



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Caracterización y fraccionamiento químico de metales tóxicos en
sedimentos procedentes del río Quinto (Argentina)**

Autora: Nuria Samaniego Santos

Tutor: Rafael Pardo Almudí



Universidad de Valladolid

Departamento de
Química Analítica

UVa

Rafael Pardo Almudí, Catedrático 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 “Caracterización y fraccionamiento químico de metales tóxicos en sedimentos procedentes del río Quinto (Argentina)” realizado por Dña. NURIA SAMANIEGO SANTOS,

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 caracterizar por primera vez sedimentos fluviales procedentes del río Quinto en Argentina, respecto de sus contenidos totales y fraccionamiento químico B.C.R. de diferentes metales tóxicos. Las muestras nos fueron facilitadas por el Dr. Fabricio D. Cid de la Universidad de San Luis (Argentina). Durante el trabajo, la alumna ha procedido a la puesta a punto y validación de los protocolos para la determinación de los contenidos pseudo-totales (norma US-EPA 3051) y del fraccionamiento químico B.C.R. en las muestras de sedimentos por medio de los correspondientes Materiales de Referencia Certificados, para después pasar a su aplicación en once muestras de sedimentos. Las determinaciones de los metales en los extractos, fueron llevadas a cabo por medio de espectroscopías ICP-OES e ICP-MS, que fueron asimismo optimizadas y validadas. Los resultados generados, se han estudiado por medio de procedimientos quimiométricos multivariantes, Análisis en Componentes Principales y Análisis de Conglomerados, con objeto de encontrar relaciones entre los comportamientos de las muestras y de los metales analizados.

La alumna NURIA SAMANIEGO SANTOS ha realizado el trabajo satisfactoriamente y 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 29 de agosto de 2014

Fdo. Rafael Pardo Almudí

UVa

Universidad de Valladolid. Campus Miguel Delibes. Facultad de Ciencias. Departamento de Química Analítica.

A mis padres por su apoyo incondicional en todo momento.

A mi hermana por sus consejos y ayuda sobre qué camino tomar.

AGRADECIMIENTOS:

En primer lugar, me gustaría agradecer enormemente a mi tutor Rafael Pardo Almudí toda la ayuda prestada en la realización de este Trabajo Fin de Grado y su dedicación sobre todo en los últimos meses. Además, agradecerle su participación en mi formación como química a lo largo de la carrera.

En especial, agradecer al Doctor Fabricio D. Cid de la Universidad de San Luis (Argentina) quién planteó el problema y proporcionó las muestras para realizar su análisis. Sin él este Trabajo no podría haberse llevado a cabo.

También agradecer al Departamento de Química Analítica por permitirme realizar la parte experimental de este Trabajo en sus laboratorios. Especialmente agradecer a Paco de la Rosa y Charo Gómez su ayuda en todo lo que he necesitado, y sus consejos de cómo trabajar en un laboratorio.

Agradecer al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de Valladolid permitirme utilizar sus instalaciones y equipos, en especial a Begoña Ribón y Marta Hernández, sin cuya ayuda no podría haber llevado a cabo el análisis de las muestras, fundamental en la realización del Trabajo.

Por último, pero no menos importante, agradecer a mis padres y mi hermana sus consejos y apoyo incondicional durante el transcurso de mi carrera y durante la realización de este trabajo; y sobre todo, por haber soportado esos momentos de agobio en época de exámenes. También agradecer enormemente a mi pareja y amigos el estar presentes tanto en los buenos como en los malos momentos, animándome en todo momento y diciéndome que nada es imposible.

Muchas gracias a todos los que de una forma u otra habéis participado tanto en mi formación como química, así como en mi crecimiento como persona.

RESUMEN

Los metales pesados, también conocidos como tóxicos, constituyen un grupo de riesgo para el medio ambiente por sus características tóxicas y acumulativas. Estos elementos, entre los que destacan As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn, participan en ciclos biogeoquímicos que en muchos casos tienen como receptor último el ser humano. Aparecen por acciones naturales o por actividad antropogénica y pueden producir a largo plazo problemas en la salud de las personas. En este Trabajo, se han estudiado los sedimentos procedentes del Río Quinto en la región de la Pampa Argentina, ya que es en los sedimentos fluviales o marinos donde estos metales pesados pueden permanecer por un tiempo, para posteriormente ser liberados causando un problema medioambiental.

Los metales de estos sedimentos se han estudiado de dos formas diferentes: (i) a través de los contenidos pseudototales, que representan el total movilizable de los mismos en el sedimento y (ii) por medio de un fraccionamiento químico, atendiendo a las diferentes formas físico-químicas o de asociación en las que se pueden encontrar los metales en los sedimentos. El riesgo medioambiental global depende tanto del contenido pseudototal movilizable, como de la presencia de formas físico-químicas poco ligadas al sedimento.

En este estudio, los metales pseudototales se han cuantificado mediante la norma US-EPA 3051, consistente en una digestión ácida asistida por microondas. Por su parte, el fraccionamiento químico se ha llevado a cabo por medio del método B.C.R., que implica extracciones sucesivas con tres extractantes diferentes, para obtener distintas fracciones, correspondientes cada una a diferentes formas físico-químicas o de asociación de los metales en el sedimento.

- *Fracción asociada a carbonatos*, extraída con ácido acético 0,11 M.
- *Fracción asociada a óxidos hidratados de hierro y manganeso*, con clorhidrato de hidroxilamina 0,5 M.
- *Fracción asociada a materia orgánica y a sulfuros*, con peróxido de hidrógeno 8,8 M seguido de acetato amónico 1 M.
- *Fracción residual*, obtenida por diferencia entre el contenido pseudototal y las fracciones químicas.

Los contenidos de As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn metales presentes en los diferentes extractos fueron cuantificados por medio de técnicas espectroscópicas: ICP-OES en el caso de los contenidos pseudototales e ICP-MS para el fraccionamiento químico, validándose los procedimientos mediante los apropiados Materiales de Referencia Certificados.

Los valores medios obtenidos para los contenidos pseudototales fueron del orden de 10 mg/kg de Cr y Zn, y un orden de magnitud inferior para el resto, estando todos ellos en concentraciones inferiores a los niveles guía indicativos de peligrosidad medioambiental. El fraccionamiento químico medio mostró que la fracción residual era la mayoritaria para todos los metales en los sedimentos.

Los resultados analíticos fueron también interpretados mediante técnicas quimiométricas multivariantes: Análisis en Componentes Principales y Análisis de Conglomerados. En el caso de los contenidos pseudototales, se demostró un comportamiento diferencial del As respecto del resto de elementos, además de localizarse con facilidad las muestras con mayor contenido pseudototal. Por su parte, el análisis del fraccionamiento químico aportó que As, Pb y Zn se comportan de forma diferente al resto de los metales, Cd, Cr, Cu y Ni, así como que el Cu tiende a concentrarse en la Fracción 3 mientras que As y Pb tienden a hacerlo en la Fracción 2.

Finalmente, observando conjuntamente los resultados obtenidos, se concluyó que los metales presentes en los sedimentos analizados procedentes del Río Quinto, no suponen un riesgo medioambiental ya que se encuentran en la Fracción Residual, la más ligada al sedimento y, por tanto, la menos movilizable.

ABSTRACT

Heavy metals, also known as toxic metals, are dangerous for the environment, because of their poisonous and cumulative characteristics. These elements, among them As, Cd, Cu, Ni, Pb and Zn, take part in biogeochemical cycles having as last receptor, in the majority of the cases, the human beings. They appear in the environment because of natural actions or anthropogenic activities and can produce long-term health problems in people. This work has been focused on the study of sediments collected at the Río Quinto (located in the Argentinean Pampa), because the river and marine sediments act as temporary sinks, where these metals can remain for a long time, to be later released causing an environmental problem.

The metals included in these sediments, have been evaluated in two different ways: (i) through pseudo-total contents, which represent the total mobilizable or available amount of metals in the sediment and (ii) by using a chemical fractionation procedure, differentiating amongst the several physicochemical or bonding possibilities in which these elements appear in the sediments. The real environmental risk will depends both on the pseudototal contents as well as on the existence of physicochemical forms weakly bonded to sediments.

In this study, the pseudototal metals have been quantified by the US-EPA 3051 norm, a microwave-assisted acid digestion. On the other hand, chemical fractionation has been carried out by the B.C.R. procedure, based on sequential extractions using three different extractantes, in order to obtain several fractions corresponding to different physicochemical or bonding forms of the metals in the sediments:

- *Fraction associated to carbonates*, extracted by 0.11 M acetic acid.
- *Fraction associated to hydrous iron and manganese oxides*, using 0.5 M hydroxylammonium chloride.
- *Fraction associated to organic matter and sulphides*, with 8.8 M hydrogen peroxide followed by 1 M ammonium acetate.
- *Residual Fraction*, obtain by subtraction between the pseudototal contents and the sum of the 3 above fractions.

The concentrations of As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in the different extracts were quantified by using spectroscopy techniques: ICP-OES for the pseudototal contents and ICP-MS for the chemical fractionation. Besides, both procedures were validated with the appropriated Certified Reference Materials.

The average values obtained for pseudototal contents were around 10 mg/kg for Cr and Zn, and one magnitude order for the other metals, all these concentrations being under the reference values for environmental risk. On its behalf, chemical fractionation showed that residual fraction was the majoritarian one for all metals in the sediments.

In addition, the results were also interpreted by multivariate chemometrics techniques: Principal Component Analysis and Hierarchical Clustering. Firstly, in the case of pseudototal contents, a different behaviour was demonstrated for As and the samples with large pseudototal contents were easily located. On the other hand, their application to chemical fractionation showed a similar behaviour for As, Pb and Zn, different with regards to the rest of metals, Cd, Cr, Cu and Ni. It was also shown that Cu tends to concentrate in Fraction 3, while As and Pb tend to do it in Fraction 2.

To sum up and by taking in account all the found results, it can be concluded that toxic metals present in the sediments of the Río Quinto, do not pose any environmental risk: their mobilizable or available levels are lesser than the reference values and, moreover, they are mainly concentrated in the Residual fraction, the more bonded to sediment and, therefore, the less available one.

Índice

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Problemática medioambiental de los metales tóxicos	3
1.2	Fraccionamiento químico y movilidad	5
1.3	Técnicas analíticas	10
1.3.1	ICP-OES	10
1.3.2	ICP-MS.....	13
1.4	Técnicas quimiométricas	14
1.4.1	Análisis en Componentes Principales	14
1.4.2	Análisis de Conglomerados	17
1.5	Área de estudio	19
2	OBJETIVOS	21
3	MATERIALES Y MÉTODOS	25
3.1	Zona de muestreo	27
3.2	Procedimiento de muestreo	27
3.3	Procedimientos analíticos	30
3.3.1	Determinación de contenidos pseudo-totales	30
3.3.2	Fraccionamiento químico B.C.R.	33
3.3.3	ICP-OES	38
3.3.4	ICP-MS	41
3.3.5	Validación de los procedimientos	44
3.3.6	Herramientas informáticas	45
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1	Contenidos pseudototales	49
4.1.1	Evaluación de la peligrosidad medioambiental	49
4.1.2	Análisis estadístico univariante	50
4.1.3	Análisis en Componentes Principales	52
4.1.4	Análisis de Conglomerados	58
4.2	Fraccionamiento químico	63
4.2.1	Fraccionamiento medio	65
4.2.2	Análisis en Componentes Principales	66
4.2.3	Análisis de Conglomerados	73
5	CONCLUSIONES	75
6	BIBLIOGRAFÍA	79

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1.- Problemática medioambiental de los metales tóxicos

Ciertos elementos traza y metales pesados, tales como As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn entre otros, constituyen un grupo de elementos ubicuos en la corteza terrestre y en el medio natural y que se asocian con efectos negativos en los campos medioambiental y sanitario. Aunque en ese grupo se incluyen algunos no-metales, como el selenio, o metaloides como el arsénico, la mayor parte de sus componentes son metales, lo que ha hecho que todos ellos fueran conocidos popular y colectivamente como metales pesados, un término muy confuso científicamente (Duffus, 2002; Hodson, 2004; Pardo, 2010). Dicho término en ocasiones se complementa, por razones obvias con el de elementos traza, y en general hoy día tiende a ser evitado, siendo sustituido progresivamente por el de 'metales tóxicos'. Esta denominación no goza aún de consenso absoluto, pero será generalmente utilizado en el presente trabajo para referirnos colectivamente a los elementos estudiados en el mismo.

Todos ellos conforman un grupo muy peligroso de contaminantes medioambientales debido a sus características tóxicas y acumulativas (Härup, 2003; Cruz-Guzmán Alcalá, 2007; Kabata-Pendias, 2011; Alloway 2013): no son biodegradables y tienen unos periodos muy grandes de semi-eliminación de los seres vivos. Participan en ciclos biogeoquímicos globales, circulando por los diversos compartimentos medioambientales hasta llegar a los seres humanos, a través de la cadena alimentaria, pudiendo tener efectos significativos a largo plazo sobre la salud. Mientras que algunos procesos naturales (erupciones volcánicas, incendios...) constituyen una fuente relevante de dichos elementos en el medioambiente, el problema está en las aportaciones por acción antropogénica, tales como la actividad industrial y algunas actividades agrícolas: abonado con residuos urbanos, aguas residuales, residuos ganaderos, etc. (Figura 1).

Los suelos y los sedimentos fluviales y marinos pueden actuar como reservorios temporales, de los cuales los metales tóxicos pueden ser removilizados y liberados al medio-ambiente (Chabukdhara y Nema, 2012). Por este motivo, para estos elementos, se

debe considerar como riesgo ambiental tanto su concentración total como la movilidad de los mismos (Ebdon et al, 2001; Yan et al 2007; Pardo et al, 2008;).

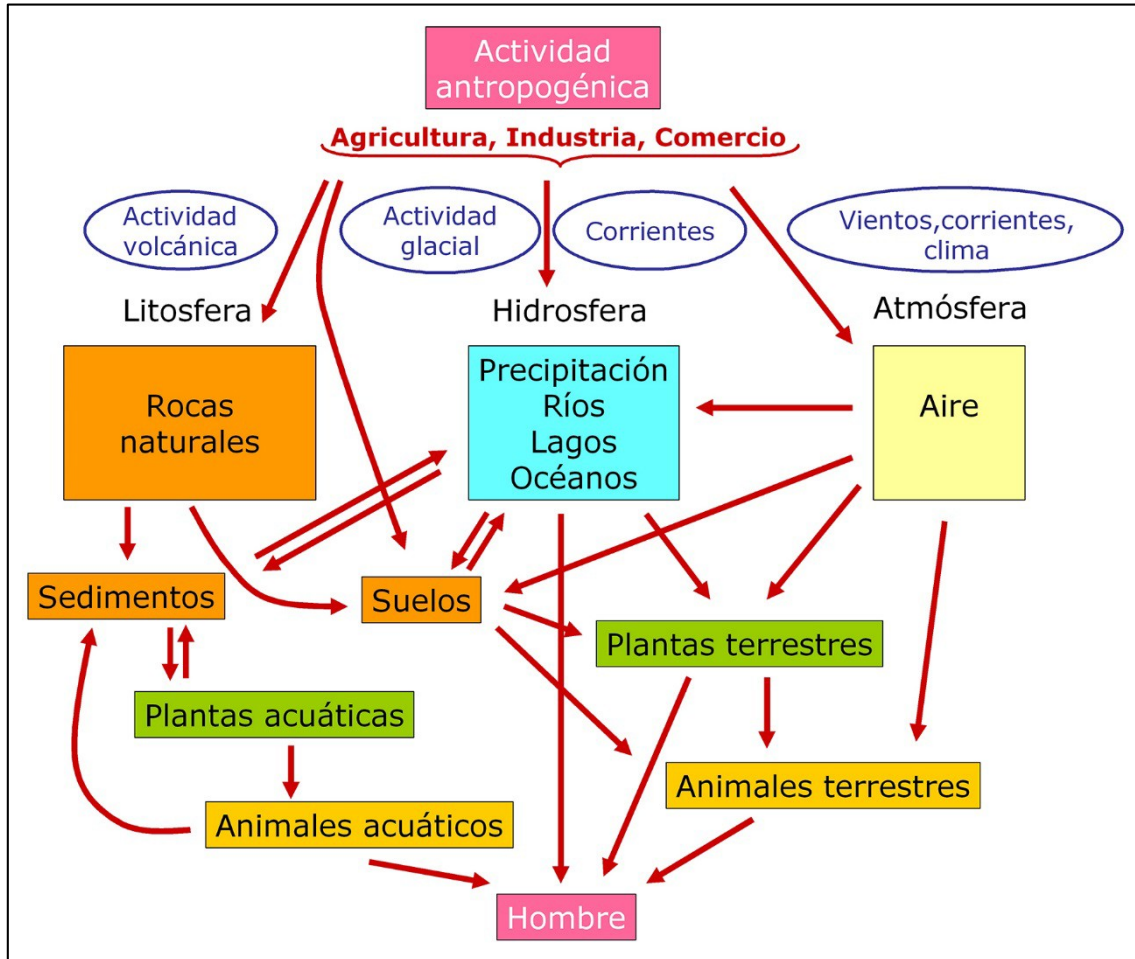


Figura 1.- Ciclo biogeoquímico global de los ‘metales tóxicos’

Habitualmente, los contenidos totales de elementos traza y metales pesados en muestras medioambientes sólidas, tales como suelos o sedimentos, se evalúan a través de los denominados contenidos ‘pseudo-totales’, determinados en los extractos obtenidos a partir de la digestión de las muestras con ácido fuerte o agua regia. La utilización de procedimientos que originen la disolución total de los sedimentos (ataque por fusión alcalina o bien con mezclas ácidas conteniendo ácido fluorhídrico) o bien el empleo de técnicas de espectroscopía de rayos X (Manceau et al, 2004), permitiría conocer la concentración total de los elementos en la muestra, incluyendo aquella fracción de los

mismos, por formar parte del retículo cristalino o estar en forma de un compuesto muy insoluble, es difícilmente movilizable.

Por el contrario, los denominados contenidos pseudo-totales muestran el contenido máximo potencialmente movilizable o disponible a largo plazo o en condiciones medioambientales extremas (Sierra et al, 2007; Rao et al, 2008), y que es por tanto capaz de circular con mayor facilidad por los compartimentos medioambientales y la cadena trófica (Figura 1) y llegar en último término al hombre. Permiten por lo tanto, conocer de una manera más realista el máximo riesgo medioambiental. El procedimiento más utilizado es el tratamiento, ayudado con microondas, de la muestra sólida con ácido nítrico concentrado, que es la base de la denominada norma EPA-3051 (USEPA, 1994). Dicho procedimiento ha sido adoptado por muchos países e incluso en nuestra comunidad autónoma de Castilla y León (UTE SINAE-ITSEMAP AMBIENTAL, 1999) y cuenta además con el suficiente número y variedad de Materiales de referencia certificados, como para poder ser validado con perfectas garantías.

1.2.- Fraccionamiento químico y movilidad

Los contenidos pseudo-totales muestran el máximo riesgo medioambiental que una muestra medioambiental sólida tiene a largo plazo, pero los metales tóxicos en suelos y sedimentos pueden existir en diferentes formas químicas y/o de asociación (*binding*) con diferentes toxicidad y movilidad (Rauret, 1993). Mientras que el concepto de especiación (*speciation*) como ‘determinación de las diferentes formas físico-químicas de un elemento’ (Florence, 1982) ha resultado de gran utilidad en muestras acuosas, el problema es más complejo en muestras sólidas. Por un lado está el problema de las diferentes formas químicas en las que un elemento puede estar presente y que tienen distinto comportamiento en términos de toxicidad y movilidad (véase por ejemplo Henke (2009) para el caso del arsénico) y por otro el de su asociación concreta con la fase sólida (Gleyzes et al, 2002). Todo esto, unido a que la herramienta fundamental para estudios de este tipo sea la extracción/lixiviación con diferentes reactivos químicos, que es fuertemente dependiente de parámetros operacionales, tipo y concentración del reactivo, relación

extractante/muestra, temperatura, tiempo de agitación... (Sutherland et al, 2000) hace que los términos preferidos para referirse a esta metodología en el caso de muestras sólidas, sean los de extracción/lixiviación o fraccionamiento químico, antes que al antiguamente utilizado de especiación.

El fundamento del empleo de la extracción/lixiviación, es que la toxicidad y movilidad de los elementos tóxicos en muestras sólidas dependen, no solo de su especie química concreta como también de su forma de asociación al sólido: adsorbido superficialmente, precipitado dentro de minerales primarios o secundarios, complejoado por ligandos orgánicos, etc. (Gleyzes, 2000). Por tanto, los cambios de condiciones medioambientales, tales como el pH, el potencial red-ox o el aumento de la concentración de ligandos orgánicos, pueden originar la removilización del metal tóxico de la fase sólida a la líquida y favorecer por tanto la contaminación de las aguas cercanas y por tanto su circulación en el ciclo biogeoquímico global. Por tanto, la identificación de los puntos y fases principales de asociación de dichos elementos en suelos y sedimentos nos ayudará a comprender los procesos geoquímicos subyacentes y a evaluar el potencial de removilización y los riesgos medioambientales que se corren (Sutherland et al 2000).

La extracción/lixiviación se lleva a cabo mediante el tratamiento de la muestra medioambiental sólida con una disolución extractante conteniendo uno o varios reactivos químicos. El proceso puede hacerse en un solo paso (*single extraction procedures*) o en varios (*sequential extraction procedures*). La utilización de un único (*single*) extractante tiene la ventaja en principio de que al menos en teoría se puede conseguir mediante la adecuada elección del reactivo químico, extraer una determinada especie, fase o forma de asociación con el sólido. Entre las fases y fracciones universalmente reconocidas están (Rao et al, 2008):

- *Fracción intercambiable adsorbida inespecíficamente.* Incluye metales retenidos superficialmente por interacciones electrostáticas débiles, que pueden ser removilizados fácilmente por cambios en las concentraciones de K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} o NH_4^+ o el pH del líquido circundante.
- *Fracción intercambiable adsorbida específicamente.* Incluye elementos ligados por fuerzas covalentes y que no son desplazados por K^+ o Ca^{2+} , pero sí por Pb^{2+} o Cu^{2+} , que se emplean para su determinación.

- *Fracción complejada orgánicamente*. Incluye metales procedentes de procesos de complejamiento/bioacumulación. Su determinación se efectúa por oxidación de los complejantes en dos pasos (i) peróxido de hidrógeno y (ii) acetato amónico, lo que implica que también se determinan metales ligados a fases sulfuradas. En la naturaleza, este proceso se lleva a cabo por aumento del potencial red-ox, por oxidación natural o por degradación bacteriana
- *Fase carbonatada (fracción asociada a carbonatos)*. Fase muy sensible a cambios ambientales naturales que impliquen aumento de la acidez. Los metales ligados se determinan mediante utilización de extractantes ácidos a pH no muy extremo.
- *Fracción asociada a óxidos hidratados de hierro y manganeso*. Estos óxidos conforman uno de los sumideros más habituales para acumular metales tóxicos, y operan por varios mecanismos: coprecipitación, adsorción, complejamiento superficial, intercambio iónico o incorporación al retículo cristalino. Los metales ligados suelen determinarse por medio de reductores de fuerza media como la hidroxilamina, ditionito, citrato y oxalato.

La Tabla 1 presenta un resumen de las fases y los reactivos más utilizados (Ure et al, 1993). Una relación más exhaustiva puede encontrarse en Rao et al (2008).

Tabla 1.- Resumen de fracciones y reactivos

Fracción	Reactivo y concentración
Fracciones intercambiables	KNO ₃ 0,1 mol /L MgCl ₂ 1 mol /L CaCl ₂ 0,05 mol /L Ca(NO ₃) ₂ 0,1 mol /L NH ₄ OAc 1 mol /L pH_7
Fase carbonatada (fracción asociada a carbonatos)	HOAc 0,5 mol /L HOAc:NaOAc 1 mol /L pH 5
Fracción asociada a óxidos hidratados de hierro y manganeso	NH ₂ OH, HCl 0,04 mol /L en medio acético o nítrico Oxalato amónico Ditionito Sódico + Citrato sódico + Bicarbonato sódico (DCB)
Fracción complejada orgánicamente	H ₂ O ₂ NaOCl

La utilización de extractantes únicos (*single extractants*) como los propuestos en la Tabla 1, presenta en principio la ventaja de que se puede liberar una fase o fracción específica. Sin embargo, esto no es estrictamente cierto (Rao et al, 2008) ya que un extractante dado puede en principio movilizar mayoritariamente una fase, pero simultáneamente será capaz de liberar fracciones o fases retenidas con menos fuerza. Este tipo de extracciones/lixivitaciones con un único extractante se usan en muchos casos en investigaciones de tipo más agroquímico, en los que se puede correlacionar el contenido lixiviado con otros parámetros propios de los vegetales estudiados.

