



**Interacción atmósfera-hidrosfera: incidencia de los aportes atmosféricos y fluviales en la zona de influencia mareal del río Guadalquivir y estudio de la especiación química de contaminantes.**



*Tesis Doctoral*

*José Antonio López López  
- Cádiz 2010 -*



## TESIS DOCTORAL

---

---

*Interacción atmósfera-hidrosfera: incidencia de los aportes atmosféricos y fluviales en la zona de influencia mareal del río Guadalquivir y estudio de la especiación química de contaminantes*

---

---

*José Antonio López López*

*- Cádiz 2010 -*





***Interacción atmósfera-hidrosfera: incidencia de los aportes atmosféricos y fluviales en la zona de influencia mareal del río Guadalquivir y estudio de la especiación química de contaminantes***

Memoria presentada por el Licenciado en Química

D. José Antonio López López

para optar al grado de Doctor Europeo por la Universidad de Cádiz

Fdo.; José Antonio López López

La presente Tesis Doctoral ha sido dirigida por los doctores D. Carlos Moreno Aguilar, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz y D. Manuel García Vargas, Catedrático de Universidad del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz, y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente.

Puerto Real a 05 de Junio de 2010

Fdo. D. Carlos Moreno Aguilar

Fdo.: D. Manuel García Vargas





Dr. D MANUEL GARCÍA VARGAS, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

CERTIFICA: Que el presente trabajo, realizado en los laboratorios de los Departamentos de Química Analítica de la Universidad de Cádiz y de la Universidad de Lund, bajo la dirección conjunta de los Profesores Dr. D. Carlos Moreno Aguilar y Dr. D. Manuel García Vargas, reúne las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor Europeo en Química.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado, en Puerto Real a 05 de Junio de 2010

Fdo.: D. Manuel García Vargas



Parte de los trabajos descritos en la presente memoria se encuentran recogidos en las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos

### **Publicaciones:**

López-López, J.A.; Mendiguchía, C.; Pinto, J.J.; Moreno, C. (2010) *Liquid membranes as an analytical tool for the quantification and speciation of trace metals in natural waters*. Trends in Analytical Chemistry. Article in press

López-López, J.A.; García-Vargas, M.; Moreno, C. (2010) *A new contamination-free method for the determination for traces of anthropogenic silver in freshwaters*. International Journal of Environmental Analytical Chemistry. Article in press

López-López, J.A.; García-Vargas M y Moreno, C. *Application of cobalt as selective tracer for urban sewage in aquatic ecosystems*. En preparación.

López-López, J.A.; García-Vargas M y Moreno, C. *Application of liquid membranes to the chemical speciation of silver in natural waters*. En preparación.

López-López, J.A.; García-Vargas M y Moreno, C. *Chemometric-assisted study of atmospheric and fluvial pollutant inputs in the Guadalquivir River estuary*. En preparación.

López-López, J.A.; García-Vargas, M; Moreno, C. y Jönsson, J.A. *Determination of silver ultra-traces in natural waters by hollow fiber liquid membrane based technique*. En preparación.

López-López, J.A.; García-Vargas M y Moreno, C. *In-house validation of direct Cu and Mn determination by Atomic Absorption Spectrometry in estuarine waters: Comparison between longitudinal and transversal heating of the graphite furnace*. En preparación.

### **Congresos:**

*Chemometric-assisted study of atmospheric and fluvial pollutant inputs in the Guadalquivir River estuary*. López-López, J.A.; García-Vargas M y Moreno, C. Colloquium Chemiometricum Mediterraneum. Granada 21 a 24 de junio de 2010.



*Validación de la determinación directa de Cu y Mn en agua de estuario mediante GFAAS.* López-López, J.A.; García-Vargas M y Moreno, C. Reunión del Grupo Regional de la Sociedad Española de Química Analítica, Córdoba, 10 a 11 de junio de 2010.

*Application of cobalt as selective tracer for urban sewage in aquatic ecosystems.* López-López, J.A.; García-Vargas M y Moreno, C. SETAC, Science and Technology for Environmental Protection, Sevilla, 23 a 27 de mayo de 2010.

*Determination of silver ultra-traces in natural waters by hollow fiber liquid membrane based technique.* López-López, J.A.; García-Vargas, M; Moreno, C. y Jönsson, J.A. SETAC, Science and Technology for Environmental Protection, Sevilla, 23 a 27 de mayo de 2010.

*Identification of pesticides and emerging pollutants in river water and rainwater of the lower Guadalquivir River basin.* Fernández-Gómez, C.; Matamoros, V.; López-López, J.A.; Montoya, R.; Bayona, J.M. y Díez, S. X European Meeting on Environmental Chemistry, Limoges, 2-5 de diciembre 2009.

*Application of liquid membranes to the chemical speciation of silver in natural waters.* López-López, J.A; García-Vargas M y Moreno, C. Conference of the European Membrane Society, Montpellier, 6 a 10 de septiembre de 2009.

*Anthropogenic pollution assessment in the Guadalquivir River estuary using inorganic nutrients and carbon species as indicators.* López-López, J.A.; Moreno, C. y García-Vargas, M. XV Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica, San Sebastian, 19 a 21 de julio de 2009.

*Clean preconcentration of anthropogenic silver in natural waters by bulk liquid membranes.* López-López, J.A; García-Vargas M y Moreno, C. XII Jornadas de Análisis Instrumental, Barcelona, 21 a 23 de octubre de 2008.

*Medida directa de metales pesados (Cu y Mn) en aguas de estuario. THGFAAS vs LHGFAAS.* López-López, J.A., Mendiguchía, C.; Benítez, A., García-Vargas, M y Moreno, C. Reunión del Grupo Regional de la Sociedad Española de Química Analítica, Huelva, 12 a 13 de mayo de 2008.





Este trabajo ha sido financiado por:

PAI-RNM-0117



CTM2007-64678/TECNO





En estas líneas quisiera a mostrar mi agradecimiento a todas las personas que de algún modo u otro han influido en mí para que empezara a trabajar en el mundo de la investigación y a los que me guiaron en mis primeros pasos. Gracias a ellas puedo tener una opinión crítica de lo que significa, lo que me ha ayudado a afrontar los problemas que han surgido con serenidad. También quiero agradecer a todos los que han pasado por mi vida durante estos años, su contribución, no científica, sino personal, porque son parte responsable de que haya llegado hasta aquí.

A D. Carlos Moreno Aguilar, director de esta tesis, el haberme mostrado el camino que había de recorrer para llegar hasta aquí. Quiero darle las gracias por haber contado conmigo en todo momento y haberme hecho sentir parte integrante del grupo desde el primer día. Sobretudo darle las gracias porque lo que empezó con una llamada profesional termina con el abrazo de un amigo.

A D. Manuel García Vargas, también director de esta tesis, la confianza que ha depositado en mí para la realización de este trabajo, sus consejos y su interés en que tanto a nivel profesional como personal me haya sentido cómodo en todo momento. Gracias por su dirección en todos los trabajos que realizado en los laboratorios del departamento de Química Analítica.

Quiero dar las gracias a Dña. Carolina Mendiguchía Martínez por que siempre ha sido la guía, el referente en cada uno de los pasos seguidos durante estos cuatro años. Su amistad, su apoyo y su experiencia han significado un impulso en cada experimento, han marcado el camino a seguir y han supuesto un incentivo para dar el siguiente.

A D. Juan J. Pinto Ganfornina con el que he compartido especialmente mis últimos meses de laboratorio y que ha sabido tener la paciencia de escucharme al final de este proceso. Al que le debo su desinteresada participación e implicación, especialmente en cada muestreo, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible desarrollar este trabajo.

Gracias a D. Manuel Pedro Manuel Vez que ha sido un apoyo moral en cada momento de frustración, que ha sabido hacer más agradable cada minuto que hemos compartido juntos, que siempre ha tenido un valioso consejo que ofrecer y con el que colaborar en el laboratorio ha sido un placer.

A mis compañeros Cristina, Gemma, Juanjo, Mirella, Mostapha y a los que han pasado por “Los Mares”, porque han hecho cada minuto más agradable, porque aunque

no era fácil se han implicado en mi trabajo y porque han soportado largas peroratas de quejas y alegrías. Porque ha sido un placer compartir este tiempo con vosotros.

No me quiero olvidar de mis compañeros de “Ciencias”, Abdellah, Clara, Estrella, Hafida, Juan Verdugo, Loli, Marga, María José y Mariló. Con ellos he compartido parte de mi trabajo y siempre han supuesto una ayuda agradable en el laboratorio.

Quiero agradecer a D. Jan Ake Jonsson su acogida en el departamento de Química Orgánica de la Universidad de Lund y su dirección durante mi estancia allí. Quiero dar las gracias a mis compañeros Aiman, Azadeh, Lei Hong, Luke, Murtaza, Precious y Ricky que no me han permitido sentirme solo ni siquiera un instante, pero en especial a Ester, con quien he compartido todo lo bueno y lo malo que ha sucedido en Lund.

Gracias a D. Sergi Díez y a Dña. Cristal Fernández por su disposición y acogida en el Centro de Investigación Jaume Almera del CSIC, por su ayuda y sus consejos con los compuestos orgánicos y por haber hecho agradable mi estancia en Barcelona.

Un pilar importante en el desarrollo de esta tesis se soporta en la experiencia, los consejos y la amistad de Antonio Benítez que ha seguido de cerca el trabajo realizado y de cuya mano he aprendido a caminar en el mundo del análisis instrumental.

Tampoco hubiese sido posible llevar a buen fin un estudio de estas características sin la inestimable colaboración del personal de las embarcaciones AMA-VI y Dunas de Doñana, de la Policía de Aguas de la Junta de Andalucía. Especialmente por parte de Alfredo y Miguel, que siempre han ido un poco más allá con su ayuda y gracias a cuya colaboración todo ha sido más fácil.

A mis amigos y compañeros de fatigas Dani, Francis, Leandro y Raúl, con los que he compartido momentos buenos y malos, desde el día que decidimos estudiar Química hasta hoy. Con los que siempre he podido contar y que saben que siempre estaré ahí.

El más especial y sincero de los agradecimientos se lo debo a mi familia. A Ali, que significa todo lo que he podido desear en mi vida, que me escucha y comparte mis dudas, pero también mis alegrías, que hace que cada día tenga sentido levantarme para trabajar. A mi hermana y sobretodo a mis padres, que han creído en mí en todo momento, incluso cuando yo no lo he hecho, y que me han brindado la oportunidad de tener la vida que tengo.

*A Marta*









# Índice

<b>Objetivos</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo 1. Introducción</b>	<b>3</b>
<b>Contaminación de las aguas superficiales</b>	<b>3</b>
1. Factores naturales que afectan a la calidad de las aguas superficiales	5
1.1. Naturaleza de la cuenca:	6
1.2. Tiempos de residencia:	7
2. Factores antropogénicos que afectan a la calidad de las aguas naturales	7
2.1. Fuentes agrícolas de contaminación	7
2.2. Fuentes urbanas de contaminación	9
2.3. Fuentes industriales de contaminación	10
3. Contaminación atmosférica: deposición húmeda	11
<b>Uso de trazadores de actividades antropogénicas</b>	<b>13</b>
<b>Descripción del área de estudio</b>	<b>13</b>
1. Localización geográfica y usos de la tierra	13
2. Legislación aplicable	15
3. Calidad ambiental en la cuenca del Guadalquivir	17
3.1. Calidad de las aguas y sedimentos del río Guadalquivir	17
3.2. Efectos ecológicos de la contaminación de las aguas del río Guadalquivir	19
<b>Metodología analítica para la determinación de contaminantes en aguas naturales</b>	<b>19</b>
1. Toma y conservación de muestras	19
2. Preparación de la muestra	20
3. Etapa de cuantificación	21
3.1. Determinación de metales	22
3.2. Compuestos orgánicos	26
<b>Bibliografía</b>	<b>28</b>
<b>Capítulo 2. Validación de un método para la determinación directa de Cu y Mn en agua de estuario mediante espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito</b>	<b>35</b>
<b>Introducción</b>	<b>35</b>
1. Determinación de Cu y Mn mediante espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito	35
2. Validación de métodos analíticos	40
<b>Optimización del análisis de Mn y Cu</b>	<b>42</b>
1. Condiciones de atomización de Mn	43
2. Condiciones de atomización de Cu	46
3. Efectos de matriz para sistemas de calentamiento transversal y longitudinal	48
<b>Validación del método de determinación directa de Cu y Mn</b>	<b>51</b>
1. Confirmación de identidad	51
2. Selectividad y especificidad	53
3. Límites de detección y cuantificación	53
4. Intervalos lineal y de trabajo	55
5. Exactitud	56
5.1. Sesgo	56
5.2. Precisión	58
6. Sensibilidad	59
7. Robustez	59
8. Análisis de recuperación	60
9. Incertidumbre	61
9.1. Identificación de los focos de incertidumbre	62
9.2. Cuantificación de la incertidumbre en cada etapa del análisis	64
9.3. Cálculo de la incertidumbre combinada y expandida	66
9.4. Método de Kragten para el cálculo de la incertidumbre combinada	68

9.5.	Cálculo de la incertidumbre de la determinación de Cu y Mn en agua de estuario mediante (GFAAS)	71
9.6.	Contribución de los focos de $u_s$ a la $u_c$ de cada etapa del método analítico	74
9.7.	Estimación de la incertidumbre para el método de las adiciones patrón	75
9.8.	Comparación de la incertidumbre del método de la adición de patrón y calibración externa	77

**Bibliografía** **79**

**Capítulo 3. Fraccionamiento de Ag en aguas naturales sistemas de membrana líquida.** **83**

1.	Principios y fundamentos de las membranas líquidas	84
1.1.	Difusión:	85
1.2.	Reacción química:	86
2.	Tipos de transporte	86
3.	Clasificación de membranas líquidas:	87
3.1.	Membrana líquida de volumen	87
3.2.	Membrana líquida soportada	88
3.3.	Membrana líquida de emulsión:	89
4.	Aplicación de las membranas líquidas:	90
5.	Preconcentración de Ag en aguas naturales mediante membranas líquidas	92
6.	Uso de membranas líquidas en la especiación de metales en aguas naturales	95
6.1.	Especiación de cationes metálicos basada en su estado de oxidación.	96
6.2.	Especiación de complejos inorgánicos	96
6.3.	Especiación de la fracción biodisponible del metal	97
6.4.	Especiación de Ag en aguas naturales.	99

**Desarrollo de un sistema de membrana líquida para la determinación de Ag en aguas naturales.** **100**

1.	Extracción líquido-líquido	101
2.	Sistema de membrana líquida	104
2.1.	Membrana líquida de volumen	105
2.2.	Membrana soportada: configuración de fibra hueca	112

**Fraccionamiento de Ag en agua de estuario mediante membranas líquidas.** **118**

3.	Efecto de la materia orgánica disuelta sobre el transporte de Ag a través de membranas líquidas.	119
4.	Efecto de la salinidad sobre el transporte de Ag en membranas líquidas	121
5.	Efecto combinado de la materia orgánica y el cloruro sobre el transporte de Ag en membranas líquidas.	122
6.	Cálculos de especiación de Ag utilizando membranas líquidas en presencia de materia orgánica y cloruro.	123
7.	Cálculo de constantes de equilibrio mediante membranas líquidas	125

**Bibliografía** **128**

**Capítulo 4. Metodología de estudio de calidad de aguas en el estuario del río Guadalquivir.** **135**

**Diseño de las redes de muestreo** **135**

1.	Red de muestreo sistemático	136
2.	Red de muestreo puntual	136
3.	Selección de las estaciones de muestreo.	136
3.1.	Estaciones de muestreo del río Guadalquivir.	136
3.2.	Estaciones de muestreo de los ríos afluentes.	145
3.3.	Estaciones de muestreo selectivo.	147
4.	Periodicidad de los muestreos.	148
4.1.	Muestreo sistemático.	148
4.2.	Muestreo puntual.	149
5.	Selección de las variables utilizadas para determinar la calidad del agua.	149
5.1.	Variables físico-químicas:	150
5.2.	Nutrientes nitrogenados y fosforados:	150

5.3.	Carbono:	151
5.4.	Metales:	151
5.5.	Compuestos orgánicos:	151
<b>Metodología analítica</b>		<b>152</b>
1.	Toma de muestras	152
1.1.	Descripción de la toma de muestras	153
1.2.	Limpieza del material de muestreo	156
2.	Determinación de variables ambientales	159
2.1.	Parámetros físico-químicos:	159
2.2.	Sólidos en suspensión	159
2.3.	Nutrientes	160
2.4.	Carbono y nitrógeno total disuelto	162
2.5.	Metales	163
2.6.	Compuestos orgánicos	167
<b>Bibliografía</b>		<b>171</b>
<b>Capítulo 5. Distribución espacio-temporal de contaminantes en el estuario del río Guadalquivir.</b>		<b>174</b>
<b>Distribución de contaminantes</b>		<b>174</b>
1.	Variables físico-químicas	175
1.1.	Temperatura	175
1.2.	Salinidad	176
1.3.	pH	177
1.4.	Oxígeno disuelto	178
1.5.	Sólidos en suspensión	180
1.6.	Nutrientes	184
1.7.	Metales	195
1.8.	Carbono:	212
1.9.	Compuestos orgánicos	217
<b>Origen y carácter de la contaminación química en el estuario del río Guadalquivir.</b>		<b>225</b>
1.	Análisis de la varianza	226
2.	Análisis multivariante de los datos	238
2.1.	Análisis de correlación	238
2.2.	Análisis de componentes principales	239
2.3.	Análisis de conglomerados (AC)	249
<b>Uso de Co como trazador de actividades urbanas</b>		<b>257</b>
1.	Estudio de correlación	258
2.	Efecto de la contaminación proveniente del río Guadaira	258
3.	Análisis multivariante	259
4.	Cuantificación de la influencia urbana en la concentración de Co	260
<b>Bibliografía</b>		<b>263</b>
<b>Capítulo 6. Caracterización de la entrada de contaminantes por vía fluvial y atmosférica al estuario del río Guadalquivir. Estudios de predicción de la contaminación.</b>		<b>267</b>
<b>Aportes de contaminación fluvial y atmosférica.</b>		<b>268</b>
1.	Variables inorgánicas	269
2.	Sólidos en suspensión	274
3.	Variables orgánicas	275
<b>Carácter de los aportes fluviales y atmosféricos de contaminantes</b>		<b>280</b>
1.	Análisis discriminante	280
2.	Clasificación territorial del estuario del río Guadalquivir en base a sus aguas	282
3.	Carácter de los aportes de los ríos afluentes del estuario al Guadalquivir	288
4.	Carácter de la contaminación aportada por las lluvias	289
<b>Bibliografía</b>		<b>291</b>

<i>Conclusiones</i>	293
<i>English summary</i>	296
<i>ANEXO I</i>	355
<i>ANEXO II</i>	361
<i>ANEXO III</i>	375
<i>ANEXO IV</i>	379

## Objetivos

El objetivo del presente trabajo es evaluar la calidad de las aguas superficiales de estuario del río Guadalquivir, en base a sus aportes externos tanto de origen natural como antropogénico y relacionar la concentración y distribución de contaminantes ambientales con las distintas zonas de actividades humanas.

Para llevar esto a cabo se han establecido una serie objetivos particulares:

- Establecer el carácter trazador de contaminantes característicos de las distintas zonas de influencia antrópica a lo largo del estuario del río Guadalquivir, así como cuantificar la importancia de los aportes atmosféricos y sus ríos afluentes.
- Definir las características de las distintas entradas de contaminación fluvial y procedente de la precipitación atmosférica en zonas afectadas por las actividades humanas al estuario del río Guadalquivir.
- Optimizar metodología analítica para la determinación directa de metales pesados en aguas de estuario.
- Desarrollar métodos de análisis basados en membranas líquidas para la especiación de metales pesados en aguas de estuario.





## **Capítulo 1 .Introducción**

Con la intención de mejorar su calidad de vida, el hombre ha hecho uso del medio ambiente y de los recursos que éste le ofrece. Entre ellos se encuentra el agua, que es esencial tanto para la vida como para el desarrollo de actividades cotidianas de tipo doméstico, industrial, agrícola y de ocio.

Entre las fuentes de agua disponibles se encuentran las aguas superficiales y las procedentes de deposiciones atmosféricas. En el primer grupo están los ríos, en cuyas riberas el hombre ha establecido asentamientos urbanos desde la antigüedad. La interacción con estos sistemas ha sido siempre en un doble sentido, tanto para extraer el agua como para verter residuos que son arrastrados aguas abajo. En cuanto a la interacción con la atmósfera siempre ha existido de forma natural aunque ha sido mucho más intensa desde la Revolución Industrial.

Teniendo en cuenta que estos compartimentos ambientales forman parte del ciclo integral del agua no se pueden tratar de forma independiente (Figura 1-1). Por eso es necesario encontrar una forma de relacionar los datos existentes en los diferentes compartimentos y comprobar cuál es la interacción entre los mismos.

No se puede perder de vista que la calidad de un agua está relacionada con el fin para el que va a ser utilizada. De esta forma, al existir interconexión entre todos los compartimentos que forman el ciclo del agua existe un intercambio de contaminantes que puede llevar al empobrecimiento de su calidad, siendo de interés para este trabajo las vías de entrada correspondientes a las aguas superficiales.

### **Contaminación de las aguas superficiales**

La contaminación es la introducción en un sistema, de un agente que no es propio del mismo, o a niveles superiores a los naturales.

Los tipos de contaminación de las aguas naturales se suelen clasificar según su naturaleza en tres [1]:



Figura 1-1. Esquema del ciclo integral del agua

- Contaminación Química: que es la provocada por vertidos de distinta composición química que la del cauce receptor.
- Contaminación Física: que es debida a variaciones de temperatura y energía del agua.
- Contaminación Biológica: por la incursión de organismos vivos no autóctonos en los ecosistemas acuáticos.

La contaminación de las aguas superficiales de los ríos puede tener origen tanto natural como antropogénico. El primero se entiende por la existencia de procesos naturales que hacen disminuir la calidad de las aguas para su uso por el ser humano, mientras que el segundo responde a las actividades humanas cotidianas. Los ríos son sistemas con una gran capacidad de autodepuración, pero el vertido incontrolado de contaminantes sobre sus aguas puede llevar a situaciones que no pueden superar por sí mismos. Además, es necesario tener en cuenta las características de la cuenca que se estudia, ya que el contacto del agua con ésta puede ser tanto un amortiguador de la contaminación como un potenciador de sus efectos.

Es muy importante, por tanto, establecer una serie de herramientas que permitan realizar el control de la calidad de las aguas, de forma que se tenga un conocimiento lo más continuo posible, para determinar su estado general y las alteraciones que pueden

sufrir. Esto facilita la identificación de vertidos o fuentes de contaminación, así como la remediación de los problemas ambientales que se ocasionen, de manera más eficiente.

A pesar de su flujo continuo, se pueden apreciar distintas zonas con propiedades diferentes en los ríos. De entre éstas, los estuarios tienen un especial interés, ya que son las regiones de influencia mareal. En estas zonas de transición entre el mar y las corrientes continentales, existe una mezcla entre dos masas de agua de salinidad diferente y se producen gradientes muy importantes de variables físico-químicas como la fuerza iónica, la temperatura, la concentración de gases disueltos, el pH, el potencial rédox y el material particulado en suspensión. Además tienen lugar grandes cambios en la reactividad de muchas sustancias químicas y en los fenómenos de transporte entre los distintos compartimentos ambientales, por lo que la concentración de los mismos se ve muy afectada [2].

De este modo los contaminantes se comportan de distinta forma a lo largo de los diferentes tramos del río y no siempre tiene por qué cumplirse que su comportamiento sea conservativo en el estuario, es decir, la variación de su concentración puede deberse no exclusivamente a la dilución por la mezcla de dos masas de agua, sino que se puede ver afectada por fuentes externas.

Atendiendo a las distintas propiedades de los diferentes tramos del río: agua dulce, zona de mezcla (estuario) y agua de mar (desembocadura), hay que tener en cuenta las dificultades añadidas a la determinación de contaminantes en el mismo, debido a las diferentes matrices de las muestras que se deberán analizar y al amplio rango de concentraciones en que los contaminantes se encuentran.

De todo lo anterior se puede extraer que el control de la calidad y la gestión del agua de un río son herramientas fundamentales para mantener su buen estado, pero implican un gran esfuerzo tanto desde el punto de vista analítico como de infraestructuras, para poder ser desarrollados de forma adecuada.

### 1. Factores naturales que afectan a la calidad de las aguas superficiales

Es muy importante establecer cuáles son los factores naturales que afectan a la calidad del agua, porque permiten delimitar hasta qué punto la incidencia de contaminantes tiene origen antropogénico. En la mayoría de los casos, los sistemas estudiados ya han sido previamente modificados por el hombre y deberían ser comparados con sistemas de referencia establecidos, por ejemplo, en la Directiva Marco

del Agua (DMA) [2], que deben acercarse en la medida de lo posible al “muy buen estado químico, ecológico o hidromorfológico”. El hecho de tener que recurrir a sistemas de referencia explica porqué es fundamental entender cuál es el estado de contaminación natural de un río, ya que si este no se establece correctamente, no se podrá determinar qué proporción tiene origen en las actividades humanas.

Según Bricker y Jones [4], los dos factores naturales que afectan de forma más importante a la calidad del agua son la naturaleza de la cuenca y el tiempo de residencia.

### 1.1. Naturaleza de la cuenca:

Hay que tener en cuenta su geología, que va a condicionar el contenido mineral del río, su biología y la interacción con la atmósfera, que siempre está en contacto con las aguas superficiales. Todas van a ser vías de degradación o aporte de contaminantes:

- Geología: es la característica que más importancia tienen en el grado de mineralización de las aguas naturales debido a la erosión que éstas van causando sobre las rocas del lecho de los ríos. Por ejemplo, Guyot y col. [5] pusieron de manifiesto la importancia del recorrido geológico del río Amazonas y utilizando diagramas de Piper establecieron sus características minerales a lo largo de su cauce como estimador de la calidad del agua.
- Biología: influye en gran medida en su capacidad de autodepuración, ya que de la presencia o no de organismos capaces de degradar ciertas especies químicas va a depender la calidad del agua. Por ejemplo, la degradación de alquilbencenosulfonatos lineales gracias a los microorganismos presentes en el sedimento, puede llegar a su mineralización y como consecuencia a su retirada del medio [6].
- Atmósfera: existe un importante intercambio de sustancias entre ésta y el medio acuático, tanto desde ella, por deposición seca y húmeda como hacia ella, por la fuga de gases y otras sustancias volátiles e insolubles que escapan al aire. Morales-Baquero y col.[7] pusieron de manifiesto la importancia de los aportes atmosféricos de N y P en Sierra Nevada (España), relacionándose el primero con las deposiciones húmedas y el segundo con la deposición seca, asociado al material particulado procedente de los vientos saharianos.

## 1.2. Tiempos de residencia:

Harán que el agua que interaccione con un material determinado, vea modificada su composición en mayor medida cuanto más tiempo interaccione con ese material, hasta llegar al equilibrio. Estos tiempos de residencia pueden ser estimados, por ejemplo, mediante métodos basados en balances de masa.

Estos dos factores no son independientes de la actividad antropogénica, ya que la extracción mineral y la introducción o eliminación de organismos en el agua puede contribuir a una fácil degradación o a un aumento del efecto de los contaminantes en el medio. La mano del hombre también afecta a los tiempos de residencia, mediante la construcción de presas y embalses que hacen que el agua pueda estar en contacto durante mucho tiempo con los contaminantes.

## 2. Factores antropogénicos que afectan a la calidad de las aguas naturales

La relación del hombre con el agua puede ser de dos tipos según el uso que de ella se hace. De este modo encontramos usos consuntivos en los que las propiedades del agua varían una vez que el hombre la ha utilizado, o no consuntivos, en los que las propiedades del agua permanecen inalteradas. Podemos decir que los usos consuntivos son los que van a provocar el vertido de un agua de peor calidad sobre el río o el sumidero correspondiente, y pueden tener distinto origen según la actividad humana en la que se han utilizado, siendo habituales la agricultura, el consumo urbano y la industria, donde se engloba la minería.

En este sentido hay que distinguir la contaminación difusa de la puntual. La primera es la que no tiene un origen bien definido, sino que se encuentra extendida a lo largo de zonas continuas, como la agricultura. La segunda es la que tiene un origen localizado, por lo que sus focos son más fáciles de identificar, por ejemplo los vertidos industriales.

### 2.1. Fuentes agrícolas de contaminación

Es importante tener en cuenta que la agricultura está íntimamente ligada a los recursos hídricos, y por tanto en el margen de los cursos de agua se pueden encontrar innumerables extensiones de campos de cultivo cuyas escorrentías van a los ríos. En

estos vertidos es muy frecuente encontrar elevadas concentraciones de nitratos y fosfatos, que se utilizan como fertilizantes en sus distintas formas químicas así como de otros productos químicos utilizados como plaguicidas o procedentes de la degradación de los mismos. Uno de los principales inconvenientes que presentan es que suelen ser fuentes de contaminación difusa y por lo tanto sus focos suelen ser difíciles de localizar.

Balls y col. [8] realizaron un estudio en varios ríos escoceses en los que determinaron que el aporte de contaminantes, principalmente nutrientes, desde los campos de cultivo en los márgenes de los ríos es importante. Además concluyeron que la estacionalidad influye en las concentraciones de contaminantes en los estuarios, siendo su comportamiento conservativo en invierno y verano, pero desviándose de este ideal en primavera. Por otro lado, Khai y col. [9] describieron la agricultura intensiva en Hanoi (Vietnam) como una fuente potencial de nutrientes y elementos tóxicos, apuntando además, que en zonas agrícolas que se encuentran aguas abajo de asentamientos urbanos, las aguas de riego contienen los contaminantes propios de las ciudades y que al pasar por los cultivos se enriquecen en sustancias indeseables y producen vertidos con una mayor carga contaminante.

En cuanto a los efectos que pueden tener estos compuestos químicos en el estado de las aguas cabe destacar que tanto nitratos como fosfatos son nutrientes que provocan eutrofización, aunque este problema se da en general en aguas estancadas.

Por otro lado, los plaguicidas que se utilizan en agricultura pueden tener efectos perjudiciales sobre la biota del sistema acuático, siendo en ocasiones sus productos de degradación incluso más peligrosos, estando varios de ellos incluidos en la lista de compuestos orgánicos persistentes (COPs) elaborada según el Convenio de Estocolmo de 2001 [10]. Power y col. [11] determinaron entre 1988 y 1997, que la disminución de la concentración de lindano en el estuario del río Támesis fue del 73% llegando a bajar hasta valores de  $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , mientras que para otros pesticidas como simazina y atrazina, la disminución ha sido superior al 90%, y las concentraciones registradas se mantienen entre  $120$  y  $170 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Esto pone de manifiesto el interés en reducir el uso de estos compuestos peligrosos.

Algunos de estos compuestos reaccionan con la materia orgánica presente en las aguas dando lugar a otros subproductos que pueden ser más peligrosos aún o llegando a su degradación total. Hasset [12] establece la existencia de una serie de reacciones de fotodegradación que tienen lugar gracias a la formación del singlete  $^1\text{O}_2$  que tiene una

elevada reactividad y es capaz de atacar a los compuestos orgánicos. Además indica que los ácidos húmicos se comportan como una trampa para este tipo de sustancias.

## 2.2. Fuentes urbanas de contaminación

La contaminación de origen urbano es la procedente principalmente de los residuos domésticos, aunque también se pueden incluir aquí las pequeñas industrias que se encuentran englobadas en los núcleos de población. En España, todas las poblaciones, o núcleos urbanos de más de 20.000 habitantes deben contar con una estación depuradora de aguas residuales urbanas (EDARU) antes de 2010 [2], para minimizar el aporte de contaminantes procedentes de las ciudades [13].

Como contaminantes habituales en zonas urbanas cabe destacar la presencia de algunos metales pesados como Mn y Co [14] que presentan máximos de concentración en zonas de influencia urbana en el río Guadalquivir, alcanzando concentraciones de hasta  $135 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para el Mn y de  $430 \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  para Co. Por otro lado, Sañudo-Wilhelmy y Flegal [15] encontraron concentraciones de entre 1 y 18 pM de plata, asociada a actividades urbanas en la Bahía de San Francisco, donde también determinaron que elevadas concentraciones de Ag con respecto al Pb sugerían una mayor introducción debida a efluentes urbanos respecto a las aguas naturales. Soto-Jiménez y Flegal [16] establecieron que la mayor influencia sobre la concentración de plomo en la región del Golfo de California es debida a actividades urbanas y agrícolas, así como a emisiones procedentes de EE.UU. La presencia de estos metales en las zonas próximas a las ciudades se relaciona en ocasiones con la baja eficiencia de los procesos de eliminación utilizados en las EDARUs [17].

También es importante destacar el papel que juegan en estas zonas los nutrientes nitrogenados, entre los que es característico el comportamiento del amonio, para el que Ahad y col. [18] determinaron concentraciones de hasta  $1700 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4^+$  debidos a obras en la ribera del río *Tyne*. En ese mismo trabajo determinaron un comportamiento conservativo del  $\text{NO}_3^-$  en la zona estuárica, por lo que no cabe esperar ninguna entrada externa de este nutriente al río. Por el contrario Shirasuna y col. [19] determinaron que el nitrato presenta una influencia urbana muy importante, al igual que el amonio en la escorrentía urbana de *Tsukuba* (Japón), ofreciendo concentraciones mayores en la fase disuelta que en la particulada. Otro indicador de actividad urbana es la materia orgánica, que se puede determinar como carbono orgánico disuelto (COD) y que se relaciona de



forma especial a las actividades domésticas. Por ello, en lugares turísticos como la Amazonia argentina se han descrito aumentos de 3 a 9 mg·L<sup>-1</sup> en épocas de afluencia turística [20]. En este caso, también se determinaron incrementos de la concentración de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> desde 7 a 22 µg·L<sup>-1</sup> por el mismo motivo. La relación entre estos contaminantes es importante, ya que el amonio es generado en la descomposición anaerobia de materia orgánica y se oxida a nitrato pasando por nitrito, mediante procesos de nitrificación.

En los últimos tiempos también se han identificado algunos compuestos orgánicos de uso doméstico en los cursos de agua cerca de las ciudades, destacando, por ejemplo, medicamentos de uso común como el ibuprofeno, que ha sido encontrado en concentraciones de entre 0,2 y 0,7 µg·L<sup>-1</sup> en agua de efluentes de depuradora o sustancias de consumo habitual como la cafeína, a niveles de hasta 50 µg·L<sup>-1</sup> [21]. También es posible encontrar compuestos orgánicos biocidas como triclosan, que se utiliza en dentríficos y otros productos de aseo personal; Hua y col., [22] analizaron concentraciones de este compuesto de 60 ng·L<sup>-1</sup> en aguas naturales, atribuyéndolo al uso doméstico.

### 2.3. Fuentes industriales de contaminación

Son fuentes de contaminación puntual y por tanto más fácilmente localizables, pero además su identificación se simplifica debido a que los contaminantes que vierten son muy característicos, pudiendo determinarse cuál es el tipo de industria del que procede un determinado residuo con cierta facilidad.

Los vertidos industriales tienen como característica principal la descarga de efluentes enriquecidos en un determinado contaminante, que puede dar lugar a efectos catastróficos desde el punto de vista ecológico, incluso a pequeñas concentraciones. Otro tipo de contaminación industrial distinto es la contaminación física, que se produce generalmente por el vertido de aguas de refrigeración, con el consiguiente calentamiento de los cursos naturales.

Dentro de este tipo de actividad es muy destacable el papel que la minería ha jugado en la contaminación de las aguas por metales pesados. En este sentido Moore y Luoma [23] clasifican en tres los tipos de contaminación generada por la extracción de metales a gran escala:

- Residuos producidos durante la explotación, la molienda y fundición y que son depositados cerca de la fuente de origen.
- Efectos producidos en suelos, atmósfera, ríos, aguas subterráneas, etc., como consecuencia del transporte de contaminantes generados en el lugar de explotación a través de corrientes de aguas o de la atmósfera.
- Removilización de contaminantes a muchos kilómetros de distancia de la fuente.

Por ejemplo, el estuario de los ríos Tinto y Odiel que nacen en la zona minera de Ríotinto (España), presenta una elevada contaminación de Fe, As, Zn, Cd, Pb y Cu tanto en el agua como en el sedimento [24]. Además su biodisponibilidad, ha sido demostrada utilizando órganos diana en peces, siendo Cu y Zn los que mayores concentraciones han mostrado en los tejidos estudiados [25], lo que hace que sus efectos sobre la cadena alimentaria deban ser tenidos muy en cuenta.

### 3. Contaminación atmosférica: deposición húmeda

El otro compartimento ambiental estudiado dentro del ciclo del agua en este trabajo corresponde a la deposición húmeda de contaminantes atmosféricos. Es muy importante destacar que la principal diferencia con el agua superficial de los ríos es que en la atmósfera no existe una frontera física que permita aislar una región en particular, por lo que la deposición de contaminantes lejos de los puntos de emisión es frecuente. Por lo tanto, este estudio se ha basado en el aporte directo de contaminantes desde la lluvia a los ríos.

En este sentido existen dos vías principales de entrada de estas especies al agua superficial, la precipitación directa y la escorrentía tanto superficial como subterránea. Así, dependiendo de la zona de estudio, la intensidad de la lluvia y el periodo seco previo, el peso de una u otra en el aporte de contaminantes será distinto [26, 27].

En general la composición del agua de lluvia se encuentra dominada por aniones inorgánicos como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ , y  $\text{Cl}^-$ , aunque en zonas de elevada influencia urbana o industrial es posible encontrar también cationes como  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{H}^+$  a concentraciones comparables, lo que en circunstancias incontroladas puede llevar a problemas de lluvia ácida [28]. Además, los niveles de nitrógeno, carbono orgánico y fósforo son en general

elevados [29], dando lugar a concentraciones de  $\text{PO}_4^{3-}$  de entre 0,063 y 0,220  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 0,36 y 4,1  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de nitrógeno total o 1,2 y 7,5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de COD.

Los metales pesados presentes en las partículas atmosféricas tienen una gran movilidad, debido al efecto de las corrientes de aire. Durante la precipitación, las partículas son arrastradas por la lluvia al mismo tiempo que los metales son lixiviados. Por eso, desde hace 40 años, los esfuerzos para reducir las emisiones atmosféricas han llevado a una disminución de la concentración de estos contaminantes. Esto se refleja en trabajos como el realizado por Berg y col., [30] que determinaron una reducción de la concentración de Cd y Pb del 87% y 90% respectivamente en el agua de lluvia en Noruega. Este descenso en la concentración de Pb es atribuido a que ya no se utiliza como aditivo en combustibles. Por otro lado, Rülhing y Tyler [31] también observaron una reducción de la concentración de Cd, Cu, Zn y Pb en la precipitación como consecuencia del descenso de emisiones de polvos metálicos en la industria del metal desde 1975.

En zonas urbanas la principal vía de entrada de nutrientes como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  o  $\text{NH}_4^+$  es el aporte directo desde el agua de lluvia [32], mientras que el aporte de metales pesados es tanto directo como por escorrentía [33]. En áreas urbanizadas próximas a la costa oeste francesa se han determinado, por efecto del tráfico en las proximidades del Canal de la Mancha, concentraciones medias de Cd, Pb, Cu y Zn del orden de 0,08; 0,9; 1,7 y 11,6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en agua de lluvia, que en el caso de Pb y Zn superan las determinadas para las aguas superficiales del estuario del río Guadalquivir [14, 34]. En cuanto a la escorrentía urbana, existen precedentes de su aporte de metales como Mn, Zn y Pb, que dan lugar a un enriquecimiento en los cauces de los ríos [35].

En zonas agrícolas el aporte es fundamentalmente desde la escorrentía y el lavado de los suelos, siendo muy importante el aporte de sólidos en suspensión, que siempre está acompañado de un aumento de la concentración de contaminantes que son transportados en la fase particulada. En este sentido un análisis de los suelos resulta fundamental para completar el estudio del ciclo integral del agua. Por ejemplo, Packett y col. [29] llegaron a determinar concentraciones de 12  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de sólidos en suspensión totales (SST) por efecto de la escorrentía en los ríos que fluyen hacia la Gran Barrera de Coral (Australia). Por otro lado, esta vía de entrada tiene gran peso en la concentración de nitrógeno y fósforo a las aguas superficiales [36]

## Uso de trazadores de actividades antropogénicas

Se define como trazador de una determinada actividad a una especie química cuya presencia en un cierto intervalo de concentraciones permite establecer que procede de un vertido debido a dicha actividad.

Desde este punto de vista, se trata de identificar y cuantificar estas especies, características de las actividades humanas, para poder localizar las fuentes de contaminación de un curso de agua en sus márgenes e incluso a distancias importantes, desde las que por fenómenos de transporte llegan a los ríos. Hay que tener en cuenta que el uso de un determinado elemento como trazador va a depender de las características geológicas de la cuenca objeto de estudio. Lo ideal es utilizar como trazador un elemento que se encuentre en baja concentración de forma natural, de modo que las variaciones en su concentración puedan atribuirse únicamente a las actividades antropogénicas.

La caracterización de distintas zonas de un cauce en base a las diferentes especies químicas contaminantes que se encuentran a lo largo del mismo resulta de utilidad para identificar sus fuentes de contaminación características [14].

Bhatt y Gardner [37] utilizaron el descenso de pH y oxígeno disuelto para estudiar el empobrecimiento de la calidad del agua en zonas urbanas debido a un exceso de materia orgánica, cuya degradación supone un consumo de  $O_2$  y una producción mayor de  $CO_2$ . Para otros contaminantes como los nutrientes nitrogenados se pueden dar situaciones que no permitan determinar de forma clara su origen. Así  $NO_3^-$  y  $PO_4^{3-}$  se pueden mostrar indefinidos entre zonas agrícolas y urbanas [38, 39].

En el caso de los metales pesados pueden existir distintos focos de contaminación dependiendo de la zona de estudio, y se pueden encontrar diversos estudios en los que son aplicados como trazadores [40, 41].

## Descripción del área de estudio

### 1. Localización geográfica y usos de la tierra

El presente estudio se ha realizado en la zona de influencia mareal del río Guadalquivir, que se encuentra limitada en su parte superior por la presa de Alcalá del río y la desembocadura del río en Sanlúcar de Barrameda en su parte inferior (Figura 1-2).

Desde su parte más alta y a lo largo de sus primeros veinte kilómetros, el estuario atraviesa una zona agrícola salpicada de pequeñas poblaciones. A partir de aquí se introduce en el área de influencia de la ciudad de Sevilla (700.000 habitantes) [42]. Aguas abajo de esta zona, el río se adentra de nuevo en una región cuyos márgenes están dominados por cultivos de cereales. Avanzando hacia la desembocadura y manteniendo el carácter agrícola de la zona, el río experimenta un cambio en su salinidad en las proximidades del Brazo del Este (50 Km. desde la cabecera del estuario), que se debe a la mezcla de agua de mar y fluvial, por lo que a partir de este punto se puede considerar como estuario desde el punto de vista químico. Posteriormente, al término de esta zona se encuentra el Parque Nacional de Doñana que coincide con la desembocadura del río en Sanlúcar de Barrameda.

Durante este recorrido, el río Guadalquivir se ve afectado por el aporte de varios afluentes (Figura 1-3). Siguiendo con el trazado desde la cabecera a la desembocadura, el primero que se encuentra es el río Rivera de Huelva, de marcado carácter agrícola y que es la única entrada de agua exterior al mismo anterior a Sevilla. Dentro de la zona urbana se puede considerar también como afluente la dársena del río, por ser un brazo de agua distinto al de su curso natural y que a priori puede tener importancia debido a su clara localización urbana y al tránsito de grandes buques que sufre.

Avanzando en el estuario y ya en la zona agrícola se localiza el río Guadaira, que trae las aguas depuradas de la zona este de Sevilla, su interés reside en que se presenta como un potencial vehículo de residuos urbanos, no eliminados, al río Guadalquivir. El último afluente que se tiene en cuenta en este trayecto es el río Guadiamar, que desemboca en la zona estuárica del río y que ha tenido gran impacto social desde que en 1998 se produjera el accidente minero de los Frailes. Actualmente se ha construido un corredor verde en la zona afectada y la desembocadura al río Guadalquivir está influenciada de forma importante por el cultivo de cereales y la presencia de piscifactorías.

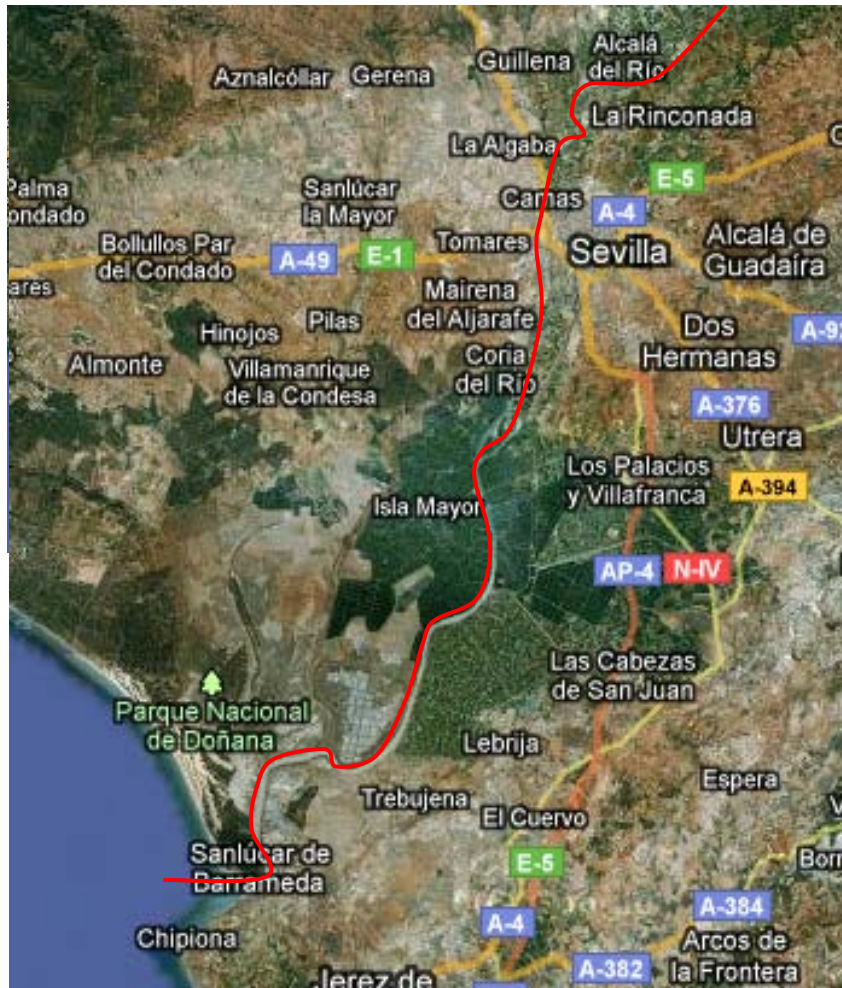


Figura 1-2. Estuario del río Guadalquivir.

En cuanto a la climatología se puede considerar que existen dos estaciones anuales desde el punto de vista de las precipitaciones, una seca que comprende los meses desde abril a septiembre y otra húmeda de octubre a marzo que presentan unos datos pluviométricos medios de entre 500 y 700 mm al año [43]. Además de las lluvias, el caudal del río en esta región se ve afectado por la apertura de la presa de Alcalá del Río que tiene lugar al menos dos veces al año, una en abril y otra en noviembre y que tiene una capacidad de 21 Hm<sup>3</sup> según la Agencia Andaluza del Agua [44].

## 2. Legislación aplicable

Como se ha comentado anteriormente existe un marco legislativo que viene dado desde la Unión Europea al que se deben adaptar todos los países miembros de la misma y que hace referencia a la calidad de las aguas y al uso que de ellas se hace.

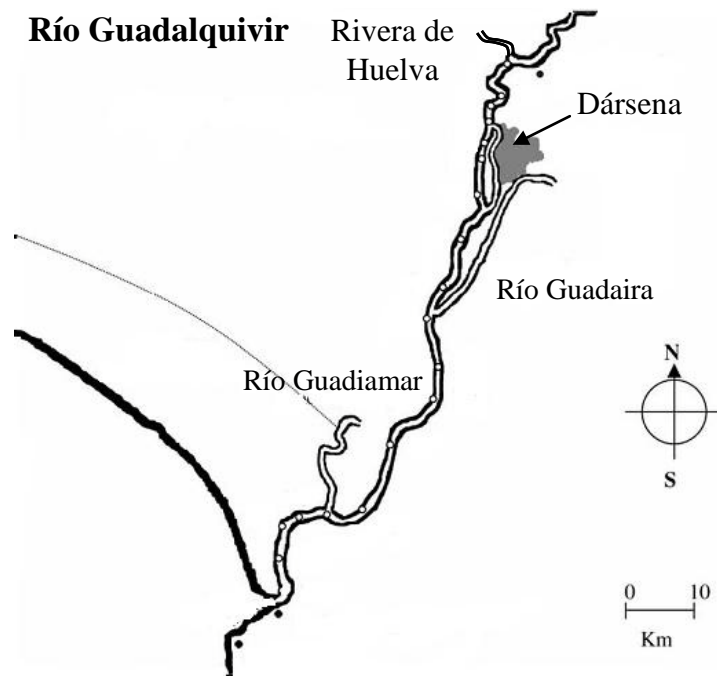


Figura 1-3. Afluentes del río Guadalquivir en su estuario.

En primer lugar la Directiva Marco del Agua (DMA) [3] tiene como primera consideración establecer que el agua no es un bien comercial, sino un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal y presenta como objetivo el establecimiento de un marco para la protección de la misma, que prevenga todo deterioro adicional y proteja y mejore el estado de los ecosistemas acuáticos. También contempla que se haga un uso sostenible del agua y se favorezca la reducción progresiva de emisiones contaminantes.

Una de las partes importantes de esta normativa es la definición de buen estado químico de las aguas, para lo que es imprescindible el control de la calidad de las mismas, por lo que se establecen una serie de variables a tener en cuenta y que se clasifican en una lista de los principales contaminantes de las aguas (ANEXO VIII de la DMA 2000), donde se encuentran los compuestos organofosforados, sustancias tóxicas persistentes y bioacumulables, materia en suspensión, nutrientes y metales. Para ciertos metales como Zn, Cu, Ni, Pb, Co y Ag no existe un nivel máximo permisible descrito en la normativa [45].

Esta normativa europea encuentra su transposición en España en el Texto Refundido de la Ley de Aguas [13] y la ley 62/2003 que lo modifica [46]. Además se establecen en el RDL140/2003 [47], los criterios sanitarios de la calidad de aguas de consumo. En este marco se determinan los contaminantes que deben ser analizados de

forma rutinaria en las aguas y entre ellos se encuentran metales como Cd, Cu, Mn, Ni y Pb; nutrientes como  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NH}_4^+$  y compuestos orgánicos utilizados como plaguicidas.

Por último, aparece una transposición de las normas anteriores a la Comunidad Autónoma Andaluza en la que se presentan los mismos objetivos planteados por la DMA, así como los mismos caminos para cumplirlos (Ley 7/2007) [48]. Además desde 2007 existe la Agencia Andaluza del Agua que tiene todas las competencias en cuanto a la Cuenca del Guadalquivir se refiere y que es dependiente de la Junta de Andalucía.

### 3. Calidad ambiental en la cuenca del Guadalquivir

El control de la calidad ambiental de las aguas del río Guadalquivir se realiza de forma periódica gracias al Plan de Policía del Agua establecido por la Junta de Andalucía, siendo la zona de mayor aplicación la estuárica. Para poder tener una idea del estado, previo a este estudio, de la calidad de las aguas del río Guadalquivir, se ha realizado una revisión de la evolución de su contaminación y de los sedimentos, así como del efecto que ésta tiene sobre diversos organismos utilizados como biomarcadores.

#### 3.1. Calidad de las aguas y sedimentos del río Guadalquivir

La calidad del agua en el estuario del Guadalquivir y su control ha evolucionado con la aplicación de la nueva legislación estatal [13] y las normativas europeas [2]. Cabrera y col., [49] realizaron el estudio de contaminación por metales pesados (Fe, Cu, Mn, Pb y Zn) en el estuario del Guadalquivir, en el periodo 1978-1984, cuando no existían estas normativas, encontrando, con las técnicas analíticas disponibles en ese momento, que sus aguas se veían afectadas por el transporte de metales pesados y otros contaminantes desde el río Guadiamar, destacando el vertido de aguas fecales desde pequeñas poblaciones y el aporte de alpechín desde plantas productoras de aceite de oliva.

La explotación minera de Los Frailes ha centrado la atención de la mayoría de trabajos realizados sobre este ecosistema desde que en 1998 tuviera lugar el vertido incontrolado de lodos de minería, que fueron transportados por el río Guadiamar hasta el Guadalquivir. La influencia de este vertido en la concentración de metales pesados sobre el río Guadalquivir fue recogida por Gómez-Parra y col. [50], que estudiaron los



mismos metales que Cabrera y col., [49] además del Cd y establecieron que los niveles metálicos más elevados eran registrados con bajamar, por lo que el comportamiento de éstos no es conservativo, sino que tiene origen aguas arriba del río y desde el río Guadamar. Por otro lado, Achterberg y col. [51] determinaron que la influencia de este vertido dejó de tener un efecto significativo en el estuario del Guadalquivir desde seis meses después del mismo, por lo que los niveles de concentración son los propios del río.

Siguiendo en esta línea, Riba y col. [52] realizaron el estudio de metales pesados en sedimentos procedentes de esta zona. A pesar de encontrar concentraciones elevadas de Cu y Pb, pudieron determinar que su origen no estaba en el vertido minero a la vista de su gradiente de concentración con respecto a la profundidad del sedimento. También en esta zona se han descrito elevadas concentraciones de Cd y Zn, pero en niveles que no representan un riesgo ecológico inmediato, aunque pueden tener influencia a largo plazo [53]. Meharg y col. [54] llevaron a cabo el análisis de Pb en el río Guadamar y una serie de estaciones de muestreo correspondientes al Parque Nacional de Doñana, del que es frontera natural, para determinar que los efectos del derrame de los lodos de la mina afectaron únicamente a la zona de Entremuros, desde donde tuvo lugar el vertido.

Menos son los trabajos en los que se ha evaluado la calidad de las aguas y el origen de los contaminantes que en ellas aparecen. En este sentido, Mendiguchía y col. [41] realizaron el estudio de distribución de contaminantes inorgánicos en el río Guadalquivir llegando a establecer tres zonas diferentes según las fuentes de contaminación; definiendo una parte urbana caracterizada por Mn y nutrientes nitrogenados, un área agrícola caracterizada por sólidos en suspensión y fosfato y una última zona que se corresponde con la desembocadura, donde se muestran como variables dominantes Cu, pH y oxígeno disuelto. Posteriormente se evaluó la influencia de diversos metales pesados (Mn, Cu, Pb, Ni, Zn, Cd y Co) y su distribución en este sistema, confirmando la división anterior [14]. En cuanto a la contaminación por materia orgánica, Espigares y col. [55] realizaron un estudio que permitió relacionar altos niveles de carbono orgánico disuelto con la presencia de vertidos urbanos sin depurar.

### 3.2. Efectos ecológicos de la contaminación de las aguas del río Guadalquivir

De nuevo, al igual que para el establecimiento de la calidad ambiental del estuario del río Guadalquivir, la mayoría de los trabajos realizados se centran en la zona influenciada por el desastre de las minas de Aznalcóllar. En los meses posteriores al vertido minero, se llevaron a cabo diversos estudios sobre los efectos de la creciente contaminación de metales en aguas y sedimentos, así como sobre la micro [56] y macrofauna [57] autóctona, determinando que se puede utilizar la especie de ostra *Crassostrea angulata* como bioindicador de contaminación por Zn. Posteriormente, Riba y col. [58] estudiaron los efectos tóxicos de los sedimentos contaminados por este episodio, llegando a la conclusión, de que las acciones llevadas a cabo para la limpieza y descontaminación de la desembocadura del río Guadiamar minimizaron la toxicidad de los mismos, por lo que la entrada de estos metales no debe suponer un riesgo para la vida en el río Guadalquivir.

También se evaluaron los efectos de metales pesados como el Pb sobre las aves que habitan la zona de marismas del Guadalquivir [59], que ha mostrado tener una gran influencia sobre la población de águilas imperiales en este área.

#### Metodología analítica para la determinación de contaminantes en aguas naturales

Dependiendo de la naturaleza y concentración de los contaminantes presentes en las aguas naturales es necesario utilizar una metodología analítica distinta. Esto implica desde la preparación del material hasta la determinación final de la concentración de analito. En este sentido es necesario desarrollar protocolos de actuación que permitan garantizar la calidad de los resultados obtenidos. Así por ejemplo, no será lo mismo determinar concentraciones de sólidos en suspensión totales del orden de los  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  que realizar el análisis de ultratrazas ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) metálicas como en el caso de Ag.

##### 1. Toma y conservación de muestras

En primer lugar hay que cuidar la preparación del material, que es de crucial importancia cuando se quieren analizar especies químicas que se encuentran a bajos niveles de concentración, por lo que la selección del mismo es muy importante, ya que puede dar lugar bien a contaminación de las muestras o bien a pérdida del analito

durante su conservación [60]. También es muy importante el área de trabajo, ya que puede suponer una sobreestimación de la concentración cuando se trabaja con bajas concentraciones. Mendiguchía [61] comprobó la variación de los límites de detección del proceso de extracción líquido-líquido de ultratrazas de metales con APDC/DDDC en distintos ambientes de trabajo, alcanzando reducciones considerables de la señal del blanco para Pb y Zn trabajando dentro de una sala blanca.

La etapa de toma de muestra presenta también una serie de características que hacen que sea muy importante que el personal que la realiza esté perfectamente entrenado y sea consciente del tipo de análisis para el que las muestras van a ser utilizadas, ya que si el muestreo no se realiza de forma correcta, no se puede confiar en la calidad de los resultados ofrecidos [62].

En cuanto a la conservación de las muestras también depende del nivel de concentración y características de los analitos, pero de forma general el tipo de preservación puede ser según resumen Sliwka-Kaszynska y col. [63]:

- Física: cuando no se introducen aditivos que estabilicen al analito, sino que se realiza una operación como congelación o protección contra la luz. Esto es común cuando se realizan estudios de especiación, nutrientes o materia orgánica.
- Química: cuando se introduce un aditivo que estabiliza al analito, como en el caso de la acidificación de las muestras para análisis del contenido total de metales.
- Físico-química: en este caso se realiza un pretratamiento de la muestra y se consigue un extracto de forma que éste es fácilmente almacenable hasta el momento del análisis. Esto ocurre con la determinación de compuestos orgánicos.

## 2. Preparación de la muestra

Uno de los factores que afecta de forma más importante a la determinación instrumental de los contaminantes es la matriz de las muestras, ya que cuando se trabaja con aguas salinas como son las de estuario y de mar, suele ser necesario separar los analitos de la matriz. Por ejemplo, para la determinación de metales pesados, es muy habitual el uso de la extracción líquido-líquido [64], siendo la más utilizada la

desarrollada por Bruland y Franks [65] para la determinación de Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Ni, Ag y Zn en aguas naturales con APDC/DDDC. Una alternativa más rápida, que permite un menor uso de reactivos y por tanto más limpia es la extracción en fase sólida, empleada de forma general para la preconcentración de compuestos orgánicos. Díez y col., [66] determinaron compuestos orgánicos de estaño aplicando tropoleno como agente complejante en la fase sólida y alcanzaron límites de detección de  $20 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  para el caso del butilestaño y de  $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  para fenilestaño. Estas técnicas también se han utilizado para el análisis de iones metálicos como  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  con límites de detección de 0,58; 0,33; 0,47; 0,61 y  $0,14 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente, utilizando p-tert[(dimetilamino)metil]-calix[4]areno como complejante [67].

Las principales diferencias entre estas técnicas de preparación es que la extracción líquido-líquido presenta una mayor facilidad para ser modulada, ya que se pueden variar las concentraciones de los distintos reactivos químicos que forman parte del proceso de transporte del analito, mientras que la extracción en fase sólida a pesar de ser menos laboriosa y generar mayores enriquecimientos con menor generación de residuos es difícilmente optimizable. Una alternativa de gran potencialidad, que ofrece fácil modulación y elevados rendimientos, son las membranas líquidas [68], así como su modalidad de microextracción, cuya aplicabilidad será estudiada en el presente trabajo.

### 3. Etapa de cuantificación

El buen resultado de esta etapa depende en gran medida de la calidad de los pasos previos de toma y preparación de las muestras. En este momento es en el que cobra más sentido la definición de la naturaleza y concentración del analito, ya que una mala selección de la técnica de análisis puede llevar a resultados erróneos.

La determinación instrumental depende del analito, ya que, por ejemplo, el análisis de sólidos en suspensión en agua no requiere de instrumentación sofisticada, pues se realiza por gravimetría [69], mientras que el análisis de nutrientes nitrogenados y fosforados se suele llevar a cabo por espectrofotometría de absorción molecular [70] o cromatografía iónica [71]. Para el análisis de las distintas especies de carbono (orgánico e inorgánico) total disuelto se puede utilizar el análisis elemental con detección en IR.

La determinación de metales y compuestos orgánicos es algo más compleja, por lo que se ha abordado de forma independiente.

### 3.1. Determinación de metales

Hay que tener en cuenta que para la determinación de metales traza en aguas naturales las técnicas deben ofrecer límites de detección suficientemente bajos y en la medida de lo posible deben estar libres de los efectos de la matriz. De entre las técnicas disponibles cabe destacar la espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito, las técnicas con plasma acoplado inductivamente y las técnicas electroanalíticas [72]. Las primeras se han empleado en el presente trabajo y su fundamento, ventajas y aplicaciones se describen brevemente a continuación [73].

- Espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito

Esta técnica es la que más ampliamente se ha utilizado en la determinación de metales en aguas naturales y ha sufrido una gran evolución desde su desarrollo. Se basa en la generación de átomos del metal que se quiere analizar mediante calentamiento en un tubo de grafito. Las temperaturas que se pueden alcanzar son de hasta 3000 °C, y los límites de detección para algunos elementos pesados de gran interés ambiental como Cd o Pb llegan a 7 y 9 ng·L<sup>-1</sup> respectivamente [74].

Una de las ventajas de esta técnica es el poco volumen de muestra necesario para realizar los análisis, ya que 20 µL suelen ser suficientes. Además gracias a los programas de temperaturas de los hornos de grafito se pueden realizar varias inyecciones de una misma muestra, para aumentar la cantidad de metal depositada en el tubo de grafito, en un solo análisis. Otra ventaja muy importante que aparece con las nuevas tecnologías de calentamiento desarrolladas es la posibilidad de realizar la determinación de metales pesados en agua de mar, de forma directa en tubos de grafito con calentamiento transversal, en ausencia de los efectos de la matriz. En este sentido, Cabon y Le Bihan [75] alcanzaron límites de detección ( $\sigma$ ) de 0,042 µg L<sup>-1</sup> para Cr, 0,075 µg L<sup>-1</sup> para Cu y 0,026 µg L<sup>-1</sup> para Mn.

Esta técnica cuenta además con otras herramientas que permiten reducir los efectos de la matriz. Una de ellas son los modificadores de matriz, que permiten eliminar o reducir su influencia [76]. Por otro lado se encuentra la corrección del fondo, que se puede realizar bien con una lámpara de D<sub>2</sub> o con el efecto Zeeman, siendo la segunda de especial utilidad en el análisis de muestras salinas, ya que presentan fondos muy estructurados.

El principal inconveniente de esta técnica es su lentitud, ya que además sólo se puede realizar la determinación de un elemento por análisis, por lo que se está viendo relegada por el ICP-MS, que ofrece mejores límites de detección en general y que además permite realizar la determinación de varios elementos en un solo análisis.

- Técnicas con plasma acoplado inductivamente

Se trata de dos técnicas distintas que comparten un mismo sistema de generación de introducción de la muestra. En este caso la fuente de átomos o iones es un plasma en el que se pueden alcanzar temperaturas de entre 6.000 y 10.000K. La antorcha consta de tres tubos concéntricos de cuarzo, alrededor de cuyo extremo se sitúa una bobina de inducción enfriada por agua y conectada a un generador de radiofrecuencia. La ionización del argón se produce por una chispa de la bobina Tesla, generándose de esta manera el plasma y tras su estabilización, la muestra en forma líquida es bombeada al interior de un nebulizador, donde se convierte en un fino aerosol mediante un flujo de gas argón. Esta corriente es utilizada tanto para transportar los analitos como para producir los átomos o iones de los mismos. En cuanto a la introducción de las muestras no se realiza de forma discreta como en el caso del GFAAS, sino que es succionada.

- Espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES)

En general se utiliza la radiación producida por los iones y átomos generados en el plasma para la detección, por lo que las medidas se realizan en emisión y los detectores pueden ser de varios tipos, que se resumen en secuenciales, multicanal simultáneos o de transformada de Fourier. De entre los tres tipos, los que presentan un mayor potencial son los segundos, ya que permiten realizar la detección simultánea de todos los analitos.

En cuanto a la disposición de la antorcha con respecto al detector existen dos formas de colocarla: una axial y otra radial. En la posición radial el plasma está situado en perpendicular al detector y se consiguen menores interferencias cuando se trabaja con matrices complicadas; pero los límites de detección son peores que para la axial, que al enfrentar una mayor superficie de plasma al detector, ofrece también una mayor cantidad de especies emisoras.

La aplicación de esta técnica al análisis de metales en aguas naturales suele necesitar un paso de preconcentración. Danesvhar y col. [77] realizaron la

determinación de U y Th en aguas naturales mediante esta técnica utilizando previamente la extracción en fase sólida con 2,3-dihidro-9,10-dihidroxi-1,4-antracenediona. Por otro lado, para la determinación de V en agua de mar, Abbasse y col. [78] utilizaron 8-hidroxiquinolina en un sistema de extracción en fase sólida para eliminar la matriz salina.

- Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS)

En este caso la detección se realiza en un espectrómetro de masas, donde se consiguen límites de detección mucho más bajos que para el caso de la emisión y también mejores que los determinados por GFAAS. Los átomos e iones se generan en el plasma y su orientación suele ser siempre axial, para facilitar la extracción de los iones a través de la interfase.

Los iones generados están en contacto con la interfase formada por unos conos con un orificio en su vértice tras los que se genera un vacío a 1-2 torr, que los succiona y dirige al detector. Detrás de esta zona de vacío se colocan una serie de lentes electrostáticas que se encuentran a una presión de  $10^{-6}$  torr. y que mantienen el haz de iones focalizado hacia el detector, al cual sólo deben llegar iones metálicos monovalentes, por lo que se realiza una selección previa de los mismos mediante un separador de masas a distintos potenciales, de forma que sólo se dirijan al detector de masas los iones deseados.

La selección de las masas más extendida es con selectores de tipo cuadrupolo, que consisten en cuatro barras cilíndricas colocadas de forma axial. A dos de ellas se les aplica una corriente eléctrica determinada, mientras que a las otras dos se les aplica un campo de radiofrecuencia, de forma que sólo los iones de una masa en particular pasen al detector. Esto se repite para cada masa seleccionada. Existen otros tipos de selectores como el de sector magnético o el de tiempo de vuelo.

Cuando existen interferencias poliatómicas, como las generadas por el Ar, se pueden utilizar dispositivos como celdas de colisión/reacción. Esta herramienta es útil por ejemplo en el caso del análisis del  $^{56}\text{Fe}$ , cuya masa coincide con la de la especie  $^{40}\text{Ar}-^{16}\text{O}$ , por lo que este metal es difícilmente analizable en ICP-MS, sin el uso de estas celdas, en las que un gas o una mezcla de gases, como  $\text{He}_2/\text{H}_2$  o  $\text{NH}_3$ , reaccionan con estas especies impidiendo que lleguen al detector. Leonhard y col. [79] consiguieron determinar V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Mo, Cd y Pb, siendo los resultados con la

celda de colisión/reacción sensiblemente mejorados para los elementos con masas centrales, ya que es donde se encuentran las posibles interferencias del tipo  $^{40}\text{Ar}-^{16}\text{O}$ ,  $^{40}\text{Ar}-^{40}\text{Ar}$ ,  $^{16}\text{O}-^{35}\text{Cl}$ ,  $^{16}\text{O}-^{32}\text{S}$ , en las que participan elementos que tienen una gran abundancia tanto en el plasma como en aguas naturales.

Las ventajas que presenta esta técnica son por tanto, un límite de detección que permite realizar el análisis de ultratrazas y la posibilidad de realizar la determinación de varios elementos en un mismo análisis. Su principal inconveniente es su sensibilidad a la matriz salina de las muestras de estuario y agua de mar, por lo que para su aplicación necesita de un paso previo de eliminación de la matriz.

Mendiguchía y col. [80] realizaron el análisis semicuantitativo de metales pesados (Cu, Zn, Mn, Al, Cd, Ni y Pb) en agua de mar utilizando ICP-MS previa preconcentración de los mismos y eliminación de la matriz salina utilizando membranas líquidas y aplicando ácido 2-etilhexilfosfórico como transportador. Por otro lado, Zhu y col. [81] llevaron a cabo la determinación multielemental de Fe, Cu y Zn en agua de mar en ICP-MS preconcentrando en una resina quelatante y obteniendo límites de detección de 0,03; 0,012; 0,018 y 0,009  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente.

Hay que tener en cuenta que estas dos técnicas permiten analizar sólo el contenido total del metal, pero en muchas ocasiones es más interesante llevar a cabo la determinación de las distintas formas en la que se encuentra, ya que no todas presentan la misma toxicidad. Sanz-Medel [82] propone una serie de estrategias que permiten llevar a cabo este tipo de análisis:

- Aproximación computacional.
- Determinación directa de especies con sensores selectivos o biosensores.
- Uso de técnicas híbridas.
- Técnicas de caracterización espectral.

De entre estas técnicas destacan las técnicas híbridas, en las que se realiza la separación de las fracciones antes de la determinación instrumental. Cumpliendo con esto, N'dungu y col. [83] realizaron el análisis de Ag en agua de mar utilizando resinas de intercambio iónico y evaluando la influencia de la materia orgánica para determinar la fracción biodisponible de la misma. También Romero y col. [84] consiguieron



realizar la especiación de Cu en muestras de aguas naturales con membranas líquidas realizando la determinación instrumental en GFAAS.

### 3.2. Compuestos orgánicos

La forma más habitual de realizar la determinación de compuestos orgánicos en aguas naturales es mediante el uso de cromatografía gaseosa acoplada a la detección de masas, previo tratamiento de las muestras. Hay que tener en cuenta las bajas concentraciones que estos contaminantes presentan en las aguas naturales, por lo que al igual que para el análisis de metales las condiciones de limpieza son muy importantes.

La separación cromatográfica tiene lugar en una columna capilar compacta rellena de sílice inactivada con un polímero orgánico de polaridad determinada. La muestra es inyectada a una temperatura determinada, de forma que los compuestos lleguen a la columna arrastrados por el gas portador en estado gaseoso. En función del programa de rampas de temperaturas, su afinidad por la fase estacionaria y el flujo de gas portador, los compuestos son transportados a distinta velocidad a través de la columna y llegan al detector. Cada compuesto ofrece un tiempo de retención característico en su paso por la columna, siendo la diferencia de estos tiempos para los distintos compuestos suficiente para distinguirlos.

La detección en un espectrómetro de masas permite obtener límites de detección muy bajos. Los espectrómetros más utilizados son del tipo cuadrupolo y la degradación del compuesto más extendida es por impacto electrónico. También se pueden utilizar varios cuadrupolos en serie, de forma que se tendría un tándem de varios detectores. Una ventaja que presentan estos detectores es que permiten identificar los fragmentos en los que se separa la molécula en el detector, de manera que se puede confirmar la identidad del analito de forma adicional a como se hace con el tiempo de retención.

Esta técnica está muy extendida y desde hace algún tiempo su aplicación a la determinación de compuestos orgánicos en aguas naturales tiene mucho interés sobre todo debido a la gran y creciente variedad de este tipo de sustancias. Por ejemplo, Bendz y col. [85] determinaron compuestos como *triclosan*, antiinflamatorios y antioxidantes en aguas vertidas desde las depuradoras al río *Höje* (Suecia) aplicando GC-MS tras el tratamiento de las muestras por extracción en fase sólida. En cuanto al análisis de herbicidas, Berzas-Nevado y col. [86] realizaron la determinación de

triazinas en agua mediante la preconcentración por extracción en fase sólida, obteniendo límites de detección de  $3,0 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  para terbutrín y de  $4,0 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  para atrazina.

Como se puede apreciar, la determinación de contaminantes en aguas naturales debe ofrecer límites de detección suficientemente bajos además de evitar los efectos de la matriz para obtener resultados fiables. Así, se plantea, o bien la posibilidad de desarrollar nuevos métodos para la separación y/o preconcentración de los contaminantes, o bien optimizar su determinación directa evitando los efectos de la matriz. Además hay que tener en cuenta el interés que suscitan tanto el contenido total de las variables a determinar como la cuantificación de las distintas formas que presentan.

## Bibliografía

1. Heath, Alan G. (1995) *Water pollution and fish physiology*. Lewis Publisher, 1-5
2. García-Luque, E.; Forja, J.M.; Del Valls, A.M. and Gómez-Parra, A. (2003) *The behaviour of heavy metals from the Guadalquivir river after the Aznalcollar mining spill: field and laboratory surveys*. Environmental Monitoring and Assessment **83**, 71-88.
3. Directiva 2008/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 11 de marzo de 2008, que modifica la Directiva 2000/60/CE por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas, por lo que se refiere a las competencias de ejecución atribuidas a la Comisión.
4. Bricker, O.P. and Jones, B.F. (1995) *Main factors affecting the composition of natural waters*. In Trace elements in natural waters. Eds. B. Salbu and E. Steinnes. CRC Press, Boca Raton.
5. Guyot, J.L.; Jouanneau, J.M.; Soares, L.; Boaventura, G.R.; Maillet, N. and Lagane, C. (2007) *Clay mineral composition of river sediments in the Amazon Basin*. Catena **71**, 340-356.
6. Abboud M. M.; Khleifat K. M.; Batarseh M.; Tarawneh K. A.; Al-Mustafa A. and Al-Madadhah M. (2007) *Different optimization conditions required for enhancing the biodegradation of linear alkylbenzenesulfonate and sodium dodecyl sulfate surfactants by novel consortium of Acinetobacter calcoaceticus and Pantoea agglomerans*. Enzyme and Microbial Technology **41**, 432-439.
7. Morales-Baquero, R.; Pulido-Villena, E. and Reche I. (2006) *Atmospheric inputs of phosphorus and nitrogen to the southwest Mediterranean region: Biogeochemical responses of high mountain lakes*. Limnology and Oceanography, **51**, 830-837.
8. Balls, P.W. (1994) *Nutrients inputs to estuaries from nine Scottish east coast rivers; influence of estuarine processes on inputs in the North Sea*. Estuarine, Coastal and Shelf Science **39**, 329-352.
9. Khai, N.M.; Ha, P.Q. and Öborn, I. (2007) *Nutrient flows in small-scale peri-urban vegetable farming system in Southeast Asia- A case study in Hanoi*. Agriculture, Ecosystems and Environment **122**, 192-202.
10. Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes (2001), ANEXO A, 26-34.
11. Power, M.; Attrill, M.J. and Thomas, R.M. (1999) *Trends in agricultural pesticide (atrazine, lindane, simazine) concentrations in the Thames Estuary*. Environmental Pollution **104**, 31-39.
12. Hassett, J.P. (2009) *Dissolved organic matter as a microreactor*. Science. Online publication.
13. BOE 176: Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de Julio, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Aguas. Martes 24 de julio de 2001. 26791-26817.
14. Mendiguchía, C.; Moreno, C. and García-Vargas, M. (2007) *Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients*. Chemosphere **69**, 1509-1517.

15. Sañudo-Wilhelmy, S.A. and Flegal, A.R. (1992) *Anthropogenic silver in the Southern California bight: A new tracer for sewage in coastal waters*. Environmental Science and Technology **26**, 2147-2151.
16. Soto-Jiménez, M.F. and Flegal, A.R. (2009) *Origin of lead in the Gulf of California Ecoregion using stable isotope analysis*. Journal of Geochemical Exploration **101**, 209-217.
17. Buzier, R. Tusseau-Vuillemin, M.H.; dit Meriadec, C.M.; Rousselot, O. and Mouchel, J.M. (2006) *Trace metal speciation and fluxes within a major French wastewater treatment plant: Impact of successive treatment stages*. Chemosphere **65**, 2419-2426.
18. Ahad, J.M.E.; Ganeshram, R.S.; Spencer, R.G.M., Uher, G.; Upstill-Goddard, R.C. and Cowie, G.L. (2006) *Evaluating the sources and fate of anthropogenic dissolved inorganic nitrogen (DIN) in two contrasting North Sea estuaries*. Science of the Total Environment **372**, 317-333.
19. Shirasuna, H.; Fukushima, T.; Matsushige, K.; Imai, A. and Ozaki, N. (2006). *Runoff and loads of nutrients and heavy metals from an urbanized area*. Water Science and Technology **53**, 203-213.
20. Almeida, C.A.; Quintar, S.; González, P. and Mallea, M.A. (2007) *Influence of urbanization and tourist activities on the water quality of the Potrero de los Funes River (San Luis-Argentina)*. Environmental Monitoring and Assessment **133**, 459-465.
21. Weigel, S.; Berger, U.; Jensen, E.; Kallenborn, R.; Thoresen, H. and Hühnerfuss, H. (2004) *Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites*. Chemosphere **56**, 583-592.
22. Hua, W.; Bennett, E.R. and Lether, R.J. (2005) *Triclosan in waste and surface waters from the upper Detroit River by liquid chromatography-electrospray-tandem quadrupole mass spectrometry*. Environmental International **31**, 621-630.
23. Moore, J.N. and Luoma, S.N. (1990) *Hazardous wastes from large-scale metal extraction- A case-study*. Environmental Science and Technology **24**, 1279
24. Vicente-Martorell, J.J.; Galindo-Riaño, M.D.; García-Vargas, M. and Granado-Castro, M.D. (2008) *Heavy metals speciation of estuarine sediments affected by acid mine drainage in the Tinto and Odiel estuary, Spain. Relationship to bioconcentration of fish tissues*. Fresenius Environmental Bulletin **17**, 1744-1754.
25. Vicente-Martorell, J.J.; Galindo-Riaño, M.D.; García-Vargas, M. and Granado-Castro, M.D. (2009) *Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary*. Journal of Hazardous Materials **162**, 823-836.
26. Kayhanian, M.; Stransky, C.; Bay, S.; Lau, S-L. and Stenstrom, M.K. (2008) *Toxicity of urban highway runoff with respect to storm duration*. Science of the Total Environment **389**, 386-406.

27. Zhu, Y.; Liu, P.; Liu, H.; Zhang, H. and Chen, L. (2009) *Pollutant washoff characterization of expressway runoff in Shanghai*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **83**, 298-402.
28. Aleksic, N.; Roy, K.; Sistla, G.; Dukett, J.; Houck, N. and Casson, P. (2009) *Analysis of cloud and precipitation chemistry at Whiteface Mountain, NY*. Atmospheric Environment **43**, 2709-2716.
29. Packett, R.; Dougall, C.; Rohde, K. and Noble, R.; (2009) *Agricultural lands are hot-spot for annual runoff polluting the southern Great Barrier Reef lagoon*. Marine Pollution Bulletin **58**, 976-986.
30. Berg, T.; Aas, W.; Pacyna, J.; Uggerud, H.T. and Vadset, M. (2008) *Atmospheric trace metals concentrations at Norwegian Background sites during 25 years and it relation to Europeans emissions*. Atmospheric Environment **42**, 7494-7501.
31. Rühling, A. and Tyler, G. (2004) *Changes in the atmospheric deposition of minor and rare elements between 1975 and 2000 in south Sweden, as measured by moss analysis*. Environmental Pollution **131**, 417-423.
32. Rouvalis, A.; Karadima, K.; Zioris, I.V.; Sakkas, V.A.; Alabanis, T. and Iliopoulou-Georgudaki, J. (2009) *Determination of pesticides and toxic potency of rainwater samples in western Greece*. Ecotoxicology and Environmental Safety **72**, 828-833.
33. Ozsoy, T. and Ornektekin, S. (2009) *Trace elements in urban and suburban rainfall, Mersin, Northeastern Mediterranean*. Atmospheric Research **94**, 203-219.
34. Debout K.; Flament, P. and Bertho, M.L. (2004) *Cd, Cu, Pb y Zn concentrations in atmospheric wet deposition at a coastal station in Western Europe*. Water, Air and Soil Pollution **151**, 335-359.
35. Kang, J-H.; Lee, Y.S.; Ki, S.J.; Lee, Y.G.; Cha, S.M.; Cho, K.H. and Kim, J.H. (2009) *Characteristics of wet and dry weather heavy metals discharges in the Yeonsang watershed, Korea*. Science of the Total Environment **407**, 3482-3493.
36. Olarewaju, O.E.; Adetunji, M.T.; Adeofun, C.O. and Adekunle, I.M. (2009) *Nitrate and phosphorus loss form agricultural land: implications of non-point pollution*. Nutrient Cycling in Agroecosystems. In press.
37. Bhatt, M.P. and Gardner, K.H. (2008) *Variation in DOC and trace metal concentration along the heavily urbanized basin in Kathmandú Valley, Nepal*. Environmental Geology **96**, 1-10.
38. Li, S.; Liu, W.; Gu, S.; Cheng, X.; Xu, Z. and Zhang, Q. (2009) *Spatio-temporal dynamics of nutrients in the upper Han River basin, China*. Journal of Hazardous Materials **162**, 1340-1346.
39. Tetzlaff, B.; Kuhr, P.; Vereecken, H. and Wendland, F. (2009) *Aerial photograph-based delineation of artificially drained areas as a basis for water balance and phosphorous modelling in large river basins*. Physics and Chemistry of the Earth **34**, 552-564.
40. Karvelas, M.; Katsoyiannis, A. and Samara, C. (2003) *Ocurrence and fate of heavy metals in the wastewater treatment process*. Chemosphere **53**, 1201-1210.

