las instalaciones y equipos que han permitido realizar este trabajo, en especial a Begoña Ribón por su ayuda incondicional.

Me gustaría también agradecer a mis amigos que me han acompañado en los buenos y malos momentos durante mi carrera.

Por último, en el apartado personal, mi gratitud a mi familia, en especial a mis padres por enseñarme a luchar contra todo y hacerme ver que todo es posible con esfuerzo y dedicación; y a mis hermanos por apoyarme y escucharme en cada momento. Quiero mencionar a esa persona que sigue luchando por estar entre nosotros, por su eterno amor y dedicación a los suyos a lo largo de toda su vida.

RESUMEN

La contaminación de las aguas subterráneas por arsénico y otros elementos tóxicos es una de las mayores amenazas sanitarias y medioambientales a las que se enfrenta la humanidad. Las aguas subterráneas son el único recurso hídrico en muchas regiones del planeta y se destinan tanto al consumo humano como a la agricultura y ganadería, por lo que su calidad debe ser cuidadosamente controlada. Aunque estos contaminantes pueden tener un origen antropogénico, en la gran mayoría de los acuíferos su origen es geogénico, producto de las interacciones agua-roca que provocan la lixiviación de minerales cuando se dan las condiciones químicas y físicas adecuadas.

Desde hace más de una década se conoce la presencia de niveles anormalmente altos de arsénico y de otros elementos geogénicos tóxicos como vanadio, uranio, litio o estroncio en aguas subterráneas de la margen sur Cuenca del Duero. En este trabajo se han analizado muestras de agua subterránea de dos zonas diferentes de la cuenca, localizadas en las provincias de Segovia y Ávila, para intentar encontrar similitudes y poder comprender los mecanismos que movilizan arsénico y otros elementos tóxicos en acuíferos de la región. Además de determinar los parámetros hidroquímicos habituales (aniones y cationes mayoritarios, pH, conductividad o potencial redox), se han determinado diversos elementos traza y las especies As(III) y As(V), dado que la existencia de arsénico en forma oxidada o reducida es un indicador del mecanismo dominante de movilización de As.

Paralelamente, se han estudiado y optimizado algunas variables del método analítico HPLC/ICP-MS empleado para la especiación de As en aguas: composición de la fase móvil, estabilidad de la señal analítica y estabilidad de la distribución de especies de As en las muestras de agua con el tiempo. Se ha investigado el efecto de diversos interferentes potenciales presentes en las muestras en la señal analítica, así como la influencia de varios reactivos químicos empleados como estabilizantes de las especies de As. De estos ensayos se han extraído algunas conclusiones:

- Algunos iones presentes en las aguas subterráneas interfieren en la cuantificación de las especies de arsénico por HPLC/ICP-MS cuando se encuentran a altas concentraciones. La interferencia no es significativa a las concentraciones habitualmente halladas en las aguas.

- En algunas muestras se observa una reducción de As (V) a As (III) a los pocos días de ser tomadas, por lo que deben ser estabilizadas con un conservante adecuado si no pueden ser analizadas inmediatamente. Se propone emplear ácido nítrico 10 mM dado que no interfiere con la determinación de las especies.
- La especie de As predominante en las muestras analizadas es la forma oxidada arseniato, lo que es coherente con el pH ligeramente alcalino y potencial redox oxidante que presentan las aguas. En ninguna muestra se detectó la presencia de especies orgánicas de As.

Los resultados analíticos se han interpretado mediante técnicas estadísticas multivariantes (Análisis en Componentes Principales y Análisis de Conglomerados Jerárquicos), hallándose correlaciones entre las variables hidrogeoquímicas similares para las dos zonas investigadas. Se observa que el As parece estar asociado con la presencia de vanadio, sodio y bicarbonato en todas las muestras, y también con la presencia de uranio y hierro en las muestras recogidas en la zona de Segovia. Esto parece apuntar a un mecanismo predominante de liberación de As basado en equilibrios aniónicos competitivos de adsorción-desorción, que provocaría la desorción de elementos tóxicos de los sedimentos del acuífero cuando la concentración de bicarbonato es elevada, lo que es frecuente en muchos acuíferos de la cuenca del Duero.

ABSTRACT

Contamination of groundwater by arsenic and other toxic elements is one of the major health and environmental threats that humanity must face. Groundwater is the only water resource in many parts of the world and it is used for both human consumption and agriculture and livestock, so its quality should be carefully controlled. Although these pollutants may have an anthropogenic origin, in the vast majority of aquifers its origin is geogenic, as a result of water-rock interactions that cause the leaching of chemicals and minerals when suitable conditions exist.

For over a decade ago the presence of abnormally high levels of arsenic and other toxic geogenic elements as vanadium, uranium, lithium or strontium in the groundwater in the south bank of the Duero basin is known. In this paper we have analyzed groundwater samples from two different areas of the basin, located in the provinces of Ávila and Segovia trying to find similarities and to understand the mechanisms that mobilize arsenic and other toxic elements in aquifers in the region. Besides the determination of the usual hydrochemists parameters (major anions and cations, pH, conductivity or redox potential), several trace elements and As (III) and As species (V) have been identified, since the occurrence of oxidized or reduced arsenic can be an indication of the dominant mechanism of As mobilization

Simultaneously, some variables of the analytical method HPLC / ICP-MS used for the speciation of As in waters have been studied and optimized: composition of the mobile phase, analytical signal stability and stability of the arsenic species in the water samples with time. We have investigated the effect of various potential interfering substances present in the samples in the analytical signal and the influence of various chemical reagents used as stabilizing species. Of these trials we have drawn some conclusions:

- Some ions present in groundwater interfere the quantification of arsenic species by HPLC / ICP-MS when they are in high concentrations. The interference is not significant at concentrations commonly found in the waters.
- Reduction of As (V) to As (III) in samples within days of collection is observed, so they must be stabilized with a suitable preservative if they cannot be analyzed

immediately. It is proposed the use of 10 mM nitric acid as it does not interfere with the determination of species.

- The oxidized form of As, arsenate, is the predominant species in the analyzed samples which is in good agreement with the alkaline pH and redoxpotential measured in the samples. The occurrence of organic As species was not observed in any of samples collected.

The analytical results have been interpreted using multivariate statistical techniques (Principal Component Analysis and Hierarchical Cluster Analysis), finding correlations between similar hydrogeochemical variables for the two areas investigated. Arsenic seems to be associated with vanadium, sodium and bicarbonate in most samples, and also with uranium and iron in the samples collected in Segovia. This seems to point to a predominant As release mechanism based on competitive anionic adsorption-desorption equilibria, causing desorption of toxic elements from aquifer sediments when the concentrations of bicarbonate and other major anions are high, which is common in many aquifers of the Duero basin.

Índice

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. PROBLEMÁTICA MEDIOAMBIENTAL DEL ARSÉNICO.....	3
1.2. NIVELES MÁXIMOS ADMISIBLES DE ARSÉNICO EN AGUAS DE BEBIDA.....	9
1.3. ORIGEN Y MOVILIDAD DEL AS EN AGUAS SUBTERRÁNEAS.....	11
1.4. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN Y ESPECIACIÓN DE AS.....	16
2. OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Zona de muestreo.....	25
3.2. Procedimiento de muestreo.....	26
3.3. Procedimientos analíticos.....	29
3.3.1. Determinación de aniones por cromatografía aniónica	
3.3.2. Alcalinidad	
3.3.3. Determinación de elementos metálicos mayoritarios	
3.3.4. Determinación de elementos traza	
3.3.5. Especiación de arsénico	
3.3.6. Herramientas estadísticas	
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
4.1. Optimización de la composición de la fase móvil usada en HPLC/ICP-MS.....	39
4.2. Reproducibilidad de la señal analítica en HPLC/ICP-MS.....	41
4.3. Estabilidad de las especies As(III) y As(V).....	42
4.4. Efecto de interferentes potenciales	44
4.5. Elección de un conservante para estabilizar las especies de arsénico.....	48
4.6. Resultados de la especiación de arsénico.....	54
4.7. Relación del arsénico con otras variables hidrogeoquímicas.....	55
5. CONCLUSIONES.....	69
6. BIBLIOGRAFÍA.....	73
7. ANEXO.....	77

Capítulo 1.
INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática medioambiental del arsénico

El arsénico es un elemento ampliamente distribuido en la atmósfera, en rocas y suelos, en la hidrosfera y en la biosfera. Se encuentra presente en la corteza terrestre con una concentración promedio de 1.5-3.0mg/Kg (*Emsley, 1991; NRCC, 1978*), ubicando su abundancia relativa en la litosfera en el lugar vigésimo, el catorceavo en agua de mar y el duodécimo en el cuerpo humano (*NationalAcademy of Sciences, 1977; Henke, 2009*). En la naturaleza el único isótopo estable es el ⁷⁵As, aunque otros radioisótopos han sido identificados.

Ciertas actividades humanas tales como la producción industrial de metales, la combustión de carbón y petróleo, el uso de compuestos arsenicales en agricultura, o el uso de productos fungicidas en la industria maderera causan una enorme dispersión de arsénico en aire, agua y suelos. Entre las fuentes naturales de arsénico cabe destacar la actividad volcánica y el lixiviado de arsénico de minerales y rocas. Debido a esta ubicuidad y alta dispersión en el medio ambiente, el arsénico se encuentra en la mayor parte de alimentos y bebidas (*Seiler et al., 1994; Kabata-Pendias y Pendias, 1985*). Uno de los mayores problemas medioambientales es la contaminación por As de aguas naturales (y en mayor medida en las aguas subterráneas) por tener efectos nocivos para la salud (*Smedley y Kinniburgh, 2002*).

El agua constituye probablemente la principal vía de entrada de arsénico en la cadena alimenticia humana, lo que justifica la gran preocupación de las autoridades sanitarias por vigilar y controlar la concentración de este elemento en el agua de bebida. El límite establecido tanto por la Organización Mundial de la Salud como por las reglamentaciones nacionales en materia de aguas ha sido rebajado de 50 a 10 µg/L para agua potable, y se está estudiando una nueva reducción a 5 µg/L, dada la toxicidad de este elemento y su incidencia en la aparición de ciertos tipos de cánceres y otra serie de trastornos asociados a la exposición continuada a este metal (*WHO, 1993; Directiva 98/83/CE*).

En la actualidad, el arsénico está considerado como un elemento extremadamente tóxico para el organismo humano. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) lo clasifica como cancerígeno del grupo A debido a la evidencia de sus efectos adversos sobre la salud (USEPA, 1980). La exposición a 0,05 mg/L puede causar 31,33 casos de cáncer de piel por cada 1.000 habitantes. La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer

(IARC) lo ha clasificado en el grupo I debido a su elevada carcinogenicidad. Esta clasificación está basada en estudios sobre personas y animales que muestra una asociación entre la exposición de arsénico y el desarrollo de cáncer (Hughes, 2002). La ingesta máxima de arsénico recomendada por JEFCA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) es de 15 μg semanales de arsénico por kg de masa corporal (Kaiser y Roskamp, 1992). Esto supone que, para un ser humano adulto con un peso medio de 70 kg, la ingesta máxima diaria recomendada es de 150 μg del elemento (WHO, 1996).

La toxicidad del arsénico depende del estado de oxidación, de la estructura química y de la solubilidad en el medio biológico (Henke, 2009; Nriagu et al., 1994). La toxicidad de las diferentes especies de arsénico para los organismos vivos decrece en el siguiente orden: Arsina (H_3As) > As(III) inorgánico (arsenito) > As(III) orgánico > As(V) inorgánico (arseniato) > As(V) orgánico > As elemental.

En el caso del agua, dependiendo del pH y de las propiedades redox del medio, se puede encontrar el arsénico formando diferentes compuestos, como arsenitos y arseniatos (los más comunes), o como ácido metilarsónico, MMA, y ácido dimetilarsónico, DMA, compuestos metilados de menor toxicidad.

El diagrama Eh-pH muestra los intervalos de potencial redox y pH a los cuales predomina cada una de las especies ácido-base de As (III) y As (V). Este diagrama puede usarse para predecir la especiación de As inorgánico en aguas sin más que medir el potencial redox y el pH (Smedley y Kinniburgh, 2002).

La toxicidad aguda, cuyos efectos pueden llegar a ser letales, es la consecuencia de la ingesta de alto contenido de arsénico en un tiempo corto. En humanos, la mayor parte del arsénico ingerido se elimina a través del riñón en pocos días, pero cuando la ingesta de arsénico se

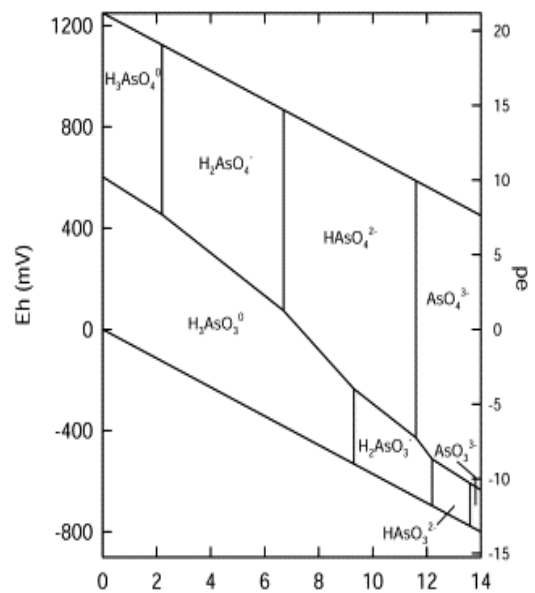


Fig. 1.1. Diagrama Eh-pH de especies de As en agua para el sistema $\text{As-O}_2\text{-H}_2\text{O}$, a 25 °C y 1 bar.

produce en grandes cantidades, este es retenido en el pelo, uñas, piel y huesos durante largos periodos.

La toxicidad crónica es el resultado de la exposición prolongada a pequeñas concentraciones de arsénico en el agua de consumo y en los alimentos. El arsénico ingerido inhibe la reparación del DNA dañado y ha sido asociada con la aparición de diferentes tipos de cáncer (piel, pulmón, hígado, riñón y tracto urinario), y otras muchas dolencias como alteraciones de la piel (relajamiento de los capilares cutáneos y la dilatación de los mismos), lesiones dérmicas (neoplasias de piel), vasculopatías periféricas ("enfermedad del pie negro"), enfermedades respiratorias, cardíacas y neurológicas, problemas gastrointestinales, deficiencias en la reproducción, y retrasos en el crecimiento y en el desarrollo neurológico y motriz de niños (Bissen y Frimmel, 2003). Un ejemplo de toxicidad crónica se da en Argentina, donde la ingesta continuada de agua contaminada por arsénico provoca en los habitantes una enfermedad conocida como HACRE (hidroarsenicismo crónico regional endémico). Otro caso de obligada referencia es el de Bangladesh y oeste de Bengala, donde hay un millón de pozos con niveles de arsénico superiores a 10 µg/L y más de 200.000 personas afectadas por enfermedades relacionadas con el envenenamiento por arsénico (Henke, 2009; Dahr et al., 1997; Mandal et al., 2002; Nickson et al., 1998).

A medida que la población mundial aumenta, uno de los recursos fundamentales para la supervivencia humana, el agua potable, disminuye. Las aguas continentales superficiales son insuficientes para satisfacer la creciente demanda de agua potable, por lo que cada vez se explotan más las aguas subterráneas. Esta práctica se traduce a menudo en sobreexplotación de los acuíferos, hundimientos del terreno y uso de agua subterránea inadecuada para el consumo humano. La utilización creciente de agua subterránea está causando graves problemas sanitarios en muchos países, especialmente en el área del sudeste asiático. La presencia de elevados niveles de arsénico en el agua subterránea es uno de los problemas medioambientales más graves y extendidos a los que se enfrenta actualmente la humanidad (Henke, 2009; Mandal et al., 2002). La gravedad del problema se deriva del hecho de que las aguas subterráneas son el único recurso hídrico disponible en grandes áreas del planeta, empleadas tanto para el abastecimiento de la población como en usos agrícolas y ganaderos. Se estima que más de 100 millones de personas están en riesgo de consumir agua subterránea con niveles de arsénico y otros elementos geogénicos tales

como Mo, W, Sr, Ba, U, V, considerados tóxicos. En las dos últimas décadas se han detectado y documentado acuíferos severamente contaminados con arsénico en el sudeste asiático (Bangladesh, China, India, Nepal, Camboya, Vietnam...) y en América (Argentina, Chile, México, Estados Unidos...). Aunque de menor gravedad y extensión, en Europa (Hungría, Francia, España, Reino Unido...) también se han detectado acuíferos cuyas aguas contienen niveles de arsénico superiores al límite máximo de 10 µg/L recomendado por la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2001).

El siguiente mapa señala las áreas del planeta donde se han documentado aguas subterráneas contaminadas por arsénico:



Fig. 1.2. Principales áreas afectadas por altos niveles de As en las aguas

Puede observarse que, en un buen número de casos (etiquetados en el mapa como M o C), la presencia de arsénico en el agua tiene un origen antrópico, relacionado con actividades mineras e industriales. No obstante, el arsénico presente en aguas subterráneas tiene generalmente un origen natural (A y G), ya que forma parte de las rocas y minerales del suelo y puede ser movilizado por la actividad microbiana del suelo y por la lixiviación de las rocas causada por fenómenos erosivos (precipitaciones, irrigación de suelos agrícolas...). La contaminación de origen natural es mucho más compleja porque es más difícil de predecir y prevenir, y porque los acuíferos afectados suelen estar ubicados en las cuencas de los ríos,

regiones densamente pobladas que someten el acuífero a una sobreexplotación que agrava aún más el problema.

En Bangladesh, el caso más documentado, el origen del As en las aguas proviene de la existencia de un lecho rocoso rico en arsénico en la cuenca del río Brahmaputra, que filtra el agua potable bombeada a la superficie por miles de pozos. Los niveles de arsénico del agua son tan altos que la Organización Mundial de la Salud describe la contaminación por arsénico en el suministro de agua como "el mayor caso de envenenamiento masivo de la población registrado en la historia". Sin embargo, el arsénico no sólo afecta al agua potable, sino que tiene un efecto importante en los productos agrícolas y ganaderos, contaminando también el arroz, principal alimento de la población.

En Europa también se han detectado acuíferos afectados por elevados niveles de arsénico en países como Reino Unido, Francia, Hungría o España (*O'Reilly et al, 2010*). *En España, los datos epidemiológicos en relación con la ingesta de arsénico en el agua de bebida son prácticamente inexistentes. Los primeros estudios en relación con niveles de arsénico en aguas de abastecimiento de origen subterráneo se realizaron en Salamanca (Blanco et al., 1998) y en Madrid (Hernández et al., 2002), detectándose niveles de arsénico superiores a 50 µg/L.* En España se han detectado problemas de contaminación significativos en las Marismas del Pinar, Huelva (causado por cenizas de pirita procedentes de la planta de fosfórico de Fertiberia, que cerró en el año 2000), en la cuenca del Tajo y en la cuenca del Duero (*Gómez et al, 2006*). Las comarcas más afectadas de Castilla y León son Tierra de Pinares (Valladolid), El Carracillo y Las Cogotas (Segovia) y La Moraña (Ávila), donde se cree que la presencia de As es debida a procesos de desorción relacionados con intercambio iónico y favorecidos por la recirculación del agua causada por el bombeo de los acuíferos (*Moyano et al., 2003*).

La siguiente tabla (*Nordstrom, 2002*) muestra algunas estimaciones relacionados con la presencia de As en las aguas subterráneas de diversos países: población potencialmente expuesta, concentración y condiciones ambientales de los acuíferos afectados. A la vista de los trabajos publicados en fechas más recientes, cabe pensar que el problema a nivel mundial es aún más grave de lo que pueda deducirse de esta tabla, pues el número de regiones y países afectados no cesa de crecer.

Tabla 1.1. Estimación de población expuesta a altos niveles de As en aguas de bebida

País	Población expuesta	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Origen: Condiciones ambientales
Bangladesh	30.000.000	<1 a 2500	Natural: Sedimentos deltaicos y aluviales con fosfato y materia orgánica elevados.
Oeste Bengala	6.000.000	<10 a 3200	Similar a Bangladesh
Vietnam	>1.000.000	1 a 3500	Natural: Sedimentos aluviales
Tailandia	15.000	1 a >5000	Antropogénico: minería
Taiwan	200.000	10 a 1850	Natural: pizarras arcillosas, zonas costeras
Mongolia	500.000	1 a 2400	Natural: sedimentos aluviales y lacustres, alta alcalinidad
Argentina	2.000.000	1 a 9900	Natural: rocas volcánicas, aguas termales, alta alcalinidad
Chile	400.000	100 a 1000	Natural y antropogénico: rocas volcánicas, cuencas cerradas, minería
Brasil	--	<1 a 350	Minería del oro
México	400.000	8 a 620	Natural y antropogénico: rocas volcánicas, minería
Alemania	--	<10 a 150	Natural: areniscas mineralizadas
Hungría, Rumanía	400.000	<2 a 176	Natural: sedimento aluvial, materia orgánica
España	>50.000	<1 a 200	Natural: sedimentos aluviales
Grecia	150.000	--	Natural y antropogénico: minería y aguas termales
Reino Unido	--	<1 a 80	Minería
USA, Canadá	--	<1 a >100000	Natural y antropogénico: minería, CCA, aguas termales, cuencas cerradas, sedimentos aluviales
Ghana	<100.000	<1 a 175	Natural y antropogénico: minería del oro

En el verano del año 2000, a raíz de la realización de análisis químicos en las aguas que abastecían a la población de Íscar (Valladolid), se detectaron altos contenidos de arsénico que superaban la concentración máxima admisible establecida por la Reglamentación Técnico Sanitaria vigente en aquel momento (50 $\mu\text{g/l}$). Posteriores análisis en otras localidades confirmaron la verdadera envergadura del problema, ya que los altos contenidos de arsénico en las aguas subterráneas se extendían por un amplio sector de la Cuenca del Duero que comprendía la zona de Tierra de Pinares (Valladolid), El Carracillo y Las Cogotas (Segovia) y La Moraña (Ávila) y afectaba los abastecimientos de más de 40 poblaciones.

Ante la alarma social y sanitaria que suponía las altas concentraciones de esta sustancia en aguas para consumo humano, la Junta de Castilla y León puso en marcha en 2002 un plan de trasvase de agua desde el río Eresma a buena parte de los municipios afectados situados en las provincias de Valladolid y Segovia, con el que intentó solucionar el problema del arsénico

en las comarcas afectadas. No obstante, considerando la importante utilización de las aguas subterráneas en agricultura y ganadería y la acusada interacción de los procesos que intervienen en el funcionamiento de las aguas subterráneas, es imprescindible investigar el origen del arsénico en la región y los mecanismos que intervienen en su dispersión por el medio hidrogeológico.

1.2. Niveles máximos admisibles de arsénico en aguas de bebida

Las investigaciones sobre la toxicidad del arsénico y el riesgo sanitario que supone una prolongada exposición a niveles elevados de este elemento en las aguas de bebida han llevado a la Organización Mundial de la Salud, O.M.S. a reducir paulatinamente los niveles máximos recomendados. El objetivo primario de los límites recomendados por la O.M.S. para la calidad del agua potable es la protección de la salud pública, teniendo en cuenta el principio de precaución para que las aguas destinadas al consumo humano puedan consumirse con el más amplio margen de seguridad durante toda la vida (por el grupo de población más vulnerable) sin que suponga un riesgo para la salud. Los límites tiene la intención de ser usados como bases para el desarrollo de la normativa nacional para asegurar la seguridad del abastecimiento público de agua, aunque los valores límites recomendados no son límites obligatorios.

La primera versión de la Normativa Internacional para el Agua Potable de 1958 incluye al arsénico en la categoría de elemento tóxico que, si se presenta en las provisiones de agua potable en concentraciones superiores a ciertos niveles, puede dar lugar a incrementar el peligro real para la salud. En 1958 la O.M.S. estableció 0.20 mg/L como concentración permisible. La normativa actualizada de 1963 mantuvo al arsénico en la misma categoría y estableció una concentración más estricta de 0.05mg/L. Una norma actualizada en 1971 mantuvo al arsénico en la categoría de sustancias tóxicas y reafirmó el valor de 0.05 mg/L.

En 1984, las categorías de tóxico para sustancias específicas en las publicaciones anteriores se abolieron y el arsénico entró en la categoría de los constituyentes inorgánicos importantes para la salud (OMS, 1984), recomendando 0.05 mg/L como valor límite. La siguiente edición de la OMS-GDQW (1993) estableció un valor límite provisional de 0.01

mg/L (10 µg/L) de arsénico en el agua potable. En la actualidad está en estudio una nueva propuesta de reducción a 5 µg/L para paliar los efectos nocivos del elemento. No obstante, este último límite será difícil de conseguir en algunos países debido a las limitaciones tecnológicas en el tratamiento de aguas contaminadas por arsénico.