La información obtenida a partir de la extracción/lixivitación con reactivos apropiados a las diferentes fases o fracciones, puede ser aumentada mediante la combinación de una serie de ellos, en un esquema secuencial de extracción/lixivitación conocido como fraccionamiento químico, en el cual el residuo de la primera extracción es empleado como material para la segunda y así sucesivamente. El orden de aplicación de los diferentes reactivos se elige de tal forma que su agresividad o reactividad química vaya aumentando, liberándose así en primer lugar los metales asociados a las fases o fracciones menos retenidas y que presentan por tanto un mayor riesgo medioambiental por su mayor disponibilidad. Según va avanzando el proceso de fraccionamiento, los metales lixiviados presentan una menor disponibilidad y una menor peligrosidad, hasta llegar a fracciones que contienen metales prácticamente inmovilizables (Rao et al, 2008; Okoro et al, 2012).

El primer esquema que fue aceptado por la comunidad científica, fue el propuesto por Tessier et al (1979), que utilizaba cuatro reactivos (a) cloruro magnésico a pH=7, (b) disolución reguladora ácido acético/acetato de pH=5, (c) clorhidrato de hidroxilamina en medio ácido acético a pH=2 y (d) peróxido de hidrógeno en medio nítrico, seguido de acetato amónico, obteniéndose cuatro fracciones que corresponden de forma aproximada a los metales (a) intercambiables, (b) asociados a carbonatos, (c) asociados a óxidos reducibles de Fe y Mn y (d) asociados a Materia Orgánica y sulfuros. Unos años más tarde apareció una modificación (Kersten y Förstner, 1986) que utilizaba cinco reactivos y originaba por tanto cinco fases, al dividir la fracción (c) de Tessier en dos, conteniendo los metales asociados a óxidos ‘fácilmente’ o ‘moderadamente’ reducibles, respectivamente. Ambos esquemas fueron utilizados durante una serie de años, en los que se pusieron de manifiesto algunas carencias, particularmente la falta de concreción de algunos

parámetros operacionales, tales como las concentraciones o los tiempos de extracción o la falta de Materiales de Referencia Certificados.

Con objeto de enfocar el problema de la extracción de elementos traza en suelos y sedimentos, el *Bureau Communautaire de Référence* (B.C.R.), hoy denominado *Standards, Measurements and Testing Program* (S.M.T.P.) de la Unión Europea, comenzó en 1987 una serie de programas de estudio para la armonización de procedimientos de extracción única o secuencial de metales tóxicos en suelos y sedimentos. En 1992, durante una reunión celebrada en Sitges (Barcelona) un grupo de expertos propuso un procedimiento de extracción secuencial que incluye tres pasos y emplea por tanto tres reactivos (Ure et al, 1993): (a) ácido acético, (b) clorhidrato de hidroxilamina y (c) peróxido de hidrógeno, obteniéndose tres fracciones que corresponden de forma aproximada a los metales (a) extraíbles y asociados a carbonatos, (b) asociados a óxidos reducibles de Fe y Mn y (c) asociados a Materia Orgánica y sulfuros, a la vez que daba una serie de recomendaciones prácticas sobre reactivos, matrices analíticas y problemas producidos después de la extracción (Griepink, 1993; Quevauviller et al, 1993). El procedimiento inicial (Ure et al, 1993) fue comprobado, estudiado y validado y sufrió algunas modificaciones hasta alcanzar su forma final (Ure et al, 1999; Rauret et al, 2000) que presenta algunas modificaciones respecto del primitivo, fundamentalmente en el tratamiento de la Fracción 2. La Tabla 2 presenta un esquema del procedimiento B.C.R. (esa es su denominación informal) en su forma actual, adaptado de Mossop and Davidson (2003) que hacen un estudio comparativo de ambas versiones del procedimiento.

No incluida en el procedimiento B.C.R., está la denominada fracción 'Residual' que puede obtenerse tratando el residuo procedente de la obtención de la Fracción 3 con agua regia (Rauret et al, 2000) o bien por diferencia, restando la suma de las fracciones 1, 2 y 3 del contenido pseudo-total obtenido en una muestra aparte.

El procedimiento B.C.R. se ha venido utilizando a lo largo de estos últimos años, aplicándolo a diferentes matrices medioambientales, suelos (Davidson et al, 1998; Madrid et al, 2007; Pueyo et al, 2008; Pardo et al, 2008), sedimentos (Tokalioğlu et al, 2000; Guevara et al, 2004; Kartal et al, 2006; Alomary and Belhadj, 2007), residuos urbanos e industriales (Pardo et al, 2013; Li et al, 2014), suelos vegetales (Kubová, 2008). Para más aplicaciones, ver Okoro et al (2012).

Tabla 2.- Resumen esquemático del procedimiento B.C.R.

Fracción	Denominación	Fracciones extraídas	Reactivo
1	Intercambiable y soluble en agua y en ácido	Fracciones, solubles, intercambiables y asociadas a carbonatos	Ácido acético 0,11 M
2	Reducible	Fracción asociada a óxidos hidratados de hierro y manganeso	Clorhidrato de hidroxilamina 0,5 M a pH 1,5
3	Oxidable	Fracción asociada a materia orgánica y sulfuros	Peróxido de hidrógeno seguido de acetato amónico 1,0 M a pH 2

1.3.- Técnicas analíticas

Una vez separadas las diferentes fracciones o extractos, tres procedentes del esquema BCR y uno de la norma USEPA 3051, se deben determinar los contenidos de los metales tóxicos mediante la correspondiente técnica. En nuestro caso, se han utilizado ICP-OES e ICP-MS. A continuación se describe brevemente el fundamento de ambas técnicas (Skoog et al, 2000)

1.3.1.- ICP-OES

La Espectroscopía de Emisión Atómica con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo es una técnica muy utilizada actualmente debido a las grandes ventajas que ofrece. El plasma que es una mezcla gaseosa (Ar) conductora de la electricidad contiene una concentración significativa de cationes y electrones, que de forma neta tiene una carga neutra. Gracias a las altas temperaturas que alcanza el plasma debido a la energía que absorben los iones del gas, se consigue que las interferencias entre elementos sean menores. Por ello, el ICP-OES es una técnica en la que se pueden analizar simultáneamente diferentes elementos. Además, se obtienen buenos espectros de emisión para los elementos a analizar en unas mismas condiciones de excitación. Con esta técnica se consiguen buenos límites de detección, llegando al nivel de trazas.

Un equipo de ICP-OES está formado por la fuente de plasma denominada antorcha (Figura 2). Consiste en tres tubos concéntricos de cuarzo a través de los cuales fluyen corrientes de argón. El consumo total de argón puede ser de 5-20 L/min dependiendo el diseño de la antorcha. Rodeando la parte superior del tubo externo hay una bobina de inducción alimentada por un generador de radiofrecuencia capaz de producir una potencia de 0.5 a 2 kW. La ionización del argón que fluye por el tubo interior se inicia por medio de una chispa; los iones y electrones formados interaccionan con el campo magnético producido por la bobina de inducción y toman una trayectoria circular. El plasma toma una temperatura elevada que hace necesario el aislamiento térmico del cilindro exterior, se consigue haciendo fluir argón de forma tangencial alrededor del tubo.

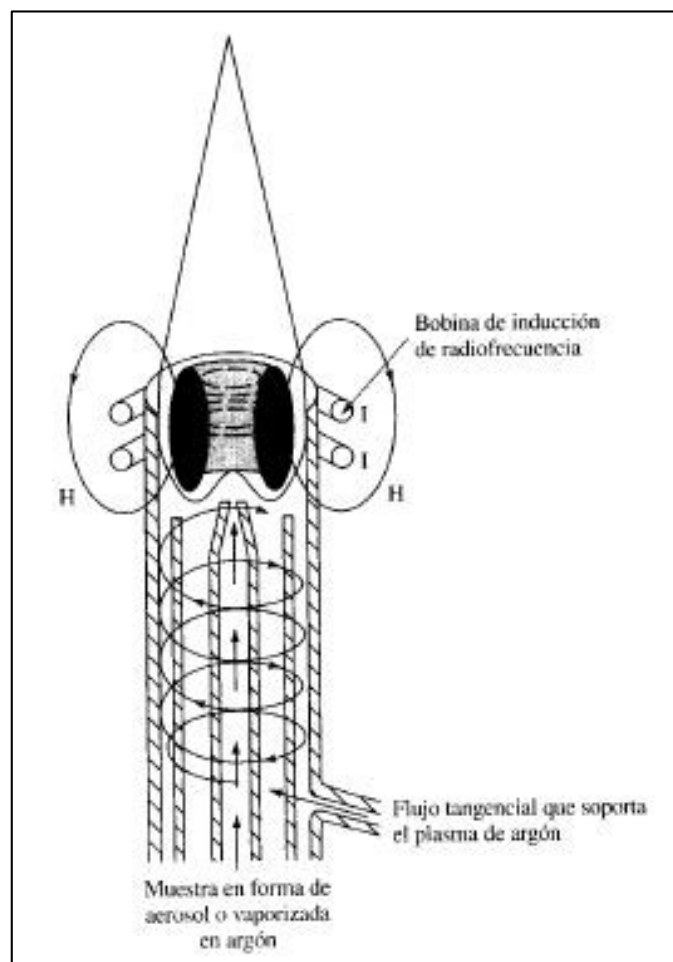


Figura 2.- Antorcha ICP (Skoog et al,2010)

La introducción de la muestra se hace mediante un nebulizador. La muestra líquida se transforma en un aerosol en el nebulizador, introduciéndose en el plasma. Debido a las altas temperaturas del plasma, la muestra se atomiza y los elementos se excitan según la altura de observación. Esto es debido a que la temperatura, y en consecuencia la energía, del plasma varía según la altura de la llama en la que se produzca la observación. Esto se produce cuando se tiene una antorcha radial, la observación se produce de forma perpendicular con el detector. En cambio, la observación puede hacerse de forma axial, es decir, la antorcha se alinea horizontalmente con el detector. En este segundo caso, variará la profundidad de observación.

La detección de la radiación emitida por los elementos excitados se hace mediante un espectrómetro (Figura 3), consistente en un policromador de red de escalera. Tiene un prisma de fluoruro de calcio que clasifica la radiación que llega a la red de escalera donde se separan las radiaciones de cada elemento según las longitudes de onda de emisión.

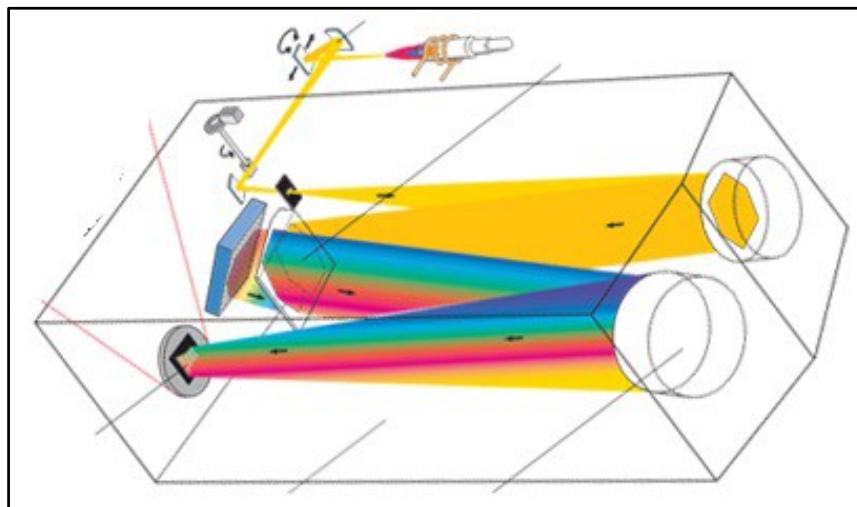


Figura 3.- Esquema del espectrómetro ICP-OES

Eligiendo la longitud de onda a la cual el elemento emite mayor energía, se obtendrá el espectro de emisión de dicho elemento. Cuantificando la intensidad de las líneas de emisión se conocerá el contenido de la muestra en dicho elemento.

1.3.2. ICP-MS

La Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo se ha convertido en una de las técnicas más importantes para el análisis elemental, debido a sus bajos límites de detección, alto grado de selectividad y razonable buena precisión y exactitud. La antorcha del ICP sirve en este caso como atomizador e ionizador. La muestra líquida se introduce y el nebulizador se encarga de formar un aerosol. En ocasiones, una vez que se ha formado el plasma, este pasa a una cámara de reacción/colisión donde se eliminan las especies formadas que puedan ser interferencias a la hora de determinar los iones.

La parte crítica del instrumento es la interfase que acopla la antorcha del ICP que trabaja a presión atmosférica con el espectrómetro de masas que trabaja a vacío. Esto se consigue a través del cono de muestra, a través del cual pasa el plasma a una región donde la presión es menor. En este punto el plasma sufre una expansión rápida produciendo su enfriamiento. A continuación, una fracción del plasma pasa a un segundo cono llamado separador o *skimmer* que lleva a una cámara que se mantiene a la presión del espectrómetro de masas. En este punto se separan los cationes de los electrones y de las especies moleculares mediante un potencial negativo y son enfocados y acelerados por diferentes lentes magnéticas hacia el orificio de entrada del analizador de masas cuadrupolar (Figura 4).

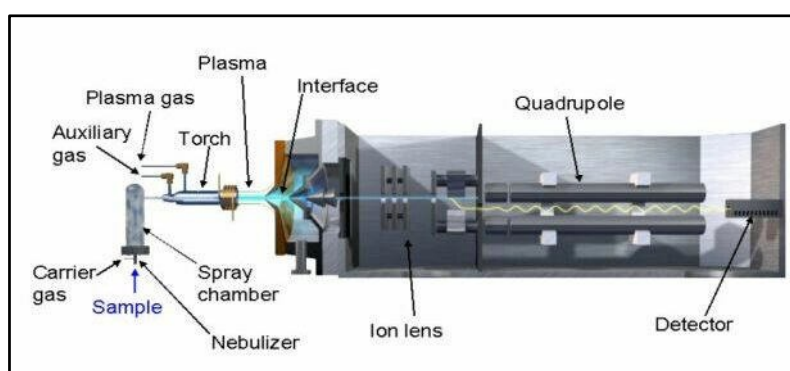


Figura 4.- Esquema de un ICP-MS

El cuadrupolo está formado por cuatro barras cilíndricas paralelas que actúan como electrodos. Las barras opuestas están conectadas eléctricamente, unas al polo positivo de

una fuente de corriente continua y las otras al polo negativo. De esta forma, los iones irán alcanzando el detector según su relación m/z .

Los espectros de masas obtenidos en este caso, son mucho más sencillos de interpretar que los espectros ópticos. La cuantificación de los elementos se hará por medio de la intensidad de las líneas de estos espectros de masas, correspondientes a las relaciones m/z de los elementos deseados. Los ICP-MS consiguen separar iones con una unidad de relación m/z de diferencia. Además, lo hacen en un intervalo dinámico de 6 órdenes de magnitud.

Ambas espectrometrías, ICP-OES e ICP-MS, se vienen utilizando de forma rutinaria en la determinación de metales tóxicos en muestras medioambientales incluyendo estudios de fraccionamiento químico (Pardo et al, 2002, 2004, 2008, 2013; Guevara-Riva et al, 2004, Alomary et al, 2007; Kubová et al, 2008; Pueyo et al, 2008; Karlsson et al, 2010; Okoro et al, 2012)

1.4.- Técnicas quimiométricas

La extracción de información de los datos obtenidos experimentalmente puede hacerse por procedimientos estadísticos clásicos, pero en este caso en que los datos son de naturaleza multivariante, ya que se determinan distintas variables (metales) sobre diferentes objetos (fracciones o sedimentos), da lugar a que los datos puedan ser presentados en forma de matriz bidimensional. Estos procedimientos son de gran utilidad en esos casos, pues permiten visualizar de forma sencilla información no asequible a primera vista en una tabla de datos. En este trabajo, hemos utilizado dos de los procedimientos más habituales; el Análisis en Componentes Principales (A.C.P.) y el Análisis Clúster o de Conglomerados (A.C.), cuyo fundamento resumimos brevemente a continuación (Pardo y Barrado, 1988; Ramis y García, 2001; Departamento de Química Analítica, 2013; Vandeginste et al, 1998).

1.4.1.- Análisis en Componentes Principales

El Análisis en Componentes Principales (A.C.P.) es uno de los procedimientos más utilizados para reducir la dimensionalidad de una tabla de datos, bien procedente de una técnica analítica multivariante, o bien de la combinación de una serie de análisis independientes llevados a cabo sobre muestras idénticas. Independientemente de su origen, una tabla de esas características siempre corresponde a la determinación de diferentes variables pertenecientes a distintos objetos y en nuestro caso, la determinación de una serie de metales en diferentes muestras.

Objeto	Variable			
	1	2	...	p
1	x_{11}	x_{12}	...	x_{1p}
2	x_{21}	x_{22}	...	x_{2p}
...
n	x_{n1}	x_{n2}	...	x_{np}

En estos casos, la información puede ponerse en forma matricial. Cada uno de los n objetos está caracterizado por un vector línea: $\mathbf{x}_i = [x_{i1}, x_{i2}, \dots, x_{ip}]$ formado por los elementos x_{ij} que son los valores de las p variables, los cuales se colocan uno debajo de otro para dar lugar a una matriz \mathbf{X} de dimensiones (n x p). En nuestro caso las variables son los metales y los objetos las diferentes muestras.

Una tabla de datos permite representar cada uno de los n objetos como un punto en un espacio de p dimensiones. El objetivo del A.C.P. es reducir la dimensionalidad de \mathbf{X} de forma que al disminuir el número de variables, hasta un valor $F < p$, la visualización sea más fácil. Para ello, se parte de la hipótesis de que no todas las p variables originales medidas contienen información relevante sobre los objetos y de que algunas de ellas están correlacionadas entre sí, por lo que la reducción en su número hasta F, no implica una pérdida significativa de información. El modelo matemático que se busca es:

$$x_{ij} = \sum_{f=1}^F u_{if} b_{fj} + e_{ij}$$

En esa ecuación, F es el número de factores o componentes ortogonales significativos del modelo, el cual debe ser tan pequeño como sea posible (2 ó 3). u_{if} son las

puntuaciones (o *scores*), es decir los valores que toma para cada objeto cada una de las F nuevas variables. b_{fj} son las cargas (o *loadings*) que muestran como participa cada una de las variables originales en las F nuevas variables, y e_{ij} es el error, es decir la cantidad de información no explicada por el modelo. Los u_{if} se agrupan en una matriz \mathbf{U} ($n \times F$) o matriz de scores, y los b_{fj} en una matriz \mathbf{B} ($p \times F$), por lo que el modelo en forma matricial es $\mathbf{X} = \mathbf{U}^T \mathbf{B}$.

Las puntuaciones, u_{if} , se suelen denominar componentes principales, factores o variables latentes y no coinciden con las variables determinadas experimentalmente, sino que son una combinación lineal de las mismas, participando éstas últimas en las nuevas en una cuantía que depende del grado de información que realmente aportan al conjunto de datos original. Los nuevos F componentes son además ortogonales entre sí, lo que hace que no compartan información los unos con los otros. El algoritmo utilizado por nosotros se basa en la diagonalización de la matriz de correlación, lo que implica un autoescalado previo de todas las columnas a media cero y varianza unidad, lo que evita sesgos indeseados causados por las diferentes magnitudes de las p variables originales.

Los resultados del A.C.P. se presentan mediante una serie de gráficos. El primero, es el gráfico de Scree (o gráfico de sedimentación) en el que se representa la importancia decreciente de cada una de las nuevas variables en la descripción de la información contenida en la tabla \mathbf{X} . Ese gráfico permite elegir los F componentes más significativos y que explican por tanto una mayor cantidad de la información original. Los gráficos de cargas o *loadings* presentan los valores b_{fj} para cada componente F y muestran por tanto la participación de las variables originales en las nuevas, asimilados a coeficientes de correlación entre cada variable original y cada uno de los F componentes. Por su parte, el gráfico de puntuaciones o *scores* muestra los valores, u_{if} , que toman cada una de las nuevas variables para cada uno de los objetos.

La interpretación del A.C.P. se hace visualizando por separado o conjuntamente, los gráficos de cargas y puntuaciones. En general, las variables originales que aparezcan cercanas entre sí en el gráfico de cargas, estarán muy relacionadas entre sí. Asimismo, aquellos objetos que aparezcan cercanos entre sí en el gráfico de puntuaciones, se comportarán de forma similar y se parecerán entre ellos. Por el contrario, aquellas variables u objetos que aparezcan separadas en dichos gráficos, se parecerán muy poco entre sí.

Habitualmente, y con el fin de facilitar la interpretación, se representan solo los 2 o 3 primeros componentes, lo cual suele bastar para explicar una cantidad significativamente importante de información.

Las cargas y puntuaciones se pueden representar conjuntamente, en lo que se denominan gráficos bivariados. Su interpretación es similar a la indicada más arriba, pero ahora se pueden sacar conclusiones acerca del comportamiento conjunto de objetos y variables. Hay que tener en cuenta que cada gráfico que se construya, explicará una cantidad de información que será la suma de la explicada por cada uno de los componentes representados, ya que son ortogonales y no comparten información. En cualquier caso, y salvo excepciones, la cantidad de información representada es inferior al 100%.

En ocasiones se aplican a los resultados del A.C.P. lo que se conoce como rotaciones, entre las que la más conocida es la rotación Varimax. Mediante ella, se sacrifica la condición de ortogonalidad en aras de encontrar factores más “limpios”, lo que suele complicar la interpretación al aumentar el número de factores o componentes significativos.

El A.C.P. se viene utilizando con profusión en aquellos campos científicos como el medioambiental, en que se conocen una gran cantidad de parámetros químicos correspondientes a muchas muestras (Barbieri et al 1998; Salman y Abu Ruka'h, 1999; Helena et al, 2000; Simeonov et al, 2000; Singh, et al 2007; Salman et al, 2009; Cid et al 2011) o a estudios de fraccionamiento químicos (Pardo et al, 2002, 2004, 2008, 2013; Abollino et al, 2011; Wang, 2014).

1.4.2.- Análisis de Conglomerados

Se trata de un método de Reconocimiento de Pautas (*Pattern Recognition*), que son un conjunto de herramientas de tipo matemático y estadístico, que analizan datos multivariantes y permiten clasificar objetos en clases diferentes de acuerdo con la información proporcionada por una serie de variables. Estos métodos suelen ser divididos en dos grandes grupos en función de si se conocen o no las clases de antemano. El Análisis de Conglomerados (A.C.) es un Métodos de Reconocimiento no Supervisado de Pautas, MRNSP (*Non-Supervised Pattern Recognition*), y su objetivo es precisamente el visualizar la existencia de clases. Como la información aparece en forma de árbol jerarquizado,

dendrograma, los métodos A.C. son métodos jerárquicos y de hecho la forma más habitual de referirse a ellos es *hierarchical clustering*.

El procedimiento se basa en agrupar los objetos o las variables en función de su parecido, que se cuantifica por medio del concepto de distancia, el cual tiene que cumplir una serie de propiedades. Así, dados dos objetos A y B, la distancia entre ellos, d_{AB} , debe ser tal que:

$$\begin{aligned} d_{AB} &\geq 0 \\ d_{AA} &= 0 \\ d_{AB} &= d_{BA} \\ \text{Si } d_{AB} < d_{AC} &\text{ es preferible agrupar A y B antes que A y C} \end{aligned}$$

De entre las diferentes alternativas (Departamento de Química Analítica, 2013) la más utilizada es la distancia euclídea

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

En el caso de las variables la distancia se cuantifica en función del coeficiente de correlación, bajo la premisa de que dos variables que se comporten de forma parecida, estarán correlacionadas positivamente, de forma que cuando una aumente, la otra aumente, y cuando una disminuya, la otra disminuya. Así, dadas dos variables i y j , la distancia entre ellas se puede cuantificar como:

$$d_{ij} = 1 - r_{ij}$$

A partir de la matriz de distancias, se construye un dendrograma, diagrama en forma de árbol, en el cual los objetos o variables se van agrupando en función de su distancia. Existen diversos métodos (*linkage methods*) para construir los dendrogramas (Departamento de Química Analítica, 2013), eligiéndose el que produzca los resultados más fáciles de interpretar. Hay que hacer notar que, al contrario que en el A.C.P., la cantidad de información que se representa en un dendrograma de A.C. es siempre del 100%. La forma del árbol depende del procedimiento de construcción (*linkage*), pero las conclusiones suelen coincidir y apoyar las que se extraen a partir del A.C.P. Ambos métodos coinciden en su objetivo de presentar información multivariante de una forma visualmente comprensible, siendo la principal diferencia entre ambos el que el A.C.P. trata de buscar un

modelo matemático para explicar los datos, mientras que el A.C. se limita a agruparlos en función de su parecido.

El resultado final es un diagrama similar al de la Figura 5, cuya interpretación es inmediata e intuitiva.