41. Mendiguchía, C.; Moreno, C.; Galindo-Riaño, M.D. and García-Vargas, M. (2004) *Using chemometric tools to assess anthropogenic effects in river waters: A case study; the Guadalquivir river (Spain)*. *Analytica Chimica Acta* **515**, 143-149.
42. Instituto Nacional de Estadística, España (ed.): «Series de población desde 1996. Cifras oficiales de la Revisión anual del Padrón municipal a 1 de enero de cada año». 2008.
43. [www.chguadalquivir.es](http://www.chguadalquivir.es) Oficina de Planificación Hidrológica del MMA (enero, 2009).
44. [www.juntadeandalucia.es/agenciadelagua/portalweb/sites/aaa/contenidos/Gestion/PatrimonioHidraulico/Presas/TxtEmbalses?lang=es&apartado=gestion&perfil=org&tema=/Patrimonio\\_Hidraulico/Presas/&desplegar=/Patrimonio\\_Hidraulico/](http://www.juntadeandalucia.es/agenciadelagua/portalweb/sites/aaa/contenidos/Gestion/PatrimonioHidraulico/Presas/TxtEmbalses?lang=es&apartado=gestion&perfil=org&tema=/Patrimonio_Hidraulico/Presas/&desplegar=/Patrimonio_Hidraulico/)
45. Diario Oficial de la Unión Europea. Directiva 2006/11/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de febrero de 2006 relativa a la contaminación causadas por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la comunidad. L64/52-L64/59.
46. BOE 313: Ley 62/2003, de 30 de diciembre, de medidas fiscales, administrativas y del orden social. Miércoles 31 de diciembre de 2003. 26874-46961.
47. BOE 45: Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad de l agua de consumo humano. Viernes 21 de febrero de 2003. 7228-7244.
48. BOJA 143: Ley 7/2007, de 9 de julio, de Gestión Integrada de la Calidad Ambiental. 20 de julio de 2007. 4-48.
49. Cabrera, F.; Soldevilla, M.; Cordón, R. and De Arambarri, P. (1987) *Heavy metals pollution in the Guadiana river and Guadalquivir estuary. (South west Spain)*. *Chemosphere* **16**, 463-468.
50. Gómez-Parra, A.; Forja, J.M.; Del Valls, T.A.; Sáenz. I. and Riba, I. (2000) *Early contamination by heavy metals of the Guadalquivir estuary after the Aznacollar mining spill (SW Spain)*. *Marine Pollution* **40**, 1115-1123.
51. Actherberg, E.P.; Braundgardt, C.; Morley, N.H.; Elbaz-Poulichet, F. and Leblanc, M. (1999) *Impact of los Frailes mining spill on riverine, estuarine and coastal waters in southern Spain*. *Water Research* **33**, 3387-3394.
52. Riba, I.; Del Valls, T.A.; Forja, J.M. and Gómez-Parra, A. (2002) *Influence of Aznalcollar mining spill on the vertical distribution of heavy metals in sediments from the Guadalquivir estuary (SW Spain)*. *Marine Pollution Bulletin* **44**, 39-47.
53. Morillo, J.; Usero, J. and Gracia, I. (2005) *Study of fractionation and potencial mobility of metal from the Guadalquivir estuary: Changes in mobility with time, influence of the Aznalcollar mining spill*. *Environmental Management* **36**, 162-173.
54. Meharg, Pain, D.J.; Ellam. R.M.; Baos. R.; Olive, V.; Joyson, A.; Powell, N. Green, A.J. and Hiraldo, F. (2002) *Isotopic identification of the sources of lead contamination for white storks (Ciconia ciconia) in a marshland ecosystem (Doñana, S.W. Spain)*. *Science of the Total Environment* **300**, 81-86.

55. Espigares, M.; Coca, C.; Fernández-Crehuet, M.; Moreno, O.; Bueno, A. and Gálvez, R. (1998) *Pesticide concentrations in the waters from a section of the Guadalquivir River Basin, Spain*. *Toxicology and Water Quality* **12**, 249-256.
56. Blasco, J.; Arias, A.M. and Sáenz, V. (1999) *Heavy metals in organisms of the River Guadalquivir estuary: Possible incidence of Aznalcollar disaster*. *The Science of the Total Environment* **242**, 249-261.
57. Drake, P.; Baldó, F.; Cuesta, J.A.; García-González, D.; Silva-García, A.; Arias, A.M.; Rodríguez, A. and Sobrino (1999) *Initial effect of the toxic waste spill (Aznalcollar mine accident) on the aquatic macrofauna of Guadalquivir Estuary*. *The Science of the Total Environment* **242**, 271-281.
58. Riba, I.; Forja, J.M.; Gómez-Parra, A. and Del Valls, T.A. (2004) *Sediment quality in the litoral regions of the Gulf of Cádiz: A triad approach to address the influence of mining activities*. *Environmental Pollution* **132**, 341-353.
59. Mateo, R.; Green, A.J.; Lefranc, H.; Baos, R. and Figuerola, J. (2007) *Lead poisoning in wild birds from southern Spain: A comparative study of wetland areas and species affected, and trends over time*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **66**, 119-126.
60. Reimann, C.; Siewers, U.; Skarphagen, H. and Banks, D. (1999) *Does bottle type and acid-washing influence trace element analyses by ICP-MS on water samples? A test covering 62 elements and four bottles types: high density polyethylene (HDPE), polypropene (PP), fluorinated ethene propene copolymer (FEP) and perfluoroalcoxy polymer (PFA)*. *The Science of the Total Environment* **239**, 111-130.
61. Mendiguchía, C. (2005) *Utilización de ultratrazas de metales pesados como trazadores de los efectos antropogénicos producidos en ecosistemas acuáticos*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz, Cádiz.
62. Valcarcel, M and Ríos, A. (1992) *La calidad en los laboratorios analíticos*. Ed. Reverté. Barcelona (España).
63. Sliwka-Kaszynska, M; Kot-Wasik, A. and Namiesnik, J. (2003) *Presevation and storage of water samples*. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* **33**, 31-44.
64. Cámara, C. y Pérez-Conde, C. (2002) *Preparación de la muestra para la determinación de analitos inorgánicos*. En Toma y tratamiento de muestras. Eds. C. Cámara, P. Fernández, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde y M. Vidal. Síntesis, S.A. 2002.
65. Bruland, K.W. and Franks, R.P. (1979) *Sampling and analytical methods for the determination of copper, cadmium, zinc and nickel at the nanogram per liter level in seawater*. *Analytica Chimica Acta* **105**, 233-245.
66. Díez, S.; Ortiz, L. and Bayona, J.M. (2000) *Off-line solid-phase extraction procedure for the determination of phenyl and butyltin compounds from aqueous matrices followed by GC-FPD determination*. *Chromatographia* **52**, 657-663.
67. Nie, R.; Chang, X.; He, Q.; Hu, Z. and Li, Z. (2009) *Preparation of p-tert[(dimethylamino)methyl]-calix[4]arene functionalized aminopropylpolysiloxane resin for selective solid-phase extraction and preconcentration of metal ions*. *Journal of Hazardous Materials* **169**, 203-209.

68. Jönsson, J.A. and Mathiasson, L.; (1999) *Liquid membrane extraction y analytical preparation. I. Principles*. TRAC-Trends in Analytical Chemistry **18**, 318-325.
69. Martín Galvín, R. (1995) *Análisis de aguas y ensayos de tratamiento*. Ed. Gestió i Promoció Editorial, S. A: Barcelona.
70. Rodier, J. (1990) *Análisis de las aguas*. Ed. Omega, Madrid.
71. ORDEN MAM/3207/2006, de 25 de septiembre, por la que se aprueba la instrucción técnica complementaria MMA-EECC-1/06, determinaciones químicas y microbiológicas para el análisis de las aguas.
72. Salbu, B. and Oughton, D.H. (1995) *Strategies of Samplig, Fractionation and Analysis*. In Trace elements in natural waters. Eds. B. Salbu and E. Steinnes. CRC Press, Boca Ratón.
73. Skoog, Holler, and Nieman, (2000) *Principles of Instrumental Analysis*, Fifth edition, Mc Graw-Hill, Madrid.
74. Colognesi, M.; Abollino, O.; Aceto, M.; Sarzanini, C. and Mentasti, E. (1997) *Flow injection determination of Pb and Cd traces with graphite furnace atomic absorpition spectrometry*. Talanta **44**, 867-875.
75. Cabon, J.Y. and Le Bihan, A. (1995) *The determination of Cr, Cu and Mn in seawater with transversally heated graphite furnace atomic absorption spectrometry*. Spectrochimica Acta Part B, Atomic Spectroscopy **50**, 1703-1716.
76. Welz, B.; Schlemmer, G. and Mudakavi, J.R. (1992) *Palladium-nitrate magnesium-nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry. Part 5. Performnce for the determination of 21 elements*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry **7**, 1257-1271.
77. Danesvhar, G.; Jabbari, A.; Yamini, Y. and Paki, D. (2009) *Determination of uranium and thorium in natural waters by ICP-OES after on-line solid phase extraction and preconcentration in the presence of 2,3-dihydro-9,10-dihydroxy-1,4-antracenedion*. Journal of Analytical Chemistry **64**, 602-608.
78. Abbasse, G.; Ouddane, B. and Fischer, J.C. (2002) *Determination of trace levels of dissolved vanadium in seawater by use of synthetic complexing agents and inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy (ICP-AES)*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **374**, 873-878.
79. Leonhard, P.; Pepelnik, R.; Prange, A.; Yamada, N. and Yamada, T. (2002) *Analysis of diluted sea-water at the ng-L<sup>-1</sup> level using an ICP-MS with an octopole reaction cell*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry **17**, 189-196.
80. Mendiguchía, C.; García-Vargas, M. and Moreno, C. (2008) *Screening of disolved heavy metals (Cu, Zn, Mn, Al, Cd, Ni, Pb) in seawater by a liquid-membrane-ICP-MS approach*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **391**, 773-778.
81. Zhu, Y.; Inagaki, K.; Chiba, K. (2009) *Determination of Fe, Cu, Ni, and Zn in seawater by ID-ICP-MS after preconcentration using a syringe-driven chelating column*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry **24**, 1179-1183.



82. Sanz-Medel, A. (1998) *Toxic trace metal speciation: importance and tools for environmental and biological analysis*. Pure and Applied Chemistry **70**, 2281-2285.
83. N'dungu, K.; Ranville, M.A.; Fraks, R.P. and Flegal, A.R. (2006) *On-line determination of silver in natural waters by inductively-coupled plasma mass spectrometry: Influence of organic matter*. Marine Chemistry **98**, 109-120.
84. Romero, R. and Jönsson, J.A. (2005) *Determination of free copper concentrations in natural waters by using supported liquid membranes extraction under equilibrium conditions*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **381**, 1452-1459.
85. Bendz, D.; Paxeus, N.A.; Ginn, T.R. and Loge, F.J. (2005) *Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment , a case study : Höje River in Sweden*. Journal of Hazardous Materials **122**, 195-204.
86. Berzas-Nevaldo, J.J.; Guiberteau, C.; Villaseñor-Llerena, M.J. and Rodríguez-Robledo, V. (2007) *Sensitive SPE GC-MS-SIM screening of endocrine-disrupting herbicides and related degradation products in natural surface waters and robustness study*. Microchemical Journal **87**, 62-71.

## **Capítulo 2. Validación de un método para la determinación directa de Cu y Mn en agua de estuario mediante espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito**

### Introducción

#### 1. Determinación de Cu y Mn mediante espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito

Existen varias formas de afrontar el análisis de metales traza en aguas naturales, cada una de ellas condicionada por la concentración de analito y la matriz de las muestras. El caso ideal es aquél en el que las muestras presentan concentración suficientemente elevada y matrices sencillas, no generando problemas considerables en la etapa de medida. Por el contrario existen muestras complejas tanto por sus bajas concentraciones como por su matriz, que dificultan el análisis, como ocurre con la determinación de metales pesados en agua de mar.

Cuando la matriz es un problema se plantea la conveniencia de medirlas directamente, sin tratar, o hacerlo tras un paso previo de eliminación de la misma. Cuando se escoja la segunda opción se debe tener en cuenta si las concentraciones de los metales a analizar se encuentran a niveles de trazas, ya que cualquier tipo de manipulación puede introducir contaminación o provocar una pérdida de analito. En el presente trabajo se plantea el análisis directo de Cu y Mn mediante la técnica de espectroscopía de absorción atómica por atomización electrotérmica en horno de grafito (GFAAS).

La GFAAS se ha extendido considerablemente desde que L'Vov [1] desarrollara los tubos de grafito para cuantificar la concentración de metales y ha sufrido cambios sustanciales para conseguir mejorar sus propiedades analíticas. En los primeros equipos de absorción atómica y aún hoy día se vienen utilizando tubos de grafito que se calientan de forma longitudinal, es decir, el contacto entre los tubos y el equipo se realiza por los extremos del primero (LHGFAAS) (Figura 2-1).

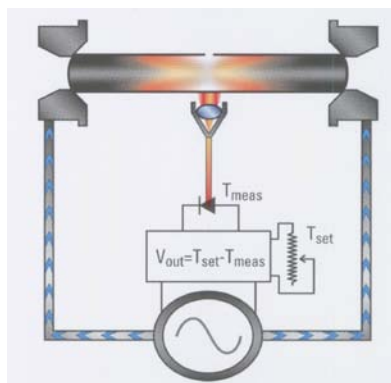


Figura 2-1. Tubo de grafito con calentamiento longitudinal.

A finales de los años 70 se realizaron mejoras en los equipos de GFAAS, con la inclusión de las plataformas para estabilización de la temperatura en el horno (STPF), que originalmente se desarrollaron para evitar el uso del método de adiciones estándar y poder medir muestras con matrices complicadas de forma directa y con patrones acuosos sencillos, ganando así en tiempo y precisión [2] (Figura 2-2).

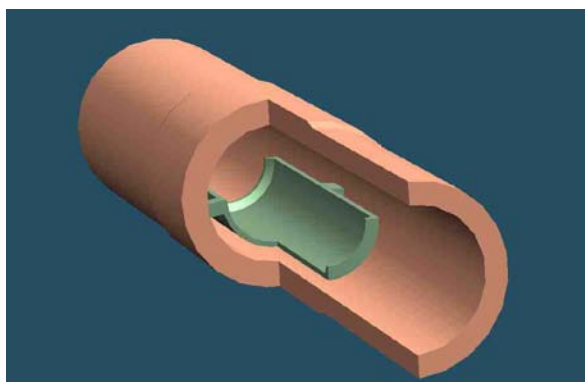


Figura 2-2. Tubo de grafito equipado con plataforma de L'Vov.

El inconveniente inicial de usar la técnica de STPF es que a pesar de su buena exactitud y precisión para muestras con matrices orgánicas [3], se requiere mucho tiempo para realizar cada análisis. A partir de 1990, se desarrollaron métodos más rápidos para el análisis de Mn, Cu y otros metales por STPF, gracias a mejoras en la técnica [4] y la optimización de los programas de calentamiento del horno, o incluso, dependiendo de la complejidad de la matriz, eliminando etapas del mismo que son en principio imprescindibles [5].

Durante el trabajo con equipos de calentamiento longitudinal se observan inconvenientes debidos a la distancia entre los contactos, entre los que destacan:

- No se mantienen condiciones isotérmicas en el interior.
- Se producen interferencias en la fase gaseosa.
- Al encontrarse los contactos de los equipos refrigerados con agua, la temperatura en los mismos no es suficiente para eliminar la matriz salina y en ellos se produce condensación de la muestra.

Una solución, aunque parcial, a estos problemas es la adición de un paso previo de enfriamiento en el tubo antes de la atomización junto con un alargamiento de los tiempos de calcinación, para eliminar de forma más efectiva la matriz salina y evitar la condensación en los extremos de los tubos.

En esta situación aparece otro tipo de tecnología, desarrollada en la década de 1990, que convive con su predecesora y que es la espectroscopía de absorción atómica por horno de grafito con calentamiento transversal (THGFAAS) [6], donde el tubo de grafito no se calienta por sus extremos, es decir, el contacto entre tubo y equipo tiene lugar entre la pared del primero y los contactos del segundo, reduciéndose de esta forma la distancia entre los contactos y situándose éstos a lo largo de todo el tubo. Así se deben conseguir condiciones isotérmicas dentro de éste, en las que se alcance de forma rápida el equilibrio térmico entre el tubo y el gas portador. Por tanto, se debería obtener una mayor estabilidad en la medida (Figura 2-3). Por el contrario, en los equipos de calentamiento longitudinal encontramos que la zona del tubo que se encuentra a mayor temperatura es el centro del mismo.

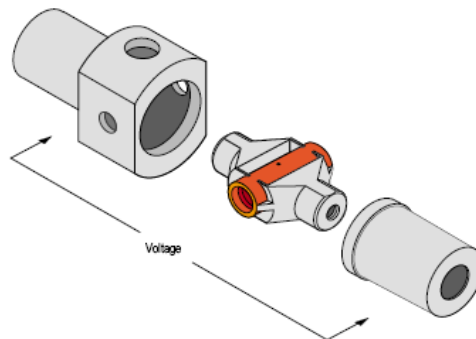


Figura 2-3. Tubo de grafito con calentamiento transversal.

Hay que tener en cuenta que la temperatura no es la única herramienta que permite eliminar los efectos de la matriz, más aún, en ocasiones no es suficiente. En este

sentido, el empleo de lámparas de  $D_2$  y efecto Zeeman, para corregir la señal del fondo, o el uso de modificadores de matriz, permiten la reducción de sus efectos en el proceso de medida y, en general, alargar la vida útil de los hornos. Existen dos tipos de modificadores de matriz, unos que permiten su eliminación a temperaturas más suaves llevando a cabo su degradación en las etapas previas a la atomización y otros que retienen el analito durante la calcinación y garantizan que éste no se volatilice en el proceso de eliminación de la misma.

No obstante, existen situaciones en las que la matriz no afecta considerablemente a la medida en GFAAS, por ejemplo Slavin y col. [5] analizaron varios metales, entre ellos Cu, en muestras de diverso tipo: alimentos, aguas, etc., suprimiendo el uso de modificadores de matriz y la etapa de calcinación en el programa del horno, sin que ello afectara a la calidad de los resultados.

Por otro lado, Welz y col. [7] establecieron el efecto del uso de  $Pd(NO_3)_2$  y  $Mg(NO_3)_2$  como modificadores de matriz en el análisis de 21 elementos metálicos. En el caso del Cu, que en principio podría ser analizado sin usar modificadores por ser estable a  $1100\text{ }^\circ\text{C}$ , observaron interferencias debidas a algunos haluros. El uso de  $Pd(NO_3)_2$ , permitió aumentar la temperatura de calcinación a  $1300\text{ }^\circ\text{C}$  y de esta forma evitarlas.

Como ya se ha comentado, las muestras analizadas en este trabajo proceden de estuario y agua de mar, por lo que a tenor de lo expuesto, se puede entender la dificultad que reviste su análisis sin un paso previo de separación de la matriz y/o preconcentración.

El análisis de forma directa de este tipo de muestras por GFAAS ha tenido gran interés tanto por las bajas concentraciones metálicas que contienen, como por el inconveniente que suponen los pretratamientos, tanto desde el punto de vista económico como analítico, ya que a cada nueva etapa de análisis se añade una nueva fuente de error [8]. Los principales problemas de absorción de la matriz, en la etapa de medida son debidos a las sales que no se han eliminado en etapas anteriores de secado o calcinación. De entre las especies interferentes, NaCl,  $CaCl_2$  y  $MgCl_2$  son las más importantes. Estas sales no suponen un problema serio en la determinación de algunos metales como Cr, pero sus señales de fondo suelen aparecer solapando las de Mn y Cu en la atomización [8,9].

Para minimizar estos problemas, Pi-Guey y Sang-Da [10], modificaron los programas clásicos de los hornos de grafito, introduciendo un paso previo de enfriamiento a 20 °C antes de la atomización, consiguiendo reducir la condensación de la matriz en los extremos del tubo, lo que conjugaron con el uso de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  como modificador de la misma para la determinación de Cu y Mn.

Otro modificador de matriz útil en GFAAS para el análisis de metales en muestras salinas es el HF, que fue aplicado por primera vez por López-García y col. [9] para el análisis de Se, Tl y Sb eliminando los efectos del NaCl (Figura 2-4). En principio, el uso de HF podría ser peligroso para las lentes de cuarzo y los tubos de los equipos de GFAAS, pero los autores comprobaron que estos problemas no existen, mediante microscopía electrónica.

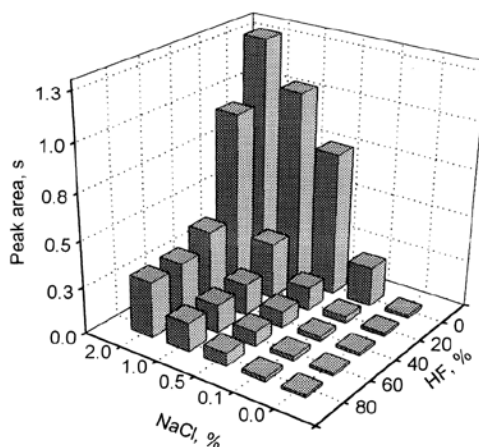


Figura 2-4. Señal debida al NaCl durante la atomización en presencia de HF [9]

Cabon [11] aplicó, a un mismo tiempo, las condiciones de enfriamiento antes de la atomización y el HF como modificador de matriz para el análisis de Cu y Mn en muestras salinas. Además, para aumentar la sensibilidad del método utilizó un tipo de horno conocido como “end-capped”, en el que gracias a su construcción en grafito pirolítico y a su diseño con los extremos del tubo más cerrados, se reduce la dispersión del analito, aumentando la eficiencia de la atomización.

El uso de HF como modificador de matriz provoca la reacción del NaCl,  $\text{MgCl}_2$  y  $\text{CaCl}_2$  para dar lugar a sus respectivos fluoruros, que son vaporizados en la etapa de secado, mientras que el Cl<sup>-</sup> excedente es eliminado como HCl [11,12]. Esta metodología permite reducir la absorción de los fondos a la mitad, facilitando así la corrección por

efecto Zeeman. Como la matriz se ha eliminado en la etapa de secado, se puede disminuir la temperatura de calcinación, o incluso en ocasiones eliminar este paso. Para evitar la condensación en los extremos de los tubos de grafito también empleó una etapa de enfriamiento antes de la atomización (Tabla 2-1).

Tabla 2-1. Condiciones de análisis de Cu descritas por Cabon [11].

Paso	Secado	Calcinación	Enfriamiento	Atomización	Limpieza
Temperatura (°C)	130	(600-1300)	20	2150	2500
Rampa (s)	5	10	1	0	10
Permanencia (s)	30	60	10	5	5
Lectura				on	
Flujo Ar (L·min <sup>-1</sup> )	250	250	250	0	250

Como se ha comentado anteriormente las muestras analizadas son de agua de estuario, por lo que la salinidad varía desde valores inferiores a la unidad en zonas altas hasta valores próximos a 35 en la desembocadura. El análisis de Cu y Mn en este tipo de muestras se puede realizar sin pretratamiento mediante el método de las adiciones estándar [13], pero el objetivo del presente estudio es realizar los análisis utilizando una recta de calibración externa con patrones acuosos sencillos, consiguiendo un ahorro tanto en el uso de los equipos y reactivos como en tiempo. Posteriormente se realizará el estudio de validación para el método que presente mejores resultados.

## 2. Validación de métodos analíticos

Se entiende como validación de un método analítico al proceso de adecuación y evaluación del mismo para resolver un problema determinado. Por tanto, un método validado debe cumplir una serie de requisitos que garanticen su consistencia y la de los resultados obtenidos. La determinación de una sustancia en una muestra consiste en medir su concentración. Para asegurar la corrección de las medidas es necesario recurrir a la Metrología, que etimológicamente se entiende como “la ciencia de la medida”.

Hay que tener en cuenta que el desarrollo de metodología analítica responde a la necesidad de resolver un problema concreto, por lo que el objetivo de los procesos de optimización y validación es asegurar que el método empleado se ajusta a los requisitos definidos para un determinado problema [14]. Teniendo en cuenta esta idea, el primer paso, que resulta fundamental, es la definición del problema analítico.

La validación de un método está muy relacionada con su desarrollo y en muchas ocasiones ambos coinciden en varios puntos, por lo que no hay una clara definición

sobre cuándo termina el desarrollo del método (que normalmente tiene lugar primero) y comienza el proceso de validación, ya que algunos de los factores utilizados durante el desarrollo son empleados para llevar a cabo la validación [15].

Llevar a cabo la validación de métodos analíticos es muy importante, ya que se realizan innumerables análisis químicos en el mundo cada día, todos ellos utilizando métodos que deben garantizar la comparabilidad de las medidas. Hay que tener en cuenta la gran implicación para la salud, la sociedad y la economía, que tienen este tipo de medidas. Así que es crucial determinar el resultado correcto de los análisis, pero no menos importante es poder demostrar la corrección del proceso por el que se llega al mismo.

A la vista de esta situación y ante la importancia de los resultados que se obtienen es necesario ofrecer confianza en la información que se presenta. Gracias al proceso de validación, el laboratorio o analista pueden demostrar que el método utilizado se ajusta a las necesidades generadas por el problema. Así, los resultados obtenidos se encuentran dentro unos límites de confianza determinados y se puede estimar la incertidumbre correspondiente de forma consistente y sencilla de interpretar, utilizando, junto a otros, los parámetros de validación.

La validación de métodos se puede clasificar en distintos grados, en función de las características del problema y la implantación de los mismos en el laboratorio, pudiéndose estimar que éstos son susceptibles de ser validados cuando se cumpla una de las siguientes situaciones [14]:

- Método nuevo desarrollado para un problema concreto.
- Establecimiento de un método actualizado o ampliado para la resolución de un problema nuevo.
- Revisión del método como parte de un programa de control de calidad.
- Utilización de un método validado en un laboratorio nuevo, un analista distinto o un instrumento diferente.
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos.

Otra cuestión que afecta de forma muy importante al desarrollo práctico de la validación es la autoría del proceso. En última instancia, es el laboratorio que va a utilizar los métodos el que debe garantizar que se ajustan al problema planteado. Una



forma muy extendida y reconocida como la más fiable, consiste en el concurso en ejercicios de intercomparación; pero cuando esto no es posible, se puede desarrollar el estudio de validación en un único laboratorio [16]. Trabajando de esta forma es evidente que el número de datos de validación obtenidos será menor que cuando se participa en ejercicios de intercomparación, pero éste no es un requisito excluyente, ya que se pueden utilizar medidas de materiales de referencia certificados u otros métodos previamente validados para realizar las comparaciones.

En este trabajo el problema planteado es la determinación de Cu y Mn en muestras acuosas procedentes de un estuario, habiéndose seleccionado como método analítico la espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito (GFAAS) sin tratamiento previo de la muestra.

En este momento es conveniente introducir el concepto de mensurando, referido al agente químico que se va a determinar teniendo en cuenta su entorno y las operaciones previas a la aplicación del método [17]. Este concepto engloba a su vez al tradicional analito, que hace referencia únicamente al agente químico a determinar. Así, en el caso que nos ocupa, el analito es el metal; cobre o manganeso, mientras que el mensurando es la concentración del metal en una muestra de agua de estuario filtrada por un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  y acidificada con ácido nítrico a pH igual o menor que 2. De esta forma el problema analítico queda perfectamente definido.

### Optimización del análisis de Mn y Cu

En el presente trabajo, al poder contar con dos equipos de absorción atómica con horno de grafito, uno de calentamiento longitudinal y otro de calentamiento transversal, se ha realizado el estudio de optimización para ambos en la determinación directa de Cu y Mn en muestras de estuario. Para el equipo de calentamiento longitudinal se han realizado los experimentos utilizando como correctores de fondo la lámpara de  $\text{D}_2$  y el efecto Zeeman, mientras que el equipo de calentamiento transversal sólo cuenta con efecto Zeeman.

Para poder completar el estudio, se ha realizado la optimización de la atomización de Cu y Mn utilizando ambos tipos de calentamiento con las distintas correcciones del fondo. Posteriormente se ha comprobado la adecuación de los métodos al análisis de muestras reales. En la siguiente figura se muestran los equipos de absorción atómica utilizados para realizar este trabajo (Figura 2-5).

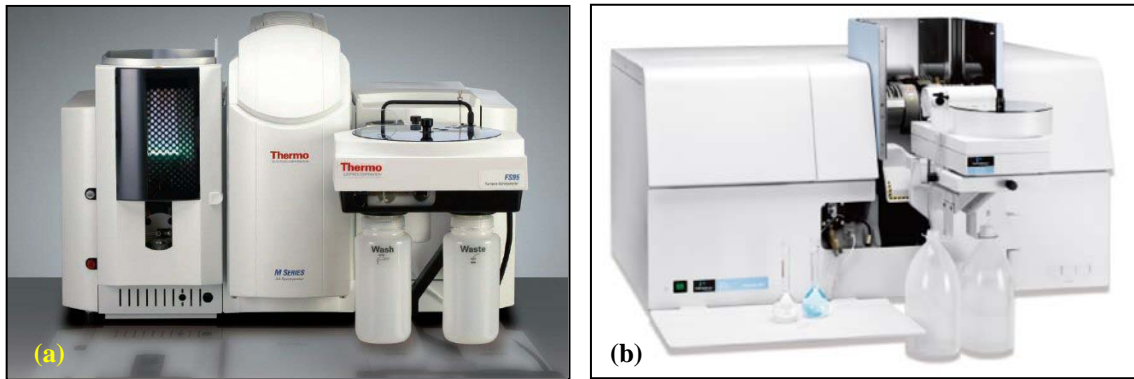


Figura 2-5. Instrumentos de AAS con calentamiento del horno longitudinal (a) y transversal (b).

El uso de dos equipos de absorción atómica con diferente tecnología de calentamiento permite comprobar la capacidad de cada una de ellas para el análisis directo frente a matrices complejas. De esta forma se puede determinar cuál de las dos se adecua mejor al problema planteado.

En cuanto a las condiciones de análisis, se han optimizado inicialmente tanto los programas de temperatura del horno de grafito como el uso de modificadores de matriz. En ambos equipos las señales se han registrado como área bajo pico. Para todos los casos se han utilizado dos etapas de secado de la muestra, teniendo en cuenta que para matrices salinas puede quedar agua ocluida a temperaturas superiores a 100°C. Por otro lado, se ha evaluado la necesidad de utilizar modificadores de matriz o combinaciones de los mismos, teniendo en cuenta el papel que juegan durante la etapa de medida. Así el  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  se ha utilizado para calcinar a mayor temperatura por su papel retenedor del metal reduciendo su volatilidad, mientras que el HF se ha utilizado para eliminar las interferencias producidas por la matriz salina a temperaturas bajas.

### 1. Condiciones de atomización de Mn

En primer lugar para la determinación de Mn en agua no salina, se ha utilizado el equipo que cuenta con calentamiento transversal del horno de grafito, aplicando las condiciones previamente indicadas por el fabricante [18] (Tabla 2-2). De las condiciones iniciales se han eliminando los modificadores de matriz. La exactitud ha sido evaluada comparando los resultados con la muestra de intercomparación CALITAX-07/2A (LABAQUA) de agua natural, cuya concentración de referencia es  $47,8 \pm 4,3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , siendo la determinada en estas condiciones  $47,9 \pm 0,9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  y

ofreciendo una diferencia del -0,21%, por lo que el método puede utilizarse para la determinación de las muestras de agua de río recogidas para este trabajo [19].

Tabla 2-2. Condiciones de análisis de Mn en THGFAAS descritas por el fabricante [18].

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C·s <sup>-1</sup> )	Tiempo (s)	Gas (L·min <sup>-1</sup> )
Secado 1	110	10	20	250
Secado 2	130	15	15	250
Calcinación	1250	10	20	250
Atomización	190	0	3	
Limpieza	2450	1	3	250

Modificadores de matriz: 5 µg Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y 10 µg Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> por 20 µL de muestra.

En cuanto al análisis directo de este metal en aguas con salinidad superior a 1 se tomaron como punto de partida las condiciones aplicadas por Mendiguchía [13] (Tabla 2-3) para análisis por adiciones patrón para calentamiento longitudinal y las aplicadas para agua dulce y descritas anteriormente para el transversal. De este modo se estudió la eficacia del método utilizando el material de referencia certificado SLEW-3 de agua de estuario, obteniéndose diferencias relativas entre la concentración analizada por calibración directa y la certificada superiores al 50%.

Tabla 2-3. Condiciones de análisis de Mn en LHGFAAS descritas por Mendiguchía [13].

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C·s <sup>-1</sup> )	Tiempo (s)	Gas (L·min <sup>-1</sup> )
Secado 1	90	10	30	250
Secado 2	200	5	20	250
Calcinación 1	600	100	40	250
Calcinación 2	900	100	40	250
Enfriamiento	20	0	15	250
Atomización	1800	0	3	
Limpieza	2500	0	3	250

A continuación se planteó la posibilidad de realizar estudios de calcinación-atomización en presencia de modificadores, con el objetivo de eliminar la matriz en condiciones suaves de temperatura y/o poder realizar la calcinación de las muestras a temperaturas superiores sin pérdida de analito. Un paso previo, que ha sido determinante en su selección, es la comprobación de la señal proporcionada por los blancos en presencia de los mismos. Como se puede observar en la Tabla 2-4, el Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> ofrece menor señal para los blancos, mientras que el uso de HF provoca un aumento considerable de la misma, por lo que se ha seleccionado el primero.

Tabla 2-4. Señal de los blancos para Mn en presencia de modificadores de matriz.

Modificador de matriz	Señal (abs.·s)	RSD(%)
Ninguno	0,0026	3,85
5 µg Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,0051	0,00
5 µg HF	0,0291	17,71

Volumen de muestra: 20 µL

La optimización del programa de temperaturas del horno de grafito se ha realizado mediante estudios de calcinación y atomización (Figura 2-6) en presencia de 5 µg Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> para alícuotas de 20 µL de muestras de agua con salinidad 15. Esta optimización se ha realizado tanto para los dos tipos de calentamiento como para las dos correcciones del fondo disponibles. Posteriormente se ha comprobado la aplicabilidad del método frente al material certificado de referencia SLEW-3 de agua de estuario.

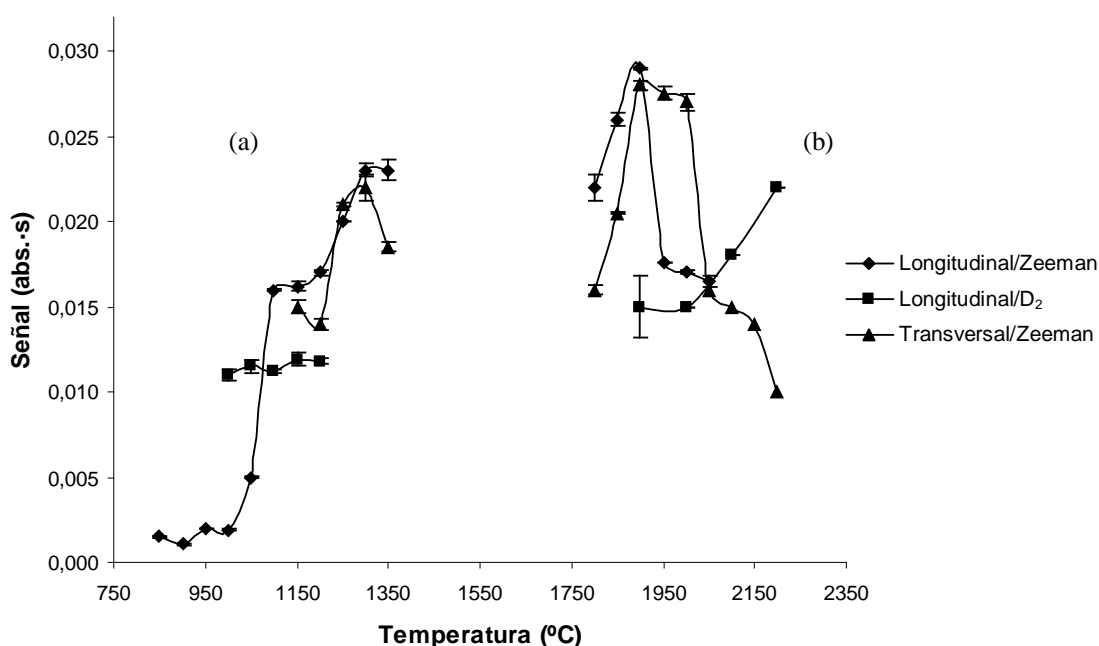


Figura 2-6. Estudio de calcinación (a) y atomización (b) en las distintas condiciones propuestas.

Cabe destacar que cuando se utiliza como corrector del fondo el efecto Zeeman, la temperatura de calcinación óptima es superior a la requerida utilizando la lámpara de deuterio. Por otro lado, se necesita una menor temperatura para conseguir una atomización efectiva en los casos en los que el efecto Zeeman se utiliza como corrección del fondo. Las condiciones óptimas para cada uno de los tipos de calentamiento y sus respectivas correcciones del fondo se muestran en la Tabla 2-5.

Tabla 2-5. Programa de temperaturas optimizado para diferentes condiciones propuestas.

Etapa	Secado1	Secado2	Calcinación		Atomización	Limpieza
Temperatura (°C)	110	130	THGFAAS <sup>1</sup>	1300	1900	2450
			LHGFAAS <sup>1</sup>	1300	1900	
			LHGFAAS <sup>2</sup>	1150	2200	
Rampa (°C·s <sup>-1</sup> )	1	15	10		0	1
Estabilización (s)	20	15	20		3	3
Medida					on	
Flujo de Gas (L·min <sup>-1</sup> )	250	250	250			250

<sup>1</sup> Corrección de fondo, Zeeman.

<sup>2</sup> Corrección de fondo, D<sub>2</sub>.

## 2. Condiciones de atomización de Cu

Como en el caso del Mn, las muestras de agua dulce recogidas para el presente estudio se han analizado utilizando el equipo con calentamiento transversal y aplicando las condiciones descritas por el fabricante [18] (Tabla 2-6), eliminándose también los modificadores de matriz del análisis.

Tabla 2-6. Condiciones de análisis de Cu en LHGFAAS descritas en Perkin Elmer © (2003).

Etapa	Temperatura (°C)	Rampa (°C·s <sup>-1</sup> )	Tiempo (s)	Gas (L·min <sup>-1</sup> )
Secado1	110	10	30	250
Secado2	130	20	15	250
Calcinación	1150	10	20	250
Atomización	1950	0	3	
Limpieza	2450	1	3	250

Modificadores de matriz: 5 µg Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y 5 µg Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> por 20 µL de muestra.

La exactitud de los análisis se comprobó utilizando la muestra de intercomparación CALITAX-04/3B (LABAQUA), con una concentración consensuada de 390±34 µg·L<sup>-1</sup> y para la que se han determinado 414±9 µg·L<sup>-1</sup> con un error relativo del 5,79%. Por lo tanto estas condiciones fueron utilizadas para realizar los análisis de muestras de agua de río.

En muestras salinas, se tomaron de nuevo como punto de partida las condiciones usadas para agua dulce, en el caso del calentamiento transversal y las condiciones descritas por Mendiguchía [13] para el calentamiento longitudinal y el método de las adiciones estándar. En estas circunstancias se observó que los resultados del análisis directo no son satisfactorios, ya que el fondo debido a la matriz hace que se obtengan señales negativas.

Como anteriormente, se ha realizado un estudio de la señal del blanco en presencia de distintos modificadores de matriz, optándose por utilizar HF (Tabla 2-7), ya que la señal del blanco es inferior que para el Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. A partir de aquí se realizó la optimización de los programas de temperatura del horno.

Tabla 2-7. Señal de los blancos para Cu en presencia de modificadores de matriz.

Modificador de matriz	Señal (abs.·s)	RSD(%)
Ninguno	0,0003	28,7
5µg Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,0009	21,73
5µg HF	0,0007	33,33
5µg Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> + 5µg HF	0,0012	4,25

La cantidad añadida de HF se ha optimizado ya que los 5 µg añadidos por muestra inicialmente resultaron insuficientes para reducir los efectos del fondo, obteniéndose los mejores resultados cuando se añadieron 8 µg del mismo (Figura 2-7).

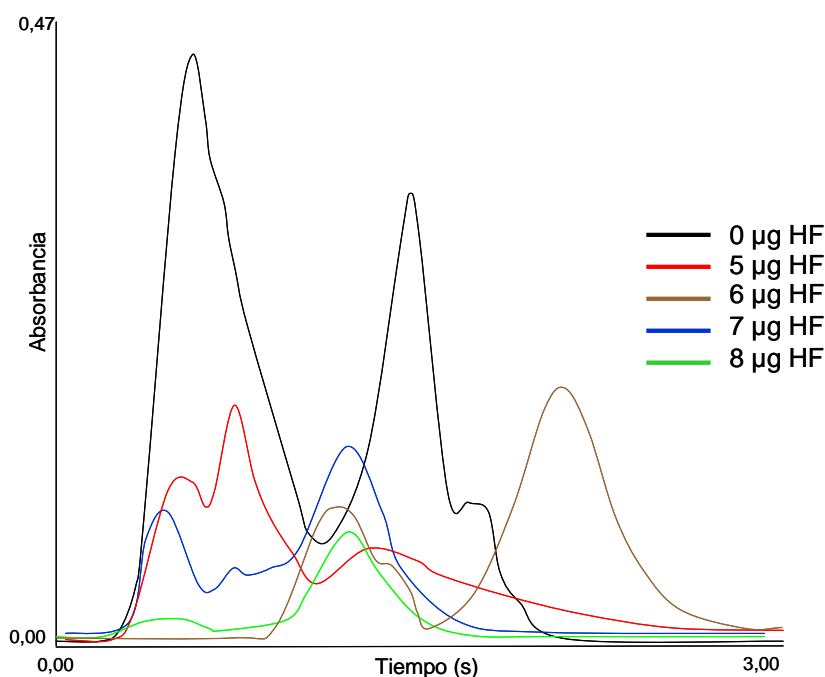


Figura 2-7. Efecto del HF en la señal del fondo.

En estas condiciones se ha realizado el estudio de calcinación-atomización para optimizar el programa de temperatura del horno grafito (Figura 2-8). Se puede comprobar cómo para el uso del calentamiento longitudinal, las temperaturas de calcinación y atomización necesarias para alcanzar condiciones óptimas son más suaves que para el caso del calentamiento transversal.

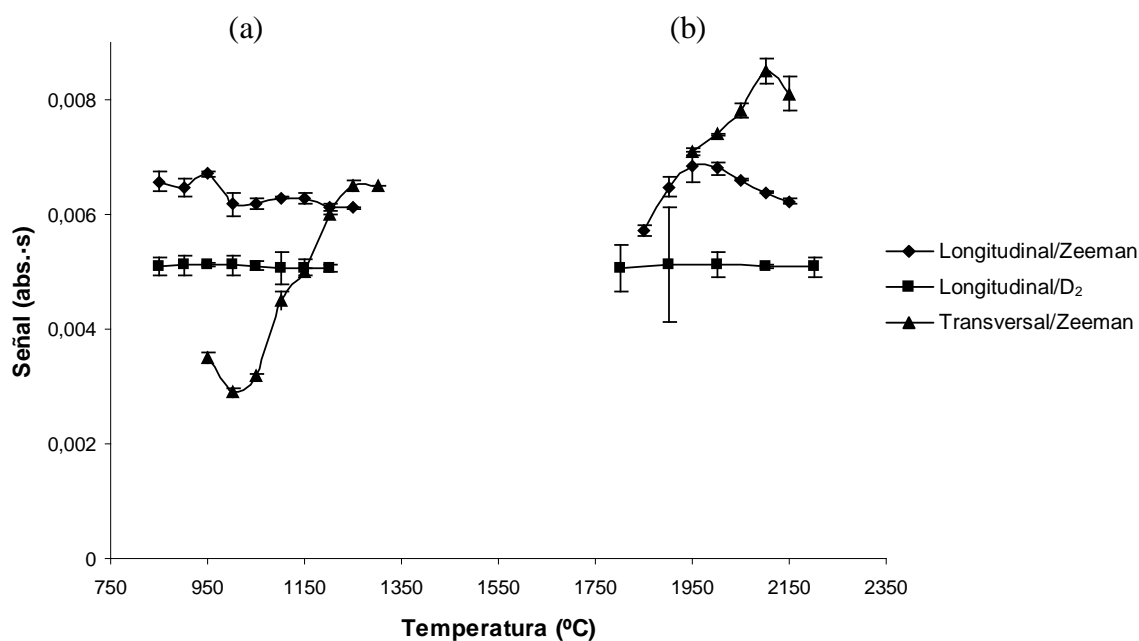


Figura 2-8. Estudio de calcinación-atomización para Cu en las condiciones propuestas.

Estas condiciones deben ser suficientes para obtener buenos resultados en la determinación de Cu, pero se han observado problemas de variabilidad en la señal para una serie de medidas repetidas ( $n=3$ ), con RSD(%) superiores al 10%. Para reducir la dispersión de los resultados se ha estudiado el efecto de la adición de  $\text{Pd}(\text{NO}_3)_2$  ( $5 \mu\text{g}$ ) sobre la señal, ya que éste actúa evitando la dispersión del Cu fuera del tubo de grafito durante la etapa de calcinación. Su aplicación ha permitido obtener valores de RSD(%) inferiores al 5% para tres medidas repetidas.

De esta forma, los programas de temperaturas del horno para ambos tipos de calentamiento utilizados en la determinación de Cu quedan como sigue (Tabla 2-8):

### 3. Efectos de matriz para sistemas de calentamiento transversal y longitudinal

Una vez que se realizó el estudio de optimización química y térmica del método, se evaluó si la determinación de Cu y Mn en estas condiciones se ve influenciada por efectos de la matriz que no hayan sido detectados, para lo que se han realizado los análisis tanto aplicando una recta de calibración externa con patrones acuosos sencillos como por el método de las adiciones patrón a muestras de distinta salinidad procedentes del río Guadalquivir [20].

Tabla 2-8. Programa de temperaturas optimizado para el análisis de Cu en las diferentes condiciones propuestas.

Etapa	Secado1	Secado2	Calcinación		Atomización	Limpieza
Temperatura (°C)	110	130	THGFAAS <sup>1</sup>	1200	2150	2450
			LHGFAAS <sup>1</sup>	950	1950	
			LHGFAAS <sup>2</sup>	950	1950	
Rampa (°C·s <sup>-1</sup> )	1	15	10		0	1
Estabilización (s)	20	15	60		3	3
Medida					on	
Flujo de Gas (L·min <sup>-1</sup> )	250	250	250			250

<sup>1</sup> Corrección de fondo, Zeeman.

<sup>2</sup> Corrección de fondo, D<sub>2</sub>.

La comparación de los resultados para ambas determinaciones se ha realizado mediante un contraste de hipótesis por comparación de medias utilizando el test de la *t-Student* (Tabla 2-9).

Tabla 2-9. Comparación entre la calibración externa y el método de las adiciones estándar.

Elemento	Calentamiento	Corrección de fondo	Modificador	C <sub>Cal. ext.</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>Ad. patrón</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )	t <sub>exp.</sub>
Mn	Longitudinal	Zeeman		1,34±0,13	1,82±0,15	3,00
			Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2,34±0,07	1,81±0,05	8,80
		D <sub>2</sub>		0,59±0,11	0,63±0,11	<b>0,20</b>
			Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,84±0,16	1,79±0,02	<b>0,42</b>
	Transversal	Zeeman		2,05±0,23	1,80±0,19	<b>1,16</b>
			Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,69±0,15	1,63±0,09	<b>0,44</b>
Cu	Longitudinal	Zeeman		0,76±0,02	1,63±0,15	5,85 <sup>1</sup>
			HF-Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,81±0,11	1,53±0,08	14,81
		D <sub>2</sub>		0,46±0,03	1,49±0,05	2,65 <sup>1</sup>
			HF-Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,85±0,02	2,06±0,18	<b>1,61</b>
	Transversal	Zeeman		0,74±0,76	1,54±0,15	1,03 <sup>1</sup>
			HF-Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,50±0,09	1,53±0,12	<b>0,25</b>

t<sub>crítica</sub> (4;0,05)= 2,48.

<sup>1</sup>No supera la prueba F de Snedecor de homogeneidad de varianzas (F<sub>crítica</sub>= 15,44).

En el caso del Mn se puede observar que no existen diferencias significativas entre la aplicación del método de las adiciones estándar y una calibración externa cuando en el calentamiento longitudinal se utiliza la lámpara de D<sub>2</sub> como corrector del fondo, incluso en ausencia de modificador de matriz. Lo mismo ocurre para el calentamiento transversal en las mismas condiciones químicas pero utilizando el efecto Zeeman como corrector del fondo. Esto haría pensar que no aparecen efectos debidos a la matriz en estas situaciones.



Para el Cu se puede comprobar cómo las condiciones térmicas y de corrector del fondo en las que no aparecen diferencias significativas son las mismas que para el Mn, aunque en ambos casos es necesario utilizar HF y Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como modificadores de matriz, confirmando que si no se emplean es recomendable aplicar el método de las adiciones estándar.

La exactitud del método se ha evaluado tanto para los dos tipos de calentamiento como para las dos correcciones del fondo, con el fin de seleccionar el método más adecuado, aplicándose igualmente el método de las adiciones de patrón y la calibración externa. Para ello se utilizaron la muestra de referencia certificada SLEW-3 de agua de estuario (Salinidad 15) y el test de la *t-Student* para contrastar el sesgo de las medidas.

En primer lugar se ha comprobado la exactitud de las determinaciones mediante el método de la adición patrón (Tabla 2-10). Para el caso del Mn se puede observar cómo, para conseguir resultados exactos es necesario aplicar modificadores de matriz. Para el calentamiento longitudinal los mejores resultados se obtienen aplicando la lámpara de D<sub>2</sub> como corrector del fondo, mientras que para el calentamiento transversal el efecto Zeeman funciona correctamente. Para el Cu se ha podido comprobar que es posible realizar los análisis mediante adición patrón de forma exacta, incluso sin necesidad de utilizar modificadores de matriz, excepto para el calentamiento longitudinal combinado con la lámpara de D<sub>2</sub>.

Tabla 2-10. Contraste de exactitud del análisis de Mn y Cu mediante el método de adiciones estándar.

Elemento	Calentamiento	Corrección de fondo	Modificador	C <sub>Adición patrón</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>Certificada</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )	t <sub>exp.</sub>
Mn	Longitudinal	Zeeman		1,82±0,15	1,61±0,11	3,13
			Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,81±0,05		8,94
		D <sub>2</sub>		0,63±0,11		-19,92
			Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,79±0,02		<b>2,24</b>
	Transversal	Zeeman		1,80±0,19		3,28
			Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,63±0,09		<b>0,50</b>
Cu	Longitudinal	Zeeman		1,63±0,15	1,55±0,06	<b>1,31</b>
			HF-Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,53±0,08		<b>0,55</b>
		D <sub>2</sub>		1,49±0,05		-2,94
			HF-Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2,06±0,18		6,90
	Transversal	Zeeman		1,54±0,15		<b>-0,57</b>
			HF-Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,53±0,12		<b>-0,89</b>

t<sub>crítica</sub> (4;0,05)= 2,48.

A continuación se ha realizado el contraste de exactitud mediante aplicación de una recta de calibrado externa con patrones acuosos sencillos. Las condiciones evaluadas son las que no han mostrado diferencias significativas con el método de la adición de patrón, ya que son las que se encuentran, en principio, libres de los efectos de la matriz. Como se puede comprobar, el calentamiento transversal es el único que permite realizar estos análisis para Cu y Mn de forma exacta en agua de estuario, siempre en presencia de los modificadores de matriz correspondientes (Tabla 2-11).

Tabla 2-11. Exactitud del análisis de Mn y Cu en agua de estuario mediante calibración externa.

Elemento	Calentamiento	Corrección de fondo	C <sub>Analizada</sub> (µg·L <sup>-1</sup> )	C <sub>Certificada</sub> (µg·L <sup>-1</sup> )	t <sub>exp.</sub>
Mn	Transversal	Zeeman	1,69±0,15	1,61±0,11	<b>1,20</b>
	Longitudinal	Zeeman	2,34±0,07		23,32
		D <sub>2</sub>	1,84±0,16		3,21
Cu	Transversal	Zeeman	1,50±0,09	1,55±0,06	<b>0,86</b>
	Longitudinal	Zeeman	1,81±0,11		3,42
		D <sub>2</sub>	1,85±0,02		3,67

t<sub>crítica</sub> (4;0,05)= 2,48.

Como se ha comprobado, la determinación directa de estos metales en agua salina es posible utilizando tecnología de calentamiento transversal y en presencia de modificador de matriz. Condiciones éstas que serán las seleccionadas para su posterior aplicación, una vez validadas.

### Validación del método de determinación directa de Cu y Mn

Para poder realizar la validación de un método es necesario conocer una serie de parámetros propios del mismo que permitan evaluar su grado de adecuación al problema, como son: confirmación de identidad, selectividad/especificidad, límites de detección y cuantificación, rangos lineal y de trabajo, exactitud, precisión, robustez, sensibilidad e incertidumbre [14]. A continuación se describe el significado de estos parámetros así como su cálculo y los resultados obtenidos durante la validación del método propuesto.

#### 1. Confirmación de identidad

La confirmación de la identidad es muy importante, ya que es necesario asegurar que la señal producida durante la etapa de medida corresponde al analito y no a otra especie química o física de similares propiedades que pueda ofrecer una señal

coincidente con la de éste. Una forma de realizar la confirmación de la identidad es utilizar varias técnicas para llevar a cabo la determinación del mensurando y comparar los resultados obtenidos [14].

En este caso, para Mn y Cu se han utilizando distintas técnicas para comprobar su identidad. Para el Cu, se ha realizado el análisis de muestras reales de agua de estuario tanto por el método propuesto como por el método validado por preconcentración mediante extracción líquido-líquido con APDC/DDDC [21] seguida de la determinación instrumental en ICP-MS. (Figura 2-9). Para el Mn se ha realizado la comprobación mediante comparación con la determinación directa por ICP-MS (Figura 2-10). En las figuras se presentan los valores de *t-Student* para la comparación de medias respecto a las concentraciones analizadas utilizando ambos métodos. La línea horizontal marca el valor de *t* crítico ( $t_c=2,78; n=4; \alpha=0,05$ ).

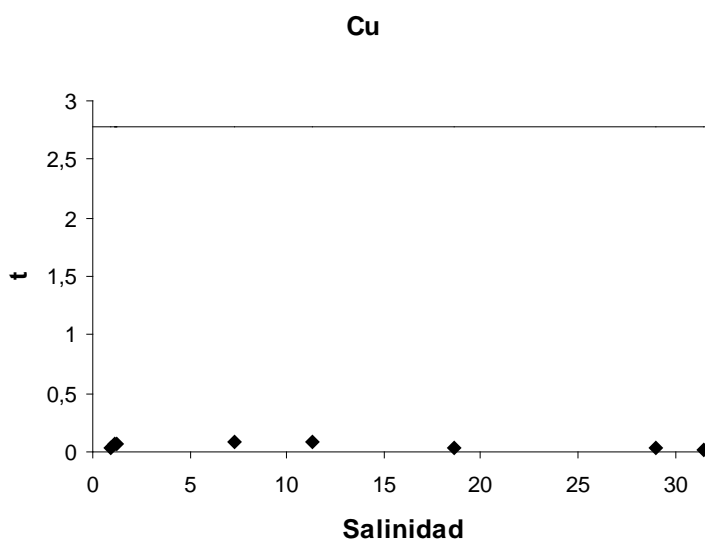


Figura 2-9. Confirmación de la identidad de Cu aplicando extracción líquido-líquido seguida de ICP-MS como referencia.

Como se puede observar, los resultados obtenidos utilizando el método propuesto y las diferentes técnicas analíticas utilizadas para la confirmación de la identidad confirman que la respuesta del método se puede considerar propia de los analitos.

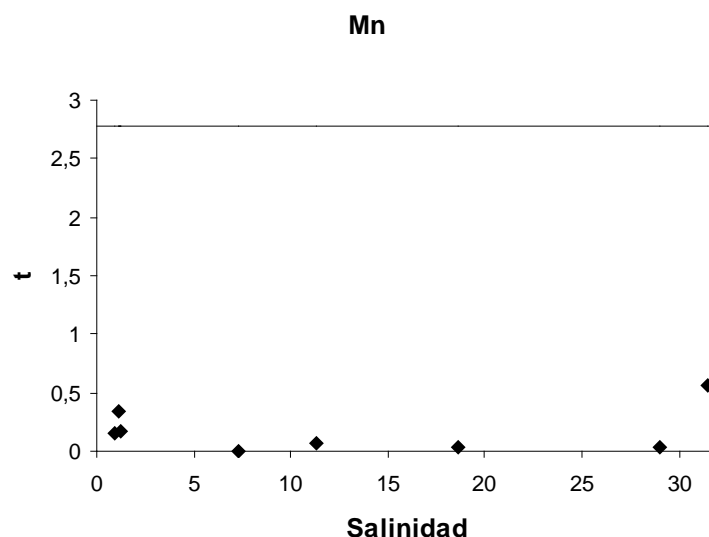


Figura 2-10. Confirmación de la identidad para Mn aplicando ICP-MS como referencia.

## 2. Selectividad y especificidad

Son dos parámetros que se encuentran muy ligados entre sí y con la identidad del analito. Ambos dan una idea de la posibilidad de que la medida se vea afectada o no por interferencias. De este modo, cuanto más selectivo es un método, menos se verá afectado por la presencia de interferencias y mayor confianza generarán los resultados. Se habla de especificidad cuando la selectividad alcanza un nivel del 100%, pero este criterio no es universal y se desaconseja por la IUPAC [22], ya que el hecho de que no se conozcan interferencias para un método no quiere decir que éstas no existan. También es probable encontrar interferencias para un determinado método durante su desarrollo, pero que luego sean muy improbables en muestras reales.

En este caso, el estudio de interferencias viene marcado por las características de la técnica instrumental utilizada, habiéndose además complementado con los estudios anteriores, en los que se comparaban los resultados de la calibración externa con patrones sencillos y el método de las adiciones estándar. En estos se demostró que no existen diferencias significativas entre ambos y que, por tanto, se pueden realizar los análisis en condiciones libres de los efectos de las interferencias de la matriz.

## 3. Límites de detección y cuantificación

Cuando se realiza la medida del mensurando o de una de sus propiedades a niveles suficientemente bajos, es importante establecer cuál es el límite inferior de esta

propiedad al que se puede obtener un resultado en el que se puede confiar. La importancia de establecer este límite inferior radica en que la probabilidad de encontrar el analito no varía de forma brusca de cero a la unidad, sino que aumenta de forma progresiva desde cero.

Aunque no existe un consenso universal en cuanto a la terminología aplicable para este concepto, la ISO [14] propone el término general de mínima concentración neta detectable, aunque la IUPAC recomienda el término valor mínimo detectable. A efectos de validación es suficiente indicar el criterio que se ha seguido para llevar a cabo el cálculo del límite de detección (*LOD*) y es bastante habitual encontrarlo expresado como la concentración a la que se obtiene una respuesta igual a la del blanco más tres veces su desviación estándar (Ecuación 2-1) [20].

$$LOD = \frac{(Y_b + 3S_b) - n}{m}$$

Ecuación 2-1

Donde  $Y_b$  es la señal media de diez réplicas del blanco,  $S_b$  su desviación estándar,  $n$  la ordenada en el origen de la recta de calibrado y  $m$  su pendiente.

Por otro lado nos encontramos con el concepto de límite de cuantificación (*LOQ*) (Ecuación 2-2) que es la concentración de analito más baja que se puede determinar con un nivel de confianza y repetibilidad aceptables. Es muy importante ser consciente de que este valor es indicativo. El valor de límite de cuantificación es superior al de límite de detección y quedaría definido como la concentración necesaria para obtener una respuesta del método igual a la del blanco más diez veces su desviación estándar.

$$LOQ = \frac{(Y_b + 10S_b) - n}{m}$$

Ecuación 2-2

De forma habitual se sigue el criterio de realizar diez medidas independientes del blanco para tener una mayor aproximación a la dispersión de los resultados ofrecidos por el método. Los valores de señal del blanco y los parámetros de calibración utilizados en el cálculo de los límites de detección y cuantificación se muestran en la Tabla 2-12.

Tabla 2-12. Parámetros de la recta utilizados en el cálculo de LOD y LOQ.

Cu					Mn				
$Y_b$	$S_b$	$m$	$n$	$R^2$	$Y_b$	$S_b$	$m$	$n$	$R^2$
0,0012	0,0001	0,0056	-0,0004	0,9989	0,0046	0,0006	0,0165	0,0051	0,9991

$Y_b, S_b$  y  $n$  en (abs·s)  
 $m$  en (abs·s·L· $\mu\text{g}^{-1}$ )

Así, aplicando las expresiones anteriores se ha conseguido obtener un valor de  $LOD$  de  $0,33 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en el caso del Cu y de  $0,08 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para Mn, mientras que para el  $LOQ$  se encuentra en  $0,46 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para el caso del Cu y  $0,33 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para Mn. Estos límites son suficientes para realizar los análisis de estos metales en el sistema ambiental estudiado en el presente trabajo.

#### 4. Intervalos lineal y de trabajo

Siempre que se pretende realizar la cuantificación de un analito es necesario definir el intervalo de concentración o respuesta en el que se realizan las medidas analíticas, por lo que deben definirse los límites tanto inferior como superior entre los que se puede aplicar el método en cuestión. El primero de ellos vendrá dado por el límite de cuantificación, mientras que el segundo vendrá dado por el límite de linealidad, el cual dependerá de la capacidad de respuesta del método.

Es deseable que en el intervalo de trabajo la respuesta sea lineal. En general se emplea el coeficiente de regresión para estimar la calidad de la calibración lineal del método. Esto no siempre proporciona resultados correctos, por lo que es recomendable utilizar otras herramientas, tales como los coeficientes de calidad de la recta (QC%) [23], que establecen el sesgo de la medida de cada patrón, para estimar la bondad de la linealidad del intervalo de trabajo (Ecuación 2-3). Generalmente es necesario utilizar 6 patrones para llevar a cabo un estudio de la linealidad.

$$QC(\%) = 100 \cdot \sqrt{\frac{\left(\frac{Y_i - \hat{Y}}{\bar{Y}}\right)^2}{N - 1}}$$

Ecuación 2-3

Donde  $Y_i$  es la señal medida para un patrón determinado,  $\hat{Y}$  es la señal calculada utilizando una curva de calibración con  $N$  patrones y  $\bar{Y}$  es la señal media de todos los patrones.

El criterio que se ha seguido para estimar el intervalo lineal consiste en considerar lineal la curva de calibrado siempre que la introducción de un nuevo patrón no suponga un QC superior al 5%. En este caso se han obtenido curvas de calibración lineales para ambos metales hasta  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 2-11). El intervalo de trabajo escogido en ambos casos es de 0 a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , ya que en el caso del Cu la concentración de todas las muestras analizadas se encuentra en la zona central de este intervalo y para el Mn ha sido necesario realizar la dilución de las muestras, de modo que la concentración final de las mismas se encuentra comprendida en este rango.

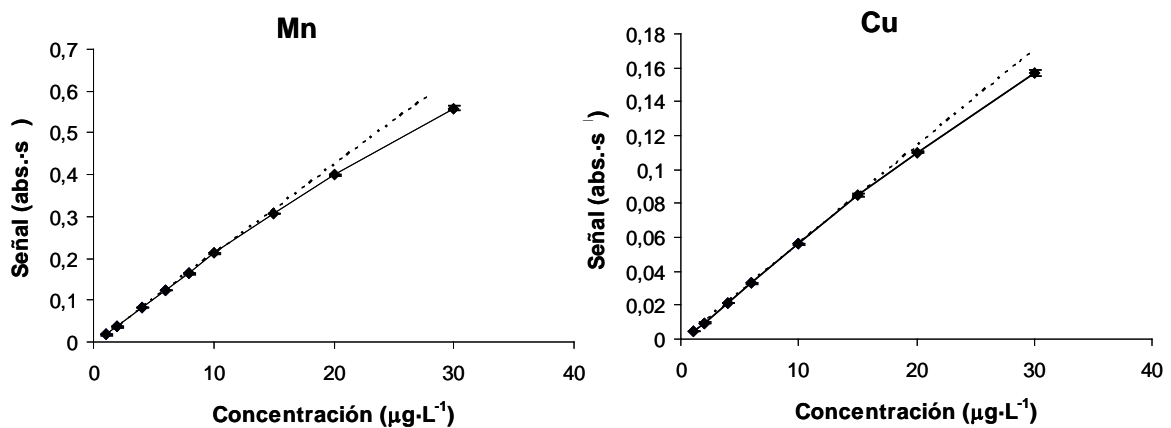


Figura 2-11. Intervalo lineal del método.  $\hat{Y}$  ----  $Y_i$  ——— .

## 5. Exactitud

El concepto de exactitud definido aquí variará con respecto al utilizado tradicionalmente y que se podía confundir con el de sesgo, ya que además de la diferencia del valor determinado con el de referencia, se tiene en cuenta la precisión de las medidas realizadas, englobando tanto los factores aleatorios como sistemáticos que les puedan afectar.

### 5.1. Sesgo

El sesgo se expresa normalmente en forma de porcentaje de recuperación del analito en la muestra (Ecuación 2-4) y existen dos técnicas que permiten estudiarlo: la comparación del valor analizado con el de referencia para un material determinado o la comparación con el valor obtenido por otro método [24]. En cualquier caso, siempre es

recomendable el uso de un material de referencia certificado adecuado, ya que los valores son trazables al Sistema Internacional de Unidades [25].

$$Recuperación(\%) = \frac{C_{Metal\ analizada}}{C_{Metal\ certificada}} \cdot 100$$

Ecuación 2-4

En nuestro caso, el material de referencia ideal debe ser de procedencia natural y lo más parecido posible en cuanto a matriz y concentración a la muestra de interés [19]. Debido a la limitación de existencias o a su difícil adquisición, para los materiales de referencia certificados se pueden utilizar alternativas que permiten llevar a cabo la validación del método como son:

- Adicionar una cantidad determinada de analito de un patrón de referencia certificado a una muestra que no lo contiene.
- Utilizar una muestra bien caracterizada previamente en el laboratorio y utilizarla como referencia.

Como los datos de sesgo se expresan en forma de porcentaje de recuperación, hay que tener en cuenta que consta de dos componentes, uno debido al método y otro al laboratorio. En general la recuperación debida al laboratorio se relaciona con errores sistemáticos, mientras que la mayoría de los errores aleatorios se deben al propio método.

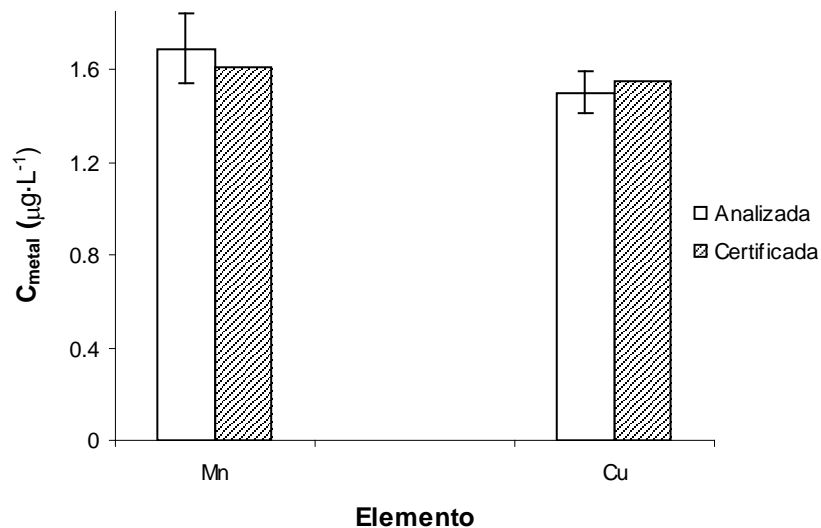


Figura 2-12. Concentración analizada frente a la concentración certificada.



Para la realización de este trabajo se ha contado con un material de referencia certificado para agua de estuario. La muestra empleada es el material SLEW-3, que tiene concentración certificada para Cu y Mn entre otros elementos. Se ha realizado la determinación de estos elementos aplicando el método propuesto, obteniéndose un porcentaje de recuperación del 96,8 % para el Cu y 104,9 % en el caso del Mn. Como se puede observar, la concentración certificada se encuentra dentro de los límites marcados por la desviación estándar de las medidas experimentales para ambos casos (Figura 2-12).

## 5.2. Precisión

La precisión, como ya se ha comentado, da una idea de la dispersión de los resultados obtenidos. Se habla en general de repetibilidad y reproducibilidad, siendo la primera una medida de la precisión en una escala temporal corta, para análisis realizados en un laboratorio y por un mismo analista [14], mientras que la segunda se refiere a análisis realizados por diferentes laboratorios durante una escala de tiempo más amplia, como podrían ser los ejercicios de intercomparación [26]. Como medidas de reproducibilidad intermedia se encuentran todas las realizadas en condiciones comprendidas entre estos dos extremos. Es tan importante el grado de amplitud del estudio de la precisión como la buena definición de las condiciones en las que se calcula. Ambas propiedades se expresan de forma habitual como desviación estándar relativa para los distintos análisis de una misma muestra.

Para la validación del método, se ha realizado un estudio de la variabilidad de los resultados obtenidos para una misma muestra durante un mismo día y para un solo analista, para tener una medida de la repetibilidad del método (Tabla 2-8). En cambio para el estudio de la reproducibilidad se ha aumentado la escala temporal, de manera que se han utilizado los análisis realizados cada seis meses durante dos años (Tabla 2-10).

Tabla 2-13. Estudio de repetibilidad del método para el análisis de Cu y Mn.

Cu		Mn	
Réplica	C <sub>Cu</sub> (µg·L <sup>-1</sup> )	Réplica	C <sub>Mn</sub> (µg·L <sup>-1</sup> )
1	1,43±0,06	1	1,60±0,09
2	1,44±0,13	2	1,64±0,02
3	1,45±0,10	3	1,57±0,11
Repetibilidad (%)	<b>99,54</b>	Repetibilidad (%)	<b>97,42</b>

Tabla 2-14. Estudio de reproducibilidad del método para el análisis de Cu y Mn.

Cu		Mn	
Réplica	C <sub>Cu</sub> (µg·L <sup>-1</sup> )	Réplica	C <sub>Mn</sub> (µg·L <sup>-1</sup> )
Jul-07	1,67±0,03	Jul-07	1,60±0,09
Nov-07	1,45±0,07	Nov-07	1,88±0,02
Jul-08	1,50±0,01	Jul-08	1,69±0,09
Nov-08	1,52±0,07	Nov-08	1,57±0,12
Reproducibilidad (%)	<b>98,22</b>	Reproducibilidad (%)	<b>95,66</b>

## 6. Sensibilidad

La sensibilidad es el gradiente que corresponde a la curva de respuesta del método, dando una idea de la capacidad para discriminar entre cantidades muy similares de analito. Cuanto mayor sea el gradiente, el método ofrecerá una respuesta significativamente distinta para concentraciones más próximas. Cuando se trabaja en el intervalo lineal de un método se puede hablar de que la sensibilidad se corresponde con la pendiente de la curva de calibrado [17]. En este caso hemos visto que la sensibilidad es mayor para el Mn que para el Cu.

## 7. Robustez

Una medida de la bondad de un método analítico es el establecimiento de su aplicabilidad si varían ligeramente las condiciones de aplicación. Hay que tener en cuenta que si ciertos pasos a seguir dentro del procedimiento analítico no están completamente definidos se corre el riesgo de que el método no sea en absoluto aplicable.

Una forma de estudiar la robustez de un método es realizar cambios en las condiciones del mismo e investigar cómo se ven afectados los resultados. De esta forma es posible detectar las etapas críticas del método y controlarlas durante la aplicación para obtener resultados fiables. En nuestro caso se ha tenido en cuenta el efecto del ambiente de trabajo en el laboratorio donde se han realizado los análisis [2]. En este sentido, se ha estudiado el efecto de la evaporación del disolvente de las cubetas de muestra utilizadas en el equipo (Figura 2-13). En esta, se puede observar que tanto para las cubetas de 4 mL como para las de 2 mL la alteración de la muestra por evaporación es continua, por lo que no resulta recomendable mantener las muestras en el carrusel del automuestreador durante más de 120 minutos.

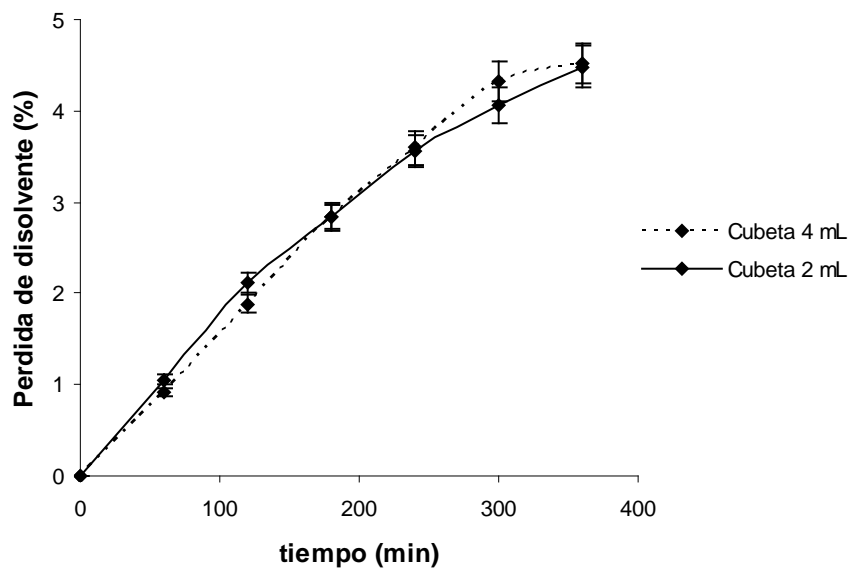


Figura 2-13. Evaporación del disolvente en las muestras colocadas en el automuestreador del equipo de absorción atómica.

## 8. Análisis de recuperación

Cuando se aplica un método analítico no siempre se analiza la totalidad del mensurando. Cuando se pretende analizar el contenido total del mismo es importante poder recuperar una señal producida por todo el analito presente en las muestras.

Se define como recuperación la proporción de mensurando presente o añadido a la muestra que es extraído y se encuentra en forma disponible para ser medido. Una forma sencilla y poco costosa de realizar análisis de recuperación es mediante la adición de una cantidad conocida de patrón puro a muestras con matrices reales [27]. La práctica ideal es adicionar el analito a una muestra en la que no esté presente, pero cuando esto no es posible se puede utilizar una muestra cuya concentración sea conocida. Para comprobar la recuperación se establece que el 100% corresponde a un incremento de la respuesta del método equivalente a la cantidad total de analito añadida y se refiere el resultado medido a esta cantidad.

Esta forma de proceder es análoga al método de las adiciones estándar y hay que tener en cuenta que, el mensurando original de la muestra se encuentra en equilibrio, mientras que el analito añadido no tiene porqué haber alcanzado el equilibrio con la matriz en el momento de la determinación.

Los análisis de recuperación para comprobar los efectos de la matriz se han realizado adicionando una cantidad determinada de analito a las muestras recogidas en

el estuario del río Guadalquivir previamente analizadas, para tener así una matriz idéntica a la de las muestras analizadas en este estudio (Tabla 2-15). Los porcentajes de recuperación obtenidos se encuentran entre los determinados como válidos por la EPA (80%-120%) [28].

Tabla 2-15. Análisis de recuperación para Cu y Mn.

Salinidad	Cu			Mn		
	<sup>1</sup> C <sub>Cu</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	<sup>2</sup> C <sub>Cu</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Recuperación (%)	<sup>1</sup> C <sub>Mn</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	<sup>2</sup> C <sub>Mn</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Recuperación (%)
1,5	6,15	6,19	100,6	10,87	10,58	97,4
3	7,13	6,90	96,8	8,86	8,98	101,3
8	6,15	6,36	103,4	4,87	4,44	91,2
15	4,78	4,20	87,9	5,42	4,54	83,7
17	8,24	8,25	100,1	5,09	4,83	94,9
31	7,52	7,22	96,1	5,05	4,70	93,1
Promedio			<b>97,5±0,05</b>			<b>93,6±0,06</b>

<sup>1</sup> Concentración de analito esperada. <sup>2</sup> Concentración de analito recuperada

## 9. Incertidumbre

La incertidumbre se define según el VIM como un parámetro asociado al resultado que caracteriza la dispersión de los valores que pueden ser atribuidos de forma razonable al mensurando [17]. La incertidumbre se constituye de diversos componentes que pueden ser caracterizados en forma de desviación estándar de medidas experimentales y otros que se atribuyen a datos tomados de la bibliografía o de la experiencia. Los primeros se conocen como componentes tipo A y los segundos como tipo B [14].

Hay que tener en cuenta que a pesar de las connotaciones negativas que pueda tener la palabra incertidumbre, ésta no expresa duda sobre la validez de las medidas realizadas, sino que por el contrario, su establecimiento proporciona una mayor confianza en los resultados ofrecidos. Por eso es importante distinguir entre incertidumbre y error, ya que el error se refiere a la diferencia del valor medio observado con respecto del valor verdadero [20] y por tanto los resultados, si el error es conocido, pueden ser corregidos matemáticamente. Por otro lado nos encontramos que la incertidumbre tiene forma de rango, dentro del que se encuentran todos los posibles valores del mensurando para un nivel de confianza dado y, por tanto, no se puede utilizar para corregir un resultado analítico.

La incertidumbre debe recoger todos y cada uno de los factores que puedan provocar variabilidad en los datos obtenidos aplicando el método en cuestión, por lo que cada uno de los pasos y condiciones del proceso analítico son fuente de incertidumbre [29].

Cuando se evalúa la incertidumbre global de una medida es necesario tener en cuenta cada uno de sus focos y tratarlos de forma independiente, para obtener la incertidumbre relativa a cada uno de ellos. Cuando ésta se corresponde con la desviación estándar de medidas repetidas se conoce como incertidumbre estándar ( $u_s$ ). Una vez que se ha calculado la incertidumbre estándar de cada foco, éstas se combinan para obtener el valor de incertidumbre combinada ( $u_c$ ).

Para la presentación de los datos obtenidos después de la aplicación del método en cuestión se utiliza la incertidumbre expandida ( $U$ ), que ofrece un intervalo en el que la confianza de que se encuentre el valor de referencia es mayor. Se obtiene multiplicando la  $u_c$  por un factor de cobertura  $k$ , que para un nivel de confianza del 95% suele tomar un valor próximo a 2.

Para poder llevar a cabo la estimación de la incertidumbre de una medida es necesario seguir una serie de pasos, como son: la definición del mensurando, la identificación de los focos de incertidumbre, la cuantificación de la incertidumbre de cada etapa del análisis y el cálculo de las incertidumbres combinada y expandida. Además, hay que presentar los resultados en un lenguaje universal, que no dé lugar a confusión [30].

### 9.1. Identificación de los focos de incertidumbre

El objetivo fundamental de este paso es identificar los puntos del proceso analítico que son susceptibles de aportar incertidumbre al resultado. Una forma práctica y sencilla de identificarlos es utilizar la expresión matemática empleada para el cálculo final del mensurando, donde se encuentren todos los parámetros utilizados para llegar al resultado final. También hay que tener en cuenta aquellos factores que afecten de forma indirecta al mensurando, pero que no aparecen de forma explícita en la ecuación del modelo.

Para controlar cuáles son los focos de incertidumbre resulta muy útil también, una vez establecido el modelo matemático, el uso de diagramas de causa efecto, también

conocidos como de espigas de pescado, donde se puede observar cómo se relacionan unos parámetros con otros y su influencia en la incertidumbre final [29].

Algunos de los principales efectos a considerar pueden resumirse como sigue:

- Muestreo: suele estar afectado por las variaciones aleatorias entre las distintas muestras.
- Condiciones de almacenamiento: considerando tanto el tiempo como las condiciones de conservación de las muestras.
- Instrumentación: es necesario controlar las condiciones de uso de los instrumentos, así como el sesgo y precisión de los mismos.
- Pureza de los reactivos: que viene en general dada como un contenido inferior a una cantidad determinada en impurezas.
- Condiciones de medida: es muy importante utilizar material apropiado y en las condiciones en las que fue calibrado.
- Efectos de la muestra: efectos de la matriz, sobre todo en los análisis de recuperación.
- Efectos computacionales: teniendo en cuenta sobre todo el modelo de calibración utilizado.
- Corrección del blanco: tanto del valor del blanco como de la corrección aplicada a las muestras.
- Efectos debidos al analista: bien por inexperiencia, interpretación diferente del método, etc.
- Efectos aleatorios: cada vez que se realiza una medida se encuentran presentes este tipo de efectos. Se puede decir que son inherentes al hecho de medir.