El objetivo primario del límite impuesto por la O.M.S. para la calidad del agua potable es la protección de la salud pública, teniendo en cuenta el principio de precaución para que las aguas destinadas al consumo humano puedan consumirse con el más amplio margen de seguridad durante toda la vida (por el grupo de población más vulnerable) sin que suponga un riesgo para la salud. Los límites tiene la intención de ser usados como bases para el desarrollo de la normativa nacional para asegurar la seguridad del abastecimiento público de agua, aunque los valores límites recomendados no son límites obligatorios.

La legislación de los diferentes países en materia de aguas potables ha ido en consecuencia adaptándose a esas recomendaciones. Así, en 1942 el U.S. Public Health Service estableció que el nivel máximo de arsénico que podían tener las aguas para el consumo humano fuera de 0.05mg/L. En 1975, bajo las autoridades del Safe Drinking Water Act (SDWA), la EPA rebajó el límite a 50 µg/L. Las legislaciones de otros países adoptaron niveles máximos similares: Reino Unido, 0,2 mg/L; Argentina, 0,12 mg/L; Chile, 0,05 mg/L; Alemania, 0,04 mg/L.

En 1989, la EPA decide revisar el nivel máximo recomendado de As en aguas de bebida, pero hasta el año 2000 no han llegado a ningún criterio nuevo; en esta fecha sólo se llega a la conclusión de que había que poner en marcha unos métodos para la eliminación del arsénico de las aguas de bebida, debido a los grandes efectos que se estaban produciendo en diversas zonas del mundo. Además, se decidió que a principios del 2001 se volverían a debatir los límites máximos permitidos de arsénico en aguas tras observar el funcionamiento de los métodos propuestos para su eliminación. El 22 de Junio del 2001, la EPA estableció el máximo del nivel de arsénico en aguas permitido en 0,01 mg/L(10 µg/L) debido al buen funcionamiento de los métodos del tratamiento de aguas (*EPA, guía del arsénico, 2002*).

Las legislaciones europeas en materia de agua potable han adaptado los límites máximos admisibles de arsénico al valor recomendado por la O.M.S. (*Directiva 98/83/CE, 1998*). En España, el Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero que establece los criterios sanitarios de la

calidad del agua de consumo humano, redujo el nivel máximo permitido para el arsénico de 50 a 10 $\mu\text{g/L}$, adaptando así la Directiva Europea y las recomendaciones de la O.M.S.

1.3. Origen y movilidad del As en aguas subterráneas

Una característica común a todos los acuíferos contaminados por arsénico, tanto en España como en otras latitudes, es el elevado grado de variabilidad espacial en la concentración de arsénico en las aguas subterráneas, hasta el punto de que es muy difícil predecir la concentración del elemento en un pozo concreto a partir de los resultados de los pozos circundantes (*Smedley y Kinniburg, 2002; Carretero et al., 2004; Sahún et al., 2004*). También se han detectado variaciones estacionales no muy bien explicadas hasta la fecha (*Calvo-Revuelta et al., 2003; Vega et al., 2004*).

Desafortunadamente, no es siempre posible identificar las causas de la contaminación de arsénico en el agua subterránea. Determinar las causas y el grado de contaminación requiere estudios de campo y de laboratorio, geológicos, químicos, biológicos y físicos.

El arsénico puede originarse de una o más fuentes antropogénicas o naturales: la inapropiada fabricación, uso y eliminación de productos que contienen arsénico, las extensas aplicaciones de pesticidas y fertilizantes que contienen fosfato, degradación bacteriana de materiales orgánicos naturales o artificiales, etc. Incluso si la contaminación no se origina directamente de los desechos humanos, actividades humanas (como excavaciones, riego) pueden cambiar las condiciones de los materiales geológicos bajo la superficie y causar la liberación de arsénico a las aguas subterráneas.

Se han detectado aguas subterráneas con altos contenidos de arsénico de origen natural en ambientes muy diferentes: (i) cuencas cerradas en zonas áridas y semiáridas, (ii) acuíferos, generalmente aluviales, con condiciones fuertemente reductoras, (iii) aguas geotermales, y (iv) áreas con actividad minera donde se produce oxidación de sulfuros minerales (*Smedley y Kinniburg, 2002; Sahún et al., 2004; García-Sánchez y Álvarez-Ayuso, 2003*). También se han identificado acuíferos con predominio de rocas carbonatadas y gradientes térmicos que presentan elevados niveles de arsénico en sus aguas (Taiwan). Esta variedad de condiciones

ambientales complica la interpretación del origen y procesos que ponen al arsénico en disolución.

Desafortunadamente, no es siempre posible identificar las causas de la contaminación de arsénico en el agua subterránea. Determinar las causas y el grado de contaminación requiere estudios de campo y de laboratorio, geológicos, químicos, biológicos y físicos.

El fenómeno de la existencia de contenidos altos de arsénico de origen natural en las aguas está controlado por tres factores: la fuente primaria de arsénico (litosfera y atmósfera), los procesos de movilización/retención de arsénico en la interfase sedimento-agua, y el transporte de arsénico como especie disuelta en el agua. El arsénico se halla en las aguas naturales como especie disuelta, presentándose habitualmente como oxoaniones de arsénico en dos estados de oxidación, arsénico trivalente, arsenito, y arsénico pentavalente, arseniato. El estado de oxidación del arsénico, y por tanto su movilidad, están controlados fundamentalmente por las condiciones redox (potencial redox, Eh) y el pH. La diferente toxicidad de las especies de As(III) y As(V) junto con los diferentes mecanismos de movilización relacionados con el estado de oxidación del elemento, hacen necesario conocer no solo la concentración total del elemento en el agua, sino también su distribución entre las diferentes especies químicas (especiación del elemento).

Los dos procesos geoquímicos más frecuentes que controlan los procesos sufridos por el arsénico en la interfase agua-sedimento son: reacciones de adsorción-desorción, y reacciones de coprecipitación-codisolución. Tanto arsenito como arseniato son adsorbidos sobre la superficie de una gran variedad de materiales presentes en el medio como son óxidos de hierro, manganeso y aluminio, arcillas o materia orgánica. La desorción del arsénico adsorbido en la fase sólida está condicionada por los cambios en pH, cambios del potencial redox que provocan oxidaciones o reducciones, la presencia de iones competitivos, y los cambios en la estructura cristalina de la fase sólida. Por su parte, las reacciones de coprecipitación-codisolución están controladas por el pH, temperatura, estado de oxidación y concentración de otras especies competitivas en disolución.

Existen varios mecanismos de incorporación de arsénico de origen natural a las aguas: a) oxidación de sulfuros; b) disolución de óxidos e oxihidróxidos de Fe y Mn en condiciones ácidas; c) desorción en condiciones oxidantes a pH alcalino; d) desorción y disolución de

óxidos y oxihidróxidos relacionados con cambios a condiciones reductoras; e) desorción por reducción de superficie específica en la fase sólida; f) desorción por reducción en la carga de superficie de la fase sólida. De estos, los mecanismos que conducen más frecuentemente a la disolución de arsénico de las rocas del subsuelo hacia el agua subterránea (*Smedley y Kinniburgh, 2002*) son:

Desorción de oxoaniones de As(III) y As(V) en condiciones alcalinas ($\text{pH} > 8.5$), en ambientes áridos o semiáridos, que se produce como una combinación de procesos de lixiviación de los minerales del subsuelo y elevadas tasas de evaporación. Este aumento del pH del agua provoca la desorción de especies de arsénico y otros elementos formadores de aniones como vanadio, boro, flúor, molibdeno, wolframio o uranio que estaban ligados a óxidos de hierro o a arcillas. Los oxoaniones de arsénico compiten con los aniones más abundantes en agua como sulfato, bicarbonato o cloruro. Se ha observado que altas concentraciones de carbonato y bicarbonato en aguas subterráneas dificultan la retención del arsénico adsorbido por los minerales que componen el sustrato rocoso de los acuíferos, especialmente óxidos de Fe y Mn y arcillas. El fosfato también ejerce un efecto competitivo, y puede estar presente en las aguas, especialmente cuando el acuífero entra en contacto con suelos agrícolas a los que se ha aplicado fertilizantes inorgánicos. La adsorción y/o desorción del arsénico a óxidos metálicos depende del pH. El As(V) es adsorbido fuertemente en condiciones ácidas, pero a pH alcalino la superficie del mineral está cargada negativamente y promueve la desorción del arseniato y otros elementos formadores de aniones como vanadio, boro, flúor, molibdeno, wolframio o uranio.

El arsénico también puede ser liberado como consecuencia de procesos de oxidación-reducción. La evolución electroquímica, comúnmente mediada por bacterias, comienza con la oxidación de la materia orgánica y la reducción del oxígeno disuelto. El arsénico que hubiera formado complejos con la materia orgánica es liberado en esta etapa. La liberación del arsénico adsorbido también se produce en condiciones fuertemente reductoras a valores de pH próximos a la neutralidad que conducen a la disolución de arsénico de minerales ricos en este elemento, y/o a la disolución en condiciones reductoras de óxidos de hierro(III) y manganeso(IV) que contienen arsénico adsorbido, el cual también pasa a la disolución.

En publicaciones más recientes se describe un tercer mecanismo en el que la liberación de arsénico se produce por condiciones reductoras y actividad microbiana a partir de sedimentos con alto contenido de materia orgánica; estas condiciones aparecen con frecuencia en cuencas fluviales sedimentarias en regiones muy fértiles, como es el caso de Bangladesh y sudeste asiático. Estos procesos se describen en más detalle a continuación.

Atendiendo a las características locales de los acuíferos tales como contenido de iones mayoritarios en el agua, pH, potencial redox, o composición de las rocas sedimentarias, entre otras, *Amini et al. (2008)* han elaborado modelos predictivos para calcular la probabilidad de que el arsénico esté presente en el agua a concentraciones superiores a la recomendada por la Organización Mundial de la Salud (10µg/L). La predicción depende también del tipo de mecanismo de movilización de arsénico implicado, alto pH y condiciones oxidantes o condiciones reductoras. Los mapas que se muestran en la siguiente página reflejan las áreas con mayor probabilidad de presentar niveles elevados de As. Se puede apreciar que los acuíferos previsiblemente contaminados por arsénico están distribuidos por todo el mundo. Cabe destacar que la zona de la cuenca del Duero está coloreada en uno de los mapas (b), indicando una probabilidad elevada de que el As pase al agua en condiciones alcalinas oxidantes. Aunque son solo modelos predictivos, han sido confirmados en la mayoría de acuíferos estudiados.

A la vista de los resultados encontrados por varios autores en los acuíferos de la comarca de Tierra de Pinares, el mecanismo predominante por el que el arsénico pasa al agua subterránea en esta zona parece ser el segundo (b), esto es, aguas subterráneas alcalinas y condiciones oxidantes, aunque en ciertos tipos de aguas los otros mecanismos pudieran tener una contribución significativa (*Sahún et al., 2004; Vega et al., 2004; Carretero et al., 2004*).

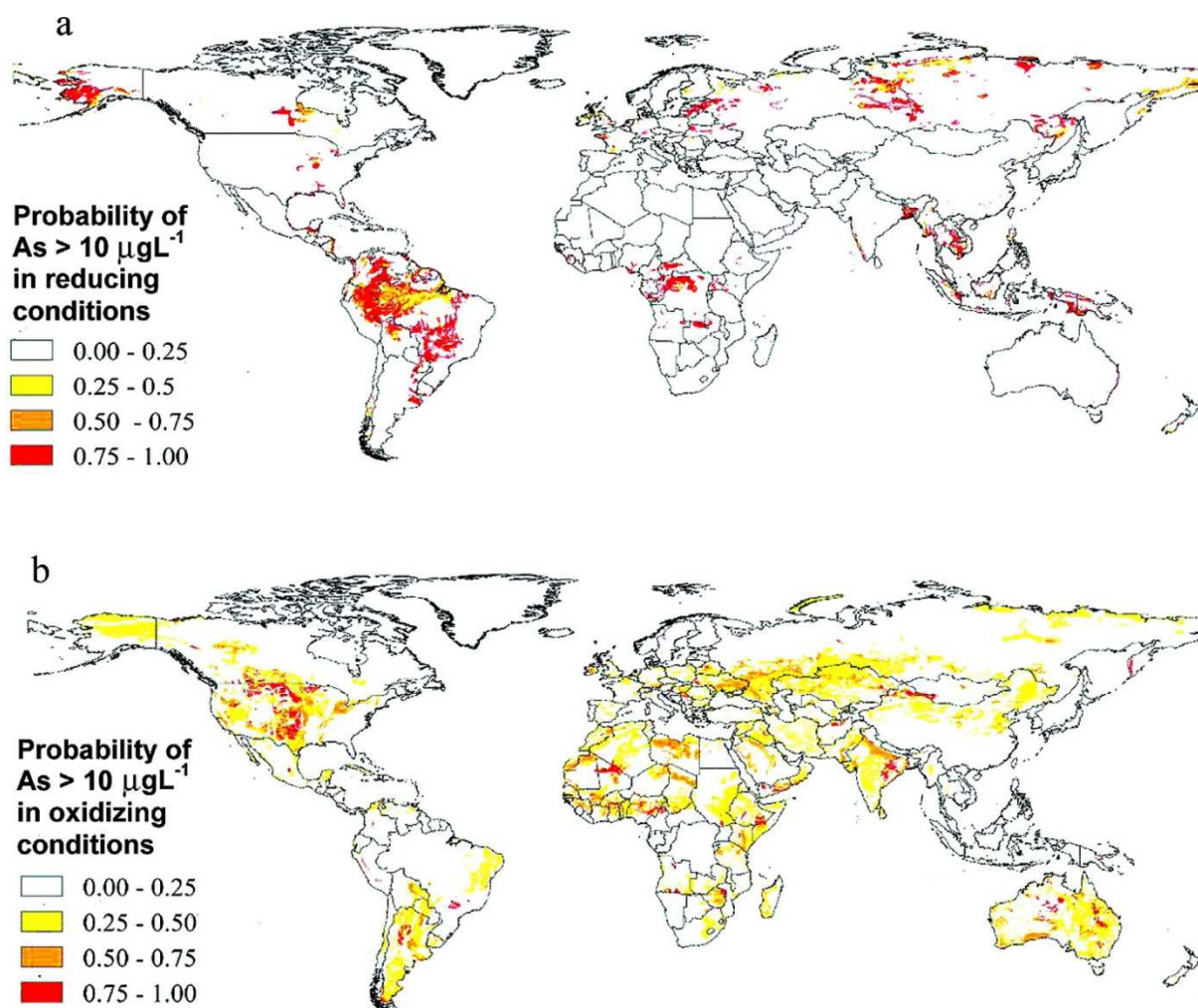


Fig. 1.3. Áreas con mayor riesgo de presentar elevados niveles de As en las aguas subterráneas

Sahún y col. (2004) han detectado elevadas concentraciones de arsénico en la facies Zaratán, que aflora en varios puntos en la comarca de Tierra de Pinares, y que se caracteriza por altos contenidos de materia orgánica. No obstante, otros estudios realizados en zonas con afloramiento de la facies Zaratán por *Vega et al. (2004)* no han identificado niveles de As en ese tipo de sedimentos significativamente superiores al nivel medio de la corteza terrestre (≈ 10 mg/kg). Similares resultados se han obtenido en otras regiones que, estando afectadas por elevados contenidos de arsénico en las aguas subterráneas, presentan no obstante rocas sedimentarias con niveles de As normales, entre 1 y 20 mg/kg, próximos a la abundancia media del elemento en la corteza terrestre. En estos casos, la disolución de arsénico y otros elementos tóxicos parece estar relacionada con uno de estos fenómenos: (i) un aumento del pH de las aguas por encima de 8.5, asociado a la presencia de elevados niveles de bicarbonato, o (ii) la disolución en condiciones reductoras de óxidos de hierro conteniendo

elementos tóxicos adsorbidos. La presencia de elevados niveles de fosfatos, silicatos y materia orgánica en el agua también parece estar correlacionada con mayores niveles de arsénico.

Algunos estudios realizados en las aguas subterráneas de la cuenca del Duero y en acuíferos de otras latitudes, han mostrado que existe una correlación significativa entre los contenidos de As y otros elementos traza, especialmente elementos formadores de aniones (U, W, B, F, V...), en las aguas de estos acuíferos. Esta correlación parece corroborar el primer mecanismo de lixiviación de arsénico descrito, apuntando a un origen geogénico común para estos elementos.

1.4. Técnicas analíticas para la determinación y especiación de arsénico

Existen diferentes métodos para la determinación de arsénico en aguas; muchos de ellos no permiten la especiación del arsénico y otros tienen una baja sensibilidad para la determinación del mismo a nivel de trazas.

La cuantificación de las diferentes especies de arsénico cuando éstas se encuentran a nivel de trazas es una tarea compleja, debido a que las concentraciones son bajas en comparación con los límites de detección de las técnicas analíticas comunes. Los métodos híbridos usados para la especiación y determinación de arsénico consisten en la hibridación entre una técnica de separación y una técnica de análisis.

La técnica de separación más común es HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) en sus diversas modalidades, aunque otras técnicas tales como GC (cromatografía de gases), SFC (cromatografía de fluido supercrítico), o CE (electroforesis capilar) también se han aplicado a este objetivo (*Gong et al., 2002*).

Las técnicas usadas para detectar especies de arsénico deben ser selectivas y sensibles, aunque también es importante la rapidez. Las técnicas de detección de arsénico más frecuentemente usadas son (*Ramesh Kumar et al., 2010*):

- *Espectroscopía de absorción atómica: Dentro de este método existen dos modalidades: (1) usando un sistema generador de hidruros (HGAAS) y (2) usando una cámara de grafito (GFAAS).*
 - (1) *En HGAAS, el arsénico se reduce a arsina mediante un proceso de derivatización química por acción de borohidruro sódico (NaBH_4) en medio ácido. El hidruro liberado en el reactor es arrastrado por medio de un gas portador (argón o nitrógeno) hacia la llama de argón-nitrógeno de un espectrómetro de absorción atómica. Se llegan a determinar concentraciones de arsénico en agua entre 1,4 - 8 $\mu\text{g/L}$. La generación de hidruros puede acoplarse con absorción atómica (AAS), emisión atómica (OES), fluorescencia atómica (HGAFS) o espectrometría de masas (GS), aumentando la sensibilidad y disminuyendo los límites de detección. Sólo los hidruros gaseosos son introducidos al detector y no todos los compuestos de arsénico forman hidruros volátiles.*
 - (2) *GFAAS es otra alternativa analítica para determinar arsénico total. Posee una sensibilidad marcadamente superior a la AAS de llama. La muestra se inyecta en un horno donde se deshidrata primero y se calcina después y donde las sales de arsénico se disocian y el arsénico es atomizado. Se utiliza un espectrómetro de absorción atómica con una lámpara de arsénico de cátodo hueco y la corrección del fondo se puede llevar a cabo mediante efecto Zeeman, lámpara de cátodo hueco de deuterio o efecto Feedback. En combinación con una técnica previa de separación permite especiar As (Welz, 1998).*
- *Espectrometría de emisión atómica acoplada inductivamente a un plasma (ICP-OES): La muestra líquida se transforma en un aerosol y se introduce mediante una corriente de argón en un plasma, en el cual el arsénico es atomizado y donde, mediante una radiofrecuencia acoplada al plasma, se produce un espectro de emisión específico del elemento, el cual es dispersado por un espectrómetro determinando la intensidad de las líneas de emisión. La técnica es usada para análisis multielemental con unos límites de detección de entre 35-50 $\mu\text{g/L}$. Ha sido acoplado a HPLC de manera exitosa, ya que los flujos a los que operan son compatibles. Pero este sistema no proporciona la suficiente sensibilidad para la especiación de arsénico en la mayoría de aguas naturales. Para aumentar la sensibilidad algunos estudios incorporan HG (generador de hidruros) entre el HPLC y ICP-OES.*

- *Espectrometría de masas acoplada inductivamente a un plasma (ICP-MS)*: La muestra líquida se introduce en un plasma mediante una corriente de argón donde se le aplica una alta temperatura y una radiofrecuencia. Los iones generados son extraídos desde el plasma y separados en el espectrómetro de masas en función de su relación m/z mediante la utilización de un analizador de cuadrupolos o de sector magnético. Tiene unos límites de detección de 0,02-1 $\mu\text{g/L}$. Junto con HPLC ofrece varias ventajas como la alta sensibilidad, *simplicidad, rapidez y precisión* y la posibilidad de hacer especiar arsénico (*B'Hymer y Caruso, 2004; Komorowicz y Barańkiewicz, 2011*). Otros estudios acoplan CE (electroforesis capilar) al ICP-MS pero tiene el problema del ajuste del volumen de muestra entre ambos.

- *Técnicas voltamperométricas: Dentro de este método existen dos modalidades: (1) Voltamperometría de redisolución anódica (ASV) y (2) Voltamperometría de redisolución catódica (CSV).*
 - (1) ASV: la técnica es muy sensible aunque sólo determina arsénico(III) libre disuelto, llegando hasta un límite de detección de 0,1 $\mu\text{g/L}$. Es una técnica sensible y reproducible, pero más lenta y laboriosa que las técnicas espectroscópicas. Si se utiliza electrodo de oro, se puede determinar As(III) en una primera etapa; posteriormente se reduce As(V) a As(III) y se determina el As total.

 - (2) CSV: Permite realizar especiación entre As (III) y As (V) determinándolos por separado en distintos medios y a distintos potenciales. Se llegan a determinar concentraciones de arsénico de hasta 0,9 $\mu\text{g/L}$.

- *Espectrometría de fluorescencia atómica con sistema generador de hidruros (HGAFS)*: Se acidifica la muestra y se trata con borohidruro sódico para la generación de arsina. No permite especiación. La arsina es conducido por una corriente de argón hasta una llama, donde se atomiza dando lugar a átomos que se detectan por fluorescencia atómica. Llega a tener unos límites de detección de hasta 0,01 $\mu\text{g/L}$.

Capítulo 2.
OBJETIVOS DEL TRABAJO

El trabajo pretende aportar información sobre la hidroquímica del arsénico en aguas subterráneas procedentes de acuíferos ubicados en la margen sur de la Cuenca del Duero, contaminadas de forma natural por este elemento. Para ello ha de investigarse la relación entre la concentración y distribución de las especies de arsénico con otros parámetros hidroquímicos en aguas subterráneas a fin de ahondar en la comprensión de los fenómenos que rigen la movilización de As en los acuíferos.

Con este propósito se han tomado muestras en dos áreas diferentes de la cuenca, ubicadas en las comarcas de Tierra de Pinares (Segovia) y La Moraña (Ávila), y se han analizado exhaustivamente para poder caracterizar la hidroquímica de los acuíferos.

Para ello se realizaron una serie de experiencias, tales como:

- Elección de las condiciones experimentales para la especiación de As por HPLC/ICP-MS: composición y pH de la fase móvil, estudio de la estabilidad de la señal analítica de As(III) y As(V), efecto de interferentes químicos potenciales presentes en las muestras de agua a analizar.

- Elección de las condiciones de conservación de las muestras de agua subterránea para estabilizar las especies de As.

- Investigación de la relación entre la especiación de As en aguas subterráneas y otros parámetros hidroquímicos tales como pH, alcalinidad, potencial redox, salinidad, aniones y cationes mayoritarios y elementos traza geogénicos (U, V, Li, Sr, Ba, Mo...).

- Estudio, mediante técnicas estadísticas multivariantes (Análisis en Componentes Principales y Análisis de Conglomerados), de la relación entre las variables estudiadas y de las similitudes entre las muestras analizadas.

La información resultante contribuirá a entender los mecanismos de dispersión de arsénico en los acuíferos afectados por elevados niveles de este contaminante. Esta información es vital para poder establecer las oportunas acciones correctoras y planificar adecuadamente la gestión de los recursos hídricos.

Capítulo 3.
MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Zona de muestreo

La Cuenca del Duero puede considerarse en su conjunto como un acuífero libre, aunque en algunas áreas llegan a reconocerse niveles confinados en las capas más profundas, en relación con la presencia de niveles arcillosos impermeables de carácter discontinuo, que individualizan ambos ambientes. En condiciones naturales, la recarga del acuífero se realiza en su mayor parte a través de la infiltración de agua de lluvia, mientras que el río Duero es la principal descarga. La calidad del agua subterránea de la Cuenca del Duero se ve comprometida por las altas concentraciones de nitrato, arsénico y otros elementos traza geogénicos (U, V, Mo...) en algunas zonas.