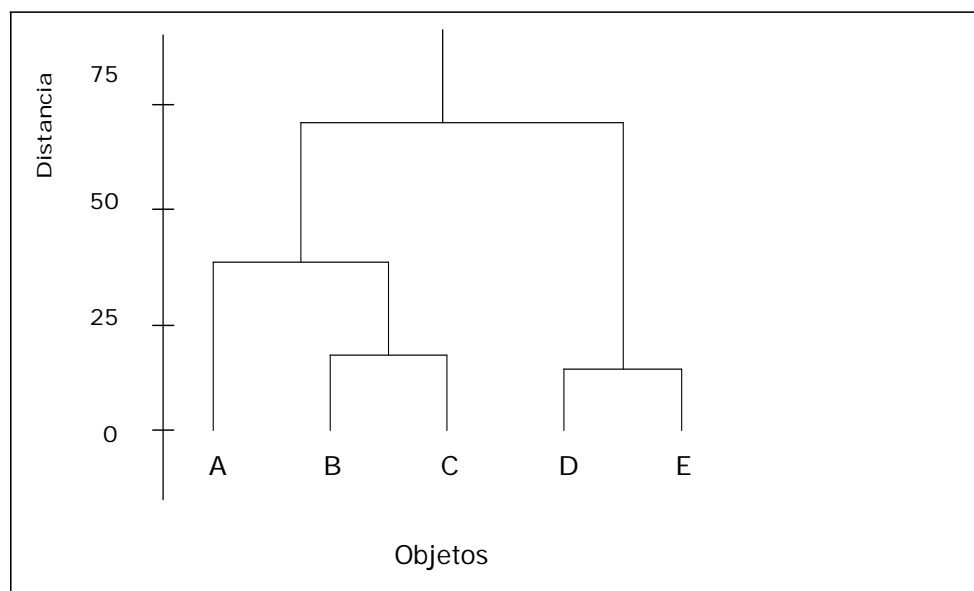


Figura 5.- Ejemplo de dendrograma

Los métodos A.C. se emplean de forma rutinaria en multitud de áreas científicas (Singh et al, 2000; Wang et al, 2014). Su aplicación a datos medioambientales se detalla en Smolinski (2002) y en el caso de los procedimientos de fraccionamiento químico en a Giacomino et al (2011)

1.5. Área de estudio

Los métodos y procedimientos descritos más arriba, se han aplicado a muestras de sedimentos procedentes del río Quinto en Argentina. La cuenca del río Quinto (Subsecretaría de Recursos Hídricos, 2014) es de carácter interprovincial y pertenece al Sistema Pampeano. Con sus nacientes en la provincia de San Luis, drena el faldeo oriental de la sierra homónima. Tiene un área de 34.360 km², abarcando parte de las provincias argentinas de San Luis, Córdoba, Santa Fe y Buenos Aires (Figura 6).

La parte de la cuenca correspondiente a la provincia de San Luis, sobre todo la zona del embalse de La Florida, donde se puede considerar que nace realmente el río Quinto, ha sido objeto de diversos estudios medioambientales para cuantificar el nivel de contaminación originado por compuestos organoclorados y metales tóxicos, tanto en la fauna asociada, aves, anfibios, peces, (Cid et al. 2007, Cid et al. 2009, Jofré et al. 2012), como en aguas (Luco et. al. 1992; Cid et al. 2011).

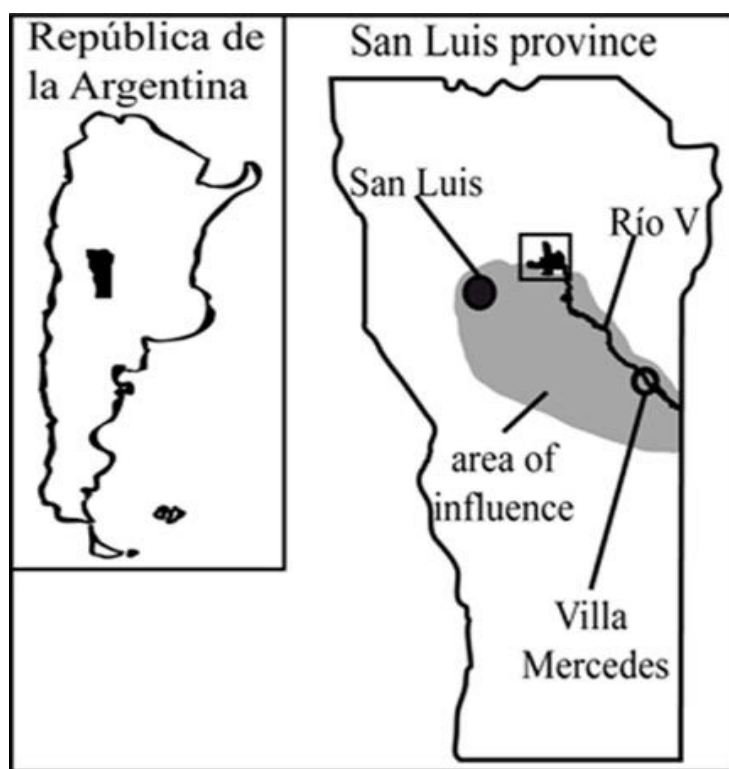


Figura 6.- Localización esquemática del Río Quinto (Cid et al, 2001)

Muchos de esos trabajos han sido publicados por el equipo de investigación del Dr. Fabricio D. Cid de la Universidad de San Luis, con el que colaboran activamente (Cid et al, 2011) los Dres. R. Pardo Almudí (tutor de este Trabajo Fin de Grado) y M. Vega Alegre del Departamento de Química Analítica de la UVa. El Dr. Cid ha suministrado las muestras analizadas en este Trabajo Fin de Grado, que se convierte así en el primer estudio en el que se aborda la problemática de los metales tóxicos, en muestras de sedimentos procedentes del río Quinto.

Capítulo 2

OBJETIVOS

El presente Trabajo Fin de Grado pretende aportar información acerca del contenido y movilidad de metales tóxicos (Cr, Ni, Cu, Zn, As, Cd y Pb), en muestras de sedimentos fluviales procedentes del río Quinto (San Luis, Argentina), con el fin último de contribuir al diagnóstico medioambiental del mismo.

Con este fin se han utilizado muestras de sedimentos recogidas a lo largo del cauce del río Quinto, desde su nacimiento hasta que abandona la provincia de San Luis, y que nos han sido proporcionadas por el Dr. Fabricio D. Cid de la Universidad de San Luis.

Dichas muestras se han caracterizado sobre la base de la determinación de:

- Contenidos movilizables o pseudototales, mediante el empleo de la norma US-EPA 3051 (extracción con HNO_3 ayudada por microondas).
- Fraccionamiento químico B.C.R., basado en una extracción secuencial que proporciona 3 fracciones de movilidad, y por tanto peligrosidad medioambiental, decreciente.

Para ello, en primer lugar, se ponen a punto las correspondientes técnicas analíticas espectrométricas, ICP-OES e ICP-MS, necesarias para la determinación de los contenidos de los elementos en los extractos generados. Los procedimientos han sido validados mediante el correspondiente Material Certificado de Referencia.

Los datos generados, tanto de contenidos pseudototales como de fraccionamiento químico, han sido estudiados mediante técnicas estadísticas univariantes y multivariantes (Análisis en Componentes principales y Análisis de Conglomerados), con objeto de encontrar las relaciones entre los elementos analizados y sacar la mayor cantidad de información, referente a las relaciones entre los elementos analizados y/o las muestras de sedimentos, extrayéndose las correspondientes conclusiones.

La información generada, que constituye el primer estudio realizado sobre contenidos de metales tóxicos en sedimentos del río Quinto, contribuirá al diagnóstico medioambiental de este recurso hídrico, tan importante para la provincia de San Luis (Argentina).

Capítulo 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Zona de muestreo

La cuenca hidrográfica endorreica del río Quinto es la más extensa y caudalosa de la provincia argentina de San Luis. Abarca una extensión aproximada de 11.000 km², de los cuales 2.500 corresponden a las sierras y 8.500 a las planicies (Garelis y Bistoni, 2010). El río Quinto (Popopis) nace en el embalse La Florida, lugar donde se unen los ríos Grande (que fluye del norte) y Trapiche (que lo hace desde el oeste). Además, tiene como afluentes los ríos Riocito, Cañada Honda y el Río del Rosario, y los arroyos Saladillo, La Barranquita y La Petra entre otros (Subsecretaría de Recursos Hídricos, 2008) y en su curso se encuentran los Embalses Saladillo, Paso de Las Carretas y Vulpiani. Después del embalse del Paso de Las Carretas, el río Quinto atraviesa una amplia llanura donde se encuentran situadas las ciudades de Villa Mercedes (111.391 habitantes) y Justo Daract (10.135 habitantes), ambas en la provincia de San Luis. A continuación el río entra en la provincia de Córdoba, atraviesa unos 110 km en dirección sudeste a través de una planicie y se subsume en los Bañados de La Amarga (Córdoba), desapareciendo de la superficie. Durante períodos húmedos, el río Quinto sobrepasa ampliamente los Bañados de la Amarga, y se divide en dos brazos. El primero, o brazo norte, aporta sus aguas al Bañado del Destino en los límites de las provincias de Córdoba y Santa Fe. Mucho más importante es el brazo que toma la dirección sur, que llega hasta la provincia de Buenos Aires desembocando en el río Salado, afluente del Río de la Plata.

3.2.- Procedimiento de muestreo

Las muestras utilizadas en este Trabajo Fin de Grado, fueron proporcionadas por el Dr. Fabricio D. Cid, de la Universidad de San Luis (Argentina). Se tomaron un total de 11 muestras, recogidas en el cauce del río Quinto durante su paso por la provincia de San Luis. Las Figuras 7 y 8 muestran, respectivamente, su posición global y una vista más detallada de los puntos de muestreo.

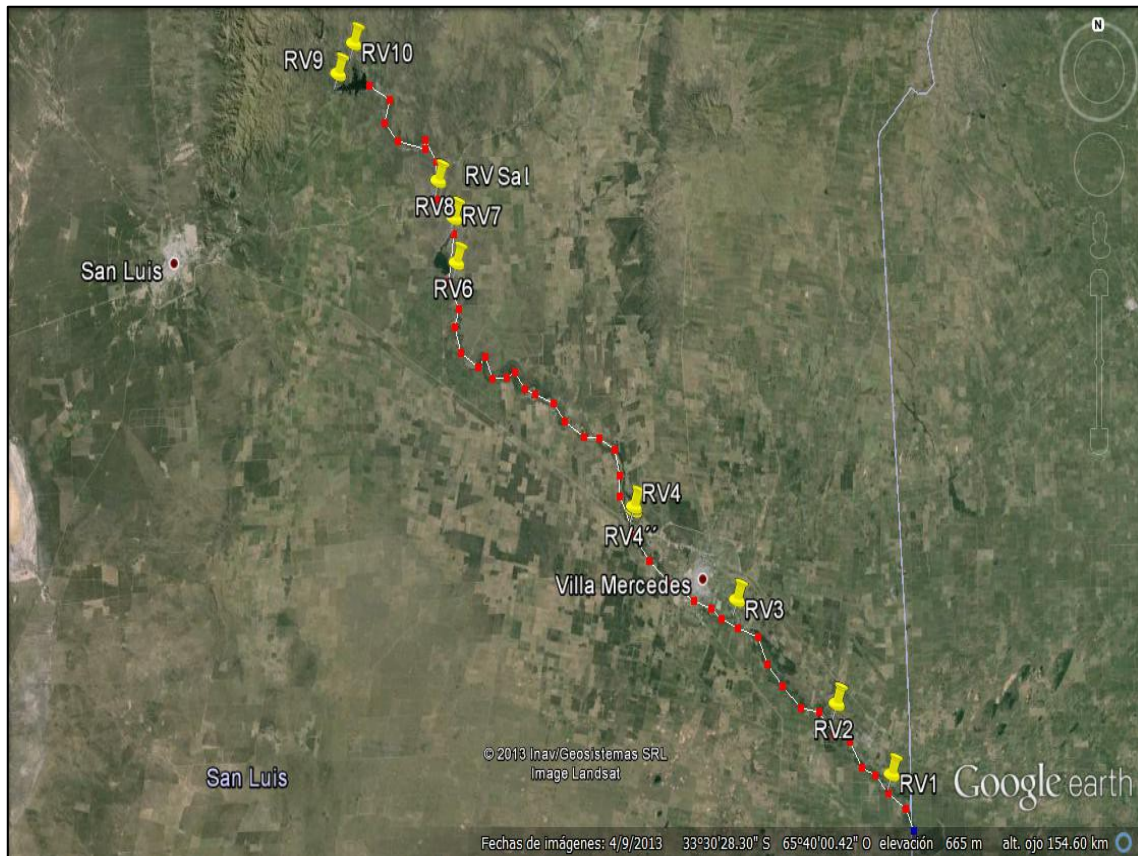


Figura 7.- Localización general de los puntos de muestreo

La Tabla 3 resume las principales características de los puntos de muestreo

Tabla 3.- Localización de las muestras

Referencia	Punto de muestreo
RV1	Aguas abajo de la ciudad de Justo Daract
RV2	Aguas arriba de la ciudad de Justo Daract
RV3	Aguas abajo de la ciudad de Villa Mercedes
RV4	Aguas arriba de la ciudad de Villa Mercedes
RV4'	Aguas arriba de la ciudad de Villa Mercedes
RV6	Aguas abajo del embalse del Paso de las Carretas
RV7	Aguas arriba del embalse del Paso de las Carretas
RVSaI	Arroyo Saladillo, afluente del río Quinto, antes del Embalse Paso de las Carretas.
RV8	Aguas abajo del dique Saladillo
RV9	Río Trapiche, aguas arriba del embalse de la Florida
RV10	Río Grande, aguas arriba del embalse de la Florida



Figura 8.- Detalle de las puntos de muestreo

Las muestras fueron tomadas en el lecho del río utilizando material y recipientes de plástico para evitar contaminación metálica. Una vez llevadas al laboratorio, se secaron al aire y se tamizaron con un tamiz de plástico de 2 mm, almacenándose en bolsas de plástico herméticas. Las muestras fueron posteriormente enviadas por correo aéreo al Departamento de Química Analítica de la UVa, donde se mantuvieron en ambiente hermético y a 4º C.

3.3.- Procedimientos analíticos

3.3.1.- Determinación de contenidos pseudo-totales

Para la determinación del contenido pseudototal de metales de los sedimentos estudiados se utilizó el método descrito en la norma EPA-3051 (USEPA, 1994). Esta norma describe el procedimiento consistente en una digestión ácida de los sedimentos en un horno microondas y posterior análisis mediante las técnicas de ICP-MS ó ICP-OES. Con este procedimiento se consigue conocer la cantidad que contiene cada sedimento de metales movilizables, es decir, la cantidad de metales más perjudiciales para el medio ambiente.

El reactivo digestor utilizado debe ser un ácido fuerte o agua regia. En este caso, se utilizó ácido nítrico concentrado al 65%. Es necesario que el ácido nítrico sea de calidad P.A. para que su contenido en metales sea mínimo; ya que en caso de tener una presencia elevada en metales interferiría en los resultados dando lugar a conclusiones erróneas.

La digestión de los sedimentos se realiza en un horno Microondas, el cual es un equipo cerrado con el que se evitan las pérdidas energéticas y las contaminaciones de las muestras. Se utilizó un horno microondas ETHOS PLUS MILESTONE como el de la Figura 9, ubicado en el Departamento de Química Analítica (Facultad de Ciencias). Este horno microondas consta de 6 vasos de digestión de teflón (TFM) acompañados de sus correspondientes encamisados (Figura 10). El horno microondas contiene un termopar, el cual se introduce en un vaso de control de digestión diferente a los otros cinco vasos digestores y en el que se introduce el blanco analítico. De esta forma, se conoce en todo momento la temperatura exacta en la que se encuentra el proceso de digestión. El proceso

de digestión se basa en una rampa de temperaturas controlada y combinada con agitación, que se consigue por el movimiento semi-rotatorio del carrusel en el que se emplazan los vasos digestores.



Figura 9.- Horno microondas en el que se realizó la digestión.

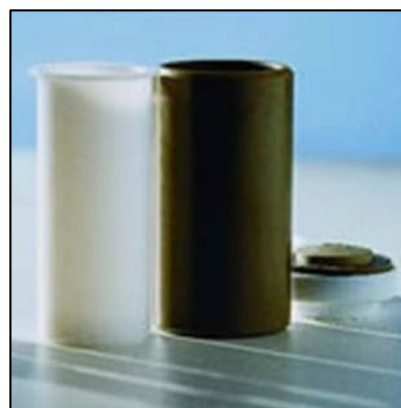


Figura 10.- Vaso de digestión y encamisado.

El material y los reactivos utilizados en todo el proceso de digestión han sido:

- Pesasustancias de vidrio, espátula de plástico
- 6 vasos digestores de microondas de teflón junto sus encamisados
- Llave dinamométrica calibrada
- Pipeta de 5 mL
- Embudo cónico de vidrio
- 6 matraces aforados de 25 mL
- Tubos de centrifuga
- Filtros de jeringa (nylon 0.45 μm)
- Jeringas
- Botes de polietileno de 25 mL
- Balanza analítica con precisión 0.0001 g
- Ácido Nítrico concentrado 65 % calidad P.A.
- Agua de calidad MilliQ

Procedimiento experimental

En el vaso digestor etiquetado como 1, y diferente al resto de los vasos digestores, se introdujo 5 mL de ácido nítrico concentrado 65% medido con pipeta. De esta forma, se tiene el blanco analítico al que se le realizaron las mismas operaciones que al resto de muestras con sedimentos. Ese vaso digestor es el que viene preparado para introducir el termopar del horno microondas y con el que se controla la temperatura del proceso de digestión. A continuación, se pesan aproximadamente 0,25 g, apuntando el peso exacto, de cada sedimento en un pesasustancias utilizando la balanza analítica. En una campana extractora, se traspa el contenido del pesasustancias a uno de los vasos digestores y se añaden 5 mL de ácido nítrico concentrado. Este proceso se realiza hasta completar el total de 6 vasos digestores que componen el carrusel del horno microondas. Una vez que se tienen todos los vasos digestores con sus correspondientes muestras, se cierran con ayuda de la llave dinamométrica calibrada para aplicar la misma fuerza en todos los vasos.

Seguidamente, se introduce el carrusel en el horno microondas, introduciendo en el vaso digestor 1 el termopar en su cavidad correspondiente y se enciende el horno microondas. El proceso de digestión se controla mediante un ordenador acoplado al horno microondas en el que se elige el programa de la EPA-3051. Este programa controla la potencia de microondas necesaria para conseguir la rampa de temperaturas utilizada en el proceso. En esta rampa, la temperatura comienza ascendiendo de forma constante hasta alcanzar $180\pm 2^{\circ}\text{C}$, consiguiéndolo en aproximadamente 5,5 minutos. A continuación, se mantiene la temperatura a $180\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante un periodo de 10 min, gracias a la aplicación constante de la radiación de microondas. Pasado este tiempo, se corta la aplicación de radiación microondas y se deja que la temperatura descienda progresivamente hasta 40°C . Este periodo de tiempo suele durar 1h, finalizando entonces el proceso de digestión.

A continuación, se saca el carrusel del horno microondas y en una campana extractora se abre cada vaso digestor con ayuda de la llave dinamométrica. Se observa que se desprende un gas amarillento debido al óxido nitroso formado en la digestión de los sedimentos. Tras dejar enfriar el contenido de los vasos digestores, se procede a traspasarlo con ayuda de un embudo cónico a matraces aforados de 25 mL. Se arrastra el contenido del vaso digestor con ayuda de agua destilada y se enrasan. Seguidamente, se traspa a tubos de centrifuga, asegurándose de que el sólido residual también caiga en el

tubo de centrifuga. Se introducen los tubos en una centrifuga ALC Centrifuge PK120 (Figura 11) manteniéndose a 3800 rpm durante 10 min. Se retiran los tubos y se procede a filtrar la disolución sobrenadante con filtros de jeringa de 0,45 μm llevándolo a botes de polietileno en los que se conserva la muestra para su posterior análisis. Es necesario conservar las muestras digeridas en refrigeración a 4°C para evitar su degradación y posible contaminación.



Figura 11.- Equipo de Centrifuga.

El proceso de digestión se realizó por triplicado para cada muestra de sedimento, por lo que se repitió todo el proceso descrito anteriormente un total de 6 veces, hasta tener todas las muestras digeridas.

3.3.2.- Fraccionamiento químico B.C.R.

El procedimiento B.C.R. consiste en llevar a cabo tres extracciones en forma secuencial (Rauret et al, 2000), aplicando cada extractante al residuo proveniente de la anterior extracción, de acuerdo con el esquema presentado en la Figura 12.

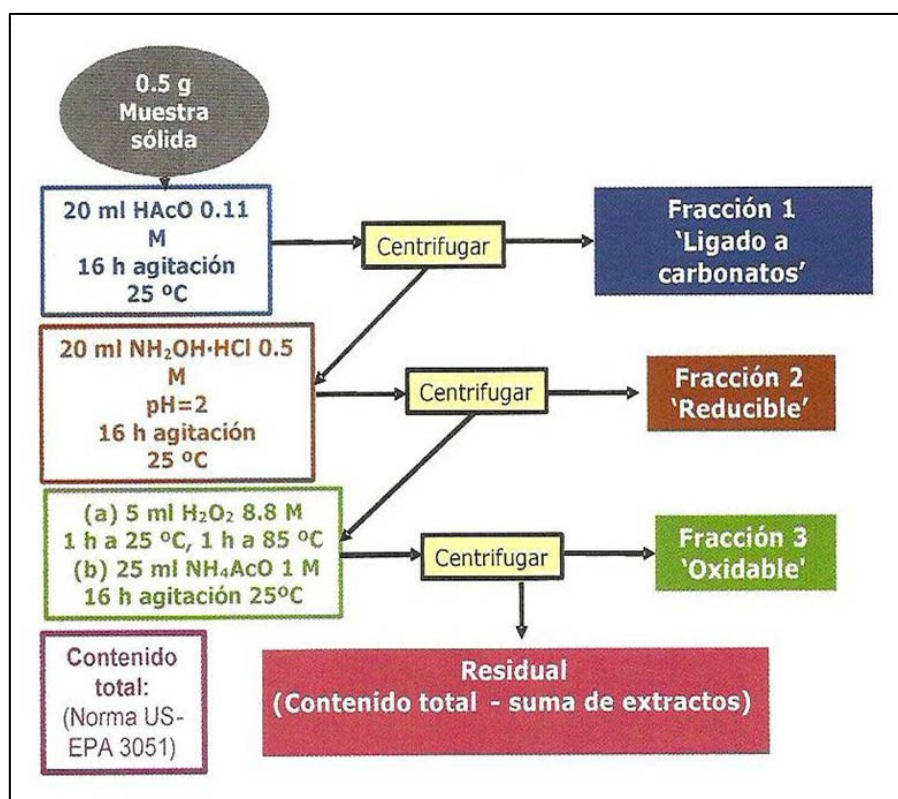


Figura 12.- Esquema del procedimiento BCR.

El material y reactivos utilizados fueron los siguientes:

- Tubos de centrifuga
- Pesasustancias de vidrio
- Espátula de plástico
- Pipeta de 25 mL y 20 mL
- Probeta de 100 mL
- Matraces aforados de 50 mL, 250 mL y 1 L
- Filtros de jeringa de 0.45 µm
- Jeringas
- Botes de polietileno de 50 mL
- Baño de agua.
- Agitador magnético rotatorio
- Balanza analítica
- Equipo Vibromatic
- pH metro
- Ácido acético glacial de calidad P.A.
- Clorhidrato de Hidroxilamina P.A.
- Ácido nítrico concentrado 65% de calidad P.A.
- Amoníaco al 25 % de calidad P.A.
- Peróxido de hidrógeno al 33 % P.A.
- Agua destilada de calidad MilliQ

Procedimiento experimental

El procedimiento debe llevarse a cabo durante cuatro días seguidos, pues las extracciones se deben llevar a cabo durante más de ocho horas. De esos cuatro días, el tercero es el más laborioso, ya que el procedimiento para obtener la Fracción 3 es bastante complicado.

Fracción 1 (Asociada a carbonatos)

El reactivo extractante es el ácido acético 0,11 M. Se toman 25 mL de ácido acético glacial de calidad P.A. y se llevan a un matraz aforado de 1000 mL enrasando con agua destilada; de esta forma se obtiene ácido acético de 0.43 M. De esta disolución que se acaba de preparar se toman 64 mL y se llevan a un matraz de 250 mL enrasando con agua destilada, consiguiéndose así el extractante ácido acético de 0,11 M.

En un tubo de centrifuga se introdujo 20 mL de ácido acético 0,11 M, el contenido de este tubo actúo como blanco analítico y se operó con él como con el resto de las muestras. A continuación, se pesó aproximadamente 0,5 g del sedimento en la balanza analítica y se traspasó a un tubo de centrifuga; se añadieron 20 mL de ácido acético 0,11 M y se cerró el tubo. Esto se repitió con el resto de los sedimentos hasta tener 8 tubos en total, ya que son las posiciones del Vibromatic (Figura 13) que se conectó, dejando los tubos en agitación durante 16 h a 500 rpm.



Figura 13.- Vibromatic utilizado en las extracciones.

Pasado el tiempo de extracción se llevaron los tubos al equipo de centrifuga, el mismo que se utilizó en el proceso de digestión ácida. Se centrifugaron durante 25 min a 3900 rpm. A continuación, se decanta el extracto de los tubos en matraces de 50 mL

reservando los tubos de centrifuga con el residuo sólido para utilizarlo en la siguiente extracción. Se enrasan los matraces con agua destilada. Las disoluciones de los matraces se filtran con filtros de jeringa de 0.45 μm y se llevan a botes de polietileno de 50 mL. Estos botes contienen los extractos resultantes de la primera extracción que son almacenados a 4°C hasta su posterior análisis.