El método propuesto presenta una serie de etapas que pueden introducir incertidumbre a los resultados. En principio se deben tener en cuenta tanto la pureza de las disoluciones utilizadas como las operaciones de preparación de las muestras y patrones, para terminar con la determinación instrumental. Además, debe considerarse el efecto de la temperatura en el laboratorio ( $u_{AT}$ ).

Para estudiar el aporte de cada fuente de incertidumbre es necesario que el procedimiento esté perfectamente definido, para además poder reproducirlo [31]. En nuestro caso se podría dividir en varias etapas:

- *Preparación de un patrón intermedio de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$* : Se ha preparado por dilución de un patrón de referencia certificado de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . En primer lugar se ha preparado un patrón de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en un matraz de 25 mL ( $V_{25}$ ) pipeteando  $25 \mu\text{L}$  ( $V_{\mu 25}$ ) y a partir de éste se ha preparado el patrón intermedio en un matraz de 25 mL.
- *Preparación de los patrones de calibración*: Los patrones de calibración se han preparado a partir del patrón intermedio, utilizando el automuestreador del equipo de AAS (AAAnalyst 800), por dilución.  $V_{\text{inyec.}}$  es el volumen final de disolución, mientras que  $V_{\text{dil.}}$  es el volumen de diluyente empleado en la preparación de los patrones y  $V_{\text{patrón}}$  corresponde al del patrón intermedio.
- *Determinación instrumental*: Consiste en registrar la señal ofrecida tanto por los patrones como por las muestras tras el proceso de secado-calcinación-atomización en el horno de grafito. Siendo  $S$  la señal para cada una de las disoluciones medidas.
- *Expresión de los resultados*: Aplicando la calibración lineal y mediante el método de interpolación se ha calculado la concentración de metal en las muestras.

A continuación se muestra el diagrama de propagación de la incertidumbre a lo largo del proceso analítico descrito (Figura 2-14):

## 9.2. Cuantificación de la incertidumbre en cada etapa del análisis

Una vez que se han identificado los posibles focos de incertidumbre, el siguiente paso es cuantificar su aporte. Durante el proceso de desarrollo y validación del método analítico se genera una gran cantidad de información que puede ser utilizada para calcular la incertidumbre, aunque en general es necesario llevar a cabo algunas experiencias adicionales [31].

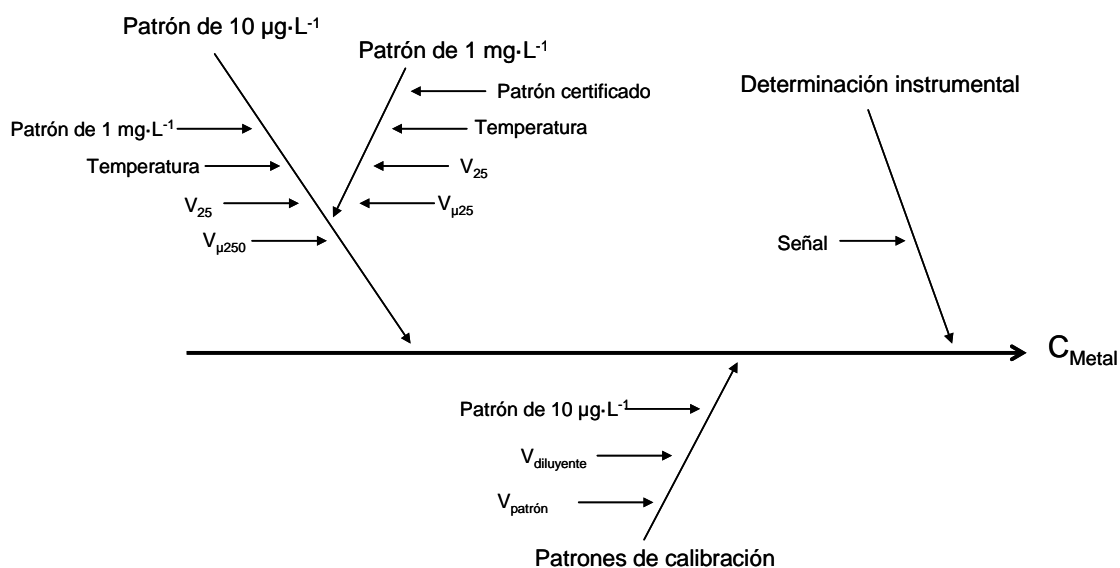


Figura 2-14. Diagrama causa-efecto de propagación de la incertidumbre.

Para que estos datos previos, procedentes del desarrollo del método, puedan ser utilizados hay que demostrar su validez. Esto consiste en comprobar que la precisión de las medidas realizadas durante el desarrollo se mantiene para el proceso de cálculo de incertidumbre, del mismo modo que se mantiene el porcentaje de recuperación (sesgo) cuando se utiliza un material de referencia certificado.

La práctica más habitual es determinar la incertidumbre estándar correspondiente a cada etapa del método y luego combinarlas mediante la ley de propagación de la incertidumbre. Teniendo en cuenta la naturaleza de  $u_s$  se pueden utilizar distintos métodos en su establecimiento:

- Variación experimental de las medidas: se obtiene a partir de la desviación estándar de los resultados observados.
- Datos previos o certificados de calibración y análisis: en este caso hay que tener en cuenta si el valor de dispersión ofrecido aporta el nivel de confianza para el que se han calculado. Si es así se asumirá una distribución rectangular y se dividirá el valor certificado por  $\sqrt{3}$  mientras que si no es así el valor se dividirá por  $\sqrt{6}$ .
- Modelos teóricos que expliquen fenómenos físico-químicos.
- Experiencia previa y simplificaciones del método.

En este caso para determinar  $u_s$  debida a cada etapa se han tenido en cuenta datos certificados correspondientes al material volumétrico, medidas repetidas en el



laboratorio (para incluir los efectos del analista) y el efecto de la variación de la temperatura en el lugar de trabajo (Ecuación 2-5). En el caso de la incertidumbre del material volumétrico, por seguir una distribución triangular, se ha dividido por  $\sqrt{6}$  su desviación estándar, mientras que la de la temperatura, que presenta una distribución rectangular, se ha dividido por  $\sqrt{3}$  [32].

$$u_{\Delta T} = \beta \cdot V \cdot \Delta T$$

Ecuación 2-5

Donde  $u_{\Delta T}$  es la incertidumbre debida a la variación de la temperatura,  $\beta$  el coeficiente de expansión térmica del agua ( $\text{H}_2\text{O} = 2,1 \cdot 10^{-4}$ ) y V el volumen de disolución. En el lugar de trabajo se ha mantenido una temperatura de  $20 \pm 3$  °C.

Teniendo en cuenta todos estos aspectos,  $u_s$  de cada fuente de incertidumbre puede calcularse a partir de la Ecuación 2-6 (Tabla 2-16).

$$u_s = \sqrt{\left(\frac{u_{cert.}}{\sqrt{6}}\right)^2 + (u_{rep.})^2 + \left(\frac{u_{temp.}}{\sqrt{3}}\right)^2}$$

Ecuación 2-6

### 9.3. Cálculo de la incertidumbre combinada y expandida

Una vez que se ha obtenido la contribución individual de cada uno de los focos de incertidumbre, expresada como  $u_s$ , hay que combinarlas mediante la ley de propagación de la incertidumbre para poder calcular la  $u_c$  [29]. De forma general, la relación entre  $u_s$  y  $u_c$ , cuando no existe dependencia entre las variables ( $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$ ) responde a la expresión (Ecuación 2-7):

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1, n} c_i^2 u(x_i)^2} = \sqrt{\sum_{i=1, n} u(y, x_i)^2}$$

Ecuación 2-7

Donde  $x_i$  es cada uno de los parámetros cuya incertidumbre se ha estudiado y  $c_i$  es el coeficiente de sensibilidad, que se describe como la variación de la respuesta con respecto a la variación del parámetro ( $c_i = \delta y / \delta x_i$ ) y  $u(x_i, y_i)$  denota la incertidumbre de  $y$  debida a la incertidumbre en  $x_i$ .

Tabla 2-16. Incertidumbre estándar de cada una de las fuentes identificadas.

Magnitud	valor	unidades	$u_{cert.}$	$u_{rep.}$	$u_{\Delta T}$	$u_s$
C Patrón certificado Cu	1000	mg·L <sup>-1</sup>	1			1
C Patrón certificado Mn	1000	mg·L <sup>-1</sup>	1			1
V <sub>25</sub>	25	mL	4,00·10 <sup>-2</sup>	2,0·10 <sup>-2</sup>	1,57·10 <sup>-2</sup>	2,78·10 <sup>-2</sup>
V <sub>μ25</sub>	0,025	mL	6,25·10 <sup>-4</sup>	4,80·10 <sup>-4</sup>	1,57·10 <sup>-5</sup>	5,40·10 <sup>-4</sup>
V <sub>μ250</sub>	0,25	mL	5,00·10 <sup>-3</sup>	2,59·10 <sup>-3</sup>	1,57·10 <sup>-4</sup>	3,30·10 <sup>-3</sup>
V <sub>inyec.</sub>	0,02	mL	6,00·10 <sup>-4</sup>		1,26·10 <sup>-5</sup>	2,45·10 <sup>-4</sup>
V dil. Patrón 1μg·L <sup>-1</sup>	0,018	mL	5,40·10 <sup>-4</sup>		1,13·10 <sup>-5</sup>	2,20·10 <sup>-4</sup>
V dil. Patrón 2μg·L <sup>-1</sup>	0,016	mL	4,80·10 <sup>-4</sup>		1,01·10 <sup>-5</sup>	1,96·10 <sup>-4</sup>
V dil. Patrón 4μg·L <sup>-1</sup>	0,012	mL	3,60·10 <sup>-4</sup>		7,56·10 <sup>-6</sup>	1,47·10 <sup>-4</sup>
V dil. Patrón 6μg·L <sup>-1</sup>	0,008	mL	2,40·10 <sup>-4</sup>		5,04·10 <sup>-6</sup>	9,80·10 <sup>-5</sup>
V Patrón 1μg·L <sup>-1</sup>	0,002	mL	6,00·10 <sup>-5</sup>		1,26·10 <sup>-6</sup>	2,45·10 <sup>-5</sup>
V Patrón 2μg·L <sup>-1</sup>	0,004	mL	1,20·10 <sup>-4</sup>		2,52·10 <sup>-6</sup>	4,90·10 <sup>-5</sup>
V Patrón 4μg·L <sup>-1</sup>	0,008	mL	2,40·10 <sup>-4</sup>		5,04·10 <sup>-6</sup>	9,80·10 <sup>-5</sup>
V Patrón 6μg·L <sup>-1</sup>	0,012	mL	3,60·10 <sup>-4</sup>		7,56·10 <sup>-6</sup>	1,47·10 <sup>-4</sup>
V Patrón 10μg·L <sup>-1</sup>	0,02	mL	6,00·10 <sup>-4</sup>		1,26·10 <sup>-5</sup>	2,45·10 <sup>-4</sup>
C Cu certificada	1,55	μg·L <sup>-1</sup>	0,06			0,06
C Mn certificada	1,61	μg·L <sup>-1</sup>	0,11			0,11
S patrón Cu 1μg·L <sup>-1</sup>	0,0048	abs.·s		0,0001		0,0001
S patrón Cu 2μg·L <sup>-1</sup>	0,0096	abs.·s		0,0002		0,0002
S patrón Cu 4μg·L <sup>-1</sup>	0,0215	abs.·s		0,0001		0,0001
S patrón Cu 6μg·L <sup>-1</sup>	0,0328	abs.·s		0,0001		0,0001
S patrón Cu 10μg·L <sup>-1</sup>	0,0560	abs.·s		0,0006		0,0006
S muestra Cu	0,0078	abs.·s		0,0002		0,0002
S patrón Mn 1μg·L <sup>-1</sup>	0,0169	abs.·s		0,0005		0,0005
S patrón Mn 2μg·L <sup>-1</sup>	0,0358	abs.·s		0,0025		0,0025
S patrón Mn 4μg·L <sup>-1</sup>	0,0826	abs.·s		0,0004		0,0004
S patrón Mn 6μg·L <sup>-1</sup>	0,1244	abs.·s		0,0001		0,0001
S patrón Mn 10μg·L <sup>-1</sup>	0,2123	abs.·s		0,0020		0,0020
S muestra Mn	0,0305	abs.·s		0,0012		0,0012

Cuando existe dependencia entre las variables, la relación es más compleja y queda como (Ecuación 2-8):

$$u(y(x_{i,j,\dots})) = \sqrt{\sum_{i=1,n} c_i^2 u(x_i)^2 + \sum_{\substack{i,k=1,n \\ i \neq k}} c_i c_k \cdot u(x_i, x_k)}$$

Ecuación 2-8

Donde  $u(x_i, x_k)$  es la covarianza entre  $x_i$  y  $x_k$  mientras que  $c_i$  y  $c_k$  son los coeficientes de sensibilidad y tienen el mismo significado que la expresión para variables independientes. La covarianza es la que representa la relación entre  $x_i$  y  $x_k$  mediante el coeficiente de correlación  $r_{ik}$  (Ecuación 2-9) a través de:

$$u(x_i, x_k) = u(x_i) \cdot u(x_k) \cdot r_{ik}$$

Ecuación 2-9

Para poder llevar a cabo el cálculo de la incertidumbre combinada de forma sencilla Kragten [33] diseñó un procedimiento de cálculo basado en la combinación de los distintos valores de incertidumbre estándar mediante hojas de cálculo.

Una vez que se conoce la incertidumbre combinada, resta calcular  $U$ , que se consigue multiplicando la incertidumbre combinada por un factor de cobertura que permita establecer un intervalo de concentraciones en el que se encuentre de forma razonable el mensurando. Para poder escoger el valor de este factor de cobertura  $k$  es necesario definir el nivel de confianza requerido, tener conocimiento de distribuciones subyacentes y cualquier idea sobre el número de valores utilizados para estimar los efectos aleatorios ( $k=2$  para  $\alpha=0,05$ ).

#### 9.4. Método de Kragten para el cálculo de la incertidumbre combinada

Kragten [33] diseñó un método de cálculo que permite determinar de forma simplificada la incertidumbre combinada de una medida tanto si las variables son independientes como si no, utilizando programas de cálculo tipo EXCEL, LOTUS123 o incluso calculadoras programables. Al simplificar enormemente los cálculos se minimizan los riesgos de error y se facilita la comprensión del proceso. La lógica de cálculo que sigue se basa en que la varianza de un número suficiente de medidas sigue una distribución  $\chi^2$ .

Partiendo de la ley de propagación de la incertidumbre en su forma más genérica (Ecuación 2-10):

$$u_y^2 = \left(\frac{\partial y}{\partial p}\right) \cdot u_p^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial q}\right) \cdot u_q^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial r}\right) \cdot u_r^2 + \dots + 2\rho_{pq} \cdot \left(\frac{\partial y}{\partial p}\right) \cdot \left(\frac{\partial y}{\partial q}\right) \cdot u_p \cdot u_q + \dots$$

Ecuación 2-10

Donde  $\rho$  es el coeficiente de correlación entre las dos variables y se define como (Ecuación 2-11).

$$\rho_{pq} = \frac{cov(p,q)}{\sqrt{S^2(p) \cdot S^2(q)}}$$

Ecuación 2-11

Considerando que el coeficiente de correlación entre variables es despreciable, se puede obtener la siguiente expresión (Ecuación 2-12):

$$u_y^2 = \left(\frac{\partial y}{\partial p}\right) \cdot u_p^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial q}\right) \cdot u_q^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial r}\right) \cdot u_r^2 + \dots$$

Ecuación 2-12

Contando con el valor medio, obtenido a partir de cuatro valores independientes, se puede considerar, utilizando el teorema del límite, que la media sigue una distribución normal y las varianzas una distribución  $\chi^2$  (Ecuación 2-13).

$$\chi_v^2 = v \frac{u^2}{\sigma^2} \Leftrightarrow u^2 = \sigma^2 \frac{\chi_v^2}{v}$$

Ecuación 2-13

Donde  $v$  es el número de grados de libertad de la incertidumbre. Los grados de libertad de  $u_i$  se pueden conocer a partir de los experimentos, mientras que para la varianza su distribución puede desviarse ligeramente de la  $\chi^2$ . A la vista de esta situación, Satterhwaite [34] investigó la distribución de  $u^2$  para los casos de interés práctico y llegó a la conclusión de que para éstos la varianza sigue una distribución  $\chi^2$  (Ecuación 2-14):

$$\sigma_y^2 \frac{\chi_y^2}{v_y} = \left(\frac{\partial y}{\partial p}\right)^2 \cdot \sigma_p^2 \frac{\chi_p^2}{v_p} + \left(\frac{\partial y}{\partial q}\right)^2 \cdot \sigma_q^2 \frac{\chi_q^2}{v_q} + \left(\frac{\partial y}{\partial r}\right)^2 \cdot \sigma_r^2 \frac{\chi_r^2}{v_r} + \dots$$

Ecuación 2-14

Aplicando de nuevo las reglas de la ley de propagación de la incertidumbre y sustituyendo por la incertidumbre estándar a ambos lados de la ecuación (Ecuación 2-15):

$$\left(\frac{\sigma_y^2}{v_y}\right)^2 2v_y = \left[\left(\frac{\partial y}{\partial p}\right)^2 \cdot \frac{\sigma_p^2}{v_p}\right]^2 2v_p + \left[\left(\frac{\partial y}{\partial q}\right)^2 \cdot \frac{\sigma_q^2}{v_q}\right]^2 2v_q + \left[\left(\frac{\partial y}{\partial r}\right)^2 \cdot \frac{\sigma_r^2}{v_r}\right]^2 2v_r + \dots$$

Ecuación 2-15

Por último, sustituyendo  $\sigma$  por su estimador  $u$  se obtiene la ecuación de Satterhwaite para la estimación de los grados de libertad (Ecuación 2-16):

$$\frac{1}{v_y} = \frac{1}{v_p} \left[ \frac{\left(\frac{\partial y}{\partial p}\right)^2 u_p^2}{u_y^2} \right] + \frac{1}{v_q} \left[ \frac{\left(\frac{\partial y}{\partial q}\right)^2 u_q^2}{u_y^2} \right] + \frac{1}{v_r} \left[ \frac{\left(\frac{\partial y}{\partial r}\right)^2 u_r^2}{u_y^2} \right]$$

Ecuación 2-16

El valor de  $v_y$  calculado de esta forma se utiliza para determinar el valor de  $t$  con el nivel de confianza requerido, para establecer el intervalo de valores de la incertidumbre.

Aplicando esta lógica de cálculo se puede llegar al diseño de hojas de cálculo tipo EXCEL, teniendo en cuenta que las derivadas parciales se pueden resolver como incrementos que se ven afectados únicamente por la variable con respecto a la que se realiza la derivada parcial (Ecuación 2-17):

$$\left(\frac{\partial y}{\partial p}\right) \cdot u_p \approx \frac{\Delta y}{\Delta p} \cdot u_p$$

Ecuación 2-17

En nuestro caso se ha utilizado una hoja de cálculo de EXCEL para obtener los valores de  $u_c$  y  $U$ . Así, se determinó la incertidumbre de cada una de las etapas del proceso y se combinaron para obtener la  $u_c$  del método. Los cálculos que se presentan a continuación corresponden a la muestra certificada de referencia SLEW-3. En el ANEXO III se detallan los cálculos realizados para un caso particular.

9.5. Cálculo de la incertidumbre de la determinación de Cu y Mn en agua de estuario mediante (GFAAS)

- Incertidumbre de la preparación del patrón intermedio

El patrón intermedio de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  se ha preparado mediante dilución a partir de un patrón certificado de  $1000\pm 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  tanto para Cu como para Mn, pasando por una disolución intermedia de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tabla 2-17). La ecuación del modelo para el cálculo de la incertidumbre de esta etapa responde a dos diluciones sucesivas (Ecuación 2-18):

$$C_{\text{Patrón } 10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}} = C_{\text{Patrón Certificado}} \cdot \left( \frac{V_{\mu 25}}{V_{25}} \right) \cdot \left( \frac{V_{\mu 250}}{V_{25}} \right)$$

Ecuación 2-18

Tabla 2-17. Incertidumbre debida a la preparación del patrón intermedio.

Elemento	Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$		RSu (%)
Cu	$C_{\text{Patrón certificado}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$1,00 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^3$		0,1
	$V_{\mu 25}$	L	$2,50 \cdot 10^{-5}$	$5,40 \cdot 10^{-7}$		2,16
	$V_{25}$	L	$2,50 \cdot 10^{-2}$	$2,78 \cdot 10^{-5}$		0,11
	$V_{\mu 250}$	L	$2,50 \cdot 10^{-4}$	$3,30 \cdot 10^{-6}$		1,32
	$C_{\text{Patrón } 10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>10,00</b>	$u_c$	<b>0,25</b>	2,54
Mn	$C_{\text{Patrón certificado}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$1,00 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^3$		0,1
	$V_{\mu 25}$	L	$2,50 \cdot 10^{-5}$	$5,40 \cdot 10^{-7}$		2,16
	$V_{25}$	L	$2,50 \cdot 10^{-2}$	$2,78 \cdot 10^{-5}$		0,11
	$V_{\mu 250}$	L	$2,50 \cdot 10^{-4}$	$3,30 \cdot 10^{-6}$		1,32
	$C_{\text{Patrón } 10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>10,00</b>	$u_c$	<b>0,25</b>	2,54

- Incertidumbre de la preparación de los patrones de calibración

La preparación de los patrones de calibración parte de la disolución patrón intermedia preparada anteriormente, por lo que tiene en cuenta la incertidumbre de la misma. Además hay que tener en cuenta que las disoluciones han sido preparadas por el automuestreador del equipo, que presenta una incertidumbre relativa asociada al pipeteo del 3,00% [18]. Teniendo en cuenta que el automuestreador prepara un volumen constante de la disolución a inyectar, variando los volúmenes de diluyente y patrón intermedio en cada caso, obteniéndose la correspondiente ecuación modelo (Ecuación 2-19). A modo de ejemplo se presenta la incertidumbre correspondiente a la preparación de un patrón de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Tabla 2-18).

$$C_{\text{Patrón calib.}} = C_{\text{Patrón } 10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}} \cdot \frac{V_{\text{patrón}}}{V_{\text{patrón}} + V_{\text{dil.}}}$$

Ecuación 2-19

Tabla 2-18. Incertidumbre de la preparación de patrones de calibración.

Elemento	Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$	RSu (%)
Cu	$C_{\text{ Patrón } 10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10	0,25	2,45
	$V_{\text{ dil. Patrón } 1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	L	$1,80\cdot 10^{-5}$	$2,20\cdot 10^{-7}$	1,22
	$V_{\text{ Patrón } 1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	L	$2,00\cdot 10^{-6}$	$2,45\cdot 10^{-8}$	1,22
	$C_{\text{ Patrón } 1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>1,00</b>	$u_c$ <b><math>2,98\cdot 10^{-2}</math></b>	2,98
Mn	$C_{\text{ } 10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10	0,25	2,45
	$V_{\text{ dil. Patrón } 1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	L	$1,80\cdot 10^{-5}$	$2,20\cdot 10^{-7}$	1,22
	$V_{\text{ Patrón } 1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	L	$2,00\cdot 10^{-6}$	$2,45\cdot 10^{-8}$	1,22
	$C_{\text{ Patrón } 1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>1,00</b>	$u_c$ <b><math>2,98\cdot 10^{-2}</math></b>	2,98

Como la incertidumbre de los patrones certificados y del material es la misma para ambos casos, las incertidumbres coinciden hasta este momento.

- Incertidumbre de la concentración de metal en la muestra

La concentración de Cu y Mn en las muestras reales se ha calculado mediante interpolación utilizando la respuesta de los patrones de concentraciones superior e inferior a la muestra (Ecuación 2-20). Las fuentes de incertidumbre en esta etapa son por tanto, la preparación de los patrones de calibración y la señal instrumental de patrones y muestras (Tabla 2-19).

$$C_{\text{muestra}} = \frac{C_{\text{Patrón inf.}} \cdot (S_{\text{Patrón sup.}} - S_{\text{muestra}}) + C_{\text{Patrón sup.}} \cdot (S_{\text{muestra}} - S_{\text{Patrón inf.}})}{S_{\text{Patrón sup.}} - S_{\text{Patrón inf.}}}$$

Ecuación 2-20

Hasta aquí se ha calculado  $u_c$  para el caso del material de referencia SLEW-3 tanto para Cu como para Mn empleando el método propuesto. Se puede ver cómo en ambos casos la incertidumbre combinada residual (RSu (%)) no supera el 10%. Para ofrecer una expresión del dato de concentración final éste debe ir acompañado de  $U$ .

Tabla 2-19. Incertidumbre de la concentración del metal.

Elemento	Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$	RSu (%)
Cu	$C_{\text{Patrón Cu } 1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1,00	$2,98\cdot 10^{-2}$	2,98
	$C_{\text{Patrón Cu } 2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	2,00	$5,78\cdot 10^{-2}$	2,89
	$S_{\text{Patrón Cu } 1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	abs.·s	0,0048	0,0001	2,08
	$S_{\text{Patrón Cu } 2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	abs.·s	0,0096	0,0002	2,08
	$S_{\text{Cu muestra}}$	abs.·s	0,0078	0,0002	1,92
	$C_{\text{Cu muestra}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>1,63</b>	$u_c$ <b><math>4,39\cdot 10^{-2}</math></b>	<b>2,69</b>
Mn	$C_{\text{Patrón Mn } 1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1,00	$2,98\cdot 10^{-2}$	2,98
	$C_{\text{Patrón Mn } 2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	2,00	$5,78\cdot 10^{-2}$	2,89
	$S_{\text{Patrón Mn } 1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	abs.·s	0,0169	0,0005	2,96
	$S_{\text{Patrón Mn } 2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	abs.·s	0,0358	0,0025	6,97
	$S_{\text{Mn muestra}}$	abs.·s	0,0305	0,0012	3,93
	$C_{\text{Mn muestra}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>1,72</b>	$u_c$ <b><math>1,13\cdot 10^{-1}</math></b>	<b>6,62</b>

- Incertidumbre expandida de la determinación directa de Cu y Mn en agua de estuario mediante GFAAS

Una vez que se ha calculado  $u_c$ , se puede calcular  $U$  multiplicando por un factor de cobertura que asegure con un 95% de confianza que la concentración de analito se encuentra en el rango determinado por la misma. En este caso el factor de cobertura toma un valor  $k=2$ , obteniéndose para Cu un resultado de  $1,63\pm 0,09 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  frente a un valor certificado de  $1,55\pm 0,12 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , mientras que para el Mn se ha obtenido una concentración de  $1,72\pm 0,23 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , para un valor de referencia  $1,66\pm 0,22 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Como se puede comprobar,  $U$  obtenida para la concentración analizada solapa con la correspondiente a la de la concentración certificada (Figura 2-15).

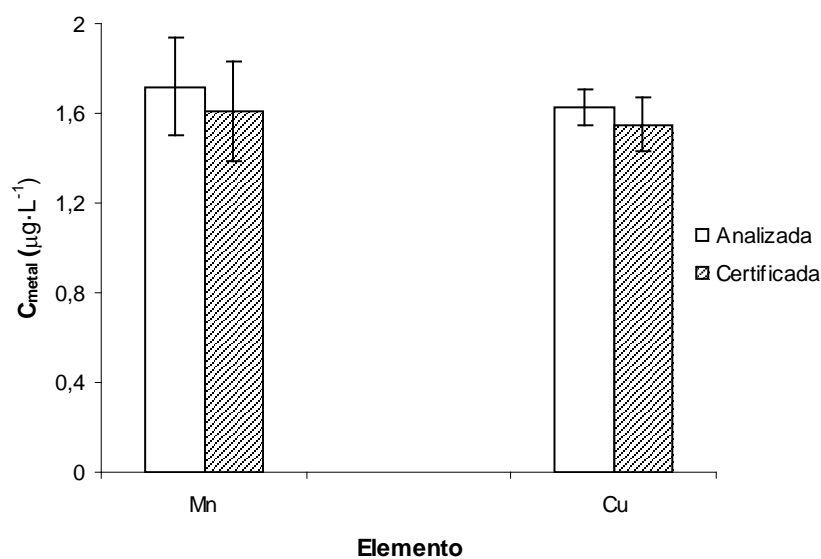


Figura 2-15. Intervalos de concentración acompañados para el valor experimental y certificado.



## 9.6. Contribución de los focos de $u_s$ a la $u_c$ de cada etapa del método analítico

Determinar la contribución de los distintos focos de  $u_s$  a  $u_c$  permite establecer qué puntos del método son susceptibles de mejorar, de acuerdo con la idea de que la validación de un método es un proceso dinámico sometido a continua comprobación y mejora del mismo.

La determinación de estas contribuciones se puede realizar a partir de las diferencias de cuadrados existentes entre el valor medio de la magnitud que se mide y el valor obtenido cuando en su cálculo se tiene en cuenta  $u_s$ . Este es un dato que se obtiene durante la aplicación del método de Kragten. La representación mediante diagramas de sectores permite visualizar cuál es el foco que presenta un mayor peso sobre  $u_c$  en cada etapa.

Tanto en el caso de Cu como de Mn se presentan los mismos valores de  $u_c$  hasta la preparación de los patrones de calibrado, ya que los reactivos, materiales y procedimientos empleados son iguales y presentan la misma  $u_s$ , por tanto se puede realizar una discusión conjunta. En la primera etapa, la preparación del patrón intermedio, se puede observar que la mayor contribución se corresponde con el micropipeteo para la preparación de las disoluciones, siendo ésta mayor cuando se toman volúmenes menores. En la etapa de preparación de patrones de calibración, la mayor proporción es debida al patrón intermedio, aunque la que se debe al pipeteo del automuestreador no es despreciable (Figura 2-16).

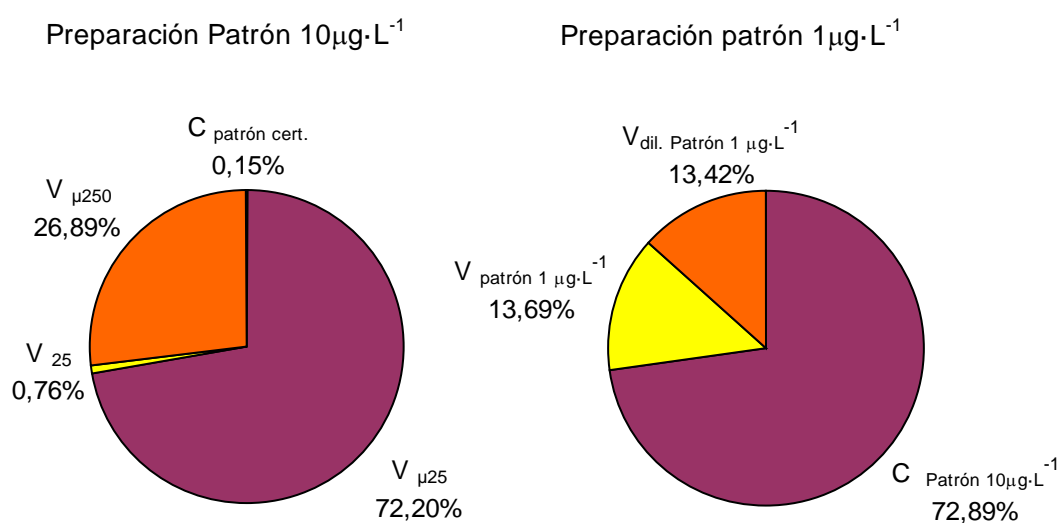


Figura 2-16. Contribución a la incertidumbre de la preparación de los patrones

Aunque la etapa de determinación instrumental para ambos metales es diferente, su contribución muestra factores comunes en ambos casos. Como se puede comprobar la mayor carga para los dos metales viene dada por la señal de los patrones y la muestra, muy por encima de la preparación de los patrones de calibración (Figura 2-17). Además, debido a la mayor dispersión en los datos de señal para el patrón de  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , su contribución es mayoritaria en el caso del Mn. Para el caso del Cu, la señal de la muestra es la que presenta la mayor contribución.

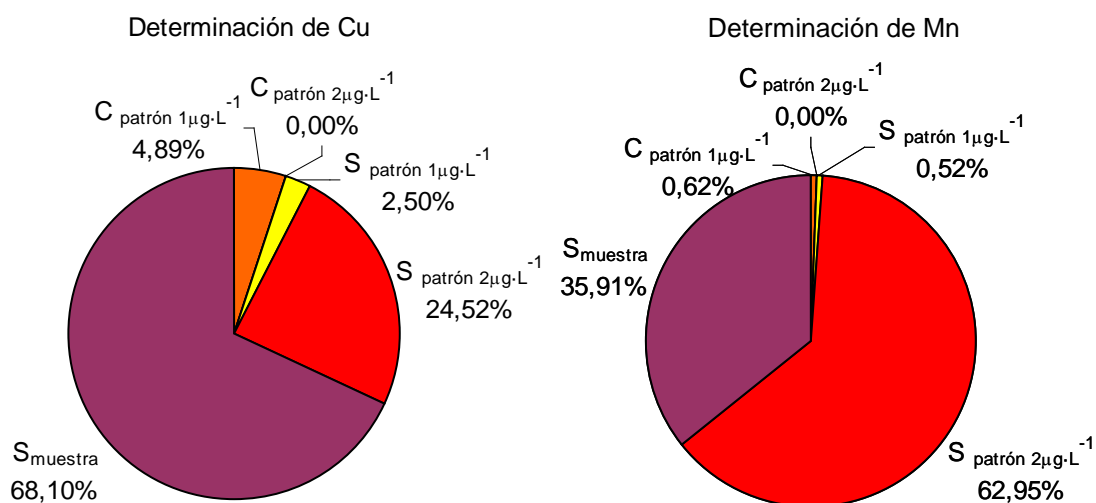


Figura 2-17. Contribución de la determinación instrumental a la incertidumbre para ambos metales.

### 9.7. Estimación de la incertidumbre para el método de las adiciones patrón

Del mismo modo que se ha realizado el cálculo de  $u_c$  para la determinación de Cu y Mn en agua de estuario mediante calibración externa con patrones acuosos sencillos, se ha determinado la que ofrece el método de la adición patrón. Para estas estimaciones se han utilizado las distintas condiciones de análisis para las que se ha demostrado anteriormente que se obtienen resultados exactos.

La estimación de  $u_c$  se ha realizado por interpolación entre la muestra analizada y una adición de patrón. En primer lugar, hay que establecer la incertidumbre propia de la preparación de la adición (Tabla 2-20), ya que el equipo utilizado la realiza añadiendo a una alícuota de  $20 \mu\text{L}$  de muestra, una cantidad de patrón intermedio ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) suficiente para alcanzar la concentración que se quiere adicionar (Ecuación 2-21), en

este caso  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Para el cálculo de  $u_c$  del patrón intermedio se han utilizado los mismos datos que para la determinación directa:

$$C_{\text{Adición}} = \frac{C_{\text{Patrón } 10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}} \cdot V_{\text{Adición}}}{V_{\text{Adición}} + V_{\text{inyec.}}}$$

Ecuación 2-21

Tabla 2-20. Incertidumbre de la preparación de la adición.

Elemento	Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$	RSu (%)
Cu	$C_{\text{Cu Patrón } 10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10,00	0,25	2,45
	$V_{\text{inyec.}}$	L	$2,00 \cdot 10^{-5}$	$2,45 \cdot 10^{-7}$	1,22
	$V_{\text{adición}}$	L	$2,00 \cdot 10^{-6}$	$2,45 \cdot 10^{-8}$	1,22
	$C_{\text{Cu adición}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>0,91</b>	$u_c$ <b><math>2,7 \cdot 10^{-2}</math></b>	<b>2,98</b>
Mn	$C_{\text{Mn Patrón } 10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10,00	0,25	2,45
	$V_{\text{inyec.}}$	L	$2,00 \cdot 10^{-5}$	$2,45 \cdot 10^{-7}$	1,22
	$V_{\text{adición}}$	L	$2,00 \cdot 10^{-6}$	$2,45 \cdot 10^{-8}$	1,22
	$C_{\text{Mn adición}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>0,91</b>	$u_c$ <b><math>2,7 \cdot 10^{-2}</math></b>	<b>2,98</b>

En segundo lugar, aplicando la ecuación modelo de la interpolación (Ecuación 2-22) para una adición, es decir un punto, se ha estimado la  $u_c$  de la concentración de metal en la muestra. Como ejemplo se ha utilizado el resultado obtenido para la muestra certificada de referencia SLEW-3 (Tabla 2-21).

$$C_{\text{Metal}} = \frac{S_{\text{muestra}} \cdot C_{\text{Adición}}}{S_{\text{Adición}} - S_{\text{Muestra}}}$$

Ecuación 2-22

Tabla 2-21. Incertidumbre de la interpolación.

Elemento	Magnitud	Unidades	Valor	$u_s$	$u_s$ (%)
Cu	$C_{\text{Cu adición}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0,91	$2,7 \cdot 10^{-2}$	2,98
	$S_{\text{Cu adición}}$	$\text{abs}\cdot\text{s}^{-1}$	0,0178	0,0057	3,20
	$S_{\text{Cu muestra}}$	$\text{abs}\cdot\text{s}^{-1}$	0,0112	0,0000	0,00
	$C_{\text{Cu muestra}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>1,54</b>	$u_c$ <b>0,13</b>	<b>8,37</b>
Mn	$C_{\text{Mn adición}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0,91	$1,42 \cdot 10^{-2}$	2,98
	$S_{\text{Mn adición}}$	$\text{abs}\cdot\text{s}^{-1}$	0,0502	0,0031	6,20
	$S_{\text{Mn muestra}}$	$\text{abs}\cdot\text{s}^{-1}$	0,0312	0,0008	2,71
	$C_{\text{Mn muestra}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>1,47</b>	$u_c$ <b>0,24</b>	<b>16,07</b>

### 9.8. Comparación de la incertidumbre del método de la adición de patrón y calibración externa

Además de las ventajas experimentales que supone la sustitución del método de las adiciones estándar por la calibración externa, tales como tiempo, gasto de reactivos, etc., hay que tener en cuenta que se produce una disminución de la incertidumbre del proceso.

Para comprobar esto, se ha realizado una comparación de la  $U$  relativa para ambos métodos (Figura 2-18). Para ello, se obtuvieron las concentraciones de Cu y Mn en muestras de distinta salinidad utilizando los dos tipos de calentamiento para las adiciones estándar, mientras que para la calibración externa se ha empleado el calentamiento transversal. Las condiciones de temperatura son las anteriormente optimizadas, y para cada uno de los tipos de calentamiento se han utilizado los modificadores de matriz seleccionados.

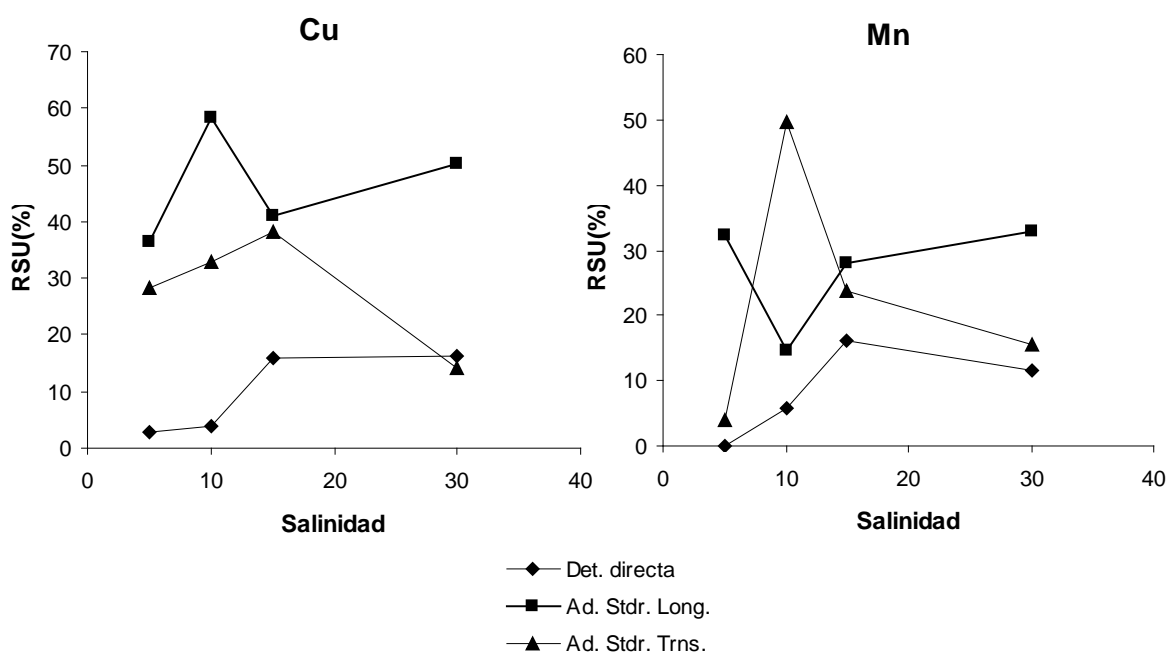


Figura 2-18. Comparación de la RSU (%) generada en la determinación directa y el método de las adiciones estándar.

En la figura se puede comprobar cómo, excepto en uno de los casos analizados, la determinación directa mediante una calibración externa con patrones acuosos sencillos ofrece resultados con menor  $U$  que por el método de las adiciones estándar. Además, se muestra también interesante la situación que presentan los dos métodos de adición entre sí, ya que en general se aprecia una mayor  $U$  cuando se usa el calentamiento

longitudinal. Esto, hace que sea recomendable el uso del calentamiento transversal cuando sea posible, tanto para la determinación directa como por adición.

## Bibliografía

1. L'vov, B.V. (1959) *Inzh. Fiz. Zh.* **2**, 44.
2. Slavin, W; Manning, D.C. and Carnrick, G.R. (1989) *Quality-assurance procedures for graphite furnace atomic-absorption spectrometry*. *Talanta* **36**, 171-178.
3. Slavin, W. (1988) *Graphite furnace AAS for biological materials*. *Science of the Total Environment* **71**, 17-35.
4. L'vov, B.V. (1990) *Recent advances in absolute analysis by graphite furnace atomic absorption by graphite furnace spectrometry*. *Spectrochimica Acta Part B* **45**, 633-655.
5. Slavin, W; Manning, D.C. and Carnrick, G.R. (1989) *Fast Analysis with Zeeman graphite furnace AAS*. *Spectrochimica Acta Part B* **12**, 1237-1243.
6. Mariconti, F. (1992) *Latest innovation in graphite furnace atomic absorption spectrometry technique*. *Microchemical Journal* **46**, 418-421.
7. Welz, B.; Schlemmer, G. and Mudakavi, J.R. (1992) *Palladium-nitrate magnesium-nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry. Part 5. Performnce for the determination of 21 elements*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **7**, 1257-1271.
8. Cabon, J.Y. and Le Bihan, A. (1995) *The determination of Cr, Cu and Mn in seawater with transversally heated graphite furnace atomic absorption spectrometry*. *Spectrochimica Acta Part B, Atomic Spectroscopy* **50**, 1703-1716.
9. López-García, I.; Sánchez-Merlos, M. and Hernández-Córdoba, M. (1999) *Use of hydrofluoric acid to decrease the background signal caused by sodium chloride in electrothermal atomic absorption spectrometry*. *Analitica Chimica Acta* **396**, 279-284.
10. Pi-Guey, S. and Shang-da, H. (1998) *Direct and simultaneous determination of copper and manganese in seawater with a multielement graphite furnace atomic absorption spectrometer*. *Spectrochimica Acta Part B; Atomic spectrometry* **53**, 699-708.
11. Cabon, J.Y. (2002) *Determination of Cu and Mn in seawater by graphite furnace atomic absorption spectrometry with the use of hydrofluoric acid as a chemical modifier*. *Spectrochimica Acta Part B, Atomic Spectroscopy* **57**, 939-950.
12. Cabon, J.Y. (2005) *Improvement of direct determination of Cu and Mn in seawater by GFAAS and total elimination of the saline matrix with the use of hydrofluoric acid*. *Talanta* **62**, 402-407.
13. Mendiguchía, C. (2005) *Utilización de ultratrazas de metales pesados como trazadores de los efectos antropogénicos producidos en ecosistemas acuáticos*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz, Cádiz.
14. *The fitness for purpose of analytical methods* (1998) Eurachem. First Edition.

15. Maroto, A.; Riu, J.; Boqué, R.; Rius and F.X. (1999) *Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process*. *Analytica Chimica Acta* **391**, 173-185.
16. Schmidt, K.S.; Stachel, C.S.; Gowik, P (2007) *In-house validation and factorial effect analysis of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of steroids in bovine muscle*. *Analytica Chimica Acta* **637**, 156-164.
17. International vocabulary of metrology: Basic and general concepts and associated terms (VIM) (2008) JCGM ©.
18. *The THGA Graphite Furnace. Techniques and Recommended Conditions*. Part Number: B 050-5538. Release: 3.0. Publication Date: November 1999. Perkin Elemer ©.
19. *The selection and use of reference materials. A basic guide for laboratories and accreditations bodies*. EEE/RM/062rev3 (2002). IUPAC.
20. Miller, J.N. and Miller, J.C. (2005) *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Fifth edition. Pearson Education Limited, Harlow.
21. Pino, V.; Hernández-Martín, I.; Ayala, J.H.; González, V. and Alfonso, A.M. (2007) *Evaluation of the uncertainty associated to the determination of heavy metals in seawater using graphite furnace atomic absorption spectrometry*. *Analytical letters* **40**, 3322-3342.
22. Vessman, J.; Stefan, R.I.; Van Staden, J.F.; Danzer, K.; Lindner, W.; Burns, D.T.; Fajgelj, A. and Müller, H. (2001) *Selectivity in analytical chemistry: (IUPAC recommendations 2001)*. *Pure and Applied Chemistry* **73**, 1381-1386.
23. Vankeerberghen, P. and Smeyers-Verbeke, J. (1992) *The quality coefficient as a tool in decisions about the quality of calibration in graphite furnace atomic absorption spectrometry*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **15**, 195-202.
24. Maroto, A.; Riu, J.; Boqué, R.; Rius and F.X.; (2003) *Effect of non-significant proportional bias in the final measurement of uncertainty*. *The Analyst* **128**, 373-378.
25. Cuadros-Rodríguez, L.; Gámiz-Gracia, L.; Almansa-López, E.M. and Bosque-Sendra, J.M. (2001) *Calibration in chemical measurement processes I. A methodological approach*. *Trends in Analytical Chemistry* **20**, 620-236.
26. Hibbert, D.B. (2007) Systematic errors in analytical measurements results. *Journal of Chromatography A* **1158**, 25-32.
27. Cuadros-Rodríguez, L.; Gámiz-Gracia, L.; Almansa-López, E.M., Bosque-Sendra, J.M. and Laso-Sánchez, J. (2001) *Calibration in chemical measurement processes II. A metrological approach*. *Trends in Analytical Chemistry* **20**, 195-206.
28. [www.epa.gov/reg3hscd/bf-lr/regional/analytical/metals.htm](http://www.epa.gov/reg3hscd/bf-lr/regional/analytical/metals.htm)
29. *Quantifying uncertainty in analytical measurements* (2000) Eurachem/CITAC, Second Edition. Eds., Ellison, S.L.R., Roslein, M.; Williams, A

30. *Traceability in Chemical measurements* (2003) Eurachem/CITAC. Eds., Ellison, S.L.R.; King, B.; Röslein, M.; Salit, M. and Williams, A.
31. Maroto, A.; Riu, J.; Boqué, R.; Rius and F.X (1999) *Estimating uncertainty in routine analysis*. Trends in Analytical Chemistry **18**, 577-584.
32. Duta, S.; Robouch, P.; Barbu, L. and Taylor, P. (2007) *Practical aspects of the uncertainty and traceability of spectrochemical measurement results by electrothermal atomic absorption spectrometry*. Spectrochimica Acta Part B **62**, 337-343.
33. Kragten, J. (1994) *Tutorial review. Calculating standard deviations and confidence intervals with an universally applicable spreadsheet technique*. The Analyst **119**, 2161-2165.
34. Satterthwaite, F.E. (1941) *Synthesis of variance*. Psychometrika **6**, 309-316.





### **Capítulo 3. Fraccionamiento de Ag en aguas naturales sistemas de membrana líquida.**

El análisis de trazas de metales pesados en aguas naturales, como son las de río y de mar presenta dificultades debidas sus bajas concentraciones y los efectos provocados por la matriz de las muestras. La naturaleza salina de las muestras de agua en la desembocadura de los ríos, que se incrementa al avanzar en el estuario, entorpece el análisis directo de metales. Es por ello que se recurre a diversas técnicas de preconcentración, que en la mayoría de las ocasiones llevan asociada una eliminación de los efectos de la matriz, de entre las que cabe destacar la extracción líquido-líquido y el intercambio iónico, así como más recientemente, las membranas líquidas.

Además es interesante no sólo conocer la concentración metálica total, sino también en qué forma se encuentra el metal en el agua, ya que su toxicidad depende en muchas ocasiones de cómo se presenta frente a los organismos vivos. Por lo tanto, es importante realizar la especiación de los metales pesados en aguas naturales, para tener una idea más fiel a la realidad de su implicación medioambiental. La especiación se define según la IUPAC como “la actividad analítica que consiste en identificar y/o medir la cantidad de una o más especies químicas en una muestra”. En este caso se define especie como “la forma específica de un elemento, diferenciada bien por su composición isotópica, su estado de oxidación, formación de complejos o estructura molecular” [1].

En el presente trabajo hemos concentrado los estudios en la plata, metal generalmente antropogénico en las aguas, y utilizado como trazador de vertidos urbanos [2]. Como para otros elementos, la alternativa más extendida para la determinación de plata en aguas sería la extracción líquido-líquido. Sin embargo presenta inconvenientes como el gasto de reactivos, la producción de residuos y el riesgo de contaminación de las muestras, por lo que se han planteado estudios por extracción en fase sólida, que evita algunos de estos inconvenientes. A pesar de sus ventajas, ésta presenta menor versatilidad en su optimización o adición de reactivos, no siendo por lo tanto la técnica ideal. En este trabajo se ha desarrollado un sistema de membranas líquidas, que posee las propiedades de modulación de la extracción líquido-líquido y que ofrece una alternativa limpia y económica a la extracción en fase sólida, minimizando además la manipulación de las muestras [3].

## 1. Principios y fundamentos de las membranas líquidas

Una membrana es una barrera semipermeable entre dos fases. Para conseguir que exista separación de los componentes de una mezcla hay que conseguir que el soluto deseado la atraviese de forma exclusiva, o que pase a velocidad muy superior a la del resto de los componentes. El transporte a través de membranas líquidas es un proceso que tiene lugar gracias a la existencia de un gradiente químico.

Las membranas líquidas están formadas por disoluciones orgánicas inmiscibles con las fases que separan. Por lo tanto, distintos solutos tienen distinto comportamiento a través de la membrana debido a su solubilidad en la misma y su difusividad en todas las fases. El producto entre la difusividad y la solubilidad se conoce como coeficiente de permeabilidad y es proporcional al flujo de soluto en el sistema. Este coeficiente de permeabilidad ( $P$ ) ofrece una estimación de la velocidad a la que tiene lugar el proceso de transporte continuo [4] (Ecuación 3-1).

$$-Ln[S]_f = \frac{Q}{V_f} \cdot P \cdot t - Ln[S]_{f,0}$$

Ecuación 3-1

Donde  $Q$  es el área efectiva de la membrana,  $V_f$  el volumen de la disolución cargada,  $t$  el tiempo y  $Ln[S]_{f,0}$  el logaritmo de la concentración de soluto en la fase cargada en un tiempo determinado. De este modo, representando la variación temporal de  $Ln[S]_{f,t}$  se puede obtener una relación lineal a partir de cuya pendiente se puede calcular  $P$ .

El transporte de un componente a través de la membrana puede ser ineficiente, principalmente debido a problemas de solubilidad. Para solucionar esto, al igual que en la extracción líquido-líquido, se pueden utilizar sustancias que lo faciliten. Estas sustancias se conocen como extractantes o transportadores y deben reaccionar reversiblemente con el soluto, de forma que se unan a él en la fase cargada, dando lugar a una especie soluble en la membrana y atraviesen la misma; por último, este compuesto se disocia al entrar en contacto con la fase receptora, dejando el metal libre y volviendo a solubilizarse en la membrana para repetir el proceso [5].

Existen cuatro ventajas del uso de extractantes en los sistemas de membrana líquida:

- Se obtienen flujos de soluto elevados.
- Se pueden realizar separaciones de forma selectiva en función de la selectividad de la reacción extractante-soluto.
- Si existe un transporte acoplado, se puede llevar a cabo el transporte de iones.
- Permiten utilizar reactivos costosos, ya que sólo es necesaria una pequeña cantidad de los mismos.

El proceso de transporte a través de membranas líquidas se puede dividir en cinco etapas:

1. Paso de las especies a través de la capa de difusión entre la fase cargada y la membrana.
2. Reacción química en la interfase de la disolución cargada y la membrana.
3. Difusión a través de la membrana orgánica.
4. Reacción química en la interfase entre la membrana y la disolución receptora.
5. Paso a través de la capa de difusión entre la membrana líquida y la fase receptora.

Estas cinco etapas se clasifican en dos tipos de procesos fundamentales: procesos de difusión y procesos de reacción. Los primeros son los que de forma general controlan la velocidad del transporte [6]:

#### 1.1. Difusión:

Los procesos de difusión en los sistemas de membrana pueden mejorarse de dos formas, bien minimizando el grosor de las capas que deben ser atravesadas, o bien aumentando la movilidad de los solutos en ellas, generalmente mediante agitación. Otro factor que afecta a la difusión se relaciona con las características (densidad, viscosidad, etc.) de la fase orgánica, así como, en el caso de los solutos iónicos, con factores como la carga, la fuerza iónica, campos eléctricos, etc.

## 1.2. Reacción química:

La cinética de las reacciones químicas implicadas en el transporte no suele ser tan importante como su termodinámica. Los factores que más afectan en el caso de transporte de cationes son su carga y la disposición del extractante orgánico a la reacción. A pesar de todo, la cinética puede tener igualmente influencia en la posterior aplicabilidad del sistema.

## 2. Tipos de transporte

De forma simplificada, el transporte a través de la membrana puede ser de dos tipos, según se ha mostrado anteriormente, en función de si es necesario utilizar o no un agente químico que mejore el rendimiento del proceso de extracción continua [7]:

- Transporte por permeación: donde el soluto se mueve a través de las fases simplemente por su solubilidad en las mismas. Se pueden diferenciar:
  - Permeación simple: el soluto pasa de una fase a otra hasta alcanzar una situación de equilibrio.
  - Permeación con reacción química en el receptor: cuando se forma un nuevo compuesto en la fase receptora que no es soluble en la fase orgánica, dejándolo atrapado. En este caso no se llega al equilibrio.
- Transporte asistido: en el que se utiliza un agente químico que facilite la entrada del soluto a la fase orgánica. Se pueden comentar varios mecanismos.
  - Transporte facilitado: en este caso se incrementa el rendimiento del proceso de transporte ya que a la permeación simple del soluto hay que añadirle el efecto de la reacción reversible de éste con un extractante que aumenta su solubilidad en la membrana.
  - Contratransporte acoplado: consiste en la reacción del soluto con el extractante dando un complejo que se transporta a través de la membrana. En el contacto con la fase receptora este complejo reacciona con otro agente químico que produce la reacción inversa liberando al soluto.

- Cotransporte acoplado: el transporte del soluto se da de forma conjunta con otro componente de la fase cargada. Este mecanismo puede ser utilizado en el transporte de cationes cuando es necesaria la presencia de un anión para que tenga lugar la reacción con el transportador, para la formación de un compuesto soluble en la fase orgánica en forma de par iónico.
- Transporte primario activo: tiene lugar gracias a reacciones de oxido-reducción que tienen lugar a ambos lados de la membrana.

### 3. Clasificación de membranas líquidas:

Existen tres tipos generales de membrana líquida que dependen de la forma en la que se dispone la fase orgánica con respecto a las disoluciones receptora y cargada: membranas líquidas de volumen (MLV), membranas líquidas soportadas (MLS) y membranas líquidas de emulsión (MLE) [6,8]:

#### 3.1. Membrana líquida de volumen

Consisten en un volumen de disolvente orgánico que pone en contacto y separa dos fases acuosas. Las configuraciones pueden ser varias, desde el diseño en forma de “tubo en U” a la celda de vasos concéntricos (Figura 3-1). En función de la relación de volúmenes entre la fase cargada y la fase receptora se pueden alcanzar diferentes factores de preconcentración para los solutos, además de separarlos de los demás componentes de la disolución cargada. Sus principales ventajas son su simplicidad, versatilidad y su alta reproducibilidad, por lo que son adecuadas para estudios de optimización. Sus principales inconvenientes son que la velocidad del transporte es menor que con los otros tipos, y la dificultad para obtener altos factores de preconcentración.

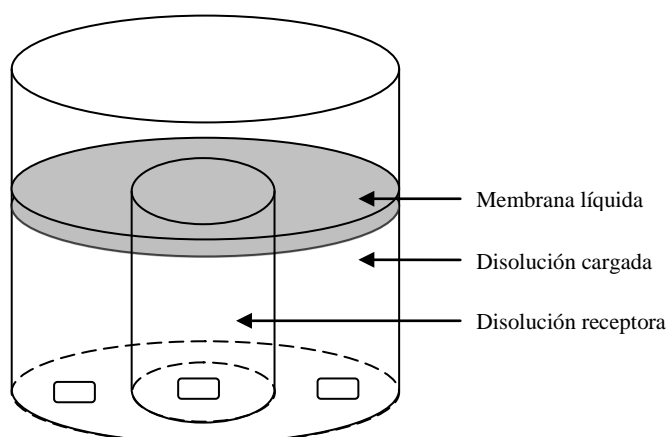


Figura 3-1. Membrana líquida de volumen con configuración del tipo vasos concéntricos..

### 3.2. Membrana líquida soportada

La disolución orgánica se encuentra, en este caso, impregnando un material polimérico microporoso que se sitúa entre las dos fases acuosas. Tienen como principales ventajas una mayor velocidad de transporte, menor uso de disolvente y reactivos, y que son fácilmente automatizables. Presentan la desventaja de ser muy sensibles a variaciones en la agitación de las disoluciones y la hidrofobicidad del disolvente. Para este tipo de membrana hay tres geometrías habituales:

- Plana: donde una lámina delgada de material polimérico se impregna de la fase orgánica y ofrece una relación superficie volumen muy elevada. Cabe destacar dentro de este grupo la configuración en espiral, que consiste en poner dos disoluciones en contacto a ambos lados de una membrana soportada sobre una lámina de soporte microporoso. Las disoluciones se ponen en contacto gracias a unas placas con una espiral grabada en su cara interna y por la que la disolución se mueve impulsada por una bomba peristáltica (Figura 3-2), de forma que permanezca durante un tiempo en contacto con la membrana. De esta forma tiene lugar el transporte a través de la membrana y hacia la disolución receptora [9].

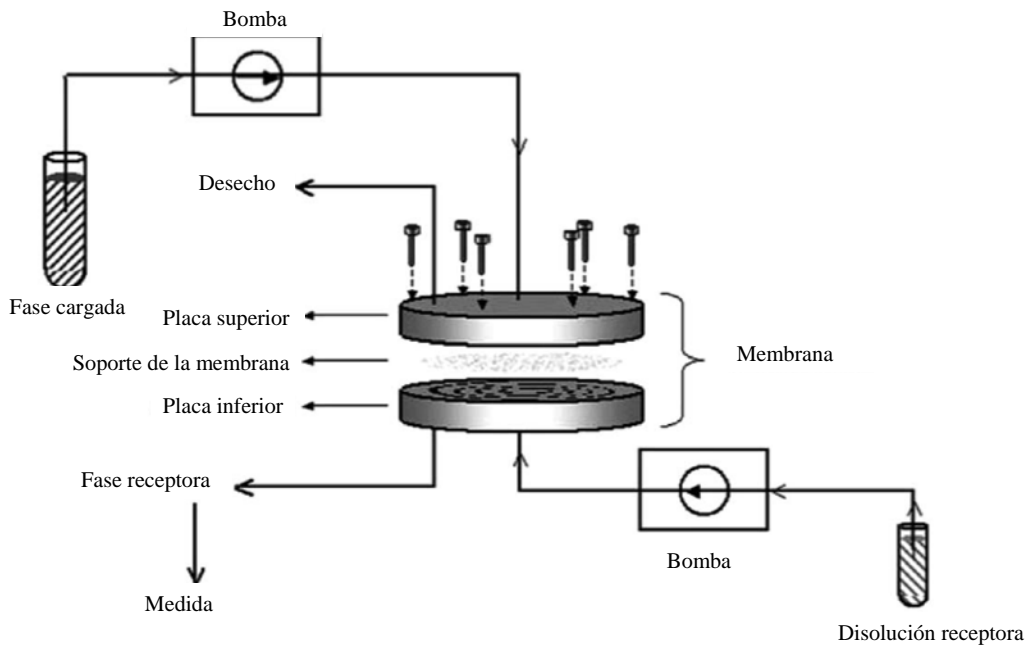


Figura 3-2. Membrana líquida soportada plana en espiral.

- Fibra hueca: donde la fase orgánica está ocupando los poros de un tubo, por cuyo exterior circula la fase cargada, mientras que por el interior pasa la fase receptora (Figura 3-3).

Capilar de fibra hueca

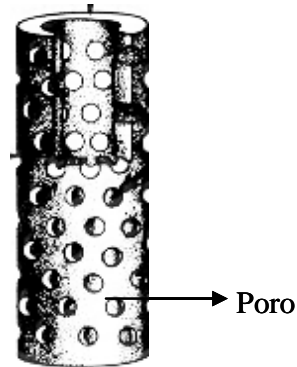


Figura 3-3. Membrana líquida en fibra hueca.

### 3.3. Membrana líquida de emulsión:

En este caso la fase receptora se dispersa sobre la fase orgánica y se estabiliza utilizando un agente tensoactivo (Figura 3-4). La emulsión que se forma encerrando la fase receptora en la orgánica se dispersa sobre la fase cargada y tiene lugar el proceso de



transporte. El principal inconveniente de este tipo de membranas es que son muy inestables, ya que son sensibles a la agitación, las variaciones de fuerza iónica y la viscosidad de las fases acuosas.

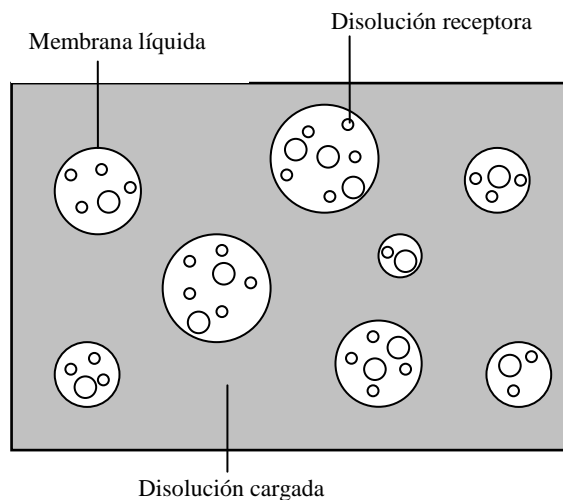


Figura 3-4. Membrana líquida de emulsión.

#### 4. Aplicación de las membranas líquidas:

Las aplicaciones de las membranas líquidas se pueden dividir fundamentalmente en dos: industriales y analíticas. Las primeras tienen como objetivo la recuperación de metales preciosos de efluentes residuales procedentes de los procesos metalúrgicos, mientras que en el caso de las aplicaciones analíticas se busca preconcentrar la especie de interés con el fin de poder determinar concentraciones por debajo de los límites de detección de los instrumentos de análisis, así como eliminar los posibles efectos debidos a la matriz de las muestras.

Una de las principales aplicaciones analíticas es el análisis medioambiental [10] de metales, campo sobre el que se pueden encontrar ejemplos de los tres tipos de membrana líquida descritos, lo que ofrece una muestra de su potencial analítico y aplicabilidad a sistemas reales.

Las MLVs han sido muy utilizadas para el análisis de metales traza en aguas naturales. A pesar de no ofrecer tan buenos factores de preconcentración como las membranas líquidas soportadas, permiten realizar análisis de metales pesados a niveles de las partes por billón y son mucho más estables y reproducibles que los otros tipos. Aparecen además, como una gran herramienta para el estudio de los equilibrios químicos en la membrana y su optimización, siendo las más aplicadas al estudio de metales pesados en agua de mar [11].

Mendiguchía y col. [12] aplicaron un sistema de MLV para la determinación de Cu en agua de mar utilizando el ácido di-(2-etilhexil) fosfórico con keroseno como fase orgánica. Con un factor de preconcentración de 4,30 y un rendimiento del 76,21%, obtuvieron resultados con un error inferior al 10% en el análisis de muestra reales, de agua de mar, entre 2,5 y 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Una muestra de la reproducibilidad de estos sistemas es que la desviación estándar relativa de los resultados obtenidos se encontró en el 0,33%. Este mismo sistema [13], con un factor de preconcentración de 1,66, ha permitido realizar la determinación de Cd en agua de mar de muestras procedentes del Golfo de Cádiz con un error del relativo del 4% para concentraciones alrededor de 1 ppb.

Granado Castro y col. [14] realizaron el análisis de cobre en agua de estuario utilizando piridin-2-acetaldehído benzoilhidrazona como agente transportador para alcanzar límites de detección de 0,24  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Este sistema ofrece aún mayor potencialidad en la determinación de Cd en aguas naturales, para las que se ha obtenido un límite de detección de 6  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y un error relativo del -7,6% en el análisis del material de referencia certificado TMDA-62 de agua natural.

También se ha demostrado la aplicabilidad de estos sistemas a la determinación multielemental de metales pesados en aguas naturales. Granado Castro y col. [15] realizaron un estudio sobre la cinética del transporte de iones  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$  a través de membranas líquidas de volumen aplicando aroilhidrazonas como agentes extractantes y evaluaron el efecto de la salinidad de la fase cargada en el transporte del metal. Mendiguchía y col. [16] lograron llevar a cabo la cuantificación de Cu, Zn, Mn, Al, Cd, Ni y Pb con este tipo de membrana utilizando el ácido di-(2-etilhexil) fosfórico como transportador para muestras de agua de mar, proponiéndolo como una alternativa limpia y sencilla para el análisis multielemental de muestras naturales.

Por lo que respecta a las membranas líquidas soportadas (MLS), ofrecen, en general, mayores factores de preconcentración que las MLVs, pero su optimización y tratamiento son más complejos. Así, por ejemplo, Ndung'u y col. [17] estudiaron la preconcentración de Cu en agua de estuario utilizando una MLS de configuración plana conteniendo una disolución de lasalocid en 2-nitrofenil éter en un soporte de polipropileno (Celgard-2400).

Otros diseños, como el de MLS de fibra hueca se han utilizado tanto para la recuperación como para el análisis de Cr en muestras de agua [18]. La utilización de

Aliquat como agente extractante ha permitido alcanzar factores de preconcentración de 27 veces, para su aplicación en agua de río, para una concentración de  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Este mismo diseño ha sido utilizado por Peng y col. [19] para la determinación de ultratrazas de Cd en agua de mar, llegando a obtener un límite de detección de  $0,8 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  para un factor de enriquecimiento de 387 veces y un porcentaje de recuperación medio del 89% en el análisis de muestras reales. Este tipo de membrana ha sido principalmente aplicado a los estudios de biodisponibilidad de metales que se discuten más adelante.

Finalmente, y a pesar de su mayor inestabilidad, las membranas líquidas de emulsión (MLE) también se han utilizado en la preconcentración de metales de efluentes acuosos. Así el ácido di-(2etilhexil) fosfórico ha sido utilizado por Sabry y col. [20] para eliminar plomo en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, encontrando como mayor dificultad la estabilización de las emulsiones para mantener separadas la fase cargada y la receptora. También en hidrometalurgia se han utilizado este tipo de membranas, en este caso para realizar la separación de Ni y Co en disoluciones amoniacales utilizando como transportador la 8-hidroxiquinolina [21]. Utilizando esta metodología ha sido posible obtener separaciones de Ni y Co con una selectividad superior al 99%.

##### 5. Preconcentración de Ag en aguas naturales mediante membranas líquidas

De entre los contaminantes metálicos que pueden encontrarse en las aguas naturales, la plata es uno de los menos estudiados y que mayor implicación medioambiental presenta. Su importancia estriba en su fácil bioacumulación y su elevada toxicidad para los organismos acuáticos, que se ve superada únicamente por la del mercurio [22]. El ion libre en disolución no es tóxico para el hombre, pero es muy fácilmente bioacumulable y dañino para organismos invertebrados [23]. A la vista de estos datos es necesario encontrar alternativas que faciliten el análisis de este metal en aguas naturales.

Aunque la plata es un metal presente de forma natural en las aguas, lo está a muy bajas concentraciones, salvo en zonas contaminadas. Este metal ha sido utilizado de forma importante en el desarrollo de la industria fotográfica y a pesar de que su uso en estas actividades ha decrecido, en la actualidad se aplica en la industria de componentes electrónicos y como agente biocida en conservas, industria textil y material médico

[24,25]. Debido a sus aplicaciones ha sido utilizado como agente trazador de actividades antropogénicas en cursos de agua [2].

A pesar del interés que presenta su determinación, los estudios en los que se ofrezcan datos de concentración de plata en aguas naturales y marinas son escasos [26]. Esta situación puede deberse principalmente al bajo nivel de concentración que presenta, entorno a pocos  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  en aguas no contaminadas [2,26] y que sólo en aguas afectadas se encuentra a nivel de  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  [27]. Esta característica hace que su determinación no sea incluida en los análisis rutinarios de los laboratorios de calidad de aguas. Para poder realizar este tipo de análisis en condiciones adecuadas es necesario trabajar en condiciones de ultralimpieza, utilizando salas blancas, y minimizar la manipulación de las muestras.

Las bajas concentraciones de plata en muestras naturales hacen que sea necesario el uso de técnicas analíticas muy sensibles e incluso de una preconcentración del metal antes de su cuantificación. Estas determinaciones se han realizado bien utilizando columnas de intercambio iónico para separar el metal de la matriz salina [28] o por extracción líquido-líquido [29]. En este aspecto, las membranas líquidas se pueden utilizar, como se ha podido comprobar en apartados anteriores, para realizar la preconcentración, libre de contaminación, de metales traza en aguas naturales eliminando la matriz.

Estudios anteriores sobre el transporte facilitado de plata se han basado en el uso de reactivos extractantes que contienen átomos dadores de electrones con los que enlazar los iones de  $\text{Ag}^+$ , siendo los más habituales S, O y N [30]. El S es el que con mayor afinidad se une a la Ag, mientras que el N es el que menor actividad presenta en este sentido. Esto se debe a las características de dureza en la escala de Pearson. La plata es un metal ácido relativamente blando, así como el S es una base moderadamente blanda, la afinidad entre ellos es superior a la que se presenta entre este metal y otros dadores de electrones [31,32]. Igualmente, se han descrito diferentes sistemas de membranas líquidas para la preconcentración de plata utilizando reactivos que la enlazan a través de átomos de O ó N.

Sirlin y col. [33] utilizaron un sistema de membrana líquida soportada para preconcentrar plata como parte de un proceso de purificación de  $\text{AgNO}_3$ . Para poder llevar a cabo el transporte del metal utilizaron diferentes agentes extractantes lineales

ricos en nitrógeno (carboxamidas polinitrogenadas) y compuestos macrocíclicos (éteres corona) para transportarlo de forma selectiva, eliminando impurezas de Pd y Cu.

Arous y col. [34] aplicaron diferentes criptandos para el transporte de plata en membranas líquidas soportadas sobre triacetato de celulosa plastificado. Estos compuestos policíclicos tridimensionales en los que el N es cabeza de puente actúan encapsulando al metal en su estructura y favoreciendo así su transporte.

En cuanto al uso de compuestos sulfurados, Lachowicz y col., [35] proponen los politioéteres por su, a priori, mayor afinidad por la plata que los éteres oxigenados. Aplicando este tipo de compuestos al transporte mediante membranas líquidas soportadas consiguió transportar plata de forma selectiva en presencia de Cu, aunque con dificultades en presencia de Pb y Zn [36]. Por otro lado, Kertesz y col., [37] utilizaron sulfuro de octilfenilo para la preconcentración de este metal, pero en membranas con configuración de fibra hueca.

Un reactivo ampliamente utilizado con fines industriales en la recuperación de plata es el sulfuro de triisobutilfosfina (TIBPS) (Figura 3-5) cuyo nombre comercial es Cyanex-471X ©.

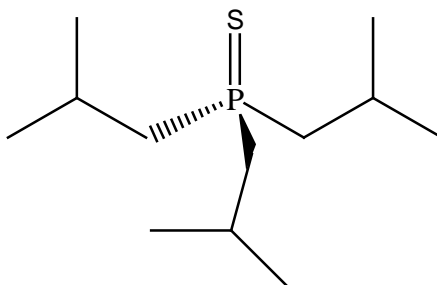
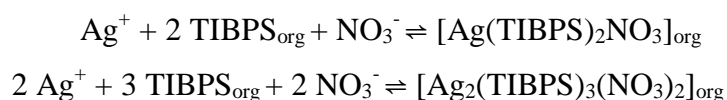


Figura 3-5. Sulfuro de triisobutilfosfina

Este reactivo es un agente solvatante que enlaza a la plata gracias a la presencia del grupo sulfuro en su estructura, dando dos reacciones de distinta estequiometría que en caso de medio nitrato se muestra a continuación [38] (Ecuación 3-2).



Ecuación 3-2

El TIBPS ha sido utilizado de forma habitual en la extracción de plata en medios ácidos procedentes de la industria metalúrgica. Hubicki y col. [39] lo emplearon en la

extracción líquido-líquido de residuos ricos en nitrato procedentes de la disociación del ácido nítrico observando que incluso a una concentración 3M del ácido tiene lugar la extracción, por lo que se podría utilizar en muestras naturales acidificadas con  $\text{HNO}_3$  para su conservación. También estudiaron el efecto de distintos disolventes en el rendimiento del transporte. Como fase receptora, en industria metalúrgica se han utilizados ácidos inorgánicos en concentración suficiente como para destruir la especie soluble en la fase orgánica y retener la plata [39,40].

Vajda y col. [41] realizaron un estudio de transporte de plata en membranas líquidas de volumen a partir de disoluciones cargadas ácidas ( $\text{HNO}_3$ ), estudiando la influencia de la concentración del ácido, las variaciones de la concentración de TIBPS y la capacidad de retención en la fase cargada de distintos tipos de agentes reextractantes que no destruyen al transportador: hidróxido amónico, sulfito sódico y tiosulfato sódico. De esta forma demostraron la aplicabilidad de este sistema reactivo al transporte de plata en membranas líquidas.

#### 6. Uso de membranas líquidas en la especiación de metales en aguas naturales

Conocer las distintas formas en las que los metales se encuentran en disolución es fundamental para entender su comportamiento y toxicidad. Por ejemplo, el Cr (VI) es más tóxico que el Cr(III) [42], la toxicidad de Ag en estuarios depende del valor de n en los complejos  $\text{AgCl}_n^{(n-1)-}$  [23] y la toxicidad de otros metales está relacionada directamente con la formación de compuestos liposolubles [43]. Teniendo esto en cuenta, el desarrollo y la aplicación de sistemas de membrana líquida para la especiación de metales en aguas naturales ha crecido en los últimos años [44].

En el caso de las aguas naturales, las especies más interesantes son aquellas relacionadas con los diferentes estados de oxidación del metal y la formación de complejos, tanto orgánicos como inorgánicos. La especiación de los distintos iones libres en disolución de un metal se puede llevar a cabo mediante el uso de transportadores selectivos en la membrana [45], mientras que para el caso de la formación de complejos, se asume a veces que sólo la fracción libre del metal cruza la misma [46], de forma que los compuestos formados quedan en la fase cargada, dando lugar a un descenso del rendimiento del transporte que puede ser cuantificado. A pesar de esto, existe la posibilidad de un transporte paralelo por difusión simple de compuestos neutros que sean solubles en la membrana. Además siempre hay que tener

en cuenta que aunque el objetivo final sea llevar a cabo el mayor enriquecimiento del metal en la muestra, la adición de reactivos o transportadores en la membrana no debe alterar la distribución de especies en la muestra [47].

#### 6.1. Especiación de cationes metálicos basada en su estado de oxidación.

El estado de oxidación de algunos metales tiene una gran influencia en su actividad biológica, tal es el caso del Cr, que como se ha comentado, en su forma oxidada hexavalente presenta mucho mayor toxicidad que en su forma reducida trivalente [42]. Debido a ello, se pueden encontrar diversos trabajos sobre su especiación, algunos con membranas líquidas, utilizando distintas estrategias. En este sentido, Djane y col. [45] realizaron la separación secuencial de estos dos cationes utilizando dos membranas conectadas en serie. En la primera membrana tenía lugar la extracción de Cr(III) con DEHPA, mientras que en la segunda membrana extraían Cr(VI), en forma de aniones  $\text{HCrO}_4^{2-}$ ,  $\text{CrO}_4^{2-}$  y  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ , que eran separados de la muestra.

Otra forma de llevar a cabo esta separación de especies es mediante el uso de un transportador selectivo para uno de los cationes. Así, Alguacil y col. [48] utilizaron el reactivo Cyanex 923 para el transporte de las especies de Cr(VI), en una proporción 29 veces mayor que Cr(III). Por otro lado, el uso del ácido 13,25,31-calix[6]corona hidroxámico permite realizar el transporte de Cr(III) a través de la membrana [49], realizando paralelamente la determinación de Cr total tras reducir el Cr(VI) a Cr(III).

#### 6.2. Especiación de complejos inorgánicos

Aplicando los sistemas de membrana líquida, también se puede realizar la determinación de la fracción unida a ligandos inorgánicos, siendo ésta fundamental en la toxicidad de algunos metales [50]. En concreto, la determinación de la influencia de la salinidad en su comportamiento es esencial en sistemas estuáricos como el estudiado en este trabajo.

De entre las dificultades de la aplicación de membranas líquidas a la especiación de la fracción ligada a material inorgánica destaca la formación de complejos del tipo  $\text{ML}^0$ , donde L es el ligando, que difunden por la membrana de forma simple. Este fenómeno ha sido observado para el transporte de Cu y Cd en presencia de  $\text{CO}_3^{2-}$ , donde

el compuesto  $\text{MCO}_3^0$  soluble en la membrana difunde a través de ella [51,52]. Conociendo esto, desarrollar sistemas de membrana líquida que no permitan el paso de estas especies será deseable.

Recientemente, se ha desarrollado un sistema basado en membranas soportadas que permite realizar la especiación de Cu, Pb y Cd con 1,10-dioctyl-1,10-diaza-18-corona-6-éter (Kryptofix-22DD) en presencia de aniones como  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{Cl}^-$  [53]. Como resultado, el transporte de los compuestos de tipo  $\text{ML}^0$  formados fue indetectable, permitiendo la determinación del metal libre en las muestras.

### 6.3. Especiación de la fracción biodisponible del metal

La forma de especiación de metales más estudiada es la que responde a la formación de complejos orgánicos, ya que da una idea de la biodisponibilidad del metal, debido a su liposolubilidad [44]. Diversos trabajos se han realizado a este respecto desde que Pathasarathy y col. [43] llevaron a cabo la especiación de Cu en aguas en presencia de oxalato y Tiron, estudiando los complejos formados y su estabilidad frente al transportador Kryptofix-22DD. Utilizando ambos ligandos se observó y cuantificó la disminución del transporte de Cu, permitiendo realizar el cálculo de las constantes de formación de los complejos. Teniendo en cuenta que sólo el Cu libre atraviesa la membrana, pudieron establecer, por primera vez, la aplicabilidad de las membranas líquidas en los estudios de especiación. En particular, se describen los procesos que regulan la resistencia del metal ligado a materia orgánica a pasar por la membrana como la difusión en el seno de la muestra, los procesos de formación/disociación y la difusión a través de la membrana [54].

De la misma forma que para los compuestos inorgánicos, puede tener lugar la formación de compuestos del tipo  $\text{ML}^0$  [51]. Su presencia puede actuar como un auxiliar a la determinación total de metales, porque puede ayudar al enriquecimiento de los mismos, pero hace que en estos casos, los sistemas no sean útiles en especiación. En ocasiones se pueden utilizar programas informáticos y bases de datos para realizar la corrección de la fracción que atraviesa la membrana en forma de  $\text{ML}^0$  [50], aunque no todos los compuestos que se pueden considerar lipofílicos atraviesan necesariamente la membrana, como ocurre con Cu-ácido ftálico [55] o Ni-Imepenen [56].



Existen ligandos como el ácido sulfosalicílico que permiten realizar estudios sobre el comportamiento del Cu en membranas en presencia de materia orgánica. Su interés radica en la formación de complejos de estequiometría 1:1 entre el Cu y este ácido, en función de las condiciones hidrodinámicas del medio [57]. Así, dependiendo de las mismas, se pueden formar compuestos lábiles o inertes, que muestran diferente resistencia al transporte de Cu por el reactivo Kryptofix-22DD. Por un lado se ha observado la disociación de los compuestos lábiles y la liberación del Cu, afectando a la velocidad del transporte, mientras que por otro lado, la formación de compuestos inertes conlleva una disminución del enriquecimiento del metal que puede ser utilizada en el análisis de especiación [58]. En concreto, el estudio del comportamiento de Cu con algunos ligandos lipofílicos es de gran interés debido a que se utilizan de forma conjunta en la formulación de algunos pesticidas [59].