El agua subterránea es de vital importancia en las regiones semiáridas de la cuenca, donde los recursos de agua para abastecimiento y riego son primordiales. Grandes volúmenes de agua de excelente calidad pueden ser desestimados por su alta concentración en arsénico y otros elementos tóxicos presentes en concentraciones traza.

La zona afectada por elevados niveles de arsénico en las aguas subterráneas se extiende por la margen izquierda del río Duero, entre los ríos Duratón y Guareña, afectado a un total de 44 municipios situados principalmente en la provincia de Segovia (El Carracillo y Las Cogotas), sur de Valladolid (Tierra de Pinares) y extremo NE de Ávila (La Moraña).

Han sido dos los sectores escogidos durante esta investigación, el primero de ellos localizado en La Moraña (Ávila), y el segundo en el municipio de Valledado, Tierra de Pinares (Segovia). La Figura 3.1 muestra la localización y la vista aérea de las dos zonas investigadas.

Las muestras analizadas se han recogido en tres campañas de muestreo diferentes:

- Campaña 1: las 7 muestras etiquetadas con el prefijo M1 fueron tomadas por investigadores del IGME (Instituto Geológico y Minero de España) en pozos, manantiales y sondeos de la comarca de La Moraña (Ávila) en julio del 2013.
- Campaña 2: las 10 muestras etiquetadas con el prefijo M2 fueron tomadas por investigadores del IGME (Instituto Geológico y Minero de España) en pozos, manantiales y sondeos de la comarca de La Moraña (Ávila) en mayo del 2014.

- Campaña 3: las 6 muestras etiquetadas con el prefijo Sg fueron recogidas el 28 de abril de 2014 por la autora de este trabajo en pozos superficiales y profundos y en manantiales ubicados en el municipio de Valledado (Segovia).



Fig. 3.1. Localización de las áreas muestreadas en este trabajo

3.2. Procedimiento de muestreo

Las muestras recogidas por la autora de este trabajo se almacenaron en recipientes de polietileno de 500 mL previamente lavados con HNO_3 1M (Kant Pandey et al, 2004) y enjuagados repetidamente con el agua a muestrear. Los recipientes se llenaron completamente para evitar la presencia de una cámara de aire que pudiese provocar reacciones no deseadas, especialmente la oxidación de As(III) a As(V) (Gómez Ariza et al, 2000).

Se determinaron diferentes parámetros *in situ*: pH, conductividad eléctrica, EC, y potencial redox, ORP.

pH y ORP se midieron con sendos milivoltímetros de campo CRISON mod. 507 equipados respectivamente con un electrodo combinado de vidrio y un electrodo combinado con punta de Pt. Las medidas de potencial, referidas al electrodo de referencia de Ag/AgCl, KCl 3M, se corrigieron sumándoles 220 mV para referirlas al electrodo normal de hidrógeno y se emplearon para predecir la especie predominante de As inorgánico en el agua, con ayuda del diagrama Eh-pH.

EC se midió con un conductivímetro CRISON mod. 524 calibrado con un patrón de conductividad de 12.88 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a 25°C (KCl 0.100 M).



Fig. 3.2. Sondas de campo para medidas de pH, ORP y EC *in situ*

En cada punto de muestreo se tomaron dos muestras distintas destinadas a diferentes ensayos: (i) una muestra neutra, sin adición de conservante, para el análisis de alcalinidad y de aniones por cromatografía iónica; (ii) una muestra acidificada con HNO_3 destinada al análisis de metales. Además, en los puntos de muestreo Sg-001, Sg-002 y Sg-005 se tomaron dos muestras adicionales a las que se añadió AEDT y H_2SO_4 para completar, junto con las muestras neutra y acidificada con HNO_3 , el experimento de conservación de las especies de arsénico. La concentración de todos los conservantes empleados fue 10mM.

Las muestras se transportaron en neveras refrigeradas al laboratorio, donde se conservaron a 4°C hasta su análisis.



Fig. 3.3. Procedimiento de toma de muestra y medida de parámetros físico-químicos in situ

Las Tablas 3.1 y 3.2 recogen información sobre la localización geográfica y los parámetros medidos in situ en las muestras obtenidas en las campañas 1 y 3.

Tabla 3.1. Muestras tomadas en la campaña 1 en La Moraña (Ávila)

Muestra	X UTM	Y UTM	pH	EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
M1-001	352705	4514878	7.25	1292
M1-002	359575	4512737	7.47	1940
M1-003	344849	4521678	9.31	526
M1-004	331361	4518308	7.30	621
M1-005	366764	4527921	7.43	745
M1-007	344886	4522154	7.15	702
M1-008	363089	4522566	7.49	749

Tabla 3.2. Muestras tomadas en la campaña 3 en Valledado (Segovia)

Muestra	Hora	X UTM	Y UTM	pH	EC ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	ORP (mV)
Sg-001	17:00	424884	4125179	7.71	520	426
Sg-002	17:30	379265	4584032	7.65	798	400
Sg-003	18:15	426654	4124033	7.35	3100	372
Sg-004	19:10	424916	4123356	8.72	1109	358
Sg-005	19:50	424308	4123571	7.73	3260	356
Sg-006	20:30	421846	4123775	7.52	401	425

3.3. Procedimientos analíticos

3.3.1. DETERMINACIÓN DE ANIONES POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA

La fase estacionaria empleada en cromatografía iónica es un intercambiador aniónico de baja capacidad, mientras que como fase móvil suelen utilizarse disoluciones acuosas de sales de ácidos débiles mono o dibásicos. La detección de los iones se realiza mediante conductimetría. El detector de conductividad se combina habitualmente con un sistema supresor postcolumna, consistente en un intercambiador catiónico protonado que disminuye la conductividad de la fase móvil, transformando los aniones de dicha fase móvil en sus correspondientes formas ácidas neutras, y reteniendo los cationes. Los iones se identifican a partir de sus tiempos de retención, mediante comparación con los patrones de calibración. La determinación cuantitativa se realiza midiendo la altura o área del pico (*Eith et al, 2007; Schäfer et al., 2003; UNE EN ISO 10304-1, 2009*).

La determinación de aniones fue realizada a temperatura ambiente con un cromatógrafo iónico *Metrohm792 IC BASIC* equipado con un detector de conductividad, bomba peristáltica y módulo de supresión química. Se empleó una columna de separación aniónica *Metrosep A Supp4*, de 250 mm de longitud y 4.0mm de diámetro interno, empaquetada con partículas de alcohol polivinílico recubiertas de grupos amonio cuaternario. Para proteger la columna se empleó una precolumna *Metrosep A Supp 4/5 Guard*.



Fig. 3.4. Cromatógrafo iónico empleado en la determinación de aniones

Como fase móvil se empleó una disolución 1.8 mM Na₂CO₃/1.7mM NaHCO₃ con un flujo de 1 mL/min. La fase móvil se filtró a través de membranas de nylon de 0.45µm de tamaño de poro y se desgasificó en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos.

El sistema de supresión química postcolumna se regeneró con una disolución de H₂SO₄50mM y posteriormente agua ultrapura para eliminar el exceso de ácido.

Se prepararon 7 multipatrones de calibración de concentraciones comprendidas entre 0.5 y 15 mg/L de F⁻, Cl⁻ y Br⁻, y entre 1 y 30 mg/L de NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄⁻² y SO₄²⁻, por dilución de una disolución multipatrón concentrada de aniones conteniendo 50 mg/L de F⁻, Cl⁻ y Br⁻ y 100 mg/L de NO₂⁻, NO₃⁻, PO₄⁻² y SO₄²⁻. Esta disolución madre se preparó disolviendo en agua ultrapura las cantidades apropiadas de las correspondientes sales sódicas o potásicas, previamente desecadas a 105 ± 5 °C. En el caso de F⁻, Br⁻ y NO₂⁻ se empleó un patrón comercial de 1000 mg/L. Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada, con una conductividad inferior de 18 µS·cm⁻¹.

Muestras y patrones se filtraron con filtros de jeringa de nylon de 0.45µm de tamaño de poro y 25 mm de diámetro y se inyectaron en el cromatógrafo (volumen de inyección, 20 µL). Las líneas de calibrado se construyeron representando el área de pico (µS/(cm·min)) frente a la concentración de anión (mg/L). Las muestras se diluyeron con agua desionizada cuando fue necesario hasta que su concentración entró dentro del rango de calibración.

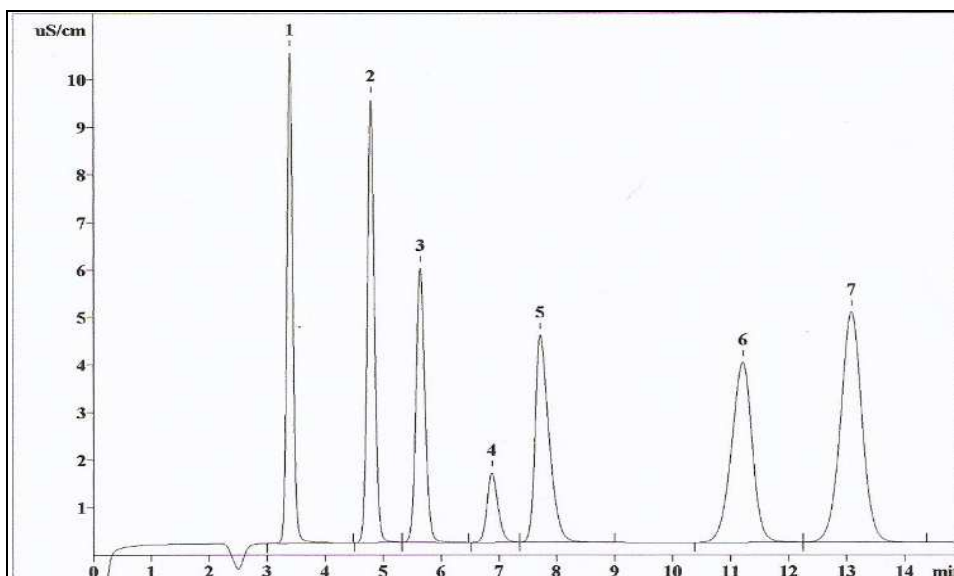


Fig. 3.5. Cromatograma correspondiente a un patrón de los 7 aniones analizados

En la gran mayoría de muestras analizadas no se detectó la presencia de bromuro, nitrito ni fosfato.

La Tabla 3.3 muestra los tiempos de retención (min) de los aniones en las condiciones experimentales empleadas.

Tabla 3.3. Tiempos de retención de los aniones determinados por IC.

F^-	Cl^-	NO_2^-	Br^-	NO_3^-	PO_4^-	SO_4^-
3.6	5.1	6.0	7.4	8.3	11.9	14.1

3.3.2. ALCALINIDAD

En aguas naturales, la alcalinidad se debe fundamentalmente a la presencia de bicarbonatos, aunque si el pH del agua es superior a 8.5 es indicativo de la presencia de carbonatos; otros aniones como borato, fosfato y silicato pueden contribuir a la alcalinidad si sus concentraciones son significativas. Su valor puede variar significativamente con el pH del punto final. La muestra se valora con una solución de ácido mineral fuerte hasta pH 8.3 y 4-5. Estos puntos finales determinados visualmente mediante indicadores adecuados, son los puntos de equivalencia seleccionados para la determinación de los tres componentes fundamentales. Con el indicador de fenolftaleína, el pH 8.3 está próximo al punto de equivalencia para las concentraciones de carbonato y dióxido de carbono y representa la valoración de todo el hidróxido y la mitad del carbonato, mientras que el pH inferior (4-5) está próximo al punto de equivalencia para el ión hidrógeno y el bicarbonato y permite determinar la alcalinidad total (*Severiche Sierra et al, 2013*).

Las muestras recogidas en la campaña 1 se valoraron con HCl 0.005M, el cual fue normalizado frente al patrón primario Na_2CO_3 0.001M (0.1043 g en 1 L) empleando heliantina como indicador visual del punto final de la valoración. Las muestras tomadas en la campaña 3 se analizaron con HCl 0.05M, normalizada frente al patrón primario Na_2CO_3 0.025M (0.2650 g en 100mL). La valoración se siguió potenciométricamente con un pHmetro GLP 21 CRISON y se detuvo a pH 4.2.

3.3.3. DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS METÁLICOS MAYORITARIOS

El equipo utilizado fue un ICP-OES Varian725-ES ubicado en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid (LTI-UVa). El equipo se calibró con patrones multielementales preparados por dilución de patrones comerciales de 1000 mg/L (ICP-multielement calibration standard solution X, Scharlau) con agua desionizada. El flujo de plasma utilizado fue 15.0 L Ar/min y de 1.8 L Ar/min como gas auxiliar. La presión del nebulizador fue 180 KPa y el tiempo de lavado, 10 s. Las lecturas fueron tomadas como promedio de 3 medidas replicadas.



Fig. 3.6. Equipo ICP-OES empleado

La tabla siguiente recoge las longitudes de onda empleadas para la cuantificación (en nm):

Tabla 3.4. Longitudes de onda (nm) para la determinación de cationes por ICP-OES

Sr	Na	Mg	K	Ca
407.771	588.995	285.213	766.491	317.933

3.3.4.DETERMINACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA

Los elementos traza se determinaron por ICP-MS en el LTI-Uva con un equipo Agilent 7500c- Inductively Coupled Plasma MassSpectrometer- Octopole Reaction System, equipado con un detector de masas cuadrupolo y con celda de colisión. Al igual que en el ICP-OES, el equipo fue calibrado con patrones preparados por dilución del multipatrón comercial.



Fig. 3.7. Equipo ICP-MS empleado

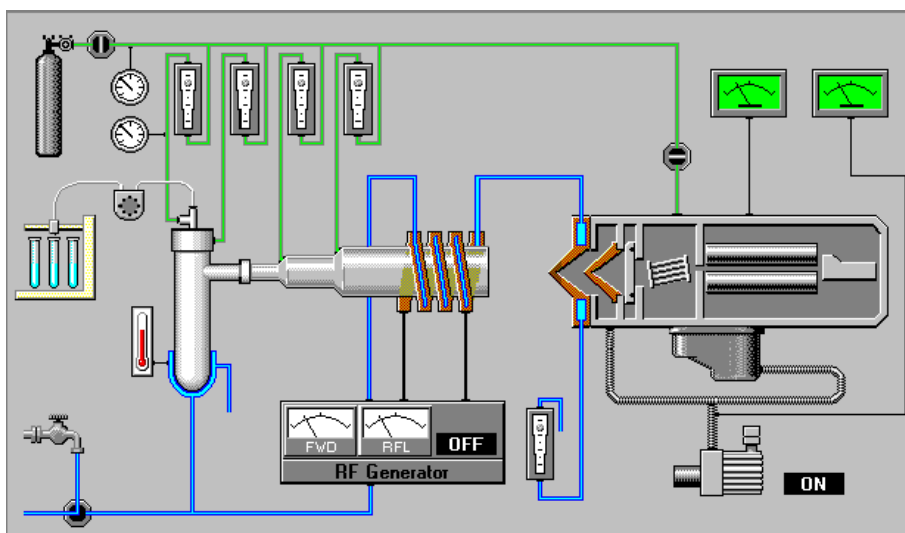


Fig. 3.8. Esquema del equipo ICP-MS.

El flujo del gas portador fue de 1.04 L Ar/min y de 0.15 L Ar/min para el gas auxiliar. La bomba del nebulizador tenía una velocidad de 0.15 rps.

En la Tabla 3.5. se muestran los valores de m/z de las especies determinadas mediante este método:

Tabla 3.5. Relaciones m/z empleadas para la cuantificación de elementos traza por ICP-MS ($z=+1$)

Zn	V	Li	Ba	B	Fe	As	U
65	51	7	137	11	56	75	238

3.3.5.ESPECIACIÓN DE ARSÉNICO

Los experimentos para la especiación de arsénico se realizaron acoplado un cromatógrafo de líquidos HPLC Agilent 1100 Series al equipo ICP-MS anteriormente descrito. La separación cromatográfica de las especies As(III), MMA, DMA y As(V) se llevó a cabo con una columna Agilent G3154A#101 de 4.6 mm de diámetro interno y 150 mm de longitud empaquetada con una resina de intercambio aniónico de polimetacrilato hidrofílico como resina básica.

Las medidas de la especiación de arsénico se llevaron a cabo sin celda de colisión. En experimentos preliminares con muestras reales se comprobó la ausencia de las especies MMA y DMA, por lo que sólo se calibró el equipo con patrones de las especies inorgánicas As(III) y As(V), de concentraciones comprendidas entre 1 y 100 $\mu\text{g/L}$, preparadas por dilución

de disoluciones madre de 1000 mg/L. La disolución madre de As(III) se preparó disolviendo 0.066 g de As_2O_3 (Sigma-Aldrich) en 50 mL de agua desionizada junto con una lenteja de NaOH para facilitar la disolución del óxido; por su parte, la disolución madre de As(V) se obtuvo disolviendo 0.208 g de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich) en 50 mL con agua ultrapura. A partir de estas disoluciones, se preparan el resto con ambas especies mediante dilución con agua ultrapura.

Muestras y patrones se filtraron con filtros de jeringa de nylon de $0.45\mu\text{m}$ de tamaño de poro y 25 mm de diámetro y se inyectaron en el cromatógrafo (volumen de inyección 10 μL).

La fase móvil empleada en la especiación de arsénico en las muestras de agua subterránea contiene 2 mM de tampón fosfato (PBS) y 0.2 mM EDTA- Na_2 , y un pH 6.0. Para preparar esta disolución se mezclaron, en un matraz aforado de 500 mL, (i) 1 mL de una disolución 1 M de PBS preparada pesando 6.4903 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ junto con 0.4207 g de Na_2HPO_4 y enrasando a 50 mL, y (ii) 1 mL de una disolución 0.1 M de AEDT preparada disolviendo 1.8611 g de EDTA- Na_2 en un matraz de 50 mL.

3.3.6. HERRAMIENTAS ESTADÍSTICAS

Las herramientas quimiométricas son de uso indispensable para la interpretación y visualización de datos analíticos medioambientales, donde existe una gran variedad y cantidad de datos que deben ser relacionados. La quimiometría como disciplina tiene la finalidad de interpretar los datos y convertirlos en información útil para el usuario.

Además de los análisis univariantes habituales, se han aplicado herramientas de análisis multivariante, que permitirán encontrar relaciones entre los parámetros estudiados y entre las muestras analizadas. Los cálculos y análisis estadísticos necesarios se han llevado a cabo con el software Microsoft Excel 2010 y el paquete estadístico SPSS v20.

El análisis multivariante incluye un conjunto de métodos estadísticos aplicables cuando se analizan un conjunto de variables en muestras diferentes. A través de los procedimientos multivariantes, que por lo general tienen como objetivo reducir la dimensionalidad de la matriz de datos, se visualizan con mayor facilidad las relaciones existentes entre las variables

y/o entre las muestras. Los análisis multivariantes que han sido utilizados en este trabajo son el Análisis de Componentes Principales (ACP) y Análisis de Conglomerados o Análisis Clúster (AC).

En muchas ocasiones, las variables que se determinan son de naturaleza muy diferente, lo cual implica diferencias en el tipo de escala así como en el orden de magnitud de los elementos correspondientes a cada objeto. En ese caso se pueden producir efectos no deseables, ya que las variables de mayor magnitud tendrán un peso superior y en muchos casos injustificado, en el resultado final. Es conveniente normalizar las variables antes de llevar a cabo el ACP o el AC para compensar esos efectos.

El objetivo del ACP es reducir la dimensionalidad de forma que, al disminuir el número de variables, la visualización sea posible. Para ello se parte de la hipótesis de que (1) no todas las variables contienen información relevante sobre los objetos, y (2) algunas variables están correlacionadas entre sí por lo que la reducción en su número no implica una pérdida significativa de información. Esto último se calcula con la matriz de correlación. Esta matriz es simétrica ya que contiene los coeficientes de correlación entre las posibles parejas de variables. Se puede buscar en la adecuada tabla el valor de r_{crit} (con $n-2$ g.d.l.) para que la correlación resulte significativa. Si dos variables están correlacionadas entre sí, una de ellas puede sustituirse por una función de la otra, lo cual permite reducir la dimensionalidad. La reducción será tanto mayor cuanto mayor sea el número de coeficientes de correlación significativos.

El ACP tiene entidad suficiente por sí mismo, y a veces se emplea solo para encontrar estructuras ocultas entre las variables y así reducir la dimensionalidad, pero en muchas ocasiones es un paso previo al reconocimiento de pautas, ya que la reducción de la dimensionalidad permite visualizar estructuras y relaciones entre los objetos que permitirán su diferenciación en clases.

El Análisis de Conglomerados es un método multivariante de reconocimiento de pautas no supervisado (Non-Supervised Pattern Recognition), que permite clasificar objetos en clases con características similares cuando no se conocen las clases a priori, e incluso cuando no se sabe si los objetos van a poder ser diferenciados entre sí. En este trabajo se ha empleado un modo jerárquico de agrupamiento, de modo que no se especifica a priori el número de

grupos, sino que los objetos se agrupan de forma jerárquica formando un diagrama de árbol o dendrograma, de acuerdo con su similitud. La interpretación de estos métodos consiste en la inspección visual del dendrograma: los objetos y/o variables que aparecen agrupadas en la misma zona del árbol se parecen más que aquellos que se sitúan en ramas más lejanas entre sí.

Como medida de disimilitud o distancia entre objetos y/o variables se ha empleado la distancia euclídea o euclidiana, calculada como raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores de las variables.

$$d_{AB} = \sqrt{\sum_{j=1}^p (y_{Aj} - y_{Bj})^2}$$

El método de agrupamiento seleccionado para unir grupos ha sido el método de Ward, en el cual la distancia entre dos grupos es la suma de los cuadrados de las desviaciones de los puntos a los centroides. El objetivo de esta técnica es minimizar la suma de cuadrados dentro de cada clúster, dando como resultado agrupaciones más compactas (*Massart et al., 1997*).

$$d_{mj} = ((N_j + N_k)d_{kj} + (N_{j+}N_l)d_{lj} - N_jd_{kl}) / (N_j + N_m)$$

Capítulo 4.
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Optimización de la composición de la fase móvil usada en HPLC/ICP-MS

El fabricante de la columna de cambio iónico empleada para la especiación de As en aguas por HPLC/ICP-MS recomienda utilizar como fase móvil una disolución 2 mM de tampón fosfato (PBS) y 0.2mM de AEDT a pH 6.0. Para comprobar la influencia de la concentración de la fase móvil, de su pH y de la presencia de AEDT en la separación cromatográfica de As(III) y As(V), se registraron cromatogramas con fases móviles de diferente composición. En todos los casos se inyectó un patrón conteniendo 10 µg/L de As(III) y de As(V).

Las diferentes fases móviles ensayadas se prepararon mezclando, en diferentes proporciones, los siguientes reactivos. Todas las disoluciones fueron preparadas con agua desionizada (ultrapura):

- Fosfato monosódico 1M: 6.9039 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Scharlau) disueltos en 50 mL.
- AEDT 0.1M: 1.8611 g de la sal disódica del AEDT (Scharlau) en 50 mL.
- Hidróxido sódico 1M: se disuelven 1.9736 g de NaOH (Merck) en 50 mL.

Todas las fases móviles fueron filtradas y desgasificadas por ultrasonificación antes de ser utilizadas. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Fase móvil 1: 2mM fosfato /0.2mM AEDT (pH=6.0). Es la fase móvil recomendada por el fabricante. Se mezclan 1 mL de fosfato monosódico 1M y 1 mL de AEDT 0.1M, se diluyen, se ajusta el pH hasta 6.0 con NaOH 1M y se enrasa en un matraz de 500 mL.

Fase móvil 2: 2mM fosfato /0.2mM AEDT (pH=6.4). Se preparó de la misma manera que la fase móvil 1, pero ajustando el pH a 6.4 con NaOH.

Fase móvil 3: 2mM fosfato /0.2mM AEDT (pH=6.8). Se preparó de la misma manera que la fase móvil 1; el pH se lleva hasta 6.8 por adición de gotas de la disolución de NaOH.

Fase móvil 4: 2 mM fosfato (pH 6.0). Esta fase móvil, sin AEDT, se preparó diluyendo 1 mL de la disolución de fosfato monosódico 1M con agua; tras ajustar el pH a 6.0 con NaOH, la disolución se enrasó a 500 mL.

Fase móvil 5: 10 mM fosfato (pH 6.0). Se diluyen 5 mL de la disolución 1M de fosfato, se ajusta el pH a 6.0 con NaOH, y se diluye a 500 mL.

La Figura 4.1 muestra los cromatogramas obtenidos con cada fase móvil.