Fracción 2 (asociada a óxidos hidratados de hierro y manganeso)

El reactivo extractante es clorhidrato de hidroxilamina 0,5 M ($\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$). Esta disolución era necesario prepararla el mismo día de su utilización ya que a lo largo de los días se va descomponiendo. Para la preparación se disuelven 8,69 g de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ en 100 mL de agua destilada. Se prepara a parte una disolución de ácido nítrico 2 M, tomando 1.4 mL de HNO_3 concentrado 65 % y se enrasan con agua destilada en un matraz aforado de 10 mL. Se toman 6,25 mL del HNO_3 2 M y se añaden a la disolución de clorhidrato de hidroxilamina, se lleva todo a un matraz aforado de 250 mL y se enrasa con agua destilada.

Al residuo sólido que se había reservado de la anterior extracción y al blanco conteniendo únicamente ácido acético, se le añaden 20 mL de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0,5 M. Se colocan los tubos de centrifuga en el Vibromatic y se deja en agitación durante 16 h a 500 rpm. Pasado el tiempo de agitación, se colocan los tubos en la centrifuga y se mantiene durante 25 min a 3900 rpm. A continuación, se decanta el extracto de los tubos de centrifuga en matraces aforados de 50 mL, reservándose el residuo sólido para la siguiente y última extracción. Los matraces se enrasan con agua destilada y esta disolución es filtrada con filtros de jeringa de 0,45 μm en botes de polietileno. Se almacenan estos botes refrigerados a 4°C hasta su análisis, ya que contienen el extracto resultante de la segunda extracción.

Fracción 3 (asociada a materia orgánica y sulfuros)

El extractante es una disolución de H_2O_2 de concentración 8.8 M. Se toman 204.26 mL H_2O_2 al 33%, y se disuelven en 200 mL de agua destilada. A continuación, midiendo con un pH-metro se añade HNO_3 concentrado al 65% hasta conseguir un pH=2, aproximadamente se necesitan dos gotas de ácido nítrico para alcanzar este pH en la disolución. Se lleva a un matraz aforado de 250 mL y se enrasa con agua. También se necesita acetato amónico de concentración 1.0 M. Se añaden sobre 500 mL de agua destilada 74.9 mL de NH_3 al 25% y 57.25 mL de HAcO glacial (Esta disolución debe

prepararse en campana extractora ya que al añadir los reactivos la disolución se calienta y desprende vapores de acetato amónico). Una vez a temperatura ambiente, se añade HNO_3 concentrado al 65% hasta alcanzar $\text{pH}=2$, vigilando con pH-metro. Son necesarios 60 mL de nítrico para conseguir acidificar la disolución. Esta acidificación debe hacerse cuidadosamente porque se calienta al añadir el ácido nítrico. Una vez que la disolución se ha acidificado y está a temperatura ambiente, se transfiere a un matraz aforado de 1000 mL y se enrasa con agua destilada.

Al residuo sólido resultante de la segunda extracción y al blanco, se le añaden 5 mL de H_2O_2 8.8 M, se cierran los tubos de centrifuga sin apretar para que se puedan liberar los gases producidos y se deja digiriendo a temperatura ambiente durante 1 h. De vez en cuando se agita suavemente para homogeneizarlo. Se observa que durante el transcurso de la digestión se liberan burbujitas de O_2 resultantes de la reducción del H_2O_2 .

A continuación se introducen los tubos cerrados en el baño de agua a 85°C durante 1 h, agitando ocasionalmente. Transcurrido este tiempo, se destapan los tubos y se eleva la temperatura del baño de agua hasta conseguir la ebullición de la disolución de los tubos. Se mantienen en ebullición hasta reducir el volumen a 1,5 mL aproximadamente (30 min aproximadamente). A continuación, se añaden otros 5 mL de H_2O_2 8,8 M a los tubos y se mantienen en el baño de agua a 85°C durante 1 h, agitando ocasionalmente.

Pasado ese tiempo, se destapan los tubos y se llevan de nuevo a ebullición pero esta vez reduciendo el volumen de disolución hasta 0,5 mL, sin llegar a sequedad completa (unos 30 min). Por último, se retiran los tubos del baño de agua y se dejan enfriar hasta temperatura ambiente. Se añaden ahora 25 mL de NH_4AcO 1,0 M a cada tubo y se mantienen en agitación en el Vibromatic durante 16 h a 500 rpm.

Una vez que haya terminado el tiempo de extracción, se colocan los tubos en la centrifuga y se mantienen durante 25 min a 3900 rpm. A continuación, se decanta el extracto en matraces aforados de 50 mL y se enrasa con agua destilada. En este caso, el residuo sólido resultante de la extracción se desecha ya que no se va a realizar ninguna operación más con él. La disolución de los extractos se filtra con filtros de jeringa de $0,45\ \mu\text{m}$ y se lleva a un bote de polietileno. Estos botes se almacenan a 4°C hasta su posterior análisis.

3.3.3.- ICP-OES

Mediante esta técnica, denominada propiamente Espectrometría de Emisión Óptica con Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo, se determinan los elementos pseudototales en los extractos obtenidos en el tratamiento con la EPA 3051.

La muestra líquida se introduce en continuo en un sistema de nebulización, formando un aerosol que es transportado por el Argón a la antorcha del plasma acoplado inductivamente por radio frecuencia. En dicho plasma de Argón y debido a las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados e ionizados generándose espectros de emisión atómicos con líneas características. Los espectros son dispersados por la red de difracción y un detector mide la intensidad de las líneas, que es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra. La información es procesada por el correspondiente software. En nuestro caso, el equipo utilizado fue un ICP-OES Varian 725ES, ubicado en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la UVA, como el que se muestra en la Figura 14.

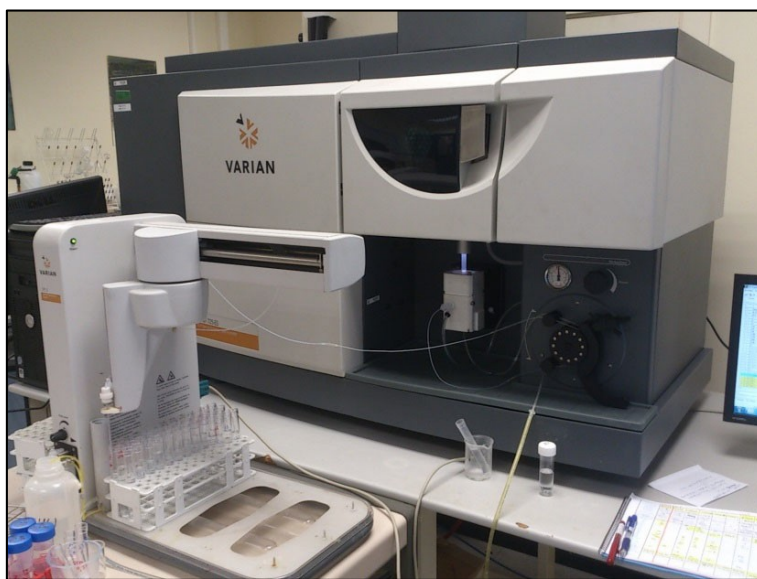


Figura 14.- Espectrómetro ICP-OES Varian 725ES

Los parámetros operacionales del ICP-OES en el análisis de los contenidos pseudototales de metales de los sedimentos fueron los siguientes:

- Potencia: 1,30 kW
- Flujo de plasma: 15,0 L/min
- Flujo auxiliar: 1,50 L/min

- Presión del nebulizador: 200 kPA
- Altura visión de la antorcha: 10 mm
- Tiempo de lectura por réplica: 15 s
- Retraso estabilización del instrumento 15 s
- Retraso de toma de muestra: 25 s
- Velocidad de bomba: 15 rpm
- Tiempo máximo de lavado: 20 s
- Número de réplicas por muestra: 3

Los elementos se midieron a dos longitudes de onda cada uno (Tabla 4), eligiendo aquella en la que mejores resultados se obtenían.

Tabla 4.- Longitudes de onda (nm) de medida mediante ICP-OES

Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
205.56	221.65	324.75	202.55	188.98	214.44	217.00
267.72	231.60	327.40	213.86	193.70	226.50	220.35

La calibración del equipo de ICP-OES se realizó con un patrón multielemental SCHARLAB de 26 elementos (1000 mg/L) en ácido nítrico 5%. A partir del cual se prepararon por pesada diferentes disoluciones de 0,022; 0,045; 0,220; 0,500; 0,990 y 2,000 mg/L. De esta forma se obtuvo una línea de calibrado para cada elemento estudiado, en las condiciones indicadas anteriormente, seleccionando las longitudes de onda correspondientes a los diferentes elementos en función de las interferencias producidas. La Tabla 5 muestra un resumen de los parámetros de las líneas de calibrado obtenidas a lo largo de la experimentación.

Tabla 5.- Parámetros típicos de líneas de calibrado de ICP-OES

Elemento	λ (nm)	Ordenada en el origen (I)		Pendiente (I.L/mg)		r^2
		Valor	Intervalo	Valor	Intervalo	
Cr	205,56	8,48	-4,75 - 12,20	590,81	586,52 - 595,10	0,999
Ni	231,60	1,75	-9,23 - 14,74	242,07	229,42 - 254,73	0,998
Cu	327,40	18,39	-6,65 - 43,44	1832,11	1803,28 - 1860,95	0,999
Zn	202,55	6,45	-2,92 - 15,82	971,82	961,04 - 982,61	0,999
As	188,98	3,42	-0,53 - 6,31	50,42	47,09 - 53,75	0,996
Cd	226,50	13,71	-6,99 - 34,41	2324,04	2300,21 - 2347,86	0,999
Pb	220,35	4,58	-0,07 - 9,09	101,72	96,53 - 106,92	0,998

Como ejemplo, la Figura 10 muestra la línea de calibrado correspondiente al Cr.

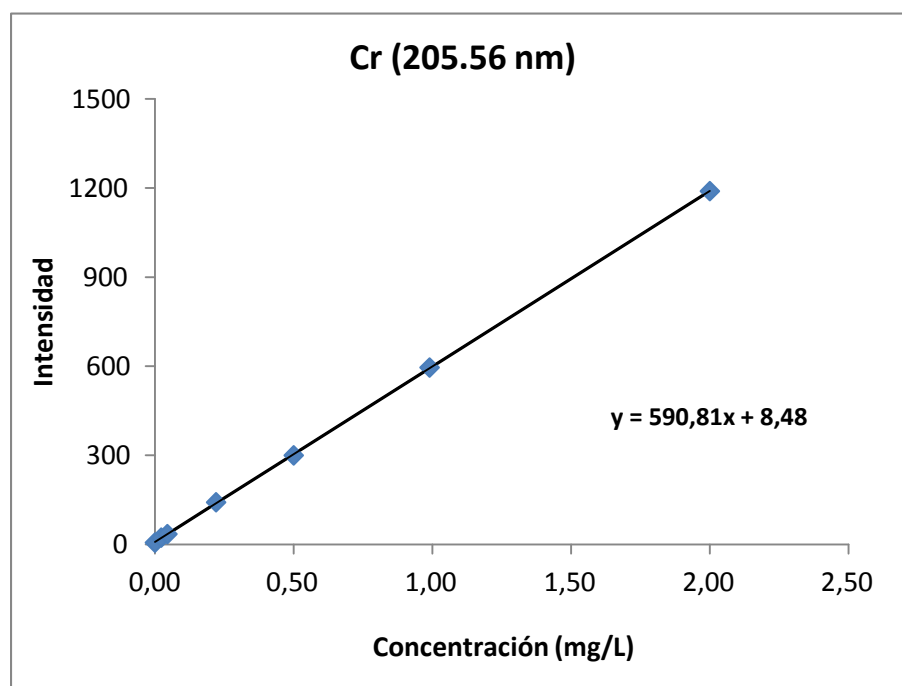


Figura 15.- Línea de calibrado del Cr mediante ICP-OES

Los límites de detección (LOD) para cada elemento, fueron calculados a partir de la siguiente expresión (Massart et al, 1997):

$$x_{\text{LOD}} = \frac{2 t_{\alpha, n-1} \frac{s_{\text{bl}}}{b_1} \sqrt{1 + 1/n}}{b_1}$$

donde s_{bl} es la desviación estándar de las n réplicas del blanco analítico, n el número de réplicas (en este caso 7) y b_1 la pendiente de la línea de calibrado para cada elemento. La Tabla 6 muestra los valores obtenidos en mg/kg utilizando las masas y volúmenes indicados en 3.3.1

Tabla 6.- Límites de detección (mg/kg) para ICP-OES

Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
0,839	0,90	0,732	3,918	1,159	0,139	0,586

3.3.4.- ICP-MS

Esta técnica, denominada propiamente Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo, ha sido utilizada para determinar los contenidos en los extractos procedentes del fraccionamiento químico B.C.R. Permite cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica en un rango dinámico lineal de 8 órdenes de magnitud (ng/l - mg/l), con unos límites de detección para la mayoría de los elementos de unas pocas ppb – ppt.

La muestra líquida es vaporizada e ionizada gracias a un plasma de Ar. Los iones, una vez formados, pasan al espectrómetro de masas donde son separados mediante un analizador y detectados. El equipo está dotado de un monocromador posterior a la muestra y una serie de detectores dedicados a cada elemento en diferentes posiciones del plano focal. El equipo utilizado ha sido un espectrómetro AGILENT 7500c equipado con un sistema de reacción octopolar y ubicado en el Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la UVa (Figura 16).



Figura 16. Espectrómetro ICP-MS AGILENT 7500c.

Los parámetros operacionales del equipo fueron los siguientes:

Parámetros del Plasma

- Potencia de radiofrecuencia: 1530 W
- RF Matching: 1,68 V
- Profundidad de muestreo: 7,4 mm

- Altura de la antorcha: -0,3 mm
- Flujo portador: 1,05 L/min
- Flujo generador de plasma: 0,15 L/min
- Bomba nebulizadora: 0,15 rps

Lentes

- Lente de extracción: 4,4 V
- Lentes Einzel 1,3: -80 V
- Lente Einzel 2: 10,5 V
- Entrada a la celda: -20 V
- Salida de la celda: -23 V

Octopolo

- Radiofrecuencia: 190 V
- Desviación: -15 V

Celda de reacción/colisión

- Gas H₂: 0 mL/min
- Gas He: 3,5 mL/min

Se estudiaron dos posibles isótopos de cada metal (Tabla 7), eligiendo aquel con el que se obtenían mejores resultados.

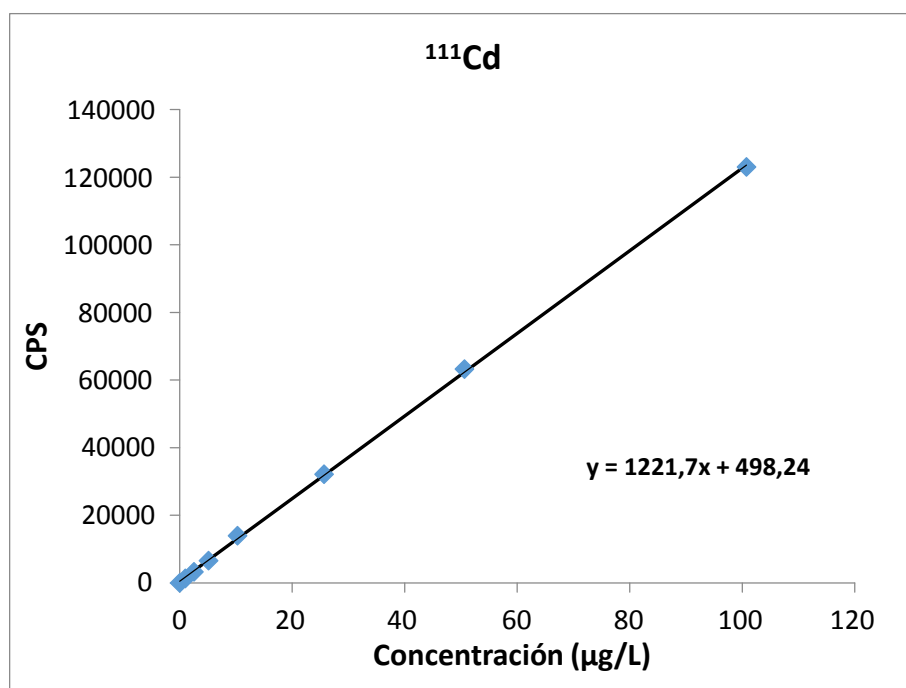
Tabla 7.- Isótopos de los elementos

Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
52	60	63	66	75	111	206
53	62	65	68			208

Los extractos del fraccionamiento químico B.C.R. se analizaron mediante el método de patrón interno o patrón externo. Como patrón interno se utilizó un patrón multielemental que contenía 50 µg/L de Sc (45), Ge (72), Y (89) y Tb (159), elementos que cubren un amplio rango de masas y que sirven para que no derive el equipo con el tiempo y para eliminar interferencias de matriz. Las líneas de calibrado se prepararon a partir de un patrón multielemental SCHARLAB de 26 elementos en ácido nítrico 5%, preparando finalmente una serie de patrones con concentraciones comprendidas entre 1 y 100 µg/L. Debido al elevado número de muestras y a su diferente matriz, las determinaciones se hicieron en diferentes tandas, lo que dio lugar a una serie de líneas de calibrado. En aras de la brevedad únicamente se presentan en la Tabla 8 y en la Figura 17, a modo de ejemplo, los parámetros correspondientes a las líneas de calibrado de la Fracción 3 (patrón externo) y la línea de calibrado del ¹¹¹Cd, respectivamente.

Tabla 8.- Parámetros típicos de líneas de calibrado de ICP-MS

Elemento	Isótopo	Ordenada en el origen (CPS)		Pendiente (CPS.L/μg)		r ²
		Valor	Intervalo	Valor	Intervalo	
Cr	53	386,5	-67,8 - 840,9	614,4	603,3 - 625,4	0,999
Ni	60	1041,8	-300,3 - 2384,0	1802,7	1770,1 - 1835,4	0,999
Cu	65	1785,5	-180,2 - 3390,7	2219,2	2180,1 - 2258,2	0,999
Zn	68	485,2	-143,4 - 1113,8	762,3	747,0 - 777,6	0,999
As	75	131,1	-62,5 - 324,8	640,6	635,9 - 645,3	0,999
Cd	111	498,2	-209,7 - 1206,1	1221,7	1204,4 - 1238,9	0,998
Pb	206	1999,3	-490,2 - 4488,9	614,4	603,3 - 625,4	0,9998

Figura 17.- Línea de calibrado de ¹¹¹Cd en la Fracción 3.

La Tabla 9 muestra los límites de detección (mg/kg) de cada elemento en cada extracto, en función de las masas y volúmenes indicados en 3.3.2, y calculados de forma análoga a como se hizo en los casos anteriores.

Tabla 9.- Límites de detección (mg/kg) para ICP-MS

Fracción	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
1	0,320	0,021	0,102	1,149	0,118	0,085	0,131
2	0,102	0,058	0,086	0,461	0,086	0,031	0,502
3	0,081	0,104	0,119	1,367	0,045	0,254	1,181

3.3.5.- Validación de los procedimientos

Los procedimientos descritos en 3.3.1 (determinación de contenidos pseudototales mediante la EPA-3051) y 3.3.2 (fraccionamiento químico B.C.R.), fueron validados mediante su aplicación al correspondiente Material de Referencia Certificado, ERA 540 (Lot No. D054 Method 3051 HNO₃) para la EPA-3051 y MRC 601 para el fraccionamiento químico. Cabe destacar que este último MRC no indica valores certificados para el As. Las tablas 10 Y 11 muestran los resultados obtenidos por nosotros.

Los intervalos de confianza obtenidos se han calculado a partir de los correspondientes valores de $t_{\text{crítico}}$, con un nivel de confianza del 95% y los adecuados g.d.l. Como se puede comprobar, en todos los casos los intervalos de confianza obtenidos se solapan con los certificados, por lo que la validación de ambos métodos se puede considerar satisfactoria.

Tabla 10.- Valores certificados y obtenidos en la validación del MRC 540

ELEMENTO	Valor certificado mg/kg	Intervalo certificado	Intervalo obtenido*
Cr	118	98,1-138	89,2-116,5
Ni	99,8	82,0-118	26,9-106,8
Cu	82,5	69,1-95,9	49,2-94,4
Zn	116	96,7-135	97,5-126,2
As	152	119-185	56,5-194,2
Cd	95,2	81,1-109	77,8-90,4
Pb	120	100-140	77,9-129,8

* A partir de 4 réplicas

Tabla 11.- Valores certificados y obtenidos en el análisis del MRC 601

Metal	Valor certificado mg/kg	Incertidumbre	Intervalo certificado	Intervalo obtenido *
Extracción 1				
Cr	0,35	0,08	0,11 - 0,59	0,44-0,78
Ni	7,82	0,84	5,3 - 10,34	2,8 - 11,5
Cu	10	0,8	7,6 - 12,4	7,0 - 13,5
Zn	261	5	246 - 276	196,7 - 318,0
Cd	4,45	0,67	2,44 - 6,46	2,5 - 5,1
Pb	2,28	0,44	0,96 - 3,6	1,87-2,54
Extracción 2				
Cr	10,6	0,9	7,9 - 13,3	7,5-13,2
Ni	10,6	1,20	7 - 14,2	5,8 - 13,6
Cu	73,8	4,9	59,1 - 88,5	42,2 - 68,1
Zn	266	17,0	215 - 317	166,3 - 280,6
Cd	3,95	0,53	2,36 - 5,54	0,7 - 5,1
Pb	205	11,0	172 - 238	97,2 - 225,3
Extracción 3				
Cr	14,4	2,6	6,66 - 22,6	12,1-18,5
Ni	6,04	1,27	2,23 - 9,85	4,4 - 9,0
Cu	78,6	8,9	51,9 - 105,3	58,7 - 124,2
Zn	106	11	73 - 139	61,4 - 148,5
Cd	1,91	1,43	0 - 6,2	0,1 - 1,3
Pb	19,7	5,8	2,3 - 37,1	18,9-43,5

* A partir de 5 réplicas

3.3.6.- Herramientas informáticas

Los cálculos numéricos y estadísticos han sido realizados mediante EXCEL 2010, STATSGRAPHICS Centurion XVI y MINITAB 16. El mapa de temperatura (*heat map*) ha sido hecho con la ayuda de MATLAB 2013B.

Capítulo 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Contenidos pseudototales

Los contenidos pseudototales representan la cantidad movilizable de metales tóxicos en una muestra sólida (suelo o sedimento), y son por tanto una indicación más precisa del riesgo que dichas muestras pueden suponer al medioambiente.

La Tabla 12 muestra los valores medios de los contenidos pseudototales, en mg/kg, obtenidos al analizar dos réplicas de cada una de las muestras disponibles.

Tabla 12.- Contenidos pseudototales (mg/kg)

Muestra	Elemento						
	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
RV1	6,05	0,59	2,38	21,93	2,88	< LD	4,50
RV2	4,05	< LD	1,29	5,68	3,83	< LD	0,80
RV3	1,31	1,21	1,08	10,08	0,65	< LD	1,59
RV4	5,03	3,18	3,92	7,09	1,56	0,26	1,28
RV4A	4,00	3,04	3,47	30,68	1,82	0,20	3,43
RV6	20,32	12,25	10,93	12,42	5,46	0,40	1,46
RV7	6,07	4,37	3,42	22,53	1,35	< LD	2,05
RV8	11,52	4,79	4,81	9,54	4,80	< LD	1,00
RV9	9,89	6,40	5,95	44,89	0,91	< LD	2,84
RV10	29,63	19,78	18,70	49,92	3,98	0,78	8,07
RVSAL	16,35	0,85	9,37	22,78	10,56	< LD	4,19

4.1.1.- Evaluación de la peligrosidad medioambiental

A la hora de evaluar la peligrosidad de las muestras analizadas, debería bastar con comparar sus valores con los correspondientes valores guía o SQG (Sediment Quality Guidelines). A pesar de la sencillez de la propuesta, lo cierto es que no existen criterios uniformes de consenso para tal fin. Mientras que tradicionalmente la peligrosidad se establecía comparando los valores encontrados con los niveles fondo del material examinado, recientemente se empezaron a tomar en consideración los efectos biológicos causados (Burton, 2002). No obstante, existen multitud de criterios, ninguno de ellos con el necesario consenso (Crane, 2003) y que se aplican en los diferentes países (CEDEX, 1994).

Incluso en Europa, donde existe la Directiva Marco sobre el Agua (Water Framework Directive) es de obligado cumplimiento para los estados miembros, solo recientemente se ha empezado a considerar a los sedimentos como susceptibles de ser incorporados en la misma (Comisión Europea, 2012). En resumen, aunque la idea es muy atractiva y de fácil implementación, en la práctica no tiene validez alguna. La Tabla 13 muestra unos ejemplos característicos.

Tabla 13.- Algunos niveles guía para sedimentos (mg/kg)

Nivel guía	Elemento						
	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
CEDEX Acción 1	200	100	100	500	80	1	120
CEDEX Acción 2	1000	400	400	3000	200	5	600
Effects Range Low (ERL)	80	30	70	120	33	5	35
Effects Range Medium (ERM)	145	50	390	270	85	9	110

CEDEX Acción 1 y 2 se refieren, respectivamente, a niveles de concentración que permiten el vertido libre al mar o que implican el vertido controlado (CEDEX 1993), mientras que ERL es el nivel por debajo del cual un sedimento origina raramente efectos perjudiciales y ERM es el nivel por encima del cual es muy probable que dichos efectos se produzcan (Burton, 2002). La disparidad evidente entre los dos tipos de criterios, proviene del hecho de que el CEDEX se refiera sedimentos portuarios. Véase Burton (2002) para más criterios de calidad.