Sin perder de vista la formación de otros complejos, en las aguas naturales, la mayor fracción del metal unida a materia orgánica se encuentra relacionada con las sustancias húmicas, principalmente formadas por ácidos húmicos (AH). De esta forma, se puede tener una idea de la fracción del metal que queda libre en disolución y cuánto está unido a materia orgánica. Teniendo esto en cuenta, Romero y Jönsson [47] realizaron el transporte selectivo de la fracción libre de Cu en presencia de AH utilizando 1,10-dibencil-1,10-diaza-18-corona-6-éter. Además, mediante el uso de membranas de fibra hueca y aplicando 4-(piridil-2-azo)resorcinol como transportador, se puede realizar la detección del complejo Cu-PAR mediante espectrofotometría de absorción molecular [60].

También se han realizado trabajos en los que se ha evaluado la especiación de la fracción libre y orgánica de este metal en aguas de estuario, donde la salinidad podría tener en principio algún efecto sobre la distribución de especies. Este supuesto efecto no ha sido observado y por tanto permite calcular la fracción liposoluble de Cu en aguas salinas [17].

Como se ha podido comprobar, son numerosos los trabajos en los que se ha realizado la especiación de Cu aplicando membranas líquidas, siendo más escasos los centrados en otros metales. Para el caso de Cd y Pb, se han aplicado sistemas de fibra hueca [61]. Bayen y col. [62] llevaron a cabo el transporte de Cd a través de membranas y determinaron su concentración libre en presencia de ligandos orgánicos. Además teniendo en cuenta la analogía entre las membranas líquidas y las membranas celulares,

se puede establecer una aproximación a su biodisponibilidad. Un estudio similar fue desarrollado por Slaveykova y col. [63] para el caso de Pb, cuyo transporte a través de la membrana permitió determinar la fracción metálica ligada a materia orgánica.

Un aspecto menos utilizado de las membranas líquidas en términos de especiación es el análisis de compuestos organometálicos. Como se ha comentado anteriormente, por difusión simple, puede tener lugar el paso de compuestos neutros a través de la membrana. Así, se puede realizar el transporte de compuestos organo-Hg utilizando sales como NaCl o Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para reducir su solubilidad en la muestra y fomentar su paso por la membrana [64]. Aprovechando esta idea, también algunos compuestos del tipo alquil-Pb se puede transportar de forma selectiva a través de membranas de fibra hueca [65].

#### 6.4. Especiación de Ag en aguas naturales.

La necesidad de realizar la determinación de las especies de plata presentes en aguas naturales radica, como se ha comentado anteriormente, en la distinta toxicidad que se puede atribuir a cada una de ellas. De este modo, determinar la fracción de Ag asociada a materia orgánica ofrece una idea de la proporción de la misma que debe ser fácilmente liposoluble. Por otro lado, la determinación de los distintos complejos que la Ag forma con el ion cloruro, es importante debido a que la toxicidad de cada complejo es diferente, siendo el más importante la especie neutra AgCl<sup>0</sup> [23]. Bielmyer y col., [23] han determinado que en organismos acuáticos como el salmón arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) la toxicidad del ion Ag<sup>+</sup> está relacionada con la sustitución del ion Na<sup>+</sup> en la enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa y proponen que un aumento considerable de la concentración de cloruro puede resultar en la formación de especies de Ag del tipo AgCl<sub>n</sub><sup>(n-1)-</sup> que tengan una menor incidencia sobre la vida piscícola. Además se observan diferentes comportamientos en cuanto a su bioacumulación en distintas concentraciones de COD y Cl<sup>-</sup> en aguas naturales, ya que de estos dependerá la formación de los distintos complejos [66].

Si la determinación de Ag en aguas naturales, sobre todo en aguas salinas no ha sido tan estudiada como la de otros metales pesados, la especiación de la misma lo ha

sido aún menos. Miller y Bruland [67] utilizaron la técnica de extracción líquido-líquido con el sistema APDC/DDDC [68] determinando que en agua de mar el factor dominante de la especiación de plata es la concentración de ion cloruro, mientras que el efecto de la materia orgánica no es apreciable. Según Russell y col. [69] esta metodología no es capaz de distinguir la plata ligada a materia orgánica y que esta se extrae por el sistema complejante del mismo modo que la plata libre, por lo que proponen el uso de una resina, que permita retener la plata libre y una posterior elución utilizando ligandos como tiosulfato o cianuro.

Posteriormente Ndung'u y col. [28] llevaron a cabo la especiación de la plata utilizando resina de intercambio aniónico, gracias a la formación de complejos  $\text{AgCl}_n^{(n-1)-}$  a concentraciones elevadas de cloruro, de forma que ,previa digestión de la materia orgánica aplicando radiación UV, consiguieron determinar la concentración de Ag ligada a ella. En agua de mar, se han encontrado diferentes especies de Ag formando complejos inorgánicos y orgánicos, siendo los primeros los más importantes y estando dominados por el ion  $\text{Cl}^-$  como ligando [70] de entre los que cabe destacar los complejos  $\text{AgCl}_2^-$  (46,9%) y  $\text{AgCl}_3^{2-}$  (47,7%) como mayoritarios [71].

En el presente trabajo se ha evaluado el efecto de ligandos orgánicos e inorgánicos en el transporte de Ag a través de la membrana líquida propuesta, de forma que ha sido posible realizar la especiación de diferentes fracciones de plata presentes.

### Desarrollo de un sistema de membrana líquida para la determinación de Ag en aguas naturales.

Basándonos en lo anteriormente expuesto, en el presente trabajo se ha desarrollado un sistema para la determinación de ultratrazas de Ag en aguas naturales, utilizando sistemas de ML junto al reactivo TIBPS, que actúa como agente transportador.

En primer lugar es necesario realizar la optimización del método seleccionado, lo que se ha realizado en dos bloques diferentes, uno de experimentos de extracción líquido-líquido para comprobar la potencialidad del sistema extractante, así como para evaluar posibles interferencias y otro de optimización tanto química como física del sistema de membrana. Por último se ha realizado el análisis de muestras reales para comprobar la aplicabilidad del sistema.

### 1. Extracción líquido-líquido

En este sentido se realizaron pruebas de solubilidad con tres disolventes orgánicos distintos: hexano, dihexileter y tolueno. El tolueno fue el que mostró mejor capacidad para disolver el reactivo TIBPS, mientras que en las disoluciones de hexano se observó la aparición de un precipitado

Los experimentos de extracción líquido-líquido se realizaron del siguiente modo:

1. Preparar una disolución cargada de plata de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  con el pH deseado.
2. Añadir el mismo volumen (5 mL) de fase cargada y de fase orgánica a un tubo con tapón de rosca.
3. Agitar la mezcla durante 20 minutos y dejar separar las fases.
4. Retirar la fase orgánica y determinar la concentración de Ag en la fase cargada después de la extracción por espectroscopía de absorción atómica de llama (FAAS) utilizando una longitud de onda de 328,1 nm.

El rendimiento de la extracción,  $R(\%)$ , se determinó a partir de la disminución de la concentración de Ag en la fase cargada utilizando la expresión (Ecuación 3-3):

$$R(\%) = \frac{C_{Ag_i} - C_{Ag_f}}{C_{Ag_i}} \cdot 100$$

Ecuación 3-3

Donde  $C_{Ag_i}$  es la concentración inicial en la fase cargada y  $C_{Ag_f}$  es la concentración final de Ag en la fase cargada.

Muñoz y col. [38] describieron el equilibrio por el que tiene lugar el transporte de Ag utilizando TIBPS y observaron la necesidad de usar  $\text{NO}_3^-$  como contraión, ya que forma parte del complejo soluble en la fase orgánica. Partiendo de este estudio, en el presente trabajo se ha estudiado el efecto de su concentración en el rendimiento de la extracción de Ag entre 0,05 y 0,2 M, siendo ésta cuantitativa a una concentración de nitrato 0,1M para  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de Ag (Figura 3-6). Conjuntamente se estudió el efecto de la concentración de TIBPS, del que fue necesario emplear una concentración 4,5mM. A la vez que se evaluó el efecto de nitrato y TIBPS se estudió la influencia del pH en los valores de 1 a 9, ya que a pH superior a 8,5 comienza la precipitación de plata en forma

de hidróxido [72]. Se puede observar que la extracción es independiente del valor del pH.

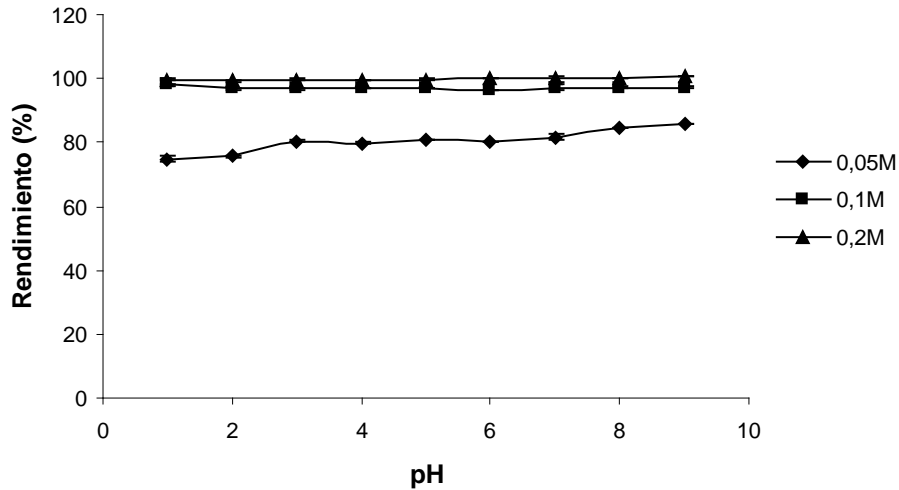


Figura 3-6. Efecto de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  sobre el rendimiento de la reextracción.

Una vez que se encontraron las condiciones óptimas para la extracción líquido-líquido se estudió la influencia de posibles interferencias provocadas por los aniones mayoritarios presentes en aguas naturales para justificar la aplicabilidad del uso de TIBPS en los estudios de membranas. En este caso, y debido a su presencia en aguas naturales se seleccionaron los aniones  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  en un rango de concentración de 2,5 a 10 mM (Figura 3-7). Como se puede observar, la presencia de aniones mayoritarios en aguas naturales no afecta al proceso de transporte de Ag en las condiciones de pH estudiadas, excepto para  $\text{SO}_4^{2-}$ , cuya precipitación afecta a la extracción a valores de concentración desde 5 mM a pH superior a 8, aunque cabe destacar que las concentraciones, de  $\text{SO}_4^{2-}$  en aguas naturales es en general inferiores a 4 mM [73].

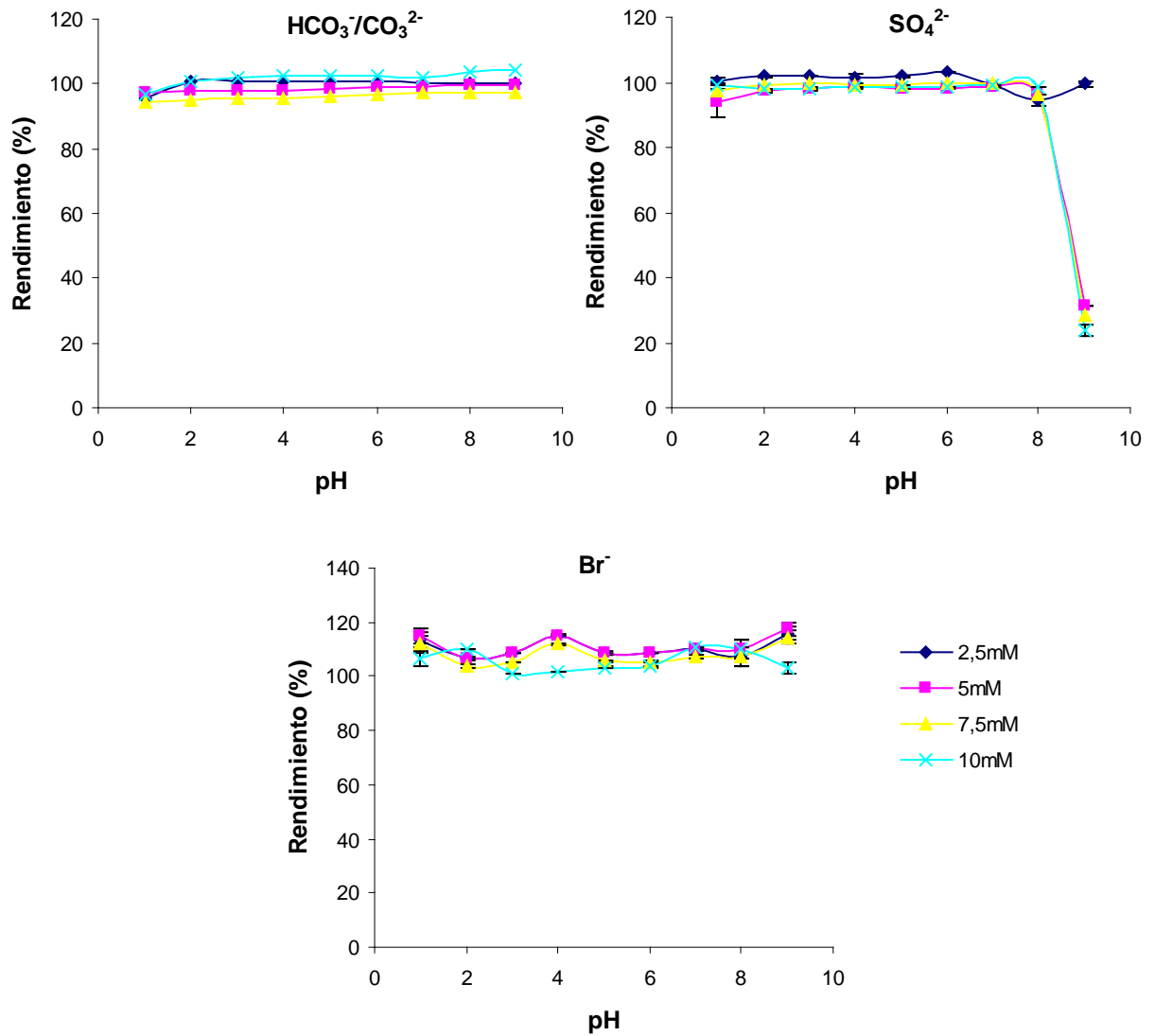


Figura 3-7. Efecto de los principales iones inorgánicos presentes en aguas naturales sobre la extracción líquido-líquido de Ag con TIBPS a diferentes valores de pH.

Por otro lado se ha evaluado el efecto de la presencia del ion Cl<sup>-</sup> en el intervalo de concentraciones entre 0,6 y 18 M, observándose que el rendimiento de la extracción no se ve afectado por el mismo (Figura 3-8).

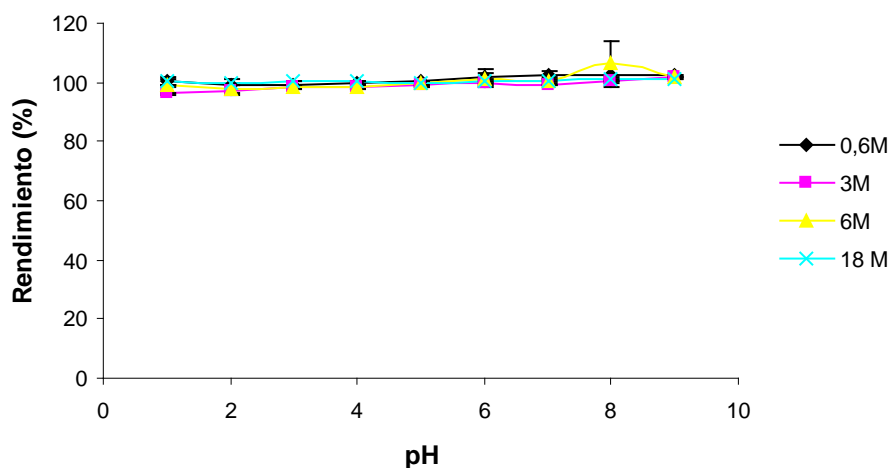


Figura 3-8. Efecto de la presencia de ion cloruro en el rendimiento de la extracción.

Después de verificar la eficacia del proceso de extracción se procedió a estudiar el de reextracción, para lo que se compararon dos reactivos distintos, ambos buenos ligandos de la plata: sulfito sódico y tiosulfato sódico. Como se puede observar en la Figura 3-9, aunque con poco diferencia el sulfito sódico aparece como mejor extractante ya que a una concentración de 10 mM ofrece extracción cuantitativa de Ag, por lo que fue elegido para posteriores estudios.

## 2. Sistema de membrana líquida

En el presente trabajo se han utilizado dos tipos membrana líquida, una membrana de volumen y una membrana soportada en configuración de fibra hueca. El sistema químico empleado tiene el mismo fundamento, pero las condiciones hidrodinámicas y de transporte son distintas, partiendo de que la relación de volúmenes y por tanto el enriquecimiento esperado es diferente.

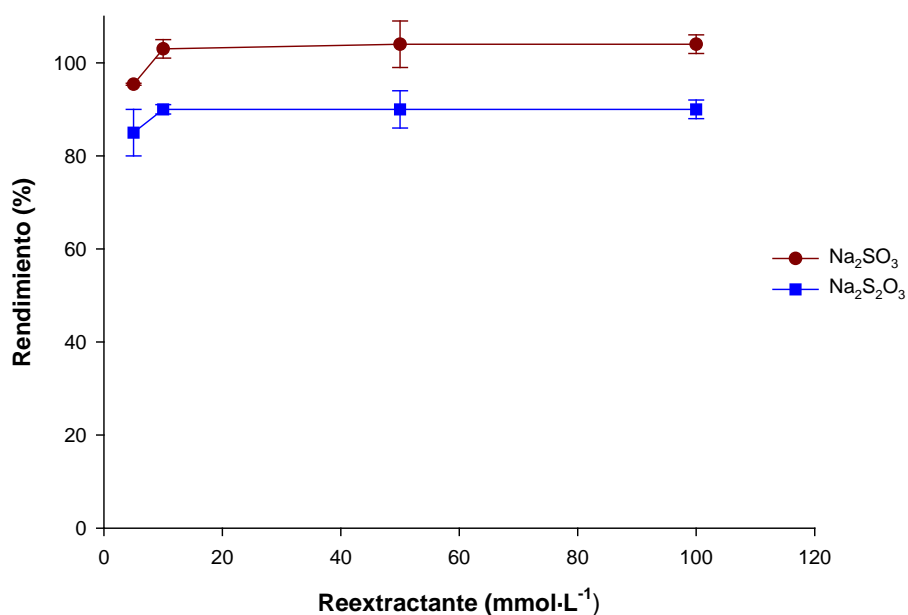


Figura 3-9. Rendimiento de la reextracción de plata.

El sistema químico se basa en la reacción en la interfase entre la fase cargada y la membrana del metal con el TIBPS, para formar junto con el  $\text{NO}_3^-$  un par iónico soluble en la fase orgánica, que difunde a través de esta y reacciona con el agente reextractante en la interfase entre la membrana y la disolución receptora, liberando a su vez el transportador que vuelve a la membrana (Figura 3-10).

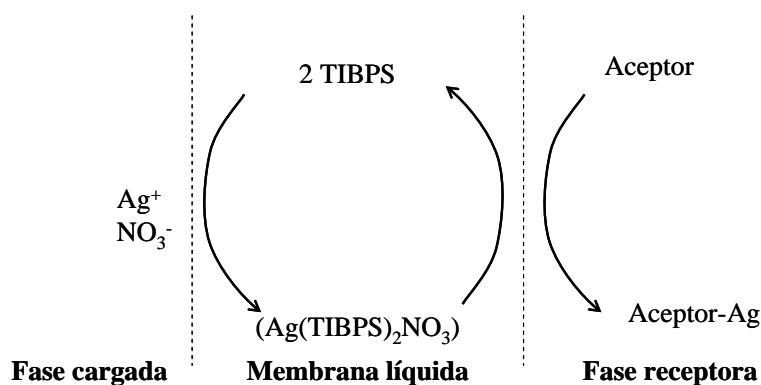


Figura 3-10. Equilibrio general para el transporte de Ag en membranas líquidas empleando TIBPS como transportador.

## 2.1. Membrana líquida de volumen

- Diseño de la membrana:

Para desarrollar este estudio se ha utilizado un sistema de membrana líquida de volumen con un diseño consistente en dos vasos concéntricos (Figura 3-11) que



comparten su base inferior. El vaso exterior, de mayor diámetro (75 mm), contiene la fase cargada, mientras que el interior (25 mm de diámetro), contiene la receptora. La membrana líquida formada por la disolución de TIBPS en tolueno se coloca sobre ambas poniéndolas en contacto.

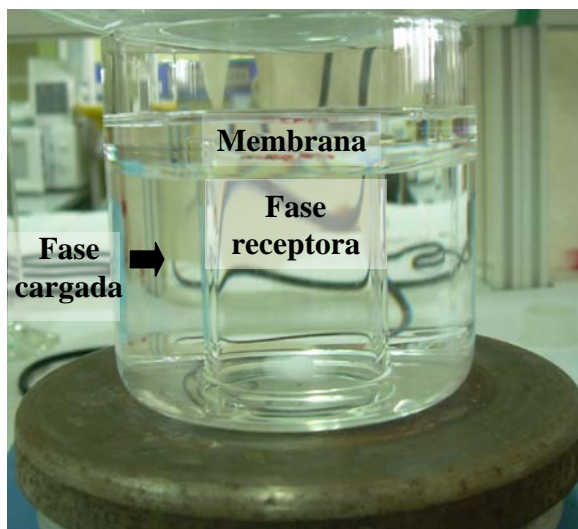


Figura 3-11. Membrana líquida de volumen utilizada para este trabajo.

- Optimización de las variables físico-químicas:

La optimización de las variables físico-químicas que tienen influencia en el sistema de membrana líquida se realizó estudiando la variación del coeficiente de permeabilidad producida por cada una de las variables en cuestión. Estos ensayos se realizaron durante dos horas, extrayendo cada 30 minutos 1,6 mL de disolución cargada y midiendo la concentración de plata; además se añadieron 1,6 mL de disolución limpia a la muestra para mantener el volumen constante, por lo que posteriormente se realizaron los cálculos necesarios para obtener los valores de concentración reales, corrigiendo éstas teniendo en cuenta la cantidad de Ag retirada en cada medida.

El valor óptimo de cada variable se corresponde con aquel que hace máxima la permeabilidad. En este caso se ha realizado una optimización univariante del sistema, es decir, se ha modificado una de las variables manteniendo constantes las demás hasta alcanzar su óptimo. En todos los casos la concentración inicial de plata para la optimización fue de  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , por lo que la determinación de la concentración de plata en las disoluciones se realizó mediante FAAS. Se ha realizado tanto la optimización del sistema químico, teniendo en cuenta la concentración de los reactivos como de la hidrodinámica del mismo, considerando la influencia de la agitación de las disoluciones.

#### - Concentración de $\text{NO}_3^-$ en la fase cargada

El efecto de la concentración de nitrato se evaluó entre 0,01 M y 2 M, observándose un incremento del coeficiente de permeabilidad hasta un máximo de  $0,027 \text{ cm}\cdot\text{min}^{-1}$  para una concentración de nitrato 0,1M (Figura 3-12), a partir de la cual la permeabilidad volvió a decrecer. Este efecto puede deberse a la predominancia de una de las dos especies posibles de Ag en la fase orgánica (Ecuación 3-2). A concentraciones de nitrato moderadas se debe formar en complejo  $\text{Ag}(\text{TIBPS})_2\text{NO}_3$  como especie predominante, mientras que a concentraciones superiores aumenta la proporción del complejo  $\text{Ag}_2(\text{TIBPS})_3(\text{NO}_3)_2$ , que puede presentar menor permeabilidad en la membrana [38].

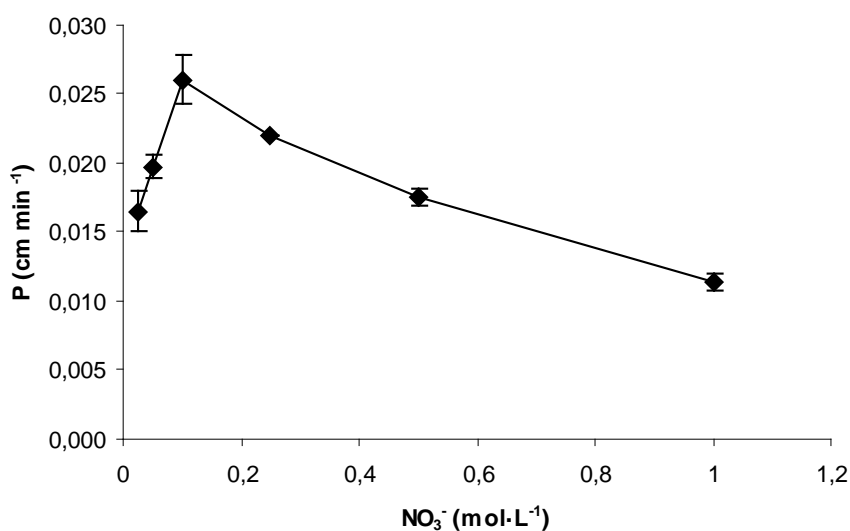


Figura 3-12. Efecto de la concentración de  $\text{NO}_3^-$  en la fase cargada.

#### - Concentración de TIBPS

Se estudió la influencia de la concentración de extractante en el intervalo entre 1 y 18 mM, observándose un aumento de la permeabilidad con la concentración de reactivo, hasta un valor de 4,5 mM, a partir del cual el transporte de Ag en la membrana aparece independiente de la concentración de TIBPS (Figura 3-13).

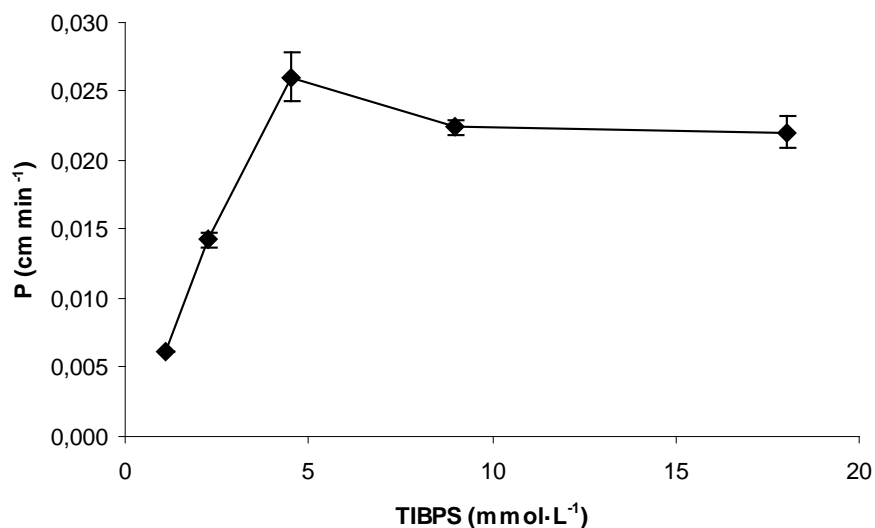


Figura 3-13. Efecto de la concentración del TIBPS en la fase orgánica.

#### - Concentración de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>

Para llevar a cabo la reextracción de la plata correctamente se necesitó, al menos, una concentración de 10mM SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Como se observa, para valores superiores la permeabilidad se hace independiente de la concentración de ligando en la fase receptora. (Figura 3-14).

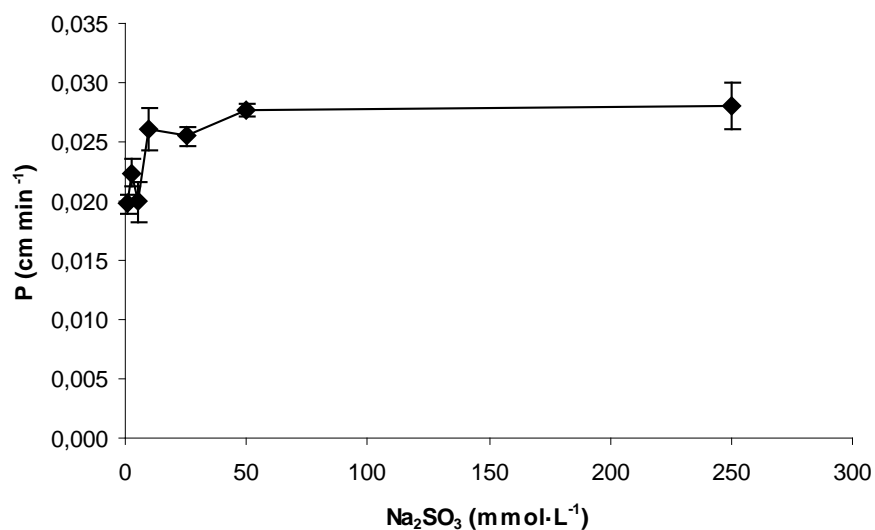


Figura 3-14. Efecto de la concentración de agente reextractante en la fase receptora.

- Velocidad de agitación:

La optimización de la velocidad mostró un crecimiento lineal del coeficiente de permeabilidad con la misma desde 100 hasta 900 r.p.m., valor a partir del que se observa la mezcla de las fases acuosas (Figura 3-15).

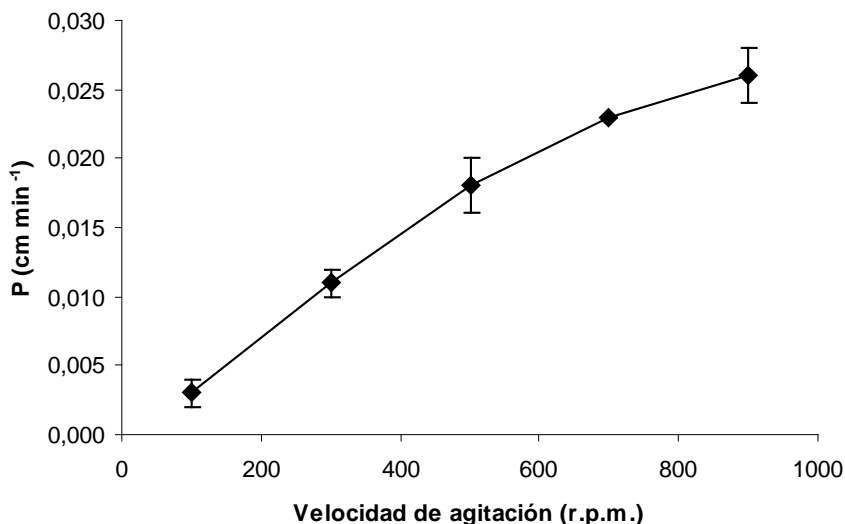


Figura 3-15. Efecto de la velocidad de agitación de las fases.

- Establecimiento del factor de preconcentración

Utilizando las condiciones óptimas para la membrana líquida se estudió el rendimiento de la reextracción (R) para diferentes concentraciones de plata en la fase cargada. El porcentaje de reextracción se determinó a partir de la siguiente expresión (Ecuación 3-4):

$$R = \frac{C_{Agr}}{R_v \cdot C_{Ag0}} \cdot 100$$

Ecuación 3-4

Donde  $C_{Agr}$  es la concentración en la fase receptora al final del proceso,  $R_v$  es la relación de volúmenes entre la fase cargada y la receptora y  $C_{Ag0}$  es la concentración inicial en la fase cargada.

Como se puede observar en la Figura 3-16, el porcentaje de reextracción aumenta de forma lineal durante los primeros 150 minutos para estabilizarse y llegar a una zona

en la que se muestra constante. Se ha tomado como tiempo de reextracción óptima 240 minutos, a los que el rendimiento del proceso de preconcentración es del  $59,54 \pm 1,89\%$ . Como la relación de volúmenes entre la fase cargada y la receptora es de 6,66; el factor de preconcentración final obtenido es de 3,96 veces. Estos datos se obtuvieron a partir de 7 muestras sintéticas de concentraciones comprendidas entre 10 y  $800 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , observándose la independencia del sistema de la concentración del metal.

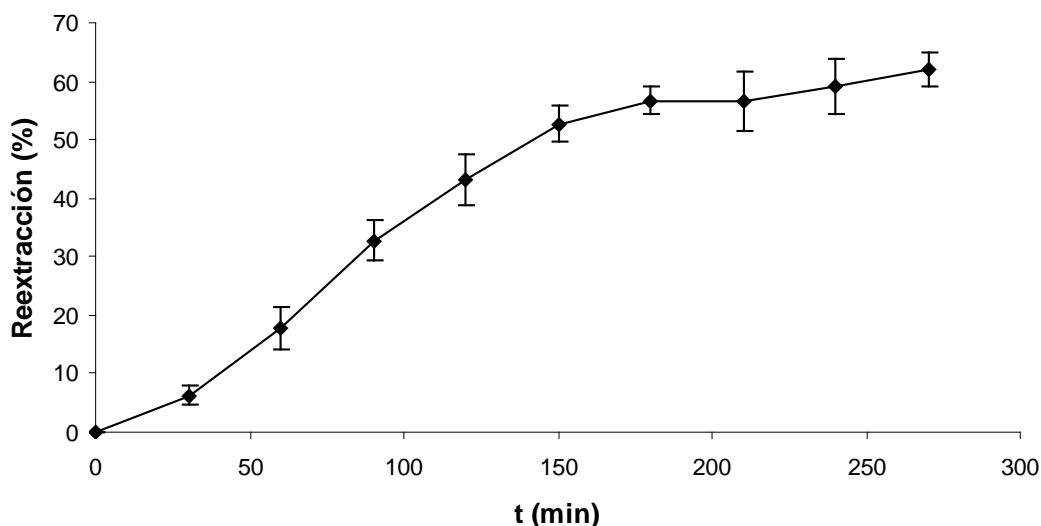


Figura 3-16. Evolución temporal del rendimiento de la reextracción.

#### - Aplicación a muestras reales

En primer lugar se realizó un estudio de blancos del método de preconcentración, para lo que se utilizó agua milli-Q acidificada con ácido nítrico a  $\text{pH} < 2$ . Para poder llevar a cabo la determinación de Ag en las distintas fases acuosas de la membrana fue necesario utilizar la técnica de plasma acoplado inductivamente con detección en un espectrómetro de masas (ICP-MS). Estos experimentos tuvieron lugar en las condiciones óptimas descritas para la membrana y se encontró una concentración de  $33,37 \pm 5,65 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  de Ag para diez réplicas de los blancos (Figura 3-17).

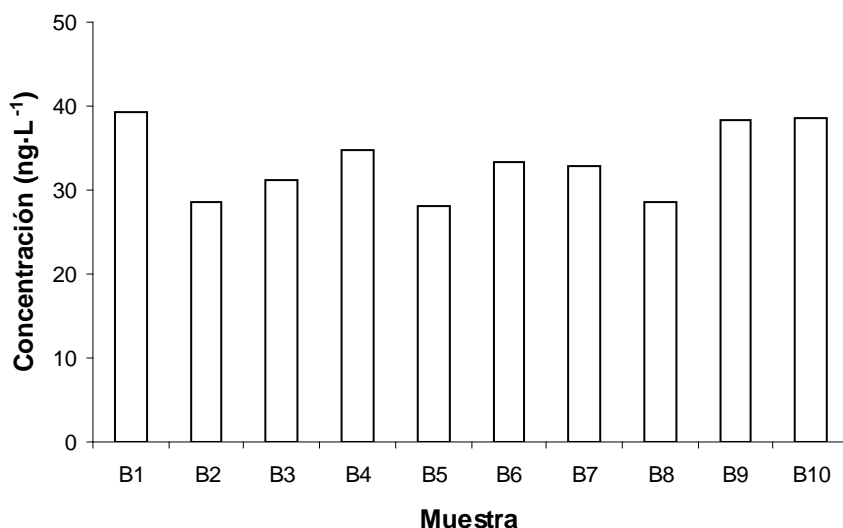


Figura 3-17. Concentración de Ag en los blancos para el sistema de MLV.

Posteriormente se realizó la determinación de plata en muestras sintéticas y reales con diferentes niveles de concentración. Las muestras reales utilizadas proceden del río Guadalquivir y se encuentran acidificadas a  $\text{pH} < 2$ . La concentración de plata de estas muestras se encuentra por debajo de la media de los blancos obtenidos aplicando la metodología que aquí se expone, por lo que se procedió a realizar una adición de Ag, para comprobar que existe un transporte eficiente de metal a ese nivel de concentración. A continuación se muestran los resultados obtenidos (Tabla 3-1).

Tabla 3-1. Aplicación de la membrana líquida de volumen a la determinación de Ag en muestras sintéticas y reales.

Muestra	<sup>1</sup> Conocida ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	<sup>2</sup> Medida ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\epsilon_r$ (%)
Sintética	$0,70 \pm 0,02$	$0,72 \pm 0,04$	2,8
	$0,43 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,04$	7,0
Agua de red	$17,96 \pm 0,01$	$17,24 \pm 0,2$	-4,0
	$0,44 \pm 0,04$	$0,40 \pm 0,03$	4,5
Agua de río	$17,03 \pm 0,01$	$15,39 \pm 0,08$	-9,6
	$0,48^3$	$0,46^3$	-4,2
	$0,27^3$	$0,28^3$	3,7

<sup>1</sup>Medida directa mediante ICP-MS

<sup>2</sup>Medida utilizando este método

<sup>3</sup>Sólo se ha realizado una réplica de esta medida

Como se puede observar es posible realizar la determinación de forma exacta de Ag en aguas naturales y de red a concentraciones del orden de los  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  aplicando la membrana líquida de volumen con TIBPS como transportador.

## 2.2. Membrana soportada: configuración de fibra hueca

- Diseño de la membrana

En este caso se han utilizado membranas capilares de fibra hueca fabricadas en polipropileno. Las fibras presentan un diámetro interno  $280\ \mu\text{m}$ ;  $50\ \mu\text{m}$  de grosor de pared y  $0,1\ \mu\text{m}$  de tamaño de poro medio. La configuración del trabajo ha sido de tipo estático, es decir, colocando la disolución receptora en el interior, la disolución orgánica que contiene al transportador (TIBPS) impregnando los poros y la muestra en el exterior (Figura 3-18). Así, dependiendo de la longitud de las fibras y el volumen de muestra se puede conseguir una relación de volúmenes distinta. En este caso se han utilizado 50 mL de muestra y fibras con un volumen interno de  $20\ \mu\text{L}$ .



Figura 3-18. Sistema de membrana líquida soportada utilizado.

- Procedimiento

Como se ha descrito anteriormente, la fibra debe contener la disolución receptora y los poros deben estar ocupados por la fase orgánica. A continuación se describen los pasos a llevar a cabo para el transporte de Ag en fibras huecas:

1. Cortar la longitud necesaria de fibra para obtener un volumen de  $20\ \mu\text{L}$ .
2. Llenar una jeringa de plástico de  $0,5\ \text{mL}$  con la disolución aceptora.
3. Conectar la jeringa a la fibra y hacer pasar  $0,1\ \text{mL}$  de disolución receptora por la misma.

4. Sumergir la fibra durante 1 minuto en la disolución orgánica que contiene el transportador.
5. Hacer pasar el resto de la disolución aceptora por la fibra evitando que pasen burbujas.
6. Sellar los extremos de la fibra y colocarla en agua milli-Q para eliminar el exceso de disolvente.
7. Introducir la fibra en la muestra y proceder a la extracción.
8. Finalmente, con una jeringa vacía retirar la disolución aceptora de la fibra para la determinación instrumental de Ag.
  - Optimización del sistema

Como condiciones iniciales se utilizaron las determinadas como óptimas para el sistema de MLV, pero se observó que no tenía lugar la extracción de plata desde la fase cargada a la orgánica. Esto es consecuencia de que el tolueno no impregna los capilares de fibra hueca utilizados, por lo que se decidió cambiar el disolvente y se seleccionó el dihexileter, que ha mostrado buenos resultados en membranas de fibra hueca para estudios anteriores [60]. Se puede comprobar como utilizando dihexileter se obtuvieron rendimientos superiores al 90% en el proceso de extracción para una concentración 0,5 M de TIBPS (Figura 3-19).

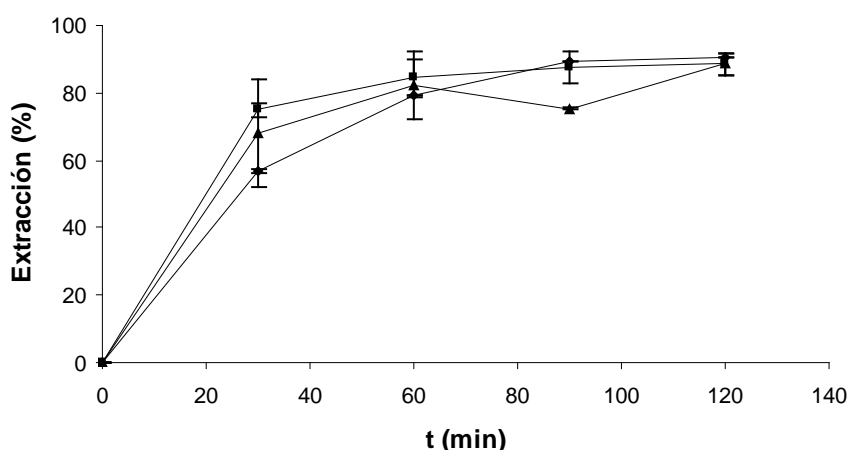


Figura 3-19. Rendimiento de la extracción utilizando dihexileter como disolvente en la membrana. Concentración de TIBPS 0,1M ▲, 0,5M ■, 1M ◆.



Una vez que se realizó la selección del disolvente, se llevó a cabo el estudio de la reextracción en la fase receptora. Teniendo en cuenta que el cambio de disolvente puede tener efecto sobre la interacción del complejo  $\text{Ag}(\text{TIBPS})_2\text{NO}_3$  y el agente reextractante, se realizó una nueva selección del agente receptor de Ag, basada fundamentalmente en la mayor estabilidad de los complejos Ag-receptor que la de los complejos Ag-TIBPS. En este sentido los ligandos  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{SCN}^-$ , ácido dietilentriaminopentacético (DTPA) y  $\text{NH}_3$  fueron utilizados. Todos salvo el amoniacó se encuentran disponibles en estado sólido, así que su solubilidad en agua es un factor limitante en el empleo de elevadas concentraciones de los mismos, por lo que el rango de concentración estudiado abarca desde 0,010 a 1 M para el sulfito y de 0,010 a 2 M para tiosulfato, tiocianato y DTPA. En todos los casos, los estudios se realizaron durante 4 horas y utilizando 0,5 M TIBPS en la membrana.

Por un lado, se observó que tanto  $\text{NH}_3$  como DTPA no permiten un transporte de Ag suficientemente alto como para determinarla en la fase aceptora, mientras que por otro lado, los aniones sulfurados  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  y  $\text{SCN}^-$  ofrecieron distintos factores de enriquecimiento, siendo el  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  el que presenta un mejor comportamiento, seguido de  $\text{SO}_3^{2-}$  y  $\text{SCN}^-$ . Como se puede observar, un incremento de la concentración del ligando conlleva un aumento del transporte de plata en la membrana, y consiguientemente del factor de enriquecimiento obtenido, siendo este de  $669 \pm 65$  veces en el caso de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  1M (Figura 3-20).

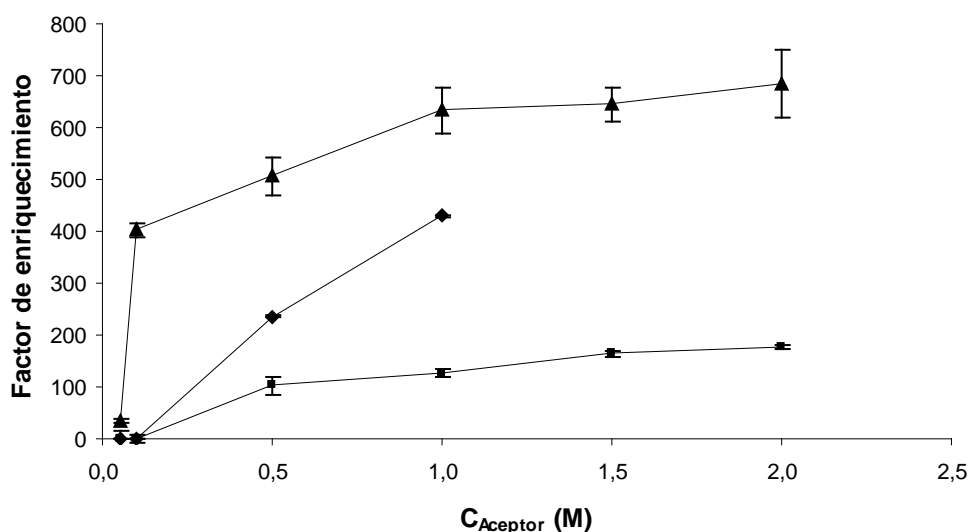


Figura 3-20. Factor de enriquecimiento para los distintos aceptores utilizados.  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ▲,  $\text{SO}_3^{2-}$  ■, KSCN ◆.

Con el objetivo de aumentar el factor de enriquecimiento del sistema se planteó una nueva optimización de la concentración de TIBPS en la fase orgánica, midiendo esta vez el transporte de Ag en la fase receptora. Como se puede observar la concentración óptima de TIBPS es 0,1M y permite alcanzar un factor de enriquecimiento de  $1053 \pm 16$  veces (Figura 3-21). En este caso, una menor concentración de reactivo permite una menor retención de la plata en la fase orgánica, así como una mayor difusión a través de ella.

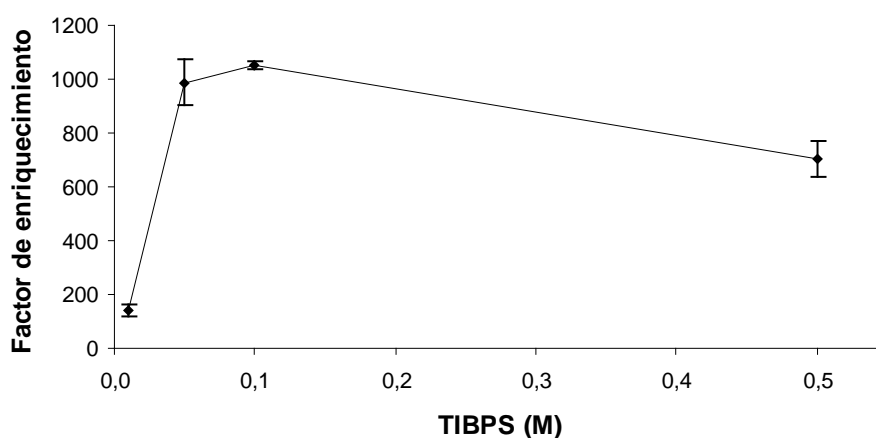


Figura 3-21. Efecto de la concentración de TIBPS en la membrana en la preconcentración del metal.

Finalmente se llevó a cabo la optimización del tiempo de operación, utilizando 0,1M TIBPS en la membrana y 1M  $S_2O_3^{2-}$  en el strip, encontrándose el máximo enriquecimiento después de 4 horas. También se puede observar un descenso de la eficiencia del sistema entre 4 y 8 horas que podría asociarse a la precipitación de Ag en la membrana, por este motivo es fundamental controlar el tiempo de operación (Figura 3-22).

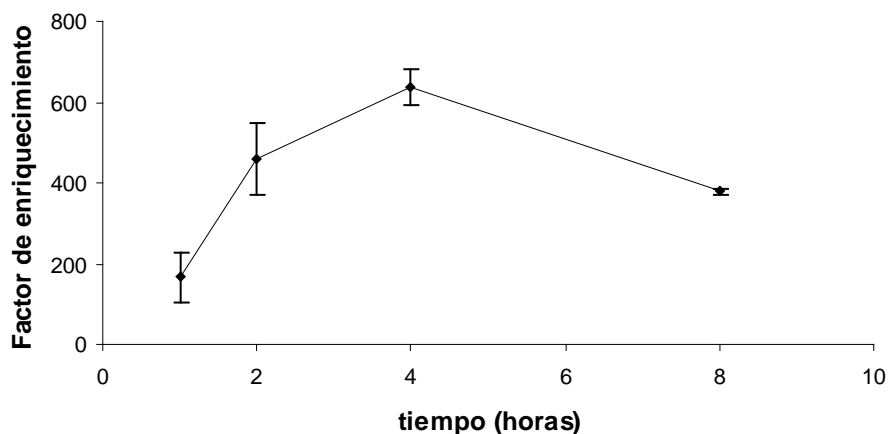


Figura 3-22. Optimización del tiempo de operación.

- Aplicación del método

Una vez optimizado el método se realizaron los estudios de aplicabilidad del mismo frente a matrices reales. En este caso se utilizaron muestras de agua potable y muestras tomadas en el río San Lars (Lund, Suecia), que se acidificaron con HNO<sub>3</sub> suprapur y se conservaron durante una semana, para poder realizar la determinación del contenido total de Ag. A estas muestras se les realizaron varias adiciones de Ag en distintas concentraciones entre 0,1 y 1 mg·L<sup>-1</sup> y se determinaron por el método propuesto, observándose que la recuperación no se ve afectada por la matriz de la muestra (Figura 3-23).

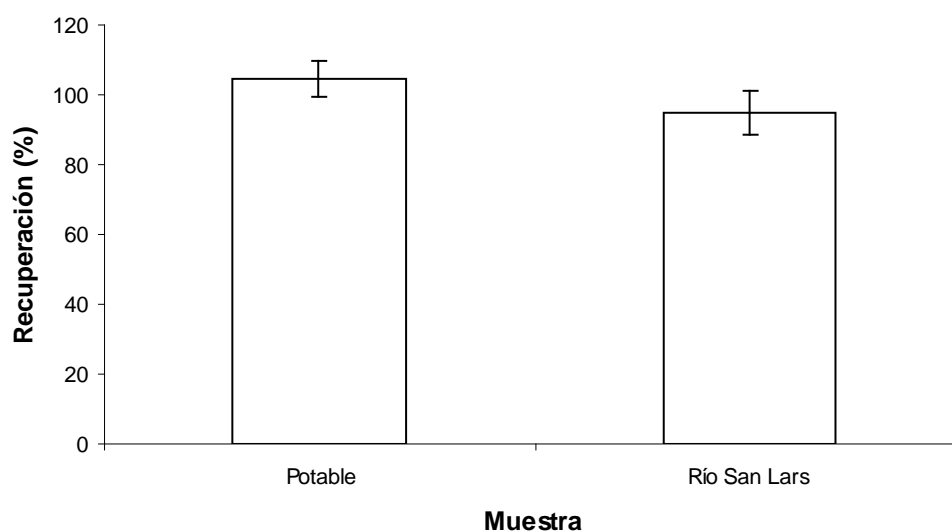


Figura 3-23. Efecto de la matriz de muestras reales en la eficiencia del transporte.

A continuación y previo a la determinación de ultratrazas de Ag en aguas naturales se realizó un estudio de blancos del método para calcular su límite de detección. Para esto se tomaron 10 alícuotas de 50mL de agua milli-Q a las que se añadió KNO<sub>3</sub> hasta una concentración 0,1M y se analizaron del mismo modo que el resto de muestras. La determinación instrumental de Ag en estas muestras se llevó a cabo mediante GFAAS, encontrándose una concentración media en blancos del método en  $1,76 \pm 0,19 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$  (Figura 3-24).

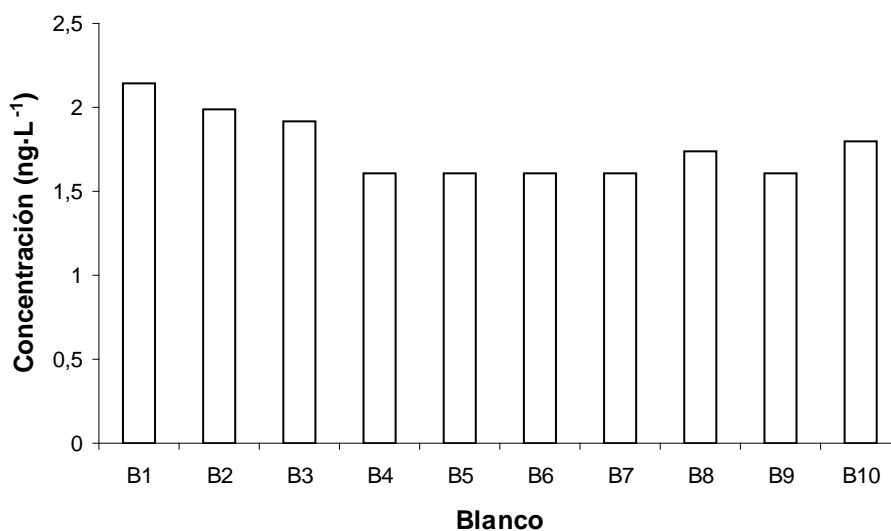


Figura 3-24. Concentración de Ag en los blancos para el sistema de MLS

Por último se realizó la aplicación del método a la determinación de Ag en muestras reales. Para ello se analizaron muestras sintéticas, de agua potable y de río procedentes de los ríos San Lars y Guadalquivir. En el caso de las muestras sintéticas de agua potable y del río San Lars se llevó a cabo el análisis de recuperación utilizando muestras fortificadas y sin fortificar, mostrando que a estos niveles de concentración no existen efectos considerables de la matriz sobre los resultados (Tabla 3-2)

Tabla 3-2. Análisis de recuperación de Ag en muestras reales.

Matriz	C <sub>Analizada</sub> (ng·L <sup>-1</sup> )	RSD (%)	C <sub>Adicionada</sub> (ng·L <sup>-1</sup> )	C <sub>Esperada</sub>	Recuperación (%)
Sintética	10,05	9,51	0	10	100,51
Grifo	3,41	5,79	0	13,41	116,26
	15,59	11,63	10		
Río San Lars	9,19	13,63	0	19,19	120,19
	23,07	5,23	10		

Para las muestras procedentes del río Guadalquivir se compararon los resultados con los obtenidos utilizando como método de referencia la extracción líquido-líquido con APDC/DDDC [68] y posterior determinación instrumental en ICP-MS. A la vista de los resultados se muestra que es posible realizar de forma exacta la determinación Ag en aguas naturales aplicando el método propuesto (Tabla 3-3)

Tabla 3-3. Comparación del método propuesto con el de referencia.

Muestra	C <sub>Analizada</sub> (ng·L <sup>-1</sup> )	RSD (%)	C <sub>Referencia</sub> (ng·L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
G1 10/07	1,85	4,55	1,90*	97,11
G6 02/07	2,02	7,12	2,18*	92,62
G1 11/08	4,00	3,22	4,21*	95,09
G5A 11/08	4,36	2,16	4,33*	100,70
G7 04/08	2,72	0,96	2,49*	109,05

Una vez que se cuenta con un sistema que permite realizar la determinación de Ag en muestras acuosas se puede estudiar el efecto de distintos ligandos orgánicos e inorgánicos (Cl) sobre el mismo, de forma que se pueda llevar a cabo la determinación de la fracción biodisponible de plata así como de los complejos clorados de plata que se encuentran en la muestra.

### Fraccionamiento de Ag en agua de estuario mediante membranas líquidas.

Como se ha expuesto anteriormente, los metales pueden encontrarse en disolución en distinta forma química, siendo de gran interés aquellas responsables de sus efectos sobre la vida. Las especies metálicas que se pueden encontrar son el metal libre, formando complejos inorgánicos o formando complejos orgánicos. En particular, el metal libre y formando complejos orgánicos presenta mayor biodisponibilidad, mientras que de los diferentes complejos tanto orgánicos como inorgánicos formados se asocian con su toxicidad.

En las aguas naturales, la plata se puede encontrar tanto como Ag<sup>+</sup> como formando complejos, de entre los que cabe destacar las especies cloradas del tipo AgCl<sub>n</sub><sup>(n-1)-</sup> como compuestos inorgánicos y el metal asociado a materia orgánica. Para poder realizar la especiación de Ag con respecto a estos complejos se han introducido en la fase cargada diferentes concentraciones de los ligandos correspondientes, variando la concentración de Cl<sup>-</sup> y la de materia orgánica en forma de ácidos húmicos.

Al añadir nuevas especies interferentes en la disolución cargada como son  $\text{Cl}^-$  y ácidos húmicos, tienen lugar una nueva serie de equilibrios en la misma, que se corresponden con la formación de complejos orgánicos y especies cloradas, que no serán transportadas a través de la membrana líquida, permitiendo separar la fracción libre de Ag (Figura 3-25).

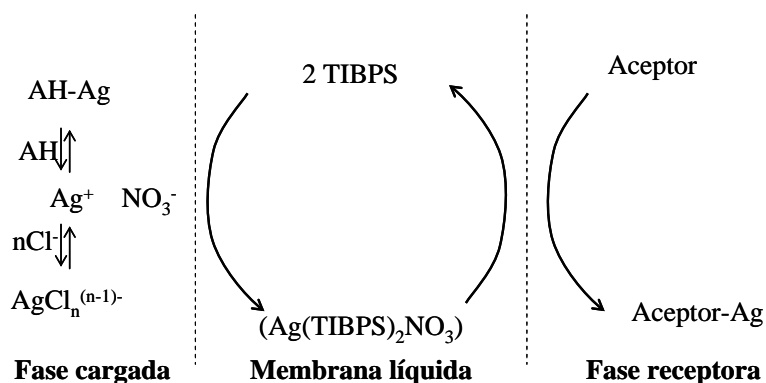


Figura 3-25. Equilibrios químicos que tienen lugar en presencia de  $\text{Cl}^-$  y Ac. húmicos en la fase cargada.

En primer lugar se ha realizado el estudio de la influencia de la materia orgánica sobre el transporte de plata en la membrana en base al coeficiente de permeabilidad (P). Posteriormente se ha llevado a cabo el mismo estudio en presencia de ion  $\text{Cl}^-$  y se han tenido en cuenta los porcentajes de reextracción obtenidos en ambas situaciones. Por último se han considerado los efectos conjuntos de ambos interferentes, para realizar la especiación del metal frente a ambos. Para realizar este estudio se ha utilizado el sistema MLV propuesto anteriormente.

### 3. Efecto de la materia orgánica disuelta sobre el transporte de Ag a través de membranas líquidas.

Estos experimentos se han desarrollado utilizando ácidos húmicos como fuente de materia orgánica, medida como concentración de carbono orgánico disuelto (COD). La concentración de plata en la fase cargada se fijó en este caso en  $0,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y el resto de las condiciones aplicadas son las determinadas como óptimas en el apartado anterior.

Se observa que tanto la permeabilidad como el rendimiento de la membrana disminuyen de forma lineal con el  $\text{Log}(\text{COD})$  (Figura 3-26). Considerando que esta disminución es debida a la materia orgánica, como veremos posteriormente, se podría determinar a partir de la ecuación de ajuste ( $R(\%) = -27,98 \cdot \text{Log}(C_{\text{COD}}) + 82,62; R^2 = 0,995$ ), el rendimiento de la membrana en

presencia de ligando. A partir de aquí se pueden determinar, como se verá posteriormente,  $Ag^+$  y la concentración de  $Ag$  ligada a material orgánica en la fase cargada. La concentración de  $Ag^+$  en la fase receptora se ha determinado experimentalmente mediante espectroscopía de absorción atómica en llama.

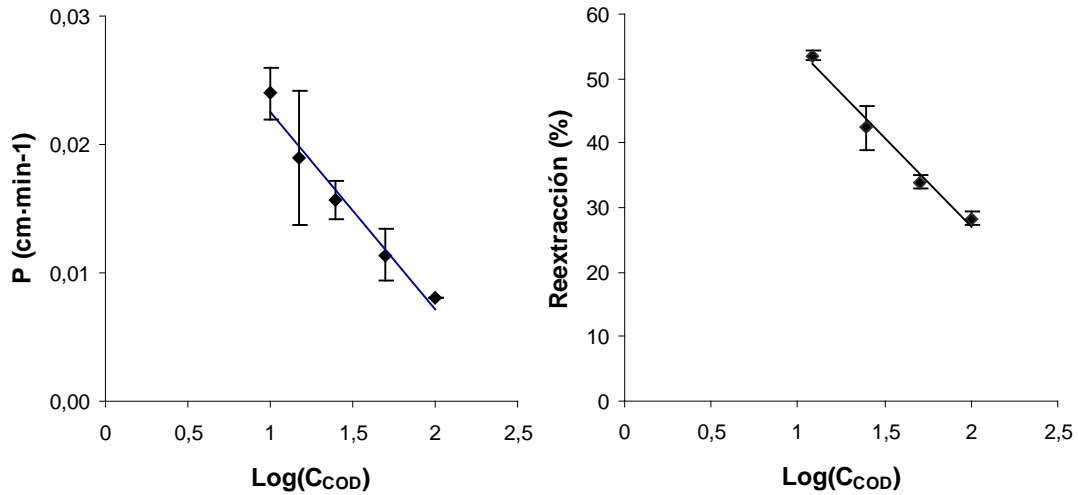


Figura 3-26. Efecto de los ácidos húmicos sobre la permeabilidad y el rendimiento de la membrana.

Con el fin de contrastar que la disminución del coeficiente de permeabilidad en la membrana se debe a la presencia de los ácidos húmicos se ha llevado a cabo la digestión de la materia orgánica de las muestras mediante radiación UV durante 90 minutos y en presencia de  $H_2O_2$  [17](Figura 3-27).

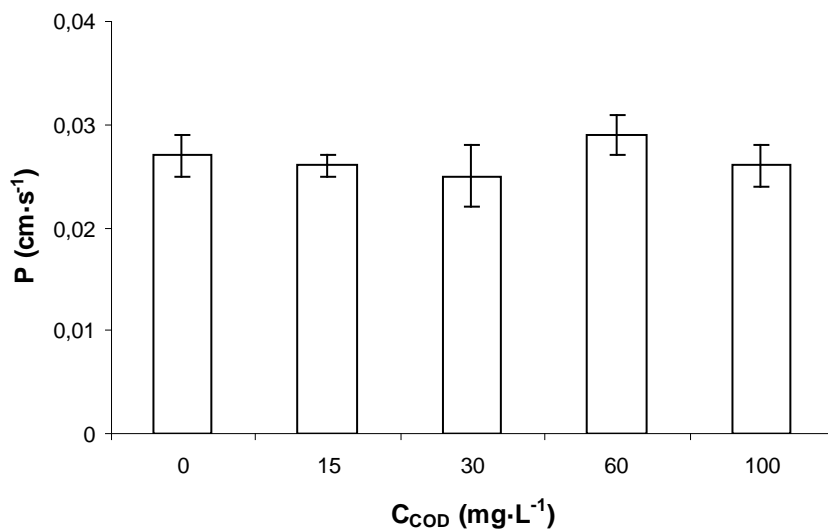


Figura 3-27. Permeabilidad de  $Ag$  en membranas después de digerir las muestras.

De esta forma, se puede apreciar la recuperación de P al aplicar la membrana líquida a las muestras digeridas, por lo que se puede asociar la disminución en la permeabilidad con la presencia de los ácidos orgánicos.

#### 4. Efecto de la salinidad sobre el transporte de Ag en membranas líquidas

En este caso se ha operado siguiendo la misma filosofía que en el anterior. Se han preparado disoluciones cargadas de plata a distinta salinidad y se ha evaluado el efecto que ha tenido la presencia de ion  $\text{Cl}^-$  sobre el transporte del metal, tanto en el coeficiente de permeabilidad como en el porcentaje de reextracción (Figura 3-28).

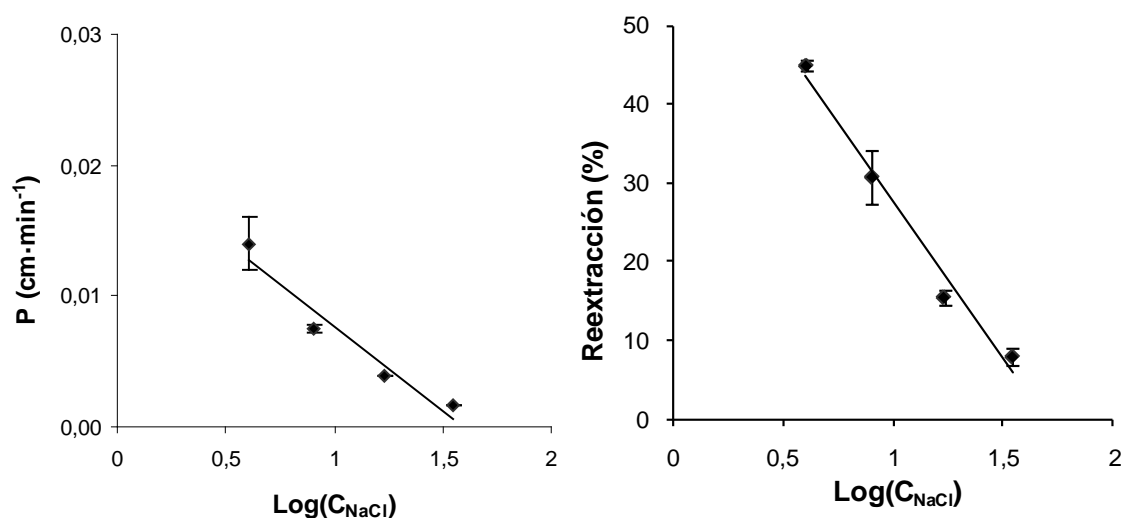


Figura 3-28. Efecto de la concentración de NaCl sobre el transporte de Ag la membrana

De forma similar que para el COD se aprecia una disminución progresiva del transporte de Ag al aumentar la salinidad de las muestras. Representando P y el porcentaje de reextracción frente al  $\text{Log}(\text{NaCl})$  se puede observar que, como en el caso anterior, la disminución es lineal ( $R(\%) = -40,05 \cdot \text{Log}(C_{\text{COD}}) + 67,59 ; R^2 = 0,973$ ) (Tabla 3-4). Siguiendo el razonamiento expuesto anteriormente para el COD se podría calcular la concentración de Ag libre en la muestra y la que se encuentra retenida por  $\text{Cl}^-$ .

Anteriormente, durante el desarrollo de los estudios preliminares de extracción líquido-líquido, no se observó efecto alguno de la salinidad de las muestras sobre el transporte de  $\text{Ag}^+$  hacia la membrana líquida. La diferencia fundamental entre aquellos



estudios y los realizados en membrana, se encuentra en las condiciones hidrodinámicas del sistema, ya que en el caso de la extracción líquido-líquido, la agitación de las fases es mucho más intensa y por lo tanto también lo es el contacto entre la fase orgánica y la fase cargada. De esta forma el efecto del ion  $\text{Cl}^-$  sobre el rendimiento de la extracción no es apreciable en extracción líquido-líquido.

El cálculo de estas fracciones asociadas a COD y  $\text{Cl}^-$  utilizando este razonamiento está en principio restringido a las situaciones de simplicidad de las muestras para las que se han desarrollado los experimentos, es decir, los efectos se han estudiado de forma independiente y habría que suponer que son aditivos e independientes para poder realizar los cálculos. Para comprobar la existencia o no de efectos competitivos, se ha llevado a cabo entonces, un estudio de los efectos combinados de ambos ligandos.

##### 5. Efecto combinado de la materia orgánica y el cloruro sobre el transporte de Ag en membranas líquidas.

El estudio de la influencia de la materia orgánica y el cloruro de forma conjunta sobre la permeación de plata a través del sistema de membrana líquida propuesto, se ha realizado con el fin de evaluar la situación existente en la mayoría de las muestras reales. Esto se ha llevado a cabo realizando estudios de reextracción en las condiciones optimizadas a concentraciones de  $\text{NaCl}$  entre 0 y  $17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  y variando la concentración de carbono orgánico disuelto entre 0 y  $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Como se puede apreciar, existe una disminución lineal del porcentaje de reextracción de Ag al aumentar tanto el  $\text{Log}(\text{COD})$  como  $\text{Log}(\text{NaCl})$  cuando la otra variable se mantiene constante. Como se ha observado, la disminución del transporte de Ag guarda relación lineal con la variación del logaritmo de la concentración de los ligandos (Figura 3-29), por lo que se puede realizar un ajuste de primer orden, para calcular la ecuación que permiten hacer las estimaciones de la concentración de Ag.

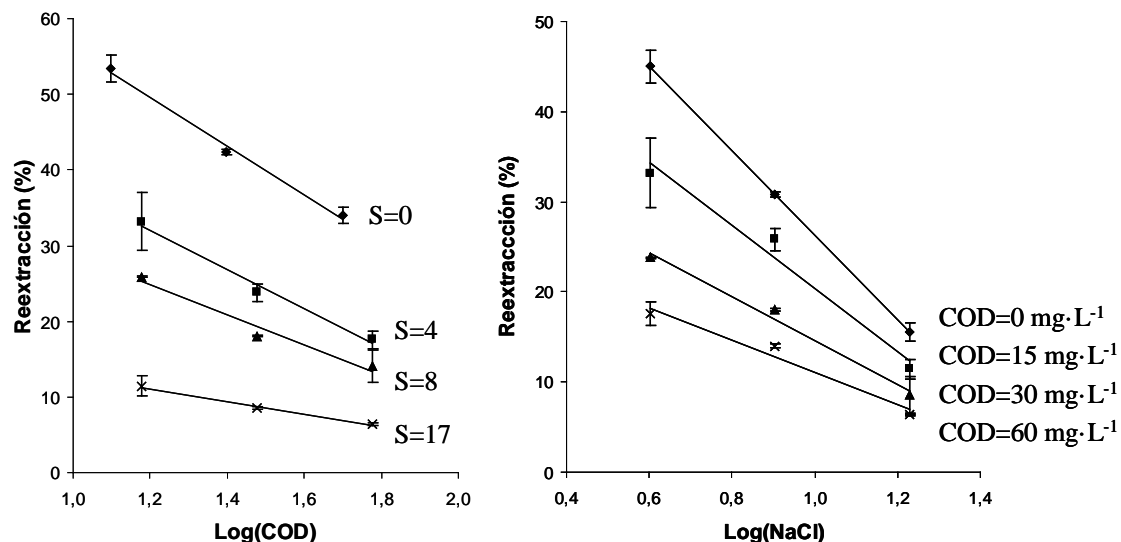


Figura 3-29. Efecto combinado de salinidad y COD sobre la eficiencia de la membrana.

Se calcularon las ecuaciones de ajuste lineal para cada una de las situaciones en las que se fijó la concentración de uno de los ligandos y se varió la del otro. De esta manera se puede estimar el rendimiento del transporte de Ag en unas condiciones determinadas de salinidad y concentración de COD. El razonamiento es análogo al presentado para el caso de un solo ligando y que será desarrollado a continuación (Tabla 3-4).

Tabla 3-4. Pendiente y ordenada en el origen de las rectas de ajuste de la disminución del porcentaje de reextracción en la membrana para el efecto conjunto de COD y NaCl.

Ligando	Condiciones	Pendiente	O.O.	R <sup>2</sup>	
Ácidos Húmicos	NaCl (g·L <sup>-1</sup> )	0	-27,98	82,62	0,995
		4	-25,90	63,10	0,986
		8	-19,69	48,38	0,966
		17	-8,32	21,08	0,992
NaCl	COD (mg·L <sup>-1</sup> )	0	-40,05	67,59	0,981
		15	-34,74	55,16	0,973
		30	-24,31	38,95	0,986
		60	-17,83	28,93	0,968

## 6. Cálculos de especiación de Ag utilizando membranas líquidas en presencia de materia orgánica y cloruro.

Estos cálculos se basan en los equilibrios químicos descritos anteriormente en la fase cargada en presencia de Cl<sup>-</sup> y ácidos húmicos (Figura 3-25). Como se ha comprobado en los apartados anteriores la materia orgánica y el cloruro actúan

reteniendo Ag en la fase cargada, permitiendo únicamente el transporte de  $Ag^+$ . Conociendo la concentración de  $Ag^+$ , determinada experimentalmente por medida de la concentración de Ag en la fase cargada y el porcentaje de reextracción calculado a partir de los datos de COD y salinidad, se puede estimar la concentración de Ag total en la fase cargada (Ecuación 3-5).

$$Ag_0 = Ag^+ + AgAH + AgCl_n^{(n-1)-}$$

Ecuación 3-5

$Ag_0$  es la plata total adicionada en la fase cargada,  $Ag^+$  es la que se encuentra como ion libre en disolución,  $AgAH$  se refiere a la unida a materia orgánica y  $AgCl_n^{(n-1)-}$  corresponde a los complejos formados entre Ag y cloruro.

De esta forma, y teniendo en cuenta que se establece como condición que únicamente se transporta  $Ag^+$  a través de la membrana, se considera que  $AgAH$  y  $AgCl_n^{(n-1)-}$  son los responsables de formar complejos que no se transportan en la fase cargada. Así, como se ha planteado anteriormente, conociendo los datos de concentración de materia orgánica y salinidad de la muestra se puede estimar el porcentaje de reextracción para esas condiciones (Ecuación 3-6).

$$R_{sal}(\%) = a \cdot \log(C_{COD}) + b$$

$$R_{COD}(\%) = a \cdot \log(C_{NaCl}) + b$$

Ecuación 3-6

Donde  $R_{sal}$  es el porcentaje de reextracción a un valor determinado de salinidad y en función de la concentración de COD,  $R_{COD}$  es el rendimiento correspondiente a concentración de COD fija y en función de la de NaCl,  $a$  es la pendiente de la ecuación de ajuste lineal y  $b$  su ordenada en el origen.

El rendimiento de la reextracción, en ausencia de ligandos, se ha establecido anteriormente en un 59,54%. Así, se puede establecer como referencia a partir de la cual calcular  $Ag_0$  en la fase cargada.  $Ag^+$ , medida experimentalmente, es la que corresponde a un porcentaje  $R(\%)$  estimado en unas condiciones de concentración de ligando dadas. Con estos datos se puede estimar la concentración de  $Ag_0$  del siguiente modo (Ecuación 3-7):

$$Ag_0 = Ag^+ \frac{R_{ligando}(\%)}{R(\%)}$$

Ecuación 3-7

Donde  $R_{ligando}(\%)$  se corresponde con  $R_{NaCl}(\%)$  o  $R_{COD}(\%)$ , según cuál de los conjuntos anteriores de ecuaciones de ajuste se utilice y  $R(\%)$  es el rendimiento en ausencia de ligandos.

A continuación, por diferencia entre  $Ag_{total}$  y  $Ag^+$  se puede estimar la concentración de Ag retenida (Ecuación 3-8).

$$Ag_0 = Ag^+ + Ag_{retenida}$$

Ecuación 3-8

Finalmente, se realizó la estimación de  $Ag_0$  y  $Ag^+$  en distintas muestras con distinta salinidad y concentración de COD. Se ha estudiado la recuperación de  $Ag_0$  con respecto a la concentración de  $Ag_0$  determinada inicialmente en la fase cargada mediante espectroscopía de absorción atómica de llama (Tabla 3-5).

Tabla 3-5. Especiación de Ag en muestras de distintas características de COD y salinidad.

COD (mg·L <sup>-1</sup> )	NaCl (g·L <sup>-1</sup> )	C <sub>Ag</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )			Recuperación (%)
		Ag <sup>+</sup>	Ag <sub>0</sub> (MLV)	Ag <sub>0</sub> (FAAS)	
20	0	130	170	193	88
30	8	76	238	215	110
60	17	52	205	220	93
60	4	87	185	196	94
15	8	19	207	214	97
15	17	20	104	100	104
20	0	130	89	98	91

Como se puede comprobar, se puede realizar el fraccionamiento de Ag asociada a complejos clorados y materia orgánica de forma sencilla mediante MLV y con los datos de concentración de COD y salinidad de las muestras.

## 7. Cálculo de constantes de equilibrio mediante membranas líquidas

De forma adicional y basándonos en el equilibrio químico descrito anteriormente, se realizó el cálculo de la constante de equilibrio de formación de las especies  $AgAH$ .

Teniendo en cuenta únicamente el efecto de la materia orgánica sobre la concentración de Ag en las muestras, se puede resumir el balance de masas propuesto anteriormente de la siguiente forma (Ecuación 3-9 y Ecuación 3-10):

$$Ag_0 = Ag^+ + AgAH$$

Ecuación 3-9

$$AH_0 = AH + AgAH$$

Ecuación 3-10

Donde  $AH_0$  es la concentración inicial de ácidos húmicos y  $AH$  su concentración en el equilibrio.

Se asume que los experimentos de membrana se llevan a cabo hasta que el sistema ha alcanzado el equilibrio y el transporte se estabiliza, de modo que las concentraciones determinadas experimentalmente al final del proceso son concentraciones en el equilibrio. Teniendo esto en cuenta se puede estimar el valor de la constante  $K_{AgAH}$  (

Ecuación 3-11).

$$K_{Ag-AH} = \frac{[Ag - AH]}{[AH][Ag^+]}$$

Ecuación 3-11

Sustituyendo  $AH$  y  $AgAH$  en los balances de masas expresados anteriormente (Ecuación 3-12), se puede expresar  $K_{AgAH}$  en función de los datos conocidos de  $Ag_0$ ,  $Ag^+$  y  $AH_0$ .

$$K_{Ag-AH} = \frac{[Ag_0] - [Ag^+]}{([AH_0] - [Ag_0] + [Ag^+]) \cdot [Ag^+]}$$

Ecuación 3-12

Finalmente se estimó el valor de  $K_{AgAH}$  para distintas concentraciones de ácidos húmicos y plata, obteniéndose un valor de  $K_{Ag-AH} = 263,63 \pm 11,69 \text{ M}^{-1}$ ; como se puede observar en la Tabla 3-6.

Tabla 3-6. Cálculo de la constante de complejación Ag-AH

<b>COD (mg·L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Variable</b>	<b>Concentración (M)</b>	<b>K<sub>Ag-AH</sub></b>
12	Ag <sup>+</sup>	1,46·10 <sup>-6</sup>	262,92
	Ag <sub>0</sub>	1,84·10 <sup>-6</sup>	
	COD	1,00·10 <sup>-3</sup>	
25	Ag <sup>+</sup>	1,14·10 <sup>-6</sup>	279,43
	Ag <sub>0</sub>	1,80·10 <sup>-6</sup>	
	COD	2,01·10 <sup>-3</sup>	
50	Ag <sup>+</sup>	9,81·10 <sup>-7</sup>	258,35
	Ag <sub>0</sub>	2,03·10 <sup>-6</sup>	
	COD	4,16·10 <sup>-3</sup>	
100	Ag <sup>+</sup>	1,17·10 <sup>-6</sup>	253,51
	Ag <sub>0</sub>	3,63·10 <sup>-6</sup>	
	COD	8,33·10 <sup>-3</sup>	
		<b>K<sub>Ag-AH</sub></b>	263,63±11,69

## Bibliografía

1. Templeton, D.M.; Ariese, F.; Cornelis, R.; Danielsson, L.; Muntau, H.; van Leeuwen, H.P. and Lobinski, R. (2000) *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects and methodological approaches*. Pure Applied Chemistry **72**, 1453-1470.
2. Sañudo-Wilhelmy, S.A. and Flegal, A.R. (1992) *Anthropogenic silver in the Southern California bight: A new tracer for sewage in coastal waters*. Environmental Science and Technology **26**, 2147-2151.
3. Jönsson, J.A. and Mathiasson, L.; (1999) *Liquid membrane extraction y analytical preparation. I. Principles*. TRAC-Trends in Analytical Chemistry **18**, 318-325.
4. Danesi, P.R: (1984) *Permeation of metal species by supported liquid membranes*. Separation Science and Technology **19**, (857-894).
5. Bartsch, R.A. and Way, J.D. (1996) *"Chemical Separations with Liquid Membranes"*. ACS Symposium Series 642.
6. Peterson, R.T. and Lamb, J.D. (1996) *Rational design of liquid membrane separations systems*. In Chemical separations with liquid membranes. Eds. R.A. Bartsch and J.D Way. ACS, Whashington.
7. Schlosser, S. (1993) *Pertraction through liquid membranes and transport mechanisms and transport mechanism. I Types of liquid membranes and transport mechanism*. The COMETT course "Advance course on membrane technology". Universidad de Calabria, Italia.
8. Mulder, M. and Kluwer (1998) *Basic Principles of Membrane Technology*. Second edition. Academic Publishers.
9. Belkhouche, N.E.; Didi, M.A.; Romero, R.; Jönsson, J.A. and Villemin, D. (2006) *Study of new organophosphorus derivates carriers on the selective recovery of M (II) and M (III) metals, using supported liquid membrane extraction*. Journal of Membrane Science **284**, 398-405.
10. Jönsson, J.A. and Mathiasson, L.; (1999) *Liquid membrane extraction y analytical preparation. II. Applications*. TRAC-Trends in Analytical Chemistry **18**, 325-334.
11. López-López, J.A.; Mendiguchía, C.; Pinto, J.J. and Moreno C. (2010) *Liquid membranes for quantification and speciation of trace metals in natural waters*. TRAC-Trends in Analytical Chemistry. In press
12. Mendiguchía, C.; Moreno, C. and García-Vargas, M. (2002) *Determination of copper in seawater based on a liquid membrane preconcentration system*. Analytica Chimica Acta **460**, 35-40.
13. Irigoyen, L.; Moreno, C.; Mendiguchía, C. and García-Vargas, M. (2006) *Application of liquid membranes to sample preparation for the spectrometric determination of cadmium in seawater*. Journal of Membrane Science **274**, 169-172.