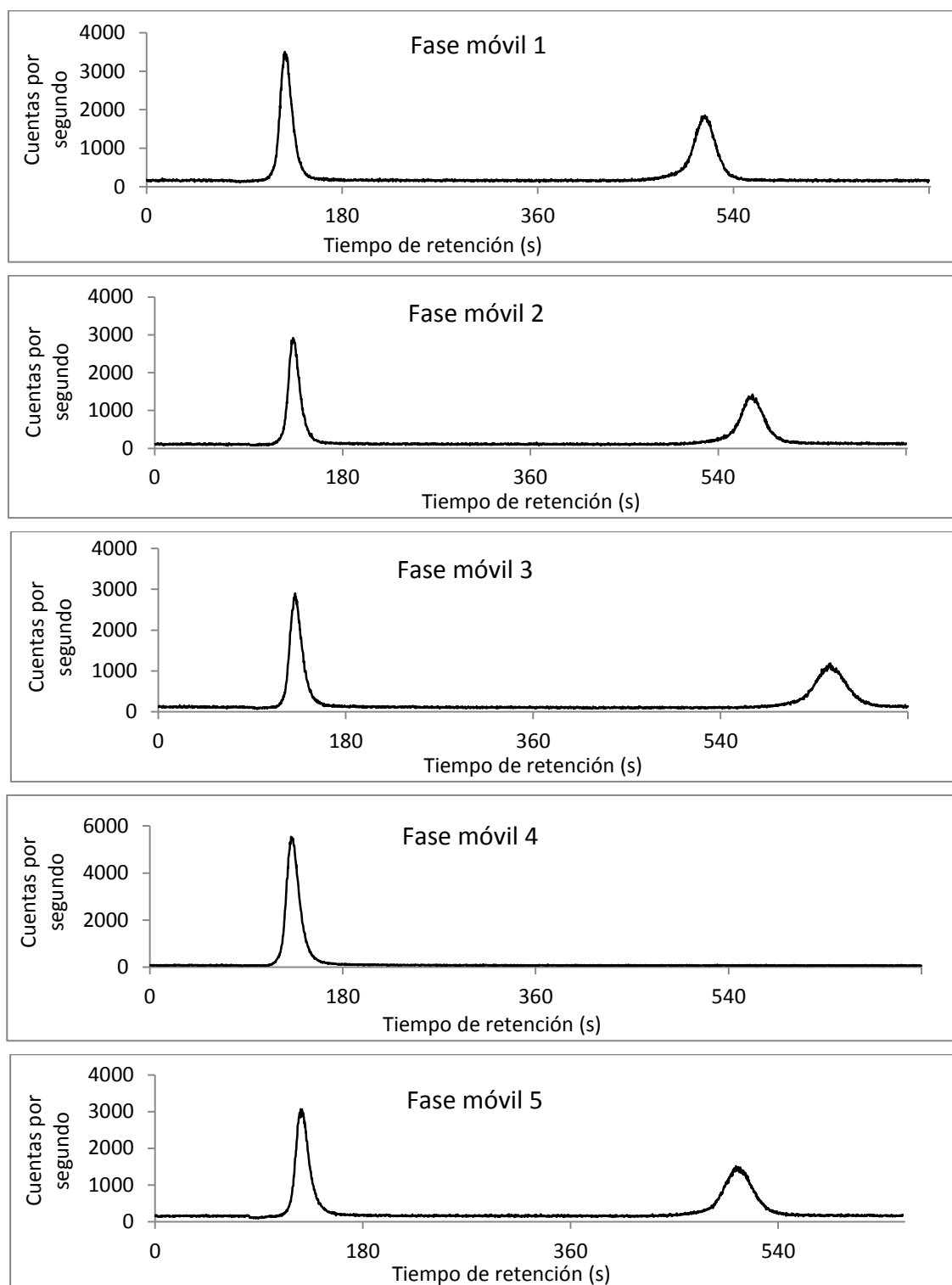


Fig. 4.1. Efecto de la composición de la fase móvil en la separación de As(III) (izda.) y As(V) (drcha.)

Se realizaron tres determinaciones con cada fase móvil para evaluar la repetibilidad. A la vista de los resultados se concluyó que las fases móviles 3, 4 y 5 no son reproducibles para la especie As(V), ya que tanto el área de pico como el tiempo de retención varían

notablemente. Con las fases móviles 1, 2 y 3 se comprueba que el tiempo de retención del As(V) se incrementa al aumentar el pH de la fase móvil, por lo que se selecciona un pH de 6.0 para minimizar el tiempo de análisis.

A la vista de los resultados, se seleccionó para experimentos posteriores la fase móvil 1 (2mM fosfato /0.2mM AEDT a pH 6.0), que además es la recomendada por el fabricante de la columna de separación.

4.2. Reproducibilidad de la señal analítica en HPLC/ICP-MS

El estudio consiste en comprobar, mediante la comparación de las pendientes de diferentes líneas de calibrado obtenidas en distintos días, que el equipo de medida ofrece una respuesta reproducible y que en ese caso se podría prescindir de realizar la calibración completa cada día que se vaya a realizar el análisis.

Se calibró el instrumento durante 5 sesiones de trabajo espaciadas entre sí de 2 a 6 días. Para ello, se prepararon diariamente 6 patrones de calibración conteniendo As(III) y As(V) en concentraciones comprendidas entre 1 y 75 $\mu\text{g/L}$, y se obtuvo la correspondiente línea de calibrado. Las líneas de calibrado obtenidas se muestran en las figuras siguientes:

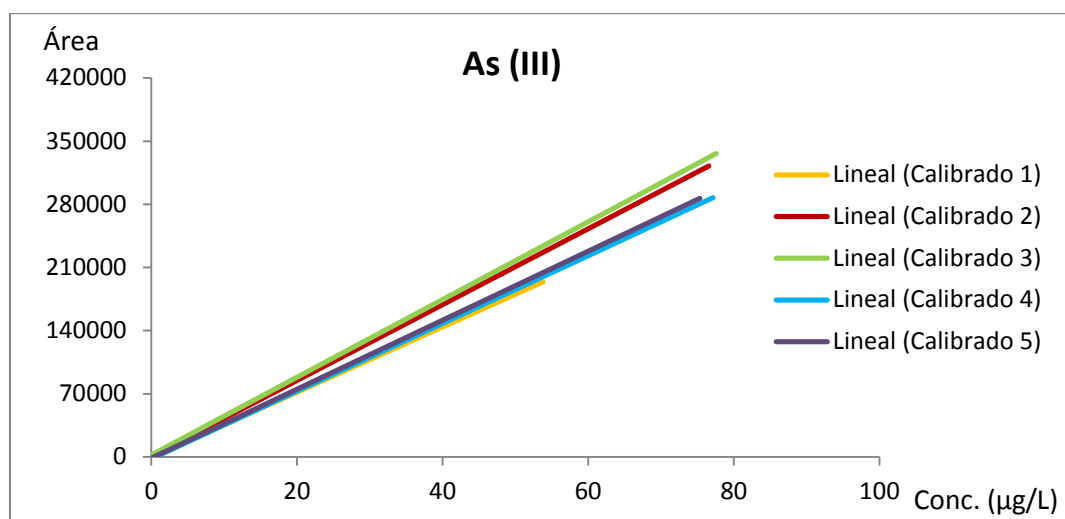


Fig. 4.2. Reproducibilidad de la línea de calibrado de As(III)

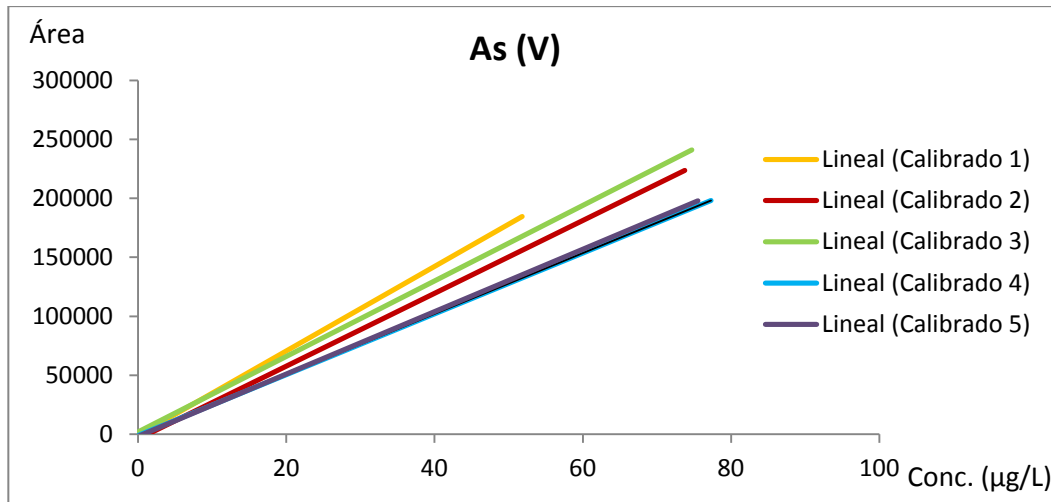


Fig. 4.3. Reproducibilidad de la línea de calibrado de As(V)

La Tabla 4.1 muestra los valores medios de algunos estadísticos de la regresión, de los que se concluye que la variabilidad asociada a las pendientes se encuentra en torno al 12%. Esta variabilidad en la respuesta instrumental es demasiado grande, por lo que se concluye que será necesario calibrar el instrumento cada día que se vaya a realizar análisis de especiación.

Tabla 4.1. Parámetros estadísticos obtenidos en las líneas de calibrado.

	As(III)	As(V)
Pendiente media	3866	2837
Desv. Estándar pendiente	420	377
DER(%)	11	13

4.3. Estabilidad de las especies As(III) y As(V)

Se prepararon patrones de As (III) y As (V) de 50 y 5 µg/L, por separado, por dilución de disoluciones madre de 1000 mg/L recién preparadas. Estas cuatro disoluciones se guardaron refrigeradas y se inyectaron repetidamente cada 2-3 días para comprobar si los patrones de As(III) y As(V) son estables o si, por el contrario, deben ser preparados diariamente.

La figura siguiente muestra los cromatogramas registrados a los 7 días de haber preparado los patrones. Se observa que las disoluciones de As(III) a altas y bajas concentraciones se mantienen constantes a los siete días de su preparación, mientras que el pico del As(V) disminuye con el tiempo, desapareciendo completamente a la concentración más baja. Esto parece indicar una reducción de As(V) a As(III) relativamente rápida.

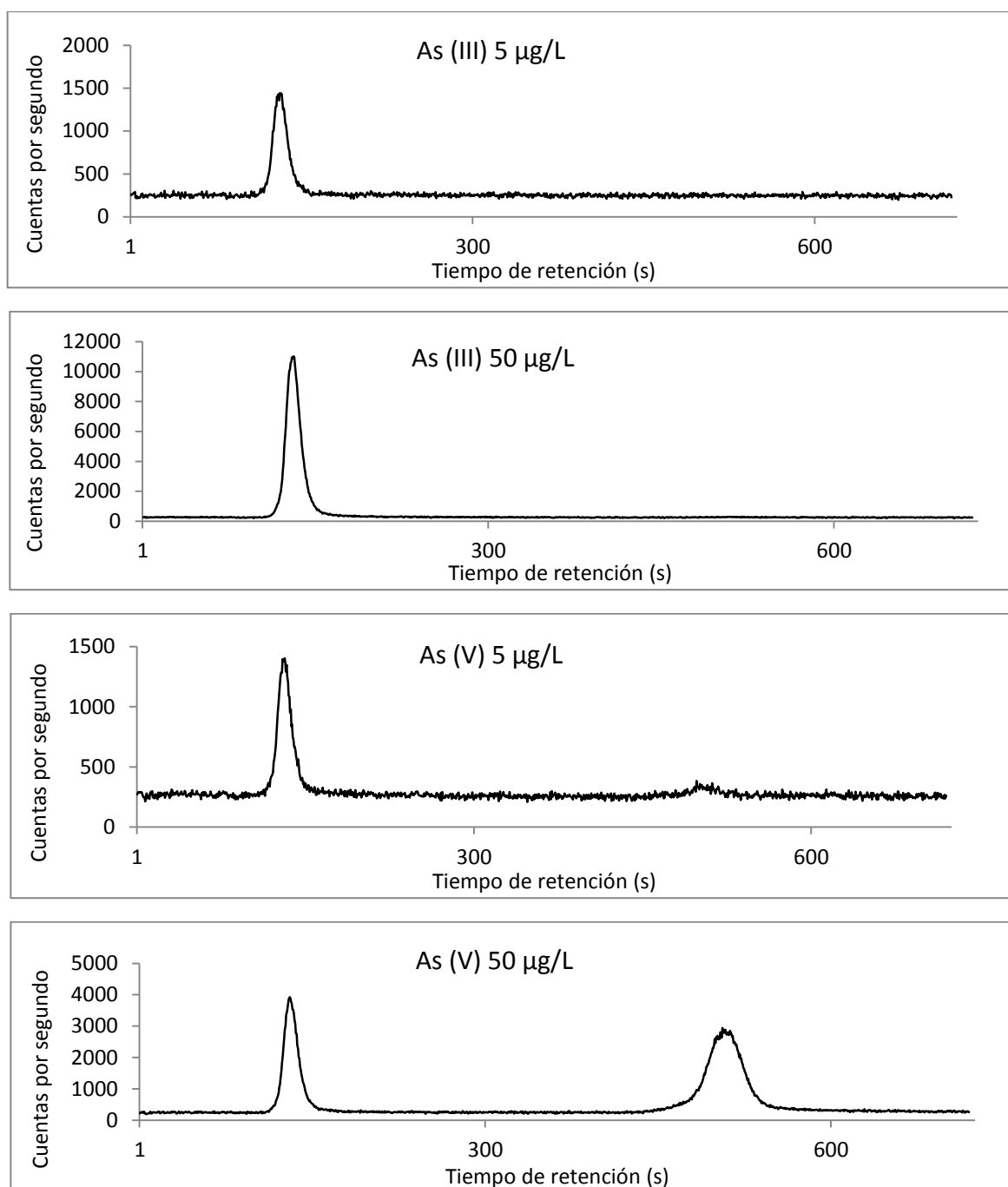


Fig. 4.3. Cromatogramas de patrones de As(III) y As(V) a los 7 días de su preparación

Estos resultados hacen recomendable la preparación diaria de los patrones de calibración, con el consiguiente incremento del tiempo de análisis, ya de por sí largo. Para evitar este inconveniente existe la alternativa de calibrar el HPLC/ICP-MS con patrones conteniendo solo la forma estable, As(III), que no necesitarían una preparación diaria. Otras ventajas de calibrar con patrones de As(III) son, en primer lugar, que el pico del As(III) es más alto y estrecho, cometiendo menos imprecisión en su integración, y en segundo lugar, que el As(III) eluye al cabo de poco más de 2 min, con el consiguiente ahorro de tiempo.

4.4. Efecto de interferentes potenciales

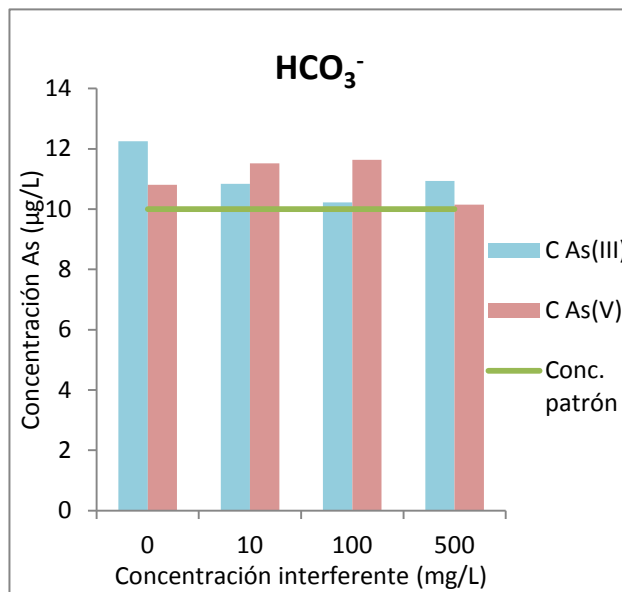
Se procedió a realizar un estudio del efecto ejercido sobre la determinación de las especies de As de varios iones presentes de forma habitual en aguas subterráneas que podrían ejercer un efecto competitivo en la especiación de arsénico por HPLC/ICP-MS. Los interferentes potenciales considerados han sido: (i) los aniones HCO_3^- , SO_4^{2-} y NO_3^- , abundantes en las aguas subterráneas de la cuenca del Duero, y que pudieran competir con los aniones arsenito y arseniato en la etapa de separación cromatográfica basada en procesos de intercambio iónico; (ii) los cationes Ca^{2+} y Mg^{2+} , abundantes en aguas y que pueden provocar la precipitación de arseniatos si se alcanza la condición de sobresaturación; (iii) el anión PO_4^{3-} , con un comportamiento análogo al del arseniato y que, aunque habitualmente presente a nivel de trazas, podría estar presente en acuíferos de áreas agrícolas fuertemente fertilizadas; (iv) Fe^{3+} ya que, aunque presente habitualmente a nivel de trazas, numerosos estudios muestran una fuerte correlación entre los niveles de As y Fe en aguas subterráneas; además el Fe^{3+} precipita fácilmente óxidos coloidales en el agua que pueden adsorber oxoaniones de As(V) y, en menor medida, de As(III), lo que se traduciría en una disminución de los picos de estas dos especies (*Ramesh Kumar et al, 2010*).

En caso de interferencias significativas, habrá que plantear la necesidad de realizar la cuantificación por algún método que minimice el efecto de matriz (calibración por el método de adiciones patrón). Por el contrario, si un anión no interfiere podría emplearse el ácido fuerte de dicho anión como conservante para acidificar y estabilizar las muestras de agua subterránea recogidas (*Kant Pandey et al, 2004*).

Se prepararon disoluciones con una concentración de As(III) y As(V) de 10 $\mu\text{g/L}$ y concentraciones crecientes de cada interferente investigado que oscilaron entre 0.5 y 1000 $\mu\text{g/L}$, dependiendo del interferente a estudiar.

Los reactivos utilizados para preparar las disoluciones de interferentes fueron patrones comerciales ya preparados o sales mono-/disódicas de las especies a estudiar: Fe^{3+} 1000ppm (Scharlau); Ca^{2+} 1000ppm (Scharlau); Mg^{2+} 1000ppm (Scharlau); NaHCO_3 (Panreac); Na_2SO_4 (Panreac); Na_2HPO_4 (Merck).

Los resultados obtenidos del análisis de interferentes a diferentes concentraciones son los siguientes:



En el caso del anión bicarbonato, abundante en algunos acuíferos de la región, la concentración de As (III) y As (V) no varía significativamente al aumentar la concentración de interferente. Por lo tanto, la alcalinidad de la muestra no va a interferir en la etapa de medida.

Los picos obtenidos para las diferentes especies de As mantienen la forma y los tiempos de retención.

Fig. 4.4. Efecto del bicarbonato sobre la estabilidad de las especies de As.

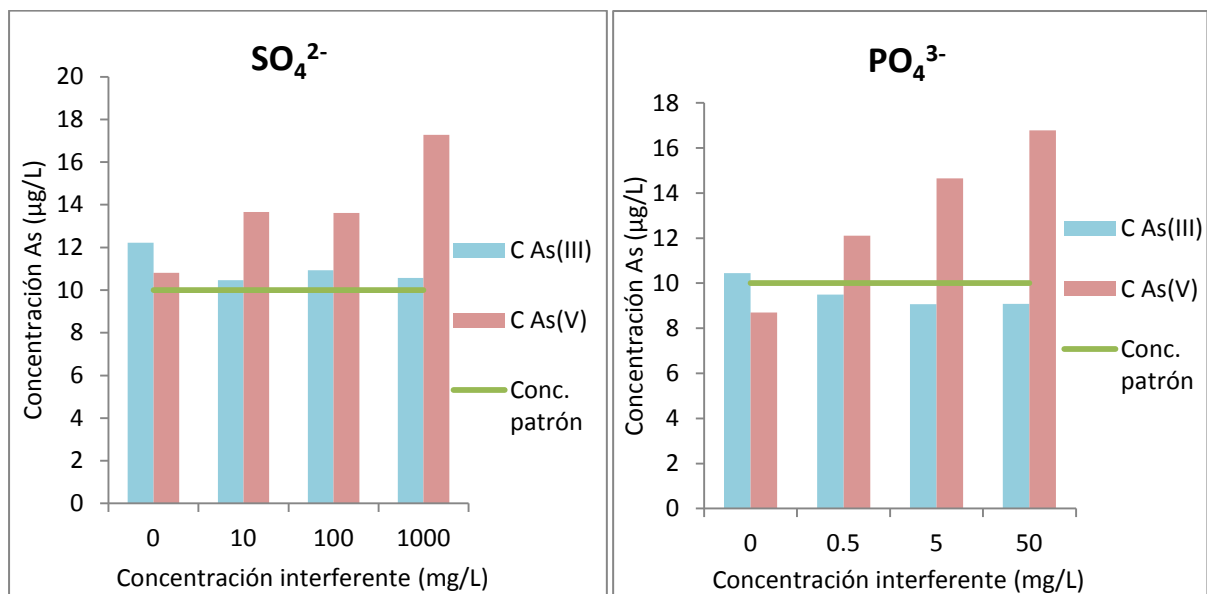
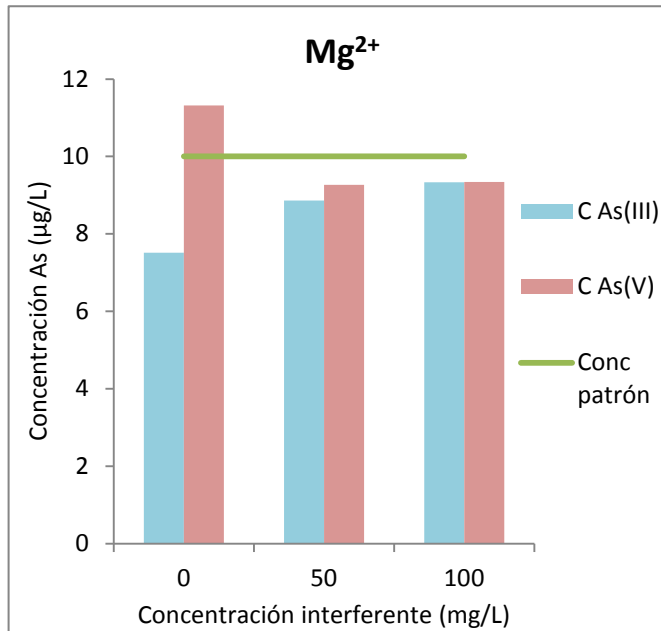


Fig. 4.5. Efecto de sulfato y fosfato sobre la especiación de As por HPLC/ICP-MS.

La presencia de SO_4^{2-} y PO_4^{3-} no alteró los tiempos de retención de As(III) y As(V). No obstante, aunque la variación de la concentración de As(III) no pareció variar significativamente al aumentar la concentración de interferente, la concentración de As(V)

sufrió un incremento aparente, bastante significativo a concentraciones muy altas de los interferentes, evidenciando un fuerte efecto competitivo o un efecto matriz que habría que corregir en el caso de darse esos niveles de concentración en las muestras. No obstante, estas concentraciones tan altas no son habituales en aguas naturales.



La presencia de Mg^{2+} apenas modifica las concentraciones de As(III) y As(V). La concentración de este ión en aguas raramente supera los 100 mg/L, por lo tanto podemos concluir que no va a interferir en la medición. Los picos de As(V) se desplazan ligeramente a la derecha, por lo que en los análisis de muestras reales podrían llegar a aumentar los tiempos de retención.

Fig. 4.6. Efecto del Mg(II) sobre la especiación de As.

La presencia de Ca^{2+} no modifica de forma apreciable la distribución de especies de As. La mayoría de las muestras de agua analizadas no superan una concentración de Ca^{2+} de 100 mg/L, por lo que la especie no va a interferir en los análisis durante la especiación. En los cromatogramas (Fig. 4.8) se observa un nuevo pico próximo al del As(III), pero no genera ningún problema a la hora de integrar. Los tiempos de retención se mantienen.