En cualquier caso, los valores encontrados por nosotros están muy por debajo de cualquiera de los criterios de calidad examinados, por lo que se puede decir que los sedimentos no ofrecen peligro medioambiental alguno.

4.1.2. Análisis estadístico univariante

La Tabla 14 muestra un resumen de los parámetros estadísticos más habituales, de los contenidos pseudototales de las muestras de sedimentos analizadas. La Figura 17 por

su parte, muestra un gráfico de caja y bigotes (box-plot) de los contenidos pseudo-totales, que permite una mejor visualización de dichos parámetros.

Tabla 14.- Resumen de parámetros estadísticos univariantes

Muestra	Elemento						
	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
Media	10,38	5,13	5,94	21,59	3,44	0,149	2,84
s	8,58	5,97	5,25	15,02	2,865	0,2523	2,153
Smedia	2,59	1,8	1,58	4,53	0,864	0,0761	0,649
Varianza	73,56	35,65	27,52	225,57	8,21	0,0637	4,635
Mínimo *	1,3	0,00	1,08	5,68	0,649	0,00	0,8
Máximo	29,63	19,78	18,7	49,92	10,558	0,783	8,07
Rango	28,32	19,78	17,62	44,24	9,909	0,783	7,27
Q1	4,05	0,85	2,38	9,54	1,346	0,00	1,28
Mediana	6,07	3,18	3,92	21,93	2,88	0,00	2,05
Q3	16,35	6,4	9,37	30,68	4,797	0,261	4,19
Sesgo	1,31	1,79	1,64	0,9	1,63	1,89	1,56
Curtosis	1,25	3,1	2,75	-0,21	3,27	3,48	2,68

* Los valores < LD se han sustituido por 0,00 mg/kg

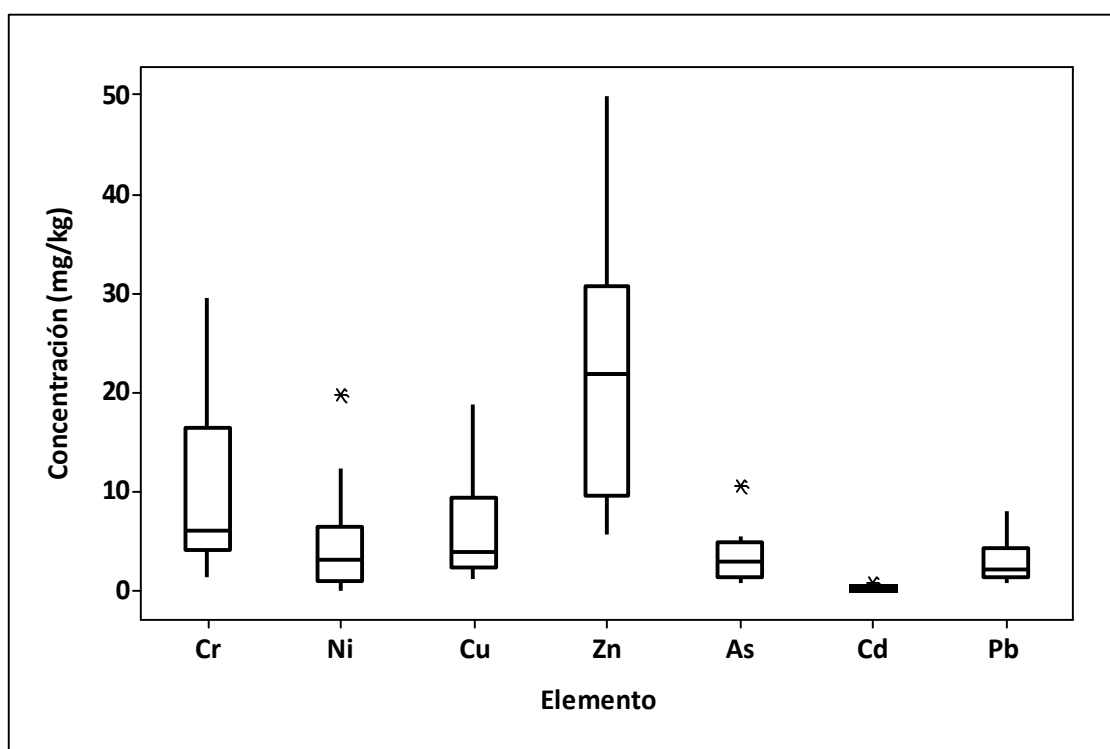


Figura 17.- Gráficos de caja y bigotes (boxplots) de los contenidos pseudototales

En el gráfico se observa que Cr y Zn aparecen a niveles un orden de magnitud más grandes que el resto de los elementos, así como que todos los elementos, a excepción del Zn, presentan distribuciones sesgadas, con colas hacia valores elevados, pues tienen coeficientes de sesgo positivos, y sus medias son mayores que las medianas. También se aprecia la existencia de algunos elementos anómalos (situados más allá de 1,5 veces el intervalo intercuartil) para Ni, As y Cd.

4.1.3. Análisis en Componentes Principales

Como ya se indicó en 1.4.1, el Análisis en Componentes Principales (A.C.P.) permite concentrar la información de una tabla de datos, en la que se presentan varias variables (contenidos pseudototales de los diferentes elementos) medidas sobre objetos diferentes (muestras de sedimentos). Eso permite obtener, unas nuevas variables (factores o componentes principales), cuya representación gráfica permite obtener información no disponible a primera vista. El primer paso (aunque transparente al usuario en los paquetes estadísticos habituales) es la construcción de la matriz de correlación de las variables, que en nuestro caso aparece en la Tabla 15, con los valores significativos en negrita. Como en 4.1.2, los valores < LD han sido sustituidos por 0,00.

Tabla 15.- Matriz de correlación de los contenidos pseudo-totales

	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
Cr	1,000 ----						
Ni	0,861 <i>0,001</i>	1,000 ----					
Cu	0,980 <i>0,000</i>	0,888 <i>0,000</i>	1,000 ----				
Zn	0,509 <i>0,110</i>	0,571 <i>0,066</i>	0,592 <i>0,055</i>	1,000 ----			
As	0,531 <i>0,093</i>	0,049 <i>0,887</i>	0,444 <i>0,171</i>	-0,078 <i>0,819</i>	1,000 ----		
Cd	0,759 <i>0,007</i>	0,891 <i>0,000</i>	0,831 <i>0,002</i>	0,435 <i>0,181</i>	0,061 <i>0,859</i>	1,000 ----	
Pb	0,639 <i>0,034</i>	0,559 <i>0,074</i>	0,707 <i>0,015</i>	0,802 <i>0,003</i>	0,204 <i>0,548</i>	0,599 <i>0,052</i>	1,000 ----

En cursiva aparecen los valores de p a posteriori con un $\alpha = 0,05$

El valor de r_{critico} con $\alpha = 0,05$ y $11-2 = 9$ g.d.l es 0,602. El valor de p *a posteriori* nos dice la fuerza con la que se mantiene la H_0 de que $r = 0$ (no hay correlación). Un valor de p *a posteriori* menor de 0,05 indica que la correlación es significativa, y tanto más cuanto más pequeño sea p . En la Tabla 15 se observa un buen número (11 de 21) significativas, y todas ellas positivas. De entre las no significativas, 5 incluyen al Zn y 5 incluyen al As, que parecen ser los elementos menos correlacionados con el resto.

El siguiente paso es la extracción de los valores propios, λ_i , de la matriz de correlación. El interés radica en que a partir de ellos se conoce la cantidad de varianza o información que explicará cada uno de las nuevas variables o factores. Los valores encontrados aparecen en la Tabla 16.

**Tabla 16.- Valores propios y varianza explicada
(A.C.P. contenidos pseudototales)**

Factor	Valor propio	% Varianza	% Varianza acumulado
1	4,6506	66,44	66,44
2	1,2366	17,67	84,10
3	0,8005	11,44	95,54
4	0,2477	3,54	99,08
5	0,0532	0,76	99,84
6	0,0090	0,13	99,97
7	0,0024	0,03	100,00

La cantidad de información se obtiene a partir del cociente $\lambda_i / \sum \lambda_i$. Se consideran significativos aquellos factores cuyo $\lambda > 1$, ya que explican más información que una variable original. En nuestro caso, hay dos factores significativos, señalados en negrita, que explicarán entre los dos el 84,10% de la información de la Tabla 12.

Otra forma típica de elección de los componentes o factores significativos es el gráfico de Scree o de sedimentación, en el cual se representan los valores de los λ_i en función del número de factor. Dada la forma de la gráfica, se retienen aquellos factores que estén por encima del umbral crítico $\lambda = 1$. No hay que decir que ambos métodos son en realidad el mismo y originan los mismos resultados. La Figura 18 muestra el gráfico correspondiente a los valores de la Tabla 16.

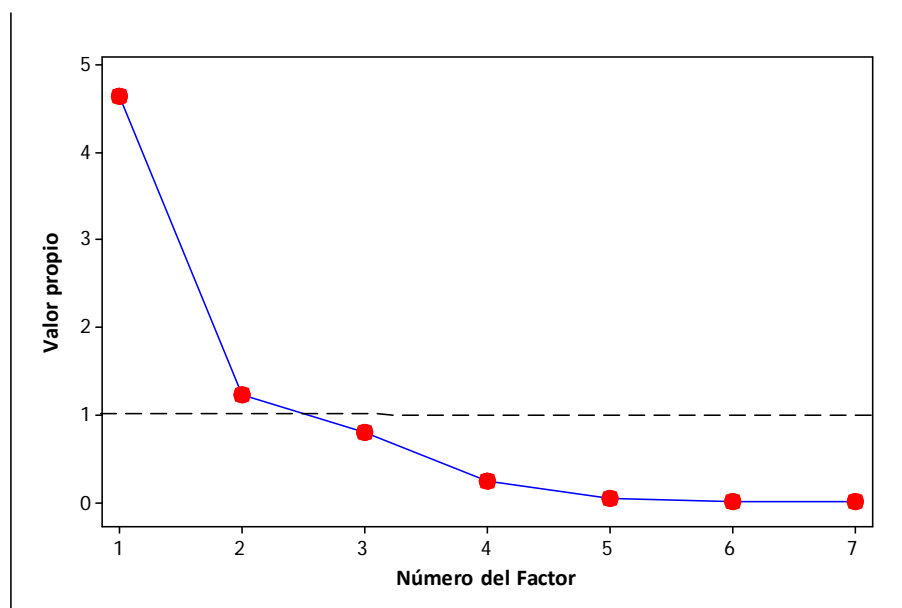


Figura 18.- Gráfico de Scree del A.C.P. de los contenidos pseudototales

El siguiente paso del A.C.P. es la construcción de la matriz de cargas (loadings), es decir de los coeficientes que permiten obtener los valores (o puntuaciones de las nuevas variables), que aparece en la Tabla 17.

Tabla 17.- Cargas (loadings) de los contenidos pseudototales

Elemento	Factor o componente						
	1	2	3	4	5	6	7
Cr	0,940	-0,291	-0,077	0,129	0,083	-0,004	-0,036
Ni	0,908	0,152	-0,350	0,152	0,069	-0,041	0,026
Cu	0,978	-0,172	-0,063	0,060	-0,022	0,077	0,014
Zn	0,705	0,469	0,474	0,216	-0,108	-0,014	-0,004
As	0,312	-0,910	0,262	-0,013	-0,063	-0,030	0,011
Cd	0,861	0,127	-0,396	-0,266	-0,123	-0,015	-0,010
Pb	0,807	0,184	0,467	-0,294	0,102	-0,003	0,005
Valor propio	4,6506	1,2366	0,8005	0,2477	0,0532	0,009	0,0024
% Varianza	66,44	17,67	11,44	3,54	0,76	0,13	0,03
% Var. acum.	66,44	84,11	95,54	99,08	99,84	99,97	100,00

En dicha tabla aparecen en negrilla los valores máximos de los coeficientes para cada elemento analizado. Se observa que casi todos ellos, a excepción del As, aparecen concentrados en el primer factor, mientras que el As lo esté en el segundo. La

representación gráfica de las cargas de los dos primeros factores, permitirá visualizar un 84,10 % de las relaciones entre los elementos analizados, tal como se expone en la Figura 19.

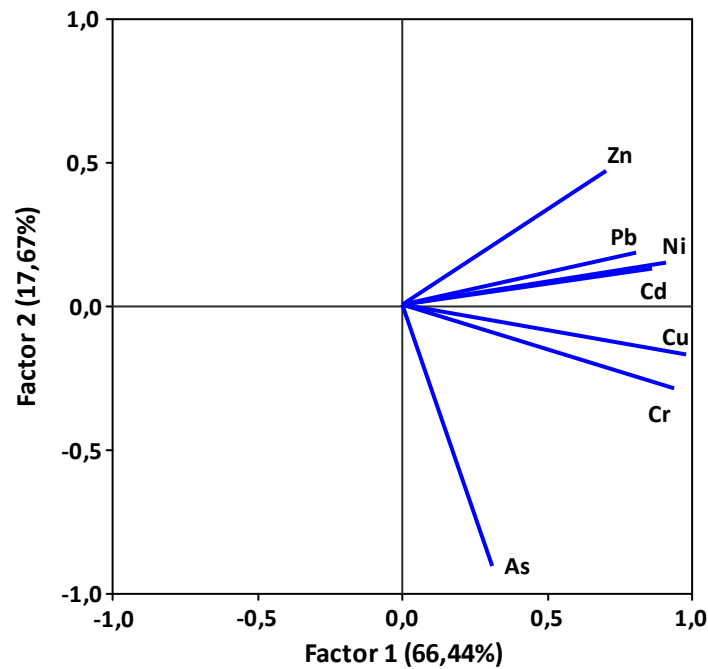


Figura 19.- Gráfico de cargas de contenidos pseudototales

En la Figura 19 se observa que el As tiene un comportamiento diferente del resto de los elementos analizados, que aparecen concentrados todos en la misma zona de la gráfica.

A continuación se construyen las nuevas variables para cada una de las muestras, lo que da lugar a la llamada matriz de puntuaciones (scores), que se muestra en la Tabla 18. La representación gráfica de los dos primeros componentes (Figura 20), explica un 84,11 % de la información presente en la Tabla 12, en lo correspondiente a las relaciones entre las muestras analizadas.

Tabla 18.- Puntuaciones (scores) de los contenidos pseudototales

Elemento	Factor o componente						
	1	2	3	4	5	6	7
RV1	-0,379	0,326	1,128	-1,147	1,546	-0,767	-1,374
RV2	-0,929	-0,513	-0,326	-0,298	-0,363	-0,875	-0,709
RV3	-0,928	0,575	-0,355	-0,474	0,838	1,118	1,344
RV4	-0,505	0,213	-1,193	-1,045	-0,928	1,642	-1,066
RV4A	-0,182	0,903	0,505	-0,685	-1,872	-1,525	0,927
RV6	0,697	-1,003	-1,708	0,676	-0,204	-0,694	-0,151
RV7	-0,440	0,615	0,020	0,705	0,651	0,117	1,477
RV8	-0,377	-0,851	-0,496	0,907	1,012	-0,739	0,077
RV9	0,097	1,216	0,836	2,134	-0,539	0,610	-1,163
RV10	2,629	0,629	-0,124	-0,685	0,486	0,144	0,170
RVSAL	0,317	-2,111	1,714	-0,088	-0,627	0,969	0,467
Valor propio	4,6506	1,2366	0,8005	0,2477	0,0532	0,009	0,0024
% Varianza	66,44	17,67	11,44	3,54	0,76	0,13	0,03
% Var. acum.	66,44	84,11	95,54	99,08	99,84	99,97	100,00

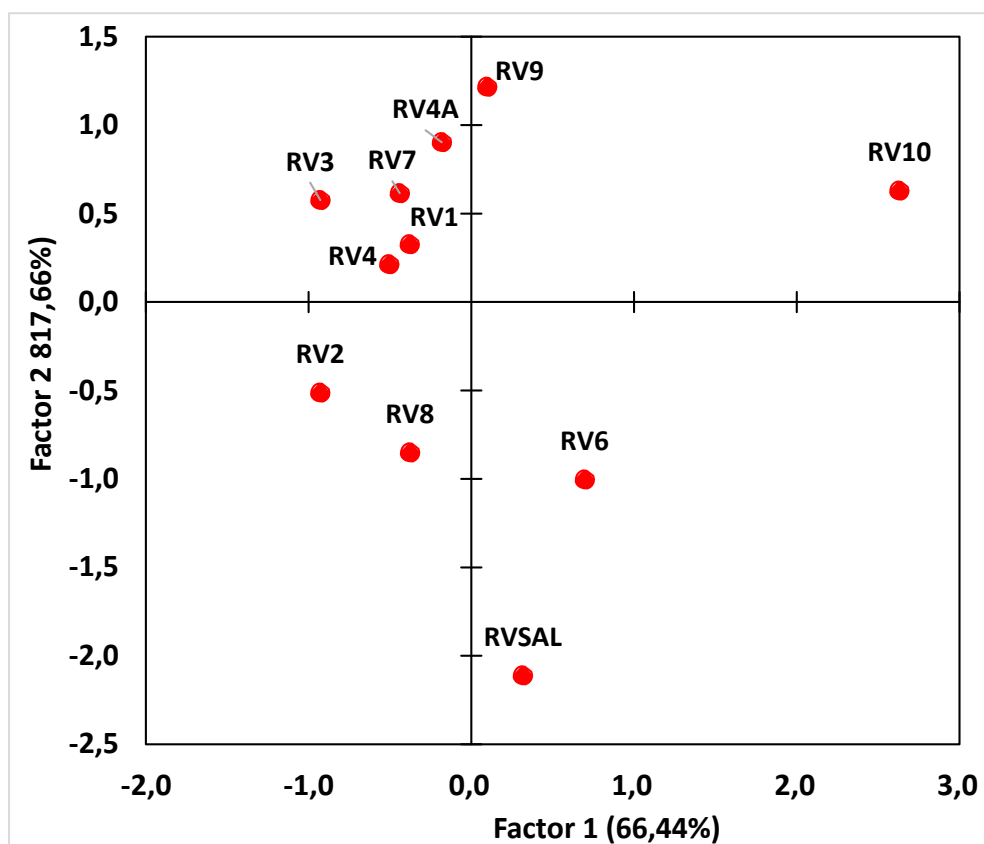


Figura 20.- Gráfico de puntuaciones de contenidos pseudototales

Como se puede observar en la Figura 20, casi todas las muestras excepto las RV6, RV9, RV10 y RVSal aparecen localizadas en la misma zona del gráfico, cuadrantes 2 y 3, lo que indica que contienen contenidos pseudototales similares. Las cuatro muestras antedichas, parecen comportarse de forma diferente al resto.

Una información más completa de las relaciones entre muestras y metales, la proporciona el denominado gráfico bivariado, en el que se representan de manera conjunta y un mismo espacio abstracto, las cargas de las variables (metales analizados) y las puntuaciones de las muestras (sedimentos). La Figura 21 muestra dicha gráfica.

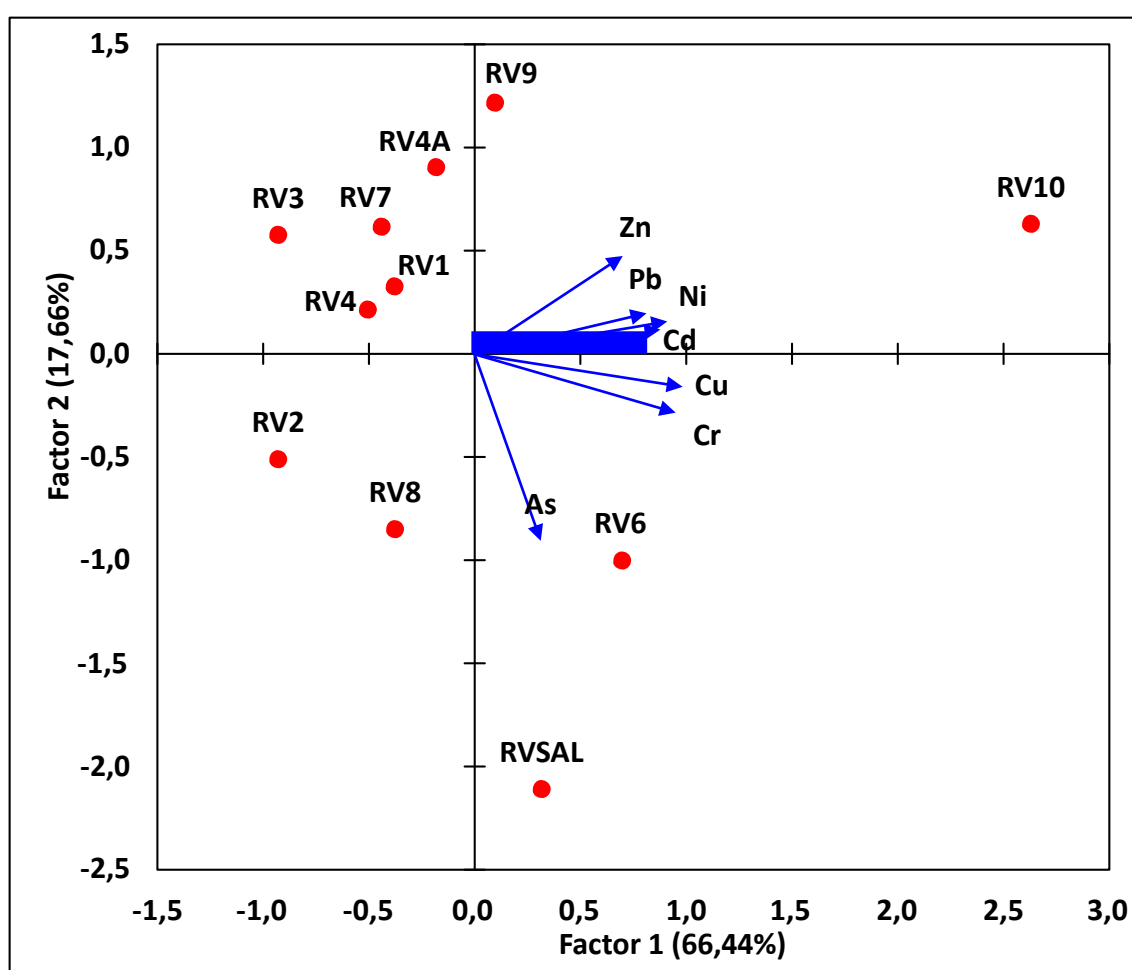


Figura 21.- Gráfico bivariado de contenidos pseudototales

La interpretación del gráfico bivariado es igual de intuitiva que en los dos casos anteriores. Así, las muestras que aparezcan en la misma zona del espacio abstracto que los elementos analizados, tendrán en general valores elevados en esos elementos. No hay que

perder de vista que la mayor parte de la información (66,44%) corresponde al Factor 1, por lo que lo más significativo es la separación a lo largo del eje de abscisas, es decir que las muestras RV6, RV9, RV10 y RVSal, todas situadas a la derecha de dicho eje, son las más cargadas en los elementos analizados, tal y como se puede comprobar si se buscan dichas muestras en la Tabla 12. Por su parte, el eje de ordenadas en el que se representa el Factor 2 (17,66%) permite diferenciar las muestras RVSal, RV6, RV2 y RV8 con contenidos altos en As (el único elemento que aparece en la zona negativa del eje de ordenadas) mientras que RV4A y RV9 presentarán niveles mayores de Zn.

Todas estas conclusiones deben ser matizadas por el hecho de que el modelo de A.C.P. con dos factores que hemos estado describiendo, deja sin explicar un 15,99% de la información de la Tabla 12.

La rotación Varimax de los factores que, en teoría permite “limpiarlos” y obtener factores más puros, no aporta mejora alguna a la interpretación, por lo que sus resultados no se muestran en la presente memoria.

4.1.4.- Análisis de Conglomerados

Al contrario que en el A.C.P., los métodos de Análisis de Conglomerados (A.C.) no tratan de buscar un modelo matemático para concentrar la información, sino que simplemente tratan de presentarla en forma de dendrograma, o diagrama en forma de árbol, en el que las variables (metales analizados) o los objetos (muestras de sedimentos) aparecen situados en función de su similitud, siendo la interpretación rápida e intuitiva. El proceso se lleva a cabo por medio del adecuado paquete estadístico, debiendo controlar el usuario, entre otros parámetros, dos que resultan ser fundamentales: la magnitud utilizada para cuantificar la distancia (o similitud) entre objetos o variables y el método de unión (linkage) utilizado para construir el dendrograma.

En primer lugar se presenta en la Figura 22, el dendrograma correspondiente a los elementos analizados. Para su obtención, se ha utilizado como distancia entre dos elementos químicos i y j el valor $d_{ij} = 1 - r_{ij}$, siendo r_{ij} el coeficiente de correlación entre i y j , lo que autoescala automáticamente las variables a media cero y varianza unidad. Para construir el dendrograma se ha preferido el método de Ward, que origina los mejores

resultados visuales (Smolinski et al, 2002), ya que minimiza la separación entre variables que se parecen mucho, a la vez que maximiza las diferencias entre las que se parecen poco.