14. Granado-Castro, M.D.; Galindo-Riaño, M.D. and García-Vargas, M. (2004) *Model experiments to test the use of a liquid membrane for separation and preconcentration of copper from natural water*. *Analytica Chimica Acta* **506**, 81-86.
15. Granado-Castro, M.D.; Galindo-Riaño, M.D.; Domínguez-Lledó, F.C.; Díaz-López, C. and García-Vargas, M. (2008) *Study of the kinetics of the transport of Cu(II), Cd (II), and Ni(II) ions through a liquid membrane*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **39**, 779-788.
16. Mendiguchía, C.; García-Vargas, M. and Moreno, C. (2008) *Screening of dissolved heavy metals (Cu, Zn, Mn, Al, Cd, Ni, Pb) in seawater by a liquid-membrane-ICP-MS approach*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**, 773-778.
17. N'dungu, K.; Hurst, M.P. and Bruland, K.W. (2005) *Comparison of copper speciation in estuarine water measured using analytical voltammetry and supported liquid membrane techniques*. *Environmental Science and Technology* **39**, 3166-3175.
18. Güell, R.; Fontás, C.; Salvadó, V. and Anticó, E. (2007) *Development of a selective optical sensor for Cr(VI) monitoring in polluted waters*. *Analytica Chimica Acta* **594**, 162-168.
19. Peng, J.; Liu, R.; Liu, J.; He, B.; X., I. and Jiang, G. (2008) *Ultrasensitive determination of Cd in seawater by hollow fiber supported liquid membrane extraction couples with graphite furnace atomic absorption spectrometry*. *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy* **62**, 499-503.
20. Sabry, F.; Hafez, A.; Khedr, M. and El-Hassanin, A. (2007) *Removal of lead by emulsion liquid membrane. Part I*. *Desalination* **212**, 165-175.
21. Kumbasar, R.A. and Sahin, I. (2009) *Separation and concentration of cobalt from ammoniacal solutions containing cobalt and nickel by emulsion liquid membranes using 5,7-dibromo-8-hydroxyquinoline (DBHQ)*. *Journal of Membrane Science* **325**, 712-718.
22. Luoma, S.N.; Ho, Y. and Bryan, G.W. (1995) *Fate, bioavailability and toxicity of silver in estuarine environments*. *Marine Pollution Bulletin* **31**, 44-54.
23. Bielmyer, G.K.; Brix, K.V. and Grosell, M. (2008) *Is Cl<sup>-</sup> protection against silver toxicity due to chemical speciation?*. *Aquatic Toxicology* **87**, 81-87.
24. Benn, T.M.; Westerhoff, P. (2008) *Nanoparticle silver released into water from commercially available socks fabrics*. *Environmental Science and Technology* **42**, 4133-4139.
25. Meakins, M. (2009) *Silver and new technology: dressings and devices*. *Surgical infections* **10**, 293-296.
26. Barriada, J.L.; Tappin, A.D.; Evans E.H. and Acherberg, E.P. (2007) *Dissolved silver measurements in seawater*. *TRAC-Trends in Analytical Chemistry* **26**, 809-817.
27. Essumang, D.K. and Nortso, B.K. (2008) *Analysis of silver in the water column of the Pra and Eture estuaries in Ghana*. *Chemistry and Ecology* **24**, 297-303.



28. N'dungu, K.; Ranville, M.A.; Fraks, R.P. and Flegal, A.R. (2006) *On-line determination of silver in natural waters by inductively-coupled plasma mass spectrometry: Influence of organic matter*. *Marine Chemistry* **98**, 109-120.
29. Buck, N.J., Gobler, C.J. and Sañudo-Wilhelmy, S.A. (2005) *Dissolved trace element concentrations in the Eas River-Long Island Sound System: Relative importance of autochthonous versus allochthonous sources*. *Environmental Science and Technology* **39**, 3528-3537.
30. Paiva, A.P. (2000) *Review of recent solvent extraction studies for recovery of silver from aqueous solutions*. *Solvent Extraction and Ion Exchange* **18**, 223-271.
31. Pearson, R.G. (1968) *Hard and soft acids and bases, HSAB, Part I: Fundamental Principles*. *Journal of chemical education* **45**, 581-587.
32. Pearson, R.G. (1968) *Hard and soft acids and bases, HSAB, Part II: Underlying theories*. *Journal of chemical education* **45**, 643-648.
33. Sirlin, C.; Burgard, M.; Leroy, M.J.F. and Prevost, M. (1990) *Silver nitrate refining using supported liquid membranes*. *Journal of Membrane Science* **54**, 299-305.
34. Arous, O.; Gherrou, A. and Kerdjoudj, H. (2004) *Removal of Ag(I), Cu(II), and Zn(II) ions with a supported liquid membrane containing cryptands as carriers*. *Desalination* **161**, 1681-1693.
35. Lachowicz, E.; Rozanska, B and Teixidor, F. (2002) *Comparison of sulphur and sulphur-oxygen ligands as ionophores for liquid-liquid extraction and facilitated transport of silver and palladium*. *Journal of Membrane Science* **210**, 279-290.
36. Lachowicz, E. (1992) *Study of the transport of silver across a supported liquid membrane containing sulphide podand*. *Talanta* **39**, 1031-1037.
37. Kertesz, R; Schlosser, S. and Teixidor, F. (2002) *Pertraction of silver with octylphenylsulfide as carrier in a hollow fiber contactor*. *Desalination* **148**, 263-265.
38. Muñoz, M.; Palet, C. and Valiente, M. (1990) *An immobilized liquid membrane containing triisobutyl phosphine sulphide for the selective separation of silver from base metals*. *Analytical Letters* **23**, 1591-1606.
39. Hubicki, Z. and Hubicka, H. (1995) *Studies on the removal of silver(I) from nitrate solutions by Cyanex-471X*. *Hydroetallurgy* **37**, 207-219.
40. Argekar, A.A.; Kulkarni, M.J.; Mathur, J.N.; Page, A.G. and Iyer, R.H. (1995) *ICP-OES determination of silver after chemical separation from uranium matrix*. *Talanta* **42**, 1937-1942.
41. Vajda, M.; Schlosser, S. and Kovakova, K. (2000) *Pertraction of silver through bulk liquid membranes*. *Chemical Papers* **54**, 423-429.
42. Katz, S.A.; H. Salem. *The Biological and Environmental Chemistry of Chromium*, VCH, New York (1994).
43. Parthasarathy, N. and Buffle, J. (1994) *Capability of supported liquid membranes or metal speciation in natural waters: application to copper speciation*. *Analytica Chimica Acta* **284**. 649-659.

44. Pesavento, M.; Alberti, G. and Bieszu, R. (2009) *Analytical methods for the determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review*. *Analytica Chimica Acta* **631**, 129-141.
45. Djane, N.; Ndung'u, K.; Johnsson, C.; Sartz, H.; Tornstrom, T, and Mathiasson, L. (1999) *Chromium speciation in natural waters using serially connected supported liquid membranes*. *Talanta* **48**, 1121-1132.
46. Petrovic-Trtic, T. and Jönsson, J.A. (2002) *Application of SLM extraction for investigation of metal-humic acid bindings*. *Desalination* **148**, 247-251.
47. Romero, R. and Jönsson, J.A. (2005) *Determination of free copper concentrations in natural waters by using supported liquid membranes extraction under equilibrium conditions*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **381**, 1452-1459.
48. Alguacil, F.J.; Coedo, A.G., and Dorado, M.T. (2000) *Transport of Chromium (VI) through a Cyanex 923-xylene flat-sheet supported liquid membrane*. *Hydrometallurgy* **57**, 51-56.
49. Agrawal, T.K., and Sharma, K.R. (2005) *Speciation, liquid-liquid extraction, sequential separation, transport and ICP-AES determination of Cr(III), Mo(VI) and W(VI) with calyx-crown hydroxamic acid in high purity grade materials and environmental samples*. *Talanta* **67**, 112-120.
50. Unsworth, E.R.; Warnken, K.W.; Zhang, H.; Davidson, W.; Black, F.; Buffle, J.; Cao, J.; Cleven, R.; Galceran, J.; Gunkel, P.; Kalis, E.; Kistler, D.; Van Leeuwen, H.P.; Martin, M.; Noël, S, Nur, Y.; Odzak, N.; Puy, J.; Van Riemsdijk, W.; Sigg, L.; Temminghoff, E.; Tercier-Waeber, M.; Toepperwien, S.; Town, R.M.; Weng, L, and Xue, H. (2006) *Model predictions of metal speciation in freshwaters compared to measurements by in situ techniques*. *Environmental Science and Technology* **40**, 1942-1949.
51. Parthasarathy, N.; Pellettier, M.; Tercier-Waeber, M., and Buffle, J. (2001) *On-line coupling of flow through voltammetric microcell to hollow fiber permeation liquid membrane device for subnanomolar trace metal speciation measurements*. *Electroanalysis* **13**, 1305-1314.
52. Sigg, L.; Black, F.; Buffle, J.; Cao, J.; Cleven, R.; Davidson, W.; Galcerán, J.; Gunkel, P.; Kalis, E.; Kistler, D.; Martin, M.; Noel, S.; Nur, Y.; Odzak, N.; Puy, J.; Van Riemsdijk, W.; Temminghoff, E.; Tercier-Waeber, M.L.; Toepperwien, S.; Town, R.M., Unsworth, E.;Warnken, K.W.; Weng, L.; Xue, H. and Zhang, H. (2006) *Comparison of analytical techniques for dynamic trace metal speciation in natural freshwaters*. *Environmental Science and Technology* **40**,1934-1941.
53. Bayen, S.; Gunkel-Grillon,P.; Worms, I.; Martin, M. and Buffle, J. (2009) *Influence of inorganic complexes on the transport of trace metals through permeation liquid membrane*. *Analytica Chimica Acta* **646**, 104-110.
54. Zhang, Z.; Buffle, J.; van Leeuwen, H.P., and Wojciechowski, K. (2006) *Roles of metal ion complexation and membrane permeability in the metal flux through lipophilic membranes. Labile complexes at permeation liquid membranes*.

55. Parthasarathy, N.; Pelletier, M., and Buffle, J. (2008) *Transport of lipophilic ligands through permeation liquid membrane in relation to natural water analysis*. Journal of Membrane Science **309**, 182-188.
56. Bayen, S.; Wilkinson, K.J., and Buffle, J. (2007) *The permeation liquid membrane as a sensor for free nickel in aqueous samples*. Analyst **132**, 262-267.
57. Tomaszewski, L.; Buffle, J., and Galceran, J. (2003) *Theoretical and analytical characterization of a flow-through permeation liquid membrane with controlled flux for metal speciation measurements*. Analytical chemistry **75**, 893-900.
58. Zhang, Z.; Buffle, J.; Herman, P.; Leewuen (2007) *Roles of dynamic metal speciation and membrane permeability in metal flux through lipophilic membranes: General theory and experimental validation with nonlabile complexes*. Langmuir **23**, 5216-5226.
59. Parthasarathy, N.; Pelletier, M.; Buffle, J. (2004) *Permeation liquid membrane for trace metal speciation in natural waters. Transport of liposoluble Cu(II) complexes*. Journal of Chromatography A **1025**, 33-40.
60. Romero, R.; Liu, J.F.; Mayer, P. and Jönsson, J.A. (2005) *Equilibrium sampling through membranes of freely dissolved copper concentrations with selective hollow fiber membranes and spectrophotometric detection of a metal stripping agent*. Analytical Chemistry **77**, 7605-7611.
61. Van Leeuwen, H.P.; Town, R.M.; Buffle, J.; Cleven, R.F.M.J.; Davidson, W.; Van Riemsdijk, W.H., and Sigg, L. (2005) *Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems*. Environmental Science and Technology **39**, 8545-8556.
62. Bayen, S.; Worms, I.; Parthasarathy, N.; Wilkinson, K, and Buffle, J. (2006) *Cadmium bioavailability and speciation using the permeation liquid membrane*. Analytica Chimica Acta **575**, 267-276.
63. Slaveykova, V.I.; Parthasarathy, N.; Buffle, J., and Wilkinson, K.J. (2004) *Permeation liquid membrane as a tool for monitoring available Pb in natural waters*. Scienci of the Total Environment **238**, 55-64.
64. Xia, L.; Hu, B., and Wu, Y. (2007) *Hollow fiber-based liquid-liquid-liquid microextraction combined with hig-performance liquid chromatography for the speciation of organomercury*. Journal of Chromatography A **1173**, 44-51.
65. Chukrowska, E.M.; Nsengimana, H.; Chimuka, L. (2007) *Speciation of alkyllead in aqueous samples with application of liquid membrane probe for extraction and preconcentration*. Journal of Separation Science **30**, 2754-2759.
66. Nichols, J.W.; Brown, S.; Wood, C.M.; Walsh, P.J. and Playle, R.C. (2006) *Influence of salinity and organic matter on silver accumulation in Gulf toadfish (Opsanus beta)*. Aquatic Toxicology **78**, 253-261.
67. Miller, L.A. and Bruland, K.W. (1995) *Organic speciation of silver in marine waters*. Environmental Science and Technology **29**, 2616-2621.

68. Bruland K.W.; Coale, K.H. and Mart, L. (1985) *Analysis of seawater for dissolved cadmium, copper, and lead: An intercomparison of voltametric and atomic absorption methods*. Marine Chemistry **17**, 285–300.
69. Russell, T.H.; Anders, W.A. and David, E.A. (2001) *Determination of silver speciation in natural waters. I. Laboratory test of Chelex-100 chelating resin as a competing ligand*. Environmental Science and Technology **35**, 1953-1958.
70. Valverde, F.; Costas, M.; Pena, F.; Lavilla, I. and Bendicho, C. (2008) *Determination of total silver and silver species in coastal seawater by inductively-coupled plasma mass spectrometry after batch sorption experiments with Chelex-100 resin*. Chemical Speciation and Bioavailability **20**, 217-226.
71. Savenko, V.S. and Tagirov, B.R. (1996) *The physico-chemical state of silver in seawater (inorganic forms)*. Oceanology **36**, 212-215.
72. Burriel, F (2002) *Química Analítica Cualitativa*. Decimooctava edición. Thomson D.L., Madrid.
73. García-Luque, E.; Forja, J.M.; Delvals, A.M. and Gómez-Parra, A. (2003) *The behaviour of heavy metals from the Guadalquivir river after the Aznalcollar mining spill: field and laboratory surveys*. Environmental Monitoring and Assessment **83**, 71-88.



## **Capítulo 4. Metodología de estudio de calidad de aguas en el estuario del río Guadalquivir.**

Este estudio tiene como principal objetivo la caracterización química del río Guadalquivir y sus fuentes de contaminación, así como el establecimiento de sus principales entradas de contaminantes tanto por vía fluvial como atmosférica. Para poder llevar a cabo este trabajo, es necesario conocer la zona del río estudiada en su conjunto, para determinar con posterioridad si existen los mencionados aportes y la magnitud de los mismos.

Así, en primer lugar se describirá el estudio de la contaminación general del estuario del río Guadalquivir, prestando especial atención a la distribución espacio-temporal de contaminantes y a su origen. Este trabajo, además permitirá establecer el carácter de nuevas especies químicas como indicadores de la calidad del agua y su potencial aplicación como trazadores de actividades antropogénicas.

Por último, una vez que se haya establecido el estado general de la calidad del agua, se podrá realizar el estudio de aporte de contaminantes por las dos vías descritas: la atmósfera y los afluentes. Para eso se estudiará el estuario desde dos puntos de vista; el primero tiene como objetivo comprobar la existencia de los aportes y su efecto en el río, el segundo se realizará para clasificar las distintas zonas geográficas del estuario del Guadalquivir y comprobar el carácter de las entradas de contaminación.

### **Diseño de las redes de muestreo**

Como se ha explicado anteriormente, para poder realizar el estudio de aportes externos de contaminación en las aguas del río Guadalquivir, es necesario establecer dos situaciones bien diferenciadas. Para el estudio del estado general del río, así como para determinar la contribución de los ríos afluentes se puede realizar una serie de muestreos sistemáticos a lo largo de un periodo de tiempo determinado, mientras que para el estudio de aportes atmosféricos en forma de precipitación, es necesario realizar la toma de muestras después de las mismas, en muestreos puntuales. Por este motivo se han diseñado dos redes y sistemas de muestreo distintos:

### 1. Red de muestreo sistemático

Las tomas de muestra de esta red se han realizado a lo largo del estuario del río Guadalquivir para establecer el estado general de su contaminación. Los muestreos tienen lugar desde una embarcación y se realizan en varios días, hasta completar todas las estaciones de muestreo seleccionadas para el estudio. La toma de agua de los ríos afluentes se realiza durante estos muestreos, para poder realizar la comparación de los datos obtenidos para los dos sistemas.

### 2. Red de muestreo puntual

Esta red de muestreo es una subred de la anterior. En el apartado anterior se ha descrito la zona de estudio y las distintas áreas en las que se puede dividir. Se han descrito distintas zonas de influencia urbana, caracterizadas por el inicio del estuario, la ciudad de Sevilla, como gran aglomeración urbana, y una zona aguas debajo de esta donde predomina la agricultura extensiva y el efecto de la salinidad es importante. Teniendo en cuenta esto, se han seleccionado distintas estaciones de muestreo que son características de cada una de estas zonas para poder realizar el estudio de aportes de contaminantes atmosféricos. La primera se encuentra en la parte más alta del estuario, posteriormente se han establecido dos puntos de toma en la zona afectada por Sevilla y por último otros dos en la zona final del estuario.

### 3. Selección de las estaciones de muestreo.

Atendiendo a trabajos anteriores [1,2] se han escogido una serie de puntos que son representativos de la calidad de las aguas del estuario del río Guadalquivir. A continuación se describe la importancia y características de los puntos escogidos.

Para distinguir las estaciones de muestreo han sido nombradas en función de las iniciales del río al que corresponden. Así, las estaciones situadas en la canal el río Guadalquivir comienzan con la letra G y han sido numeradas desde la G1 a la G14 en orden creciente desde la cabecera del estuario hasta la desembocadura.

#### 3.1. Estaciones de muestreo del río Guadalquivir.

##### - Alcalá del Río (G1):

Esta estación de muestreo se caracteriza por el aporte desde aguas arriba del río, al ser el punto inicial de la zona de estudio (Figura 4-1). Además es importante tener en

cuenta la presencia de la población de Alcalá de Río como foco de contaminación urbana así como la localización en esta zona de diferentes actividades agrícolas, principalmente dedicadas a cultivos extensivos de invierno como el algodón. La presencia de una presa en este punto hace que la zona de influencia mareal del río se vea limitada, y fundamentalmente, que sea un punto de máxima influencia sobre el estuario en el caso de apertura de sus compuertas.



Figura 4-1. Alcalá del Río (G1)

- La Algaba (G2):

La localidad de la Algaba está enmarcada en un enclave principalmente rural, caracterizado por la agricultura, con dos tipos de cultivo en cada margen del río. En la margen izquierda (hacia la desembocadura) predominan los cítricos, mientras que en la margen derecha la presencia de cultivos extensivos de invierno es más importante. A pesar de este carácter marcadamente agrícola existen dos puntos de vertido urbano próximos al lugar de toma de muestra.

- Arroyo del Tamarguillo (G3):

Es la primera estación de muestreo de la zona de influencia de la ciudad de Sevilla y se localiza en la desembocadura del Arroyo del Tamarguillo, que porta las aguas procedentes de efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) urbanas de la planta de San Jerónimo (Figura 4-2). Esta EDAR depura las aguas



procedentes de la zona Norte de Sevilla y de la Isla de La Cartuja, teniendo una capacidad de 350.000 Hab. eq. y un caudal de  $90.000 \text{ m}^3\text{día}^{-1}$ . Además de este aporte, que caracteriza al punto de muestreo, hay que tener en cuenta que las actividades en los márgenes del río son fundamentalmente industriales y urbanas, aunque es posible localizar pequeñas explotaciones agrícolas de frutales.



Figura 4-2. Vista aérea de la EDAR San Jerónimo (G3).

- Puente del Patrocinio (G4):

Esta estación (Figura 4-3), que se encuentra en la misma zona que la anterior, ha sido utilizada para estudiar la entrada de aportes industriales y urbanos sobre el río. Su selección responde a que la anterior se encuentra localizada justo en el punto de desembocadura del Arroyo del Tamarguillo, lo que puede enmascarar los efectos de vertidos directos de la zona en la que se encuentra. Esta zona sigue caracterizándose por ser prácticamente en su totalidad urbana e industrial, con pequeñas explotaciones agrícolas destinadas al cultivo de frutales.



Figura 4-3. Puente del Patrocinio (G4).

- San Juan de Aznalfarache (G5):

Este punto se puede considerar como el núcleo de la zona de influencia urbana de Sevilla sobre el río. En dirección a la desembocadura, se puede observar a la margen derecha la comarca del Aljarafe, mientras que en la izquierda se localiza la ciudad de Sevilla. Hay que tener en cuenta que se han desarrollado las obras del metro de la ciudad durante el periodo de estudio y que este punto se ha visto afectado por las mismas, de hecho durante el año 2008 se ha procedido al dragado de esta zona. Como posible foco de contaminación puntual se encuentra una planta arrocera en la ribera del río (Arrocería Herbás) (Figura 4-4).

- Gelves (G6):

Junto con la anterior forman las estaciones de mayor carácter urbano de cuantas se han seleccionado, tanto por la presencia de la localidad de Gelves como por la entrada de efluentes de la EDAR de Tablada. Esta EDAR recibe las aguas de la zona oeste de Sevilla (Chapina, Los Remedios y Triana) y tiene una capacidad de 200.000 Hab. eq. y un caudal de  $50.000 \text{ m}^3\text{día}^{-1}$ . Puede tener cierta importancia la presencia de un puerto deportivo que sirve de atraque a embarcaciones de recreo principalmente (Figura 4-5).



Figura 4-4. Arrocería Herbás (G5).



Figura 4-5. Puerto deportivo de Gelves (G6).

- Coria del Río (G7):

Es la última estación de las situadas cerca de zonas urbanizadas. Se recupera el carácter agrícola de la ribera del río con cultivos de cítricos en la margen derecha, mientras que en la margen izquierda se observan plantaciones de algodón. No hay que perder de vista la influencia de la población de Coria del Río (Figura 4-6), de donde pueden proceder vertidos de aguas residuales urbanas sin depurar.



Figura 4-6. Río Guadalquivir a su paso por Coria del Río (G7).

- Los Olivillos (G8):

Esta estación de muestreo se localiza en la Isla de los Olivillos, que ha sido propuesta como Paraje Natural (Figura 4-7). Se puede considerar una zona netamente agrícola, con el arroz como cultivo predominante, y sin influencia importante de asentamientos urbanos, excepto la Puebla del Río. Además, se puede considerar este punto como una zona limpia con la que comparar el río Guadaira, que es uno de los afluentes estudiados, por se la estación inmediatamente anterior a su entrada al río.



Figura 4-7. Paraje natural de Los Olivillos (G8).

- Corta de los Jerónimos (G9):

La estación de muestreo se localiza en la zona sur de la Corta de los Jerónimos (Figura 4-8), que es una isla en la que se encuentran varios cortijos y zonas de recreo. Su importancia radica en ser el punto en el que se estimará la evolución de contaminantes aportados por el río Guadaira al Guadalquivir. Además en este punto, eminentemente agrícola, se empieza a hacer patente la variación de salinidad debida a la mezcla de agua de río y de mar procedente de la desembocadura.



Figura 4-8. Corta de Los Jerónimos (G9).

- Brazo del Este (G10):

Nos encontramos con el punto en el que se puede considerar, atendiendo al gradiente de salinidad, que comienza el estuario. Es un área fundamentalmente agrícola, donde destacan los cultivos de arroz y se enmarca en el término municipal de Lebrija. En este punto se encuentra el Brazo del Este, que es un canal que se adentra en la margen izquierda del río y es utilizado para la extracción de agua para el riego de los cultivos de la zona.

- Trebujena (G11):

Este punto de muestreo se encuentra en el término municipal de Trebujena (Figura 4-9), junto a la división entre las provincias de Cádiz y Sevilla, aunque la zona urbana de esta localidad se encuentra a varios kilómetros tierra adentro. Es una zona caracterizada por el cultivo de cereales, aunque también cabe destacar la presencia de piscifactorías en

las zonas circundantes. Se puede utilizar este punto como referencia para el establecimiento de los aportes del río Guadamar, que es el último afluente estudiado en dirección a la desembocadura.



Figura 4-9. Río Guadalquivir a su paso por Trebujena (G11).

- Caño Brenes (G12):

Es un punto que permite evaluar el efecto de dilución del río sobre los posibles contaminantes aportados por el río Guadamar. Además es un punto de muestreo útil para el estudio de procesos estuáricos sobre los contaminantes ya que permite establecer el perfil de salinidad a lo largo del estuario. Está afectado por actividades agrícolas y esencialmente por las piscifactorías que se encuentran en las marismas del Guadalquivir (Figura 4-10).

- Boya 7 (G13):

Esta estación de muestreo es la última antes de la desembocadura y se encuentra caracterizada por la presencia del Parque Nacional de Doñana en la margen derecha del río, siendo el punto de división entre las provincias de Huelva y Sevilla. Se encuentra estrechamente ligada al efecto de la marea, destacando en cuanto a las actividades desarrolladas en su entorno, la pesca.



Figura 4-10. Caño Brenes (G12).

- Sanlúcar (G14):

Se localiza en la desembocadura del río (Figura 4-11). Es una zona con varias fuentes de contaminación potencial. En primer lugar se encuentra la influencia urbana de la población de Sanlúcar de Barrameda, en la margen izquierda. Por otro lado la presencia de cultivos hortícolas es muy importante, y tampoco hay que perder de vista la actividad pesquera, que supone una importante fuente de ingresos en la localidad. En su margen derecha se encuentra el Parque Nacional de Doñana.



Figura 4-11. Sanlúcar de Barrameda (G14).

### 3.2. Estaciones de muestreo de los ríos afluentes.

#### - Rivera de Huelva (RH):

El río Rivera de Huelva es el primer afluente que se encuentra desde el comienzo del estuario (Figura 4-12). Aguas arriba de este punto se encuentra una zona minera que no se encontraba bajo explotación durante el periodo de estudio, pero que ha sido reabierto posteriormente. Cuando se planteó el presente proyecto se decidió utilizar como posible indicador de contaminación agrícola, ya que los cultivos de cítricos y algodón en esta zona son predominantes. También hay que tener en cuenta que es el último punto de muestreo antes de la zona de influencia de la ciudad de Sevilla, así como el único aporte externo entre Alcalá del Río y Sevilla.



Figura 4-12. Rivera de Huelva (RH).

#### - Dársena del Guadalquivir (D):

Es el segundo punto considerado como afluente del Guadalquivir. A pesar de que no constituye esencialmente una entrada de agua al río, tiene gran importancia por su localización urbana y el tránsito de grandes buques que la atraviesan hacia el puerto de Sevilla. Además, aguas arriba de la dársena se realizan numerosas actividades industriales, destacando las realizadas en los astilleros de la capital sevillana. Durante el desarrollo del presente proyecto se han acometido las obras de la nueva exclusiva de la dársena y es en este punto donde se ha localizado la estación de muestreo (Figura 4-13).





Figura 4-13. Obra de la nueva esclusa de la dársena del Guadalquivir (D).

- Río Guadaira (RG):

El río Guadaira es un afluente del Guadalquivir que arrastra los efluentes de las estaciones depuradoras de la zona de Sevilla Este (Figura 4-14), por lo que se utilizará para estudiar el posible aporte de contaminantes urbanos sobre el río. En la desembocadura del río se observan importantes asentamientos de aves así como tomas de agua para regadío, principalmente destinadas al cultivo de cereales. Su caudal se encuentra muy afectado por el estado de la marea y en ocasiones no es posible navegar por él si ésta es suficientemente baja, por lo que el punto de muestreo en el río Guaira se encuentra a 100 metros de la desembocadura del mismo en su interior.

- Brazo de la Torre (BT):

Se conoce así a la desembocadura del río Guadiamar (Figura 4-15). Esta zona tiene gran importancia ecológica y social, acentuada tras el accidente de las minas de Aznalcóllar en 1998. El Brazo de la Torre sirve de frontera natural para el Parque Nacional de Doñana. Además de las características naturales que le confiere atravesar una zona pirítica con amplia actividad minera, hoy en día puede añadirse que las principales fuentes de contaminación pueden deberse a la agricultura. Igualmente, cabe destacar que su comportamiento puede verse afectado por la salinidad ya que está cerca de la desembocadura del río Guadalquivir.



Figura 4-14. Río Guadaira (RG).



Figura 4-15. Desembocadura del río Guadamar (BT).

### 3.3. Estaciones de muestreo selectivo.

Como se ha comentado anteriormente, para estos muestreos, se seleccionaron estaciones de especial representatividad de las distintas zonas del río que se han descrito. En primer lugar se escogió la estación G1 (Alcalá del Río) como cabecera del estuario, a continuación como representativas de la zona urbana se han elegido los dos

puntos que se pueden considerar como núcleo de la zona de influencia de Sevilla: San Juan de Aznalfarache (G5) y Gelves (G6). Por último se han seleccionado dos estaciones más, una en la parte central del río que es el Bazo del Este (G12) y otra en el punto G14 (Trebujena) que se encuentra más cercana a la desembocadura.

A continuación se muestra la posición de las estaciones de muestreo en un mapa de la zona de estudio (Figura 4-16). Sus coordenadas GPS se encuentran disponibles en la Tabla 4-1.

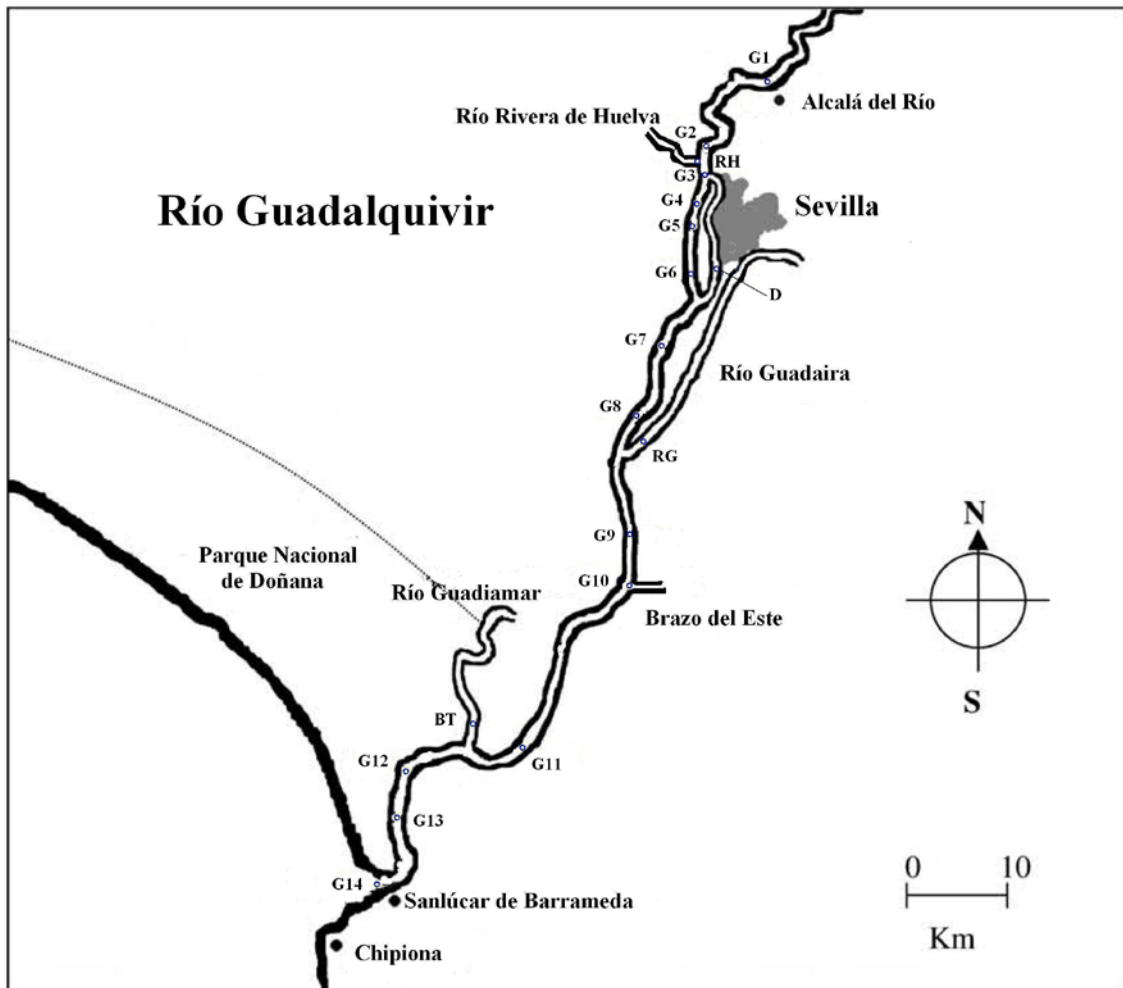


Figura 4-16. Localización de las estaciones de muestreo en el río Guadalquivir

#### 4. Periodicidad de los muestreos.

##### 4.1. Muestreo sistemático.

Para realizar este tipo de muestreo se ha tenido en cuenta que uno de los objetivos del presente trabajo es establecer posibles diferencias estacionales en el comportamiento

de los contaminantes en las aguas del río Guadalquivir. Por este motivo se han realizado dos muestreos anuales durante los años 2007 y 2008, uno al final de la estación húmeda (febrero 2007 y abril 2008) y otro al final de la estación seca (octubre de 2007 y noviembre de 2008).

Tabla 4-1. Posición GPS de las estaciones de muestreo

Nombre	Estación	Posición
Alcalá del Río	G1	37- 30-31.2/05-58-50.1
La Algaba	G2	37-27-30.9/06-00-28.8
Rivera de Huelva	RH	37-26-30.3/06-00-21.4
Arroyo del Tamarguillo	G3	37-25-18.5/06-00-34.7
Puente del Patrocinio	G4	37-23-18.1/06-01-6.4
S. Juan de Aznalfarache	G5	37-21-1 .7/06-01-21.1
Gelves	G6	37-20-09.6/06-01-14.5
Dársena	D	37-19-68.8/05-99-72.9
Coria del Río	G7	37-16-37.4/06-03-02.9
Los Olivillos	G8	37-11-23.3/06-05-58.1
Río Guadaira	RG	37-10.627/06-06.016
Corta de Los Jerónimos	G9	37-06-33.6/06-05-09.1
Brazo del Este	G10	37-03-31.3/06-05-28.8
Trebujena	G11	36-53.813/06-13.943
Brazo de la Torre	BT	36-54-43.8/06-16-37.8
Caño Brenes	G12	36-54-06.1/06-20-01.7
Boya 7	G13	36-52.13/06-21.096
Sanlúcar	G14	36-47-50.9/06-20-31.2

#### 4.2. Muestreo puntual.

La temporalidad de este tipo de muestreo ha estado condicionada por la climatología, habiéndose realizado las tomas de agua siempre un día después de cada episodio de precipitación. De esta forma se recogieron muestras para este tipo de muestreo en las fechas y puntos de toma indicados en la Tabla 4-2.

#### 5. Selección de las variables utilizadas para determinar la calidad del agua.

En este estudio se han seleccionado varios grupos de contaminantes y parámetros de calidad que permiten tener un conocimiento global de la composición química del sistema estudiado, los cuales se describen a continuación:

Tabla 4-2. Muestreos selectivos realizados durante el periodo de estudio

Nombre	Estación	Fecha	Nombre	Estación	Fecha
Alcalá del Río	G1	26/04/2007	Gelves	G6	22/11/2007
S. Juan de Aznal.	G5	26/04/2007	Alcalá del Río	G1	17/01/2008
Gelves	G6	26/04/2007	S. Juan de Aznal.	G5	17/01/2008
Trebujena	G11	03/05/2007	Gelves	G6	17/01/2008
Alcalá del Río	G1	24/05/2007	Alcalá del Río	G1	04/02/2008
S. Juan de Aznal.	G5	24/05/2007	S. Juan de Aznal.	G5	04/02/2008
Gelves	G6	24/05/2007	Gelves	G6	04/02/2008
Brazo del Este	G10	13/09/2007	Alcalá del Río	G1	14/04/2008
S. Juan de Aznal.	G5	13/09/2007	S. Juan de Aznal.	G5	14/04/2008
Gelves	G6	13/09/2007	Gelves	G6	14/04/2008
S. Juan de Aznal.	G5	22/11/2007	Trebujena	G14	15/04/2008

### 5.1. Variables físico-químicas:

Son variables importantes, ya que además de condicionar las reacciones químicas que tienen lugar en el medio acuático, ofrecen una primera aproximación al estado de calidad de las aguas naturales. Temperatura y salinidad, condicionan tanto la cinética como la termodinámica de las reacciones químicas en los estuarios, mientras que oxígeno disuelto y pH se pueden utilizar como indicadores de actividad urbana, al experimentar disminuciones considerables en estas zonas [3,4].

Otra variable de importancia que se incluye en este grupo son los sólidos en suspensión, cuyo comportamiento suele venir marcado por el encuentro de masas de agua de distinta salinidad [5,6], aunque también existen aportes desde zonas urbanas y agrícolas, por escorrentía [7]. Un aspecto importante en el estudio de los sólidos en suspensión es su influencia en el comportamiento de otras variables debido a procesos de adsorción-desorción [8].

### 5.2. Nutrientes nitrogenados y fosforados:

La presencia de nutrientes inorgánicos en concentraciones relativamente elevadas suele tener como origen la actividad humana. Este grupo se puede dividir en dos grandes bloques, el de los nutrientes nitrogenados ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_2^-$ ) y el de los fosforados ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). En el primer caso, tanto el contenido total de nitrógeno como su especiación permiten relacionarlos con ciertas actividades antropogénicas [9], así el  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NH}_4^+$  se relacionan con zonas de elevada urbanización [10,11], mientras que el

$\text{NO}_3^-$  puede aparecer bien como residuo urbano o agrícola [12,13]. Por otro lado, el  $\text{PO}_4^{3-}$  presenta un comportamiento similar al del  $\text{NO}_3^-$ , con dos focos esenciales de emisión, la actividad doméstica [4] y la agrícola [14]. El interés sobre la concentración de nitrato en el estuario del Guadalquivir es máximo, ya que la zona urbana del mismo ha sido declarada como vulnerable a este contaminante por el Gobierno Autonómico Andaluz [15].

### 5.3. Carbono:

La concentración y comportamiento del carbono total y su especiación tienen relación con actividades humanas tanto de tipo urbano como agrícola. El comportamiento del carbono inorgánico, fundamentalmente presente como bicarbonato, está ligado a la presencia de limo en zonas agrícolas, así como a la mezcla de masas de agua en estuarios [16]. Mientras, el carbono orgánico permite establecer la carga orgánica de las aguas naturales y en general se suele asociar a zonas urbanas, desde donde es arrastrado en las aguas residuales [17] o con zonas agrícolas, desde donde llega por escorrentía.

### 5.4. Metales:

El estudio de la concentración de metales en aguas naturales es importante, ya que el nivel que presenten estará directamente relacionado tanto con sus efectos sobre la vida, como con su origen, bien sea este natural o antropogénico [16].

Estudios previos en el río Guadalquivir han reflejado que la determinación de metales pesados como Cu, Mn, Ni, Pb, Zn, Co y Cd [2] es una herramienta útil para establecer la calidad de las aguas, así como para establecer el origen de los mismos. También reviste interés la determinación de Ag en las aguas de este río por su reconocido valor como trazador de actividades urbanas [19]. Establecer la relación de este metal con la de los otros previamente estudiados permitirá relacionar su presencia con su origen y distribución.

### 5.5. Compuestos orgánicos:

Se ha seleccionado un conjunto de compuestos orgánicos de uso cotidiano en distintas aplicaciones de la actividad humana divididos en grupos en función de su

aplicación y características químicas. En primer lugar se encuentran los pesticidas triazínicos simazina, atrazina, terbutilazina. También se han determinado los contenidos de insecticidas fosforados como dimetoato, herbicidas acetanilídicos como alacloro y metalachloro o pesticidas como el lindano. Por otro lado se han determinado compuestos de uso doméstico como cafeína, metildihidrojasmonato y triclosan, para terminar con el análisis de tris-cloroetilfosfato, que es utilizado como retardante de llama en plásticos (Figura 4-17).

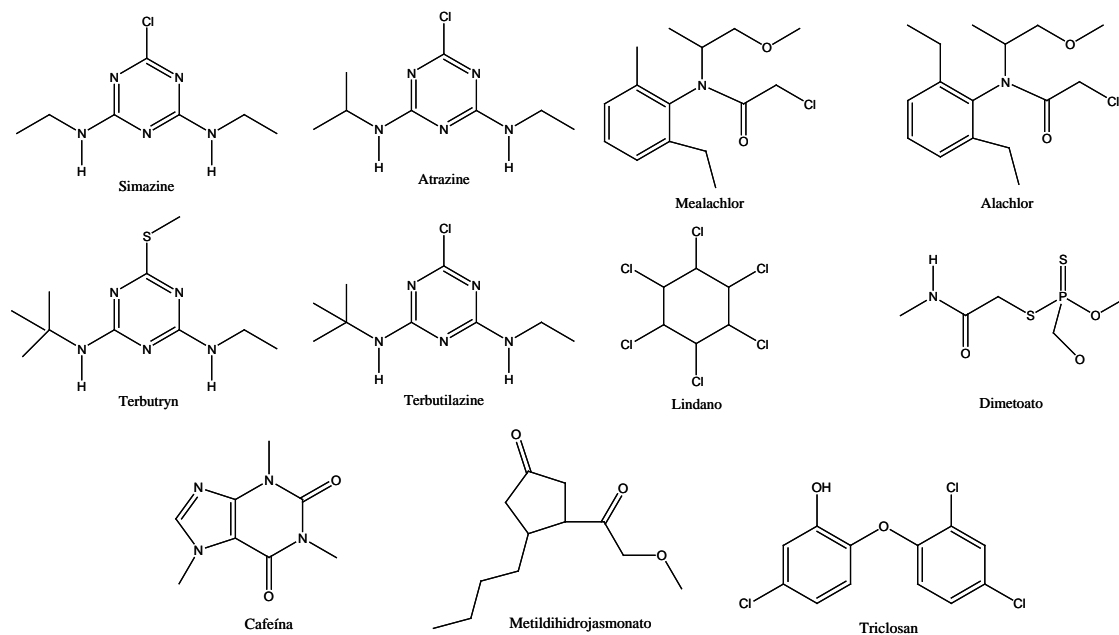


Figura 4-17. Compuestos orgánicos analizados.

## Metodología analítica

### 1. Toma de muestras

En primer lugar hay que considerar el tipo de muestra que se necesita tomar. En este caso se trata de muestras de agua de río superficiales, que para ser representativas deben tomarse en la canal del mismo, evitando en la medida de lo posible las interacciones con el sedimento. Este hecho condiciona la forma de tomar las muestras, ya que es necesario el uso de embarcaciones para acceder a la mayoría de los puntos de toma. En este caso se ha contado con la colaboración de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía y de la empresa EGMASA, que han permitido el acceso a las embarcaciones AMAVI y Dunas de Doñana, para facilitar la recogida de muestras de agua.

Otro aspecto a tener en cuenta, que es de gran importancia en el estudio de la contaminación de sistemas naturales, es la posibilidad de contaminación de las muestras durante su recogida, ya que muchas de las variables químicas a estudiar se encuentran a concentraciones muy bajas [20]. Para evitar esta situación es necesario implantar y ejecutar protocolos de limpieza del material y toma de muestra que permitan llevar a cabo los muestreos de la forma más representativa posible.

### 1.1. Descripción de la toma de muestras

Como se ha podido comprobar atendiendo a las variables físico-químicas estudiadas, se han tomado muestras para análisis de la fase disuelta y particulada. En el caso de la fase particulada la filtración de las muestras se realiza en el laboratorio como parte de su análisis, pero para la fase disuelta las muestras deben ser filtradas antes de realizar los análisis. Con el fin de minimizar la manipulación de las muestras la filtración se ha realizado *in-situ*, empleando cartuchos de filtración de nylon de  $0,45\mu\text{m}$  de tamaño de poro; considerando que todo lo que pase a través del filtro está disuelto.

Para hacer pasar el agua a través del filtro y que de éste llegue al recipiente que va a contener la muestra, se impulsa con la ayuda de una bomba peristáltica. Para evitar en la medida de lo posible la contaminación de las muestras el tubo que se conecta a la bomba peristáltica es de teflón, previamente acondicionado (Figura 4-18).



Figura 4-18. Bomba peristáltica utilizada en el muestreo

Para que las condiciones de limpieza sean óptimas durante el muestreo es necesario el concurso de tres personas, una de las cuales se encarga de mantener el tubo de teflón dentro del agua a una profundidad adecuada durante la toma de muestras (unos



50 cm). Las otras dos personas se conocen, una como *manos sucias*, que es quien puede entrar en contacto con todo aquel material distinto a los contenedores de muestras y la otra como *manos limpias*, que se encarga exclusivamente de manipular los botes contenedores de las muestras, garantizando que éstos no han sido contaminados por ningún elemento de la embarcación u otro tipo de material. En la siguiente figura se observa el papel llevado a cabo por cada individuo (Figura 4-19).



Figura 4-19. De izquierda a derecha se pueden observar: manos limpias, manos sucias y pértiga con el tubo de teflón.

El uso de esta metodología depende de los requerimientos de los análisis, es decir, para determinar especies a muy baja concentración será necesario proceder de esta forma (metales), mientras que cuando el nivel de exigencia en cuanto a la limpieza no es tan elevado, no es necesario seguir el protocolo *manos limpias-manos sucias* (sólidos en suspensión). Por este motivo, la toma para cada tipo de muestra presenta un protocolo diferente, que se describe a continuación:

- Muestra I: Sólidos en suspensión y variables físico-químicas.

Estas muestras se toman sin filtrar en botellas de plástico de 500 mL, previamente enjuagadas con agua del punto de muestreo 3 veces. Esta muestra es utilizada para la medición de los parámetros físico-químicos que se realiza en la embarcación gracias a una sonda multiparamétrica, que permite medir pH, oxígeno disuelto, temperatura y conductividad, y una vez en el laboratorio, para medir el contenido de sólidos en suspensión.

- Muestra II: Nutrientes.

En esta ocasión la muestra se toma filtrando *in situ* a través de un cartucho de filtración de tamaño de poro 0,45 µm. Para conectar el cartucho de filtración, la persona *manos limpias*, con unos guantes de plástico desechables, es la encargada de unir el tubo de teflón por el que sale la muestra con el cartucho de filtración, una vez realizada esta operación es el *manos sucias* quien sostiene el cartucho de filtración, con unos guantes desechables de plástico, mientras que el *manos limpias* se encarga de tomar un bote de muestras (polietileno 250 mL), vaciar el ácido que contiene de la limpieza y enjuagarlo tres veces antes de la toma de muestra, incluyendo el tapón.

Con respecto al cartucho de filtración es fundamental enjuagarlo bien en cada punto para evitar la contaminación con agua de puntos anteriores o con el HNO<sub>3</sub> en el que se conserva, si se usa por primera vez. Para su conservación hasta su análisis, estas muestras se introducen en una nevera y son congeladas inmediatamente al llegar al laboratorio.

- Muestra III: Carbono y nitrógeno total disuelto.

Para estos analitos se han tomado las muestras en botes de vidrio ámbar previamente acondicionados para preservarlos de la luz. La forma de proceder es la misma que para la toma de muestras para análisis de nutrientes, con la diferencia de que es necesario que los botes queden completamente llenos de muestra, para minimizar la presencia de oxígeno y reducir la degradación de la materia orgánica que se va a determinar. Para su conservación, las muestras se introducen en una nevera y en el laboratorio son congeladas hasta el momento de su análisis.

- Muestra IV: Metales.

Para la toma de muestras destinadas al análisis de metales, se han utilizado botes de polietileno de baja densidad (LDPE), previamente acondicionados, de 30 mL para el caso de metales mayoritarios y de 500 mL en el caso de los minoritarios. Las muestras se toman filtradas y la persona que actúa de *manos limpias*, con doble guante desechable de plástico en cada mano, debe enjuagar el bote y su tapón al menos cinco veces antes de recoger la muestra, mientras que la persona que hace de *manos sucias* sostiene el cartucho de filtración.

Como estos botes se conservan en doble bolsa de plástico de cierre hermético antes del muestreo, la persona que hace de *manos sucias* se encarga de abrir la bolsa y el

*manos limpias* es el único que puede sacar el bote del interior de la misma. Del mismo modo, cuando termina la operación de toma de muestras el bote es devuelto a su doble bolsa de cierre hermético e introducido en la nevera hasta que se llegue al laboratorio donde se acidifica a  $\text{pH} < 2$  con  $\text{HNO}_3$  suprapur en una campana de flujo laminar.

- Muestra V: Compuestos orgánicos.

Estas muestras se recogen en botellas de vidrio ámbar de 2,5 L, previamente acondicionadas. Son las únicas muestras para las que no se utiliza la impulsión con bomba peristáltica, sino que la toma se realiza sumergiendo la botella en el agua a una profundidad de 50 cm. Para poder realizar esta operación se coloca un tapón de vidrio a la botella, que se retira a esa profundidad, esperando a que el recipiente este lleno antes de extraerlo del agua. Las botellas de muestra se enjuagan tres veces con agua del punto de muestreo antes de la recogida de muestra (Figura 4-20). Para su conservación se mantienen refrigeradas a  $4^\circ\text{C}$  y su tratamiento debe realizarse en las siguientes 24 horas desde la toma.

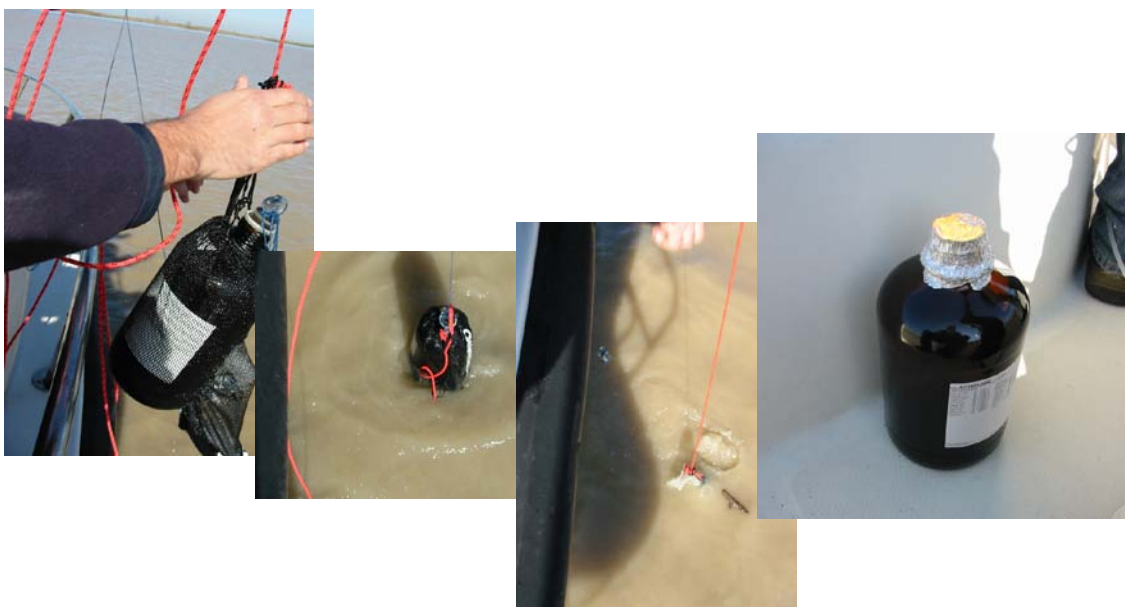


Figura 4-20. Recogida de muestra para análisis de compuestos orgánicos

## 1.2. Limpieza del material de muestreo

La limpieza del material para la toma de muestras depende fundamentalmente del tipo de muestra, la naturaleza del analito y su concentración. De esta forma hay que tener en cuenta las posibles interacciones del analito con el material de muestreo, que

debe ser cuidadosamente seleccionado, así como el nivel de concentración que presenta, ya que cuanto más bajo sea, mayor será la posibilidad de contaminación de las muestras.

Como en el presente trabajo se realiza la toma de muestra de diferentes grupos de contaminantes, con diferentes propiedades químicas y niveles de concentración, los materiales y los protocolos de limpieza deben ser también distintos para cada uno de los grupos.

- Botes para sólidos en suspensión y variables físico-químicas

Para la recogida de estas muestras no es necesario ningún tipo de limpieza especial, ya que las concentraciones de sólidos en suspensión y los parámetros físico-químicos para los que se recogen no se ven afectados. Se trata de botellas de plástico que se lavan tres veces con agua milli-Q.

- Recipientes para nutrientes

En este caso se utilizan botes de polietileno de alta densidad que se enjuagan con agua del grifo para eliminar posibles restos sólidos en su interior, posteriormente se enjuaga con agua milli-Q y por último se llenan con ácido clorhídrico 0,1 N al menos una semana. Se conservan en oscuridad y llenos de esta disolución hasta el momento del muestreo. Es muy importante no lavarlos con detergentes ya que contienen especies fosforadas y nitrogenadas que pueden contaminar las muestras.

- Recipientes carbono y nitrógeno total

Para la determinación de estas variables las muestras deben ser recogidas en recipientes de vidrio, ya que se puede producir la contaminación de la muestra con carbono procedente de las paredes de los recipientes de plástico. Los botes deben ser de vidrio ámbar o encontrarse envueltos en papel de aluminio para minimizar los efectos de la luz sobre las muestras. Estos botes son enjuagados con agua del grifo y agua milli-Q para finalmente ser llenados con HCl 2N. Se mantienen en oscuridad y con la disolución ácida durante al menos dos semanas y posteriormente se vuelven a enjuagar con agua milli-Q.

- Recipientes para análisis de metales

Para realizar el muestreo de metales se utilizan botes de polietileno de baja densidad, ya que el polietileno de alta densidad es fácilmente atacado por los ácidos a

elevadas concentraciones y se produce la degradación de los botes. Dependiendo del nivel de concentración de los metales, los recipientes se limpian de distinta manera:

- Metales mayoritarios: se encuentran a un nivel de concentración relativamente alto, por lo que se pueden determinar sin necesidad de preconcentrarlos, utilizando un volumen de muestra reducido, por lo que se toman en botes de 30 mL. Su limpieza consiste en un primer lavado con HCl 3N durante cuatro días, seguido de otro con HNO<sub>3</sub> durante el mismo tiempo. Para su conservación se enjuagan con agua milli-Q y se guardan en bolsas de plástico herméticas y en oscuridad hasta el momento del muestreo.
- Metales minoritarios: por sus bajas concentraciones es necesario realizar un paso previo de preconcentración, por lo que el volumen de muestra necesario es mayor y se toman en botes de 500 mL. Su limpieza consiste en llenarlos con HCl 3N y sumergirlos en un contenedor lleno de HCl 0,1N durante 6 semanas. Su conservación es igual que la de los botes para metales mayoritarios.

- Botellas para compuestos orgánicos:

Como ocurre en el caso de la especiación de carbono, es muy importante que los recipientes sean de vidrio, con el fin de evitar la contaminación por contacto con el plástico. En este caso se han utilizado botellas de vidrio ámbar de 2,5 L, cuya limpieza consiste en la siguiente secuencia de disolventes: agua de la red, agua milli-Q, metanol, acetona y hexano. Para evaporar cada disolvente, se dejaron los botes en una campana de extracción y se conservaron limpios y tapados con papel de aluminio.

- Conducciones para la bomba

El tubo que conduce el agua hasta el contenedor de muestra debe ser de teflón, que es químicamente inerte y garantiza que no se van a contaminar las muestras durante su toma. Su limpieza consiste en llenarlo con HCl 3N y dejarlo al menos seis semanas en este ácido. Por otro lado se utilizan tubos para la impulsión en los cabezales de la bomba, que son tubos flexibles de plástico, del tipo Master-flex®, que se limpian con ácido del mismo modo que los de teflón.

- Cartuchos de filtración

En primer lugar es necesario activar los cartuchos de filtración, para lo que se llenan con metanol y se dejan con este disolvente 24 horas. Posteriormente se enjuagan

con agua milli-Q y se introduce en los mismos una disolución 0,5 N de HCl que se mantiene durante 5 días. Después de un nuevo enjuague con agua milli-Q se rellenan con HNO<sub>3</sub> 0,5 N, conservándose de esta forma.

## 2. Determinación de variables ambientales

Las variables ambientales determinadas en el presente trabajo tienen distinta naturaleza y por lo tanto son tratadas de diferente forma desde el punto de vista analítico. Variables como los parámetros físico-químicos se determinan en el mismo lugar de muestreo gracias a la simplicidad de su análisis, mientras que otras como los metales minoritarios necesitan de elaborados pretratamientos en condiciones especiales. A continuación se describen los métodos de trabajo empleados en las determinaciones.

### 2.1. Parámetros físico-químicos:

La temperatura, el oxígeno disuelto, la salinidad y el pH han sido medidos mediante una sonda multiparamétrica Sension 156, Hach® (EE.UU.). Las medidas se han realizado en la embarcación justo después de terminar la toma de muestra para garantizar la representatividad de los resultados obtenidos, principalmente en el caso de temperatura y oxígeno disuelto.

### 2.2. Sólidos en suspensión

Los sólidos en suspensión se han dividido en dos grupos: totales y volátiles. La metodología analítica se diferencia básicamente en la temperatura a la que se tratan para poder distinguir entre unos y otros. El protocolo utilizado para el análisis de sólidos en suspensión se encuentra descrito en Martín-Galvín [21]

- Sólidos en suspensión totales:

La determinación de los sólidos en suspensión se realizó en el laboratorio por gravimetría. Se llevó a cabo el análisis filtrando las muestras a través de un filtro de microfibras de vidrio de 0,7 μm de tamaño de poro, y 47 mm de diámetro. Por diferencia de pesada de los filtros antes y después de la filtración se puede determinar la cantidad de sólidos en suspensión totales que contienen las muestras.

Los filtros se acondicionaron antes de realizar los análisis con agua milli-Q y se introdujeron en una estufa a 105°C±1°C durante una hora para eliminar la humedad.

Posteriormente, una vez secos y atemperados se tararon y se filtraron las muestras. Éstas se añadieron poco a poco, en alícuotas de 10 mL, para evitar la colmatación del filtro y de esta forma impedir una sobreestimación de la concentración de sólidos en suspensión. Para la cuantificación de los sólidos, los filtros se mantuvieron de nuevo a  $105^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  durante una hora y se dejaron enfriar en un desecador hasta alcanzar peso constante, momento en el que se anotó la masa de sólidos en suspensión. Posteriormente se calculó su concentración, conocido el volumen de muestra empleado.

- Sólidos en suspensión volátiles:

Los sólidos volátiles en suspensión se determinaron de igual forma por diferencia de pesada, pero en este caso, los filtros se calcinan en una mufla a  $550\pm 50^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos, para eliminar los sólidos volátiles presentes en la muestra.

### 2.3. Nutrientes

Como nutrientes, se analizaron los mencionados anteriormente: amonio, nitrito, nitrato y fosfato, todos ellos por espectrofotometría de absorción molecular, utilizando métodos ampliamente extendidos y reconocidos, que se pueden encontrar recopilados por Rodier [22]. Todos se analizaron en discontinuo excepto el nitrato, que se analizó en continuo, utilizando un sistema FIA descrito por Tovar y col. [23].

- Amonio:

En este caso se forma una especie coloreada que tiene un máximo de absorción a 640 nm. El complejo se forma por la reacción del amonio con fenol (1 M) y nitroprusiato sódico (0,02 M), en condiciones oxidantes (Citrato sódico:NaClO, 11:9). La absorbancia de la especie formada se puede medir tres horas después de la preparación en cubetas de 1 cm de camino óptico. Los patrones se prepararon a partir de una disolución madre de  $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{N-NH}_4^+$ .

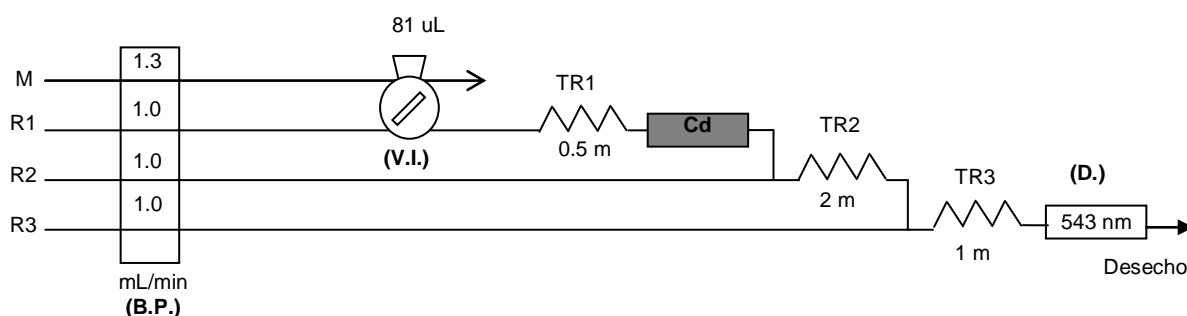
- Nitrito:

Su análisis se llevó a cabo por el método de Griess, en el que tiene lugar la formación de un complejo coloreado, cuya absorbancia se mide a longitud de onda de 543 nm en cubetas de 1 cm de camino óptico. Este complejo se forma por la reacción que tiene lugar entre el ion nitrito y los reactivos conocidos como Griess A (Sulfanilamida 0,06 M) y Griess B (dicloruro de N-naftiletildiamina 0,04 M). De esta

forma se pueden analizar concentraciones de nitrito a nivel de  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y su rango lineal es suficientemente amplio como para medir la variedad de muestras que en este trabajo se analizan. Los patrones se prepararon desde una disolución madre de  $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{N}\text{-NO}_2^-$ .

- Nitrato:

El nitrato se analiza a partir del sistema FIA desarrollado por Tovar y col. [23], en el que se reduce este anión a nitrito por contacto con una columna de Cd en línea. Una vez se ha reducido el nitrato a nitrito, este reacciona con los reactivos de Griess, sulfanilamida  $0,06\text{M}$  y dicloruro de N-naftiletilendiamina  $0,04\text{M}$ , midiéndose la absorbancia del complejo formado a  $543\text{ nm}$  (Figura 4-21). Los patrones de calibración se prepararon a partir de una disolución madre de  $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{N}\text{-NO}_3^-$ . Hay que tener en cuenta que se mide nitrato más nitrito presente en la muestra, por lo que los resultados finales deben ser calculados por diferencia.



M: muestra, R1:  $\text{NH}_4\text{Cl/AEDT}$ , R2: Sulfanilamida, R3: dicloruro de N-naftiletilendiamina  
 B.P.: Bomba peristáltica, D.: detector, V.I.: válvula de inyección, TR: tubo de reacción

Figura 4-21. Sistema FIA para análisis de  $\text{NO}_3^-$ , Tovar y col., (2002)

- Fosfato:

Para el análisis de este nutriente se utilizó la metodología de Murphy-Riley [24], por reacción del compuesto fosfomolibdico formado por el fosfato y el molibdato amónico con ácido ascórbico. La reacción del fosfato tiene lugar durante 20 minutos con una disolución que contiene un 50% de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 N, 15% de molibdato amónico 4% p/v, 30% de ácido ascórbico 0,1 M y un 5% de disolución de emético ( $0,275\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de tartrato doble de antimonio y potasio).

Una vez que tiene lugar la reacción se puede medir su absorbancia a  $690\text{ nm}$  en cubetas de cuarzo de 5 cm de camino óptico. Los patrones se prepararon a partir de una disolución madre de  $200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{P}\text{-PO}_4^{3-}$ .



## 2.4. Carbono y nitrógeno total disuelto

Para la determinación del contenido en carbono y nitrógeno total de las muestras de agua de estuario se ha utilizado un analizador multielemental de carbono y nitrógeno (Analytkjena© multi N/C 3100) (Figura 4-22).



Figura 4-22. Analizador de carbono y nitrógeno total

El fundamento de la técnica consiste en realizar la determinación directa de carbono total disuelto (CTD) e inorgánico (CID) y por diferencia calcular la concentración de carbono orgánico (COD). El CTD se analiza mediante calcinación, con una corriente de oxígeno a 800°C, de la muestra en presencia de un catalizador, generando CO<sub>2</sub>, que fluye hasta un detector de infrarrojos. Por otro lado, el CID sufre una digestión con ácido fosfórico, en la que se genera CO<sub>2</sub> que es determinado en el mismo detecto que para el CTD. Una vez analizados el CTD y el CID, se puede obtener por diferencia la concentración de COD.

Para el nitrógeno total disuelto (NTD) la determinación se ha realizado del mismo modo que para el CTD, con la única diferencia de que se generan los óxidos de nitrógeno N<sub>2</sub>O y NO<sub>2</sub> y que el detector, siendo también de infrarrojo, se encuentra localizado en otra línea.

Como las muestras de estuario presentan distinta salinidad, en función de la proximidad del punto del que fueron tomadas a la desembocadura, hay que tener en cuenta los posibles efectos de este gradiente sobre la sensibilidad de la técnica (Figura 4-23).

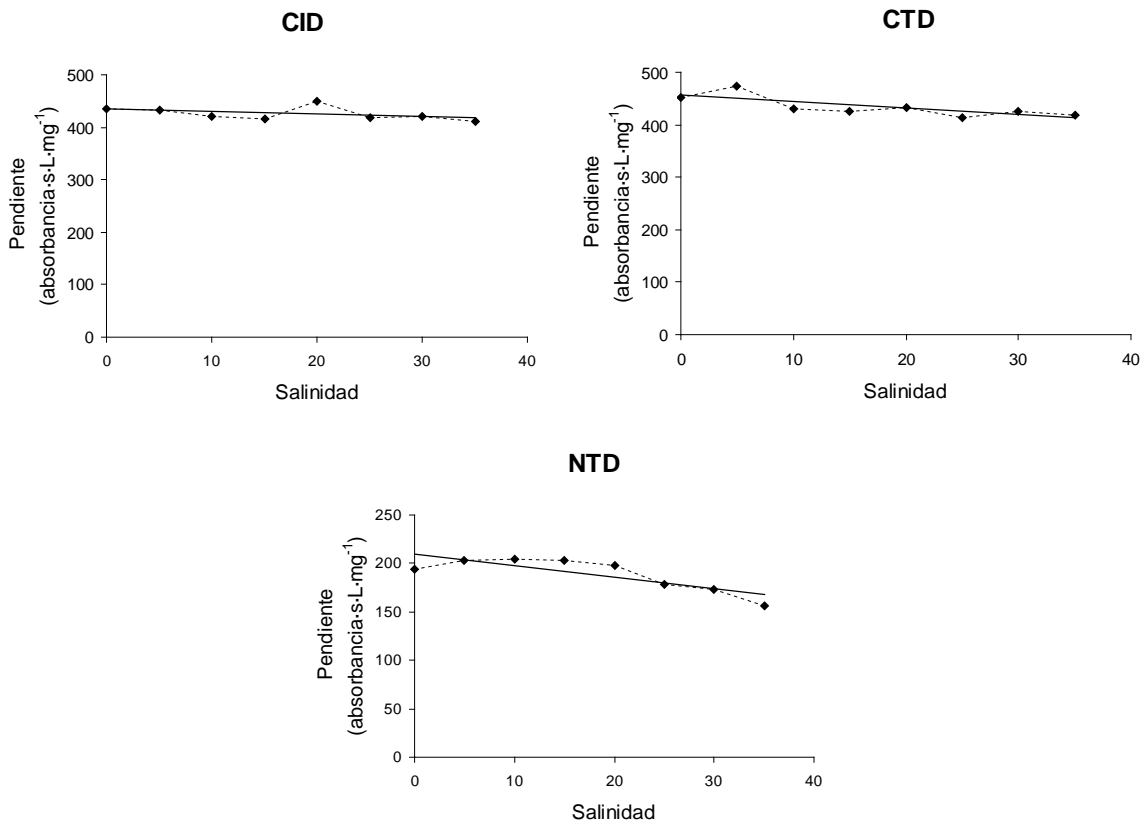


Figura 4-23. Efecto de la salinidad sobre la pendiente de la curva de calibrado para CID, CTD y NTD

Como se puede comprobar, la sensibilidad de la determinación de carbono inorgánico no se ve prácticamente por las variaciones de salinidad, mientras que en el caso del carbono total y del nitrógeno total disuelto se aprecia un decrecimiento en la pendiente de las curvas de calibrado. A la vista de estos resultados se ha decidido utilizar una curva de calibrado distintas para rangos de 5 g/L de NaCl en la determinación de estos analitos en las muestras recogidas para este estudio.

## 2.5. Metales

Como se ha descrito previamente, se han tomado dos muestras diferentes para realizar el análisis de metales. Una para los mayoritarios y otra para minoritarios, respondiendo esa distinción a la necesidad o no de realizar un paso previo de

preconcentración. De los metales analizados en el presente trabajo, Cu y Mn se han podido determinar de forma directa mediante absorción atómica en horno de grafito con calentamiento transversal, utilizando el método previamente descrito, mientras que Co, Ni, Zn, Pb, Cd y Ag se han analizado llevando a cabo su preconcentración y posterior determinación en ICP-MS.

- Metales minoritarios (Co, Ni, Zn, Pb, Cd y Ag):

La concentración de estos metales y los efectos de la matriz de las muestras hacen necesario realizar un paso previo de preconcentración antes de su determinación instrumental.

- Preconcentración:

Se ha utilizado la metodología propuesta por Kinrade y Van Loon [25] para extracción líquido-líquido de Cu, Co, Ni, Zn, Pb, Cd y Ag mediante el sistema complejante formado por 1-pirrolidil ditiocarbamato de amonio y dietilamonio ditiocarbamato (APDC/DDDC). La aplicación de esta metodología fue utilizada para el análisis de metales traza en agua de mar por Dannielson y col. [26] y Bruland y Franks [27]. Utilizando esta metodología se consigue una preconcentración del metal, así como la eliminación de la matriz salina de las muestras, lo que hace posible su determinación con ICP-MS. En este caso se realizó la extracción líquido-líquido con cloroformo, tamponando la muestra con ácido acético/acetato (pH= 4-4,5) y reextrayendo los metales en una disolución de HNO<sub>3</sub> 1 M.

Debido a las bajas concentraciones de estos metales en las muestras recogidas, todas las operaciones de preconcentración se realizaron en condiciones extremas de limpieza, dentro de una sala limpia clase ISO-6 de la que se dispone en el Centro Andaluz de Ciencia y Tecnología Marina de la Universidad de Cádiz (CACYTMAR). A su vez, ésta cuenta en su interior con una campana de flujo laminar con filtro ULPA (Clase II), equipada además con un filtro de carbono que permite la extracción de disolventes orgánicos, por lo que la evaporación del disolvente utilizado en las extracciones líquido-líquido se realizó en la misma (Figura 4-24).



Figura 4-24. Sala limpia clase ISO-6 equipada con una cabina de flujo con filtro ULPA y filtro de carbono.

Del mismo modo que para los recipientes de muestra, es necesario llevar a cabo una limpieza especial para el material que se utiliza en las extracciones de metales minoritarios. Todo el material utilizado es de polietileno o teflón. El material de polietileno sigue la misma limpieza que los recipientes de LDPE de 30 mL descrita anteriormente. Para el material de teflón se realiza primero un lavado con agua y metanol para eliminar partículas y compuestos orgánicos que queden como residuos de fabricación, posteriormente se sumerge el material en agua regia durante 4 días, se enjuaga y se trasvasa a un recipiente con  $\text{HNO}_3$  7,5 N. Para su conservación se llena de ácido nítrico 0,5 N hasta el momento de su uso. Cuando los metales han sido preconcentrados en una matriz de ácido nítrico 1M, se determina su concentración mediante la técnica de ICP-MS.

#### - Determinación instrumental en ICP-MS

La técnica de ICP-MS ha tenido gran impacto en Química Analítica desde su aparición en los años 80. Su interés reside en los límites de detección que permite alcanzar y su aplicación a la determinación de metales es una práctica frecuente, teniendo gran importancia en el análisis medioambiental, tanto de aguas naturales como de agua de mar.

Fernández y col. [28] determinaron de forma directa Al, As, Cr, Fe, Mn, Ni y Zn en aguas del río Nerbioi-Ibaizabal de forma simultánea a nivel de  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , mientras que

también se pueden determinar otros metales que a menudo se encuentran a concentraciones inferiores.

A pesar de su enorme potencial, el principal inconveniente de esta técnica es la presencia de interferencias debidas a la matriz, en especial a las sales presentes en el agua de mar, por lo que es necesario llevar a cabo un paso previo de preconcentración y limpieza de la misma. En este sentido, Mendiguchía y col., [29] proponen la determinación de metales pesados (Cu, Zn, Mn, Al, Cd, Ni, Pb) en muestras de agua de mar tras una separación de los mismos en un sistema de membranas líquidas, mientras que para otros metales como la Ag, existen sistemas de intercambio iónico que acoplados al ICP-MS permiten realizar la determinación de este metal a niveles de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  [30].

En este caso se ha utilizado un equipo de ICP-MS Thermo Elemental X-series (Figura 4-25), con un nebulizador de tipo Meinhard y cámara del tipo bola de impacto. En cuanto a las condiciones de análisis se ha utilizado una interfase normal de níquel y un detector de dínodos con separador de masa del tipo cuadrupolo. Como patrones internos se han utilizado  $^{89}\text{Y}$ ,  $^{103}\text{Rh}$  y  $^{209}\text{Bi}$ . Los isótopos utilizados en la determinación de metales minoritarios fueron  $^{59}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Ni}$ ,  $^{66}\text{Zn}$ ,  $^{107}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{Cd}$  y  $^{206}\text{Pb}$ .

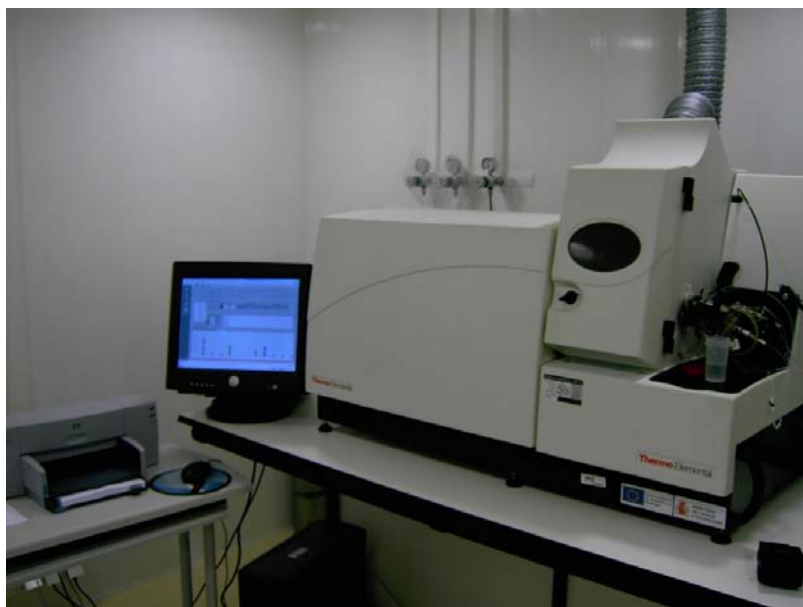


Figura 4-25. Equipo de ICP-MS

- Metales mayoritarios (Mn y Cu)

Dentro de este grupo se encuentran cobre y manganeso, que presentan una concentración suficientemente alta como para ser determinados sin preconcentración y por lo tanto se analizaron mediante espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito con calentamiento transversal, en condiciones libres de los efectos de la matriz salina de las muestras de estuario. Como se ha descrito anteriormente (Capítulo 2), se han aplicado distintas condiciones de operación para muestras de agua dulce y agua salina.

## 2.6. Compuestos orgánicos

El análisis de compuestos orgánicos requiere, del mismo modo que el de metales minoritarios, la preconcentración de los analitos para su cuantificación mediante cromatografía de gases con detector de masas. La concentración que suelen presentar en el medio acuático natural está en el nivel de los  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , por lo que las condiciones de limpieza son indispensables para evitar la contaminación de las muestras.

- Preparación del material

En cuanto a la limpieza del material hay que tener en cuenta que al trabajar con compuestos orgánicos, ésta difiere considerablemente de la utilizada en el caso de los metales pesados.

- Material de vidrio (viales, insertos, filtros y pipetas):

Este material se lava primero con agua y jabón, para posteriormente sonificarlo sumergiéndolo en una disolución de dextrano; de esta forma se eliminan los residuos que hayan podido quedar adheridos a las paredes del material. A continuación se vuelve a lavar con agua y jabón, se enjuaga con agua destilada, y se limpia con acetona. Para eliminar los restos de acetona se envuelve el material en papel de aluminio y se deja durante toda una noche a 450 °C.

- Cartuchos de preconcentración:

El acondicionamiento de los cartuchos de extracción en fase sólida es esencial para obtener resultados fiables en la concentración de compuestos orgánicos de aguas naturales, ya que sin un buen acondicionamiento no se garantiza la retención de los

compuestos en el cartucho. Este proceso consiste en un lavado con hexano, acetato de etilo, metanol y HCl 0,1N, en este orden.

- Preconcentración

Una vez tomadas las muestras como se ha descrito en el apartado previo, se filtran unos dos litros de muestra a través de un filtro de microfibra de vidrio de  $0,7\ \mu\text{m}$  de tamaño de poro. Al filtrado se le adicionan como patrones internos PCB-65 y PCB-166 hasta una concentración de  $20\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y Atrazina-d5 hasta  $700\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y se lleva hasta un volumen final de 2 litros.

Los compuestos orgánicos en esta muestra son preconcentrados, a vacío, utilizando un cartucho de preconcentración mediante extracción en fase sólida, Phenomenex® de 100 mg de fase polimérica (copolímero de estireno-divinilbenceno de superficie modificada). Entonces se dejan los cartuchos en la bomba de vacío hasta que están completamente secos, y se introducen en un congelador a  $-20\ ^\circ\text{C}$  envueltos en papel de aluminio hasta su procesado.

- Procesado de los cartuchos de preconcentración

Como los cartuchos se conservan congelados, hay que descongelarlos y colocarlos a vacío de nuevo, para volver a eliminar posibles restos de humedad. Cuando estén secos, se colocan sobre un vial de vidrio de 20 mL y se eluyen mililitro a mililitro con 10 mL de una mezcla 1:1 de acetato de etilo y hexano.

Los viales en los que se conservan las muestras hasta su determinación instrumental son de vidrio ámbar de 2 mL, por lo que es necesario reducir el volumen de disolvente; para lo que se colocan los viales de 20 mL con el eluato bajo una corriente de  $\text{N}_2$ . Una vez el volumen se ha reducido a unos  $200\ \mu\text{L}$ , se recoge el eluato del vial y se añade a un vial de 2 mL con un inserto de vidrio en su interior.

Para poder realizar los cálculos de concentración y puesto que la muestra no se enrasa en los insertos de vidrio, se añaden  $2\ \mu\text{L}$  de una disolución de  $10\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de trifetilamina como patrón interno para el análisis cromatográfico. Estas muestras se pueden conservar a  $-20\ ^\circ\text{C}$  hasta el momento de su determinación instrumental.

- Análisis cromatográfico

La cuantificación de compuestos orgánicos se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas, con cuadrupolo como selector de masas, en un

equipo TRACE-GC-MS (Thermo-Finnigan, Dreieich, Germany) (Figura 4-26). La separación cromatográfica se realizó utilizando una columna capilar TBR-5 y una precolumna de sílice desactivada, ambas de Teknokroma©.



Figura 4-26. Equipo de cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas

En cuanto a las condiciones de análisis se inyectaron  $4\mu\text{L}$  de cada muestra, en las condiciones del horno cromatográfico que se describen en la Figura 4-27. El flujo de gas portador ( $\text{He}_2$ ) se fijó en  $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . En cuanto al detector, se estableció la diferencia de potencial del cuadrupolo en  $550 \text{ V}$  y el rango de masas registrado fue desde  $50$  a  $500 \text{ m/z}$ .

Los compuestos orgánicos fueron identificados en base a su tiempo de retención y masa de iones característicos, mientras que su cuantificación se realizó en función del área bajo el pico cromatográfico. Los iones característicos y tiempos de retención utilizados en la identificación de los analitos se muestran en la Tabla 4-3.