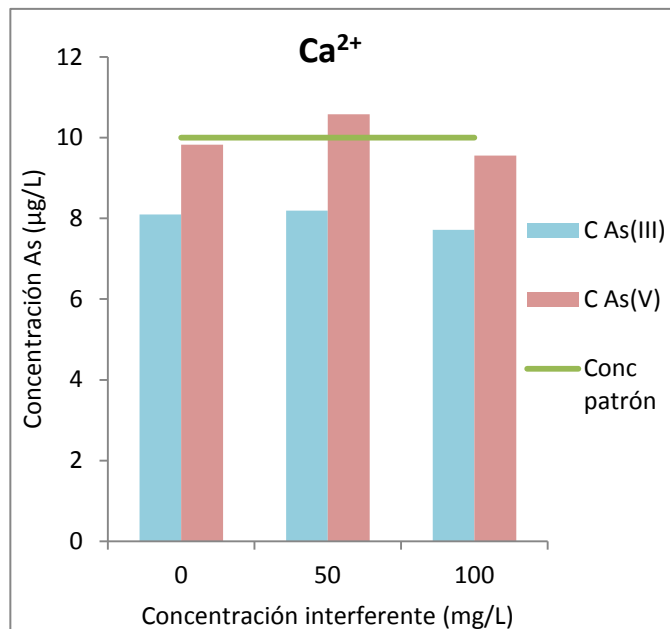


Fig. 4.7. Efecto del Ca(II) sobre la especiación de As

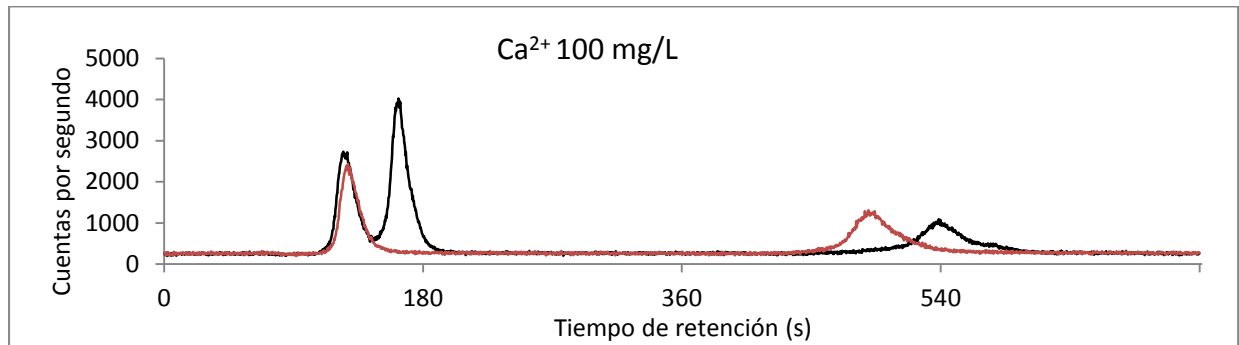


Fig. 4.8. Cromatograma de As(III) y As(V) en presencia de una elevada concentración de Ca(II)

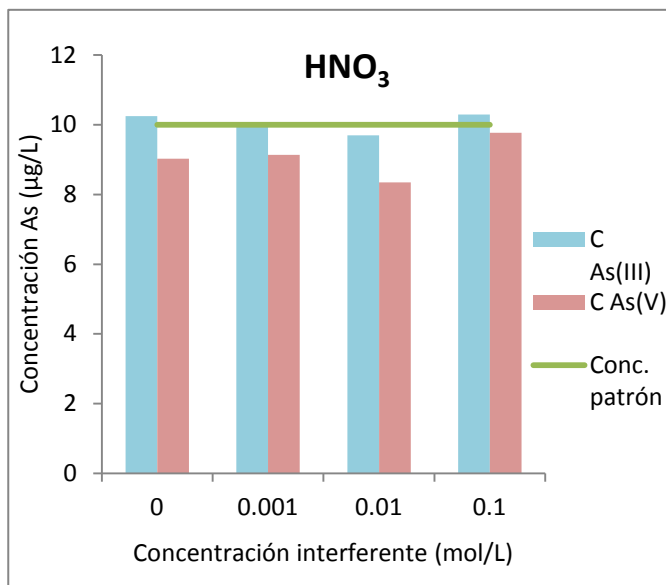


Fig. 4.9. Efecto del Ca(II) sobre la especiación de As

El ácido nítrico no parece afectar a la cuantificación de As por HPLC/ICP-MS. Los picos del cromatograma se mantienen estables, tanto en los tiempos de retención como en el área. A la vista del resultado se decidió usar ácido nítrico como conservante para las muestras en las que se va a determinar la concentración de metales y la especiación de As.

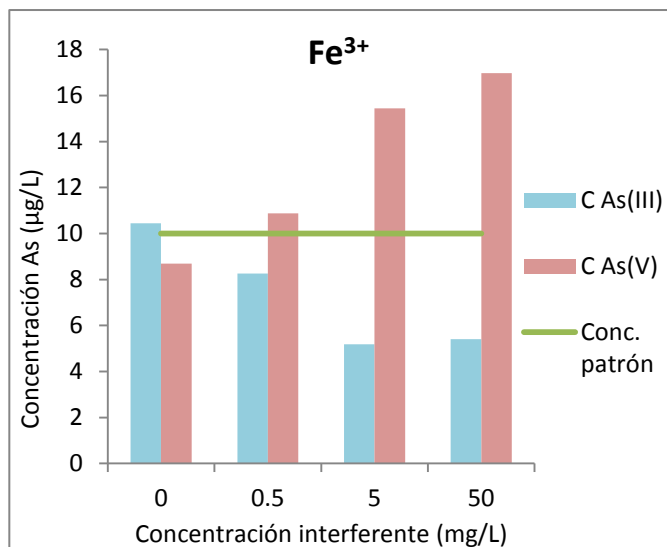


Fig. 4.10. Efecto del Fe(III) sobre la especiación de As

Al aumentar la concentración de Fe(III) en las disoluciones, se observa que la concentración de As(V) aumenta mientras que disminuye la de As(III). Parece indicar que el Fe(III) oxida el As(III) a As(V). A partir de una concentración de 5 mg/L, el hierro podría interferir seriamente en la determinación de las especies de As.

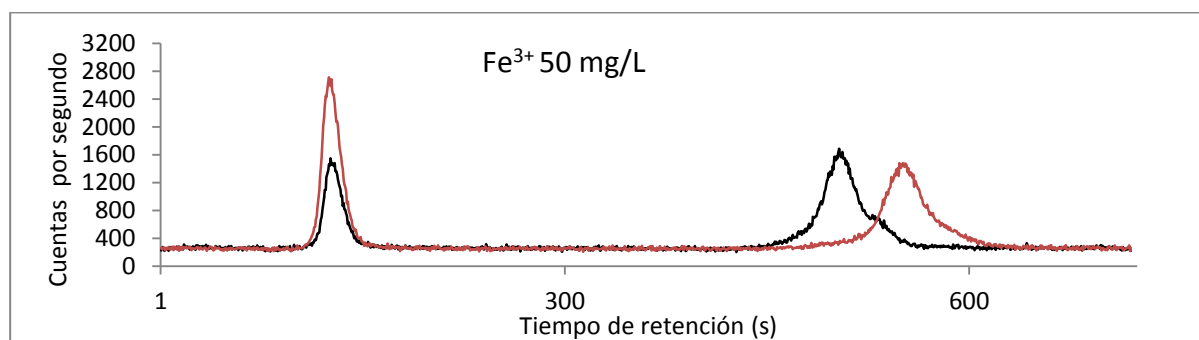


Fig. 4.11. Cromatograma de As(III) y As(V) en presencia de una elevada concentración de Fe(III)

4.5. Elección de un conservante para estabilizar las especies de arsénico

La presencia de sustancias oxidantes o reductoras en la muestra de agua puede alterar la distribución natural de especies de arsénico si las muestras no se analizan inmediatamente, lo que puede falsear los resultados y conducir a conclusiones equivocadas. Es necesario por tanto asegurar que la distribución de las especies de arsénico no se modifica durante el periodo de transporte y almacenamiento de la muestra. Diversos autores han ensayado AEDT, HNO_3 , HCl, HAcO o H_3PO_4 como conservantes, sin haber llegado aún a una recomendación clara puesto que el conservante que funciona en un tipo de agua no lo hace en aguas con diferentes características hidroquímicas (Kant Pandey et al, 2004; Gallagher et al, 2001; Blaine McCleskey et al, 2004; Samanta et al, 2005). Algunos de estos autores concluyen que la mejor forma de estabilizar la muestra es enfriarla en la oscuridad, sin añadir reactivos. Parece por tanto recomendable proceder a ensayar el efecto de estos conservantes propuestos sobre la estabilidad de las especies de As en nuestras propias muestras.

Antes de eso se comprobó si los estabilizantes propuestos en la literatura interfieren en la etapa de determinación cromatográfica de las especies de As. Para ello se realizaron experimentos similares a los descritos en el apartado anterior, empleando ahora como interferentes potenciales aquellos aún no ensayados: AEDT, HCl y HAcO.

Se prepararon disoluciones con una concentración de patrón de As(III) y As(V) de 10 $\mu\text{g/L}$ y concentraciones crecientes del conservante a ensayar con un rango entre 0.005 y 0.1M, dependiendo de la especie. Los resultados se discuten a continuación:

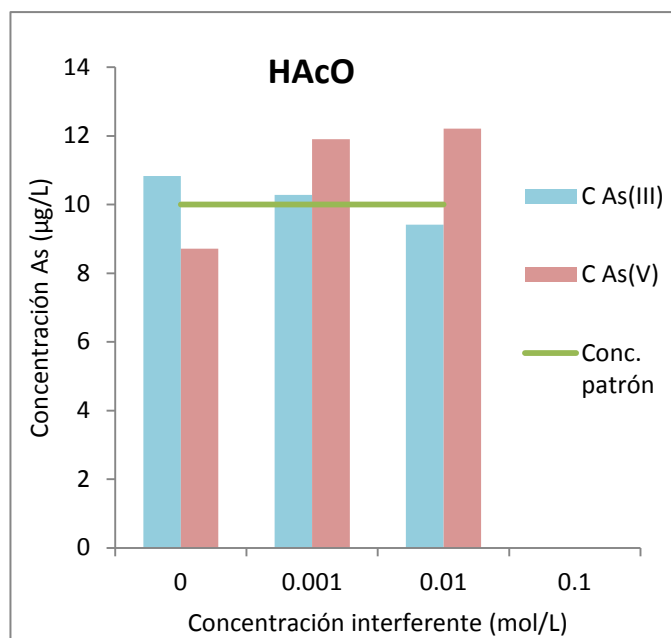


Fig. 4.12. Efecto del ácido acético sobre la especiación de As

El HAcO no parece afectar la determinación de las especies de As en el rango de concentraciones ensayado. No obstante, a la concentración más alta ensayada, 0.1M, el tiempo de retención del As (V) aumento notablemente, por lo que se descartó emplear esta sustancia como conservante.

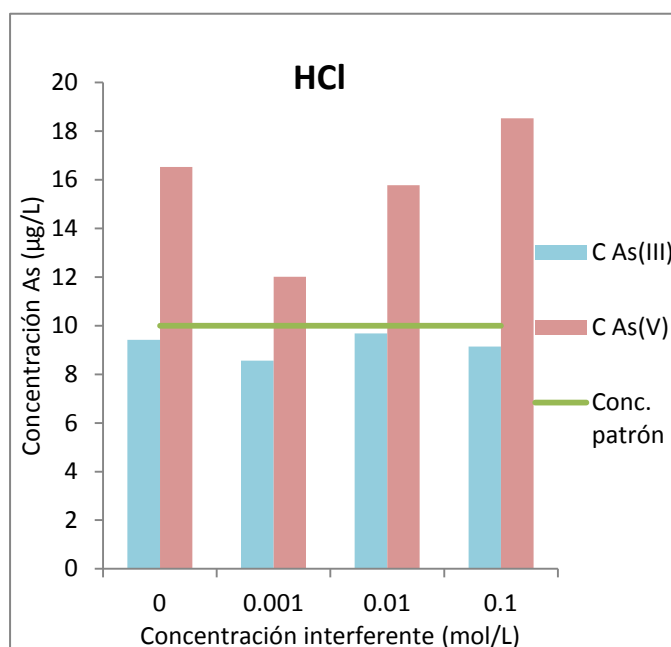


Fig. 4.13. Efecto del ácido clorhídrico sobre la especiación de As

El aumento de la concentración de HCl no modifica de forma notable las concentraciones de As(III) y As(V), aunque en este experimento el As(V) fue mayor en todos los casos que el valor teórico, incluso en ausencia de ácido (posible error de preparación del patrón). El pico del As (V) se deforma al aumentar la concentración de HCl, por lo que se descartó el uso de HCl como conservante.

El AEDT a altas concentraciones parece reducir el As(V) a As(III), lo que es razonable si tenemos en cuenta que el AEDT es materia orgánica y, como tal, presenta cierto carácter reductor. Concentraciones inferiores a 0,05 M no parecen interferir. El tiempo de retención del As (V) disminuye cuando la concentración de interferente es 0.5 mol/L.

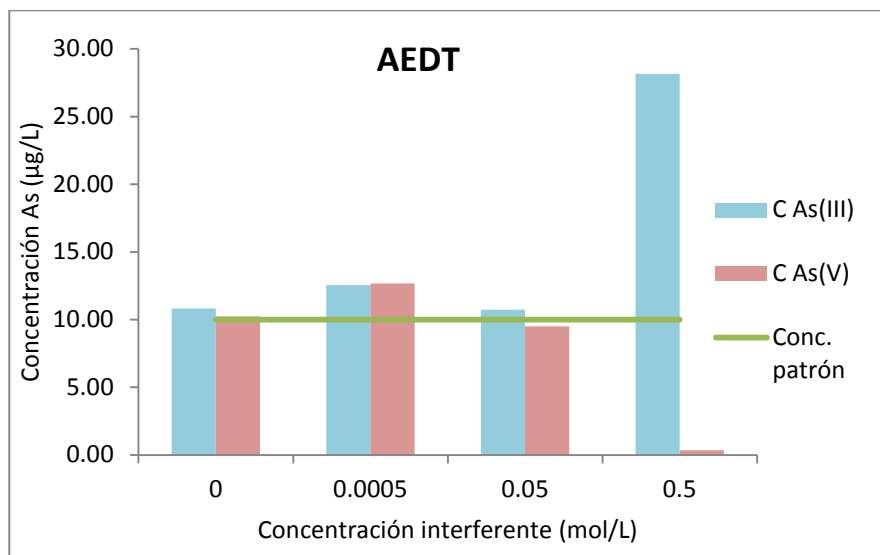


Fig. 4.14. Efecto del AEDT sobre la especiación de As

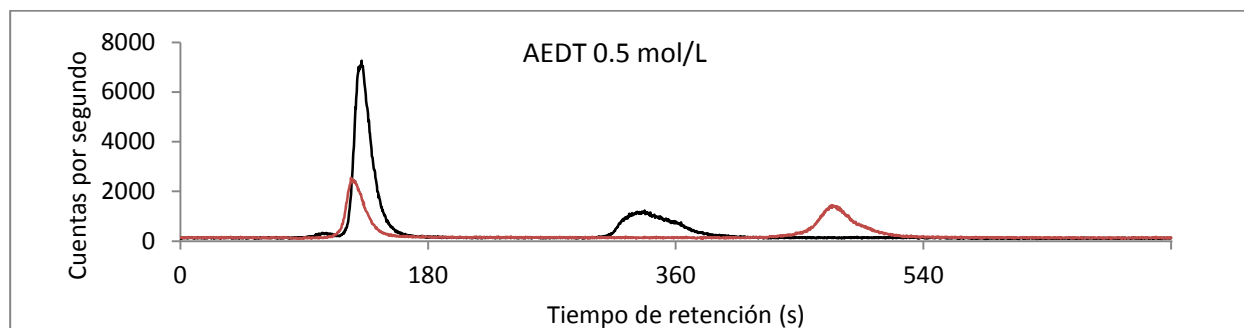


Fig. 4.15. Cromatograma de As(III) y As(V) en presencia de una elevada concentración de AEDT)

A la vista de los resultados obtenidos, los compuestos que se eligieron finalmente como posibles candidatos a ser conservantes fueron HNO_3 , H_2SO_4 y AEDT. Los conservantes se utilizaron en una concentración 10 mM para minimizar el efecto interferente y evitar un desplazamiento de los picos a altas concentraciones como ocurre en el caso del AEDT.

Con los reactivos elegidos se realizó un experimento para evaluar su capacidad para conservar la distribución de especies de arsénico durante un tiempo de almacenamiento de un mes.

El estudio de conservación se realizó con tres muestras (Sg-003, Sg-004 y Sg-006) obtenidas en la campaña de muestreo 3, realizada en el municipio de Vallelado (Segovia). A diferentes porciones de estas muestras se les añadió *in situ* cada uno de los conservantes a ensayar, tal y como se describió en el capítulo 3. Se tomó una cuarta muestra a la que no se añadió ningún conservante y se etiquetó como “Neutra”.

El muestreo se llevó a cabo el día 28 de abril de 2014 y, a partir del día 29 de abril, se realizó un análisis semanal de especiación para hacer un seguimiento de las especies y el poder de conservación de los conservantes. Los resultados obtenidos con cada muestra se presentan en las siguientes figuras:

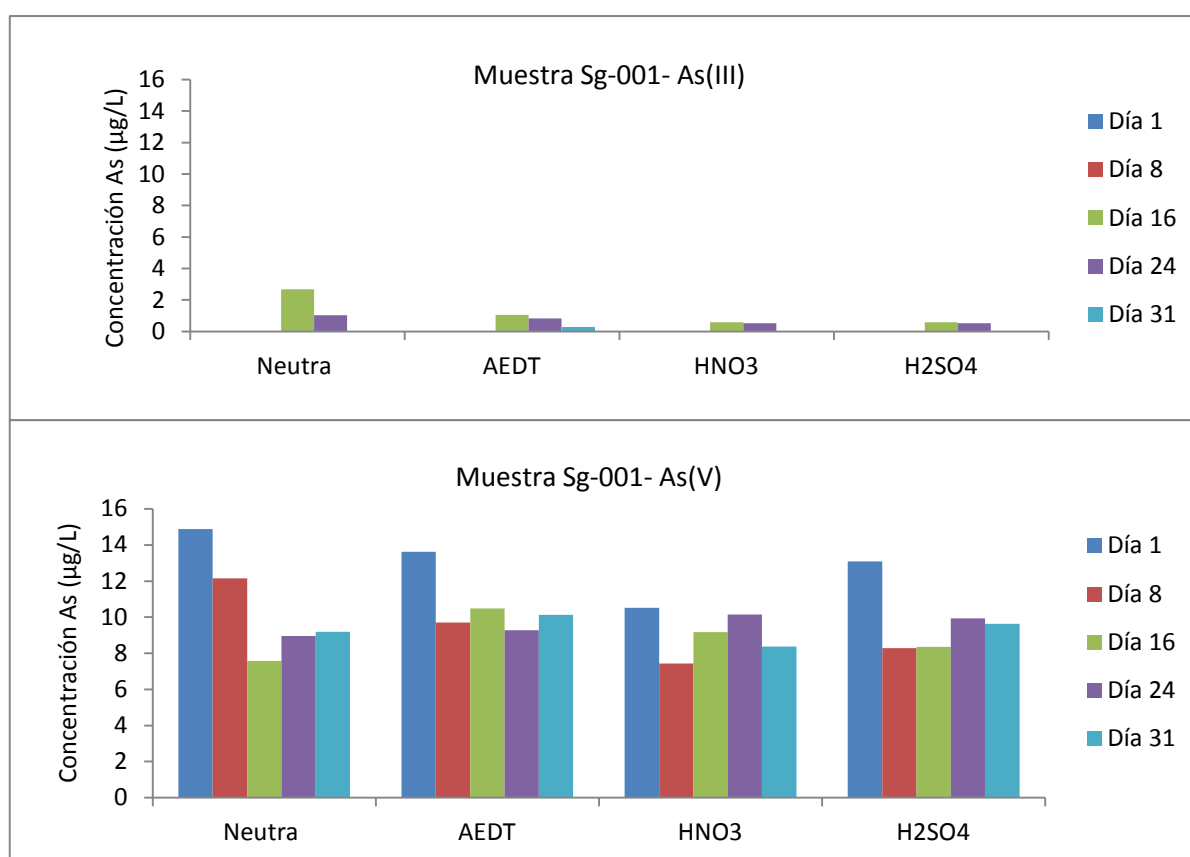


Fig. 4.16. Evolución temporal de las especies de As la muestra Sg-1 conservada con diferentes estabilizantes

En la muestra Sg-001 (Fig. 4.16) se observa que la especie mayoritaria es As(V) y que su concentración permanece aproximadamente constante en todos los medios. Se puede observar que en el caso de la muestra sin aditivos hay un mayor porcentaje de As (V) que se reduce a As (III) al cabo de 16 días. La presencia de HNO₃ parece que mantiene más estable la

concentración de As (V) durante el periodo registrado. Las diferencias observadas son atribuibles al error experimental en la determinación de As.

En la muestra Sg-002 (Fig. 4.17) hay un cambio brusco a partir del primer día, en la muestra neutra prácticamente todo el As (V) se ha transformado en As (III); es posible que en esta muestra hubiera una alta cantidad de materia orgánica capaz de reducir el arsénico. En cambio, con los conservantes no se produce dicha reducción, aunque sí se observa una disminución gradual de la concentración de As(V) que no se traduce en un incremento de As(III). Esto parece indicar un fenómeno de cambio de fase del As, que deja de estar en disolución para pasar probablemente a estar adsorbido sobre partículas en suspensión, dado que las muestras no pudieron ser filtradas.

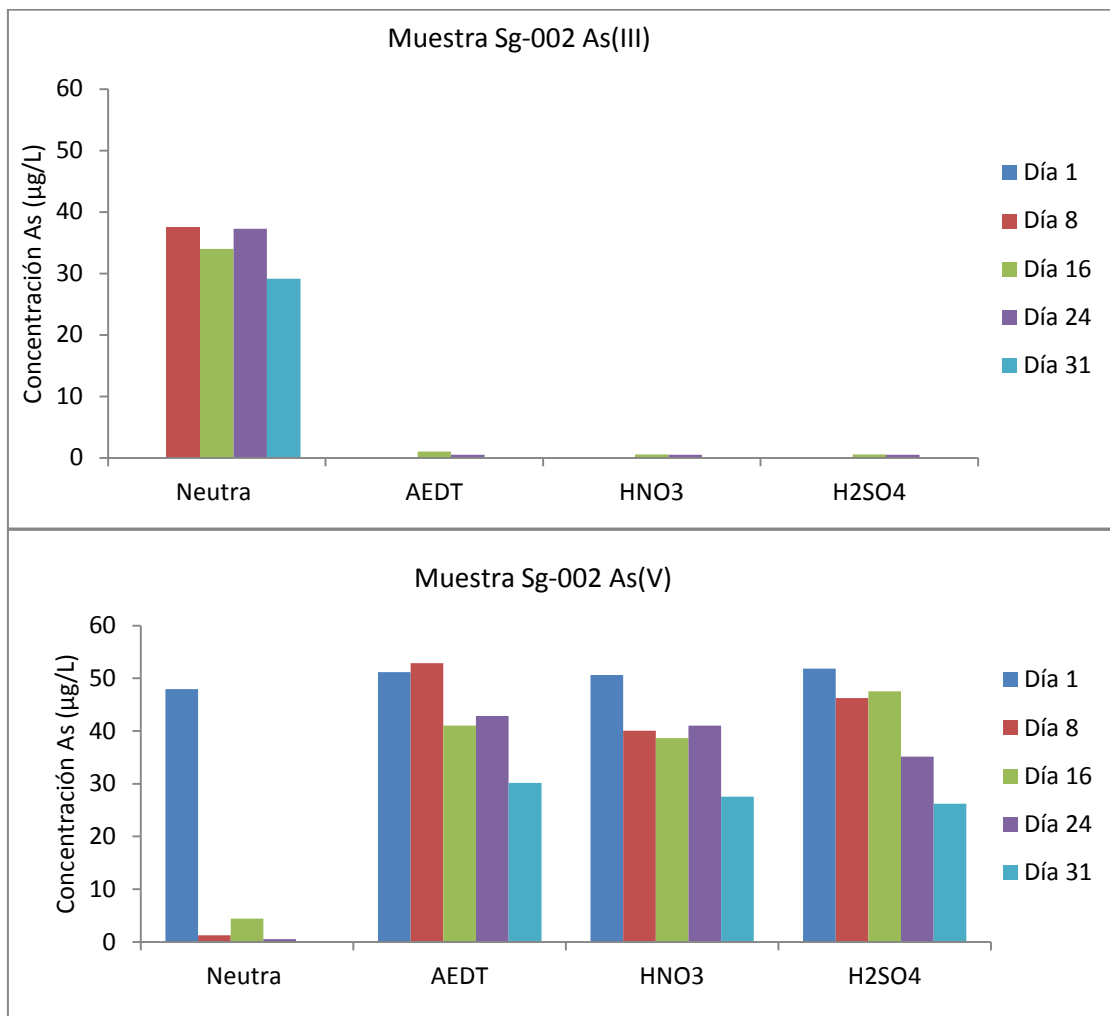


Fig. 4.17. Evolución temporal de las especies de As la muestra Sg-2 conservada con diferentes estabilizantes

En la muestra Sg-005 (Fig. 4.18) no se observa reducción de As(V), pero si una disminución de la concentración de As(V) disuelto más rápida que en la muestra Sg-002, que empieza a ser notoria a partir del día 8 desde la toma de la muestra.