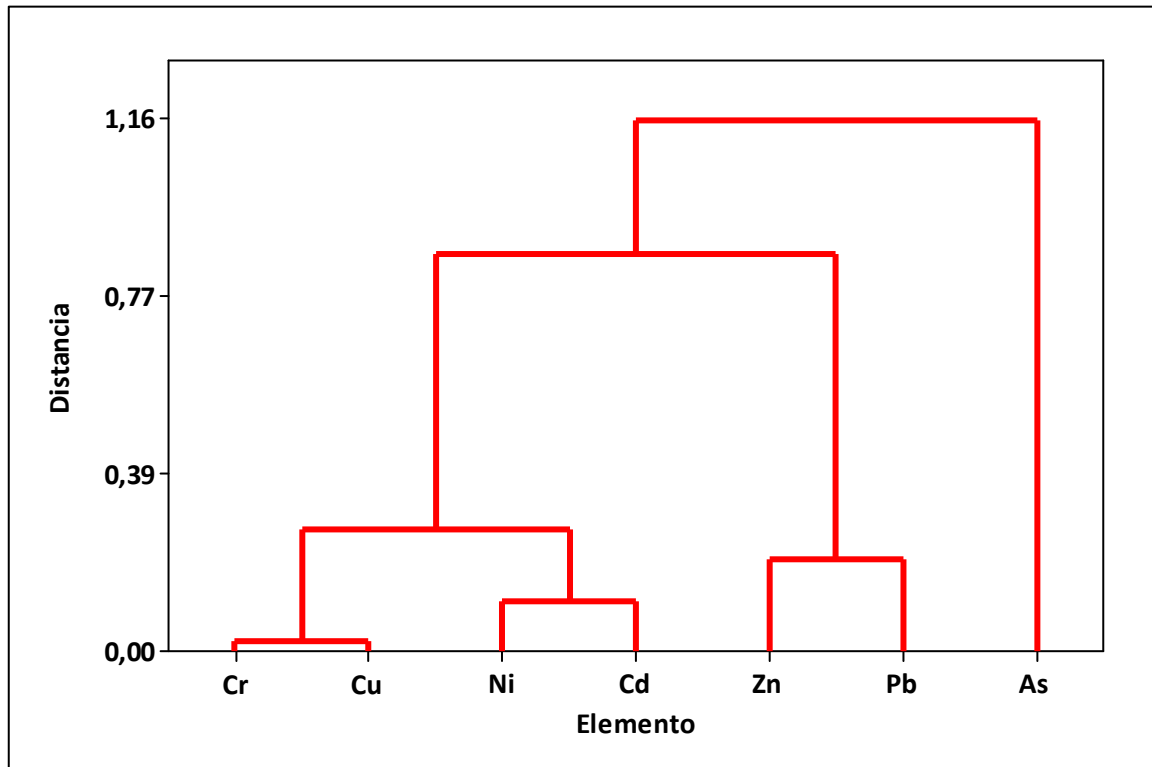


Figura 22.- Dendrograma de variables de contenidos pseudototales

De la observación de dicha figura, se confirma el comportamiento diferencial del As, ya detectado en el gráfico de cargas del A.C.P. Se aprecia además ahora, la existencia de un subgrupo, formado por Zn y Pb, dentro del conglomerado formado por el resto de los elementos.

La Figura 23 presenta el dendrograma correspondiente a las muestras de sedimentos. En este caso, se ha cuantificado la similitud entre dos muestras A y B por medio de la distancia euclídea:

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

Siendo x_{Aj} y x_{Bj} los valores de las variables (metales) para cada uno de los objetos o muestras A y B. Para evitar sesgos derivados de la diferente magnitud de los metales analizados,

todos éstos se han normalizado por autoescalado a media cero y varianza unidad, lo que facilita además la comparación de los resultados del A.C. con los del A.C.P., en los que se lleva a cabo esa misma normalización. El procedimiento de construcción del árbol (linkage) ha sido también el método de Ward.

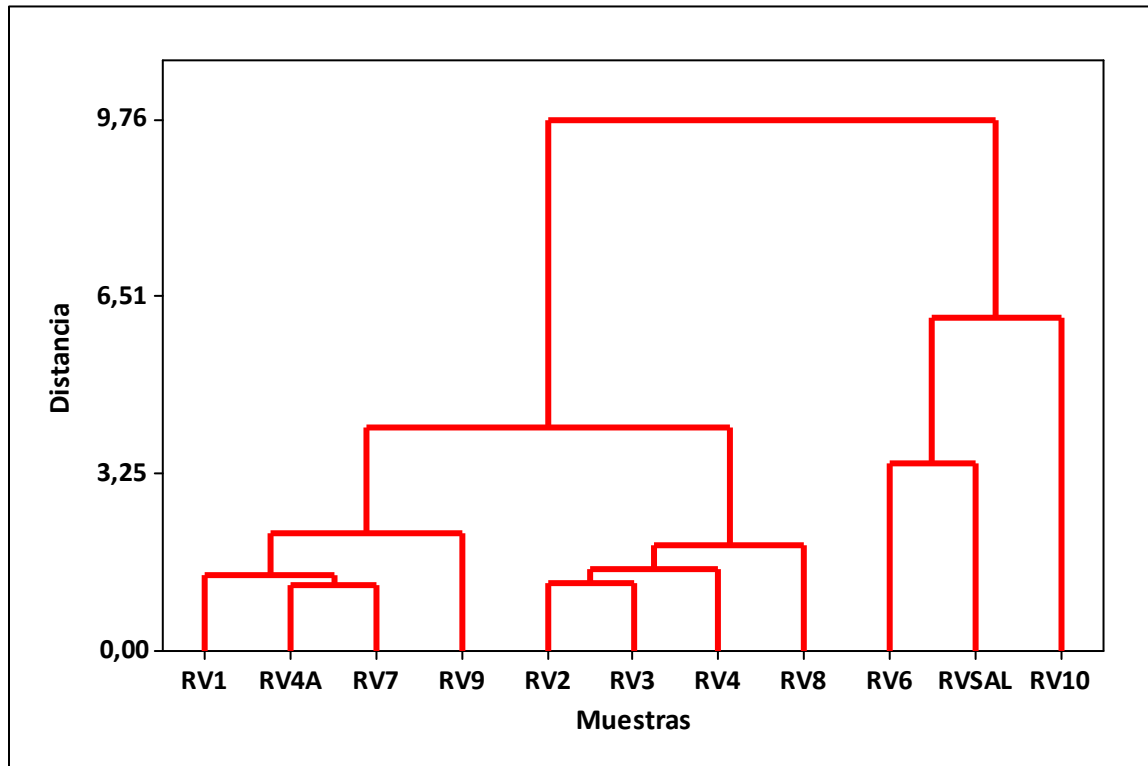


Figura 23.- Dendrograma de objetos de contenidos pseudototales

De la observación de la Figura 23, se deduce la presencia de dos grandes aglomerados, uno de ellos formado por las muestras RV6, RVSAL y RV10. El otro gran conglomerado, puede subdividirse en dos, uno de ellos formado por las muestras RV2, RV3, RV4 y RV8, y el otro por las restantes RV1, RV4A, RV7 y RV9.

La visualización conjunta de los dendrogramas correspondientes a las variables y a los sedimentos, puede hacerse por medio del método descrito por Smolinski (2002), que consiste en reordenar las filas y columnas de la matriz de datos, previamente autoescalada a media cero y varianza unidad, y aplicar un código de colores por medio de la instrucción `pcol` de MATLAB, generando así un *heat map* o mapa de temperatura de los datos. La Figura 24 presenta los resultados obtenidos.

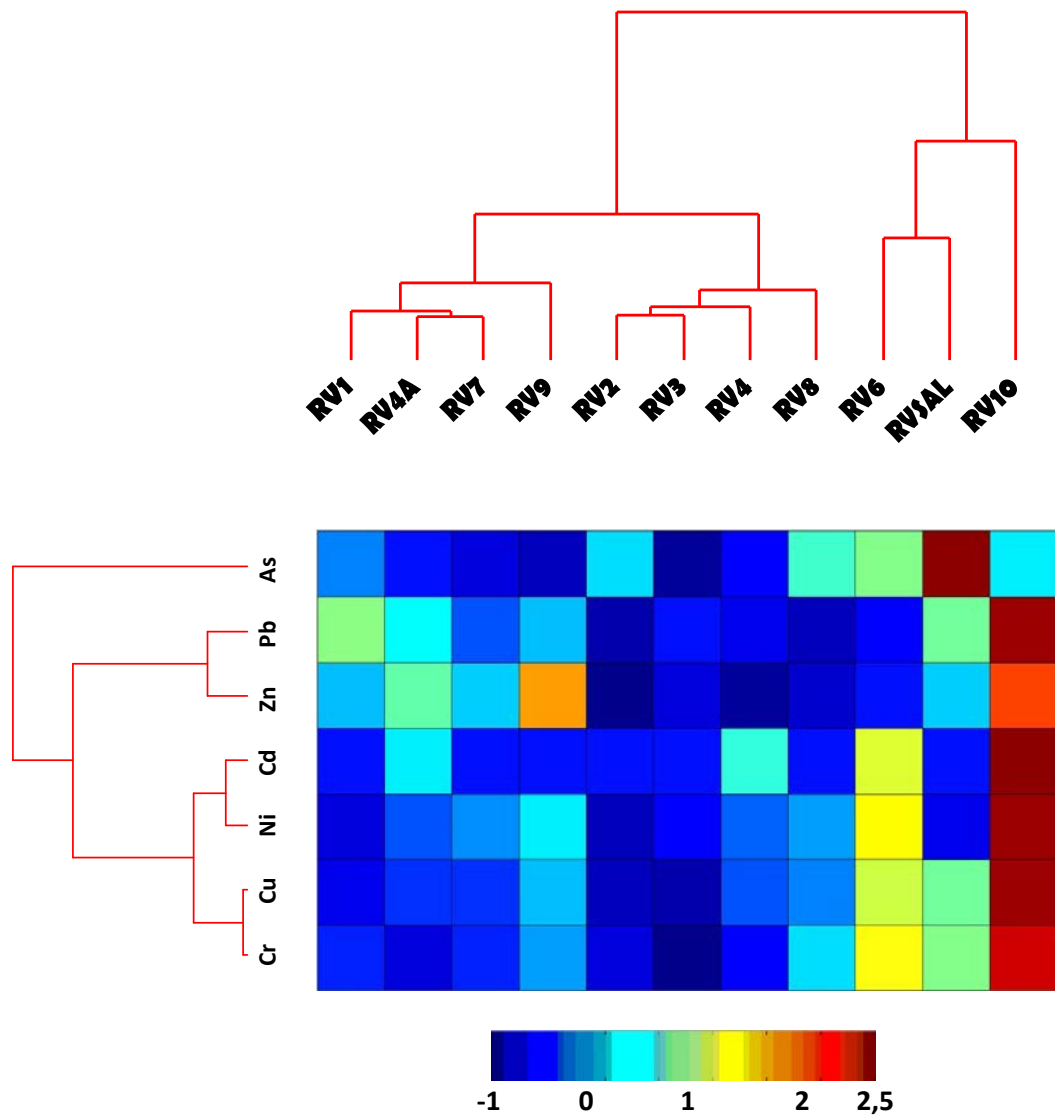


Figura 24.- Visualización conjunta de los dos dendrogramas de contenidos pseudototales

En ella se localizan fácilmente las muestras con valores elevados de metales tóxicos (coloreadas de naranja a rojo oscuro), pudiéndose comprender inmediatamente la razón del conglomerado formado por las muestras RV6, RV5AL y RV10, ya que todas ellas son las que poseen valores relativos más grandes en contenidos pseudototales de los elementos analizados.

El otro gran conglomerado está dividido en dos: el formado por las muestras RV2, RV3, RV4 y RV8 con contenidos en general bajos en todos los elementos (salvo en As y Cd

para las muestras RV2 y RV8) mientras que resto de las muestras, RV1, RV4A, RV7 y RV9 tienen un comportamiento mezclado, destacando los contenidos relativamente altos de todas ellas en Zn y Pb.

En general, el A.C. confirma todas las conclusiones extraídas del A.C.P., lo que pone de manifiesto su complementariedad. Mientras el A.C.P. trata de buscar un modelo matemático basado en unos factores ortogonales entre sí (que no comparten información), concentrando la mayor cantidad de información (84,11%) de la tabla de datos original, el A.C. representa toda la información, a partir del parecido entre objetos o variables.

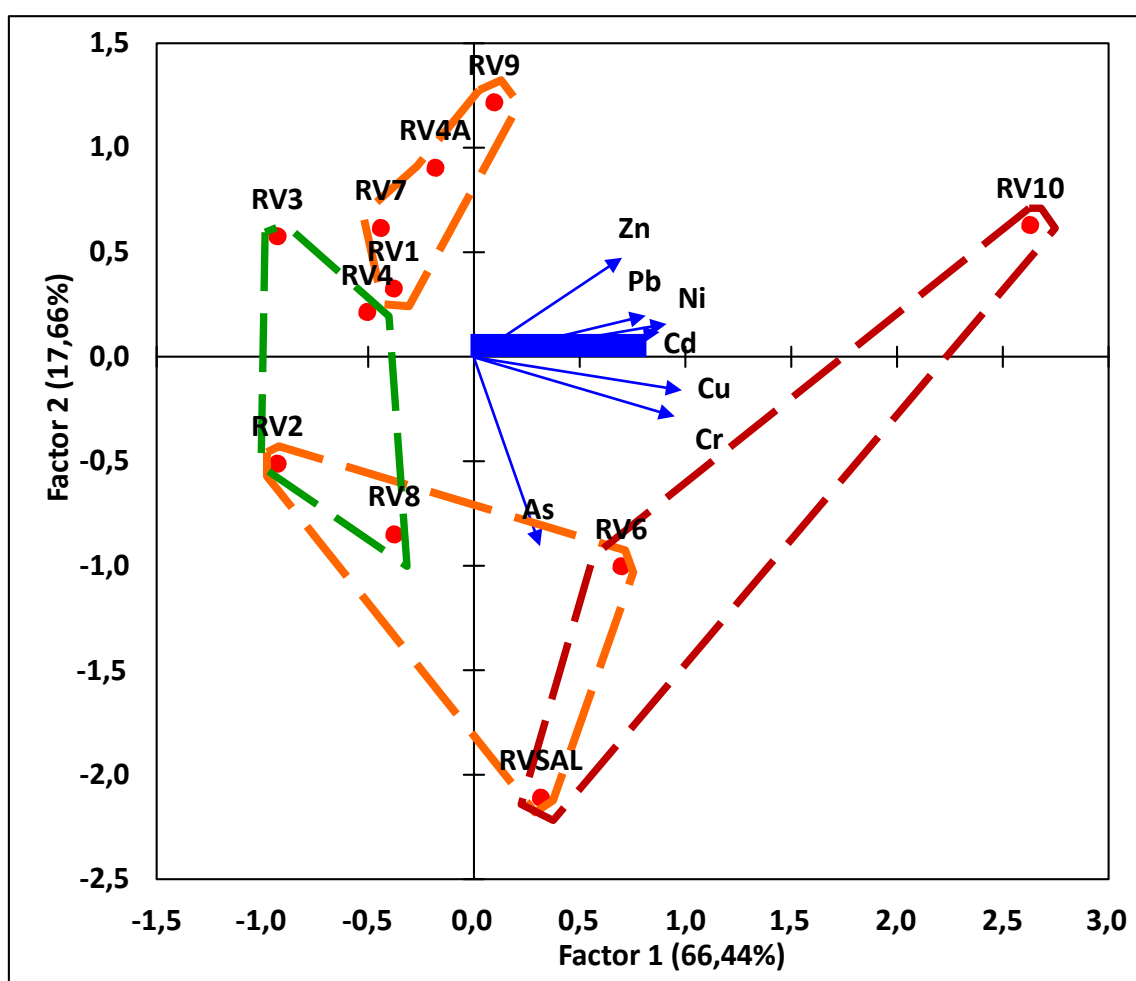


Figura 25.- Gráfico bivariado de contenidos pseudototales

Eso permite revisar la Figura 21, que resumía el A.C.P., para incluir la información del A.C., tal como se muestra en la Figura 25, en la que se han agrupado las muestras que

comparten características comunes en base a sus contenidos en metales pseudo-totales. Así, en rojo aparecen las muestras con contenidos más altos y en verde las menos cargadas, mientras que los dos grupos en naranja presentan contenidos intermedios, relativamente elevados en As o en Zn. Estas agrupaciones de muestras se hacen desde el conocimiento previo de que los niveles de elementos pseudototales encontrados, no parecen presentar riesgo medioambiental.

Si se compara la anterior visión con la situación de los puntos de muestreo (Tabla 3 y Figura 7) se observa que el factor antropogénico no parece tener efecto alguno. Los puntos RV1 y RV3 situados respectivamente aguas debajo de las ciudades de Justo Darac y Villa Mercedes, contienen siempre niveles de metales pseudototales situados entre los más pequeños. Las muestras con RV6, RVSal y RV10, las más cargadas con metales pseudototales, se encuentran en la zona de cabecera del río Quinto. Esto parece apuntar a un origen natural, relacionado con la geología de la zona, un factor a estudiar en próximos trabajos.

4.2.- Fraccionamiento químico

El fraccionamiento químico B.C.R. permite dividir los contenidos pseudototales en 4 fracciones, 1, 2, 3 y 4 (Residual), de disponibilidad decreciente. La Tabla 19 muestra los resultados medios obtenidos, en mg/kg, al analizar 2 réplicas de las muestras disponibles. Cabe resaltar que la Fracción 4 (Residual) se obtuvo por diferencia de la suma de las Fracciones 1, 2 y 3, del contenido pseudototal (Tabla 12).

Tabla 19.- Fraccionamiento químico B.C.R. (mg/kg)

Muestra	Fracción	Elemento						
		Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
RV1	1	< LD	0,10	< LD	3,00	0,34	< LD	< LD
RV2	1	< LD	0,10	< LD	0,92	0,36	< LD	< LD
RV3	1	0,02	< LD	< LD	2,50	< LD	< LD	0,28
RV4	1	0,34	0,09	< LD	3,27	0,22	< LD	< LD
RV4A	1	< LD	0,04	< LD	0,57	0,20	< LD	< LD
RV6	1	< LD	0,46	0,01	4,49	0,61	< LD	< LD
RV7	1	< LD	0,06	0,18	1,18	0,12	< LD	< LD
RV8	1	< LD	0,14	0,27	1,72	0,50	< LD	< LD
RV9	1	< LD	0,16	0,36	1,80	< LD	< LD	< LD
RV10	1	< LD	1,15	1,42	3,43	0,22	< LD	< LD
RVSAL	1	< LD	0,34	< LD	2,16	1,06	< LD	< LD
RV1	2	0,56	0,16	0,58	2,51	0,43	0,06	1,71
RV2	2	0,36	0,18	0,64	3,45	0,42	0,04	1,58
RV3	2	0,84	0,08	0,23	1,38	0,19	0,06	2,99
RV4	2	0,23	0,17	0,49	2,79	0,32	0,04	0,52
RV4A	2	0,55	0,14	0,29	0,46	0,30	0,05	1,02
RV6	2	0,89	0,42	1,26	3,88	2,78	0,08	3,38
RV7	2	0,26	0,17	0,37	0,39	0,47	0,05	0,19
RV8	2	0,33	0,29	0,73	1,74	0,92	0,05	0,78
RV9	2	0,11	0,62	0,49	0,78	0,17	0,05	< LD
RV10	2	0,71	1,45	1,86	2,43	0,68	0,06	0,53
RVSAL	2	0,58	0,69	1,55	7,83	4,62	0,13	3,72
RV1	3	< LD	0,11	1,38	2,20	0,24	< LD	< LD
RV2	3	< LD	0,49	0,61	1,94	0,33	< LD	< LD
RV3	3	0,77	0,01	0,12	1,46	< LD	< LD	0,21
RV4	3	< LD	0,32	0,64	1,85	0,05	< LD	< LD
RV4A	3	0,43	0,37	0,33	2,15	< LD	< LD	2,36
RV6	3	< LD	0,68	1,13	2,87	0,82	< LD	< LD
RV7	3	< LD	0,34	0,53	1,47	0,05	< LD	< LD
RV8	3	0,09	0,82	0,99	4,78	0,15	< LD	< LD
RV9	3	< LD	1,54	0,65	2,97	< LD	< LD	< LD
RV10	3	< LD	2,02	9,87	5,39	0,15	< LD	< LD
RVSAL	3	0,22	1,21	3,07	6,68	1,95	< LD	< LD
RV1	4	5,49	0,22	0,42	14,22	1,88	< LD	2,79
RV2	4	3,70	< LD	0,04	< LD	2,72	< LD	< LD
RV3	4	< LD	1,12	0,73	4,75	0,46	< LD	< LD
RV4	4	4,46	2,60	2,79	< LD	0,97	0,22	0,76
RV4A	4	3,02	2,51	2,85	27,51	1,31	0,15	0,06
RV6	4	19,43	10,69	8,54	1,19	1,25	0,33	< LD
RV7	4	5,80	3,79	2,34	19,50	0,81	< LD	1,86
RV8	4	11,10	3,54	2,83	1,30	3,22	< LD	0,22
RV9	4	9,78	4,08	4,45	39,34	0,73	< LD	2,84
RV10	4	28,92	15,15	5,56	38,67	2,94	0,73	7,54
RVSAL	4	15,55	< LD	4,76	6,11	2,93	< LD	0,47

4.2.1.- Fraccionamiento medio

A partir de los resultados de la Tabla 19, se pueden calcular los valores de fraccionamiento medio de cada uno de los elementos, que se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20.- Fraccionamiento B.C.R. medio

Fracción	Elemento						
	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
1	0,03	0,24	0,20	2,28	0,32	< LD	0,03
2	0,49	0,40	0,77	2,51	1,03	0,06	1,49
3	0,14	0,72	1,76	3,07	0,34	< LD	0,23
4 (Residual)	9,75	3,97	3,21	13,87	1,75	0,13	1,50

Los valores aparecen representados en forma de diagrama de barras en la Figura 26. Hay que recordar que, en el fraccionamiento químico B.C.R., la movilidad y disponibilidad de los metales tóxicos, y por tanto su potencial peligrosidad medioambiental, va disminuyendo en el orden $1 > 2 > 3 > 4$ (Residual), y de ahí el código de colores elegido para la representación gráfica.

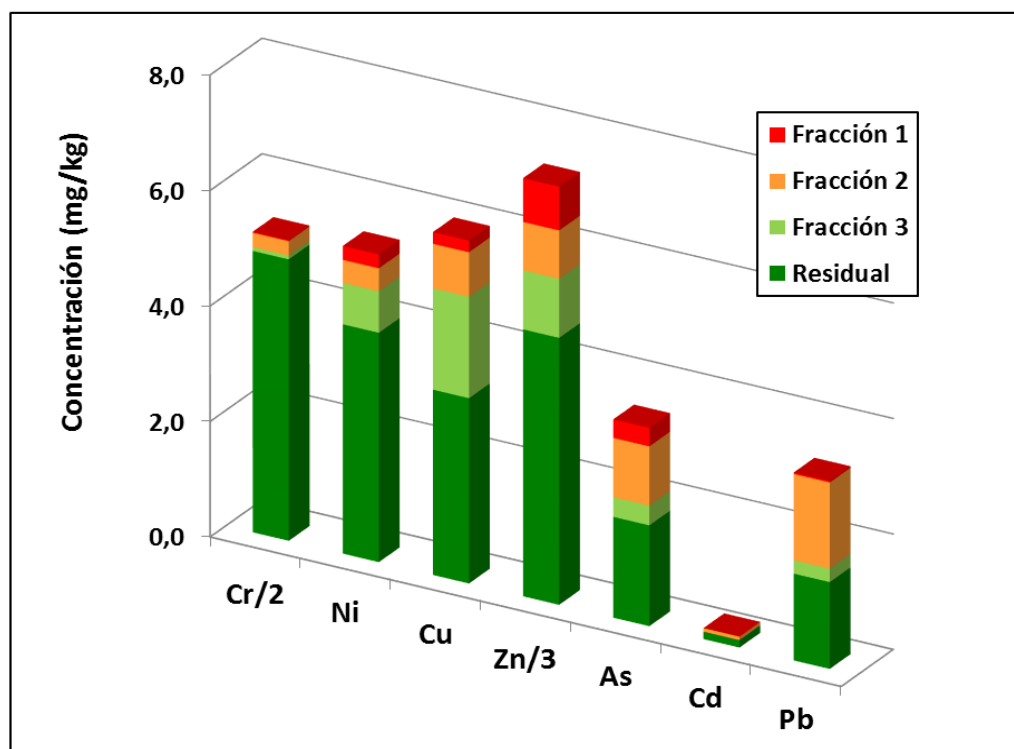


Figura 26.- Fraccionamiento B.C.R. medio

A la vista de las anteriores tabla y figura, se aprecia que todos los elementos aparecen mayoritariamente en la Fracción 4 (Residual) que es la menos disponible, aunque el Pb, aparece repartido entre dicha Fracción 4 y la Fracción 2, más movilizable. Si esto se combina con el bajo contenido pseudototal medio, se puede inferir que la peligrosidad medioambiental de las muestras es prácticamente inexistente.