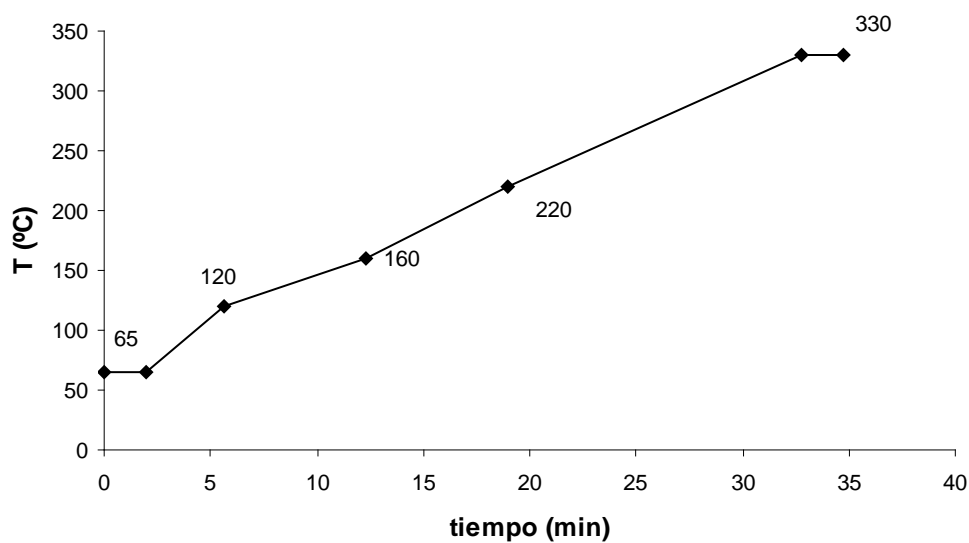


Figura 4-27. Programa de temperatura del horno cromatográfico.

Tabla 4-3. Compuestos, iones característicos y tiempos de retención empleados en el análisis cromatográfico.

Compuesto	Iones (u.m.a.)	Tiempo de retención (min)
Simazina	201/186/173	14,37
Atrazina	200/215/173	14,52
Terbutrín	226/185/241	16,96
Terbutilazina	214/229/173	14,90
Metalcloro	162/238/240	17,40
Alacloro	188/160/146	16,54
Lindano	181/219/109	14,67
Dimetoato	87/93/125	14,22
Cafeína	194/109/165	15,78
Methildihidrojasmonato	153/156/83	13,09
Triclosan	288/290/218	18,80
Tris-chloroetilfosfato	249/63/143	14,67
Trifenilamina (estándar interno)	245/167/142	17,95

## Bibliografía

1. Mendiguchía, C.; Moreno, C.; Galindo-Riaño, M.D. and García-Vargas, M. (2004) *Using chemometric tools to assess anthropogenic effects in river waters: A case study; the Guadalquivir river (Spain)*. Analytica Chimica Acta **515**, 143-149.
2. Mendiguchía, C.; Moreno, C. and García-Vargas, M. (2007) *Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients*. Chemosphere **69**, 1509-1517.
3. Bhatt, M.P. and Gardner, K.H. (2008) *Variation in DOC and trace metal concentration along the heavily urbanized basin in Kathmandú Valley, Nepal*. Environmental Geology **96**, 1-10.
4. Berzas-Nevaldo, J.J.; Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.; Guzman-Bernardo, F.J., Jiménez-Moreno, M., Ortega-Tardío, S, Sánchez- Herrera Fornieles, M.M.; Martítrn-Nieto Ríos, S. and Doncel- Pérez, A. (2009) *Integrated pollution evaluation of the Tagus River in Central Spain*. Environmental Monitoring and Assessment. **156**, 461-477.
5. Dassenakis, M.; Scoullou, M. and Gaitis, A. (1997) *Trace metals transport and behaviour in the Mediterranean estuary of Acheloos river*. Marine Pollutin Bulletin **34**, 103-111.
6. Zwolsman, J.J.G.; Van Eck, B.T.M. and Van Der Weijden, C.H. (1997) *Geochemistry of dissolved trace metals (cadmium, copper and zinc) in the Scheldt Estuary, southwestern Netherlands: Impact of seasonal variability*. Geochimica et Cosmochimica Acta **61**, 1625-1652.
7. Shirasuna, H.; Fukushima, T.; Matsushige, K.; Imai, A. and Ozaki, N. (2006). *Runoff and loads of nutrients and heavy metals from an urbanized area*. Water Science and Technology **53**, 203-213.
8. Point, D.; Bareille, G.; Amoroux, D.; Etcheber, H. and Donard, O. (2007) *Multielemental speciation of trace elements in estuarine waters with automated on-site UV photolysis and resin chelation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Environmental Monitoring **9**, 157-167.
9. Ahad, J.M.E.; Ganeshram, R.S.; Spencer, R.G.M., Uher, G.; Upstill-Goddard, R.C. and Cowie, G.L. (2006) *Evaluating the sources and fate of anthropogenic dissolved inorganic carbon (DIN) in two contrasting North Sea estuaries*. Science of the Total Environment **372**, 317-333.
10. Laryushkin-Zheleznyi, B.V. and Novikov, A.V. (2005) *On the distribution of mineral nitrogen forms in polluted waters reaches in urban territories*. Water Resources **32**, 537-544.
11. Kannel, P.R.; Lee, S. and Lee, Y.S. (2008) *Assessment of spatio temporal patterns of surface and groundwater qualities and factors influencing management strategy of groundwater system in an urban river corridor of Nepal*. Journal of Environmental Management **86**, 595-604.
12. Li, S.; Liu, W.; Gu, S.; Cheng, X.; Xu, Z. and Zhang, Q. (2009) *Spatio-temporal dynamics of nutrients in the upper Han River basin, China*. Journal of Hazardous Materials **162**, 1340-1346.

13. Lorite-Herrera, M.; Hiscock, K. and Jiménez-Espinosa, R.; (2009) *Distribution of dissolved inorganic and organic nitrogen in river water and groundwater in an agriculturally-dominated catchment, south-East Spain*. Water Air Soil Pollution **198**, 335-346.
14. Tetzlaff, B.; Kuhr, P.; Vereecken, H. and Wendland, F. (2009) *Aerial photograph-based delineation of artificially drained areas as a basis for water balance and phosphorous modelling in large river basins*. Physics and Chemistry of the Earth **34**, 552-564.
15. BOJA 5: Decreto 261/1998, de 15 de diciembre, por el que se designan las zonas vulnerables a la contaminación por nitratos procedentes de fuentes agrarias en la comunidad autónoma de Andalucía. 12 de enero de 1999.
16. Raymond, P.A.; Oh, N.H.; Turner, R.E. and Broussard, W. (2009) *Anthropogenically enhanced fluxes of water and carbon from the Mississippi River*. Nature **451**, 449-452.
17. Almeida, C.A.; Quintar, S.; González, P. and Mallea, M.A. (2007) *Influence of urbanization and tourist activities on the water quality off the Potrero de los Funes River (San Luis-Argentina)*. Environmental Monitoring and Assessment **133**, 459-465.
18. Markich, S.J. and Brown, P.L. (1998) *Relative importance of natural waters influences on the fresh surface water chemistry of the Hawkesbury- Nepean River, south-eastern Australia*. Science of the Total Environment **217**, 201-230.
19. Sañudo-Wilhelmy, S.A. and Flegal, A.R. (1992) *Anthropogenic silver in the Southern California bight: A new tracer for sewage in coastal waters*. Environmental Science and Technology **26**, 2147-2151.
20. Patterson, C.C. and Settle, D.M. (1976) *The reduction of orders of magnitude errors in lead analyses of biological material and natural waters by evaluation and controlling the extent and sources of industrial lead contamination introduced during sample collecting, handling and analysis*. In National Bureau of Standar Special Publication **422**, Accuracy in Trace Analysis: sampling; sample handling and analysis. Proceedings of the 7<sup>th</sup> IMR Symposium, Gaithersburg, MD, 321-355.
21. Martín Galvín, R. (1995) *Análisis de aguas y ensayos de tratamiento*. Ed. Gestión i Promoción Editorial, S. A: Barcelona.
22. Rodier, J. (1990) *Análisis de las aguas*. Ed. Omega, Madrid.
23. Tovar, A.; Moreno, C.; Manuel-Vez, M.P. and García-Vargas, M. (2002) *A simple automated method for the speciation of dissolved inorganic nitrogen in seawater*. Analytica Chimica Acta **469**, 2325-242.
24. Murphy, J. and Riley, J.P. (1962) *A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters*. Analytica Chimica Acta **27**, 31-36.
25. Kinrade, J.D. and Van Loon, J.C. (1974) *Solven extraction for use with flame atomic absorption spectrometry*. Analytical Chemistry **46**, 1894-1898.
26. Danielsson, L.G.; Magnusson, B. and Westerlund, S. (1978) *An improved metal extraction procedure for the determination of trace metals in seawater by atomic*

- absorption spectrometry with electrothermal atomization. Analytica Chimica Acta* **98**, 47-57.
27. Bruland, K.W. and Franks, R.P. (1979) *Sampling and analytical methods for the determination of copper, cadmium, zinc and nickel at the nanogram per liter level in seawater. Analytica Chimica Acta* **105**, 233-245.
  28. Fernández, S.; Villanueva, U.; de Diego, A.; Arana, G. and Madariaga, J.M. (2008) *Monitoring trace elements (Al, As, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni and Zn) in deep and surface waters of the estuary of the Nerbioi-Ibaizabal River (Bay of Biscay, Basque Country). Journal of Marine Systems* **72**, 332-341.
  29. Mendiguchía, C.; García-Vargas, M. and Moreno, C. (2008) *Screening of dissolved heavy metals (Cu, Zn, Mn, Al, Cd, Ni, Pb) in seawater by a liquid-membrane-ICP-MS approach. Analytical and Bioanalytical Chemistry* **391**, 773-778.
  30. N'dungu, K.; Ranville, M.A.; Franks, R.P. and Flegal, A.R. (2006) *On-line determination of silver in natural waters by inductively-coupled plasma mass spectrometry: Influence of organic matter. Marine Chemistry* **98**, 109-120.

## **Capítulo 5. Distribución espacio-temporal de contaminantes en el estuario del río Guadalquivir.**

Para poder entender de la forma más completa posible el comportamiento de los aportes fluviales y atmosféricos sobre el estuario del río Guadalquivir, es necesario primero establecer el estado general del mismo. Con ese objetivo se llevaron a cabo los análisis de las muestras tomadas en los muestreos generales para todas las variables ambientales estudiadas en este trabajo.

Como primera aproximación a la distribución y comportamiento de los contaminantes se ha estudiado el perfil de concentraciones para cada variable y muestreo (ANEXO II), de forma que se ponen de manifiesto ciertas anomalías y casos puntuales que se han podido observar para cada toma de muestra. Al final, con el conjunto de datos generado para la totalidad del estudio, se pueden utilizar diagramas de cajas y bigotes con el fin de mostrar las zonas de máxima influencia de cada contaminante para el periodo durante el que se han tomado las muestras, pudiendo establecerse además perfiles en la distribución de los contaminantes. Posteriormente se ha evaluado la existencia de diferencias temporales significativas mediante el análisis de de la varianza (ANOVA), para comprobar si existen o no efectos estacionales en la distribución espacial de contaminantes.

Durante el desarrollo del trabajo, se han utilizado, para evaluar la calidad ambiental de las aguas del estuario del Guadalquivir, variables que ya se habían empleado en el establecimiento de las influencias humanas sobre el río [1,2] y otras nuevas. El uso de las primeras permite comprobar si han existido variaciones temporales con respecto a observaciones anteriores, además de servir como apoyo para una discusión más completa sobre las que se han introducido nuevas. Este tipo de estudio se ha realizado aplicando técnicas de análisis estadístico como Análisis de Componentes Principales (ACP) que permite evaluar tendencias en la nube de datos y de conglomerados (AC), como análisis clasificatorio

### **Distribución de contaminantes**

Para poder realizar la descripción de los resultados obtenidos se ha realizado la representación de los perfiles de concentración de las variables frente a la distancia para

cada muestreo, tomando como origen la estación G1 (Alcalá del Río). Por otro lado, los diagramas de cajas y bigotes se presentan con respecto a la estación de muestreo, para poder distinguir con mayor facilidad las distintas zonas del río y se acompañan con una línea de ajuste polinomial que ajusta el perfil general de concentraciones. Esta línea de ajuste se ha construido utilizando los valores medios de concentración para cada variable en cada punto de muestreo, mientras que las líneas discontinuas marcan los límites que se han considerado como de niveles de concentración propios del río y se corresponden con 0,74 veces la desviación estándar de la muestra.

Igualmente se ha realizado el análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar la existencia de variaciones temporales de la distribución de contaminantes a lo largo del periodo de muestreo. Los detalles correspondientes a los análisis de la varianza se encuentran discutidos posteriormente.

## 1. Variables físico-químicas

### 1.1. Temperatura

Las variaciones espaciales de temperatura se deben principalmente al momento del día en el que se tomaron las muestras (Figura 5-1). Por otro lado, los muestreos que tuvieron lugar durante los meses más próximos al verano (octubre 2007 y abril 2008) ofrecen temperaturas superiores a aquellos realizados en meses más extremos (febrero 2007 y noviembre 2008), pudiéndose por otro lado atribuir los picos registrados a la franja horaria en la que se tomó cada muestra.

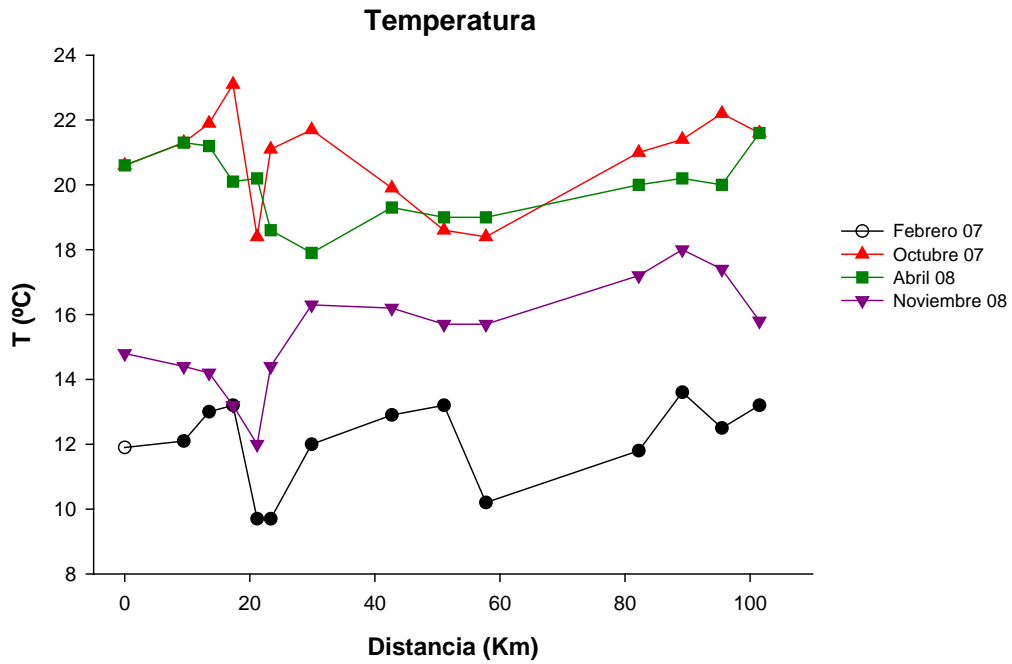


Figura 5-1. Perfil de temperatura para los distintos muestreos

## 1.2. Salinidad

El perfil de salinidad del estuario del Guadalquivir presenta dos zonas claramente diferenciadas (Figura 5-2), la primera comprende desde la cabecera del mismo hasta la zona central y desde entonces se produce un aumento continuo con la distancia.

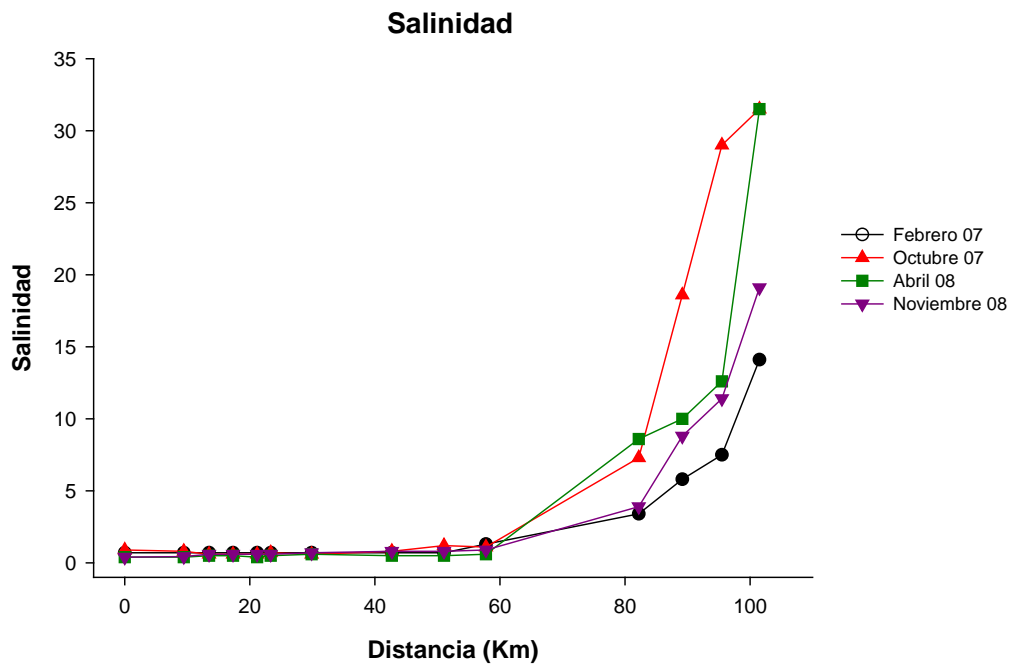


Figura 5-2. Distribución espacial de la salinidad a lo largo del estuario

Los valores que se presentan van desde 0,4 en la zona inicial hasta los 31,5 que se han llegado a medir en la desembocadura, correspondiendo ya a agua de mar. Como es lógico, los valores de salinidad observados se ven influenciados por el estado de la marea en el momento del muestreo, que marcará el inicio de la zona salina.

### 1.3. pH

Esta es una de las variables físico-químicas que se han estudiado que reviste una mayor importancia, ya que rige en buena medida los procesos químicos que tienen lugar en el estuario (Figura 5-3).

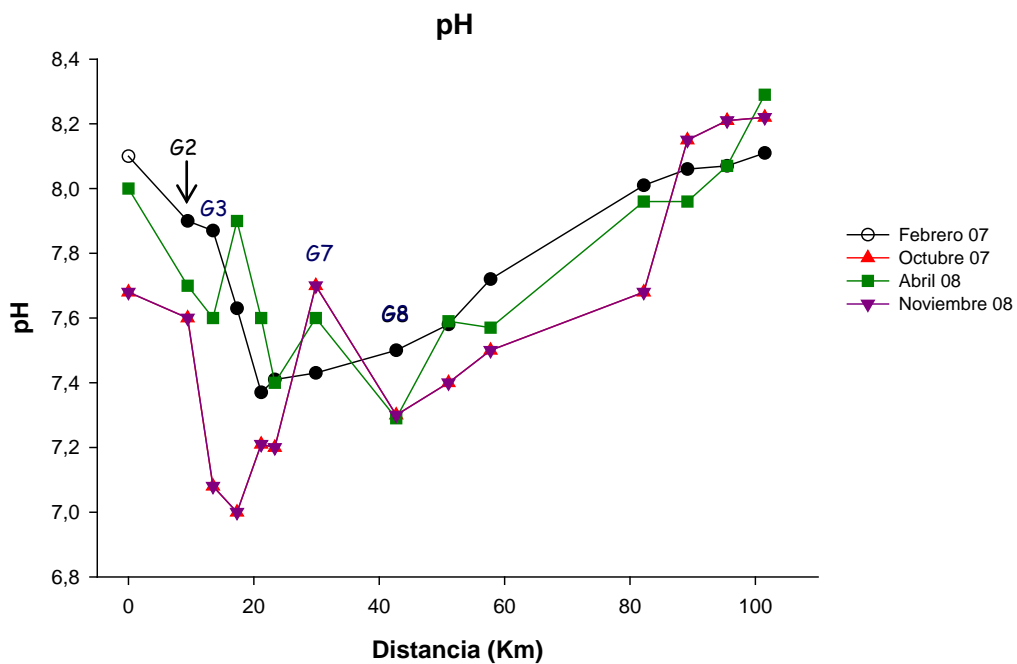


Figura 5-3. Evolución del pH para los distintos muestreos

La tendencia general del pH es a disminuir desde la estación de muestreo inicial hasta la zona de influencia de la ciudad de Sevilla, entre los kilómetros 15 y 30 (G2-G8).

Posteriormente, conforme el río se aleja de esta zona, el pH aumenta a hasta la desembocadura debido a la mezcla con agua fluvial y de mar. Los valores mínimos registrados se localizan en la zona urbana con valores pH=7,00, mientras que los valores más altos, se han recogido en la última estación con pH=8,29 en la segunda toma.

Cabe destacar la disminución del pH en la zona alta del estuario para el segundo muestreo, donde su valor se encontraba por debajo incluso de la zona de influencia de Sevilla. Además es interesante observar que hay un ligero incremento del pH en las



estaciones G3 y G7 con respecto a la tendencia general del resto de muestreos para las tomas de abril y noviembre de 2008.

Para el conjunto de los muestreos, la distribución espacial del pH presenta un mínimo en la zona de influencia de Sevilla que se reproduce de estudios anteriores como consecuencia de vertidos urbanos [1]. Los valores máximos se encuentran en los extremos, el localizado en la cabecera responde a una zona de menor presencia urbana, mientras que el incremento progresivo hasta la desembocadura se debe además a la mezcla con el agua de mar, alcanzando valores de en torno a  $\text{pH}= 8$  [3] (Figura 5-4). La aplicación del análisis de la varianza ha permitido determinar la existencia de diferencias significativas entre datos recogidos para los muestreos ( $\alpha < 0,05$ ), aunque la prueba de Tuckey a posteriori no ha revelado sus fuentes.

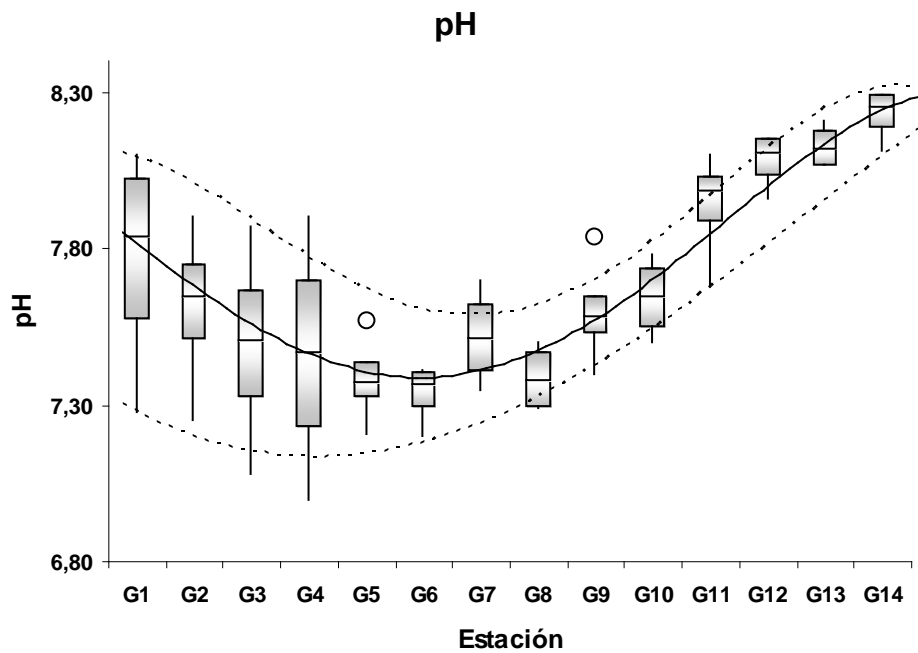


Figura 5-4. Gráfico de cajas y bigotes para el pH en el estuario a lo largo del río Guadalquivir durante el periodo de estudio.

#### 1.4. Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto es un indicador de la calidad del agua, ya que es un factor limitante para la vida en el sistema acuático, siendo de gran importancia su determinación en sistemas naturales (Figura 5-5).

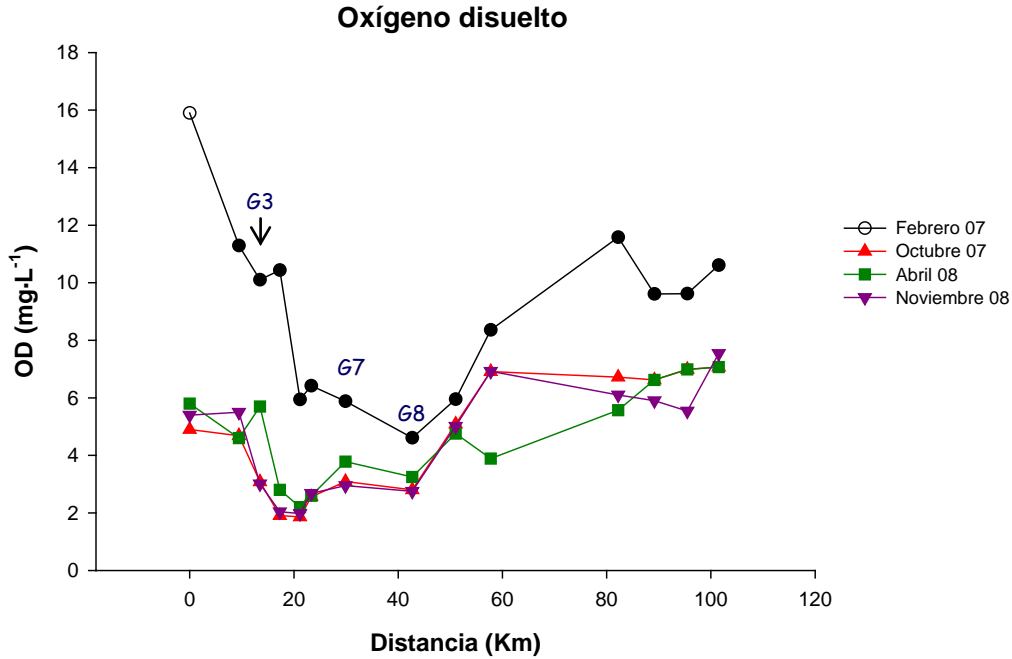


Figura 5-5. Perfil de concentración de oxígeno disuelto en el estuario del río Guadalquivir.

El oxígeno disuelto presenta una tendencia general, en cuanto a la forma de la distribución, similar a la del pH. Así, se puede observar una disminución de la concentración de OD desde el inicio de la zona de estudio hasta la zona urbana (G3), donde se encuentra en valores mínimos debido a los residuos urbanos (G8). Posteriormente, a la salida de la misma vuelve a aumentar como consecuencia de la mezcla con agua de mar y la mayor turbulencia que se aprecia en la desembocadura.

Se puede apreciar como la concentración de OD durante el primer muestreo se encuentra muy por encima de los demás. Esto se puede deber a la existencia de un episodio de Bloom algal que dentro del cual se enmarcó esta toma de muestra. Los valores de concentración de OD se encuentran entre 2,00 y 7,10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para los tres últimos muestreos, mientras que para el primero, en la zona urbana no es en ningún punto inferior a 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Como se puede extraer del diagrama de cajas y bigotes existe una disminución progresiva desde la cabecera del estuario hasta la zona urbana para el conjunto de los muestreos (Figura 5-6), este comportamiento ha sido descrito anteriormente por Bhatt y Gardner [4] en la cuenca del valle de Katmandú. A pesar de esto se observa un máximo relativo en la estación G7, registrado para las dos últimas tomas de muestra. Al avanzar en el estuario desde la zona central, la concentración de oxígeno disuelto aumenta de nuevo y de forma progresiva hasta la desembocadura.

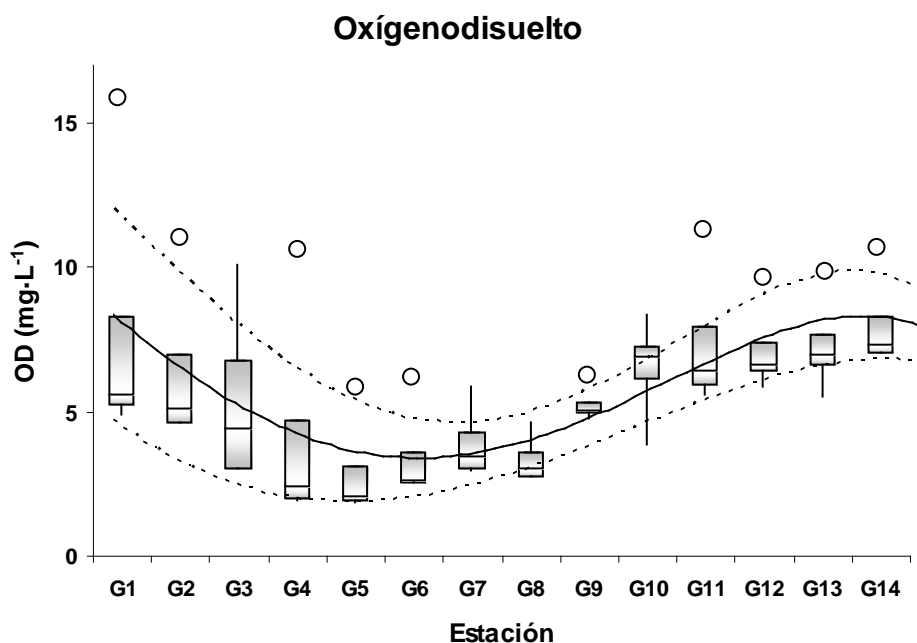


Figura 5-6. Distribución espacial de la concentración de OD durante el periodo de estudio

Se observa una gran variabilidad temporal en la distribución que se debe a los elevados valores registrados en el primer muestreo, que ha mostrado diferir de forma significativa del resto ( $\alpha < 0,05$ ), para el que el test de Tuckey muestra diferencias superiores a 3,00 cuando se compara con el resto de muestreos.

#### 1.5. Sólidos en suspensión

- Sólidos en suspensión totales.

La determinación de los sólidos en suspensión totales (Figura 5-7) presenta una gran influencia en el comportamiento de otras variables químicas así como sobre los procesos de adsorción y desorción de contaminantes [5].

A simple vista se pueden observar dos tipos de comportamiento bien diferenciados. En primer lugar, y en relación con los dos primeros muestreos, se observan concentraciones estables desde el inicio del estuario, con pequeñas variaciones a lo largo de la zona urbana y un incremento considerable en la zona intermedia, donde alcanza valores máximos, volviendo a disminuir hasta la desembocadura. El máximo registrado para estos muestreos se relaciona con actividades agrícolas y la mezcla de las

masas de agua fluvial y de mar (G9), coincidiendo con el punto en el que comienza el aumento de la salinidad.

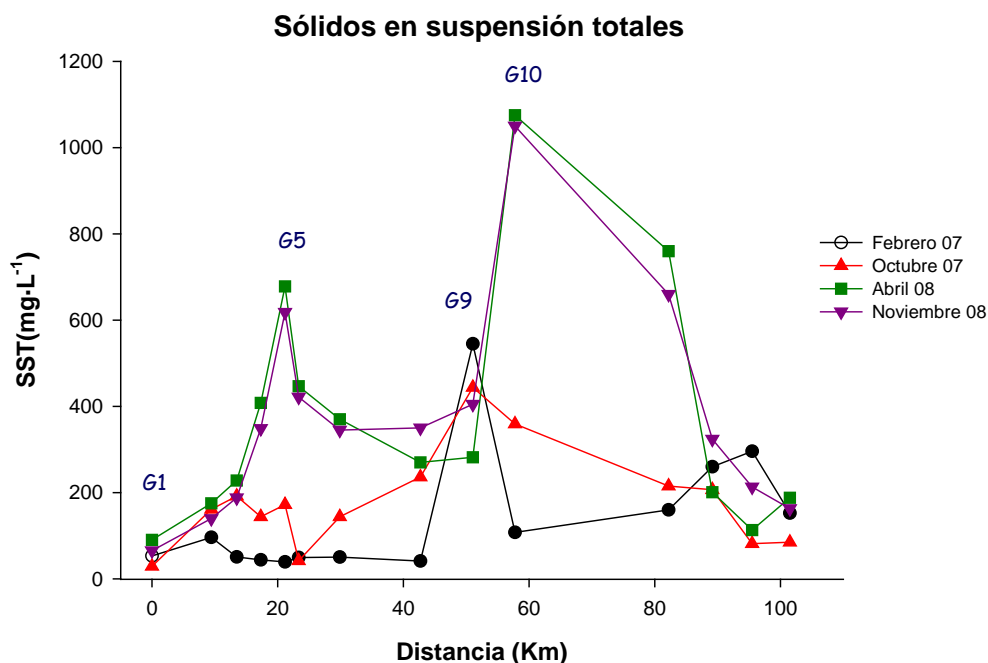


Figura 5-7. Perfil de concentración de sólidos en suspensión totales para cada muestreo

En segundo lugar, para los muestreos correspondientes a 2008 se aprecian dos zonas de máxima concentración. El valor más alto para ambos muestreos se reproduce de los anteriores en la zona de aumento de la salinidad, mientras que el otro máximo se encuentra en la zona urbana (G5). Este incremento de concentración de SST se debe a las precipitaciones que tuvieron lugar en noviembre de 2007 y que provocaron la movilización de los suelos hacia el cauce del río y la apertura de la presa localizada en la estación G1, lo que originó un aumento de la turbidez en el río que ocasionó problemas ambientales y económicos que han persistido hasta el final del estudio. Otra fuente que ha propiciado el aumento del nivel de SST en la zona urbana se debe a que desde final de 2007 y hasta 2008 se han realizado las obras del metro de Sevilla en esta zona.

Los valores máximos en el estuario se encuentran en torno a los 500 mg·L<sup>-1</sup> en la zona central para los dos primeros muestreos, mientras que para los correspondientes a 2008, la concentración se encuentra alrededor de 1000 mg·L<sup>-1</sup> en esta zona, encontrándose en la parte urbana sobre 600 mg·L<sup>-1</sup>.

A lo largo del periodo de estudio, la distribución espacial de sólidos totales en el estuario ofrece dos puntos de máxima concentración, uno en la zona urbana (G5) y otro en la zona central (G10) (Figura 5-8). Para el estudio de la varianza se observan diferencias significativas entre los muestreos correspondientes a 2007 y los de 2008, por lo que se podría establecer una diferenciación anual. Por este motivo se ha decidido estudiar como variables diferentes los SST-07 y SST-08 en los análisis estadísticos multivariantes.

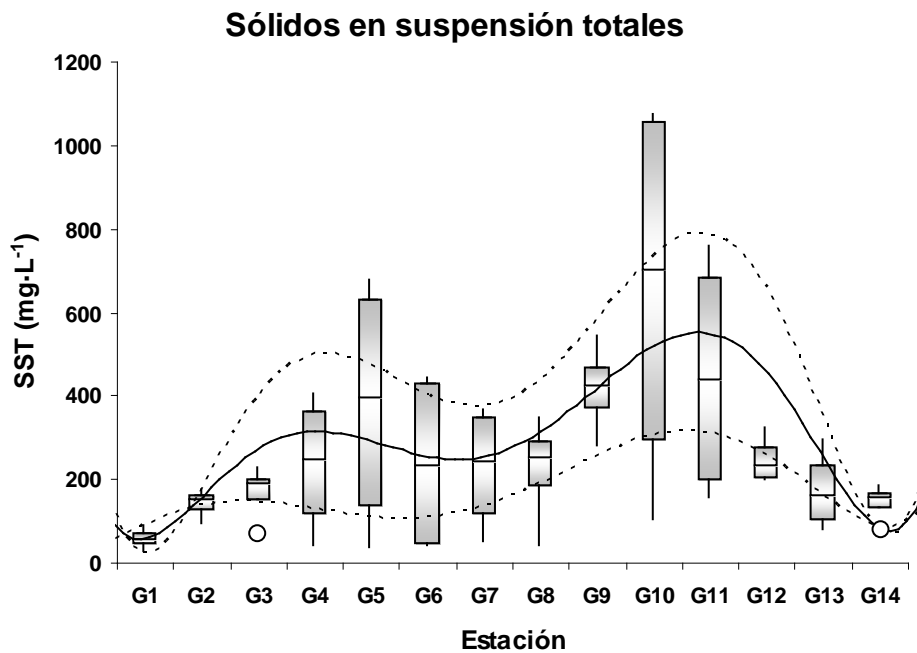


Figura 5-8. Gráfico de cajas y bigotes para sólidos en suspensión totales

- Sólidos en suspensión volátiles

Los sólidos en suspensión volátiles ofrecen una aproximación a la concentración de materia volátil presente en la fase particulada y se asocian en muchas ocasiones a aportes de microorganismos al agua desde los suelos y los efluentes de las EDARs (Figura 5-9). Esta variable se ha determinado para las tres últimas tomas de muestra.

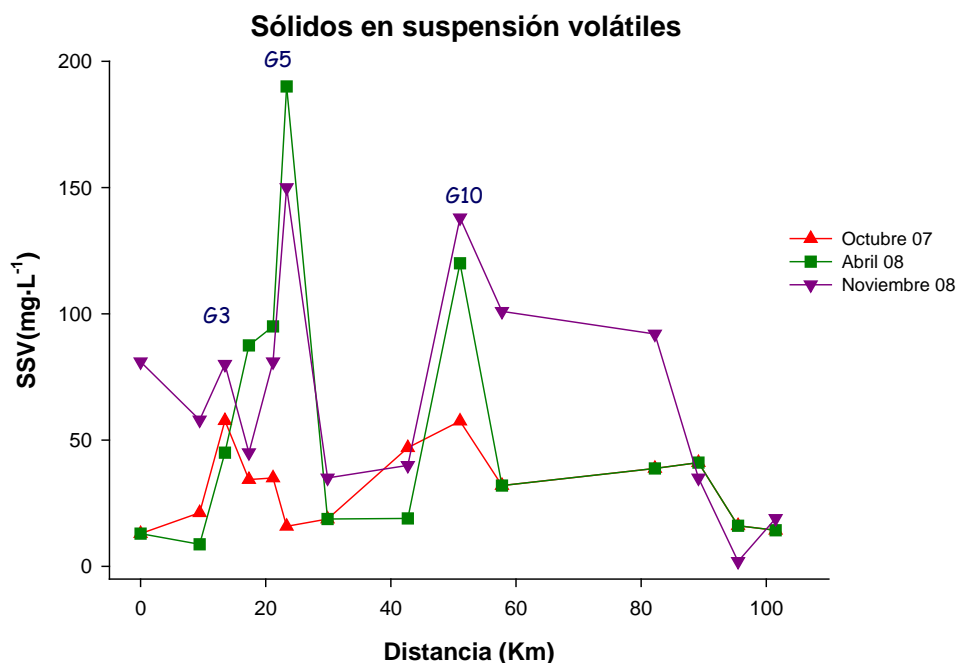


Figura 5-9. Concentración de sólidos en suspensión volátiles para cada muestreo

Para los SSV se puede observar una distribución general que presenta dos máximos de concentración y que recuerda a la de los sólidos totales. Es importante observar de nuevo la diferencia entre los muestreos de 2007 y 2008.

En cuanto al muestreo de octubre de 2007 se aprecian dos máximos de concentración. Uno ligado a los SST en la zona central (G10) y otro en la zona urbana (G3), relacionado con vertidos urbanos en los que la materia particulada está enriquecida en volátiles. Por otro lado, para los muestreos de 2008 se observan dos máximos, el primero en la zona urbana (G5) que llega a niveles de entorno a 200 mg·L<sup>-1</sup>, y otro en la zona central (G10) que no llega a los 150 mg·L<sup>-1</sup>. También cabe destacar el aumento de nivel de concentración en la zona inicial para el muestreo de noviembre de 2008.

Para el conjunto de los muestreos, es interesante estudiar la distribución de sólidos en suspensión volátiles sin perder de vista la de los totales. Como se ha descrito, existen dos máximos, uno en la zona agrícola y otro en la urbana (Figura 5-10). La presencia de un máximo urbano no es extraña, ya que en estas zonas, la contribución de los sólidos volátiles es muy importante con respecto del total, pero sí lo es su magnitud, que se ve incrementada desde el muestreo de abril de 2008. A pesar de que existen diferencias observables en las representaciones gráficas para los distintos muestreos, el ANOVA no ha revelado diferencias temporales significativas.

## Sólidos en suspensión volátiles

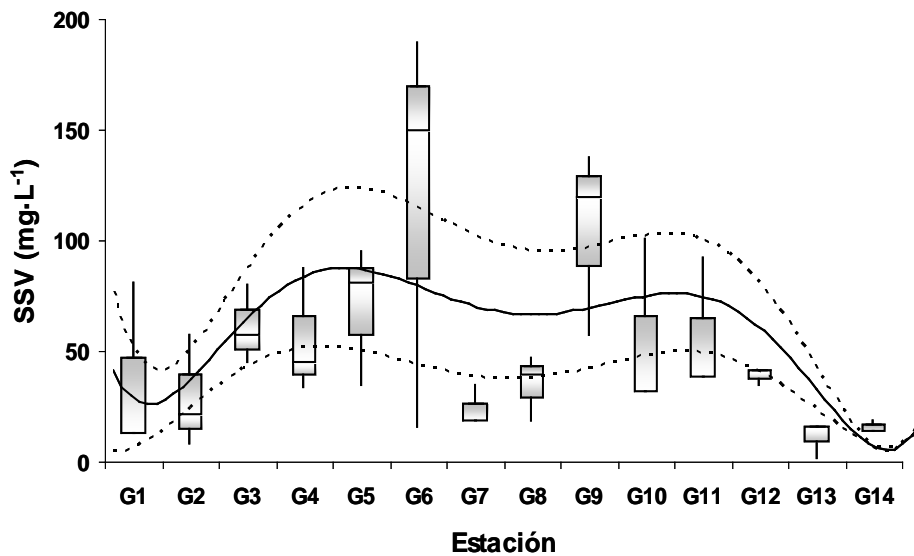


Figura 5-10. Diagrama de cajas y bigotes para los sólidos en suspensión volátiles

### 1.6. Nutrientes

- Amonio

Este nutriente es un reconocido contaminante de carácter urbano asociado a procesos de degradación anaerobia de la materia orgánica, por lo que tiene gran relación con la presencia de efluentes de EDARs (Figura 5-11). De esta forma su estudio puede resultar de utilidad en el establecimiento del comportamiento de otros contaminantes como propios de zonas urbanas.

Para este contaminante se aprecia una distribución que presenta, en general, valores máximos en la zona urbana (G3-G8) entre 100 y 300  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  excepto para el primer muestreo. Mientras que presenta un comportamiento irregular en la zona final del estuario (G11-G14). Además como para el OD se puede destacar el elevado nivel de concentración que se aprecia para febrero de 2007. En la zona final del estuario se encuentra una diferenciación del comportamiento de la concentración de amonio entre muestreos, siendo similar para los muestreos después de la estación seca.

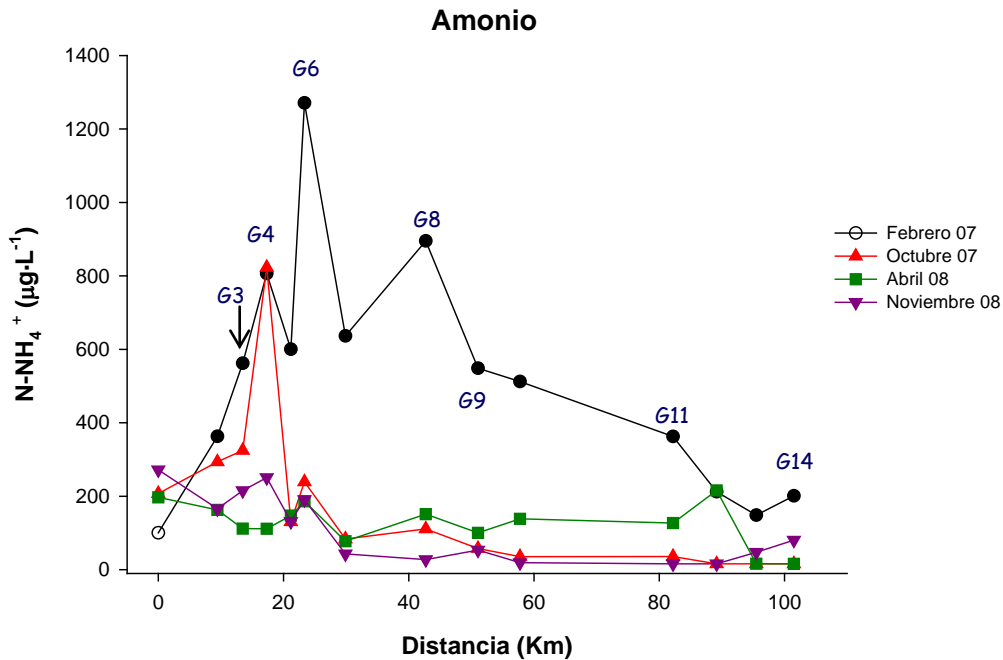


Figura 5-11. Distribución espacial de la concentración de  $\text{N-NH}_4^+$  para los distintos muestreos

En el caso del primer muestreo se encuentra la zona de mayor concentración en la parte urbana con diferentes picos de concentración, reproduciéndose uno de ellos en la estación G4. Mientras, el valor máximo registrado para todos los muestreos se localiza en G6 con un valor de hasta  $1270 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Finalmente, desde la entrada en la zona salina se produce una disminución de la concentración hasta el final del estuario. Es interesante observar que en el Caño Brenes (G13) se reproduce el nivel de concentración para los muestreos de febrero de 2007 y abril de 2008.

La disminución de concentración de este contaminante a lo largo del tiempo en la zona urbana se puede relacionar con la puesta en marcha de una EDAR en la zona norte de Sevilla, que depura las aguas que llegaban al río a través del Arroyo del Tamarguillo (G4) en forma de vertidos sin depurar y donde se puede observar que coinciden los resultados obtenidos para los dos primeros muestreos.

Como muestra el gráfico de cajas y bigotes, la distribución de concentración de amonio presenta valores superiores en la zona urbana y disminuye de forma progresiva al avanzar en el estuario (Figura 5-12), a partir de la estación G9. Como se observa, la zona de máxima variabilidad es la urbana, donde ha tenido lugar una disminución de la concentración de nitrógeno amoniacal desde el primer muestreo, observándose como para el OD, diferencias significativas entre muestreos debidas al comportamiento de la primera toma de muestra, según ha arrojado el test de Tuckey.



Las acumulaciones de amonio registradas están de acuerdo con diversos estudios en los que aparece como un contaminante típicamente urbano, siempre que no existan vertidos de amonio puntuales de origen industrial [9,10]

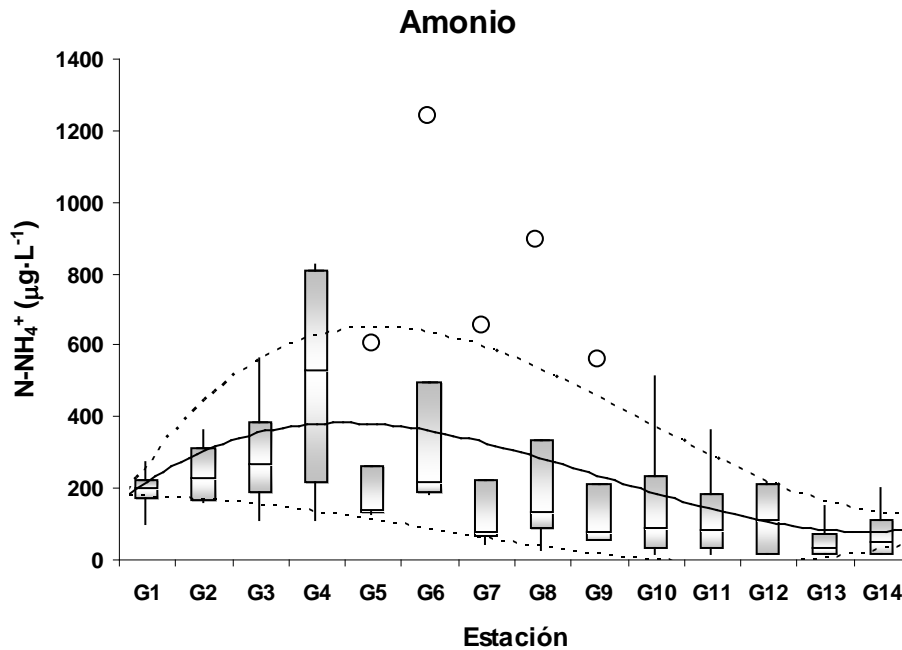


Figura 5-12. Gráfico de cajas y bigotes para N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.

- Nitrito

Este es un contaminante de gran importancia en aguas naturales ya que aparece como especie intermedia en los procesos de oxido-reducción de amonio a nitrato y viceversa. Su nivel de concentración habitual es de los  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 5-13).

Como se puede observar, la concentración de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> presenta valores máximos en la zona urbana (G3-G8), como era de esperar, ya que coincide con los máximos niveles de amonio y nitrato. Se aprecia también, como con el aumento de la salinidad se produce una disminución de la concentración.

Es interesante observar que los valores más altos de concentración de nitrito coinciden en la zona urbana para el muestreo de octubre de 2007 con los descritos para el amonio (G4), y niveles de nitrato más bajos, por lo que se puede pensar que tiene lugar un proceso de nitrificación. Del mismo modo, los valores mínimos para el muestreo de abril de 2008 en la zona urbana coinciden con los que aparecen para amonio y que coinciden con mayores concentraciones de nitrato. Por último, se aprecia

un comportamiento similar al de octubre de 2007, para noviembre de 2008, cuando en la zona final, el aumento de la concentración de nitrito vuelve a coincidir con un descenso del nitrato y un aumento del amonio.

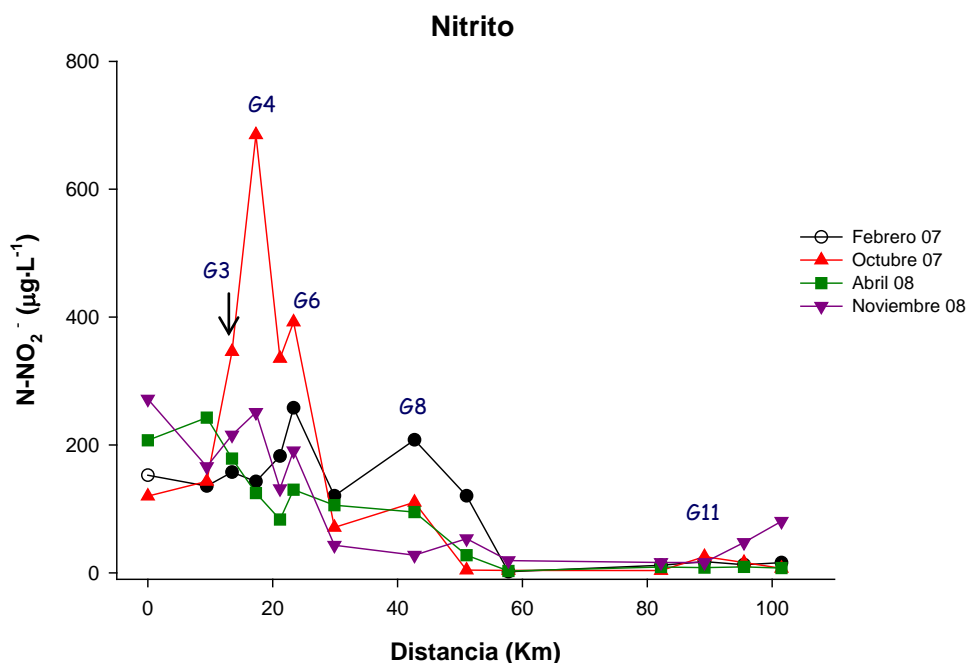


Figura 5-13. Perfil de concentración de N-NO<sub>2</sub><sup>-</sup> para los muestreos realizados.

En cuanto a los niveles de concentración, se encuentran por debajo de los 350 µg·L<sup>-1</sup> en la zona urbana, salvo para el ya comentado muestreo de octubre de 2007. Mientras que para el caso de la zona final los niveles están en general por debajo de 50 µg·L<sup>-1</sup> y en ocasiones por debajo de 2,00 µg·L<sup>-1</sup>.

Después del periodo de estudio, se puede concluir que existen no dos, sino tres zonas con distintos niveles de concentración de nitrito (Figura 5-14). La primera corresponde al inicio del estuario y la zona netamente urbana, la cual se muestra como la más influenciada por el nitrito [1,11]. La segunda se localiza a la salida de la misma, donde la salinidad aún es inferior a 1 y existen pequeñas poblaciones y explotaciones agrícolas, observándose un leve aumento de su nivel. Por último, en el estuario la concentración disminuye de forma considerable, aunque al igual que para el nitrato, parece haber un ligero incremento desde la estación G12. Se observa un máximo en la estación G4, que es variable entre muestreos, por lo que es más interesante estudiar el que aparece en el punto G6, que es persistente.

El ANOVA, ha reflejado que existen diferencias estadísticamente significativas, entre muestreos, pero que estas no son estacionales, ya que el test de Tuckey muestra que sólo se han registrado entre los dos muestreos después de la estación seca.

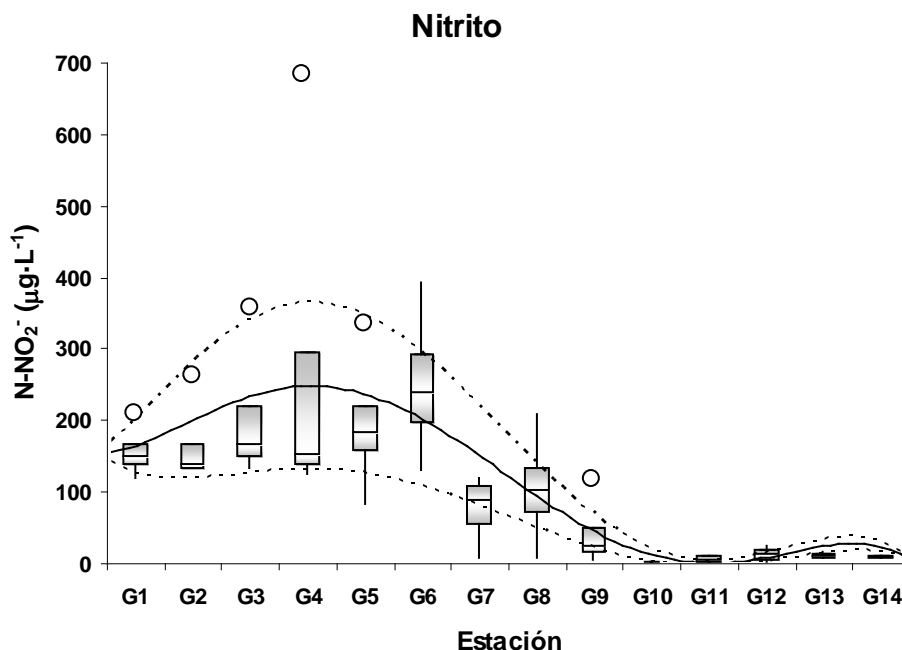


Figura 5-14. Gráfico de cajas y bigotes para  $N-NO_2^-$  para el total de los muestreos.

- Nitrito

La concentración de nitrato en sistemas naturales es muy importante, ya que si bien es necesario para el crecimiento de la flora acuática y terrestre, su exceso puede ser peligroso, ya que puede llevar a procesos de eutrofización (Figura 5-15). Su presencia en zonas urbanas se debe a que excepto en las EDARs con tratamiento terciario no puede ser eliminado.

En cuanto a la concentración de  $N-NO_3^-$  se observa un aumento de concentración en general para la zona urbana (G3-G8), mientras que para la zona central y la desembocadura el comportamiento es irregular para los distintos muestreos. Se puede observar en la zona central una separación de las líneas de distribución de  $N-NO_3^-$ , al igual que para el  $N-NH_4^+$ , presentándose una disminución progresiva de la concentración hasta la desembocadura para los muestreos de octubre de 2007 y noviembre de 2008, mientras que para los muestreos de febrero de 2007 y abril de 2008 hay un aumento en la estación G12, cerca de la desembocadura, donde la influencia de

actividades agrícolas es muy importante, debido a los cultivos de cereales de los alrededores y que coincide con el observado para el amonio. Este aumento de concentración en esta zona para los muestreos después de la estación húmeda se podría relacionar con la entrada de  $\text{N-NO}_3^-$  agrícola procedente de la escorrentía agrícola

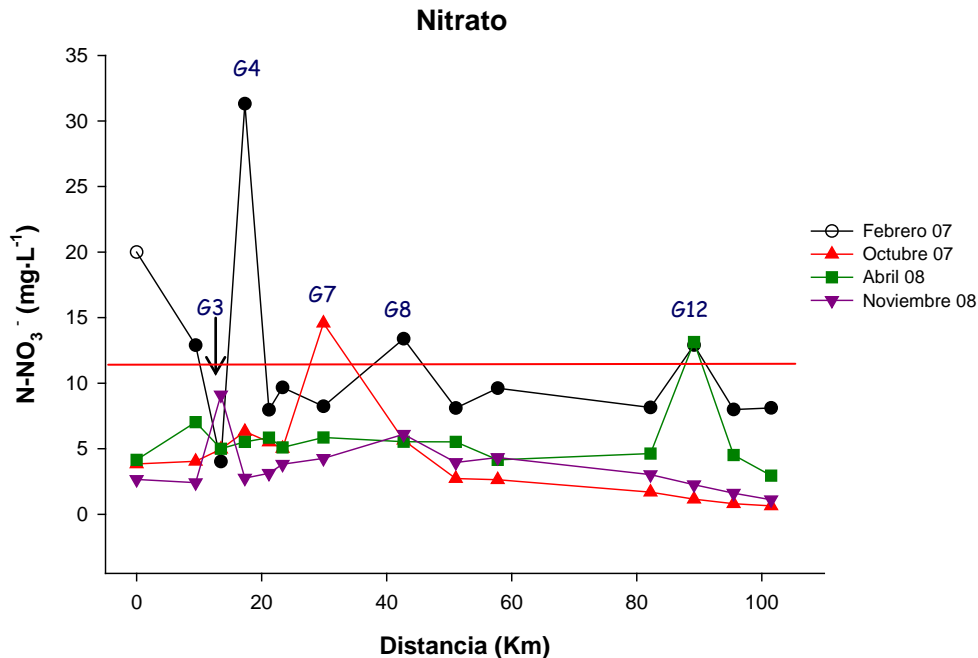


Figura 5-15. Distribución espacial de  $\text{N-NO}_3^-$  para cada toma de muestras.

Cabe destacar que el muestreo de febrero de 2007 muestra concentraciones superiores a las del resto, con una caída de la concentración desde la zona inicial hasta el inicio de la zona urbana (G3). A continuación, el punto G4, donde se encuentra el Arroyo del Tamarguillo se observa el máximo de concentración para todos los muestreos ( $31,31 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Es interesante la relación que se observa para los valores de concentración de oxígeno disuelto, amonio y nitrato en el primer muestreo, que se encuentran, de forma general, por encima del resto y que como ya se ha comentado coinciden con un episodio de Bloom algal que estaba siendo estudiado por la Junta de Andalucía.

En cuanto al  $\text{N-NO}_3^-$  es muy importante señalar que la Unión Europea establece en su Directiva Marco del Agua y sus posteriores actualizaciones, unos niveles máximos permitidos para sistemas fluviales, estableciéndose el límite en  $11,29 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{N-NO}_3^-$  [12]. Este valor se ha rebasado en el río Guadalquivir para el primer muestreo en varios puntos de la zona urbana, donde no hay que perder de vista que se registró un Bloom algal. Además en la final de estuario se han observado de forma

repetida valores superiores a este, en particular para la estación G12, donde la actividad agrícola es importante y se podría relacionar con el cultivo de cereales.

A lo largo del periodo de estudio, la concentración de nitrato ha experimentado una notable variabilidad, sobretodo debido a los datos recogidos durante la primera toma (Febrero 2007), que difieren significativamente de los otros tres muestreos (Figura 5-16). Los valores máximos de la distribución se encuentran relacionados con zonas influenciadas por la ciudad de Sevilla, mientras que cabe destacar el incremento de las concentraciones en la estación G12, al final del estuario, que podría estar ligado a vertidos puntuales. No se debe perder de vista el comportamiento de las estaciones de muestreo de la salida de la zona de Sevilla (G7 y G8), ya que se puede observar un pico de concentración [12,14].

Finalmente se han evaluado posibles variaciones estacionales en la concentración de nitrato y se ha encontrado un valor de F superior al crítico ( $<0,05$ ), por lo que existen diferencias significativas debidas al comportamiento del primer muestreo, según ha aclarado el test de Tuckey.

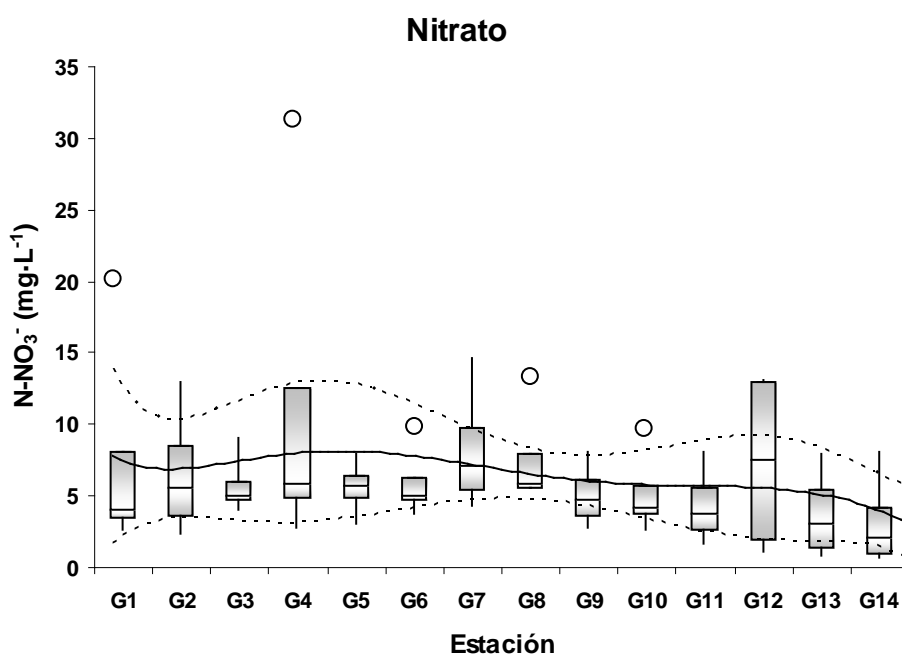


Figura 5-16. Gráfico de cajas y bigotes para N-NO<sub>3</sub><sup>-</sup>

- Nitrógeno total disuelto

El nitrógeno total disuelto ofrece información conjunta de la contribución de las diferentes especies nitrogenadas en disolución que se pueden encontrar en aguas naturales, entre las que se cuentan los nutrientes nitrogenados. Debido a los distintos orígenes que muestran los distintos nutrientes, su contribución al nitrógeno total es diferente en las distintas zonas del río (Figura 5-17). Por las características de la técnica analítica empleada, la calibración puede verse afectada por la distinta relación entre  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  en las muestras, por lo que en ocasiones los datos de concentración de NTD son inferiores a la suma de los nutrientes nitrogenados. A pesar de esto, su estudio permite tener una idea de su distribución espacial y posibles focos de N a lo largo del río.

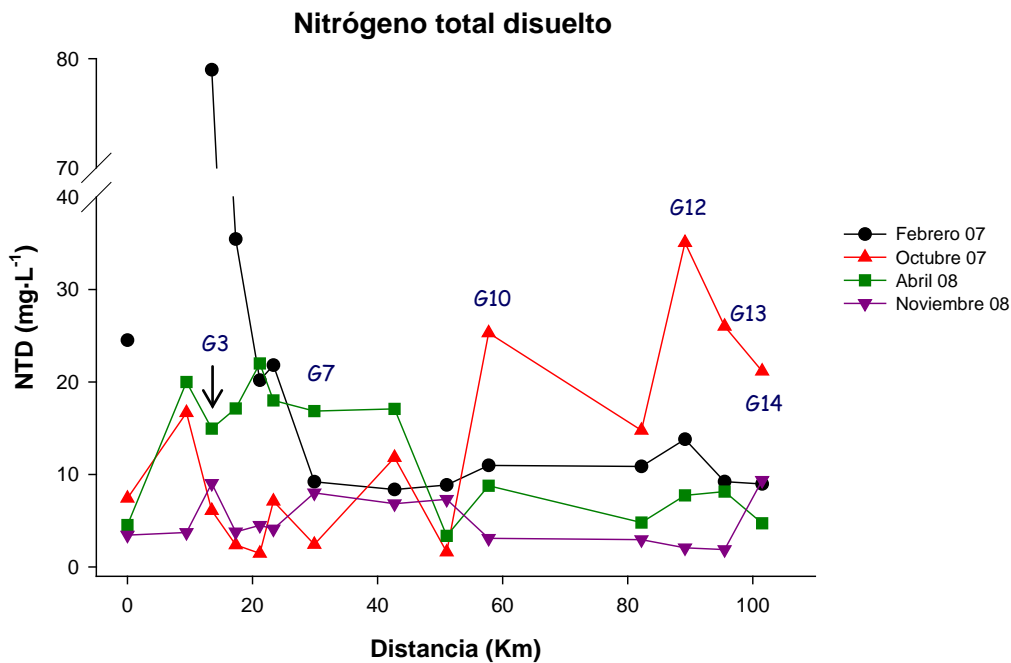


Figura 5-17. Concentración de nitrógeno total disuelto encontrada en los distintos muestreos.

Los perfiles de concentración de nitrógeno total disuelto no muestran una tendencia general clara a simple vista, pero ofrecen dos zonas de acumulación de N, la primera localizada en la zona urbana (G3-G7) y la segunda en la zona final del estuario (G10-G14).

Por muestreos, se puede apreciar como la mayor acumulación debida a la zona urbana se corresponde con la primera toma, donde se alcanzan valores de hasta 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de N. mientras que posteriormente tiene lugar una estabilización en la zona final

que hace que se aproxime al resto de muestreos. Este comportamiento muestra gran similitud con el ofrecido por  $\text{N-NH}_4^+$  y sobretodo  $\text{N-NO}_3^-$  para esa toma de muestra.

Por el contrario, para octubre de 2007, la tendencia es a disminuir en la zona urbana, aunque de forma irregular y a aumentar de igual modo hasta la estación G12, donde existe un pico que aparece también para el nitrato en los dos primeros muestreos, siendo de gran influencia la actividad agrícola y la naturaleza pirítica de la zona.

No hay que perder de vista que los muestreos después de la estación húmeda tienen el mismo perfil además de presentar un nivel de concentración superior a los de después de la estación seca en la zona urbana, que no se ha mostrado para los nutrientes nitrogenados. Los niveles de concentración en esta parte del río van desde 3,36 y 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . En cuanto a la parte final del estuario, no se reproduce el efecto de los nutrientes nitrogenados, pero se observa un pico de concentración que se podría relacionar con actividades agrícolas y la presencia de nitrógeno orgánico.

Como se ha mencionado en la descripción por muestreo, la mayor concentración de nitrógeno se encuentra en la zona urbana, así como su mayor variabilidad temporal (Figura 5-18). La otra zona de importancia es la parte próxima a la desembocadura, donde han aparecido algunos picos en la estación G13, que coinciden con los descritos para nitrato y nitrito, pudiendo ser el primero el que rige el comportamiento del nitrógeno total [9].

El análisis de la varianza se ha realizado aplicando el test de Kruskal-Wallis, obteniéndose un valor de la distribución  $\chi^2 = 12,69$ , dando lugar a un valor de  $\alpha < 0,05$ . Por lo que se confirma la existencia de diferencias significativas entre muestreos, como se podía intuir en los gráficos de tendencia.

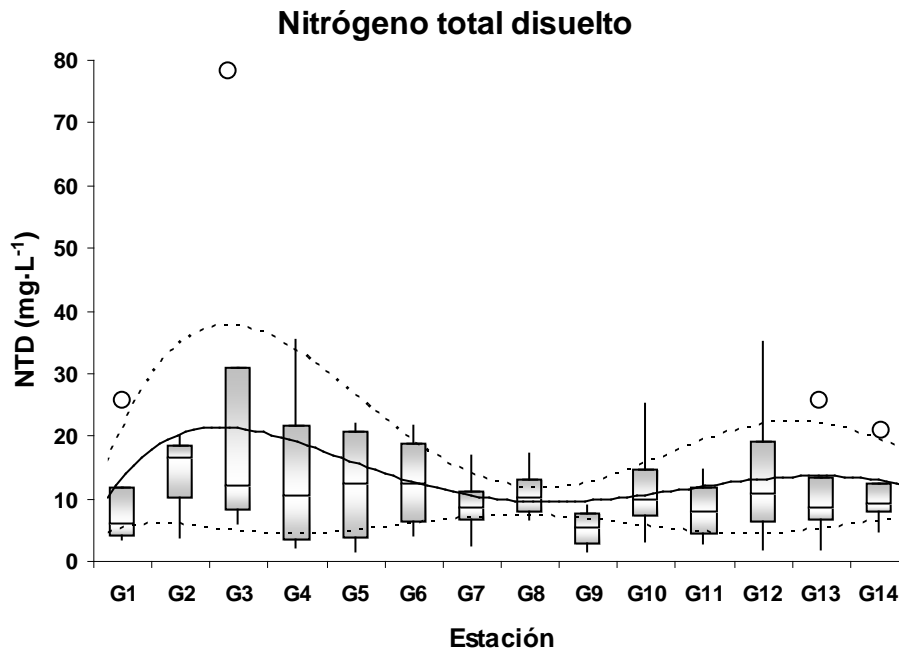


Figura 5-18. Gráfico de cajas y bigotes para nitrógeno total disuelto

- Fosfato

El fosfato presenta un interés similar al descrito para nitrato, ya que es necesario para el desarrollo de la flora terrestre y acuática, pero al mismo tiempo, su exceso puede dar lugar a procesos de eutrofización. Su presencia se puede deber tanto a actividades urbanas como agrícolas, debido a que está presente en formulaciones tanto de detergentes como fertilizantes (Figura 5-19).

La tendencia general del fosfato es la de presentar concentraciones mayores en la zona de influencia de Sevilla (G3-G8) y la zona final del estuario (G11-G14). A pesar de mantener una distribución aparentemente uniforme durante todo el periodo de estudio, se puede observar como para la toma de muestra de noviembre de 2008 tiene lugar una reducción de la concentración de  $P-PO_4^{3-}$  en la zona urbana.

Se puede apreciar como los valores máximos se encuentran concentrados entre las estaciones G5 y G7 para los tres primeros muestreos ( $147,47-332,73 \mu g \cdot L^{-1}$ ). De este modo se puede atribuir su nivel de concentración a su aplicación a la formulación de detergentes en forma de tripolifosfato. En el caso ya referido del muestro de noviembre de 2008, las mayores concentraciones se han registrado en la zona final del estuario.



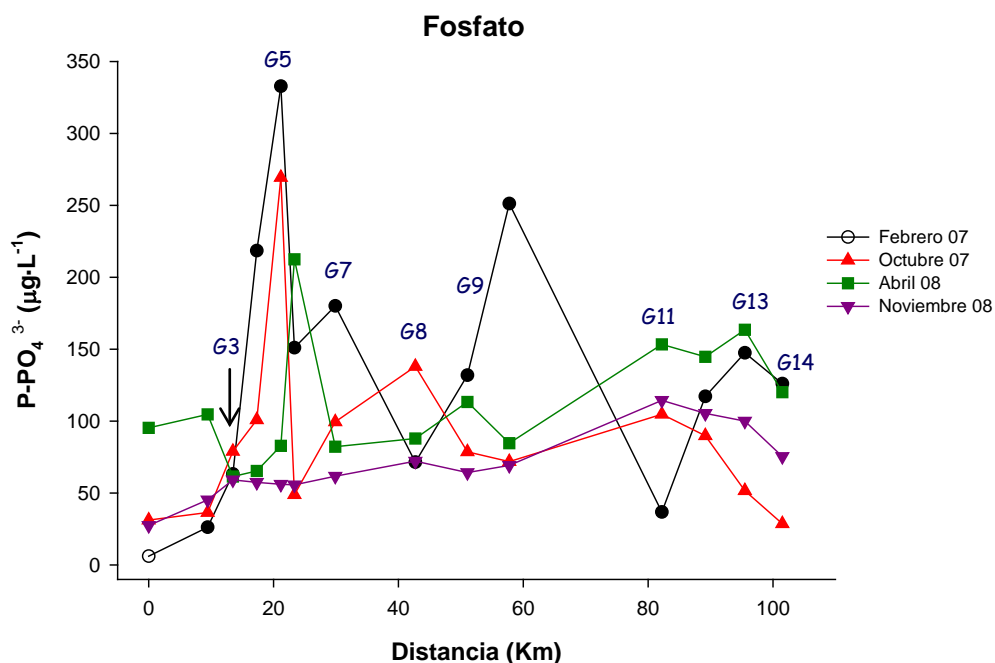


Figura 5-19. Concentración de  $P-PO_4^{3-}$  a lo largo del estuario del Guadalquivir para cada muestreo.

Es en esta zona donde se pueden establecer diferencias claras entre muestreos, observándose una tendencia similar a la del  $N-NO_3^-$ . Se puede observar cómo para los muestreos después de la estación húmeda la concentración es mayor que para la seca. Esto se puede relacionar con las actividades agrícolas que tienen lugar en esta zona, fundamentalmente relacionadas con la estación G13, que ya se describió para el nitrato y con concentraciones de hasta  $175 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Como se ha podido comprobar, para el global de los muestreos, aparece como zona de máxima influencia el área urbana [15,16] (Figura 5-20). Además se puede determinar en zonas agrícolas G9-G11, un aumento en la concentración de fosfato [17,18] que se relaciona con los muestreos de febrero de 2007 y abril de 2008. En cuanto a la zona urbana es significativo el progresivo descenso de la concentración de fosfato que se ha registrado a lo largo del periodo de estudio.

El estudio de las diferencias estadísticas entre muestreos se ha realizado mediante el test de Kruskal-Wallis ha arrojado diferencias que se deben esencialmente a la disminución progresiva de la concentración en la zona urbana a lo largo del periodo de estudio.

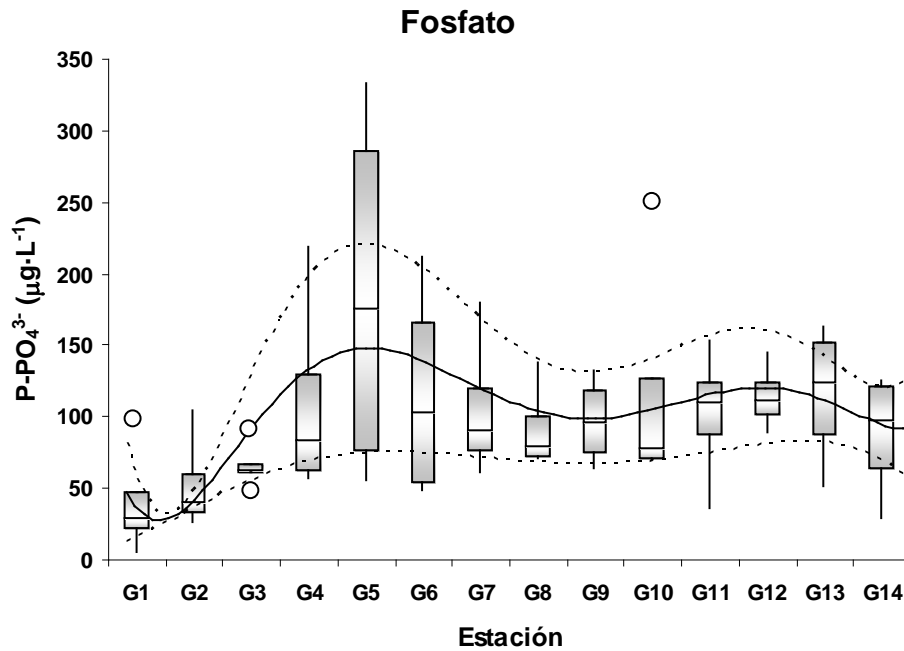


Figura 5-20. Diagrama de cajas y bigotes para el P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

## 1.7. Metales

- Cobre

El Cu es un metal que se encuentra en las aguas naturales niveles de los  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y cuya presencia se suele atribuir a vertidos desde producciones agrícolas, donde puede aparecer como componente de pesticidas en forma de complejos organo-Cu.

Como se puede comprobar en la Figura 5-21, el Cu presenta una distribución con mínimos, en general, en la zona inicial del estuario (G1-G8), mientras que los valores más altos se corresponden con la zona central (G9-G12), para descender de nuevo en las últimas estaciones de muestreo debido a la mezcla con el agua de mar.

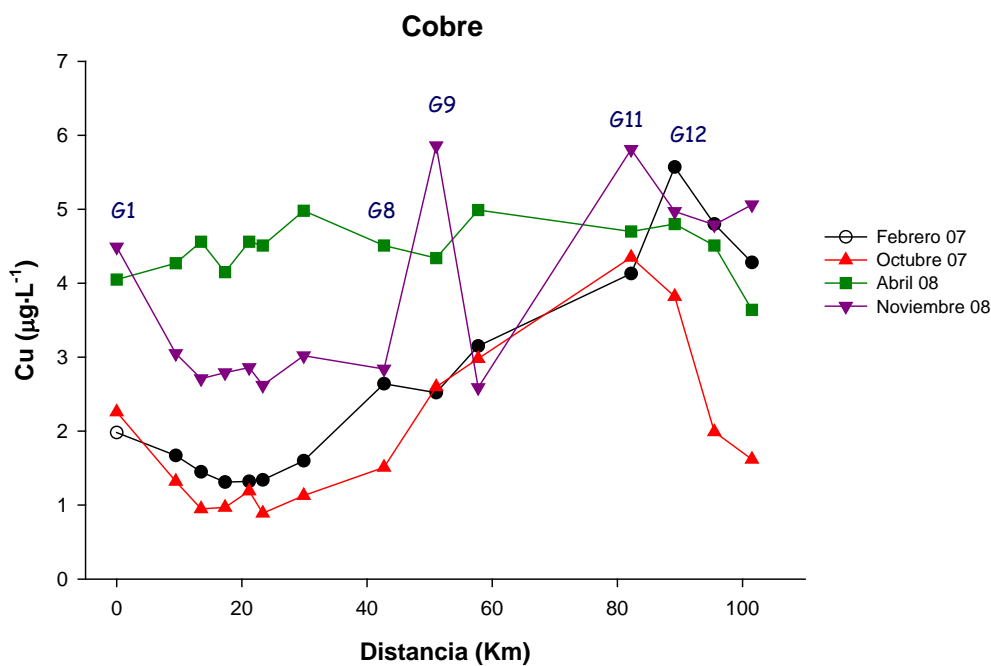


Figura 5-21. Distribución espacial de Cu a lo largo del periodo de estudio.

Es interesante observar la clara diferenciación de los perfiles de Cu para los años 2007 y 2008. Para los dos primeros muestreos (2007) el perfil mostrado ofrece un claro descenso de la concentración desde la primera estación y ofrece valores mínimos, incluso por debajo de  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , en la zona de máxima influencia de Sevilla. A continuación, para ambos casos se experimenta un aumento de la concentración desde el final de la zona de Sevilla (G9), hasta las últimas estaciones de muestreo en la desembocadura (G11). Esta es una región pirítica afectada tradicionalmente por la zona minera de Ríotinto y donde la concentración de producciones agrícolas dedicadas al cultivo de arroz es muy importante, alcanzándose niveles de entorno a  $5,70 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de Cu para este año. Finalmente se aprecia que la concentración de Cu disminuye hasta la desembocadura debido a la entrada de agua de mar fresca, ya que como se ha constatado en estudios anteriores la concentración de Cu en el Golfo de Cádiz está por debajo de los niveles descritos aquí para el río Guadalquivir [18]. También cabe destacar que para la primera toma de muestra, los niveles descritos en la desembocadura son superiores a los registrados para la segunda. Esto guarda relación con el efecto de la marea, que se encontraba subiendo durante el primer muestreo, por lo que se confirma que el río es un transportador de Cu desde zonas agrícolas.

Por otro lado, se puede apreciar, que los muestreos correspondientes a 2008 presentan unos niveles de Cu superiores en general a los observados para 2007,

fundamentalmente en la zona urbana. En particular, para la toma de abril de 2008 se han registrado concentraciones de entre 4 y 5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en la zona urbana, y no es posible apreciar el descenso de concentración descrito para 2007 en esta zona. Éste fenómeno puede guardar relación con el incremento de SST que se ha observado como consecuencia de las lluvias que tuvieron lugar en noviembre de 2007 y la apertura de la presa de Alcalá del Río. Por último, con respecto al último muestreo se aprecia la recuperación de la forma del perfil de concentración en la zona urbana y también del nivel de concentración previos a este desastre.

Para el conjunto de las tomas de muestra se observa una zona de concentraciones ligeramente inferiores, que coincide con la urbana; mientras que los máximos aparecen en la zona final, entre la zona central y la desembocadura (Figura 5-22). A la vista de estos resultados se podría relacionar el origen del cobre, con la naturaleza pirítica de la zona y la presencia de zonas agrícolas en la zona media del estuario [20], así como producciones vitivinícolas en la parte final [21]. El descenso observado en la última parte corresponde a la entrada limpia de agua de mar en el estuario [22].