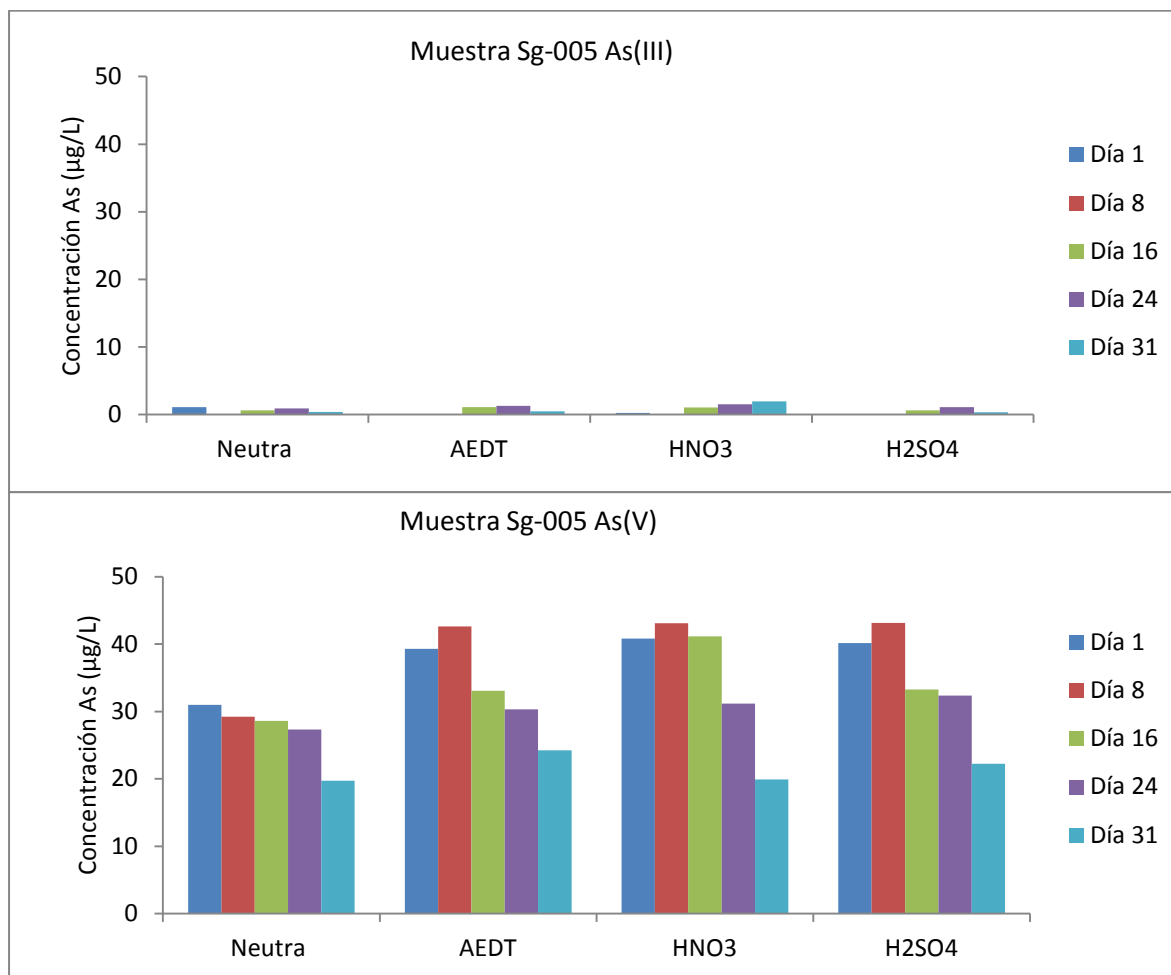


Fig. 4.18. Evolución temporal de las especies de As la muestra Sg-5 conservada con diferentes estabilizantes

De este experimento se concluye que es recomendable añadir un conservante a la muestra para asegurar que no se produce la reducción del As (V) y realizar el análisis lo antes posible para obtener una mayor exactitud en los resultados de la especiación. De entre los conservantes ensayados, nos hemos decantado por HNO₃ 10 mM pues es el que menos modifica los resultados de la especiación de As. También se concluye que las muestras deberían ser filtradas *in situ* antes de ser acidificadas para evitar reacciones de adsorción-desorción del As cuando hay partículas en suspensión.

4.6. Resultados de la especiación de arsénico

El método de especiación propuesto se ha aplicado a las muestras recogidas en las tres campañas de muestreo. Los resultados experimentales correspondientes a las campañas 1 y 3 se muestran en la tabla 4.2:

Tabla 4.2. Especiación de As en agua subterránea de la cuenca del Duero.

Zona	Muestra	pH	As (III) ($\mu\text{g/L}$)	As (V) ($\mu\text{g/L}$)	Σ As ($\mu\text{g/L}$)	As tot ICP-MS ($\mu\text{g/L}$)
Ávila	M1-001	7,25	1,42	43,94	45,36	46,77
	M1-002	7,47	0,05	32,21	32,26	39,64
	M1-003	9,31	21,98	0,92	22,90	26,50
	M1-004	7,30	1,33	1,59	2,92	0,42
	M1-005	7,43	0,05	23,07	23,11	27,88
	M1-007	7,15	3,74	13,58	17,33	17,42
	M1-008	7,49	0,05	24,69	24,74	24,64
	Segovia	Sg-001	7,71	n.d.	13,03	13,03
Sg-002		7,65	n.d.	50,41	50,41	55,21
Sg-003		7,35	n.d.	107,46	107,46	106,18
Sg-004		8,72	n.d.	126,23	126,23	131,96
Sg-005		7,73	0,66	37,82	38,49	42,40
Sg-006		7,52	n.d.	5,38	5,38	7,80

Se observa que los contenidos de As en la gran mayoría de muestras analizadas supera el límite regulado de $10 \mu\text{g/L}$, y que la especie mayoritaria es As(V) en casi todas las muestras. Mediante una prueba t de comparación de pares de valores, se compararon los resultados de As total medido directamente por ICP-MS con los resultados de As total calculados como suma de las concentraciones de As(III) y As(V) obtenidas por HPLC/ICP-MS. Para las muestras de Ávila, se obtuvo un valor de $t=1.648$, inferior al valor crítico tabulado (2.447), por lo que se concluye que las diferencias no son significativas. Por el contrario, para las muestras de Segovia el valor calculado de t, 3.011, es superior al valor crítico (2.571), indicando que hay diferencias significativas entre las parejas comparadas. Se observa que el arsénico total obtenido como suma de especies es inferior al contenido total determinado directamente. Esta diferencia aún no ha podido ser explicada, aunque podría ser debida a un error analítico en uno de los métodos.

La figura 4.19 muestra el diagrama de áreas de predominio Eh-pH para las especies As(III) y As(V); en él se han representado los valores de pH y ORP medidos en las muestras tomadas

en Vallelado. Se observa que en todas las muestras la especie predicha es HAsO_4^{2-} , lo que es coherente con los resultados de especiación obtenidos experimentalmente.

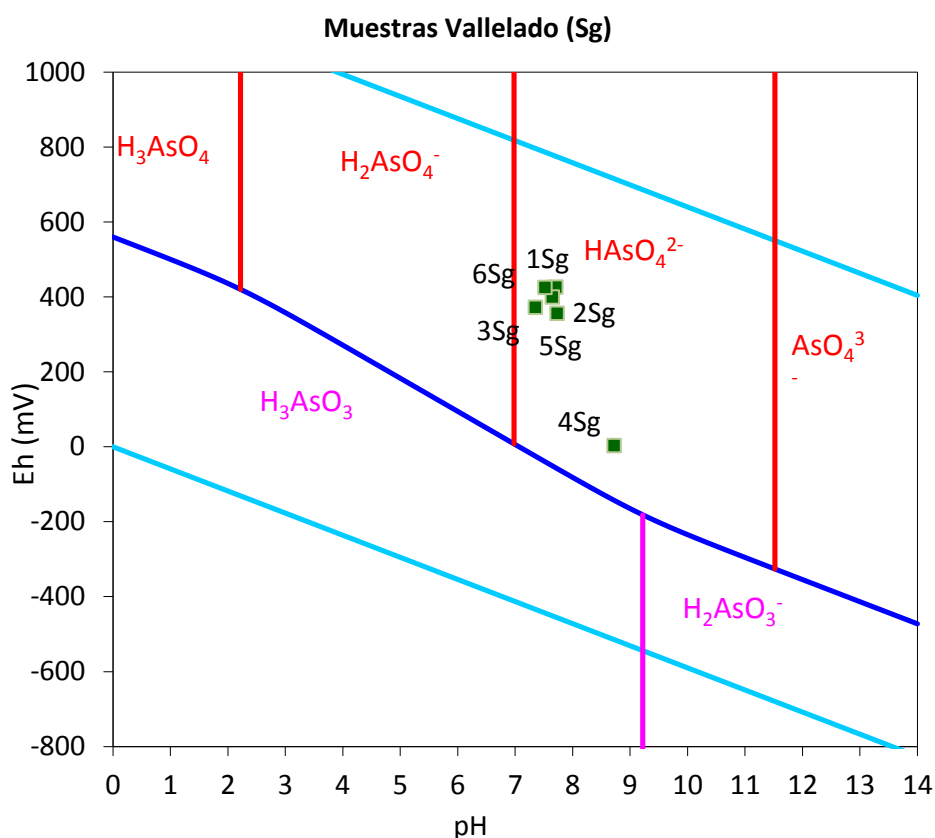


Fig. 4.19. Predicción de la especiación de As en las muestras de Vallelado en base a las medidas de ORP y pH

4.7. Relación del arsénico con otras variables hidrogeoquímicas

En las muestras de agua subterránea tomadas en las tres campañas se determinaron otros parámetros hidroquímicos para encontrar relaciones de arsénico con ciertas variables que pudieran explicar los mecanismos de movilización del arsénico en los acuíferos investigados.

En este estudio se analizaron 17 muestras de la zona de La Moraña (Ávila) todas ellas proporcionadas por el IGME, y 6 muestras de Vallelado (Segovia) del muestreo realizado.

Las variables analizadas fueron: cationes metálicos mayoritarios, elementos traza, alcalinidad, pH, conductividad, y aniones principales. Las tablas 4.3 y 4.4 muestran los resultados analíticos.

Tabla 4.3. Resultados analíticos del muestreo 1 en La Moraña

Variable	Unidades	M1-001	M1-002	M1-003	M1-004	M1-005	M1-007	M1-008
Sr	mg/L	1,0	1,4	0,05	0,27	0,53	0,62	0,68
Na	mg/L	46,9	113,8	100,7	17,5	57,3	50,0	42,6
Mg	mg/L	30,4	79,3	0,0	28,3	13,1	14,0	16,7
K	mg/L	4,0	35,6	2,5	3,6	3,3	3,4	3,8
Ca	mg/L	160,1	143,6	1,9	58,0	69,1	76,7	67,7
Zn	µg/L	23,6	0,2	6,3	6,6	0,8	68,7	1,9
V	µg/L	7,9	18,5	44,7	0,1	5,0	3,3	7,1
Li	µg/L	46,5	147,3	14,3	22,5	25,3	27,4	33,1
Ba	µg/L	125,0	111,5	6,5	13,6	91,9	85,7	101,9
B	µg/L	15,5	110,5	23,3	6,9	11,3	11,6	11,8
Fe	µg/L	10,2	4,5	14,8	2,9	1,8	10,9	0,3
U	µg/L	13,7	18,3	26,9	17,6	16,2	24,2	13,7
As	µg/L	46,8	39,6	24,0	0,42	27,9	16,2	24,6
Alcal.	mg/L CaCO ₃	284	416	161	167	98	127	103
Conduct.	µS/cm	346	508	197	204	120	155	126
Cl ⁻	mg/L	154,8	200,0	34,3	39,4	13,1	9,6	40,0
NO ₃ ⁻	mg/L	81,1	198,2	9,1	23,6	10,8	12,5	168,1
SO ₄ ²⁻	mg/L	113,6	195,7	19,9	8,1	6,3	6,6	18,8

Tabla 4.4. Resultados analíticos del muestreo 3 en Valledado

Variable	Unidades	Sg-001	Sg-002	Sg-003	Sg-004	Sg-005	Sg-006
Sr	mg/L	1,3	1,4	16,1	2,2	15,5	0,81
Na	mg/L	3,1	146,3	66,3	220,2	39,4	4,8
Mg	mg/L	42,1	27,7	205,6	45,3	349,8	28,9
K	mg/L	0,8	4,0	5,6	3,2	16,3	0,9
Ca	mg/L	70,1	51,5	583,7	78,8	559,9	54,5
Zn	µg/L	3,9	51,8	4,6	31,1	57,4	2,3
V	µg/L	7,9	22,5	32,6	50,2	4,3	7,7
Li	µg/L	13,0	70,5	253,1	64,9	450,2	20,4
Ba	µg/L	328,8	15,4	28,1	6,9	19,8	538,7
B	µg/L	17,9	117,1	106,3	133,9	315,2	26,7
Fe	µg/L	0,21	68,2	11,2	20,0	102,4	0,10
U	µg/L	2,6	34,7	25,7	12,8	690,0	6,1
As	µg/L	19,7	55,2	105,5	179,5	41,9	7,8
Alcal.	mg/L CaCO ₃	228,4	195,8	228,4	130,5	210,7	237,0
Conduct.	µS/cm	426,0	400,0	372,0	358,0	356,0	425,0
Cl ⁻	mg/L	14,9	26,6	108,9	7,0	1,2	5,0
NO ₃ ⁻	mg/L	83,1	12,4	552,3	1,8	45,1	7,3
SO ₄ ²⁻	mg/L	25,7	299,6	1634,8	631,2	2519,8	18,8

Tabla 4.5. Resultados analíticos del muestreo 2 en La Moraña

Variable	Unidades	M2-033	M2-039	M2-043	M2-044	M2-045	M2-046	M2-047	M2-048	M2-050	M2-051
Sr	mg/L	0,30	0,89	0,45	0,71	0,45	0,21	0,69	0,33	0,89	0,43
Na	mg/L	160,2	64,6	32,9	71,5	71,3	66,1	40,1	48,2	34,4	17,1
Mg	mg/L	0,34	33,7	15,7	25,9	2,8	2,7	4,4	6,6	31,3	17,2
K	mg/L	2,6	7,8	1,8	2,0	1,0	1,0	1,8	1,3	3,6	1,5
Ca	mg/L	16,3	119,4	92,9	80,3	33,4	18,4	50,0	36,0	98,2	66,6
Zn	µg/L	0,1	7,9	14,4	23,3	214,0	108,1	35,6	25,6	26,4	188,0
V	µg/L	3,8	7,7	0,2	4,7	5,9	6,9	7,2	5,8	1,7	2,1
Li	µg/L	63,6	70,1	49,2	41,8	43,6	28,8	56,5	40,9	24,7	27,5
Ba	µg/L	72,1	207,7	76,9	112,9	82,6	35,8	46,5	43,9	198,2	70,6
B	µg/L	45,2	28,4	13,9	7,9	16,1	34,9	21,4	20,8	21,7	12,4
Fe	µg/L	0,1	1,0	5,6	1,6	263,4	9,2	2,8	0,21	6,7	8,0
U	µg/L	87,9	17,2	7,3	25,5	9,6	16,7	14,7	17,1	17,7	26,7
As	µg/L	2,5	31,7	0,10	12,7	8,0	23,2	19,3	19,4	3,2	6,4
Cl⁻	mg/L	42,0	120,6	38,0	67,1	113,1	28,2	29,1	29,9	64,9	28,2
NO₃⁻	mg/L	60,1	117,2	46,1	44,1	20,0	13,6	12,5	10,7	96,7	52,8
SO₄²⁻	mg/L	26,5	54,8	11,7	15,2	13,5	18,6	15,7	15,6	29,5	5,4

Para validar los resultados analíticos se comprobó la electroneutralidad de las muestras de agua comparando los miliequivalentes de cargas positivas y los de cargas negativas aportadas por los cationes y aniones mayoritarios analizados. Si el balance de cargas no es neutro significa, o bien que se ha ignorado un ión mayoritario, o que algunas de las determinaciones analíticas son incorrectas (Clesceri y Greenberg, 1999). Los cationes considerados fueron Sr^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+ ; los aniones fueron HCO_3^- , F^- , Cl^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} y NO_3^- . Los criterios para validar los resultados fueron que la diferencia entre el balance de cargas positivas y negativas fuera inferior al 5%, y que

$$100 \times \sum \frac{\text{meq}}{L} \text{cationes o aniones} = (0,9 - 1,1) \text{EC}$$

Tabla 4.6. Electroneutralidad de muestras de la campaña 1

Muestra	$\Sigma\text{Cationes}-\Sigma\text{Aniones}$	$\Sigma\text{Cationes}+\Sigma\text{Aniones}$	%diferencia	Cationes/EC	Aniones/EC
M1-001	-1,63	26,94	-6,0	0,98	1,11
M1-002	-2,42	41,59	-5,8	1,01	1,13
M1-003	-0,46	9,54	-4,8	0,86	0,95
M1-004	0,77	11,40	6,7	0,98	0,86
M1-005	4,33	9,90	43,7	0,95	0,37
M1-007	3,88	10,64	36,4	1,03	0,48
M1-008	0,17	13,27	1,3	0,90	0,87

Tabla 4.7. Electroneutralidad de muestras de la campaña 3

Muestra	$\Sigma\text{Cationes}-\Sigma\text{Aniones}$	$\Sigma\text{Cationes}+\Sigma\text{Aniones}$	%diferencia	Cationes/EC	Aniones/EC
Sg-001	0,23	14,06	1,6	1,37	1,33
Sg-002	0,18	22,51	0,8	1,42	1,40
Sg-003	-1,25	100,13	-1,2	1,59	1,64
Sg-004	1,35	33,39	4,0	1,57	1,44
Sg-005	1,69	116,72	1,4	1,82	1,76
Sg-006	-0,08	10,78	-0,7	1,33	1,35

En el caso de las muestras M1 de La Moraña (Ávila), se obtuvo un balance próximo a la neutralidad para todas las muestras, excepto las muestras M1-005 y M1-007 que presentan un déficit de aniones, bien por un error en el análisis, o por no haber cuantificado algún anión mayoritario (quizá silicato). Las muestras Sg de Vallelado obtuvieron un balance correcto, aunque la relación de los iones con la conductividad eléctrica resultó ser un poco superior al valor esperado.

Las tablas 4.8 y 4.9 recogen algunos estadísticos descriptivos univariantes de las muestras analizadas. Se han tratado por separado los resultados pertenecientes a las distintas zonas. Por un lado, se ha hecho un análisis con las 17 muestras de La Moraña (Ávila), y por otro, las 6 muestras de Vallelado (Segovia).

Para la mayoría de las variables medidas en las muestras de La Moraña, la media y la mediana son parecidas por lo que la distribución es simétrica en dichos casos. Esto también puede comprobarse mediante el coeficiente de asimetría, siendo 2 el valor por encima del cual se considera que la función es asimétrica, esto ocurre para el Li, B, V, Fe, Cu, Mo, W, U, K, y SO₄.

En el caso de las muestras de Vallelado, la media y la mediana son parecidas en un mayor número de variables, y el coeficiente de asimetría solo supera el valor de 2 en los casos de As(III), Mn, Mo, y NO₃.

Tabla 4.8. Estadística descriptiva de las muestras de La Moraña, campañas 1 y 2

Variable	Unidades	Media	Mediana	Desv. estándar	Curtosis	Coef. Asimetría	Mínimo	Máximo
As(III)	µg/L	4,58	2,10	6,13	3,24	1,91	0,05	21,98
As(V)	µg/L	9,66	0,92	13,71	0,99	1,36	0,02	43,94
As total	µg/L	14,23	13,61	12,46	0,87	1,02	0,04	45,36
Li	µg/L	44,90	40,85	30,50	8,15	2,56	14,35	147,30
B	µg/L	24,33	16,07	24,33	10,79	3,10	6,91	110,47
V	µg/L	7,79	5,78	10,39	11,03	3,16	0,11	44,70
Fe	µg/L	20,22	4,47	62,81	16,80	4,09	0,02	263,39
Cu	µg/L	1,76	1,11	2,45	12,08	3,31	0,19	10,61
Zn	µg/L	44,21	23,31	65,39	2,81	1,93	0,15	214,00
As	µg/L	18,00	19,33	13,80	-0,43	0,46	0,10	46,77
Mo	µg/L	0,62	0,16	1,40	14,50	3,72	0,00	5,88
Ba	µg/L	87,24	82,55	55,05	0,81	0,84	6,48	207,66
W	µg/L	1,08	0,31	2,16	12,99	3,49	0,00	9,03
U	µg/L	21,83	17,24	17,90	13,33	3,48	7,33	87,92
Ca	mg/L	69,92	67,72	43,79	-0,13	0,50	1,90	160,14
K	mg/L	4,75	2,63	8,12	15,41	3,86	0,99	35,64
Mg	mg/L	18,96	15,73	19,28	5,44	1,98	0,02	79,30
Na	mg/L	60,89	50,02	36,27	2,46	1,43	17,06	160,19
Sr	mg/L	0,58	0,53	0,35	1,05	0,79	0,01	1,45
Cl	mg/L	61,89	39,40	53,62	1,59	1,52	9,58	199,96
F	mg/L	0,45	0,23	0,40	0,94	1,01	0,00	1,47
NO3	mg/L	57,49	44,15	57,71	1,17	1,38	9,14	198,23
SO4	mg/L	33,86	15,71	49,13	7,76	2,76	5,43	195,72

Tabla 4.9. Estadística descriptiva de las muestras de Vallelado, campaña 3

Variable	Unidades	Media	Mediana	Desv. Estándar	Curtosis	Coef. Asimetría	Mín.	Máx.
pH	Uds. pH	7,78	7,68	0,48	4,40	1,96	7,35	8,72
Cond	μS/cm	1531,33	953,50	1301,20	-1,86	0,83	401,00	3260,00
E	mV	389,50	386,00	32,01	-2,44	0,19	356,00	426,00
As(III)	μg/L	0,11	0,00	0,27	6,00	2,45	0,00	0,66
As(V)	μg/L	56,72	44,11	49,69	-1,58	0,59	5,38	126,23
Li	μg/L	145,33	67,68	173,07	1,08	1,41	12,96	450,19
B	μg/L	119,50	111,68	107,34	2,43	1,37	17,87	315,17
Al	μg/L	6,01	2,81	6,92	-1,87	0,83	0,04	15,25
V	μg/L	20,86	15,20	17,97	-0,28	0,92	4,34	50,17
Mn	μg/L	3,90	0,20	8,55	5,92	2,43	0,07	21,32
Fe	μg/L	33,66	15,63	42,12	-0,34	1,11	0,01	102,40
Zn	μg/L	25,21	17,89	25,22	-2,38	0,41	2,34	57,44
As	μg/L	68,27	48,56	64,24	0,92	1,21	7,80	179,49
Mo	μg/L	2,22	1,51	2,47	4,27	2,01	0,47	7,05
Ba	μg/L	156,29	23,92	225,07	0,24	1,32	6,91	538,75
U	μg/L	128,65	19,27	275,27	5,96	2,44	2,64	690,00
Ca	mg/L	233,07	74,42	262,68	-1,85	0,97	51,47	583,72
K	mg/L	5,16	3,62	5,77	4,04	1,93	0,85	16,34
Mg	mg/L	116,56	43,70	133,08	0,89	1,43	27,67	349,81
Na	mg/L	80,01	52,84	86,55	-0,32	0,97	3,07	220,16
Sr	mg/L	6,20	1,79	7,43	-1,86	0,96	0,81	16,08
Cl	mg/L	27,27	10,95	41,00	4,98	2,20	1,24	108,91
F	mg/L	1,28	1,18	0,47	0,31	0,95	0,81	2,07
NO3	mg/L	117,01	28,78	215,44	5,57	2,34	1,76	552,34
SO4	mg/L	854,98	465,37	1012,46	-0,18	1,08	18,76	2519,83
HCO3	mg/L	250,10	267,68	48,12	3,17	-1,75	159,12	289,01

Las matrices de multicorrelación entre las variables están recogidas en las tablas A.1 y A.2 del Anexo. En la tabla A.1 correspondiente a La Moraña se pueden observar fuertes correlaciones entre los aniones y los metales alcalinotérreos, y de los aniones entre sí. El arsénico total está correlacionado significativamente con As (V), SO₄, Sr y Cl. En el caso de Vallelado (tabla A.2), se observan menos correlaciones significativas pues el número de muestras analizadas es mucho menos, por lo que aumenta el valor crítico del coeficiente de correlación de Pearson para que la correlación se considere significativa. No obstante, puede verse que el arsénico total vuelve a estar correlacionado con el As(V), así como con V y Na.