4.2.2.- Análisis en Componentes Principales

Se muestra ahora de forma más resumida, el tratamiento mediante A.C.P. de los datos de la Tabla 19. Como en 4.2.1, los valores < LD han sido sustituidos por 0,00. La Tabla 21 muestra la matriz de correlación, con los valores significativos en negrita.

Tabla 21.- Matriz de correlación del fraccionamiento químico B.C.R.

	Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
Cr	1,000 ----						
Ni	0,871 <i>0,000</i>	1,000 ----					
Cu	0,633 <i>0,000</i>	0,667 <i>0,000</i>	1,000 ----				
Zn	0,576 <i>0,000</i>	0,601 <i>0,000</i>	0,401 <i>0,007</i>	1,000 ----			
As	0,515 <i>0,000</i>	0,327 <i>0,030</i>	0,297 <i>0,050</i>	0,296 <i>0,051</i>	1,000 ----		
Cd	0,762 <i>0,000</i>	0,872 <i>0,000</i>	0,464 <i>0,001</i>	0,490 <i>0,001</i>	0,379 <i>0,011</i>	1,000 ----	
Pb	0,541 <i>0,000</i>	0,532 <i>0,000</i>	0,199 <i>0,195</i>	0,619 <i>0,000</i>	0,484 <i>0,001</i>	0,658 <i>0,000</i>	1,000 ----

En cursiva aparecen los valores de p a posteriori con un $\alpha = 0,05$

Dado el elevado número de grados de libertad, $44-2 = 42$, el r_{critico} con $\alpha = 0,05$ resulta ser 0,297, por lo que solo hay dos parejas cuya correlación no es significativa, As-Cu y As-Zn, apareciendo de nuevo el comportamiento diferencial del As, aunque menos marcado que el apartado 4.1. Los valores propios de la matriz de correlación aparecen en la Tabla 22, que muestra un factor significativo, que explica el 61,23 %. El siguiente factor está muy cerca del valor crítico 1 y entre los dos primeros explican el 74,76% de la varianza,

una cantidad bastante apreciable. El gráfico de Scree (Figura 27) permite sacar las mismas conclusiones.

**Tabla 22.- Valores propios y varianza explicada
(A.C.P. fraccionamiento químico)**

Factor	Valor propio	% Varianza	% Varianza acumulado
1	4,2864	61,23	61,23
2	0,9466	13,52	74,76
3	0,7466	10,67	85,42
4	0,5486	7,84	93,26
5	0,2656	3,79	97,05
6	0,1510	2,16	99,21
7	0,0552	0,79	100,00

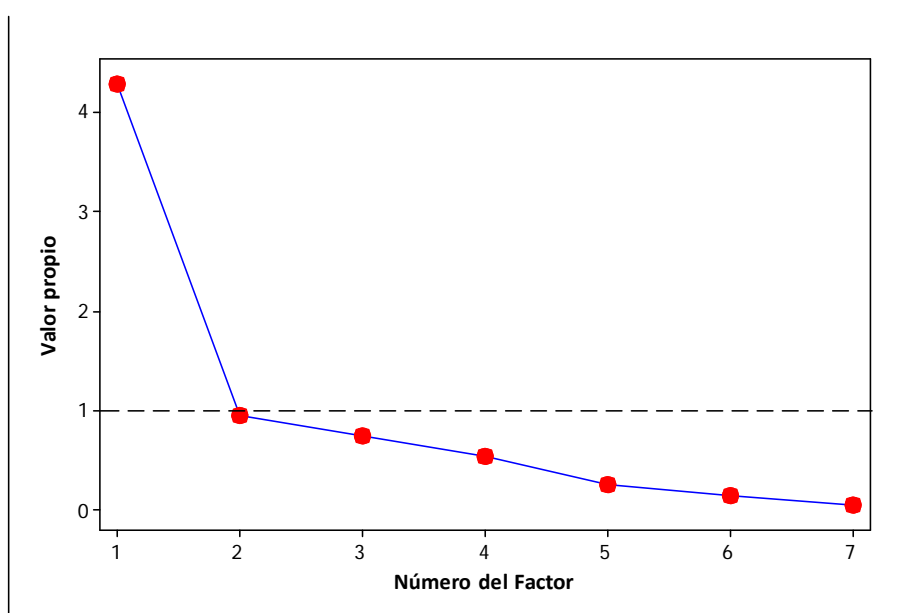


Figura 27.- Gráfico de Scree del A.C.P. del fraccionamiento químico

La matriz de cargas aparece en la Tabla 23 con los valores máximos de los coeficientes para cada factor señalados en negrilla. Destaca el comportamiento de algunos elementos, Cu, As y Pb, que aparecen divididos entre varios factores. La representación gráfica de los dos primeros, permite visualizar un 74,76% de las relaciones entre los elementos analizados, tal como se expone en la Figura 28.

Se aprecia que todos los elementos están situados en la zona positiva del eje de abscisas (Factor 1), mientras que el eje de ordenadas (Factor 2) permite distinguir dos comportamientos diferentes: As, Pb y Zn por un lado, y Cu, Ni y Cr por otro.

Tabla 23.- Cargas (loadings) del fraccionamiento químico

Elemento	Factor o componente						
	1	2	3	4	5	6	7
Cr	0,913	-0,139	0,109	0,074	0,237	0,262	0,072
Ni	0,919	-0,269	-0,121	0,158	0,091	-0,046	-0,185
Cu	0,671	-0,575	0,256	-0,262	-0,291	-0,003	0,027
Zn	0,730	0,159	-0,362	-0,527	0,147	-0,103	0,030
As	0,570	0,445	0,677	-0,067	0,067	-0,100	-0,024
Cd	0,872	-0,017	-0,144	0,407	-0,034	-0,195	0,114
Pb	0,736	0,549	-0,211	0,041	-0,299	0,146	-0,029
Valor propio	4,2864	0,9466	0,7466	0,5486	0,2656	0,151	0,0552
% Varianza	61,23	13,52	10,67	7,84	3,79	2,16	0,79
% Var. acum.	61,23	74,76	85,42	93,26	97,05	99,21	100,00

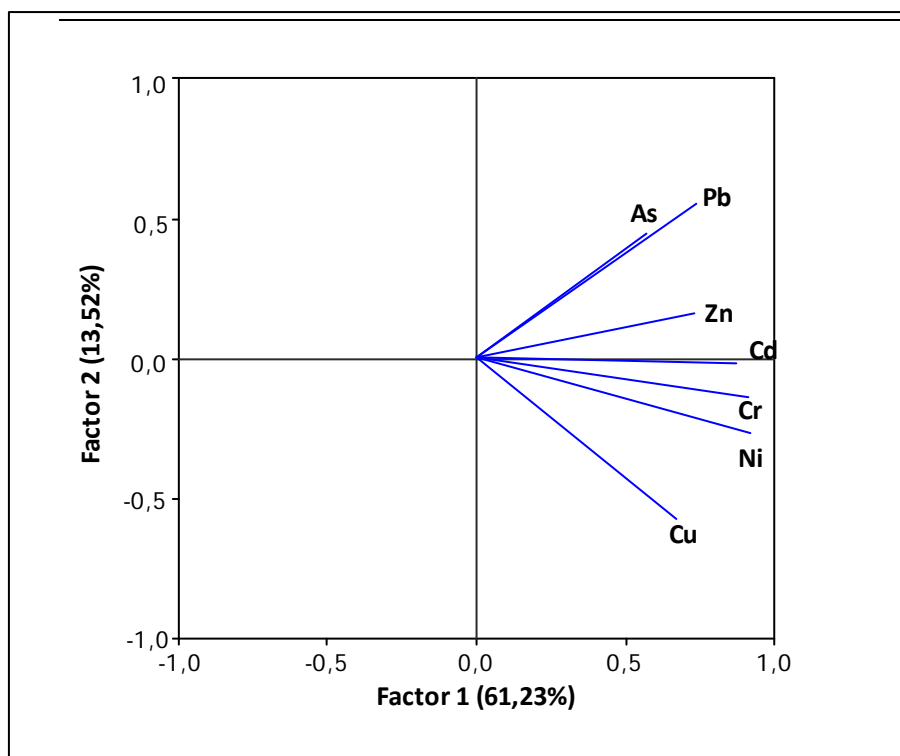


Figura 28.- Gráfico de cargas del fraccionamiento químico

Las puntuaciones o nuevas variables, aparecen en la Tabla 24 y en la Figura 29 en la que se representan los dos primeros factores en función de la Fracción B.C.R. Esto permite visualizar el 74,76 % de la información presente en la Tabla 19, en lo correspondiente a las relaciones entre las muestras analizadas respecto del fraccionamiento químico.

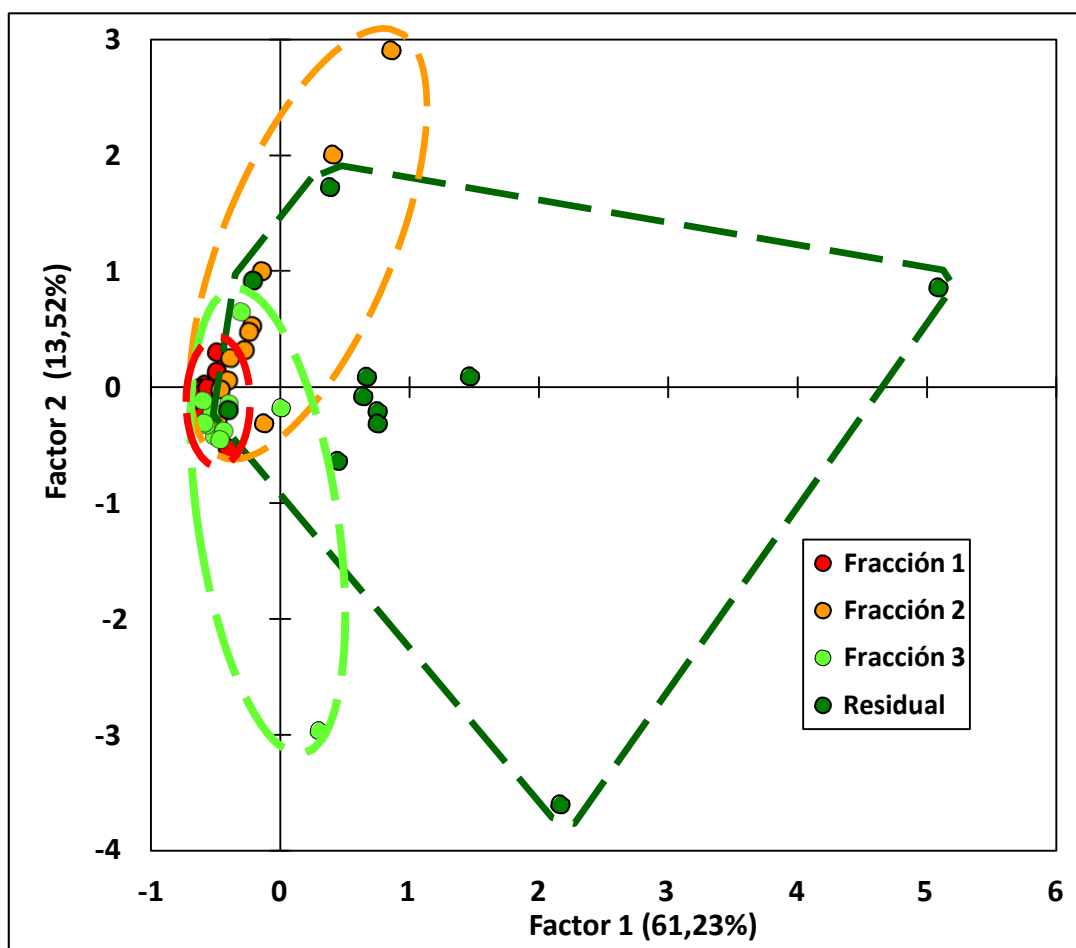


Figura 29.- Gráfico de puntuaciones del fraccionamiento químico

La Fracción Residual tiende a aparecer hacia la derecha del eje de abscisas, mientras que la Fracción 1 se concentra en el lado negativo de dicho eje. Las Fracciones 2 y 3 tienden a agruparse de forma simétrica respecto al eje de abscisas, con la Fracción 2 dirigiéndose hacia el primer cuadrante, y la Fracción 3 hacia el cuarto.

Tabla 24.- Puntuaciones (scores) del fraccionamiento químico

Muestra	Fracción	Elemento						
		Cr	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
RV1	1	-0,578	0,021	-0,307	0,131	0,595	-0,145	0,121
RV2	1	-0,615	-0,011	-0,179	0,353	0,471	0,002	-0,015
RV3	1	-0,604	-0,019	-0,611	0,229	0,266	0,298	0,240
RV4	1	-0,575	-0,032	-0,409	0,123	0,636	0,006	0,264
RV4A	1	-0,646	-0,079	-0,287	0,401	0,406	0,131	0,104
RV6	1	-0,488	0,130	-0,175	-0,023	0,792	-0,466	-0,328
RV7	1	-0,641	-0,198	-0,443	0,319	0,315	0,189	0,217
RV8	1	-0,560	-0,009	-0,059	0,196	0,426	-0,156	-0,012
RV9	1	-0,612	-0,256	-0,473	0,226	0,269	0,144	0,190
RV10	1	-0,402	-0,526	-0,269	-0,102	0,008	-0,230	-0,743
RVSAL	1	-0,486	0,298	0,336	0,164	0,743	-0,556	-0,511
RV1	2	-0,218	0,524	-0,519	0,498	-0,963	0,497	0,579
RV2	2	-0,241	0,474	-0,526	0,291	-0,852	0,432	0,395
RV3	2	-0,143	0,997	-0,941	0,778	-1,846	1,667	0,208
RV4	2	-0,403	0,056	-0,397	0,353	-0,062	-0,193	0,747
RV4A	2	-0,386	0,248	-0,419	0,722	-0,448	0,350	0,617
RV6	2	0,407	2,006	1,145	0,182	-1,869	-0,135	-0,610
RV7	2	-0,460	-0,021	-0,116	0,659	0,128	-0,396	0,789
RV8	2	-0,275	0,317	0,134	0,422	-0,285	-0,381	0,418
RV9	2	-0,483	-0,293	-0,349	0,620	0,202	-0,401	0,358
RV10	2	-0,126	-0,313	0,054	0,279	-0,488	-0,535	-0,305
RVSAL	2	0,859	2,907	2,358	-0,184	-1,668	-1,974	-0,750
RV1	3	-0,504	-0,423	-0,128	-0,073	-0,171	-0,039	0,405
RV2	3	-0,525	-0,212	-0,182	0,153	0,270	-0,108	-0,275
RV3	3	-0,595	-0,118	-0,504	0,327	0,310	0,552	0,394
RV4	3	-0,572	-0,327	-0,397	0,168	0,161	0,089	0,050
RV4A	3	-0,303	0,647	-0,939	0,344	-1,384	1,751	-0,791
RV6	3	-0,396	-0,144	0,251	-0,096	0,203	-0,506	-0,516
RV7	3	-0,586	-0,310	-0,400	0,237	0,194	0,120	-0,028
RV8	3	-0,437	-0,378	-0,441	-0,179	0,265	-0,225	-0,312
RV9	3	-0,464	-0,453	-0,570	0,179	0,364	-0,096	-1,313
RV10	3	0,301	-2,965	0,849	-2,069	-4,041	-0,509	0,287
RVSAL	3	0,005	-0,178	1,281	-0,999	-0,179	-1,508	-0,890
RV1	4	0,385	1,726	0,050	-1,056	0,173	1,472	0,343
RV2	4	-0,211	0,915	1,970	0,248	1,497	-0,291	-0,073
RV3	4	-0,399	-0,200	-0,242	-0,124	0,487	-0,470	-0,872
RV4	4	0,445	-0,638	0,303	1,483	-0,671	-1,084	1,705
RV4A	4	0,752	-0,208	-0,665	-2,030	1,454	-3,489	2,058
RV6	4	2,165	-3,602	1,263	1,847	0,284	0,512	-1,280
RV7	4	0,668	0,088	-0,852	-1,593	0,469	0,811	-2,337
RV8	4	0,640	-0,079	2,698	-0,015	1,676	1,220	-2,226
RV9	4	1,466	0,092	-1,761	-3,999	0,508	1,118	-0,455
RV10	4	5,088	0,860	-1,892	1,779	0,369	-0,354	0,415
RVSAL	4	0,752	-0,314	2,759	-1,168	0,986	2,884	3,738

El gráfico bivariado (Figura 30) permite visualizar las relaciones entre las muestras y las variables en función de la situación relativa de unas y otras en el espacio abstracto de los dos factores. La interpretación es inmediata: la Fracción 1 está alejada de las variables indicando que la misma contiene los menores valores de los elementos. Por el contrario, la Fracción residual se sitúa preferentemente al lado de las variables, indicando que, en general, dicha fracción contiene las mayores concentraciones de metales tóxicos. Las Fracciones 2 y 3 tienen un comportamiento intermedio, estando ambas mayoritariamente lejos de las variables, pero dirigiéndose la Fracción 2 hacia el primer cuadrante, indicando que esa Fracción puede contener en ocasiones As y Pb, mientras que la Fracción 3 está dirigida hacia el cuarto cuadrante, mostrando cierta tendencia a contener Cu.

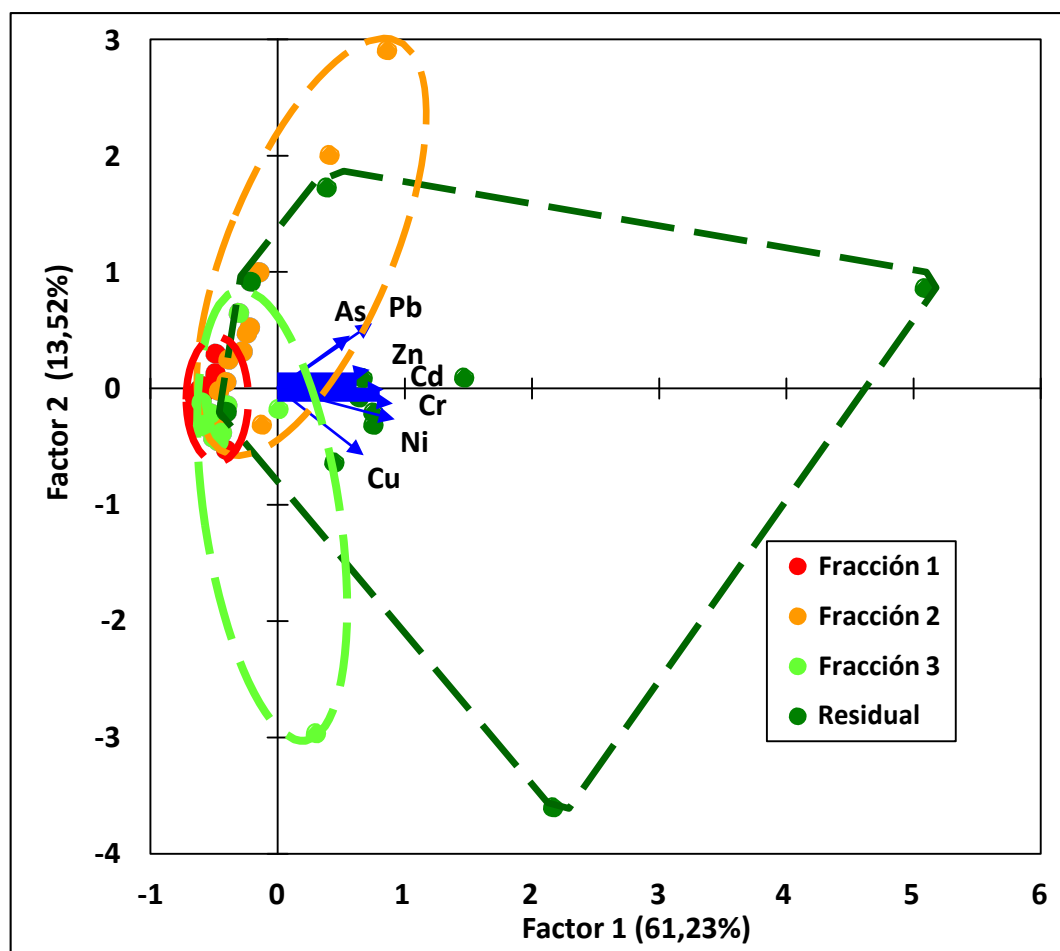


Figura 30.- Gráfico bivariado del fraccionamiento químico

El problema de la interpretación es que, dada la estructura de la matriz de datos **X** de la Tabla 19, cada muestra aparece en la Figura 30 cuatro veces (una por fracción). Para separar los comportamientos de muestras y fracciones, se podrían utilizar métodos multivariantes avanzados, como el A.C.P. de tres vías (Pardo et al, 2008; Cid et al, 2011), que no son objeto de este Trabajo Fin de Grado. Una forma aproximada es calcular el valor medio de las puntuaciones de cada una de las fases, y representarla en un gráfico bivariado promedio, tal como el que se muestra en la Figura 31.

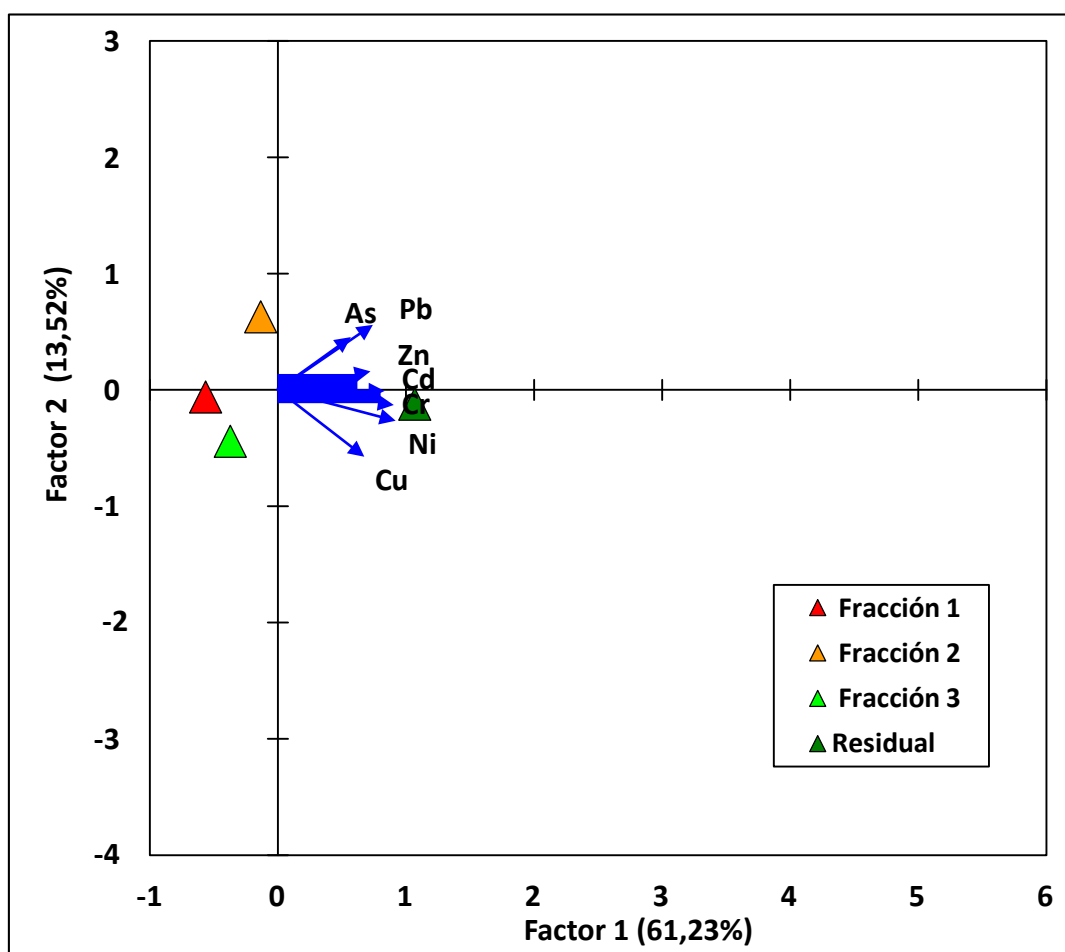


Figura 31.- Gráfico promedio de puntuaciones del fraccionamiento químico

Dicho gráfico es de interpretación más simple y confirma lo dicho más arriba, en el sentido de que los metales tienden a aparecer preferentemente en la Fracción Residual, menos disponible y de más difícil removilización y, por tanto, menos peligroso medioambientalmente.

Tampoco en este caso la rotación Varimax permite mejorar la interpretación, por lo que sus resultados no se muestran en la memoria.

4.2.3.- Análisis de Conglomerados

La Figura 32, presenta el dendrograma correspondiente a los elementos analizados, utilizando (como en 4.1.4) el valor $d_{ij} = 1 - r_{ij}$ para cuantificar la distancia entre dos elementos químicos, construyendo el dendrograma con el método de Ward.