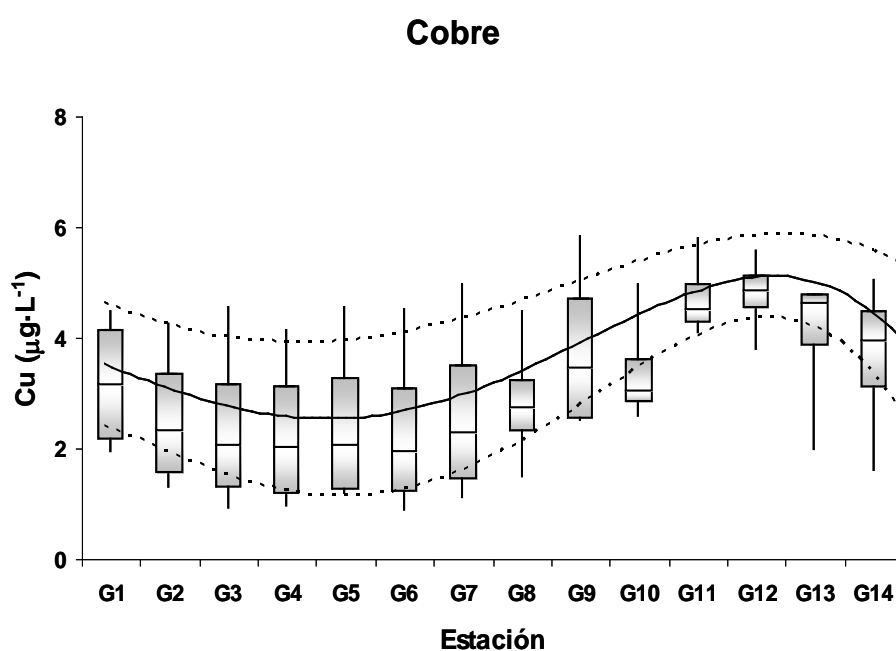


Figura 5-22. Gráfico de cajas y bigotes para Cu.

El análisis de la varianza, mediante el test de Kruskal-Wallis, ha confirmado la diferenciación de la distribución de Cu para los años 2007 y 2008, que se aprecia en por las perturbaciones registradas a final de 2007.

- Manganeseo

Este metal, al igual que nitrito y amonio puede estar muy relacionado con las aguas residuales urbanas. El Mn se suele aplicar como oxidante ( $\text{KMnO}_4$ ) para la degradación de la materia orgánica y la precipitación de otros metales (Figura 5-23). Existen alternativas a este proceso que están llamadas a sustituir el uso de Mn.

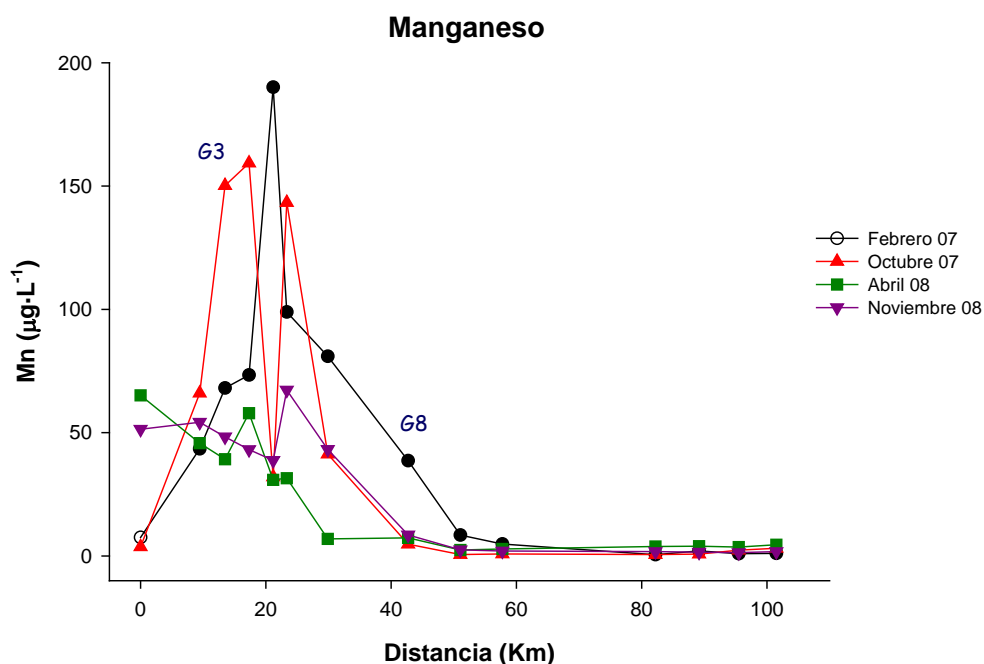


Figura 5-23. Perfil de concentración de Mn para las distintas tomas de muestra

De forma general se puede comprobar como la concentración de Mn es máxima en la zona correspondiente al área directamente afectada por Sevilla y cómo en la zona salina disminuye considerablemente.

Es interesante observar la variación del perfil de concentración de Mn en la zona urbana (G3-G8), debido a la progresiva disminución de su concentración a lo largo del periodo de estudio, siendo ésta más acusada entre el segundo y el tercer muestreo. Este comportamiento ha sido apreciado anteriormente para otras variables como el  $\text{N-NH}_4^+$  y el  $\text{P-PO}_4^{3-}$ . Así se han registrado concentraciones máximas en esta parte de hasta  $190,05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  al inicio del estudio y de  $65,13 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  al final del mismo. Un factor a tener en cuenta en este comportamiento, puede ser debido a la precipitación de Mn o a la

adsorción por materia particulada, como consecuencia del importante aumento de la concentración de SST en 2008.

En cuanto a la zona posterior a la urbana se aprecia un efecto de dilución de Mn en el estuario hasta niveles estables a partir de la zona central, donde se mantiene a niveles por debajo de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Para el global de la tomas de muestra se puede observar como la concentración de Mn a lo largo del estuario es más importante en la zona urbana (G3-G7) [21] (Figura 5-24). La variación observada en la zona urbana no ha arrojado diferencias estadísticamente significativas entre muestreos cuando se ha aplicado el test de Kruskal-Wallis, dando  $\alpha=0,058$ .

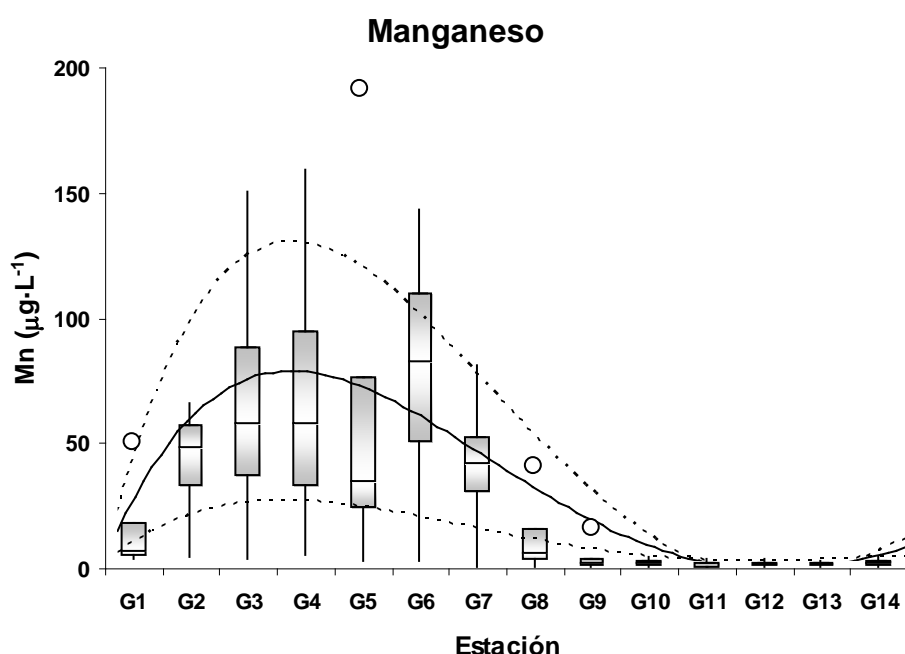


Figura 5-24. Gráfico de cajas y bigotes para Mn a lo largo del periodo de estudio

- Níquel

A continuación se muestran las concentraciones de níquel registrada para cada uno de los muestreos durante el periodo de estudio para el río Guadalquivir (Figura 5-25).

La distribución espacial de la concentración de Ni en el río Guadalquivir es irregular, aunque presenta de forma general una acumulación del metal en la zona

central. Como para otras variables, aunque de manera menos acusada, se aprecia una separación entre los muestreos de 2007 y 2008.

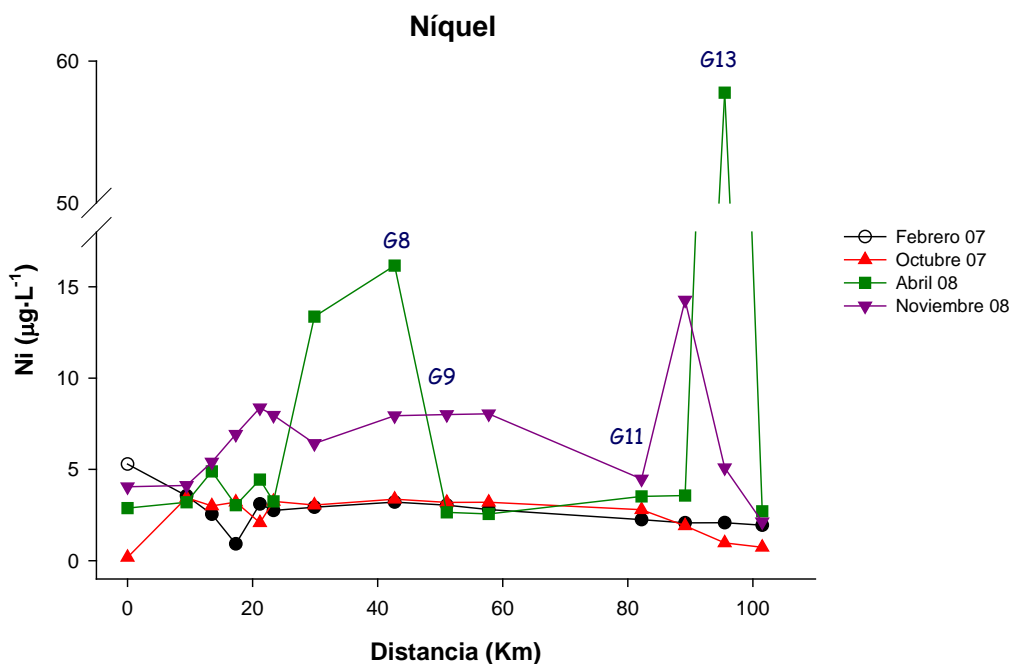


Figura 5-25. Perfil de concentración de Ni para los distintos muestreos.

En el caso de los muestreos de 2007, se aprecian valores mínimos de concentración de Ni al final del estuario, y una separación de los perfiles en la zona inicial, donde para el primer muestreo se registraron las mayores concentraciones. También se puede comprobar que la concentración de Ni se encuentra entre  $0,88 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $5,29 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para 2007. Hasta este momento se podría decir que el Ni tiende a acumularse en la ciudad de Sevilla y la zona posterior dedicada al cultivo de cereales.

En segundo lugar, para 2008, el comportamiento del Ni es irregular y se observa un máximo muy acusado en la zona urbana para abril de 2008, que se encuentra en las estaciones de muestreo localizadas en las poblaciones de Coria del Río (G8) y La Puebla (G9), donde se ha comentado anteriormente, la posible existencia de vertidos urbanos sin depurar y pequeñas explotaciones agrícolas. Ya en la zona salina, para este mismo muestreo, se puede observar un máximo por encima de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y que se localiza cerca de la desembocadura (G13), que ya se manifestó anteriormente como una fuente de contaminantes, típicamente agrícolas, como  $\text{N-NO}_3^-$  y  $\text{P-PO}_4^{3-}$ . Finalmente, para el muestreo de noviembre de 2008 se observa un aumento generalizado de la concentración de Ni, sin que exista una variación del perfil de concentración con los

descritos para el año 2007, pero con un máximo destacado en la estación G11, que se podría relacionar con la presencia de cultivos.

Atendiendo a los datos globales para el Ni (Figura 5-26), se puede decir que de forma general y salvando excepciones como la observada para la estación G13, presenta un máximo en el inicio de la zona agrícola (G8), cuyo origen puede encontrarse tanto en posibles vertidos urbanos procedentes de pequeñas poblaciones (Coria y La Puebla) [24] como agrícolas [26]. No se puede perder de vista, que en casos como el pico de concentración de Ni en la estación G13 se ha rebasado el límite de concentración admitido por la DMA-2008 de  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  [24].

El ANOVA revela que hay diferencias significativas entre muestreos, siendo  $\alpha < 0,05$ . El test a posteriori de Tuckey muestra que estas diferencias son interanuales, como ya se podía intuir en los gráficos correspondientes a los perfiles de concentración.

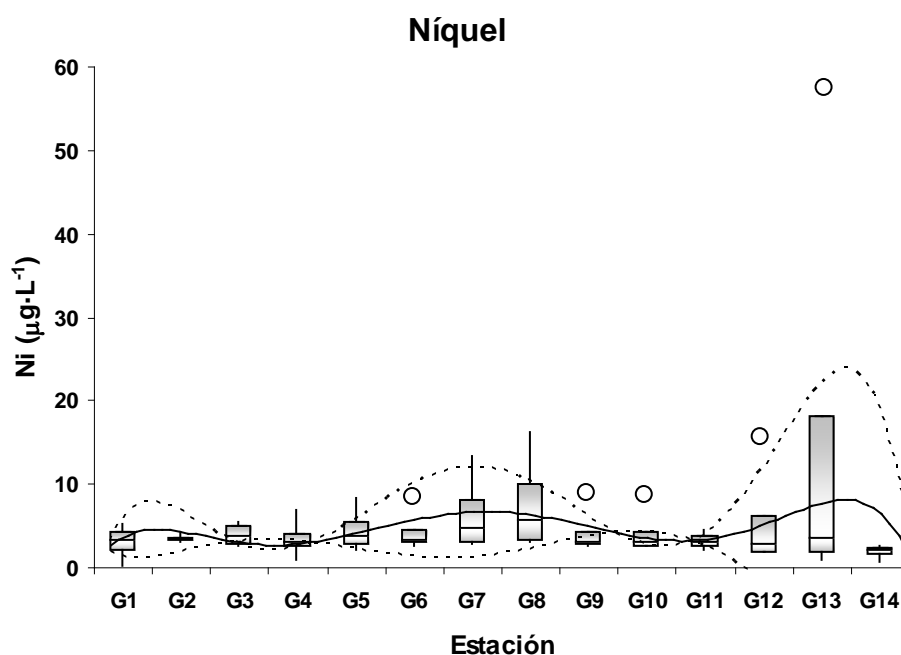


Figura 5-26. Gráfico de cajas y bigotes para el Ni a lo largo del estuario del río Guadalquivir

- Cobalto

El cobalto es un metal utilizado en la industria metalúrgica para superaleaciones, como catalizador en petroquímica, como pigmento o como cobertor de baterías. También es importante su aplicación en componentes tecnológicos como televisores o



teléfonos móviles, por lo que su implicación urbana e industrial resulta evidente. Esto se confirma con los resultados mostrados en la Figura 5-27.

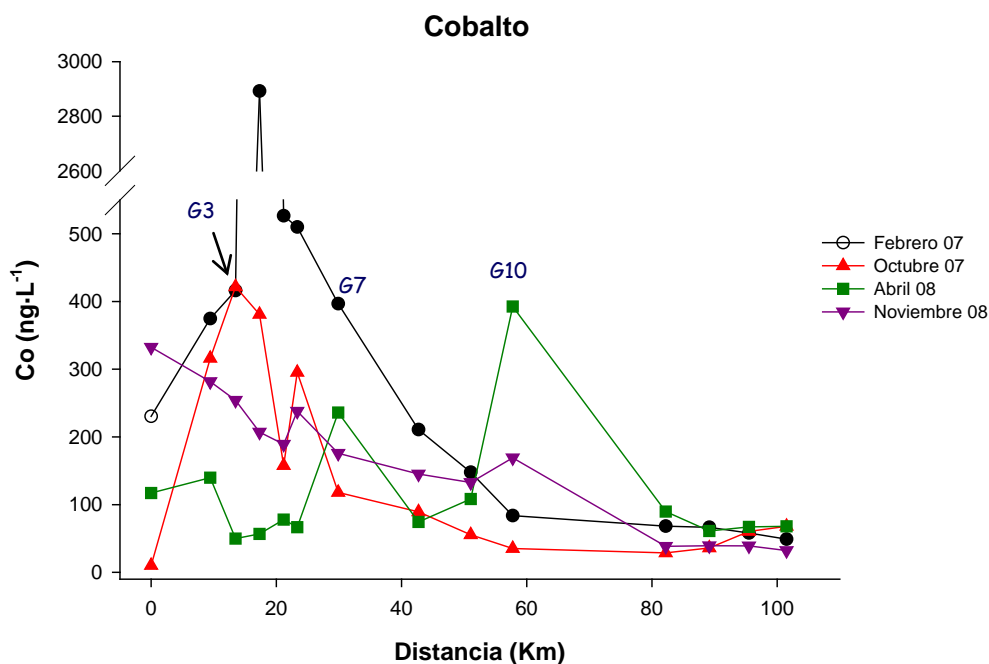


Figura 5-27. Concentración de Co en el estuario del Guadalquivir en el periodo de estudio.

El perfil de concentración del Co es similar al descrito para el Mn y N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, con un mayor nivel de concentración para el primer muestreo y una progresiva disminución a lo largo del periodo de estudio. Cabe destacar que la concentración de Co en el área de estudio se encuentra a niveles de ng·L<sup>-1</sup>, que a pesar de no estar descritos como peligrosos por la DMA-2000 presentan una clara fuente de contaminación por actividades humana. Los datos de concentración registrados en las zonas urbanas llegan hasta los 3000 ng·L<sup>-1</sup>, mientras que en la zona salina no superan los 100 ng·L<sup>-1</sup>.

Se puede observar que la concentración de Co aumenta para los dos primeros muestreos desde la estación inicial, hasta la zona urbana, donde alcanza niveles máximos (G3-G7). Posteriormente disminuye la concentración conforme el estuario se aleja de esta zona y se estabiliza en valores mínimos en la zona salina. También es posible observar que las concentraciones para febrero de 2007 son superiores que para octubre de 2007.

En cuanto a los dos muestreos de 2008, se aprecia un perfil diferente, con valores más elevados en la cabecera y que descienden a lo largo de la zona urbana, pero que caen a valores mínimos en la zona salina. Es interesante observar el pico registrado en la

estación G10 para los muestreos de abril noviembre de 2008, ya que esta es una zona meramente agrícola donde no se esperaban en principio concentraciones elevadas de este metal.

En general, se puede observar como las mayores concentraciones se encuentran en la zona urbana, donde además se presenta la máxima variabilidad (Figura 5-28). Se produce una estabilización hacia un nivel inferior de concentración al aumentar la salinidad, pero cabe destacar que el punto de muestreo G10 ofrece concentraciones comparables a las de la zona urbana. La máxima variabilidad también se observa en la zona de influencia de la ciudad de Sevilla. Su entrada en áreas urbanas se debe a que las plantas de depuradoras de aguas residuales ofrecen bajos rendimientos en su eliminación [27].

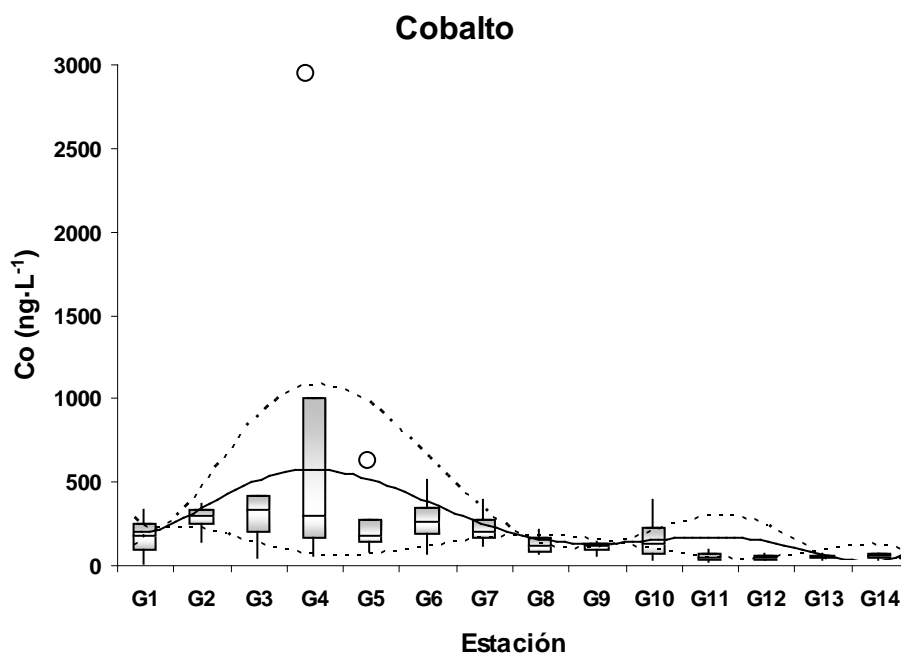


Figura 5-28. Gráfico de cajas y bigotes para Co

A pesar de las variaciones observadas en los gráficos anteriores, el ANOVA refleja que no existen diferencias estadísticamente significativas entre muestreos, con un nivel de significación de 0,068.

- Cinc

En la siguiente figura se muestra el comportamiento presentado por el cinc a lo largo de los diferentes muestreos para la zona estudiada (Figura 5-29).

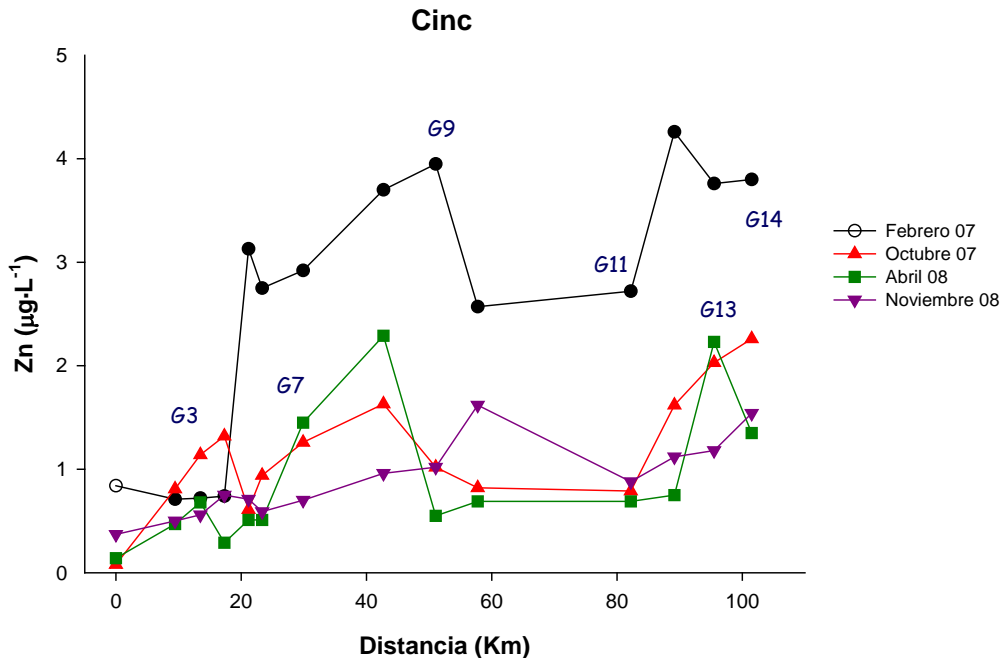


Figura 5-29. Evolución espacio temporal del cinc en el estuario del río Guadalquivir.

El perfil de concentración de Zn muestra en general un comportamiento mixto, con valores más elevados en la zona próxima a Sevilla (G3-G7) y un descenso del nivel en la zona central, para volver a aumentar hasta el final del estuario.

Como para  $\text{N-NO}_3^-$  y OD, el primer muestreo ofrece valores de concentración evidentemente superiores a los registrados para el resto. En el caso del OD, la mayor diferencia con respecto a los demás muestreos se localiza en la zona inicial del estuario, mientras que aquí lo hace en la zona final.

La forma del perfil de concentración se mantiene a lo largo de todo el estudio, con concentraciones inferiores a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  en la zona inicial. A continuación tiene lugar un aumento hasta la estaciones de muestreo G8-G9, en la zona central. Finalmente, es importante destacar, la presencia de un pico en la zona final, relacionado con la estación G11, donde se rompe la tendencia a aumentar de forma progresiva la concentración en dirección al estuario para los muestreos al final del periodo húmedo (febrero de 2007 y abril de 2008) por lo que podría ser una fuente puntual de Zn. Un fenómeno similar ha sido descrito anteriormente para el Ni.

De forma conjunta, la tendencia del Zn en el estuario muestra una curva cuyo pico se encuentra ligado a estaciones de muestreo situadas después de la ciudad de Sevilla y que presentan cierta influencia urbana (G7-G9) (Figura 5-30) [28], pero también es interesante observar que en la zona de la desembocadura (G13-G14) tiene lugar un nuevo aumento de la concentración, donde confluyen los efectos propios del estuario y la presencia de zonas agrícolas y piscícolas [20].

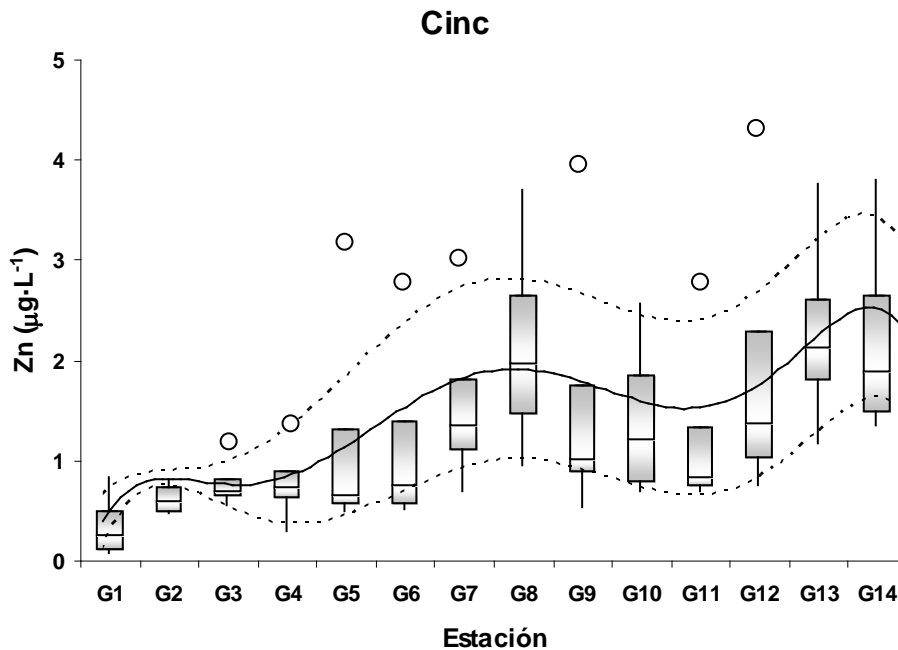


Figura 5-30. Gráfico de cajas y bigotes para Zn

El ANOVA ha demostrado la existencia de diferencias significativas entre muestreos ( $\alpha < 0,05$ ). El test de Tuckey realizado a posteriori ha mostrado que las diferencias se corresponden con el comportamiento apreciado entre los muestreos de febrero de 2007 y los realizados después de la estación seca.

- Plomo

El plomo es un metal cuyo estudio tiene un gran interés en la zona en la que se ha desarrollado este trabajo desde el derrame de lodos de minería en 1998 desde la presa de Aznalcóllar, siendo uno de los metales que más interés presentaron en ese momento, ya que entre otros motivos es responsable del saturnismo. Además el Pb ha sido estudiado por nuestro grupo de investigación con anterioridad en esta zona sin que su origen o relación con otros contaminantes quedara bien establecido, por lo que se ha tratado de esclarecer su comportamiento en el presente trabajo (Figura 5-31).

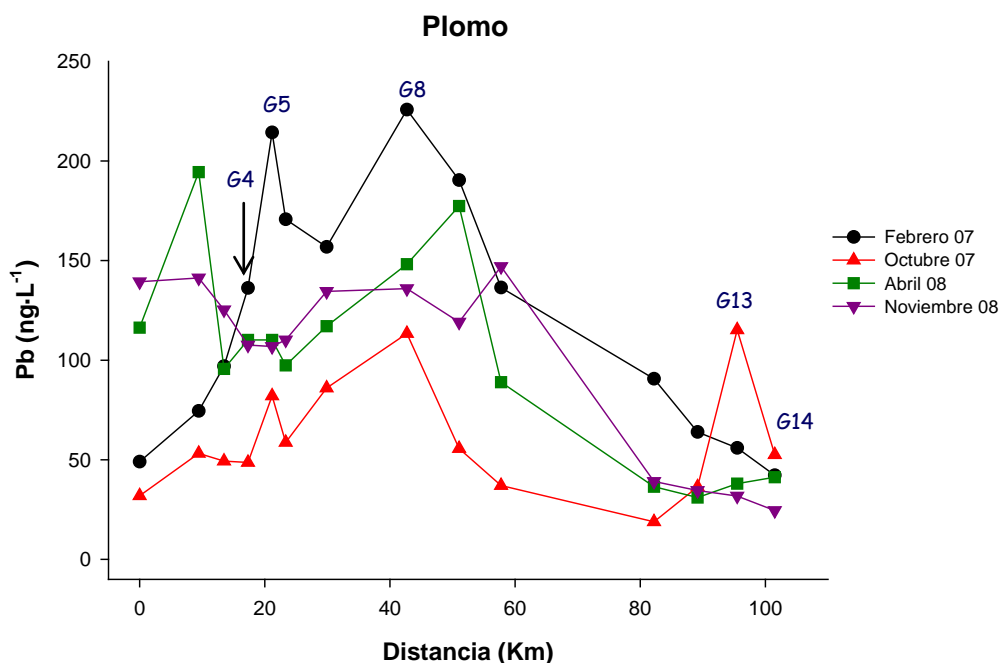


Figura 5-31. Perfil de concentración de Pb para el periodo y la zona de estudio.

Este metal se encuentra a niveles de los  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  en la zona de estudio, por lo que al igual que para el Co, las condiciones de limpieza del material y el ambiente de trabajo han resultado fundamentales en su análisis. Como se puede observar, existe en general una acumulación de Pb en la zona central del estuario, a pesar de esto no se aprecian valores superiores a los  $7,2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  que aparecen en la DMA-2008 como límite par aguas superficiales [24].

Como ya se ha descrito existe una zona de mayores concentraciones localizada en la zona urbana (G4-G8). Se puede apreciar que el nivel de concentración ha variado durante el periodo de estudio y que en general, al inicio del mismo, se han registrado las mayores concentraciones ( $100\text{-}225 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), disminuyendo en octubre de 2007 y recuperándose en cierta media en abril de 2008 para mantenerse hasta el final del estudio.

En cuanto al perfil de concentración se puede apreciar que para todos los muestreos salvo el de noviembre de 2008, la concentración de Pb aumenta desde el inicio del estuario hasta la zona urbana, donde se encuentran dos picos a tener en cuenta, uno en la estación G5, correspondiente al centro de Sevilla y otro en la G8. No hay que perder de vista la disminución de la concentración en la zona del estuario, donde en general el nivel de Pb es inferior a  $50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Se observa un ligero aumento en las últimas estaciones de muestreo, relacionado con la subida de la marea en las tomas

de muestra de octubre de 2007 y a abril de 2008, por lo que se podría pensar en un aporte desde el agua de mar.

Para el global de los muestreos se puede comprobar como la zona que presenta mayores concentraciones de plomo se localiza al final de la zona urbana e inicio del tramo agrícola del estuario (Figura 5-32), pudiendo tener varios orígenes [29], destacando el urbano y el agrícola. Cabe mencionar algún pico de cierta entidad en las estaciones G5 (urbana) y G13 (desembocadura), así como el aumento que se ha observado en el caso de las primeras estaciones para los muestreos de abril y noviembre de 2008. También hay que destacar el aumento observado para la estación G9, en la zona central y que puede tener su origen en La Puebla, a pesar de que el Pb es considerado un contaminante que tiende a acumularse en zonas urbanas o industriales y esta zona es un paraje natural.

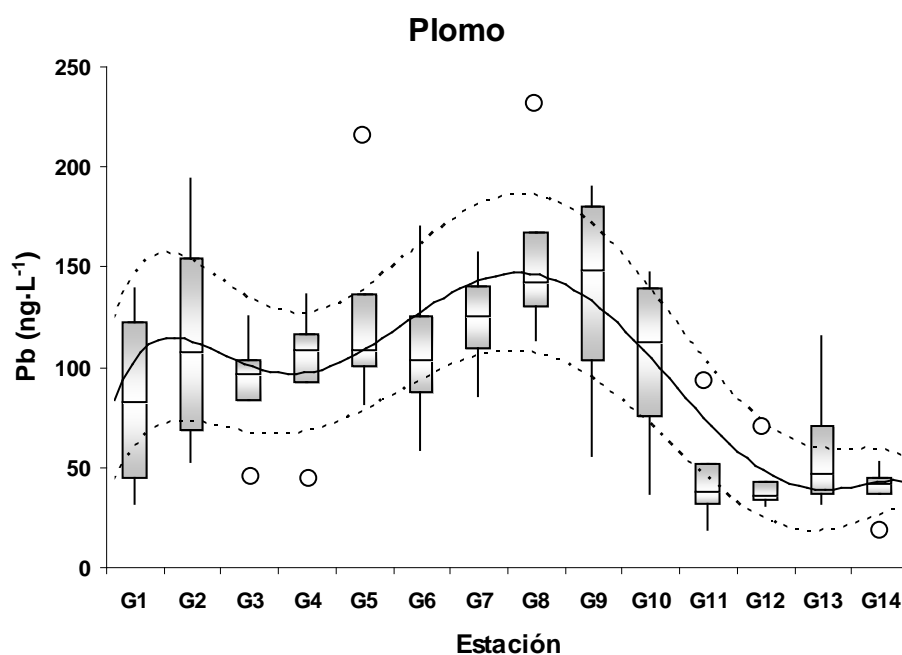


Figura 5-32. Gráfico de cajas y bigotes para el Pb.

El análisis de la varianza ha mostrado la existencia de diferencias significativas entre muestreos para un nivel de confianza del 95%. El test de Tuckey realizado a posteriori refleja que es el muestreo de octubre de 2007 el que difiere del resto.

- Cadmio

Junto al Pb es uno de los metales que mayor interés suscitó debido al episodio de las minas de Aznalcóllar (Figura 5-33). Su interés se debe entre otros motivos a sus efectos tóxicos tanto para vida acuática como para el hombre y a los niveles de concentración que presenta, en torno a los pocos  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

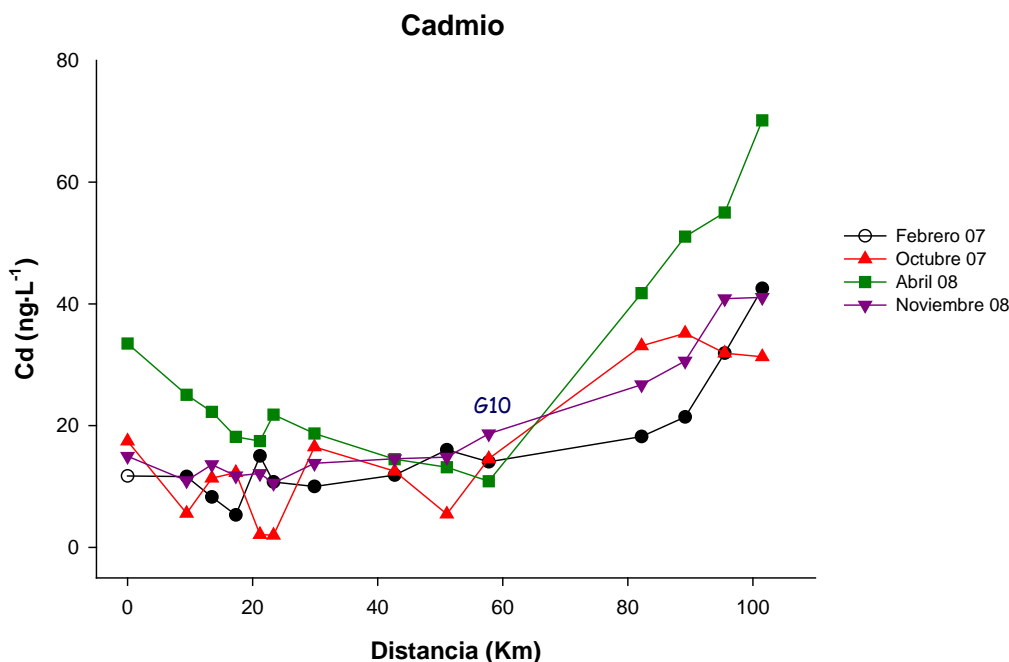


Figura 5-33. Distribución espacial de Cd para cada uno de los muestreos.

Este metal presenta un perfil uniforme durante todo el periodo de estudio con algunas variaciones. En general se puede observar un ligero descenso de la concentración desde el inicio del estuario, al igual que ocurre con el Cu, aunque menos acusado. Posteriormente, a partir del inicio de la zona salina se produce un aumento de la concentración que se puede relacionar al estado de la marea.

Como se puede comprobar, para todos los muestreos, salvo del de abril de 2008, la concentración de Cd es estable durante el tramo no salino, mientras que para esa toma de muestra, se aprecia un aumento de la concentración en la zona alta, que disminuye al entrar en la zona urbana. Este aumento en la zona inicial se podría relacionar con el incremento de la turbidez y otras variables como Cu en esta parte como consecuencia de las lluvias de noviembre de 2007 y la apertura de la presa de Alcalá del Río, que pudieron lugar a una removilización de los sedimentos. Como se puede comprobar, las

concentraciones mínimas para todo el periodo de estudio se relacionan con la zona de Sevilla, en torno a los  $2,00 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Por otro lado en la zona salina, se observa la dependencia de la concentración de Cd con el estado de la marea. Se aprecia que con el aumento de la salinidad (G10), se produce un aumento del nivel de Cd hasta alcanzar valores de  $70,16 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ . Es interesante observar que para los muestreos después de la estación seca se produce una estabilización de la concentración para las últimas estaciones de muestreo, mientras que después de la estación húmeda el crecimiento es lineal. A pesar de este aumento en la desembocadura, en ningún caso se han registrado concentraciones superiores a los  $450 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  establecidos como límite en la DMA-2008 [24].

A la vista de los resultados obtenidos durante el periodo de estudio se puede observar cómo la concentración de Cd está relacionada con la salinidad [30] (Figura 5-34). Se puede comprobar que el nivel de Cd se mantiene estable durante la zona no salina, mientras que al entrar en ésta la concentración aumenta de forma progresiva hasta la desembocadura, donde ofrece valores máximos. Las concentraciones ligeramente más altas que las de la zona urbana, observadas en la estación inicial pueden tener relación con aportes agrícolas en asociación con fertilizantes [31] debido al cultivo de frutales que tiene lugar en la zona de Alcalá del Río, como ocurre con el  $\text{P-PO}_4^{3-}$ .

En cuanto a su comportamiento temporal se observan diferencias significativas entre muestreos al realizar el ANOVA. La posterior aplicación del test de Tuckey ha permitido comprobar que estas variaciones se deben al muestreo de abril de 2008, para el que ya se había observado un comportamiento distinto en la zona urbana.

- Plata

La plata presenta un gran interés desde el punto de vista ecológico ya que es fácilmente bioacumulable y tóxica para los organismos acuáticos. Su estudio a lo largo del estuario (Figura 5-35) es interesante debido a que las distintas formas en las que se encuentran se ven afectadas por la salinidad, teniendo cada una de ellas distintos efectos sobre los organismos [32].



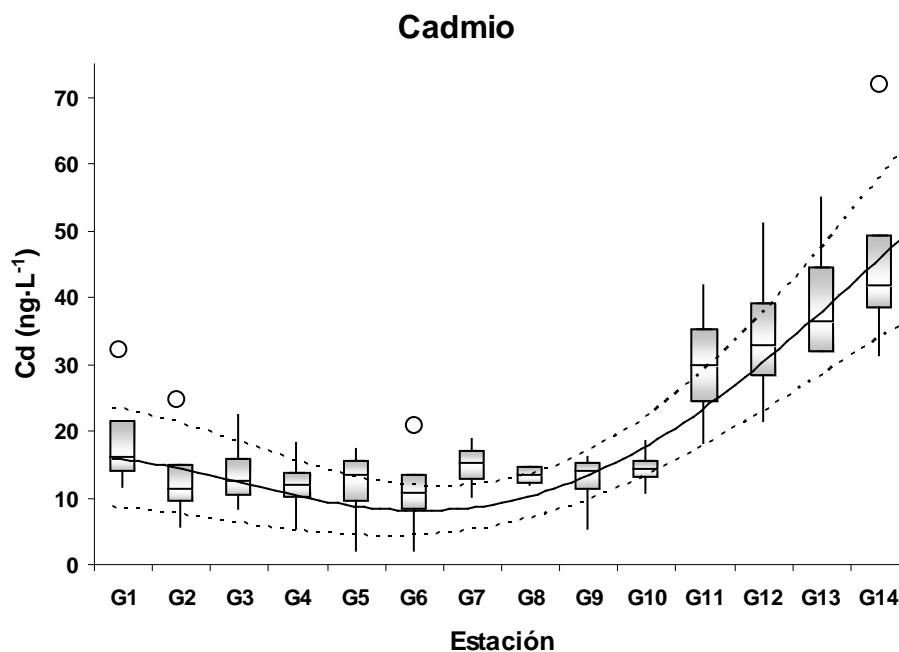


Figura 5-34. Gráfico de cajas y bigotes para Cd.

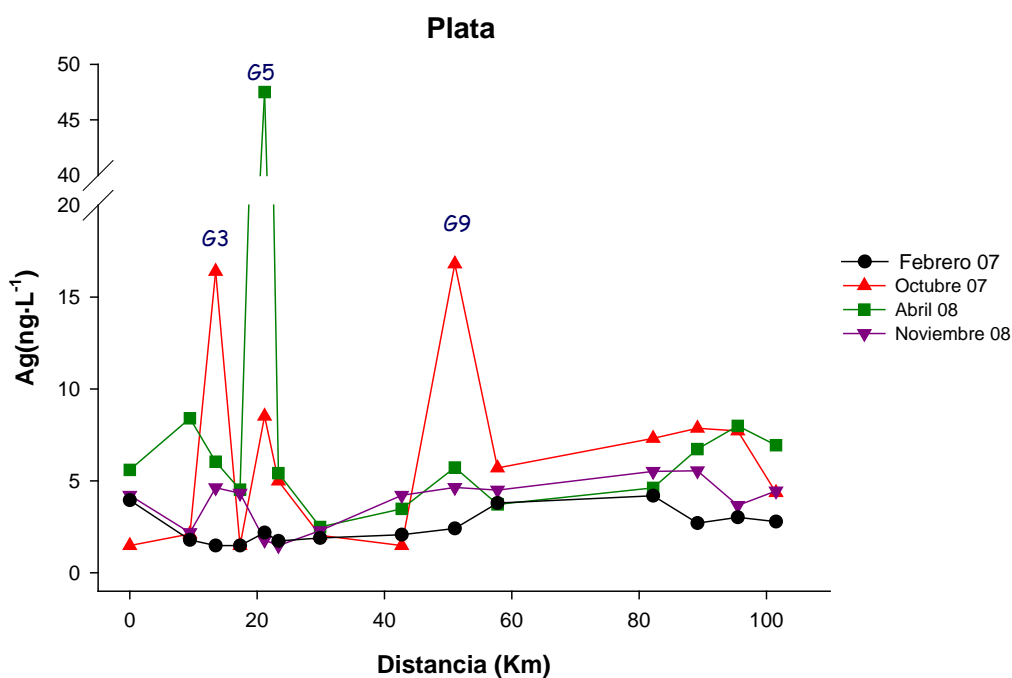


Figura 5-35. Concentración de Ag a lo largo del periodo de estudio para cada muestreo

Al igual que Cd, Co y Pb, la plata se encuentra a niveles de  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$  en el estuario del río Guadalquivir. Como se puede comprobar, su distribución es irregular y en general los valores más altos se encuentran en la zona final del estuario, aunque existen

importantes picos de concentración en la zona urbana que se encuentran en ocasiones un orden de magnitud por encima de los habituales.

En el caso del primer muestreo, el comportamiento de la Ag se muestra más uniforme que para los demás y recuerda al observado para el Cu, con un pequeño descenso desde la zona alta, para volver a aumentar en la zona central y decrecer en el final del estuario. Además este muestreo presenta los valores de concentración en general más bajos, siempre inferiores a  $5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Los demás muestreos presentan un perfil en general similar, pero con picos de concentración importantes en la zona urbana, donde se podría encontrar vertidos puntuales que se localizan fundamentalmente en la zona de Sevilla (G3 y G5), llegando hasta los  $47,00 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y en la zona de La Puebla (G9), donde aparece un pico para octubre de 2007 y abril de 2008. La existencia de este pico coincide con el registrado para este punto para Pb y Cu, donde la actividad fundamental es la agricultura y que ha sido declarado como paraje natural, por lo que no deja de ser sorprendente la aparición de estos contaminantes.

El comportamiento de Ag en la última parte se reproduce para todos los muestreos y es, como ya se ha comentado, similar al del Cu, ya que presenta valores máximos en una zona agrícola, para volver a disminuir a en la desembocadura. Esto hace que se relacione tanto con actividades agrícolas como con las características de la franja pirítica en la que se enmarca esta área y las actividades mineras de Ríotinto.

El diagrama de cajas y bigotes muestra los resultados globales para el periodo de estudio, ofreciendo dos zonas claramente diferenciadas (Figura 5-36), la urbana y el resto del estuario. Por otro lado, aparece una distribución en la zona salina que presenta un incremento del nivel de plata hasta la estación G13, donde vuelve a decrecer ligeramente. El posible origen de la plata no queda bien establecido utilizando estas herramientas, por lo que se ha profundizado en su estudio, como se verá más adelante, teniendo en cuenta el aporte de los afluentes al río Guadalquivir.

La existencia de diferencias significativas entre muestreos se ha evaluado mediante el test de Kruskal-Wallis. Este test ha mostrado la existencia de las mismas ( $\alpha < 0,05$ ), que se pueden atribuir a la gran variabilidad mostrada por el comportamiento de la Ag en la zona urbana.

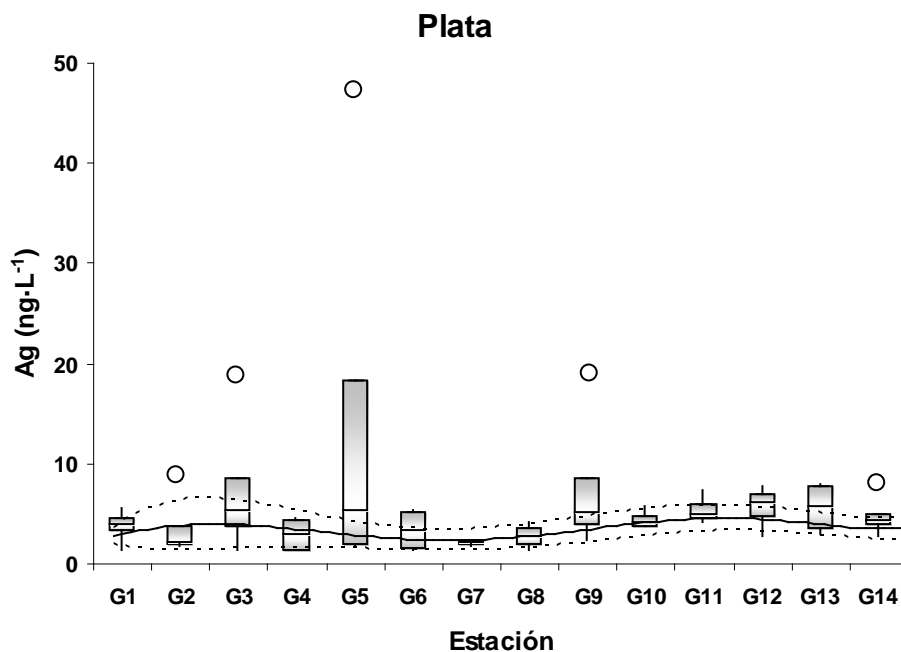


Figura 5-36. Gráfico de cajas y bigotes para Ag

#### 1.8. Carbono:

- Carbono total disuelto

A continuación se muestra la concentración analizada de carbono total disuelto para cada uno de los muestreos realizados a lo largo del estuario del río Guadalquivir (Figura 5-37).

Para el carbono total disuelto se pueden observar dos perfiles de concentración algo distintos. Para los tres primeros muestreos, la concentración de CTD es algo irregular en la zona urbana (G2-G7), y la desembocadura, pero presenta una forma similar en la parte intermedia. Mientras, el último muestreo, ofrece un nivel de concentración más estable, pero superior en general a los anteriores.

En cuanto a la parte comprendida entre la zona inicial y el final del área afectada por Sevilla, se aprecia una distribución ligeramente irregular, con concentraciones comprendidas entre 15 y 40 mg·L<sup>-1</sup>, salvo para el muestreo de octubre de 2007, donde la mayor concentración se observa para la estación inicial (35,94 mg·L<sup>-1</sup>). Posteriormente, después de atravesar Sevilla, se produce una disminución para los tres primeros muestreos, que contrasta con el último, para el que el nivel de CTD sigue aumentando.

Seguidamente, aparece un pico de concentración en el punto G9, que se corresponde con La Puebla, coincidente para Pb, Cu y Ag.

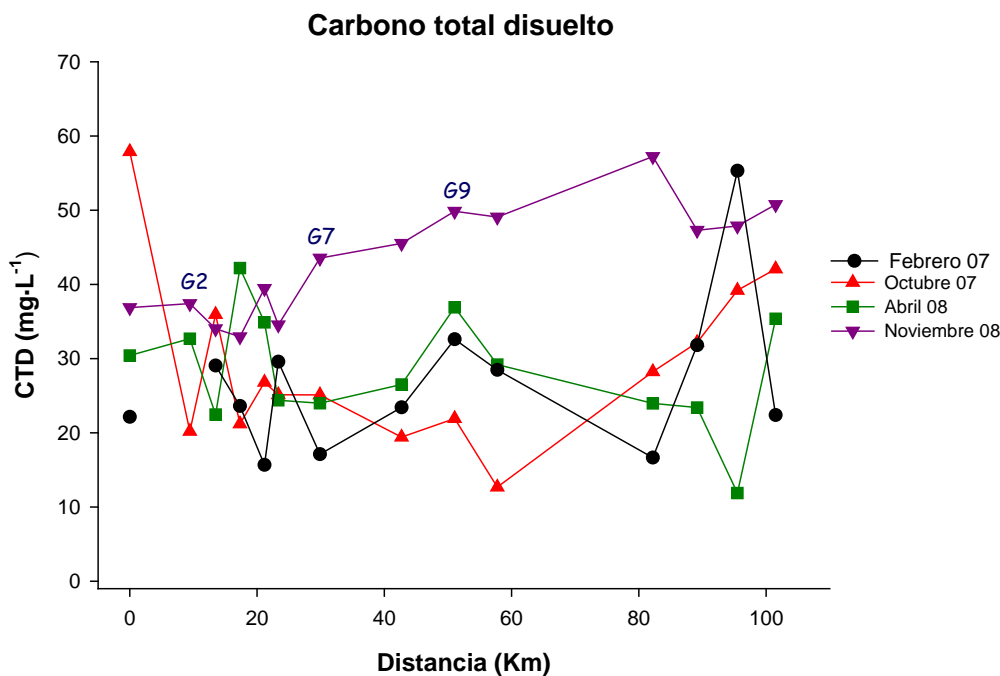


Figura 5-37. Perfil de concentración para carbono total disuelto

A partir de este punto se muestran dos comportamientos distintos según la toma de muestra. Para los muestreos después de la estación seca, tiene lugar un aumento progresivo de la concentración de CTD a lo largo de la zona central y hasta la desembocadura, mientras que para el caso de los muestreos después de la estación húmeda este efecto no se observa.

Para el estudio conjunto con gráficos de cajas y bigotes, la concentración de carbono total presenta un ligero descenso desde la zona inicial para estabilizarse en la zona urbana (Figura 5-38). Desde aquí y hasta el inicio de la zona salina se observa un máximo en el área agrícola (G9). En la zona de salinidad creciente, aumenta la concentración de forma progresiva hasta llegar al final, donde disminuye ligeramente. El análisis de la varianza ha mostrado que existen diferencias significativas entre los muestreos para esta variables ( $\alpha < 0,05$ ), pero que no las hay entre puntos de muestreo ( $F=0,58$ ,  $\alpha=0,86$ ).

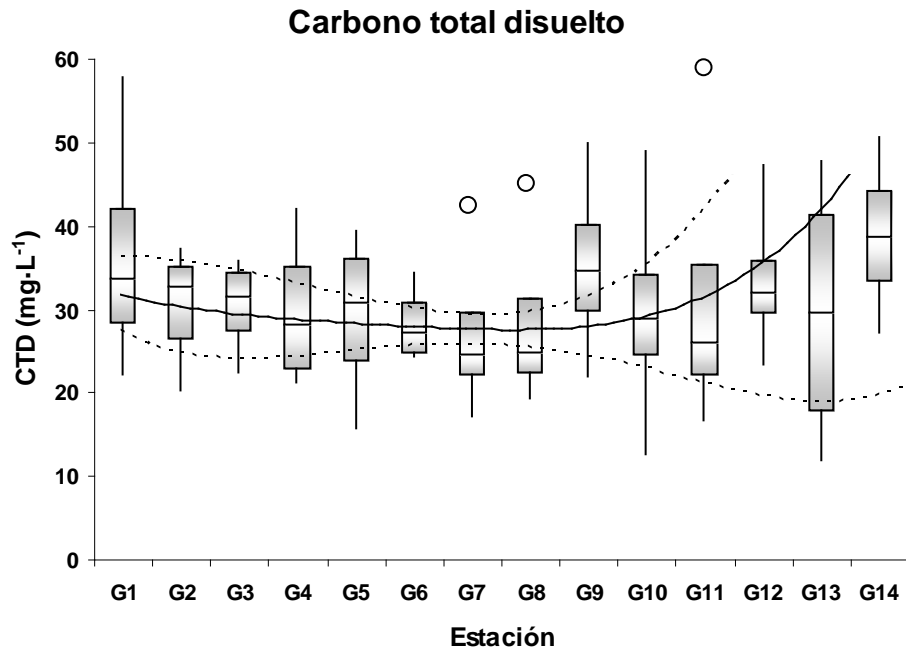


Figura 5-38. Gráfico de cajas y bigotes para el carbono total disuelto.

- Carbono inorgánico disuelto

Además del carbono total disuelto se han determinado el carbono inorgánico disuelto y el carbono orgánico disuelto. El carbono inorgánico tiene gran importancia como sistema regulador de pH ( $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ ) (Figura 5-39).

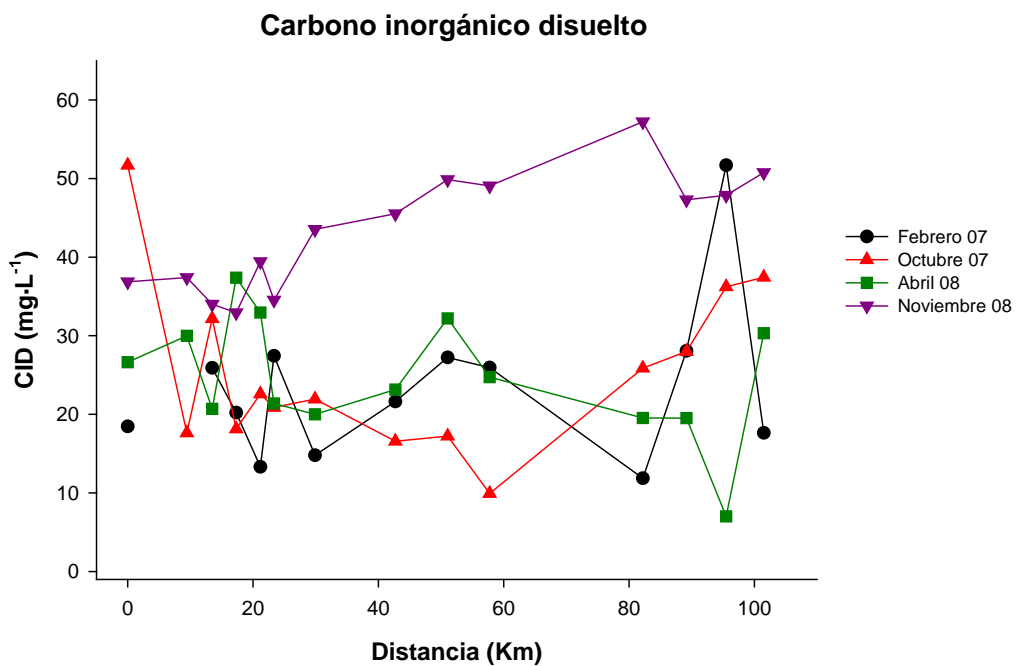


Figura 5-39. Perfiles de concentración para el carbono inorgánico disuelto

Como se puede observar la distribución y los perfiles de concentración son los mismos que se presenta para el carbono total disuelto, ya que ofrece la mayor contribución al mismo. El principal origen natural del carbono inorgánico disuelto está relacionado con la entrada de agua de mar en los estuarios, pero la presencia de máximos en la zona central podría relacionarse con actividades agrícolas que promueven una removilización de los suelos y un arrastre de sales por escorrentía superficial [33]. También hay que tener en cuenta el intercambio atmósfera-hidrosfera de carbono en forma de  $\text{CO}_2$ , ya que afecta al comportamiento del CID [34]. La línea de tendencia para el global de los muestreos tiene una forma similar a la del carbono total (Figura 5-40).

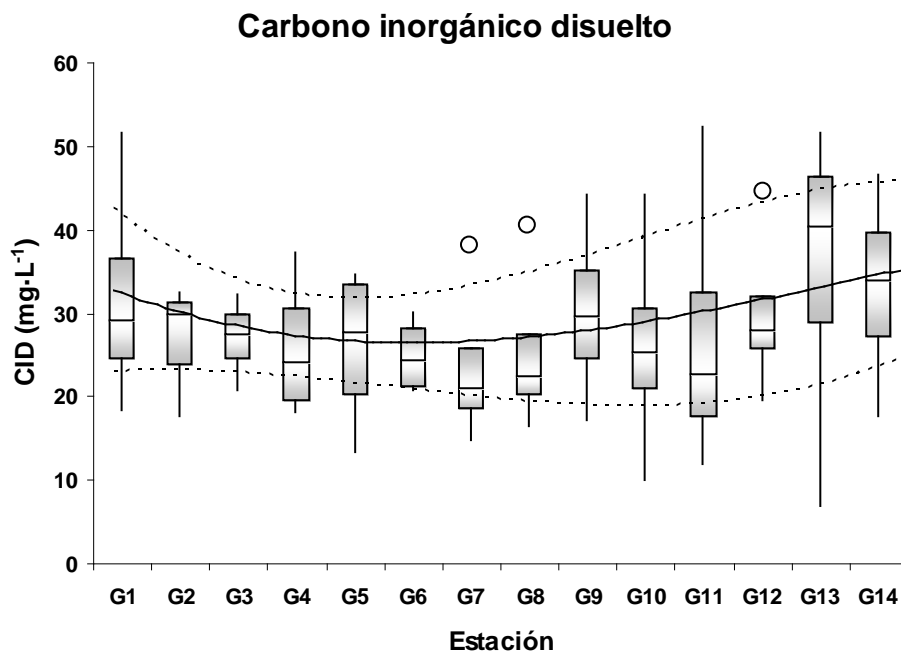


Figura 5-40. Gráfico de cajas y bigotes para carbono inorgánico disuelto

- Carbono orgánico disuelto

La determinación del carbono orgánico disuelto da una medida real de la materia orgánica disuelta en el sistema estudiado. Los resultados obtenidos se muestran a continuación (Figura 5-41).

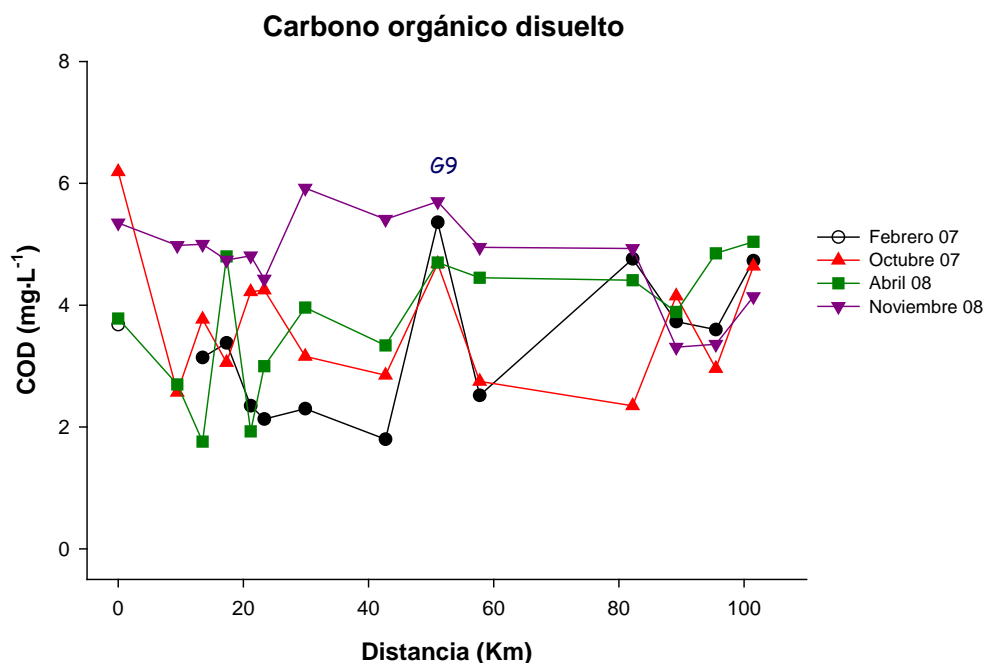


Figura 5-41. Concentración de carbono orgánico disuelto para cada muestreo

Para el carbono orgánico se puede observar una tendencia general similar a la que se muestra para el total pero con los resultados de los muestreos más agrupados. Como se puede observar el muestreo de noviembre de 2008 presenta un nivel de concentración superior en general al del resto. En general la concentración de COD se encuentra entre 2 y 6 mg·L<sup>-1</sup>.

Como característica a destacar, se puede observar un pico de concentración que se reproduce para todos los muestreos en la estación G9, que coincide para otras variables como Pb, Ag y Cu y que se localiza en La Puebla. Todas estas variables están en general asociadas a vertidos urbanos, por lo que resulta llamativo que ofrezcan un pico de concentración en este punto, que ha sido declarado como paraje natural y cuya actividad mayoritaria es la agricultura.

Según el estudio global, para esta variable se aprecia una estabilización de la concentración de carbono en la zona urbana. Posteriormente aparece un máximo en el punto G9, a la salida de la misma [35] (Figura 5-42). En esta zona el COD presenta su mayor contribución al carbono total disuelto. Desde esta zona existe cierta variabilidad hasta la desembocadura, aunque la tendencia es a aumentar de forma paulatina con la distancia.

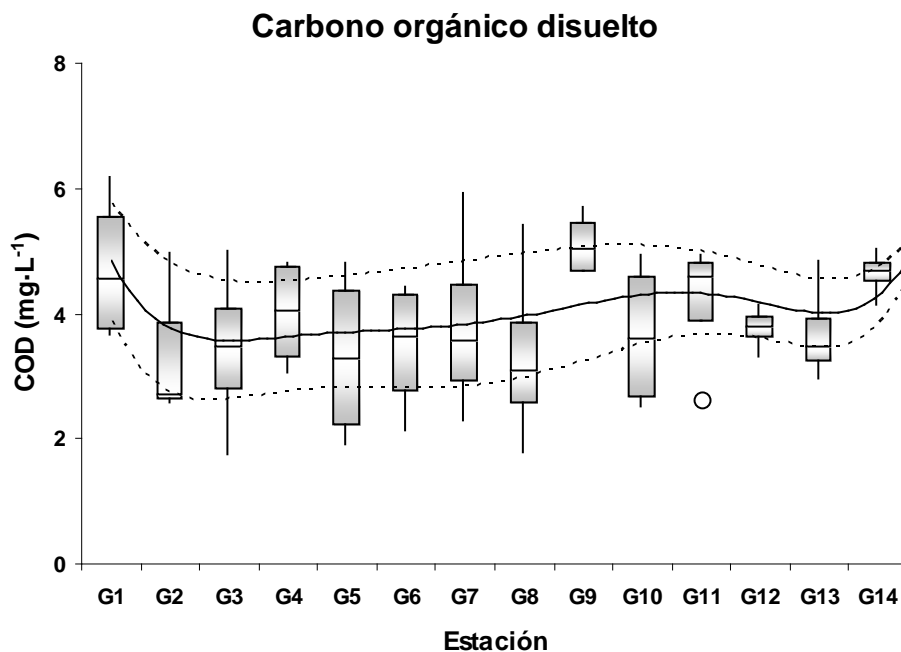


Figura 5-42. Gráficos de cajas y bigotes para COD.

Como para el carbono total disuelto no aparecen diferencias significativas entre estaciones de muestreo cuando se aplica el ANOVA ( $F=0,61$ ,  $\alpha=0,83$ ), aunque estas sí se observan entre los muestreos, salvo entre los de febrero de 2007 y octubre de 2007 según el test de Tuckey.

### 1.9. Compuestos orgánicos

El estudio de la evolución de la concentración de compuestos orgánicos se ha realizado para las cinco estaciones de muestreo escogidas para tomas de muestra selectivas, siendo los puntos tomados, representativos de cada zona del estuario. Para estos contaminantes se han realizado los análisis a partir del muestreo de octubre de 2007.

Las representaciones gráficas, para facilitar su comprensión, se han limitado a los diagramas de cajas y bigotes. Para su discusión, los compuestos orgánicos se han agrupado por familias en base a su estructura química y aplicación.

- Pesticidas triazínicos

Se han estudiado cuatro pesticidas triazínicos que se pueden dividir en dos grupos a la vista de su comportamiento en el estuario del río Guadalquivir. Por un lado están



simazina y terbutilazina que presentan su mayor nivel de concentración en la zona inicial del estuario, con concentraciones de hasta 404,37 ng·L<sup>-1</sup> y 2563,00 ng·L<sup>-1</sup> respectivamente (Figura 5-43). Aparecen con valores intermedios en la parte urbana y llegan a valores mínimos de 43,54 ng·L<sup>-1</sup> y 74,04 ng·L<sup>-1</sup> en la estación G11 para el muestreo realizado en octubre de 2007. Los elevados valores encontrados en la estación G1 se pueden corresponder a la presencia de cultivos de frutales en los alrededores de Alcalá del Río.

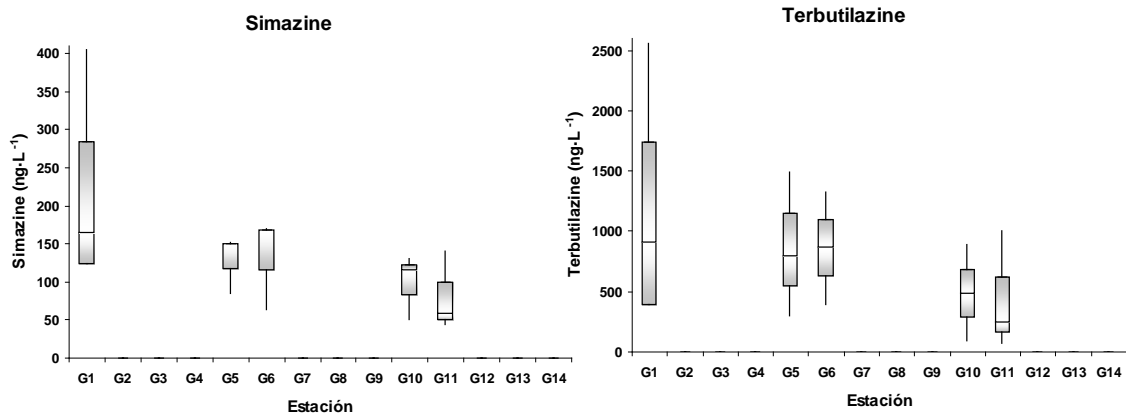


Figura 5-43. Diagrama de cajas y bigotes para simazina y terbutilazina.

Las otras dos triazinas analizadas presentan un comportamiento diferente, ofreciendo concentraciones crecientes desde la zona inicial hasta la parte agrícola (Figura 5-44). En este caso se presenta para el terbutrín un comportamiento particular en la estación G1, donde la variabilidad es muy importante, ya que presenta tanto el valor máximo registrado para este compuesto (48,73 ng·L<sup>-1</sup>), como el mínimo (10 ng·L<sup>-1</sup>); que corresponden a octubre de 2007 y noviembre de 2008 respectivamente. En el caso de atrazina, la concentración más baja se ha registrado en la zona urbana para la última toma de muestra (G5: 10,10 ng·L<sup>-1</sup>) y la mayor para la zona final (G11: 22,09 ng·L<sup>-1</sup>) en el muestreo anterior.

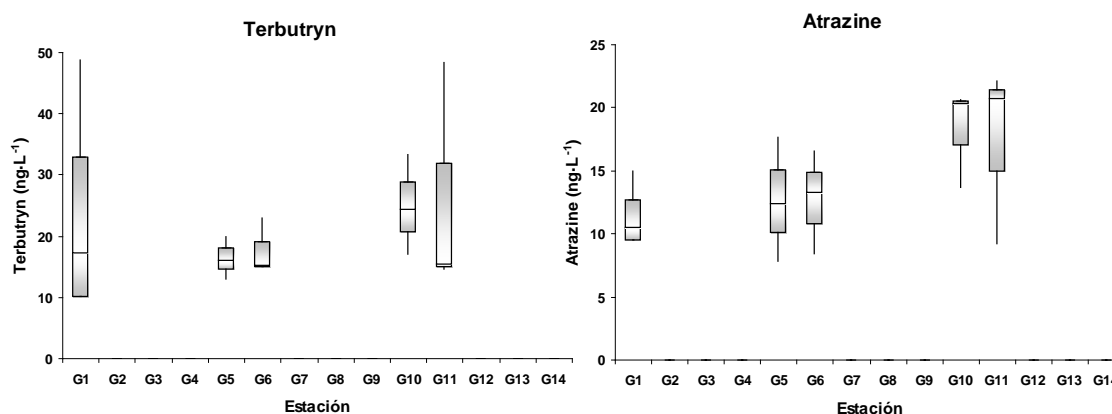


Figura 5-44. Gráfico de cajas y bigotes para terbutrín y atrazina.

La concentración de terbutrín considerada como tóxica para la vida acuática es de  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , por lo que en el estuario del río Guadalquivir se encuentra a concentraciones que no son peligrosas [36] y aparece por debajo de niveles descritos en ríos europeos que presentan concentraciones de entorno a las decenas de  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  [37]. Por otro lado, las demás triazinas estudiadas presentan concentraciones similares a las registradas en el estuario de Scheldt en el periodo 2002-2005 [38], que se encuentran por debajo de los límites definidos por Pennington y col. [39] que establecen el  $\text{LC}_{50}$  en  $96 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  como tóxico para la flora acuática. Además cabe destacar que en ningún caso se rebasan los límites de simazina y atrazina, descritos en DMA-2008 y que aparecen como representativos de esta familia de compuestos. Estos límites está establecidos en  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para atrazina y  $4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para simazina [24].

- Herbicidas cloroacetanilídicos

En el caso de los herbicidas de la familia de las cloroacetanilidas se observa un comportamiento distinto para los dos compuestos seleccionados (Figura 5-45). La concentración de metalacloro ofrece una clara tendencia a aumentar en la última estación (G11), donde además ofrece una mayor variabilidad temporal, que le lleva a presentar la concentración más alta de este compuesto ( $87,64 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en el muestreo de abril de 2008 y también la menor ( $0,36 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en octubre de 2007. En cuanto al alacloro no se aprecian diferencias considerables entre los puntos de muestreo. Ambos herbicidas presentan concentraciones que se encuentran en los mismos niveles que los estudiados para otros sistemas como el estuario de la Bahía de Chesapeake [40] y que no superan los definidos en la DMA-2008 para alacloro como referencia de este grupo y que se establecen en  $700 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  [24].

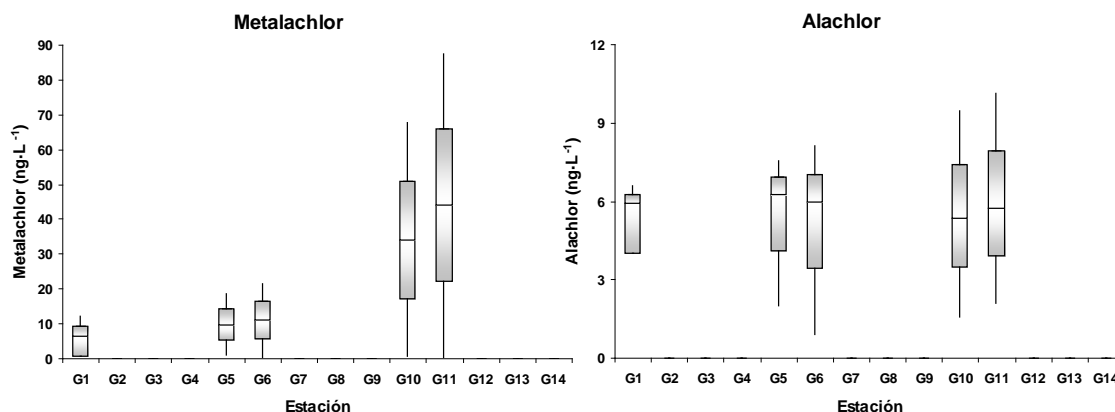


Figura 5-45. Gráfico de cajas y bigotes para metalachloro y alachloro.

- Lindano

El lindano es un insecticida policlorado, cuyo uso en agricultura está prohibido. La concentración de lindano presenta valores de entre  $0,80 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $7,97 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , cercanos al límite de detección de la técnica de medida. Las concentraciones más bajas se corresponden con la estación G10 en la zona media (abril 2008) y las mayores con el punto G1 en la cabecera del estuario (octubre 2007) (Figura 5-46). El hecho de que en ocasiones su concentración se encuentre por debajo del límite de detección se explica por la prohibición en su uso, así como la implementación de medidas en zonas afectadas por el mismo [41]. Además, en la zona de estudio no se han observado concentraciones superiores a los  $40 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  marcados como límite en la DMA-2008 [24].

- Dimetoato

El dimetoato es un insecticida que actúa inhibiendo el funcionamiento de la enzima colinesterasa. Su comportamiento espacial muestra una disminución en la zona agrícola con respecto de la parte inicial del estuario (Figura 5-47). No hay que olvidar que en la estación G1, existen cultivos de hortalizas y frutales que se encuentran a la ribera del río. Estas pueden ser vías de entrada de dimetoato al río Guadalquivir. La mayor concentración se ha registrado en noviembre de 2008 para el punto G1 ( $1087,80 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), mientras que la menor corresponde al muestreo de octubre de 2007 y el punto G11 ( $12,53 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

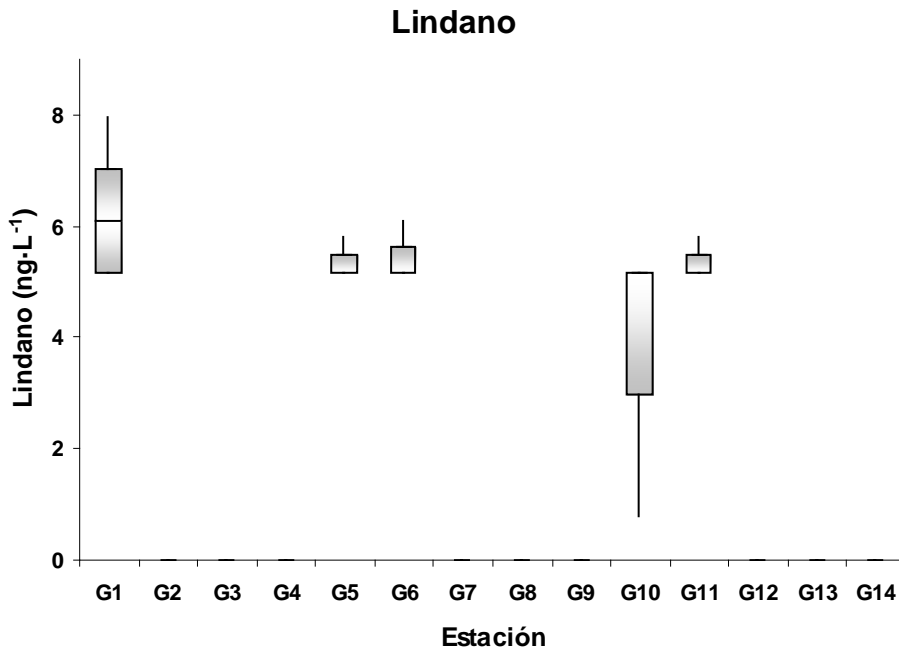


Figura 5-46. Gráfico de cajas y bigotes para el lindano.

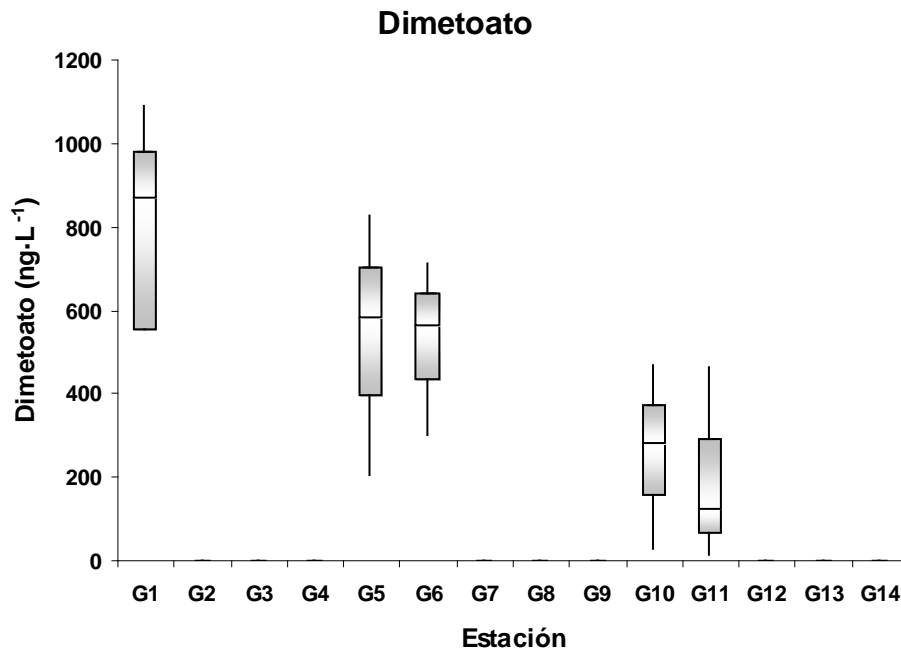


Figura 5-47. Diagrama de cajas y bigotes para el dimetoato.

- Cafeína

El comportamiento de la cafeína está muy relacionado con la actividad urbana en las cercanías de los puntos de muestreo, ya que tiene importante presencia en los

efluentes de EDARs [42]. Se puede comprobar que su concentración es muy inferior en la zona agrícola (G10 y G11) (Figura 5-48). Existe además una gran variabilidad en su concentración, teniendo su valor máximo en la estación G1 en el primer muestreo ( $184,51 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el mínimo en el G10 para abril de 2008 ( $9,33 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Teniendo en cuenta su comportamiento en zonas pobladas como G1 (Alcalá del Río) y G5-G6 (Sevilla) permiten pensar que tras un estudio más profundo de su comportamiento podría utilizarse este compuesto como trazador urbano.

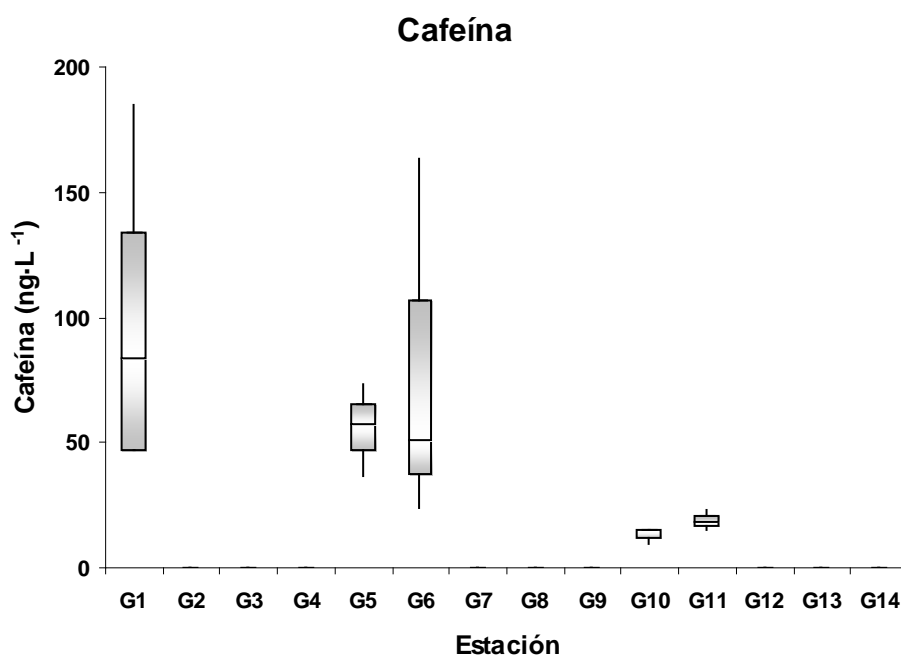


Figura 5-48. Gráfico de cajas y bigotes para la cafeína.