Estas correlaciones pueden evidenciarse con el análisis de componentes principales y el análisis clúster.

Las tablas 4.10 y 4.11 muestran las cargas de las variables en los nuevos factores o componentes principales para las matrices de datos de Ávila y Segovia, respectivamente.

En el caso de La Moraña, con los tres primeros componentes principales se llega a explicar más de un 70% de toda la varianza, esto es, de la información de la matriz de datos original. El primer componente principal (PC1) está relacionado con las variables As(V), Li, B, As, Mo, W, Ca, K, Mg, Sr, Cl, F, NO₃ y SO₄; y el PC2 está explicado por el As(III), V, U, Na y Ba, este último negativamente.

Tabla 4.10. Matriz de cargas de las variables medidas en muestras de La Moraña (Ávila).

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
As(III)	-0,388	0,661	0,059	-0,481	-0,029
As(V)	0,701	-0,244	-0,132	-0,337	0,404
Li	0,851	0,197	0,053	0,311	0,006
B	0,788	0,492	0,019	0,230	-0,111
V	0,185	0,723	-0,010	-0,508	0,083
Fe	-0,142	0,054	0,870	0,209	0,293
Zn	-0,306	-0,038	0,828	0,144	-0,007
As	0,614	0,070	-0,070	-0,563	0,475
Mo	0,894	0,295	0,245	0,033	-0,108
Ba	0,471	-0,581	-0,084	0,215	0,262
W	0,807	0,451	0,130	-0,119	-0,247
U	-0,116	0,458	-0,449	0,641	0,190
Ca	0,753	-0,583	-0,056	-0,099	0,054
K	0,928	0,228	0,044	0,062	-0,205
Mg	0,911	-0,190	-0,011	0,012	-0,284
Na	0,278	0,734	-0,177	0,415	0,394
Sr	0,875	-0,376	0,010	0,040	0,106
Cl	0,855	-0,026	0,311	0,048	0,223
F	0,775	-0,075	-0,010	-0,121	-0,381
NO ₃	0,821	-0,165	-0,132	0,140	-0,063
SO ₄	0,961	0,137	0,044	-0,053	0,079
<i>Valor Propio</i>	<i>10,228</i>	<i>3,306</i>	<i>1,909</i>	<i>1,832</i>	<i>1,170</i>
<i>% Varianza explicada</i>	<i>48,7</i>	<i>15,7</i>	<i>9,1</i>	<i>8,7</i>	<i>5,6</i>
<i>% Varianza acumulada</i>	<i>48,7</i>	<i>64,4</i>	<i>73,5</i>	<i>82,3</i>	<i>87,8</i>

En el caso de las muestras de Vallelado, con los tres primeros componentes principales se llega a explicar más de un 95% de toda la información o varianza de la matriz original de datos. Esto significa que las variables analizadas están más fuertemente correlacionadas que

en La Moraña. Con el PC1 se relacionan la conductividad, As(III), Li, B, Al, Mn, Fe, Zn, Mo, U, Ca, K, Mg, Sr, F y SO₄ de forma positiva, y ORP y Ba negativamente; contribuyen al PC2 las variables As(V), pH, V, As y Na.

Tabla 4.11. Matriz de cargas de las variables medidas en muestras de Valledado (Segovia).

Variable	PC1	PC2	PC3	PC4
pH	-0,015	0,861	-0,365	0,339
Cond	0,895	-0,059	0,432	0,091
ORP	-0,801	-0,566	-0,132	-0,109
As(III)	0,878	-0,272	-0,375	0,121
As(V)	0,246	0,838	0,482	0,053
Li	0,974	-0,175	0,123	0,052
B	0,960	0,116	-0,238	-0,059
Al	0,632	0,460	-0,481	0,369
V	-0,074	0,928	0,357	0,015
Mn	0,879	-0,264	-0,391	0,061
Fe	0,794	-0,020	-0,405	-0,452
Zn	0,647	0,266	-0,511	-0,499
As	0,160	0,935	0,278	0,147
Mo	0,877	-0,040	-0,476	-0,023
Ba	-0,656	-0,595	-0,196	0,367
U	0,892	-0,261	-0,359	0,085
Ca	0,827	-0,207	0,505	0,135
K	0,980	-0,129	-0,149	-0,016
Mg	0,943	-0,248	0,151	0,160
Na	0,045	0,957	-0,063	-0,267
Sr	0,839	-0,176	0,501	0,114
Cl	0,087	-0,003	0,982	-0,165
F	0,604	-0,156	0,730	-0,259
NO ₃	0,192	-0,097	0,973	0,047
SO ₄	0,971	-0,052	0,200	0,113
HCO ₃	-0,090	-0,953	0,287	-0,028
<i>Valor Propio</i>	<i>12,997</i>	<i>6,411</i>	<i>5,311</i>	<i>1,155</i>
<i>% Varianza explicada</i>	<i>50,0</i>	<i>24,7</i>	<i>20,4</i>	<i>4,4</i>
<i>% Varianza acumulada</i>	<i>50,0</i>	<i>74,6</i>	<i>95,1</i>	<i>99,5</i>

Las figuras 4.20 y 4.21 muestran la representación de las cargas de las variables en el gráfico bidimensional definido por los dos primeros PCs.

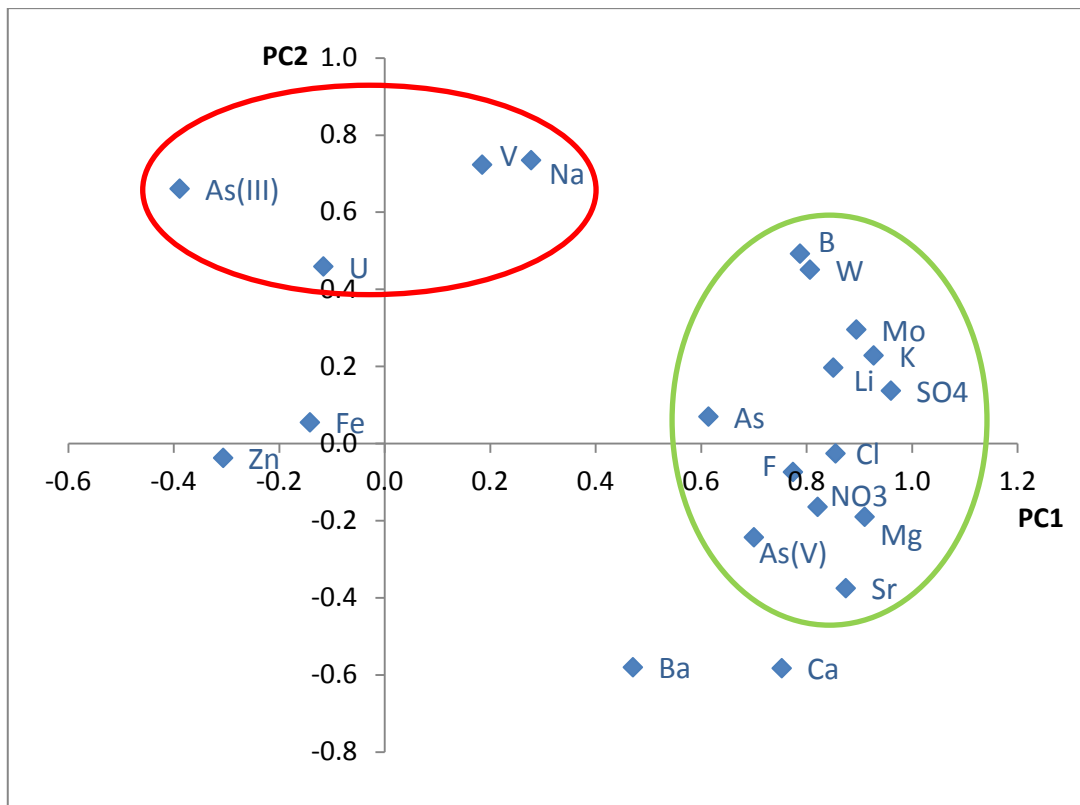


Fig. 4.20. Gráfico de cargas de las variables originales en los dos primeros PCs (La Moraña)

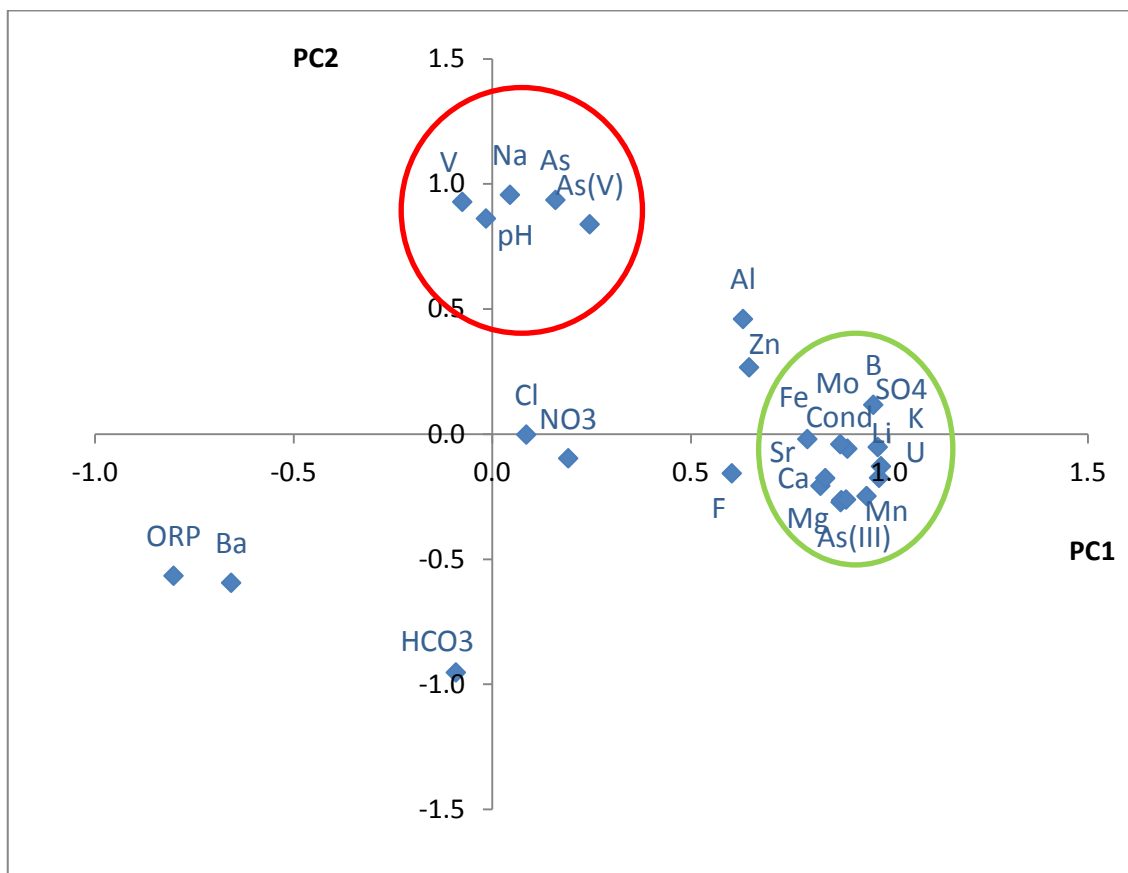


Fig. 4.21. Gráfico de cargas de las variables originales en los dos primeros PCs (Valledado)

En ambos casos pueden distinguirse dos agrupamientos principales de variables. En el gráfico de cargas de La Moraña se observa un primer grupo en el que se encuentran aquellas variables con carga positiva elevada en el componente principal 2 (PC2), y un segundo grupo constituido por las variables con carga elevada positiva en componente principal 1(PC1). El Zn y Fe, que eran aquellos con mayor contribución en el componente principal 3, no están relacionados con el resto de variables en este espacio bidimensional definido por PC1 y PC2

En el gráfico de cargas de las variables analizadas en las muestras de Vallelado, los grupos de variables que aparecen son mucho más compactos, esto es, más fuertemente correlacionados. Los agrupamientos son similares a los encontrados en las variables de La Moraña. Ahora, el ORP y el Ba no están relacionados con el resto de variables. El bicarbonato, contra lo que cabría esperar dado que algunas de las aguas analizadas son bicarbonatadas sódicas, está en el plano opuesto al U y Na, indicando posibles procesos de precipitación del bicarbonato, probablemente por sobresaturación de la disolución cuando hay mucho bicarbonato en el agua.

El Análisis Clúster ha permitido corroborar los resultados obtenidos por el ACP. Así, los dendrogramas obtenidos para las variables de las dos áreas de muestreo (figuras 22 y 23) permiten diferenciar diversos grupos de variables.

En el dendrograma de La Moraña se observa un primer grupo que contiene las variables que contribuían de manera positiva al PC1; el segundo grupo está formado por las variables que contribuían al PC1 negativamente; en el tercer grupo se encuentran el Fe y Zn, que no se relacionan con más variables; y por último, está el grupo de variables con carga positiva en el PC2. As total y As(V) están fuertemente relacionados, se mantiene esa correlación que existe entre ellos. Los aniones, al igual que ocurría en la matriz de correlación, aparecen próximos a los metales alcalinotérreos, esto significa que en las muestras los sulfatos y nitratos existentes eran de estos metales.

El Análisis Clúster aplicado a la matriz de datos de las muestras de Vallelado ha revelado cuatro grupos principales diferentes. El primero de ellos coincide con los elementos que contribuían de manera negativa al PC1; el segundo grupo está formado por los que contribuían al PC1 positivamente; en el tercer grupo se encuentran el ORP, Ba y HCO₃, que no presentaban relación con el resto de parámetros; y por último, está el grupo del PC2. De

nuevo se encuentran el As(V) y As total juntos, y los aniones con los elementos alcalinotérreos.

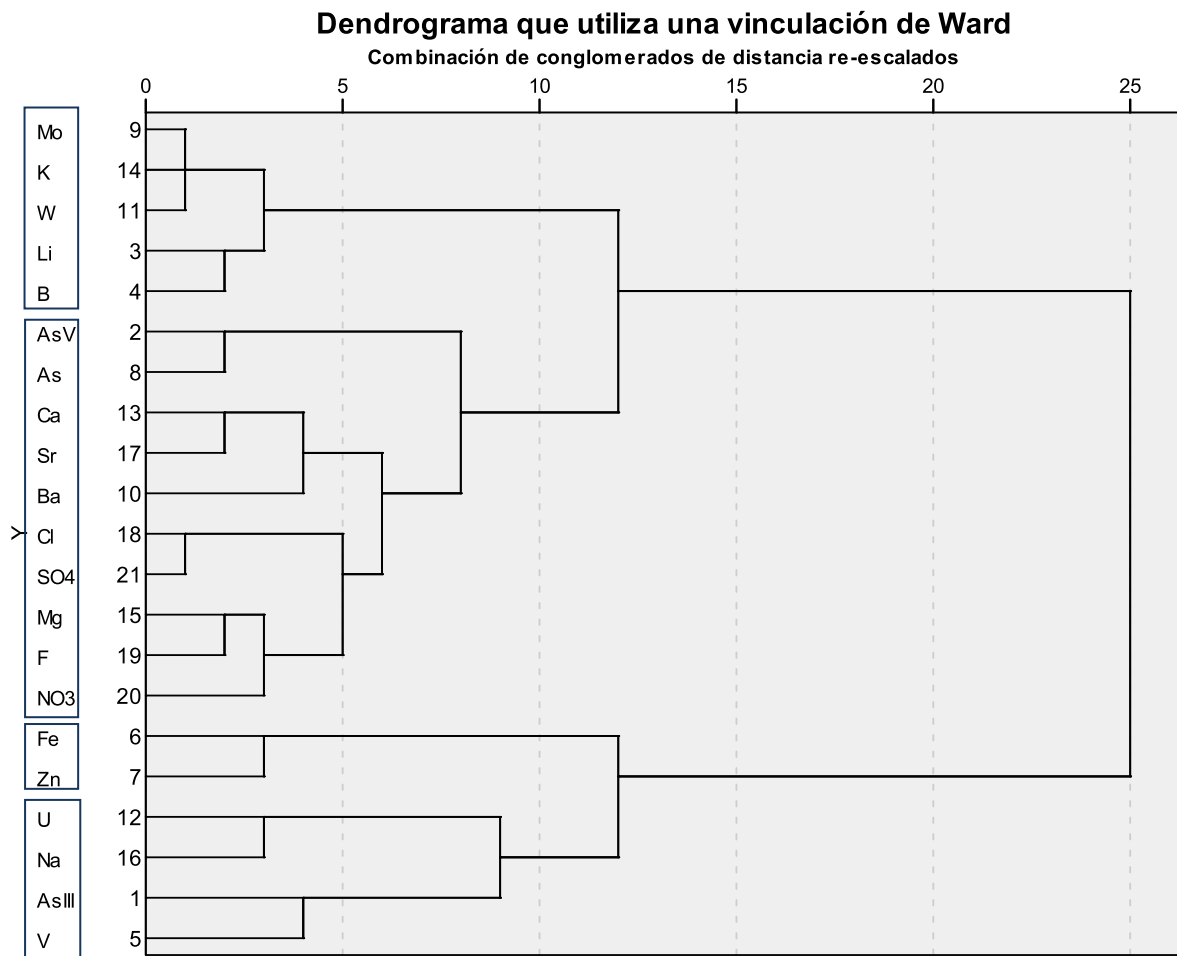


Fig. 4.22. Dendrograma de las variables comunes analizadas en las muestras de La Moraña (Ávila), obtenido por el método de unión de Ward y la distancia euclídea como medida de similitud.

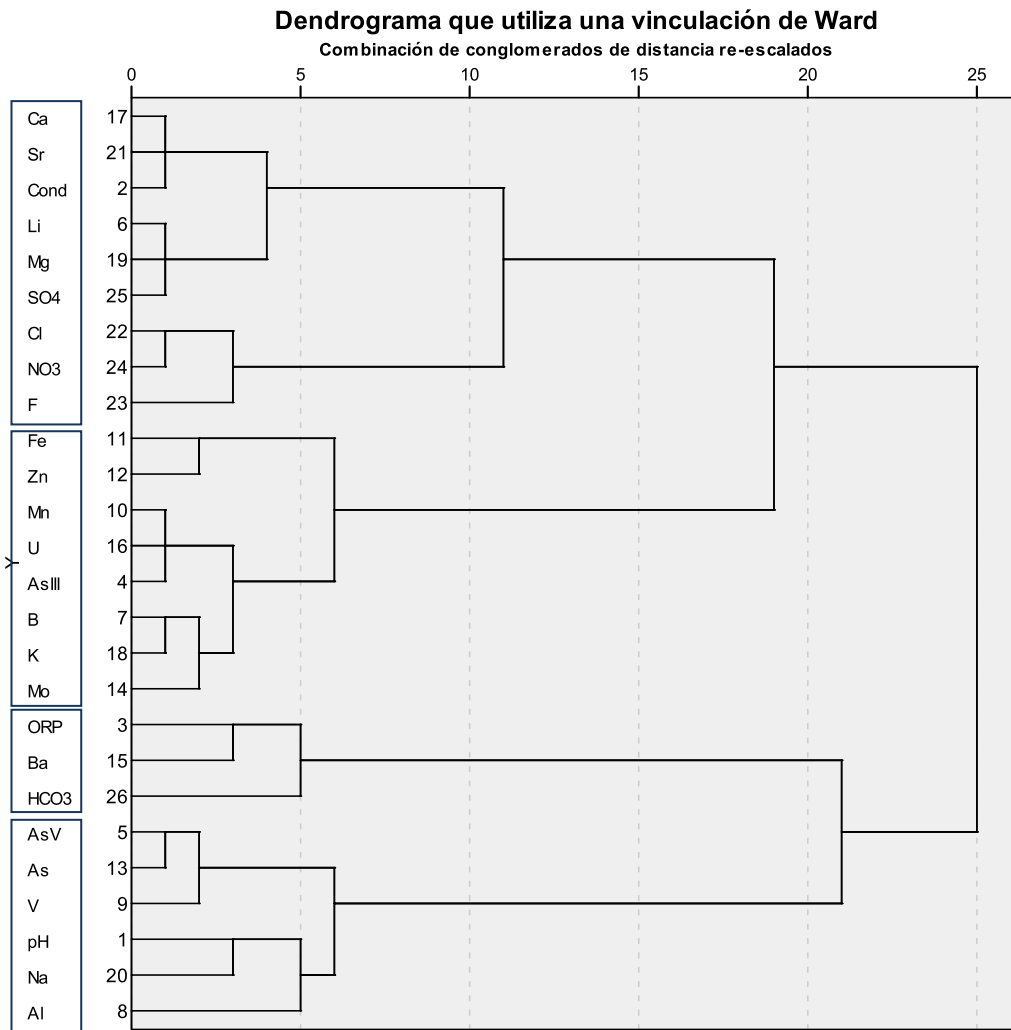


Fig. 4.23. Dendrograma de las variables analizadas en las muestras de Valledado (Segovia), obtenido por el método de unión de Ward y la distancia euclídea como medida de similitud.

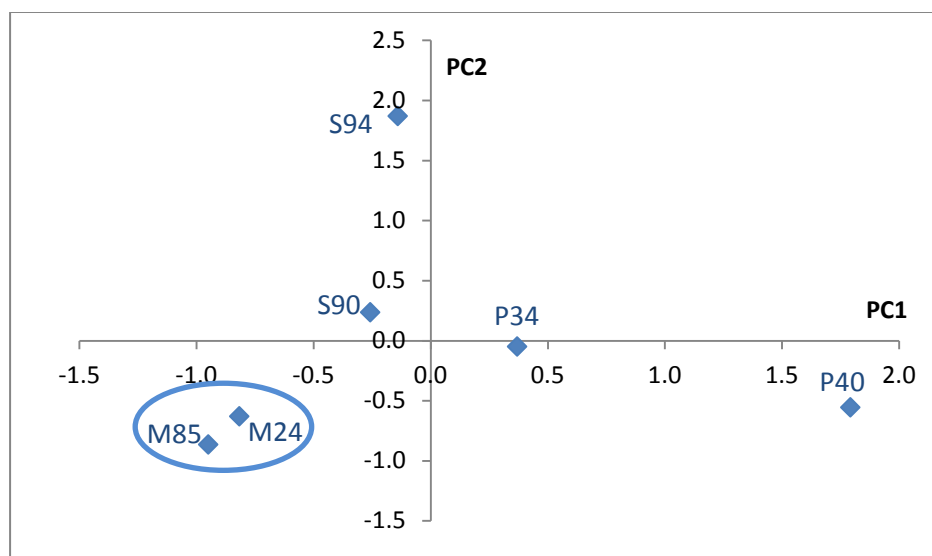


Fig. 4.24. Gráfico de puntuaciones de las muestras de Valledado en los componentes principales PC1 y PC2

Se puede observar una relación entre las muestras dependiendo del tipo de punto de agua donde fueron tomadas, pudiendo observarse diferencias entre las aguas procedentes de pozos de poca profundidad (P), sondeos profundos (S) y manantiales (M).

Tabla 4.12. Muestras de Valledado.

Muestra	Sg-001	Sg-002	Sg-003	Sg-004	Sg-005	Sg-006
Símbolo	M24	S90	P34	S94	P40	M85

La interpretación conjunta de las figuras 4.21 y 4.24, que muestran las cargas de las variables y las puntuaciones de las muestras, se puede concluir que la muestra Sg-004 con el símbolo S94 presenta los elementos que más contribuyen al PC2; lo mismo ocurre con la muestra Sg-005, con el símbolo P40, la cual contiene elementos que contribuyen en mayor medida al PC1. Las muestras pertenecientes a los manantiales (Sg-001 y Sg-006) son ricas en Ba y tienen un potencial redox muy oxidante.

El mapa reflejado en la figura 4.25 muestra la ubicación de estas 6 muestras en el mapa geológico de la zona de Valledado. Se observa que los puntos de muestreo Sg-001 y Sg-006, manantiales, descargan directamente el acuífero carbonatado del Páramo, por lo que es razonable esperar una elevada concentración de bicarbonatos y metales alcalinotérreos. Estas muestras presentan poco arsénico. Por el contrario, las muestras Sg-004 y Sg-005, ubicadas en suelos con predominio de arcillas, presentan los mayores niveles de arsénico, a la vez que altos contenidos de sulfato, calcio y magnesio. Finalmente, las muestras Sg-002 y Sg-003 se ubican en terrenos de grava y arcilla, aunque en este caso la diferencia radica a la profundidad a la que el agua es captada. La ubicación de los puntos de agua en terrenos con similar mineralogía coincide aproximadamente con el agrupamiento observado en el gráfico de puntuaciones.