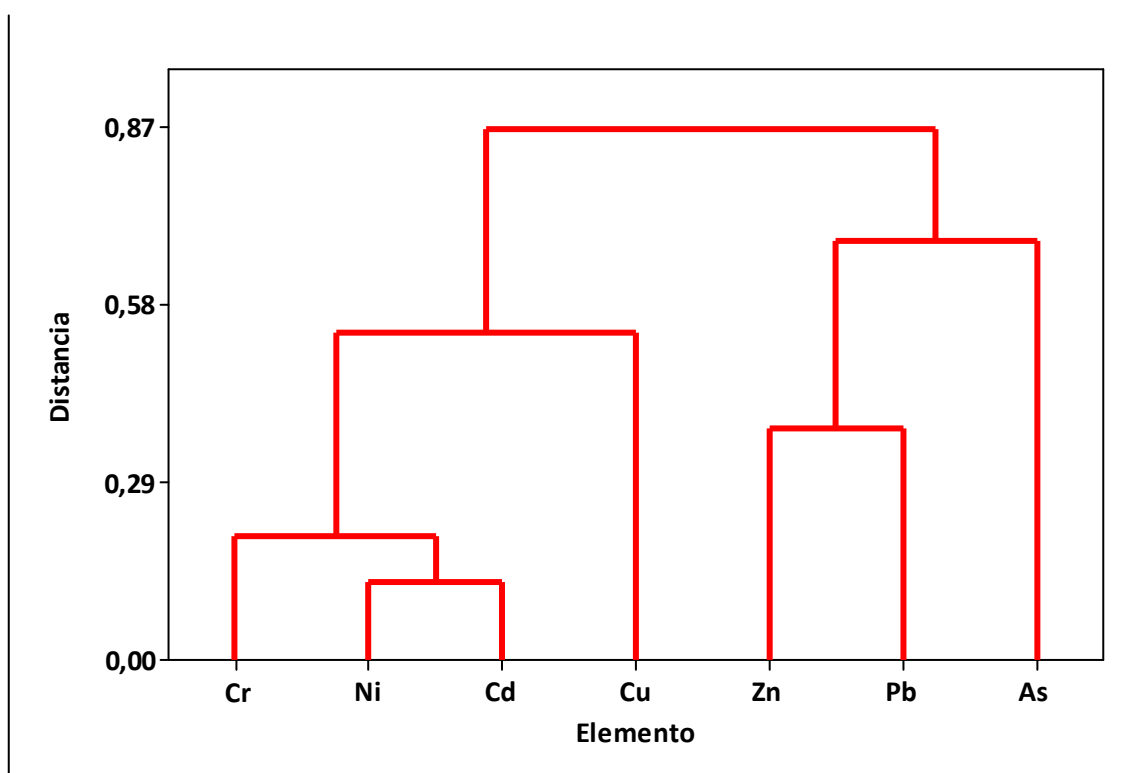


Figura 32.- Dendrograma de variables del fraccionamiento químico

De la observación de dicha figura, se confirma la agrupación As, Cd, Pb, ya detectada en el gráfico de cargas del A.C.P. (Figura 28), así como el agrupamiento muy compacto de Cr, Ni y Cd, y el levemente diferente del Cu, detectados en el antedicho gráfico de cargas.

La Figura 33 presenta el dendrograma correspondiente a las muestras de sedimentos, utilizando la distancia euclídea de variables autoescaladas y el método de Ward, rotulado en función de la Fracción a la que pertenece la muestra (recordemos que

cada sedimento original aparece cuatro veces en ese dendrograma). Se aprecian las mismas tendencias vistas en el A.C.P. Así, se visualizan dos agrupamientos bastante compactos para las Fracciones 1 y Residual y ubicadas en ramas muy separadas del dendrograma, indicando comportamiento opuestos respecto al contenido en los metales analizados. Las Fracciones 2 y 3 están mayoritariamente junto a la 1, pero aparecen mezclas entre sí.

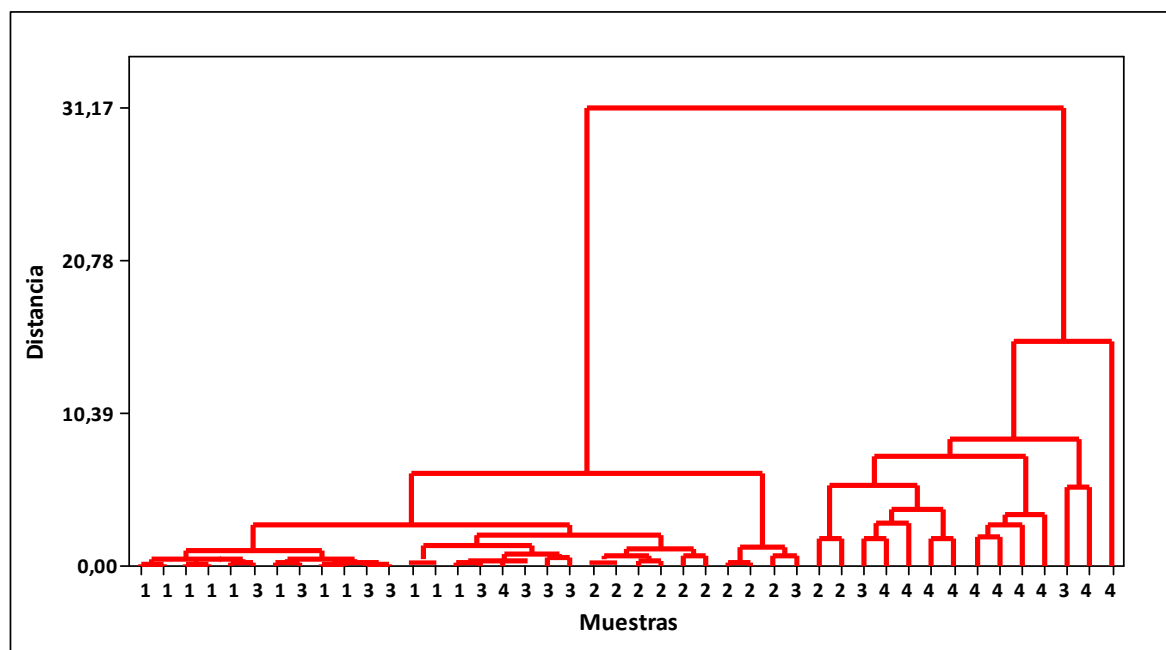


Figura 33.- Dendrograma de objetos del fraccionamiento químico

En este caso no se muestra el mapa de temperatura (*heat map*) ya que su interpretación es complicada y no aporta nada a lo anteriormente dicho.

Como en el caso de los contenidos pseudototales, el A.C. confirma todas las conclusiones extraídas del A.C.P. y vuelve a poner de manifiesto la complementariedad de ambas técnicas quimiométricas. Se puede concluir que las muestras analizadas presentan una muy baja movilidad y disponibilidad, lo que unido a su bajo contenido en metales movilizables (pseudototales) permite afirmar que la peligrosidad medioambiental promedio de las mismas es prácticamente nula. Para comprobar el comportamiento de cada una de las muestras, se pueden aplicar métodos de A.C.P. de tres vías (Pardo et al, 2008; Cid et al, 2011) que serán objetos de futuros trabajos.

Capítulo 5

CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo un estudio por vez primera, de los metales tóxicos Cr, Ni, Cu, Zn, As, Cd y Pb en muestras de sedimentos fluviales procedentes del río Quinto (San Luis, Argentina) por métodos de extracción/lixiviación, una herramienta ampliamente utilizada para el estudio de la peligrosidad medioambiental de muestras sólidas.

Para ello, se han estudiado 11 muestras de sedimentos tomados a lo largo del río Quinto, desde su nacimiento hasta su salida de la provincia de San Luis y que fueron proporcionadas por el Dr. Fabricio D. Cid de la Universidad de San Luis. Los puntos de muestreo cubren puntos significativos del cauce (embalses, poblaciones...).

Los contenidos movilizables o pseudototales, han sido determinados mediante la aplicación de la norma US-EPA 3051, una extracción con HNO_3 concentrado ayudada por microondas.

Los contenidos pseudototales han sido divididos en fracciones de peligrosidad decreciente, mediante el procedimiento de extracción secuencial B.C.R., que produce tres fracciones mediante la utilización, respectivamente, de ácido acético, hidroxilamina y peróxido de hidrógeno. Una cuarta fracción, 4 o Residual, se obtiene restando del contenido pseudototal, la suma de las 3 fracciones antedichas.

Los extractos generados fueron determinados en el laboratorio de Técnicas Instrumentales de la UVA, mediante ICP-OES e ICP-MS. Dichas técnicas fueron previamente puestas a punto, y los procedimientos validados mediante los correspondientes Materiales de Referencia, ERA 540 para la EPA-3051 y MRC 601 para el fraccionamiento químico, obteniéndose en ambos casos resultados satisfactorios.

Contenidos pseudototales

Todos los elementos, salvo Zn, presentan distribuciones sesgadas. Solo Cr y Zn aparecen en concentraciones medias superiores a 10 mg/kg, estando todos los demás, Ni, Cu, As, Cd y Pb en concentraciones inferiores. Los valores hallados están muy por debajo de los niveles guía de los criterios de calidad ambiental más utilizados.

El estudio mediante A.C.P. ha demostrado el comportamiento diferencial del As respecto del resto de los elementos. Estos últimos aparecen correlacionados en un factor significativo (66,44% de información) mientras que el As explica el 17,67% de la información en un factor también significativo. El A.C.P. ha permitido además localizar las muestras, RV6, RV10 y RVSal, con contenidos mayores en metales pseudototales.

El A.C. ha confirmado las tendencias vistas con el A.C.P. en lo relativo a los elementos y además ha permitido matizar las correspondientes a las muestras, mediante el trazado de un mapa de temperatura (*heat map*), que permite visualizar aquellas con mayores niveles en metales pseudototales, RV6, RVSal y RV10.

Fraccionamiento químico

Del fraccionamiento medio se deduce que todos los elementos aparecen mayoritariamente en la Fracción 4 (Residual) que es la menos disponible, aunque el Pb se reparte casi a partes iguales entre dicha Fracción 4 y la 2, más movilizable.

El A.C.P. indica la elevada correlación entre todos los elementos, concentrados en un factor significativo (61,23% de la información). Un segundo factor (13,52%) permite diferenciar As, Pb y Zn del resto de los elementos. El A.C.P. también confirma que todos los elementos están concentrados mayoritariamente en la Fracción 4 o residual, así como que la 2 contienen más As y Pb, mientras que la 3 contiene más Cu.

El A.C. de las variables confirma las tendencias indicadas por el A.C.P., mientras que el de las muestras visualiza el comportamiento muy diferenciado de la Fracción 4.

A la vista de los bajos contenidos pseudototales o movilizables y de que los elementos estén concentrados mayoritariamente en la Fracción Residual, se puede concluir la baja o nula peligrosidad medioambiental, en lo referente a los metales tóxicos estudiados, de los sedimentos del río Quinto.

Capítulo 6

BIBLIOGRAFÍA

- Alloway, J. (Ed.) (2013) Heavy Metals in Soils: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability. Environmental Pollution, Volume 22. 3rd Edition. ISBN: 978-94-007-4469-1.
- Alomary A.A., Belhadj S. (2007) Determination of heavy metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) by ICP-OES and their speciation in Algerian Mediterranean Sea sediments after a five-stage sequential extraction procedure, *Environ Monit Assess.*, 135: 265-80.
- Abollino O., Malandrino M., Giacomino A., Mentasti E. (2011) The role of chemometrics in single and sequential extraction assays: A review Part I. Extraction procedures, uni- and bivariate techniques and multivariate variable reduction techniques for pattern recognition, *Anal. Chim. Acta*, 688: 104-121.
- Barbieri P., Adami G., Favretto A., Reisenhofer E. (1998) A chemometric survey of three sites in Muggia Bay (Northern Adriatic Sea): meteorological effects on heavy metal patterns in surface coastal waters, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 361: 349-352.
- Burton, A.G. (2002) Sediment quality criteria in use around the world, *Limnology*, 3: 65-75.
- CEDEX (1994) Recomendaciones para la gestión del material dragado en los puertos españoles, Ministerio de Obras Públicas, Transportes y Medio Ambiente.
- Chabukdhara M. and Nema A.K. (2012) Assessment of heavy metal contamination in Hindon River sediments: a chemometric and geochemical approach, *Chemosphere*, 87: 945-953.
- Cid F.D., Antón R.I., Caviedes Vidal E. (2007) Organochlorine pesticide contamination in three bird species of the Embalse La Florida water reservoir in the semiarid midwest of Argentina, *Sci. Total Environ.*, 385: 86-96.
- Cid F.D., Antón R.I., Pardo R., Vega M., Caviedes-Vidal E. (2011) Modeling spatial and temporal variations in the water quality of an artificial water reservoir in the semiarid Midwest of Argentina, *Anal. Chim. Acta*, 705: 243-52.
- Cid F.D., Gatica-Sosa C., Antón R.I., Caviedes Vidal E. (2009) Contamination of heavy metals in birds from Embalse La Florida (San Luis, Argentina), *J. Environ. Monitor.*, 11: 2044-2051.
- Comisión Europea (2012) Propuesta de Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas
http://ec.europa.eu/environment/water/water-dangersub/pri_substances.htm#prop_2011 (fecha de acceso 04/08/2014)
- Crane, M. (2003) Proposed development of Sediment Quality Guidelines under the European Water Framework Directive: a critique, *Toxicol. Let.*, 142: 195-206.
- Cruz-Guzmán Alcalá M. (2007) La contaminación de suelos y aguas. Su prevención con nuevas sustancias naturales. Secretariado de publicaciones de la Universidad de Sevilla. ISBN 978-84-472-0926.
- Davidson C.M., Duncan A.L., Littlejohn D., Ure A.M., Garden L.M. (1998) A critical evaluation of the three-stage BCR sequential extraction procedure to assess the

- potential mobility and toxicity of heavy metals in industrially-contaminated land, *Anal. Chim. Acta*, 363: 45-55.
- Departamento de Química Analítica. Apuntes de Quimiometría y Control de Calidad. Parte de Métodos Multivariantes. Curso 2013-2014.
 - Duffus, J.H. (2002) "Heavy metals"- A meaningless term?, *Pure Appl. Chem.*, 74(5): 793-807.
 - Ebdon L., Pitts L., Corenlis R., Crews H., Donard O.F.X., Quevauviller Ph. (Eds.) (2001) Trace element speciation for environment, food and health. Royal Society of Chemistry. ISBN 0-85404-459-0.
 - Florence T.M. (1982) The speciation of trace elements in waters, *Talanta*, 29: 345-364.
 - Garelis P.A., Bistoni M.A. (2010) Ictiofauna de la cuenca endorreica del río Quinto (San Luis, Argentina), *Natura Neotropicalis*, 41: 19-30.
 - Giacomino A., Abollino O., Malandrino M., Mentasti E. (2011) The role of chemometrics in single and sequential extraction assays: A Review. Part II. Cluster analysis, multiple linear regression, mixture resolution, experimental design and other techniques, *Anal. Chim. Acta*, 688: 122-139.
 - Gleyzes C., Tellier S. and Astruc M. (2002) Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures, *TrAC*, 21: 451-467.
 - Griepink B. (1993) Some Considerations with Regard to the Quality of Results of Analysis of Trace Element Extractable Contents in Soil and Sediment, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 51:123-128.
 - Guevara-Riba A., Sahuquillo A., Rubio R., Rauret G. (2004) Assessment of metal mobility in dredged harbour sediments from Barcelona, Spain, *Sci Total Environ.*, 321: 241-255.
 - Härup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination, *Brit. Med. Bull.*, 68: 167-182.
 - Helena B.A., Pardo R., Vega M., Barrado E., Fernández J.M., Fernández L. (2000) Temporal evolution of groundwater composition in an alluvial aquifer (Pisuerga River, Spain) by principal component analysis, *Wat. Res.*, 34: 807-816.
 - Henke K.R., (2009) Arsenic: Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment, Wiley Online library
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470741122.ch1/pdf>
 (fecha de acceso 24/07/2014).
 - Hodson, M.E. (2004) Heavy metals - geochemical bogey men?, *Environ. Pollut.*, 129: 341-343.
 - Jofré, M.B., Antón, R.I., Caviedes-Vidal, E. (2012) Lead and cadmium accumulation in anuran amphibians of a permanent water body in arid Midwestern Argentina, *Environ. Sci. Pollut. R.*, 19: 2889-2897.
 - Kabata-Pendias, A. (2011) Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press. Taylor & Francis Group. ISBN 9781420093681.

- Karlsson K., Viklander M., Scholes L. and Revitt M. (2010) Heavy metal concentrations and toxicity in water and sediment from stormwater ponds and sedimentation tanks, *J. Hazard. Mater.*, 178: 612-618.
- Kartal S., Aydin Z., Tokalioğlu S. (2006) Fractionation of metals in street sediment samples by using the BCR sequential extraction procedure and multivariate statistical elucidation of the data, *J. Hazard. Mater.*, 132: 80-89.
- Kersten M. and Förstner U. (1986) Chemical fractionation of heavy metals in anoxic estuarine and coastal sediments, *Water. Sci. Technol.*, 18: 121-130.
- Kubová J., Matús P., Bujdos M., Hagarová I., Medved J. (2008) Utilization of optimized BCR three-step sequential and dilute HCl single extraction procedures for soil-plant metal transfer predictions in contaminated lands, *Talanta*, 75:1110-1122.
- Li CX., Zhong H., Wang S., Xue JR.. (2014) Leaching behavior and risk assessment of heavy metals in a landfill of electrolytic manganese residue in western Hunan, China, *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 20: 1249-1263.
- Luco, J. M., E. G. Aguilar, P. Silvia, O. Baudino y D. González. (1992) Niveles de pesticidas organoclorados en las aguas de la provincia de San Luis (Argentina), *Acta Farm. Bonaerense*, 11: 121-128.
- Madrid F., Reinoso R. Florido M.C., Díaz Barrientos E., Ajmone-Marsanc F., Davidson, C.M., Madrid L. (2007) Estimating the extractability of potentially toxic metals in urban soils: A comparison of several extracting solutions, *Environ. Pollut.*, 147:713-722.
- Manceau A., Marcus M.A., Tamura N., Proux O., Geoffroy N., Larson B. (2004) Natural speciation Zn at the micrometer scale in a clayey soil using X-ray fluorescence absorption and diffraction, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 68: 2467-2483.
- 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 A. Elsevier. ISBN: 0444897240.
- Mossop K.F., Davidson C.M. (2003) Comparison of original and modified BCR sequential extraction procedures for the fractionation of copper, iron, lead, manganese and zinc in soils and sediments, *Anal. Chim. Acta*, 478: 111-118.
- Okoro H.K. Fatoki O.S., Adekola F.A., Ximba B.J., Snyman R.G. (2012) A Review of Sequential Extraction Procedures for Heavy Metals Speciation in Soil and Sediments, *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*, Open Access Scientific Reports, <http://dx.doi.org/10.4172/scientificreports.181> (fecha de acceso 24/07/2014).
- Pardo R., Barrado E., Métodos de Reconocimiento de Pautas (Pattern Recognition) (1988) en Quimiometría, Blanco M. y Cerdá V (Eds.) Cuadernos de Ciencias y Técnicas Ambientales, Universitat Autònoma de Barcelona, ISBN: 8474883954.
- Pardo R., Vega M., Barrado E., Castrillejo Y., Prieto F. (2002) Mobility and chemical fractionation of heavy metals in solids originating from the ferrite process, *Quim. Anal.*, 20: 187-195.
- Pardo R., Helena B.A., Cazurro C., Guerra C., Debán L., Guerra C.M., Vega M. (2004) Application of two- and three-way Principal Component Analysis to the interpretation

- of chemical fractionation results obtained by the use of the B.C.R. procedure, *Anal. Chim. Acta*, 523: 125-132.
- Pardo R., Vega M., Debán L., Cazurro C., Carretero, C. (2008) Modelling of chemical fractionation patterns of metals in soils by two-way and three-way principal component analysis, *Anal. Chim. Acta*, 606: 26-36.
 - Pardo, R. (2010) Los metales pesados y el medio ambiente, *Alkaid*, 7: 36-43.
 - Pardo R, Vega M, Barrado E, Castrillejo Y, Sánchez I. (2013) Three-way principal component analysis as a tool to evaluate the chemical stability of metal bearing residues from wastewater treatment by the ferrite process, *J. Hazard. Mater.*, 262:71-82.
 - Pueyo, M., Mateu, J.; Rigol, A., Vidal, M., Lopez-Sanchez, J.F., Rauret, G (2008) Use of the modified BCR three-step sequential extraction procedure for the study of trace element dynamics in contaminated soils, *Environ. Pollut.*, 152: 330-341.
 - Quevauviller Ph., Rauret G., Griepink B. (1993) Single and Sequential Extraction in Sediments and Soils, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 51: 231–235.
 - Ramis G. y García M.C. (2001) Quimiometría. Editorial Síntesis. ISBN: 8477389047.
 - Rao C.R.M., Sahuquillo A., López Sánchez J.F. (2008) A review of different methods applied in environmental geochemistry for single and sequential extraction of trace elements in soils and related materials, *Water Air Soil Poll.*, 189: 291-333.
 - Rauret G., López-Sánchez J.F., Sahuquillo A., Barahona E., Lachica M., Ure A.M., Davidson C.M., Gomez A., Lück D., Bacon J., Yli-Halla M., Muntau H. and Quevauviller Ph. (2000) Application of a modified BCR sequential extraction (three-step) procedure for the determination of extractable trace metal contents in a sewage sludge amended soil reference material (CRM 483), complemented by a three-year stability study of acetic acid and EDTA extractable metal content, *J. Environ. Monit.*, 2: 228-233
 - Rauret, G (1998) Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment, *Talanta*, 46: 449-455.
 - Salman S.R., Y.H. (1999) Multivariate and principal component statistical analysis of contamination in urban and agricultural soils from north Jordan, *Environ. Geol.*, 38: 265-270.
 - Sierra M., Martínez F.J., Aguilar J. (2007) Baselines for trace elements and evaluation of environmental risk in soils of Almería (SE Spain), *Geoderma* , 139: 209-219.
 - Simeonov V. , Massart D.L., Andreev G., Tsakovski S. (2000) Assessment of metal pollution based on multivariate statistical modeling of 'hot spot' sediments from the Black Sea, *Chemosphere*, 41: 1411-1417.
 - Singh K.P., Malik A., Sinha S., Mohan D., Singh V.K. (2007) Exploring groundwater hydrochemistry of alluvial aquifers using multi-way modeling, *Anal. Chim. Acta*, 596: 171-182.
 - Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A. (2000) Principios de Análisis Instrumental, McGraw-Hill. 5ª Edición. ISBN 9788448127756.
 - Smolinski A., Walzak B., Einax J.W. (2002) Hierarchical clustering extended with visual complements of environmental data set, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.*, 64: 45-54.

- Subsecretaría de Recursos Hídricos (2008) Cuenca del río Quinto y arroyos menores de San Luis. Cuenca Nº 95. Secretaría de Obras Públicas de la república Argentina. http://www.hidricosargentina.gov.ar/documentos/referencias_i8/95_nueva.pdf (fecha de acceso: 30/07/2014).
- Sutherland R.A., Tack F.M.G., Tolosa C.A., Verloo M.G. (2000) Operationally Defined Metal Fractions in Road Deposited Sediment, Honolulu, Hawaii, *J. Environ. Qual.*, 29:1431-1439.
- Tessier, A., Campbell, P. G. C., Bisson, M. (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals, *Anal. Chem.*, 51: 844–851.
- Tokalioğlu S., Kartal S., Elçi L. (2000) Determination of heavy metals and their speciation in lake sediments by flame atomic absorption spectrometry after a four-stage sequential extraction procedure, *Anal. Chim. Acta*, 413: 33-40.
- Ure A., Quevauviller Ph., Muntau H., Griepink B. (1993) Improvements in the determination of extractable contents of trace metals in soil and sediment prior to certification, Report EUR 14763 EN. Commission of the European Communities, Cat No. CD-NA-14763-EN-C.
- Ure A.M., Rauret G., López-Sánchez F.J., Sauquillo A., Rubio R., Davidson C.M, Quevauviller Ph., (1999).Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials, *J. Environ. Monitor.*, 1: 57-61.
- Ure, A. M., Quevauviller, P., Muntau, H. and Griepink, B. (1993) Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 51(1–4), 135–151.
- USEPA (1994) Method 3051. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils, U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC. September 1994.
- UTE SINAE-ITSEMAP AMBIENTAL (1999) Estudio piloto para la determinación de los niveles fondo y niveles de referencia para metales en los suelos de la provincia de Valladolid. Junta de Castilla y León, Consejería de Medioambiente.
- Vandeginste B.G.M., Massart D.L., Buydens L.M.C., De Jong S., Lewi P-J., Smeyers-Verbeke J. (1998) Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part B. Elsevier. ISBN: 0444828532.
- Wang ZM., Chen LD., Zhang HP., Sun RH. (2014) Multivariate Statistical Analysis and Risk Assessment of Heavy Metals Monitored in Surface Sediment of the Luan River and its Tributaries, China, *Hum. Ecol. Risk Assess.*, 20: 1521-1537.
- Yan, S., Ling, Q. C., and Bao, Z. Y. (2007) Metals contamination in soils and vegetables in metal smelter contaminated sites in Huangshi, China, *B. Environ. Contam. Tox.*, 79: 361-366.