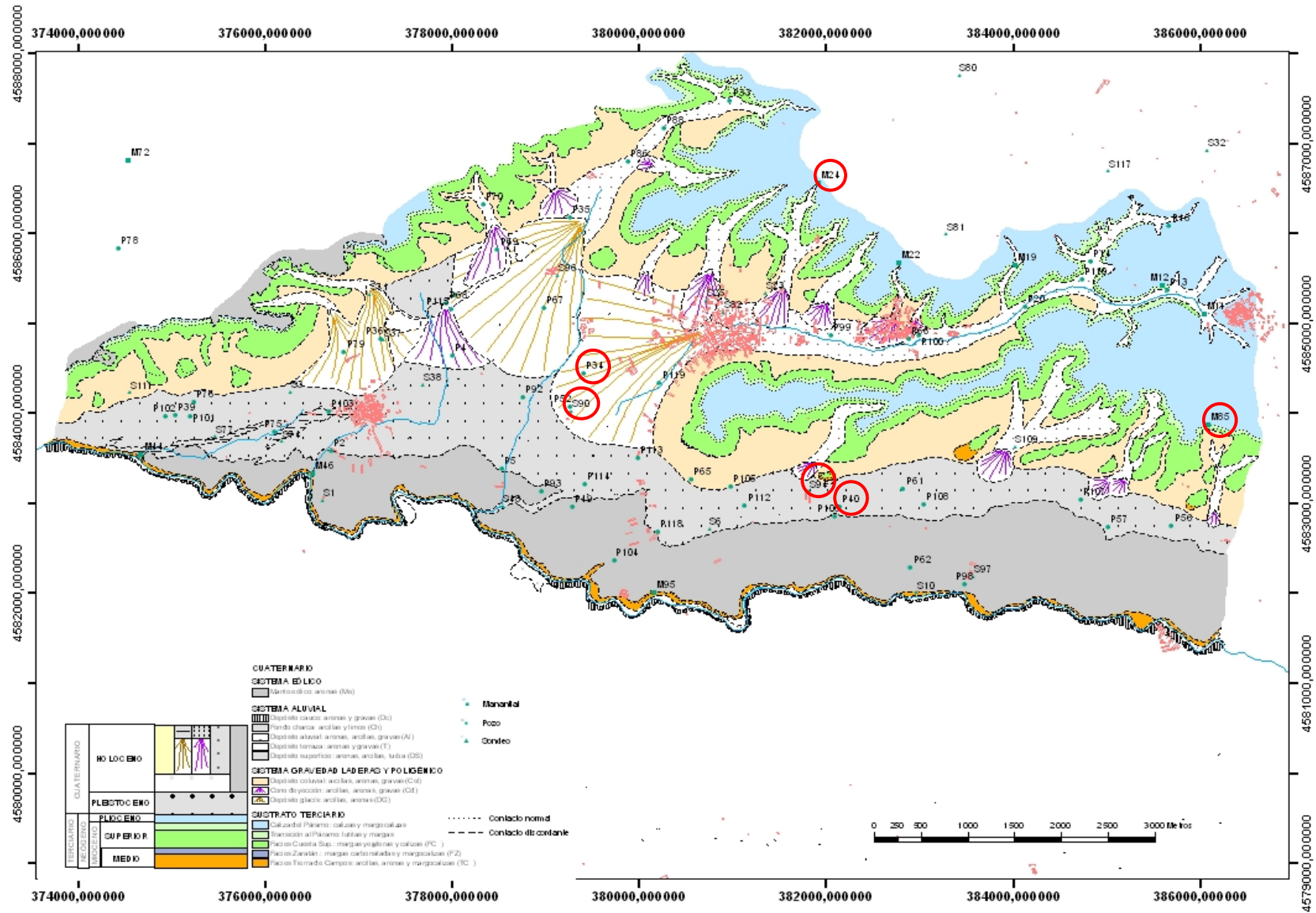


Fig. 4.25. Mapa geológico de la zona de muestreo 2 (Valledado, Segovia)

Capítulo 5.
CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo un estudio sobre la distribución y especiación de As en aguas subterráneas de dos zonas de la Cuenca del Duero situadas en las comarcas de La Moraña (Ávila), y de Tierra de Pinares (Segovia). Ambas comarcas son conocidas por presentar niveles de arsénico anormalmente elevados en las aguas subterráneas, cuyo origen es geogénico.

Para comprender el mecanismo de movilización del arsénico en los acuíferos se necesita información, no solo de la concentración y distribución de especies del arsénico, sino también de otras variables hidroquímicas del agua tales como alcalinidad, salinidad, y presencia de otros elementos traza geogénicos.

En este trabajo se han optimizado algunas variables del método analítico HPLC/ICP-MS empleado para la determinación de las especies As(III) y As(V). De los resultados experimentales obtenidos en dichos ensayos de optimización se han podido extraer las siguientes conclusiones:

- La composición óptima de la fase móvil empleada para la elución cromatográfica de las especies inorgánicas de arsénico es 2mM de tampón fosfato + 0.2 mM AEDT (pH 6.0). Con esta fase móvil se consiguen mantener reproducibles la forma de los picos y los tiempos de retención de las especies As(III) y As(V); es además la fase móvil recomendada por el fabricante para la especiación de arsénico.
- La señal analítica producida por el equipo HPLC/ICP-MS no es reproducible, ya que la pendiente de las líneas de calibrado obtenidas en días sucesivos presenta una variabilidad en torno al 10%, por lo que es necesario calibrar el instrumento cada día que se vaya a llevar a cabo el análisis.
- Se ha observado que los patrones de As(V) se reducen a As(III) al cabo de unos pocos días, por lo que se recomienda utilizar únicamente As(III) en los patrones de calibración para especiación de As, o bien preparar los patrones de calibración mixtos diariamente, aunque esto último implica un incremento significativo del tiempo de análisis.
- Se ha estudiado el efecto de diferentes iones presentes habitualmente en aguas subterráneas en la determinación de las especies inorgánicas de As. Se ha observado

que Ca(II), Mg(II), NO₃⁻ y HCO₃⁻ no interfieren en la determinación; Fe(III) provoca la oxidación de As(III) a concentraciones superiores a 0.5 mg/L, que es una concentración relativamente alta para la mayor parte de aguas naturales; SO₄²⁻ y PO₄³⁻ interfieren en la determinación cuando están presentes a concentraciones elevadas; en aguas subterráneas naturales la interferencia puede considerarse poco significativa.

- Dada la facilidad de interconversión de las especies de arsénico en presencia de sustancias con propiedades redox, se ha realizado un experimento para seleccionar un conservante capaz de estabilizar las especies de arsénico durante al menos un mes. El estudio de conservación indica que en algunas muestras se produce una rápida reducción de As(V) a As(III) que puede evitarse añadiendo a las muestras AEDT o HNO₃ 10 mM. En caso de no añadirse ningún reactivo estabilizante, las muestras deben analizarse lo antes posible para evitar dicha interconversión de especies.
- En la mayor parte de muestras analizadas se supera el límite máximo de As en aguas potables de 10 µg/L impuesto por la legislación española, por lo que estas aguas no pueden dedicarse al consumo humano sin un tratamiento previo. La especie predominante en casi todas las muestras analizadas es As(V), lo cual es coherente con los valores medidos *in situ* de pH y ORP de las aguas.

Por otro lado, del análisis estadístico multivariante de las variables hidroquímicas analizadas se han obtenido las siguientes conclusiones:

- En las dos áreas geográficas investigadas se observa que el As está altamente correlacionado con el Na, V y pH. Las muestras procedentes de la comarca de La Moraña están además correlacionadas con Fe y U. Esto parece indicar un origen geogénico común para esos elementos traza.
- En las muestras procedentes de Vallelado se ha observado un agrupamiento de muestras relacionado con la composición del suelo en el que se ubica el punto de agua, y con la profundidad del pozo.

Capítulo 6.
BIBLIOGRAFÍA

- Amini M., Abbaspour K.C., Berg M., Winkel L., Hug S.J., Hoehn E., Yang H., Johnson C.A., (2008) Statistical Modeling of Global Geogenic Arsenic Contamination in Groundwater, *Environ. Sci. Technol.*, 42:3669 -3675.
- APHA, AWWA, WEF, Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D., (1999) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th edition, 68-70.
- Bhattacharya P., Welch A.H., Stollenwerk K.G., McLaughlin M.J., Bundschuh J., Panaullah G., (2007) Arsenic in the environment: Biology and Chemistry, *Science of the Total Environment*, 379: 109-120.
- B'Hymer C, Caruso J.A., (2004) Arsenic and its speciation analysis using high-performance liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1045: 1-13.
- Bissen M.,Frimmel F. H., (2003) Arsenic-a review. Part 1: Occurrence, Toxicity, Speciation, Mobility,*Actahydrochim. hydrobiol.*, 31: 1, 9-18.
- Blanco A.K., Alonso A.L., Alonso D., Jiménez de Blas O., Santiago M., de Miguel B., (1998) Estudio de los niveles de plomo, cadmio, zinc y arsénico, en aguas de la provincia de Salamanca,*Rev. Esp. Salud Pública*, 72: 53-65.
- Blaine McCleskey R., Kirk Nordstorm D., Maest A.S., (2004) Preservation of water samples for arsenic (III/V) determinations: an evaluation of the literatura and new analytical results, *Applied Geochemistry*, 19: 995-1009.
- Calvo Revuelta C., ÁlvarezBenedí J., Andrade Benítez M., Marinero Díez P., Bolado Rodríguez S., Estudios de la zona no saturada del suelo, 6: 91, 2003.
- Carretero M.C., Vega M., Pardo R., Fernández L., Barrado E., del Barrio V., (2004) Posible origen y dispersión de arsénico en los acuíferos de la zona de Vallelado-Mata de Cuéllar (Segovia), VIII Simposio de Hidrogeología, Zaragoza (España).
- Dahr R.K., Biswas B.K., Samanta G., Mandal B.K., Chakraborti D., Roy S., Jafa A., Islam A., Ara G., Kabir S., Khan A.W., Ahmed S.A., Hadi S.A., (1997)Groundwaterarseniccalamity in Bangladesh,*Curr. Sci. India*, 73(1): 48-59.
- Directiva 98/83/CE del Consejo de 3 de noviembre de 1998 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano.
- Eith C., Kolb M., Rumi A., Seubert A., Viehweger K. H., (2007) Monograph. Practical Ion Chromatography: an introduction, 2nd edition, *Metrohm Ltd*, Herisau, Switzerland.

- Emsley J., (1991) *The elements*, 2nd Edition, *Oxford University Press*, New York, N.Y., p 251.
- Francesconi K. A., Kuehnelt D., (2004), Determination of arsenic species: A critical review of methods and application 2000-2003, *Analyst*, 129: 373-395.
- Gallagher P.A., Schewegel C.A., Wei X., Creed T.J., (2001) Speciation and preservation of inorganic arsenic in drinking water in sources using EDTA with IC separation and ICP-MS detection, *J. Environ. Monit.*, 3: 371-376.
- García-Sánchez A., Moyano A., Mayorga P., (2005) High arsenic contents in groundwater of central Spain, *Environ Geol*, 47: 847-854.
- García-Sánchez A. y Álvarez-Ayuso E., (2003) Arsenic in soils and waters and its relation to geology and mining activities (Salamanca Province, Spain), *Journal of Geochemical Exploration*, 80: 69-79.
- Gong Z., Lu X., Ma M., Watt C., Le X.C., (2002) Arsenic speciation analysis, *Talanta*, 58: 77-96.
- Gómez Ariza J.L., Morales E., Sánchez-Rodas D., Giráldez I., (2000) Stability of chemical species in environmental matrices, *Trends in Analytical Chemistry*, 19: 200-209.
- Gómez J.J., Lillo J., Sahún B., (2006) Naturally occurring arsenic in groundwater and identification of the geochemical sources in the Duero Cenozoic Basin, Spain, *Environ Geol*, 50: 1151-1170.
- Henke K.R., (2009) *Arsenic: Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment*, Wiley, USA.
- Hernández García M.E., Fernández Ruiz L., (2002) Presencia de arsénico de origen natural en las aguas subterráneas del acuífero detrítico del Terciario de Madrid, *Boletín Geológico y Minero*, 113(2): 119-130.
- Hughes M.F., (2002) Arsenic toxicity and potential mechanisms of action, *Toxicology Letters*, 133: 1-16.
- Kabata-Pendias A., Pendias, H., (1985) *Trace Elements in Soils and Plants*, *CRC Press*, Boca Raton, FL, p. 171.
- Kaiser W., Roskamp E., (1992) *Bundesgesundhbl.*, 35: 197.
- Kant Pandey P., Yadav S., Nair S., Pandey M., (2004) Sampling and preservation artifacts in arsenic analysis: Implications for public health issues in developing countries, *Current Science*, 86: 1426-1432.

- Komorowicz I., Baralkiewicz D., (2011) Arsenic and its speciation in water samples by high performance liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta*, 84: 247-261.
- Mandal B.K., Suzuki K.T. (2002) Arsenic round the world: a review, *Talanta* 58: 201–235.
- Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.J., Smeyers-Verbeke J., (1997) Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, part A, Elsevier, Amsterdam.
- Massart D.L., Vandeginste B.G.M., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P.J., Smeyers-Verbeke J., (1998) Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, part B, Elsevier, Amsterdam.
- Moyano A., Mayorga P., García-Sánchez A., (2003) Contaminación de arsénico en aguas subterráneas de Castilla y León, *III Congreso Iberoamericano de Física y Química Ambiental*, Tlaxcala.
- National Academy of Sciences. 1977. Arsenic. National Academy of Sciences., Washington, DC. En: Eisler, R. 2000. Arsenic (chapter 28). Handbook of chemical risk assessment. Volume 3. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. pages 1501-1566.
- Nickson R.T., McArthur J.M., Ravenscroft P., Burgess W.G., Ahmed K.M., (2000) Mechanism of Arsenic release to groundwater, Bangladesh and West Bengal, *Applied Geochemistry*, 15: 403-413.
- Nordstrom K., (2002) Worldwide Occurrences of Arsenic in Ground Water, *Science*, 296:2143-2145.
- Nriagu, J.O., (1994) Arsenic in the environment, Wiley, New York.
- NRCC (National Research Council of Canada), (1978) Effects on arsenic in the Canadian environment. NRCC Nro. 15391.
- O'Reilly J., Watts M.J., Shaw R.A., Marcilla A.L., Ward N.I., (2010) Environ Geochem Health 32, 479–515.
- Ramesh Kumar A., Riyazuddin P., (2010) Preservation of inorganic arsenic species in environmental water samples for reliable speciation analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 29: 1212-1223.
- Samanta G., Clifford D.A., (2005) Preservation of Inorganic Arsenic Species in Groundwater, *Environ. Sci. Technol.*, 39: 8877-8882.

- Schäfer H., Läubli M., Döring, R., (2003), Monograph. Ion Chromatography: theory columns and eluents, *Metrohm Ltd*, Herisau, Switzerland.
- Seiler H.G., Sigel A., Sigel H., (1994) Handbook on Metals in Clinical and Analytical Chemistry, *Marcel Dekker*, New York, p. 237, 339, 667.
- Severiche Sierra C.A., Castillo Bertel M.E., Acevedo Barrios R.L., (2013) Manual de métodos analíticos para la determinación de parámetros fisicoquímicos básicos en aguas, *Fundación Universitaria Andaluza Inca Garcilaso*, Colombia.
- Smedley P.L., Kinniburgh D.G., (2002) A review of the source, behavior and distribution of arsenic in natural waters, *Applied Geochemistry*, 17: 517-568.
- UNE-EN ISO 10304-1, (2009) Calidad del agua. Determinación de aniones disueltos por cromatografía de iones en fase líquida. Parte 1. Determinación de bromuro, cloruro, fluoruro, nitrato, nitrito, fosfato y sulfato. Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.
- Vega M., Pardo R., Carretero M.C., Fernández L., Barrado E., (2004) An investigation into the spatial and temporal evolution of hydrochemical variables of an aquifer influenced by arsenic contamination by three-way Principal Component Analysis, *Euroanalysis XIII*, Salamanca (España).
- Welz B., (1998) Speciation analysis. The future of atomic absorption spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 13: 413.
- WHO, (1993) Guidelines for drinking-water quality, 2nd edition, vol 1: Recommendations. World Health Organization, *Geneva*.
- WHO, (1996) Guidelines for drinking-water quality, 2nd edition, vol 2: Health criteria and other supporting information. World Health Organization, *Geneva*.
- WHO, (2001) Arsenic and arsenic compounds, *Environmental Health Criteria 224*, 2nd edition.

Capítulo 7.
ANEXO

	As(III)	As(V)	Li	B	V	Fe	Zn	As	Mo	Ba	W	U	Ca	K	Mg	Na	Sr	Cl	F	NO3	SO4
As(III)	1,000																				
As(V)	-0,423	1,000																			
Li	-0,360	0,418	1,000																		
B	-0,072	0,301	0,879	1,000																	
V	0,661	0,095	0,083	0,313	1,000																
Fe	-0,003	-0,178	-0,031	-0,090	-0,012	1,000															
Zn	0,108	-0,329	-0,214	-0,190	-0,194	0,687	1,000														
As	0,058	0,830	0,395	0,378	0,414	-0,176	-0,266	1,000													
Mo	-0,200	0,516	0,849	0,874	0,311	0,083	-0,103	0,478	1,000												
Ba	-0,519	0,345	0,284	0,113	-0,277	-0,037	-0,141	0,224	0,132	1,000											
W	0,008	0,436	0,724	0,856	0,501	-0,087	-0,136	0,473	0,937	-0,018	1,000										
U	0,016	-0,229	0,093	0,211	0,023	-0,187	-0,157	-0,274	-0,088	-0,106	-0,053	1,000									
Ca	-0,610	0,713	0,493	0,255	-0,221	-0,216	-0,257	0,480	0,487	0,690	0,344	-0,354	1,000								
K	-0,263	0,506	0,876	0,896	0,261	-0,123	-0,265	0,468	0,950	0,242	0,920	-0,055	0,530	1,000							
Mg	-0,448	0,539	0,715	0,633	0,003	-0,222	-0,295	0,395	0,789	0,494	0,715	-0,226	0,803	0,869	1,000						
Na	0,173	0,031	0,476	0,615	0,440	0,069	-0,223	0,167	0,386	-0,036	0,386	0,712	-0,223	0,363	0,028	1,000					
Sr	-0,577	0,698	0,702	0,515	-0,110	-0,116	-0,234	0,533	0,671	0,704	0,516	-0,246	0,878	0,715	0,840	0,020	1,000				
Cl	-0,297	0,568	0,745	0,617	0,164	0,245	-0,044	0,544	0,784	0,490	0,597	-0,158	0,684	0,713	0,746	0,284	0,758	1,000			
F	-0,243	0,427	0,491	0,539	0,237	-0,221	-0,205	0,330	0,643	0,391	0,657	-0,164	0,604	0,711	0,821	-0,027	0,609	0,646	1,000		
NO3	-0,476	0,555	0,651	0,582	0,039	-0,184	-0,303	0,387	0,611	0,587	0,550	-0,029	0,627	0,708	0,754	0,180	0,748	0,654	0,777	1,000	
SO4	-0,238	0,690	0,833	0,812	0,266	-0,102	-0,261	0,664	0,908	0,334	0,816	-0,062	0,681	0,882	0,824	0,355	0,786	0,883	0,712	0,702	1,000

Tabla A.1. Matriz de correlación entre las variables analizadas en aguas de La Moraña (Ávila). El valor Rcrítico para n-2=15 g.d.l. y $\alpha=0.05$ es 0.482.

Tabla A.2. Matriz de correlación entre las variables analizadas en aguas de Valledado (Segovia). El valor R crítico para $n-2=4$ g.d.l. y $\alpha=0.05$ es 0.811

	pH	Cond	ORP	As(III)	As(V)	Li	B	Al	V	Mn	Fe	Zn	As
pH	1,000												
Cond	-0,193	1,000											
ORP	-0,455	-0,753	1,000										
As(III)	-0,069	0,651	-0,513	1,000									
As(V)	0,556	0,385	-0,745	-0,186	1,000								
Li	-0,197	0,941	-0,708	0,863	0,158	1,000							
B	0,147	0,746	-0,804	0,893	0,219	0,886	1,000						
Al	0,702	0,362	-0,731	0,655	0,323	0,489	0,744	1,000					
V	0,667	0,036	-0,521	-0,450	0,936	-0,186	-0,044	0,202	1,000				
Mn	-0,077	0,639	-0,510	0,998	-0,190	0,858	0,903	0,645	-0,449	1,000			
Fe	-0,037	0,496	-0,525	0,800	-0,040	0,705	0,885	0,517	-0,227	0,835	1,000		
Zn	0,236	0,298	-0,549	0,626	0,111	0,496	0,804	0,591	0,011	0,668	0,941	1,000	
As	0,749	0,222	-0,713	-0,201	0,966	0,036	0,189	0,448	0,959	-0,206	-0,071	0,138	1,000
Mo	0,123	0,579	-0,611	0,957	-0,050	0,800	0,949	0,763	-0,276	0,967	0,900	0,811	-0,034
Ba	-0,326	-0,599	0,831	-0,297	-0,726	-0,531	-0,661	-0,489	-0,551	-0,320	-0,590	-0,663	-0,656
U	-0,079	0,666	-0,529	0,999	-0,168	0,875	0,907	0,647	-0,436	0,999	0,821	0,649	-0,189
Ca	-0,332	0,983	-0,628	0,610	0,281	0,912	0,643	0,232	-0,070	0,593	0,396	0,155	0,099
K	-0,080	0,819	-0,694	0,949	0,062	0,959	0,964	0,622	-0,244	0,953	0,849	0,684	-0,007
Mg	-0,228	0,939	-0,652	0,859	0,105	0,989	0,831	0,470	-0,245	0,846	0,620	0,387	-0,016
Na	0,748	-0,065	-0,548	-0,230	0,773	-0,141	0,191	0,389	0,864	-0,204	0,165	0,451	0,848
Sr	-0,311	0,989	-0,654	0,611	0,307	0,917	0,661	0,248	-0,043	0,596	0,416	0,184	0,126
Cl	-0,416	0,487	-0,178	-0,311	0,483	0,196	-0,143	-0,476	0,338	-0,317	-0,255	-0,364	0,260
F	-0,488	0,839	-0,454	0,269	0,351	0,688	0,397	-0,121	0,058	0,271	0,302	0,104	0,112
NO3	-0,420	0,601	-0,226	-0,163	0,434	0,323	-0,066	-0,364	0,239	-0,184	-0,263	-0,423	0,216
SO4	-0,098	0,970	-0,791	0,806	0,299	0,988	0,875	0,530	-0,045	0,797	0,641	0,457	0,179
HCO3	-0,935	0,097	0,576	0,069	-0,684	0,113	-0,264	-0,646	-0,774	0,058	-0,156	-0,445	-0,830

Tabla A.2. Matriz de correlación entre las variables analizadas en aguas de Valledado (Segovia). El valor R crítico para $n-2=4$ g.d.l. y $\alpha=0.05$ es 0.811. (Continuación)

	Mo	Ba	U	Ca	K	Mg	Na	Sr	Cl	F	NO3	SO4	HCO3
pH													
Cond													
ORP													
As(III)													
As(V)													
Li													
B													
Al													
V													
Mn													
Fe													
Zn													
As													
Mo	1,000												
Ba	-0,476	1,000											
U	0,962	-0,328	1,000										
Ca	0,489	-0,465	0,622	1,000									
K	0,935	-0,537	0,960	0,760	1,000								
Mg	0,762	-0,444	0,865	0,929	0,931	1,000							
Na	0,034	-0,667	-0,210	-0,227	-0,063	-0,248	1,000						
Sr	0,501	-0,498	0,624	0,999	0,769	0,929	-0,190	1,000					
Cl	-0,386	-0,313	-0,289	0,545	-0,059	0,205	-0,018	0,546	1,000				
F	0,200	-0,564	0,295	0,863	0,504	0,678	-0,108	0,868	0,814	1,000			
NO3	-0,289	-0,255	-0,149	0,675	0,053	0,360	-0,164	0,670	0,966	0,836	1,000		
SO4	0,755	-0,596	0,818	0,931	0,928	0,977	-0,045	0,938	0,261	0,707	0,388	1,000	
HCO3	-0,178	0,562	0,063	0,264	-0,008	0,190	-0,926	0,233	0,281	0,310	0,353	0,017	1,000