- Metildihidrojasmonato

El metildihidrojasmonato es una fragancia utilizada normalmente en perfumería. En este caso, su concentración no presenta una tendencia espacial definida y los niveles se encuentran en rangos más restringidos que para otros compuestos orgánicos como la cafeína (Figura 5-49). Su máximo nivel lo ha alcanzado en la zona agrícola para el último muestreo ( $59,50 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el mínimo corresponde a la estación G5 también para esta toma de muestra ( $16,20 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). En principio era de esperar una mayor concentración en las estaciones urbanas, pero como se ha observado, esto no es así.

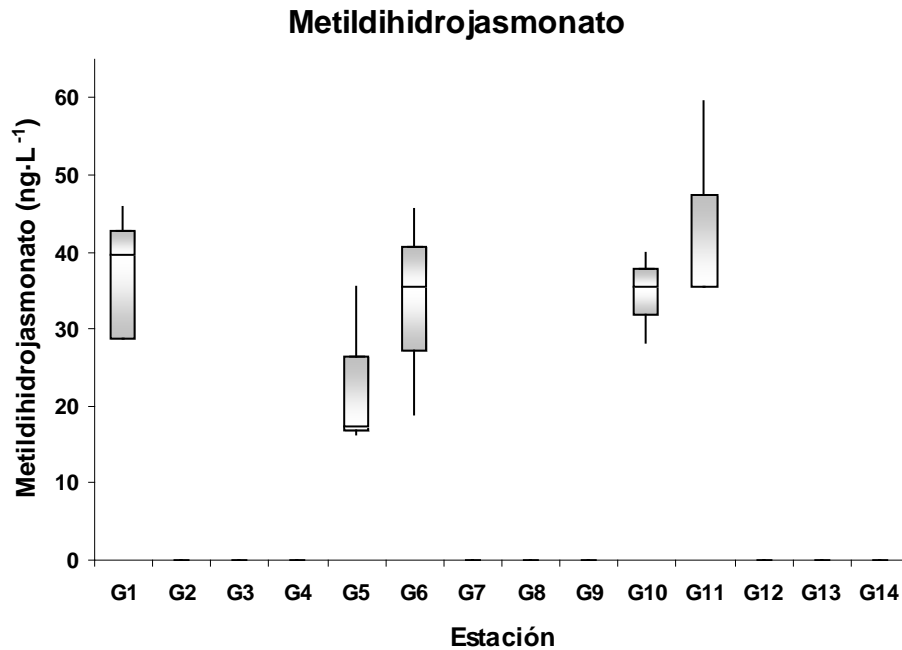


Figura 5-49. Diagrama de cajas y bigotes para el metildihidrojasmonato.

- Triclosan

El triclosan es un compuesto aplicado como bactericida y antifúngico, que está relacionado con la higiene personal y los productos detergentes empleados como limpia hogares. Como se puede observar en la gráfica, las concentraciones de triclosan son máximas en la zona inicial, afectada por la población de Alcalá del Río y en la zona de Sevilla (G5 y G6) (Figura 5-50).

En cambio, existe un ligero descenso en la zona central. La concentración máxima se ha registrado para la estación de muestreo G5 en abril de 2008 ( $56,24 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ), mientras que el mínimo corresponde a los puntos G10 y G11 en octubre de 2007 ( $8,70 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Los niveles de triclosan detectados en el estuario del Guadalquivir se encuentran en el mismo nivel que los descritos para otros sistemas como la costa del mar del Norte [43] o el puerto del Charleston [44], donde se ha utilizado como indicador de actividades domésticas.

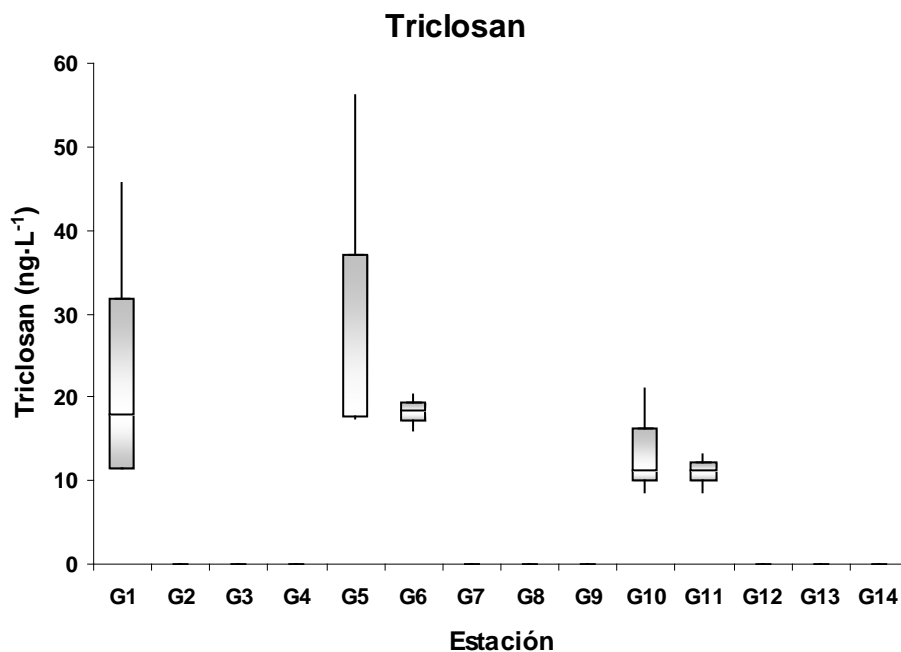


Figura 5-50. Diagrama de cajas y bigotes para el triclosan.

- Tris-cloroetilfosfato

El tris-cloroetilfosfato es un compuesto orgánico utilizado como retardante de llama en materiales plásticos como el poliuretano que puede aparecer en efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas. También se puede encontrar en zonas agrícolas donde los plásticos se utilizan en invernaderos. En el estuario del río Guadalquivir para el periodo de estudio se ha encontrado una concentración máxima de este compuesto para la estación G11 en noviembre de 2008 (84,00 ng·L<sup>-1</sup>), mientras que el valor mínimo aparece para el punto G10 en abril de 2008 (13,61 ng·L<sup>-1</sup>) (Figura 5-51), siendo la agricultura la actividad mayoritaria en los alrededores de estos puntos.

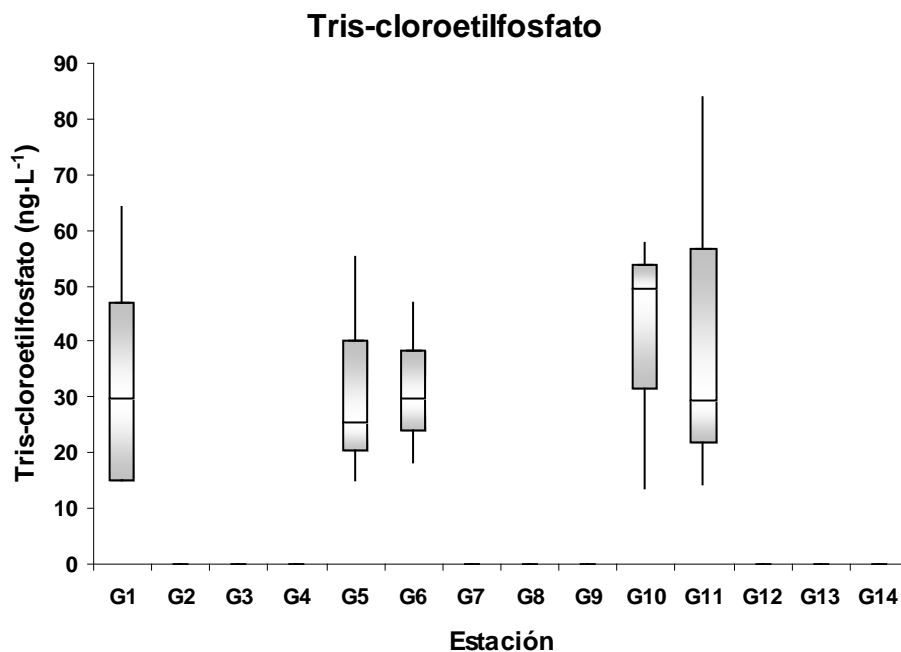


Figura 5-51. Gráfico de cajas y bigotes para el tris-cloroetilfosfato.

### Origen y carácter de la contaminación química en el estuario del río Guadalquivir.

El estudio de la concentración de contaminantes y su perfil en el estuario del río Guadalquivir es la primera etapa en el estudio de su comportamiento y origen. A continuación, es interesante establecer las relaciones entre los mismos, así como con los puntos de toma de muestra. Para poder llegar a estas relaciones es necesario el uso de herramientas estadísticas que ofrezcan información sobre su evolución espacio-temporal. En este estudio, se ha utilizado el análisis de la varianza (ANOVA) para detectar la existencia de diferencias significativas entre los muestreos realizados para una serie de variables. Cuando las diferencias han sido significativas se ha utilizado el test de Tuckey a posteriori para identificar donde se encuentran.

Con estos resultados, se plantea realizar el estudio de distribución espacial de contaminantes y sus relaciones, sin tener en cuenta los efectos temporales, salvo en los casos en los que se ha descrito anteriormente que estos tienen influencia sobre el comportamiento de los contaminantes en la línea del río. Así se han buscado relaciones entre las especies analizadas aplicando estudios de reducción de dimensiones para resumir la información mediante Análisis de Componentes Principales (ACP) y se han



establecido agrupaciones entre variables y muestreos para poder reconocer las distintas zonas del río y sus contaminantes característicos mediante análisis de conglomerados (AC).

La identificación de zonas contaminadas y la aplicación del análisis de agentes químicos propios de las mismas, permite el seguimiento y control de las actividades antropogénicas en los márgenes de los cursos de agua. A las sustancias que se pueden utilizar de esta manera se les conoce como trazadores. En este trabajo se ha estudiado la evolución del carácter como trazador de determinadas actividades humanas de una serie de parámetros previamente utilizados [2]; pero además se ha incluido otro conjunto de variables físico-químicas que se presentan como potenciales trazadores.

### 1. Análisis de la varianza

El análisis de la varianza que se ha realizado es el ANOVA factorial, teniendo en cuenta dos factores: el espacio y tiempo. De estos factores el más interesante es el temporal, ya que permite establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre muestreos, que como se han realizado al final de las estaciones húmeda y seca, también debe permitir establecer diferencias en este sentido.

El análisis factorial de la varianza permite establecer la existencia de diferencias significativas entre dos distribuciones de datos gobernadas por distintos factores. En este caso como se ha comentado, el tiempo y el espacio. En el caso del ANOVA se utiliza el estadístico F como referencia para comprobar si se cumple la hipótesis nula, que consiste en que no existen diferencias significativas entre las poblaciones comparadas. Para poder realizar el ANOVA es necesario que la distribución de los datos a analizar cumpla una serie de condiciones como son (Ramis y García, 2001):

- Normalidad de la distribución: el ANOVA supone una distribución de los datos, lo que se puede comprobar mediante el test de Kolmogorov-Smirnov de forma que atendiendo a un nivel de significación superior al 95% se puede establecer que la distribución sigue una campana de Gauss. Cuando esto no se cumple, se pueden realizar transformaciones en los datos que permitan alcanzarla.
- Homogeneidad de varianzas: este es el otro supuesto de partida del ANOVA y se puede determinar mediante el test de Levene, que permite comprobar que la homogeneidad de varianzas mediante el estadístico  $W$ .

Cuando la distribución de las variables analizadas no cumple las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas, se han realizado las transformaciones matemáticas ( $\text{Ln}$ ,  $\sqrt{\quad}$ , etc.) oportunas para que los datos las cumplan. En los casos en los que estas transformaciones no han surtido su efecto, se ha recurrido a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis que es una prueba no paramétrica que se aplica para determinar la existencia de diferencias significativas entre distribuciones cuando no se cumplen los supuestos de partida del análisis de la varianza. En este caso la comparación se realiza entre las medianas de las distribuciones, mientras que para el ANOVA se trabaja con las medias. La  $H_0$  que se plantea es por tanto que no hay diferencias significativas entre las medianas y se utiliza como referencia la distribución  $\chi^2$ .

Cuando se determinan diferencias significativas entre grupos o casos en el ANOVA, se puede utilizar el test de Tuckey, donde la hipótesis nula que se plantea es que no existen diferencias entre las medias muestrales cuando se comparan a pares. En caso de existir estas diferencias se puede identificar entre que pares tienen lugar. En los casos en los que el ANOVA ha determinado la existencia de diferencias significativas para los diferentes muestreos se ha aplicado el test de Tuckey para identificarlas. Las diferencias significativas han sido marcadas con \*. En todos los casos, el nivel de significación mínimo para que se cumpla la  $H_0$  planteada se ha establecido en  $\alpha \geq 0,05$ .

El fundamento de ambos análisis y los resultados de las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas se encuentran recogidos en el ANEXO IV.

- pH:

Presenta distribución normal y homogeneidad de varianzas. Como se ha comprobado con anterioridad, existe cierta variabilidad entre muestreos en la zona alta del estuario. El ANOVA (Tabla 5-1) muestra la existencia de diferencias significativas entre estaciones de muestreo, como se desprende de la zona de valores mínimos en la zona urbana y máximos en los extremos del estuario. Por otro lado, las diferencias entre tomas de muestra quedan patentes en el test de Tuckey (Tabla 5-2), en particular entre los muestreos de febrero de 2007 y noviembre de 2008.

Tabla 5-1. Tabla ANOVA para el pH.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	4,588	13	0,352	8,83	0,000
Tiempo	0,376	3	0,125	3,14	0,0361

Tabla 5-2. Test de Tuckey para el pH.

Comparación	Diferencia
Abr 08 - Feb 07	-0,016
Abr 08 - Nov 08	0,185
Abr 08 - Oct 07	0,103
Feb 07 - Nov 08	*0,208
Feb 07 - Oct 07	0,120
Nov 08 - Oct 07	-0,082

- Oxígeno disuelto

El oxígeno disuelto presenta un comportamiento diferente entre el primer muestreo y el resto. Como se observó anteriormente, para la primera toma se encuentran por encima de las demás, coincidiendo con un episodio de Bloom algal en la zona alta del estuario. En cuanto a su tratamiento estadístico, la distribución de los datos recogidos es normal y existe homogeneidad de varianzas. La tabla ANOVA (Tabla 5-3) muestra que el nivel de significación es  $<0,05$  tanto para las estaciones de muestreo, como era de esperar, a la vista de la curva de distribución longitudinal de concentración, como para los muestreos. Así, se puede confirmar lo anteriormente expuesto, que la toma de muestra de febrero de 2007 difiere significativamente del resto (Tabla 5-4).

Tabla 5-3. Tabla ANOVA para OD.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	62,0973	13	20,299	21,56	0,000
Tiempo	145,067	3	11,159	11,62	0,000

Tabla 5-4. Test de Tuckey para OD.

Comparación	Diferencia
Abr 08 - Feb 07	*-3,124
Abr 08 - Nov 08	0,165
Abr 08 - Oct 07	0,096
Feb 07 - Nov 08	*3,288
Feb 07 - Oct 07	*3,221
Nov 08 - Oct 07	-0,068

- Sólidos en suspensión
  - Sólidos en suspensión totales

Como se ha observado en las gráficas correspondientes a la distribución espacio-temporal de SST, se aprecian diferencias entre los muestreos correspondientes al año 2007 y 2008. Partiendo de que se cumplen los supuestos de partida para la aplicación del ANOVA, se realizó el análisis y se puede observar como existen diferencias significativas tanto entre muestreos como entre puntos de toma ( $\alpha > 0,05$ ) (Tabla 5-5). Cuando se realizó el test de Tuckey a posteriori se corroboró la separación de las tomas de muestra en dos grupos, correspondientes a 2007 y 2008 (Tabla 5-6).

Tabla 5-5. Tabla ANOVA para SST

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	680666	13	226895	8,12	0,000
Tiempo	$1,241 \cdot 10^6$	3	95463	3,41	0,001

Tabla 5-6. Test de Tuckey para SST

Comparación	Diferencia
Abr 08 - Feb 07	*238,61
Abr 08 - Nov 08	-0,485
Abr 08 - Oct 07	*198,83
Feb 07 - Nov 08	*-239,09
Feb 07 - Oct 07	-40,42
Nov 08 - Oct 07	*-198,66

- Sólidos en suspensión volátiles

En este caso sólo se cuenta con datos procedentes de los tres últimos muestreos. Inicialmente se observó un nivel de concentración de SSV inferior para la toma de octubre de 2007, mientras que los dos siguientes muestreos se encuentran agrupados según las representaciones gráficas anteriores. Sin embargo, no se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre muestreos ( $\alpha > 0,05$ ), aunque sí entre estaciones de toma. Para que el ANOVA pudiese aplicarse se tuvo que utilizar la transformación a  $\ln(SSV)$ , ya que la concentración de SSV no cumplía las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas (Tabla 5-7).

Tabla 5-7. Tabla ANOVA para SSV

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	18,199	13	1,399	2,98	0,008
Tiempo	2,257	2	1,128	2,40	0,110

- Nutrientes

- Amonio

Existe una diferencia apreciable, como se puede observar en los gráficos de tendencia anteriores, entre el primer muestreo y los demás en cuanto a la concentración de  $\text{NH}_4^+$ . La existencia de diferencias significativas entre muestreos se ha analizado mediante el ANOVA, utilizando el Ln de la concentración de amonio (Tabla 5-8). Como se puede comprobar, existen diferencias significativas tanto entre muestreos como entre estaciones de muestreo. Estas diferencias se han analizado mediante el test de Tuckey y se confirma que responden a diferencias entre el primer muestreo y el resto (Tabla 5-9).

Tabla 5-8. Tabla ANOVA para amonio.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	26,041	13	2,003	3,21	0,003
Tiempo	12,997	3	4,332	6,94	0,000

Tabla 5-9. Test de Tuckey para amonio

Comparación	Diferencia
Abr 08 - Feb 07	*-1,160
Abr 08 - Nov 08	0,368
Abr 08 - Oct 07	0,157
Feb 07 - Nov 08	*1,528
Feb 07 - Oct 07	*1,317
Nov 08 - Oct 07	-0,211

- Nitrito

El nitrito ha mostrado sus mayores concentraciones en la zona urbana y para el muestreo de octubre de 2007. Para cumplir las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas necesarias para la realización del análisis de la varianza ha sido necesario realizar la transformación  $\sqrt{\text{NO}_2^-}$ . Tanto para la comparación entre muestreos como para puntos de tomas de muestra no se ha conseguido un valor de

$\alpha \geq 0,05$ , para el valor de F calculado, por lo que existen diferencias significativas entre los mismos (Tabla 5-10). El test de Tuckey ha mostrado que estas diferencias se encuentran entre las tomas de noviembre de 2008 y octubre de 2007 (Tabla 5-11).

Tabla 5-10. Tabla ANOVA para nitrito.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	1413,62	13	108,74	12,24	0,000
Tiempo	90,352	3	30,117	3,39	0,027

Tabla 5-11. Test de Tuckey para nitrito

Comparación	Diferencia
Abr 08 - Feb 07	-1,585
Abr 08 - Nov 08	0,843
Abr 08 - Oct 07	-2,398
Feb 07 - Nov 08	2,428
Feb 07 - Oct 07	-0,813
Nov 08 - Oct 07	*-3,242

#### - Nitrato

El nitrato muestra una tendencia temporal similar a la OD y amonio, con valores superiores en general para el primer muestreo. En cuanto a su comportamiento espacial existen concentraciones superiores en la zona media del estuario. En este caso, no ha sido necesario realizar ninguna transformación matemática para aplicar el ANOVA y se puede apreciar como existen diferencias estadísticamente significativas entre muestreos pero no entre estaciones de toma ( $F=1,07$ ;  $\alpha=0,412$ ) (Tabla 5-12). Las diferencias temporales significativas se encuentran entre el primer muestreo y el resto (Tabla 5-13).

Tabla 5-12. Tabla ANOVA para nitrato.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Estación	97,293	13	7,484	1,07	0,412
Muestreo	192,468	3	64,155	9,18	0,000

Tabla 5-13 Test de Tuckey para nitrato.

Comparación	Diferencia
Abr 08 - Feb 07	*-3,297
Abr 08 - Nov 08	2,030
Abr 08 - Oct 07	1,384
Feb 07 - Nov 08	*5,327
Feb 07 - Oct 07	*4,682
Nov 08 - Oct 07	-0,645

#### - Nitrógeno total disuelto

El nitrógeno total disuelto está influenciado en gran medida por el nitrato, como se discutió anteriormente. Sin embargo, se pueden apreciar en los gráficos de distribución espacio-temporal, valores superiores para la zona alta del estuario en el primer muestreo y en la zona final para el segundo, por lo que no se aprecian diferencias globales a simple vista. Esta variable ha tenido que ser estudiada mediante el test de Kruskal-Wallis, ya que ninguna de las transformaciones matemáticas realizadas ha permitido cumplir las condiciones de partida del ANOVA. En este caso se ha calculado un valor de  $\chi^2=12,687$  y  $\alpha=0,005$ , por lo que existen diferencias significativas entre muestreos.

#### - Fosfato

A lo largo del periodo de estudio se ha observado una disminución progresiva de la concentración general de fosfato en el estuario, en especial en la zona urbana. Al igual que para el nitrógeno total disuelto ha sido necesario recurrir a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis, obteniéndose un valor de  $\alpha=0,032$  para  $\chi^2=8,772$ , por lo que se establece la existencia de diferencias significativas entre muestreos.

- Metales

#### - Cobre

El cobre mostró diferencias apreciables tanto desde el punto de vista espacial como temporal. En cuanto al primero se observaron concentraciones mínimas en la zona urbana, y máximas en los extremos. En cuanto a las diferencias temporales hay una clara separación de las concentraciones registradas para 2007 y 2008, que al igual que para SST tienen origen en las lluvias de noviembre de 2007 y la apertura de la presa de Alcalá del Río. Como ocurre con NTD y  $\text{PO}_4^{3-}$  no se ha podido aplicar el ANOVA, y el test de Kruskal-Wallis ofrece un valor de  $\alpha < 0,05$  para un valor de  $\chi^2=23,085$ .

#### - Manganeso

Este metal ha mostrado sus mayores concentraciones en la zona urbana. Además se ha apreciado una reducción progresiva de la concentración desde el primer muestreo, mientras que en el resto del nivel de concentración se ha mantenido estable. Tal y como ocurre para el Cu no se cumplen las condiciones iniciales de aplicación del ANOVA, por lo que se ha aplicado el test de Kruskal-Wallis y se ha obtenido un valor

de  $\chi^2=1,023$  para  $\alpha=0,058$ , por lo que no existen diferencias significativas entre muestreos.

- Níquel

De igual forma que para variables como SST y Cu se han observado diferencias entre los muestreos de 2007 y 2008, en los gráficos de distribución espacio-temporal. Estas diferencias se han apreciado fundamentalmente en la zona urbana y la zona final para el muestreo de abril de 2008 y en general para el de noviembre de 2008. En este caso la transformación a Ln(Ni) ha permitido aplicar el ANOVA (Tabla 5-14) y establecer la existencia de diferencias significativas entre muestreos pero no entre estaciones de toma de muestra ( $\alpha=0,128$ ). Las diferencias significativas se encuentran, según el test de Tuckey, fundamentalmente entre los muestreos de 2007 y 2008 (Tabla 5-15).

Tabla 5-14. Tabla ANOVA para níquel.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	6,418	13	0,493	1,61	0,128
Tiempo	7,075	3	2,358	7,701	0,000

Tabla 5-15. Test de Tuckey para níquel.

Comparación	Diferencia
Abr 08 - Feb 07	0,442
Abr 08 - Nov 08	-0,285
Abr 08 - Oct 07	*0,696
Feb 07 - Nov 08	*-0,728
Feb 07 - Oct 07	0,253
Nov 08 - Oct 07	*0,982

- Cobalto

El cobalto presenta una clara definición espacial, con máximas concentraciones en la zona urbana que vienen corroboradas por los resultados del ANOVA (Tabla 5-16), mientras que para las distintas tomas de muestra no existen diferencias significativas a lo largo del estudio ( $\alpha=0,065$ ). Esto es interesante porque hace que el Co puede ser considerado un buen indicador de contaminación urbana, como se verá más adelante, con independencia de la época del año en la que se tomen las muestras. Para poder realizar el ANOVA ha sido necesario aplicar la transformación a logaritmo neperiano.



Tabla 5-16. Tabla ANOVA para cobalto.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	19,544	13	1,503	2,90	0,005
Tiempo	4,073	3	1,357	2,62	0,065

- Cinc

Del mismo modo que para OD, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> se han registrado niveles muy superiores en el primer muestreo, en comparación con el resto, sobretodo después de la zona urbana. En este caso ha vuelto a ser necesario utilizar la transformación a Ln(Zn) para poder aplicar el ANOVA y se han establecido diferencias significativas tanto para las estaciones de muestreo como para las tomas de muestra ( $\alpha < 0,05$ ) (Tabla 5-17). En el caso de las tomas de muestra se han establecido las fuentes de diferencia entre el muestreo de febrero de 2007 y los demás (Tabla 5-18).

Tabla 5-17. Tabla ANOVA para cinc.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	17,598	13	1,353	7,25	0,000
Tiempo	6,414	3	2,138	11,46	0,000

Tabla 5-18. Test de Tuckey para cinc.

Comparación	Diferencia
Abr 08 - Feb 07	*-0,992
Abr 08 - Nov 08	-0,163
Abr 08 - Oct 07	-0,318
Feb 07 - Nov 08	*0,828
Feb 07 - Oct 07	*0,673
Nov 08 - Oct 07	-0,155

- Plomo

Como se ha podido observar en los gráficos de distribución anteriores, existen diferencias entre zonas de muestreo, que se pueden comprobar en los valores máximos correspondientes a la zona urbana. En cuanto a las diferencias temporales, que no se observan claramente, se han confirmado mediante el ANOVA (Tabla 5-19), para el que ha sido necesario aplicar la transformación a Ln(Pb). El test de Tuckey muestra que las diferencias se deben al muestreo de octubre de 2007 (Tabla 5-20).

Tabla 5-19. Tabla ANOVA para plomo.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	10,899	13	0,837	4,78	0,002
Tiempo	3,214	3	1,071	6,12	0,000

Tabla 5-20. Test de Tuckey para plomo

Comparación	Diferencia
Abr 08 - Feb 07	-0,185
Abr 08 - Nov 08	0,012
Abr 08 - Oct 07	*0,473
Feb 07 - Nov 08	0,197
Feb 07 - Oct 07	*0,658
Nov 08 - Oct 07	*0,461

#### - Cadmio

Para el Cd se han observado dos zonas de claras diferencias de concentración, la primera en el inicio de la zona de estudio, con valores mínimos y la segunda, al final, con valores máximos. Es interesante observar que las mayores concentraciones registradas tanto al inicio como al fin del estuario se corresponden con el muestreo de abril de 2008, donde se encuentran valores máximos también para SST, Ni y Cu, como consecuencia de la apertura de la presa de Alcalá del Río. Como para otras variables ha sido necesario recurrir a la transformación a Ln(Cd) para aplicar el ANOVA (Tabla 5-21). El análisis de la varianza ha mostrado diferencias tanto entre estaciones de muestreo y tomas de muestra, que según el test de Tuckey tienen como principal fuente el muestreo de abril de 2008 (Tabla 5-22).

Tabla 5-21. Tabla ANOVA para cadmio.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	15,571	13	1,197	6,60	0,000
Tiempo	4,396	3	1,465	8,08	0,000

Tabla 5-22. Test de Tuckey para cadmio.

Comparación	Diferencia
Abr 08 - Feb 07	*0,574
Abr 08 - Nov 08	0,360
Abr 08 - Oct 07	*0,752
Feb 07 - Nov 08	-0,213
Feb 07 - Oct 07	0,177
Nov 08 - Oct 07	0,391

- Plata

La plata ha mostrado en sus perfiles de distribución, diferentes comportamientos temporales, sobretodo en el caso del muestreo de octubre de 2007, que aparece por encima del resto. Como se ha comentado anteriormente, las mayores diferencias aparecen en la zona urbana. Ninguna de las transformaciones matemáticas planteadas ha permitido cumplir las condiciones iniciales par la aplicación del ANOVA, por lo que ha sido necesario recurrir al test de Kruskal-Wallis, que ha ofrecido un  $\alpha=0,001$  para  $\chi^2=15,496$  para los muestreos, por lo que se demuestra la existencia de diferencias significativas entre los mismos.

- Carbono

- Carbono total disuelto

Para todos los muestreos salvo para el correspondiente a noviembre de 2008 se observan perfiles muy similares tanto en forma como nivel de concentración. La aplicación del ANOVA no ha requerido de transformación matemática alguna. El análisis de la varianza ofrece diferencias significativas entre muestreos, pero no entre estaciones de toma de muestra ( $\alpha=0,857$ ) (Tabla 5-23). Las diferencias observadas entre muestreos se localizan entre el de noviembre de 2008 y el resto, según el test de Tuckey (Tabla 5-24).

Tabla 5-23. Tabla ANOVA para carbono total disuelto.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	743,422	13	57,186	0,58	0,857
Tiempo	2469,81	3	823,272	8,29	0,000

Tabla 5-24. Test de Tuckey para carbono total disuelto.

Comparación	Diferencia
Abr 08 - Feb 07	1,964
Abr 08 - Nov 08	*-14,867
Abr 08 - Oct 07	0,696
Feb 07 - Nov 08	*-16,832
Feb 07 - Oct 07	-2,660
Nov 08 - Oct 07	*14,171

- Carbono inorgánico disuelto

Esta variable, como ya comprobó anteriormente, muestra un comportamiento muy similar al que se describió para el carbono total disuelto. Del mismo modo la aplicación

del ANOVA ha sido directa y se han descrito diferencias significativas entre muestreos pero no entre estaciones de toma ( $\alpha=0,828$ ) (Tabla 5-25). Las diferencias significativas observadas se encuentran también entre el muestreo de noviembre de 2008 y el resto (Tabla 5-26).

Tabla 5-25. Tabla ANOVA para carbono inorgánico disuelto.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	804,419	13	61,878	0,61	0,828
Tiempo	2315,23	3	771,743	7,64	0,000

Tabla 5-26. Test de Tuckey para carbono inorgánico disuelto.

Comparación	Diferencia
Abr 08 - Feb 07	2,826
Abr 08 - Nov 08	*-13,837
Abr 08 - Oct 07	-0,768
Feb 07 - Nov 08	*-16,664
Feb 07 - Oct 07	-3,595
Nov 08 - Oct 07	*13,069

- Carbono orgánico disuelto

El COD presenta un perfil de concentración algo diferente al de las dos variables anteriores con niveles de concentración más agrupados para todos los muestreos. En este caso la aplicación del ANOVA (Tabla 5-27) ha mostrado la existencia de diferencias significativas entre muestreos, pero no entre estaciones de muestreo ( $\alpha=0,196$ ). El test de Tuckey ha mostrado que estas diferencias se deben al muestreo de noviembre de 2008 (Tabla 5-28).

Tabla 5-27. Tabla ANOVA para carbono orgánico disuelto.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Significación
Espacio	16,814	13	1,293	1,41	0,196
Tiempo	16,217	3	5,405	5,91	0,002

Tabla 5-28. Test de Tuckey para carbono orgánico disuelto.

Comparación	Diferencia
Abr 08 - Feb 07	0,409
Abr 08 - Nov 08	*-1,030
Abr 08 - Oct 07	0,072
Feb 07 - Nov 08	*-1,439
Feb 07 - Oct 07	-0,337
Nov 08 - Oct 07	*1,102

## 2. Análisis multivariante de los datos

El análisis multivariante de los datos se ha realizado para establecer la tendencia del comportamiento de los contaminantes a lo largo del estuario del río Guadalquivir. En este sentido, es interesante conocer tanto el agrupamiento de las variables y zonas de muestreo como las relaciones que existen entre ellas. El establecimiento de estas relaciones permite establecer el uso de ciertas variables con su origen. Si además es posible determinar las actividades que tienen lugar en los márgenes del río con el origen de los contaminantes, estos se podrán utilizar como trazadores de dichas actividades.

Estas relaciones se pueden establecer mediante el uso del análisis de componentes principales (ACP), que permiten resumir la información de la distribución de datos analizados para las variables objeto de estudio. Esta técnica permite establecer tendencias que no se aprecian a simple vista entre las variables y las estaciones de muestreo. Por otro lado se pueden establecer agrupamientos entre variables y zonas de muestreo de manera que objetos que tengan un mismo comportamiento aparecerán en un mismo grupo. Esto se consigue con el análisis de conglomerados (AC).

El requisito inicial para que se puedan llevar a cabo los análisis de componentes principales y clúster es la existencia de correlación entre variables. Fundamentalmente, es importante su existencia para la aplicación del ACP, ya que la información del análisis de correlaciones es la que se resume en este.

### 2.1. Análisis de correlación

Como paso previo al análisis multivariante de los datos se ha realizado un estudio de correlaciones para evaluar el grado de relación de las distintas variables, de este modo se puede comprobar si es necesario resumir la información ofrecida por la información de los datos, o si por el contrario no existe relación entre variables.

En este caso se ha realizado el estudio de correlación bivariada utilizando los coeficientes de correlación de Pearson para un nivel de confianza del 95%. Obteniéndose los resultados que se muestran a continuación (Tabla 5-29) [45].

En general se puede hablar de distintos comportamientos en función de los coeficientes de correlación observados. En primer lugar se aprecia una correlación positiva entre variables como pH, OD, conductividad, Cu, Cd, CID, CTD y Zn, lo que puede dar una idea de que siguen un patrón similar de distribución en la zona de

estudio. Esto también se ha apreciado en los estudios realizados utilizando los diagramas de cajas y bigotes, donde algunas de estas variables ofrecían valores de concentración máximos en cerca de la desembocadura

Por otro lado, correlacionados con estos pero con distinto signo, es decir, mostrando una tendencia contraria, se puede encontrar nutrientes como  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ , metales como Mn, Ni, Co y Pb, así como los sólidos en suspensión determinados para el año 2008. Finalmente, otras variables como Ag, SST y SSV para el año 2007, aparecen correlacionadas entre sí pero no con el resto de variables.

También se puede destacar la correlación entre el COD y CTD y CID, mientras que el NTD no aparece correlacionado con ningún nutriente nitrogenado, aunque sí lo hace con el COD, lo que no muestra una dependencia clara de la distribución del NTD con relación a las especies nitrogenadas inorgánicas.

Para resumir esta información y encontrar tendencias que permitan establecer relaciones tanto entre variables como entre puntos de muestreo se ha utilizado el análisis de componentes principales.

## 2.2. . Análisis de componentes principales

Este tipo de análisis multivariante consiste en resumir la información registrada durante los análisis para que su lectura y comprensión sea más sencilla, además de permitir el establecimiento de tendencias entre las mismas y con los puntos de muestreo que no resultan evidentes a simple vista, así como las fuentes de varianza a las que obedecen.

Hay que tener en cuenta que si se considera el número total de variables estudiadas  $N$ , se cuenta con  $N$  dimensiones, por lo que la información resulta inabordable y su estudio conjunto no es posible. El estudio de ACP consiste en reordenar la información en un número  $M$  de nuevas variables inferior a  $N$ . De esta forma la interpretación de los datos es más sencilla, aunque no hay que perder de vista que al resumir la información parte de la misma se pierde en el proceso. De esta forma se realiza la reducción de dimensiones teniendo en cuenta que la varianza de la distribución de datos original (en el nuevo espacio) que quede explicada sea la mayor posible.



Al realizar una reducción de dimensiones, en el nuevo espacio, se produce el agrupamiento de las variables estudiadas, que tienen un mayor peso en cada uno de los nuevos ejes de este espacio. Cada uno de estos ejes se conoce como componente principal ( $CP_n$ ) y se obtiene como combinación lineal de las variables analizadas. El hecho de que un grupo de variables aparezca representado por un componente principal concreto permite establecer que están controladas por un factor común, ya sea en el mismo sentido o en el contrario.

Para el ACPs se han empleado los datos obtenidos del análisis de parámetros físico-químicos, metales, nutrientes, sólidos en suspensión, especiación de carbono y nitrógeno total. Los resultados recogidos del análisis de compuestos orgánicos no se han utilizado debido al menor número de datos disponibles.

Como se ha demostrado anteriormente mediante el ANOVA, no existen variaciones temporales estacionales en la distribución de contaminantes, aunque se han establecido para algunas variables, diferencias entre los años 2007 y 2008. Por lo tanto se han realizado los ACPs utilizando datos medios para todo el periodo de estudio, salvo para el caso de los sólidos en suspensión totales, para los que las mencionadas variaciones en el nivel de concentración, han mostrado tener influencia en la forma de la distribución a lo largo del río Guadalquivir.

Como los valores de las concentraciones medias de los distintos contaminantes estudiados presentan órdenes de magnitud diferentes se plantea la cuestión de tratar los datos antes de realizar los análisis, para evitar las desviaciones en la distribución que esto pudiera producir. Para esto se ha realizado la tipificación de los datos a la escala Z, obteniéndose un conjunto de variables estandarizadas, lo que se ha conseguido tomando la media de la concentración para cada variable estudiada como centro de la distribución y dividiendo, la diferencia entre cada valor y la media por su desviación estándar [45].

A partir de esta nueva matriz de datos se establecen los nuevos ejes o vectores que forman el nuevo espacio en el que se distribuyen las variables. La idea fundamental es realizar combinaciones lineales de los datos originales estandarizados que describen la muestra, de forma que las nuevas variables generadas no se encuentren correlacionadas entre sí y los  $CPs$  sean ortogonales. De este modo se obtienen unos vectores ortogonales en un nuevo espacio rotado mediante lo que se conoce como rotación propia y cada uno de las variables originales tiene unas coordenadas en este nuevo espacio que se conocen



como puntuaciones. El cálculo de los *CPs* se realiza a partir de la suma ponderada de las variables originales  $X_i$  (Ecuación 5-1).

$$\begin{aligned}
 CP_1 &= a_{11} \cdot X_1 + a_{12} \cdot X_2 + \dots + a_{1N} \cdot X_N \\
 CP_2 &= a_{21} \cdot X_1 + a_{22} \cdot X_2 + \dots + a_{2N} \cdot X_N \\
 &\dots \\
 CP_N &= a_{N1} \cdot X_1 + a_{N2} \cdot X_2 + \dots + a_{NN} \cdot X_N
 \end{aligned}$$

Ecuación 5-1

Aunque esto pudiera suponer que no se resume la información, también se generan los nuevos ejes o *CPs* de forma que el primero que se define explique la mayor parte de la varianza de la distribución inicial, el segundo la siguiente parte de mayor proporción y así sucesivamente. De esta forma se obtendrían  $N$  componentes principales, cada uno de los cuales explica un porcentaje de la varianza total del sistema. Procediendo de esta forma se escoge un número determinado de *CPs*, inferior a  $N$ , por lo que se pierde parte de la información explicada. En este momento se debe establecer una situación de compromiso en la que se asume la cantidad de información que se puede perder para resumir la matriz de datos inicial manteniendo la representatividad de los resultados, por lo que la adición de un nuevo componente no debe suponer un aumento considerable en el porcentaje de varianza explicada por el nuevo espacio.

El valor de ponderación de cada variable en cada componente se conoce como carga ( $a_{ij}$ ) y su valor da una idea del grado de definición de cada variable en un componente determinado. En este trabajo se ha considerado un valor mínimo de 0,7 para definir que una variable se encuentra explicada por un componente. La selección de los *CPs* debe realizarse de forma que el primero de ellos explica la mayor cantidad posible de la varianza del sistema. Para cuantificar este aspecto se usan los autovalores ( $\lambda_i$ ), que corresponden al porcentaje de la varianza que se encuentra explicada por cada *CP*, considerándose generalmente que los *CPs* cuyo autovalor sea superior a la unidad deben tenerse en consideración para que el nuevo espacio rotado sea representativo de la muestra inicial.

De esta forma, y una vez establecidas las nuevas variables o *CPs* se pueden calcular las puntuaciones de cada objeto o muestra, mediante la sustitución de los valores correspondientes a las variables tipificadas en la ecuación ( $u_{ij}$ ) (Ecuación 5-1).

En ocasiones, la generación de este espacio rotado no ofrece resultados claramente diferenciadores del comportamiento de las variables, es decir, estas no están

bien definidas en un determinado componente, sino que sus cargas son similares en varios de ellos. Para solucionar este problema se puede recurrir al uso de rotaciones adicionales, para intentar llegar a una solución más simple, con una mejor separación de la información. Existen dos tipos de rotaciones adicionales, las ortogonales, como la Varimax, que es la más utilizada y las oblicuas, que permiten la correlación entre componentes rotados.

- Rotación propia

En primer lugar se realizó el análisis como se ha descrito anteriormente utilizando la rotación propia, es decir, llevando a cabo una primera rotación del espacio formado por las distintas variables en los puntos de toma de muestra. Para seleccionar el número de componentes a utilizar para resumir la información se valoró el porcentaje de varianza explicada por cada uno de ellos. El criterio que se siguió para su elección fue que su autovalor fuera mayor que 1 (Tabla 5-30).

Tabla 5-30. Selección del número de CPs utilizados para la rotación propia

Componente	Autovalor	% de la varianza explicada	% acumulado de la varianza explicada
1	10,340	44,95	44,95
2	3,300	14,34	59,30
3	2,641	11,48	70,79
4	1,706	7,41	78,21
5	1,311	5,70	83,91
<b>6</b>	<b>1,124</b>	4,88	<b>88,80</b>
7	0,688	2,99	91,78
8	0,556	2,41	94,20
9	0,483	2,10	96,30
10	0,383	1,66	97,96
11	0,292	1,26	99,23
12	0,108	0,47	99,70
13	0,068	0,29	100,00

Se puede observar cómo el primer componente es el que explica la mayor parte de la varianza de la distribución de los datos, así como que el incremento es cada vez menor al aumentar el número de componentes. Tomando como criterio el autovalor, se puede comprobar que con 6 componentes se explica un 88,80% de la varianza del sistema. A continuación, en la Tabla 5-31 se muestran las cargas de cada variable para los seis componentes seleccionados.

Tabla 5-31. Cargas de las variables físico-químicas en el espacio rotado.

Variable	Componente					
	1	2	3	4	5	6
pH	<b>0,959</b>	-0,228	0,004	0,083	-0,071	-0,022
Salinidad	<b>0,828</b>	-0,381	-0,088	0,110	0,179	0,157
DO	<b>0,885</b>	0,072	-0,021	0,059	-0,378	-0,130
SST-07	0,387	<b>0,825</b>	-0,077	0,076	-0,030	0,130
SST-08	-0,199	0,355	-0,322	0,525	0,046	-0,625
SSV-07	-0,143	<b>0,727</b>	-0,055	0,212	-0,300	0,416
SSV-08	-0,447	0,471	0,296	0,323	0,396	-0,076
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	<i>-0,514</i>	0,068	<i>-0,523</i>	0,040	-0,330	0,214
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	<i>-0,521</i>	-0,242	<i>0,566</i>	0,287	-0,318	-0,004
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	-0,158	0,027	-0,383	0,534	<i>0,637</i>	0,224
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<b>-0,802</b>	-0,249	0,457	0,065	0,136	0,209
Cu	<b>0,876</b>	0,179	-0,171	0,222	-0,055	-0,046
Mn	<b>-0,836</b>	-0,254	0,274	0,202	0,119	0,222
Ni	<i>-0,638</i>	0,017	-0,554	-0,421	0,049	0,136
Co	<b>-0,886</b>	-0,118	0,239	-0,051	-0,123	0,016
Zn	0,495	<i>-0,277</i>	<i>-0,640</i>	-0,059	0,102	0,234
Pb	<b>-0,750</b>	0,348	-0,166	-0,389	0,163	0,050
Cd	<b>0,904</b>	-0,347	-0,096	0,111	0,066	0,081
Ag	0,495	<i>0,577</i>	0,303	0,287	-0,163	0,372
CID	<b>0,861</b>	-0,104	0,342	-0,118	0,153	0,176
CTD	<b>0,862</b>	-0,041	0,381	-0,158	0,175	0,132
COD	<i>0,524</i>	0,348	0,457	-0,336	0,236	-0,178
NTD	-0,216	<b>-0,720</b>	-0,063	0,456	-0,188	0,064

En negrita aparecen las cargas superiores a 0,7, mientras que en cursiva se observan las cargas de variables representadas de forma apreciable por más de un componente.

Se observa cómo hay una serie de variables que aparecen bien definidas en el primer y segundo componente, siguiendo el criterio de que su carga sea superior a 0,7. Así se puede observar que en el *CP1* aparecen explicadas por un lado parámetros como pH, salinidad, OD, Cu, Cd, CID y CTD con signo positivo y por otro NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, Mn, Co y Pb con signo negativo. El hecho de que estas variables estén explicadas en el mismo componente con diferente signo muestra que tienen un comportamiento opuesto en el estuario, en cuanto a lo que se refiere a su distribución espacial. Cabe recordar que el primer grupo presentaba concentraciones crecientes al aumentar la salinidad, mientras que el segundo ofrecía concentraciones máximas en la zona urbana. Por otro lado, en el *CP2* se encuentran explicados los sólidos en suspensión, tanto totales como volátiles para 2007 con signo positivo, de forma opuesta al nitrógeno total disuelto.

Como se observa, a partir del *CP3* no aparece ninguna vinculación de variables originales, apareciendo las restantes variables asociadas a más de un componente principal.

En el siguiente gráfico de saturaciones se muestra la representación de las cargas de los dos componentes principales y las puntuaciones para los puntos de muestreo (Figura 5-52). En cuanto a las puntuaciones de los puntos de toma de muestra, se observa un agrupamiento en el primer componente tanto de las correspondientes a la zona urbana con signo negativo (*G2-G8*) como de las zonas extremas (*G1* y *G12-G14*), siendo el *CP2* el que contiene la mayor peso de las estaciones de la zona central (*G9-G11*).

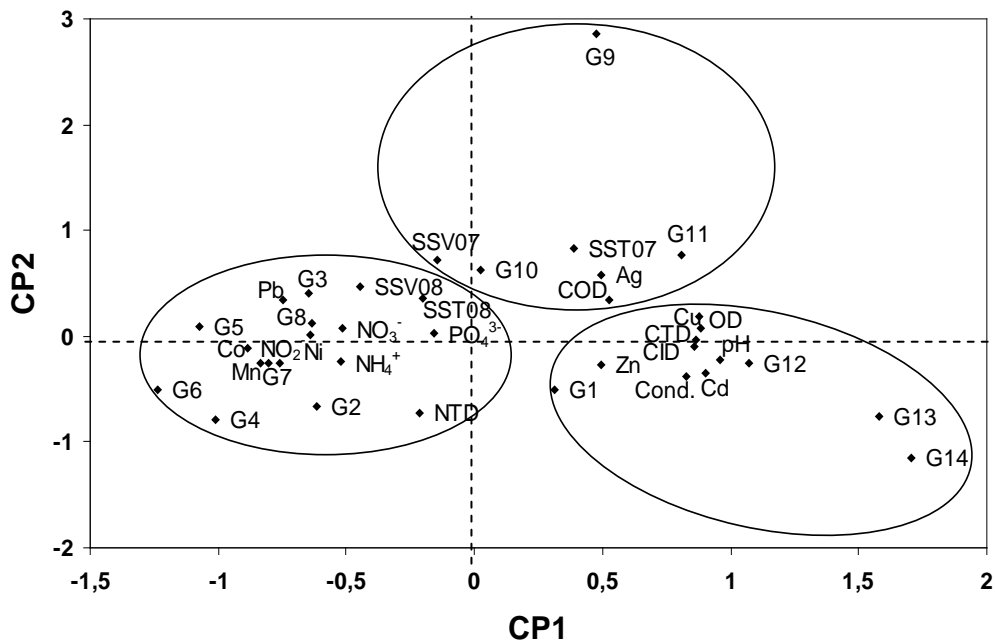


Figura 5-52. Gráfico de saturación para el ACP utilizando la rotación propia

Como se puede extraer de la representación gráfica, aparecen tres grandes grupos de comportamientos que afectan tanto a variables como a puntos de toma de muestra. En primer lugar se observa un agrupamiento formado por las estaciones de muestreo *G2-G8*, en lo que se puede considerar como el área de influencia urbana, donde también aparecen contaminantes como  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , Mn, Pb, Co, Ni y sólidos en suspensión tanto totales como volátiles para el año 2008. Un segundo grupo se presenta

formado por las estaciones de muestreo de la zona central del río, desde la G9 a la G11, que incluye a variables como COD, Ag y sólidos en suspensión de los dos tipos analizados en 2007; en lo que se puede considerar como una zona agrícola. La presencia de Ag no queda clara, ya que su asociación con variables y zonas agrícolas no ha sido descrita anteriormente. Para esclarecer su origen se han utilizado los datos de concentración en los afluentes y las precipitaciones durante en el periodo de estudio, como se verá posteriormente.

Por último se aprecia un tercer grupo, que abarca la zona final del estuario (G12-G14) y la estación inicial, junto con la salinidad, pH, OD, Cu, Cd, Zn y carbono total e inorgánico disueltos.

Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Mendiguchía y col. [2], para las variables estudiadas en ese trabajo con algunos matices y la incorporación de nuevas variables. En el presente estudio, el comportamiento del Pb se muestra bien definido por el *CPI* con signo positivo y muy relacionado a estaciones urbanas. Por otro lado, el comportamiento de los sólidos en suspensión no deja de ser interesante, ya que los SST presentan en 2007 una distribución similar a la determinada en estudios anteriores [1]; sin embargo, para 2008 existe una distorsión de su distribución, que hace que aparezcan más relacionados a zonas urbanas. Este comportamiento es consecuencia de las lluvias que tuvieron lugar en noviembre de 2007 que provocaron un aumento de la escorrentía de gran magnitud, así como de la apertura de la presa de Alcalá del Río en la zona alta del estuario a raíz de las mismas.

En cuanto a la incorporación de nuevas variables, se observa que su reparto en el diagrama de saturación de los componentes está de acuerdo con el estudio descriptivo de distribución a lo largo del recorrido muestreado. Así, la Ag y el COD muestran un comportamiento asociado a la zona agrícola del río, pero con cierta tendencia a aproximarse al grupo formado por el estuario. Mejor definido se encuentra el comportamiento de CTD y CID, que presentan clara vinculación con el estuario. En cuanto a la zona urbana, se localiza el NTD que se agrupa junto con los nutrientes inorgánicos y se puede considerar dominado por el  $\text{NO}_3^-$ . Finalmente, con un comportamiento similar al de los sólidos totales, aparecen los sólidos volátiles que para 2007 aparecen asociados a zonas agrícolas. Para esta variable, en 2008 se observa un desplazamiento hacia la zona urbana en el gráfico de saturación.

La información que se ha extraído de la aplicación de la rotación propia del espacio es de carácter general y permite distribuir las variables y los puntos de muestreo en tres grandes grupos. A pesar de esto, existe un gran número de variables que no muestra clara tendencia a ser explicada por ningún componente concreto y tienen sus cargas repartidas entre varios. Además se ha podido comprobar como sólo se aprecia una buena definición de variables en los dos primeros componentes, mientras que los otros no son representativos de ninguna. En esta situación se decidió realizar el ACP aplicando la rotación Varimax.

- Análisis de Componentes Principales: Rotación Varimax

Esta nueva rotación normal del espacio genera una matriz de cargas de los componentes en la que las cargas más altas se minimizan, pero las cargas bajas disminuyen hasta ser prácticamente nulas. En esta situación se simplifica la información y se produce una redistribución de algunas variables a ciertos componentes, que no se aprecia en la rotación propia. De esta forma se obtuvo la siguiente matriz de componentes (Tabla 5-32).

El primer rasgo que resulta interesante destacar es la separación de algunos grupos de variables, anteriormente definidas por un solo componente. Esta situación está ilustrada, en primer lugar, por las variables consideradas como urbanas y estuáricas. En cuanto a las primeras se encuentran  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , Co, Mn que están claramente relacionadas a la zona urbana, y se encuentran expresadas en el *CP2*, mientras que Ni y Pb que aparecen en el *CPI*, aparecen relacionadas a zonas urbanas-agrícolas. Para el caso de las variables propias del estuario y zonas no contaminadas, se produce una diferenciación entre pH, OD, salinidad, CTD, CID y Cd, propias de la desembocadura, que ofrecen una íntima relación con la salinidad y las variables Zn, Cu y COD, relacionadas con actividades que tienen lugar cerca de la desembocadura. En este sentido cabe destacar que el Zn tiene carácter estuárico con cierta tendencia urbana, mientras que la tendencia de Cu se liga a zonas agrícolas-estuáricas.

Tabla 5-32. Cargas de las variables estudiadas en los CPs para la rotación Varimax.

Variable	Componente					
	1	2	3	4	5	6
pH	<b>0,790</b>	0,562	-0,033	-0,043	0,136	-0,146
Salinidad	<b>0,698</b>	0,537	-0,157	0,036	0,287	0,154
DO	0,644	0,552	0,228	-0,051	-0,059	-0,419
SST-07	0,054	0,326	<b>0,767</b>	-0,365	-0,166	0,036
SST-08	-0,109	0,046	0,068	0,070	<b>-0,941</b>	0,169
SSV-07	-0,240	-0,073	<b>0,888</b>	0,072	-0,053	0,020
SSV-08	-0,164	-0,528	0,253	-0,297	-0,351	0,442
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-0,610	0,050	0,184	0,535	-0,055	-0,018
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,078	<b>-0,833</b>	-0,045	0,305	-0,037	-0,191
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	-0,062	0,088	0,033	0,190	-0,162	<b>0,916</b>
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	-0,287	<b>-0,873</b>	-0,188	0,143	0,201	0,200
Cu	0,610	0,637	0,284	-0,095	-0,124	-0,027
Mn	-0,329	<b>-0,788</b>	-0,156	0,306	0,106	0,291
Ni	<b>-0,912</b>	0,106	-0,149	0,166	0,119	0,084
Co	-0,521	<b>-0,732</b>	-0,147	0,204	0,002	-0,064
Zn	0,103	<b>0,781</b>	-0,125	0,260	0,245	0,194
Pb	<b>-0,888</b>	-0,236	0,044	-0,185	-0,004	0,106
Cd	<b>0,745</b>	0,591	-0,123	0,041	0,220	0,033
Ag	0,454	0,038	<b>0,818</b>	-0,188	0,080	0,001
CID	<b>0,735</b>	0,300	0,036	-0,370	0,410	-0,045
CTD	<b>0,720</b>	0,285	0,048	-0,458	0,384	-0,065
COD	0,341	0,089	0,102	<b>-0,800</b>	0,078	-0,156
NTD	0,216	-0,235	-0,372	<b>0,754</b>	0,011	0,090

Los componentes *CP3* y *CP4* ofrecen información sobre variables con comportamiento particular en la zona agrícola como SST-07, SSV-07 y Ag para *CP3* y COD y NTD para *CP4*. Las variables definidas con signo positivo en el tercer componente guardan relación con tendencias urbanas dentro de su grupo, mientras que el carbono orgánico lo hace hacia el agrupamiento con variables propias de la desembocadura. En cuanto al NTD cabe destacar que su carga en *CP4* tiene signo opuesto al de COD, lo que concuerda con los resultados representados en los diagramas de cajas y bigotes (Figura 5-42 y Figura 5-18).

En último lugar, las variables particuladas desde el vertido de la presa de Alcalá del Río (noviembre de 2007) y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> se encuentran representadas en los últimos componentes de forma independiente. Esto responde a que ambas presentan un comportamiento mixto dividido entre las zonas urbana y agrícola. Estos resultados quedan reflejados en el gráfico de saturaciones de cargas para las variables y puntuaciones para los puntos de toma de muestreo (Figura 5-53).

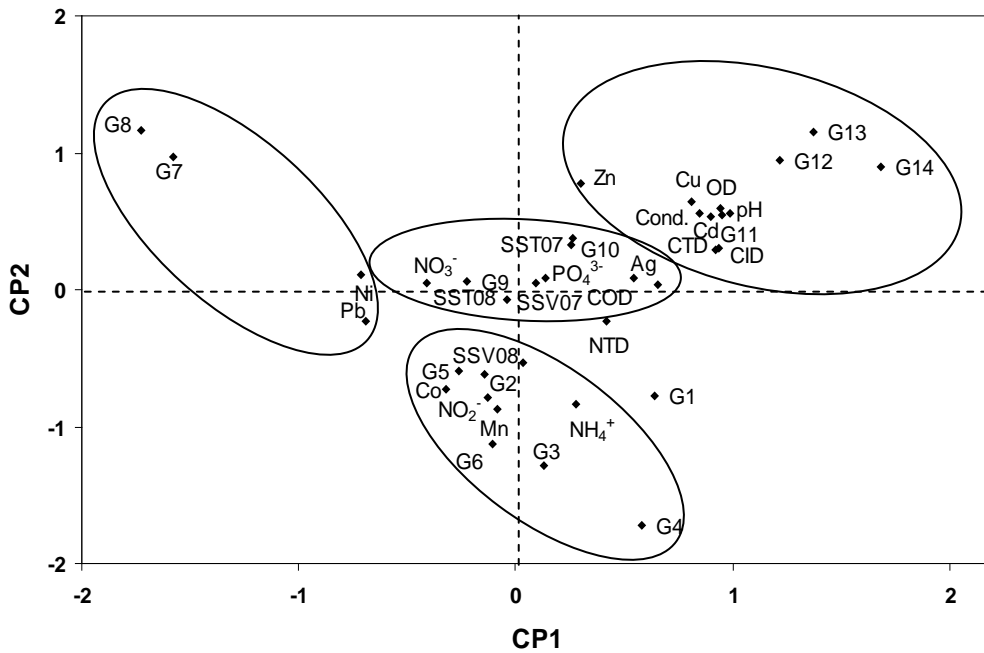


Figura 5-53. Gráfico de saturaciones para el ACP utilizando la rotación Varimax.

Como se aprecia en el gráfico de saturaciones los grandes grupos determinados utilizando la rotación propia se mantienen, pero además aparece uno nuevo relacionado con las estaciones de muestreo a la salida de la zona de influencia urbana e inicio de la parte agrícola (G7 y G8) que parece tener un comportamiento independiente. Estas estaciones de muestreo podrían asociarse a variables como Pb y Ni que presentaban valores de concentración elevados en estos puntos. Un estudio más profundo de esta zona podría ser utilizado en la identificación de alguna fuente puntual de estos metales en esa zona.

### 2.3. Análisis de conglomerados (AC)

El análisis de componentes principales ha permitido estudiar las tendencias de distribución de los contaminantes y las estaciones de toma de muestras en el río Guadalquivir. Para completar este estudio de establecimiento de origen de contaminantes y su posible uso como trazadores, se ha realizado un análisis clasificatorio utilizando la clasificación en conglomerados jerárquicos o análisis clúster (AC).



El AC consiste en agrupar las variables objeto de estudio en función de su similitud, de modo que se genera un esquema conocido como dendograma en el que la distancia entre variables similares será inferior que la de variables que se puedan considerar lejanas. Esta distancia entre las variables se mide como distancia Euclídeas o en línea recta, lo que se corresponde con el módulo del vector diferencia entre los vectores que representan las posiciones de dos variables. La similitud se obtiene mediante la siguiente ecuación (Ecuación 5-2) [46]. Además hay que tomar la decisión de si se estandarizan o no los datos, de forma que no exista una predominancia de unas variables sobre otras.

$$S_{kl} = 1 - \frac{d_{kl}}{d_{max}}$$

Ecuación 5-2

Donde  $d_{kl}$  es la distancia entre los objetos  $k$  y  $l$ ;  $d_{max}$  es la distancia entre los puntos más alejados de la nube de puntos.

Una vez que se miden las distancias que separan las variables se realizan los agrupamientos de las mismas, que pueden ser de dos tipos: jerárquicos y no jerárquicos [45]. Los métodos no jerárquicos evalúan toda la distribución de pares de variables y los clasifican en un número determinado de grupos, por lo que se asume un número inicial de grupos. Por ejemplo el método de k-medias empieza por dividir los grupos en k conglomerados y cada individuo se asigna al conglomerado con el centroide más próximo. Cuando un conglomerado pierde o gana un punto se recalcula la posición del centroide y así se continúa hasta que cada punto se encuentre en un grupo con el centroide más próximo. Los dos principales inconvenientes que presentan estos métodos son la elección previa del número de conglomerados y que el resultado final se ve afectado por la elección de los mismos.

En este trabajo se ha realizado un análisis de conglomerados jerárquicos, por lo que se considera en inicio que cada elemento forma un conglomerado de tamaño 1, se mide la distancia entre ellos y se compara. Los dos puntos que se encuentren más cerca se unen y forman un nuevo conglomerado, de esta forma se van combinando ente sí los conglomerados más próximos a menor distancia.

Existen varios métodos de análisis para conglomerados jerárquicos, que son el método del centroide, el de la unión simple, de unión completa, unión intragrupos, entre grupos y de Ward. En este caso se han seleccionado dos métodos, el método de la distancia mínima intergrupos y el método de Ward. El primero consiste en calcular la distancia como la media de las distancia entre todas las combinaciones posibles dos a dos de los elementos que forman los grupos. En el segundo se calcula la media de todas las variables para cada grupo, se calcula la distancia euclídea al cuadrado respecto a esta media y se suma para todos ellos. En cada paso, los conglomerados que se forman resultan en un menor incremento de la suma global de distancias al cuadrado dentro del conglomerado [47].

- Clasificación de las estaciones de muestreo

En primer lugar se ha realizado el análisis de agrupación de las estaciones de muestreo, de forma que se puedan definir las distintas zonas de influencia antropogénica del mismo. Se han aplicado tanto el método de las distancias mínimas ente grupos como el de Ward, para confirmar su validez. Los resultados que ofrece este análisis junto con los mostrados en ACP deben permitir el establecimiento de las variables físico-químicas como trazadores de ciertas actividades.

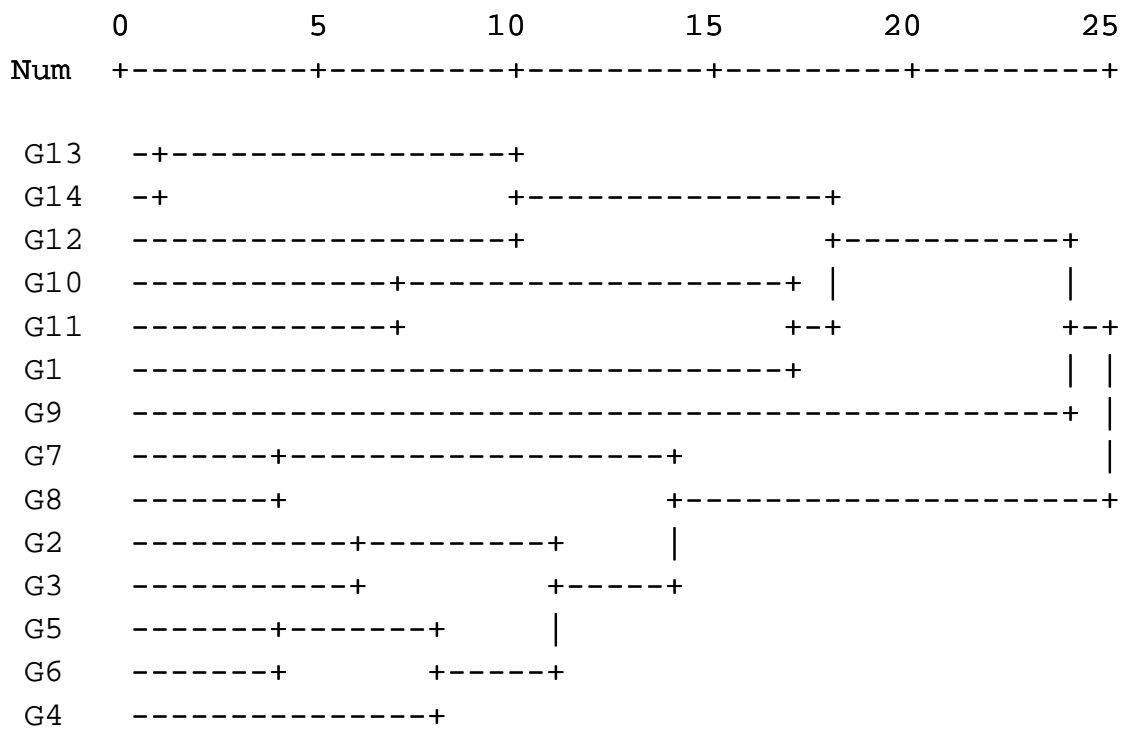


Figura 5-54. Análisis de conglomerados para las estaciones de muestreo por el método de la distancia mínima intergrupos.

Para el método de las vinculaciones mínimas entre grupos (Figura 5-54) se muestran dos grupos bien diferenciados. El primero correspondiente a la zona no salina del río y con mayor influencia urbana, con la excepción de la primera estación (G1). Dentro de esta zona se pueden diferenciar hasta tres partes distintas, una en la entrada de la misma (G2 y G3), donde la aparición de pequeñas poblaciones y la proximidad de Sevilla empieza a mostrar influencia, otra que comprende los puntos de muestreo G4-G6, en lo que supone el núcleo urbano de la ciudad y el último donde se localizan los puntos G7 y G8 en lo que es la zona en la que disminuye la presencia urbana y se inicia la influencia de actividades agrícolas. El otro gran grupo, engloba a las estaciones correspondientes a la zona salina del río, existiendo una clara diferenciación entre los puntos de muestreo G10-G11 por un lado y G12-G14 por otro, separándose la región agrícola y la desembocadura respectivamente. Para las estaciones G1 y G9 se puede ver que el agrupamiento no está bien definido y que aparecen agrupadas con las de la zona agrícola aunque tienen un comportamiento ligeramente independiente dentro del grupo, como ya se pudo ver en el ACP.

Para profundizar en las conclusiones ofrecidas por el agrupamiento de ciertas estaciones se ha aplicado también el método de Ward (Figura 5-55).

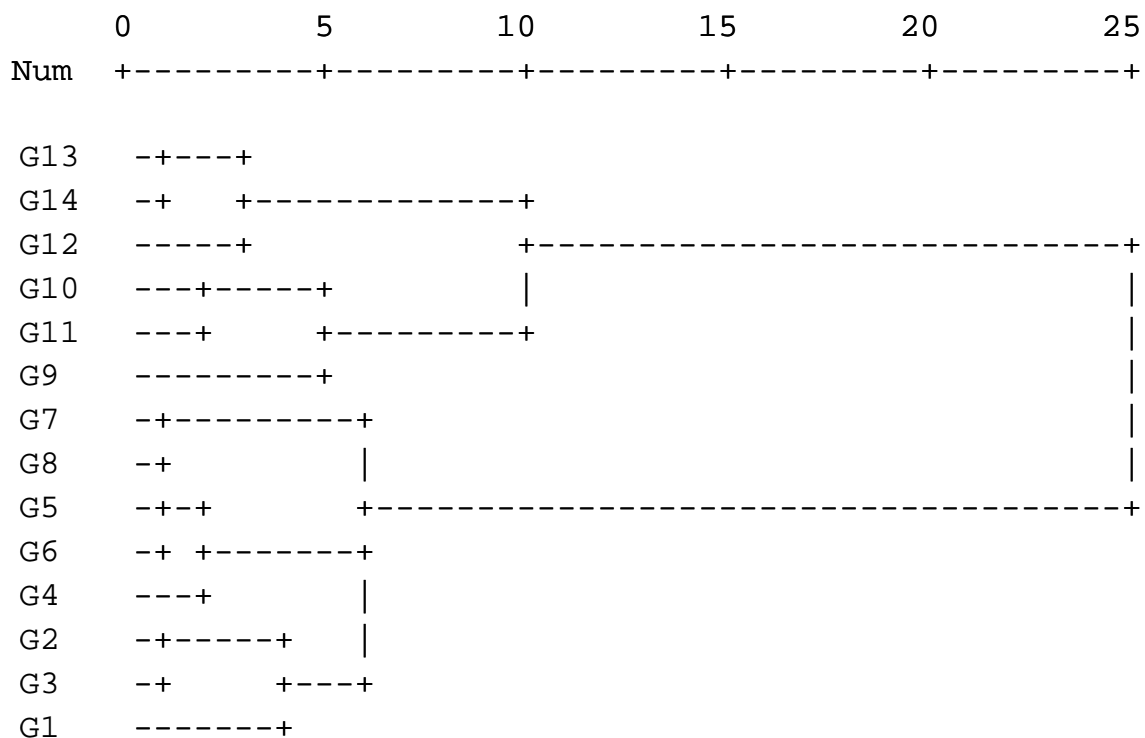


Figura 5-55. Análisis de conglomerados para las estaciones de muestreo utilizando el método de Ward.

Como primera observación, cabe destacar el comportamiento más homogéneo en este caso de las estaciones G1 y G9, así, de nuevo aparecen dos grandes grupos, formados por las estaciones no salinas (G1-G8) y otro con las salinas. En el caso de las primeras, se incluye en esta ocasión, como decimos, el punto G1, que muestra relación con las estaciones del inicio de la zona de influencia de Sevilla, pero está bastante alejada del resto de este grupo. Igual que para la vinculación intergrupos, aparece un núcleo claramente definido como urbano (G4-G6) y otro que marca el final de esta parte del estuario (G7-G8). En el lado contrario se aprecia un comportamiento similar al registrado utilizando el método anterior, con un grupo formado por las estaciones agrícolas G9-G11 y otro con las de la desembocadura (G12-G14). En esta ocasión el punto de muestreo G9 muestra una relación mayor con su grupo que la ofrecida para la distancia mínima intergrupos.

A la vista de los resultados obtenidos se pueden establecer en el estuario del río Guadalquivir tres zonas claramente diferenciadas. La primera es una zona urbana comprendida entre las estaciones G1 y G8, dentro de la que se distingue un núcleo que incluye a las tres estaciones de muestreo que se encuentran localizadas en Sevilla y dos zonas exteriores, aguas arriba (G1-G3) y aguas abajo (G7-G8). Por otro lado aparece una zona agrícola definida por los puntos de toma de muestra centrales (G9-G11), y finalmente, las estaciones G12-G14 pertenecen a la región de la desembocadura del río, con un carácter marino más acentuado. El análisis de conglomerados se ha realizado tanto incluyendo como excluyendo la salinidad de entre las variables utilizadas, obteniendo los mismos resultados en ambos casos tanto para la agrupación de variables como de estaciones.

- Clasificación de las variables físico-químicas

Una vez que se ha realizado la clasificación de las estaciones de muestreo y con el apoyo del ACP se ha considerado la agrupación de variables. Del mismo modo que para las estaciones de muestreo se han utilizado el método de la distancia mínima intergrupos y el de Ward.

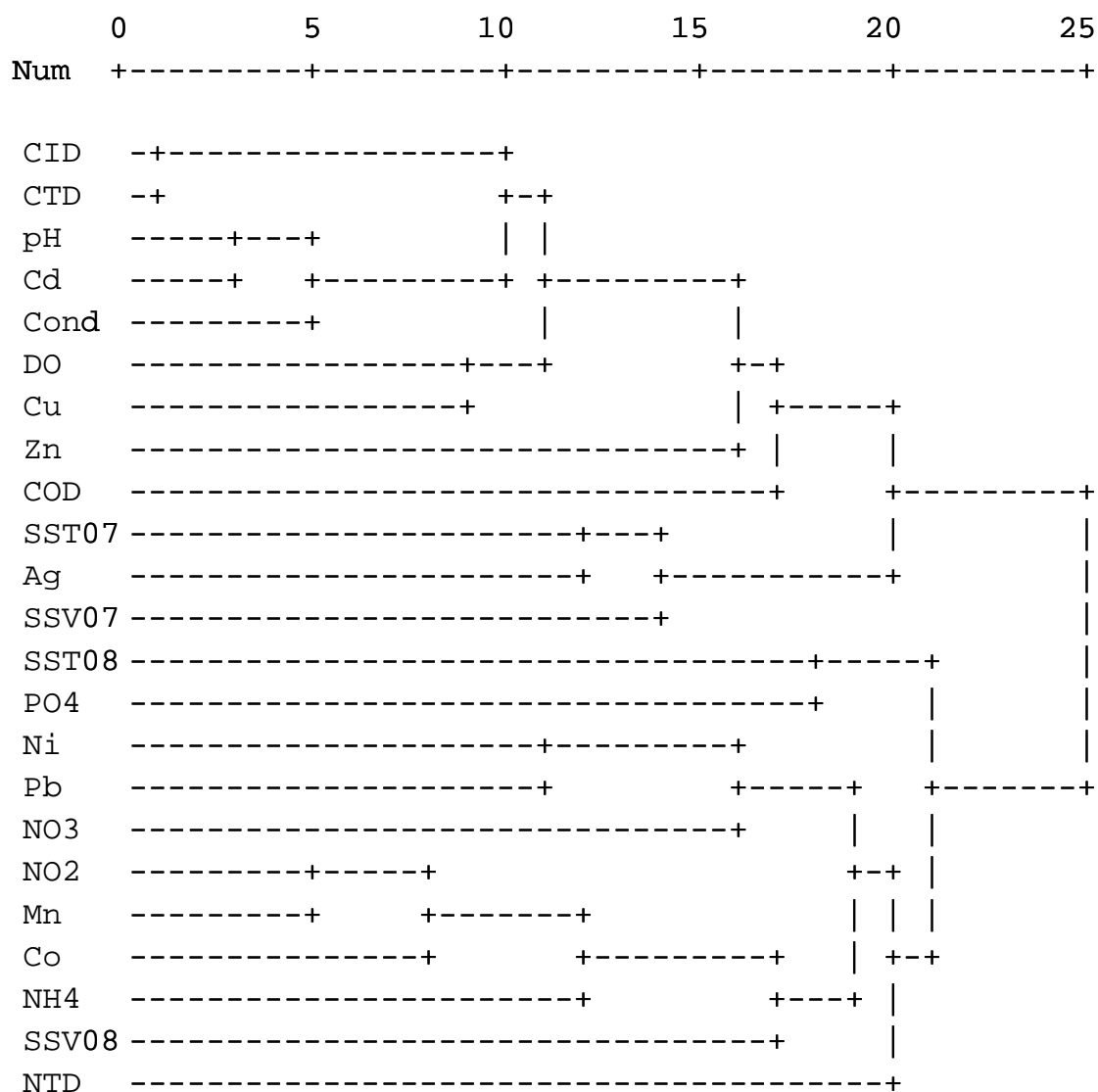


Figura 5-56. Análisis de conglomerados para las variables por el método de la distancia mínima intergrupos.

Los resultados de la aplicación del método de la distancia mínima intergrupos junto con los obtenidos en la clasificación de puntos de muestreo permiten una mejor interpretación de los ACP. Como primer rasgo cabe destacar la separación de las variables en dos grupos, que recordando los resultados de los análisis de componentes principales, permiten establecer dos conjuntos (Figura 5-54).

El primero contendría las variables de influencia esencialmente urbana y el segundo definiría al resto del estuario. En primer lugar aparecen variables asociadas a Sevilla, como Mn (procedente de los tratamientos de aguas) y  $\text{NH}_4^+$  (así como el  $\text{NO}_2^-$  procedente de él). Igualmente cabe destacar cómo, nuevamente, se asocia estrechamente a ellos el Co, abriendo con ello su posible utilización como trazador urbano.

Otras variables como Pb, Ni o  $\text{NO}_3^-$  y por lo tanto NTD, aparecen igualmente en este grupo, aunque algo diferenciadas, indicando con ello un posible origen mixto de las mismas, con cierta contribución agrícola.

Se confirman igualmente los comportamientos particulares de variables como NTD o  $\text{PO}_4^{3-}$ , ya señalados en el ACP, así como la aparición de SST para el año 2008, probablemente debido a su simple presencia en la zona durante los muestreos, ya que su procedencia se vincula, como ya se ha comentado, a la apertura de la presa situada en G1.

El segundo grupo lo forman las variables no urbanas y dentro del mismo se pueden distinguir tres subgrupos, en uno de los cuales se agrupan variables controladas por la entrada de aguas marinas procedentes del Golfo de Cádiz: Conductividad, OD, pH, CTD, CID, Cu y Zn; estas dos últimas también probablemente condicionadas por las actividades agrícolas y la naturaleza geológica de la desembocadura.

La aparición en otro grupo de los sólidos en suspensión y de COD puede relacionarse probablemente con las actividades agrícolas llevadas a cabo en la zona central del río, donde además también presenta cierta influencia el tráfico de buques. Agrupadas a ellas aparece la Ag, que se podría tener su origen en actividades industriales en la zona y el tráfico de fluvial.

El método de Ward ofrece algunos matices sobre los resultados mostrados por la distancia mínima intergrupos (Figura 5-57). Se siguen manteniendo dos grandes grupos de variables (urbanas y no urbanas), pero dentro de ellos existen algunas variaciones. Para las urbanas se muestra un agrupamiento de los SST-08 y SSV-08 con el  $\text{PO}_4^{3-}$ , definiendo un conglomerado, así como el NTD aparece asociado a las variables pertenecientes al núcleo urbano. Tanto Pb, Ni como  $\text{NO}_3^-$  ofrecen el mismo comportamiento para los dos métodos.

El segundo conglomerado refleja ciertas diferencias en Zn y COD, que aparecen claramente asociados a la desembocadura, mientras que la agrupación del resto de variables se mantiene.

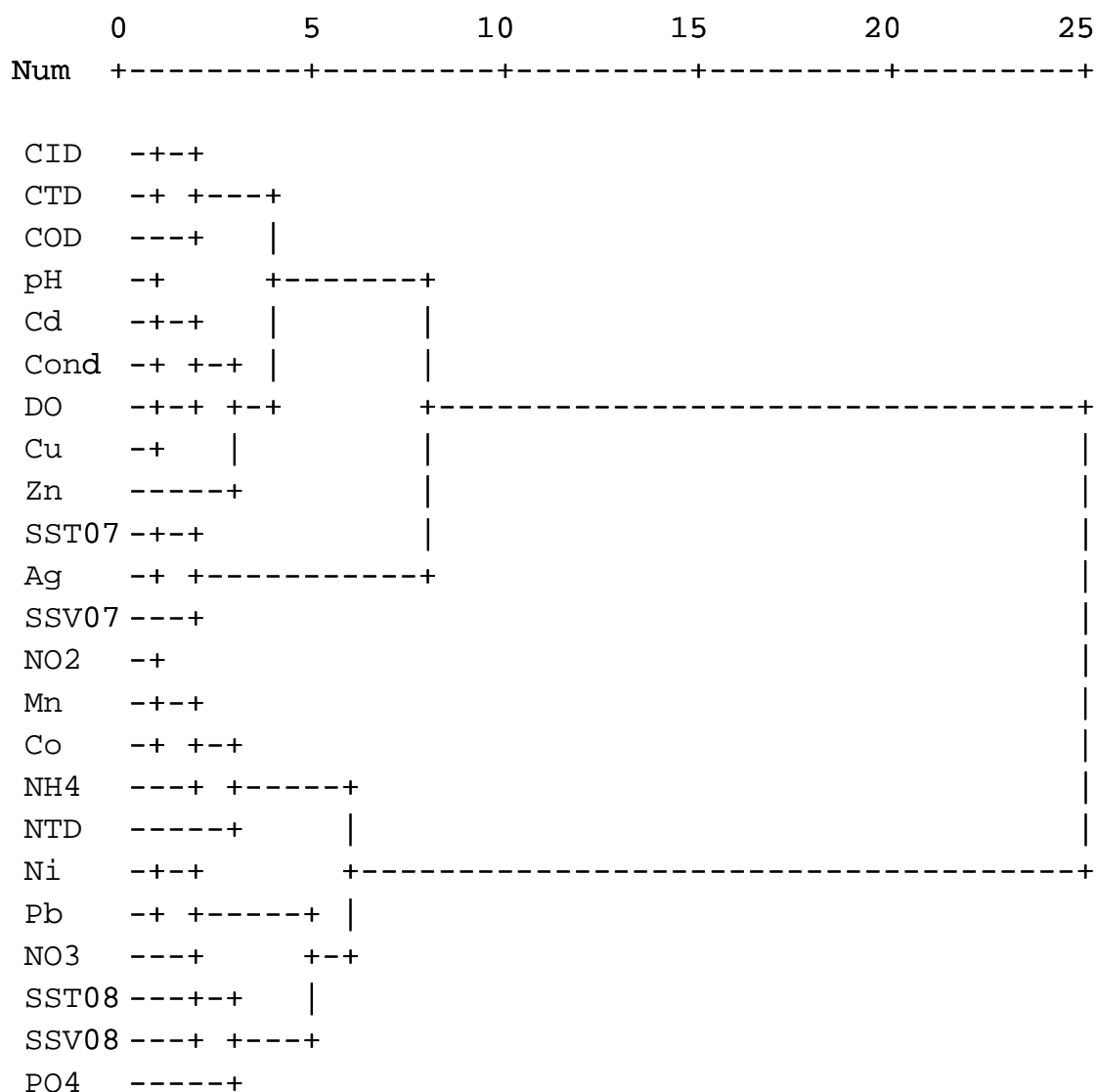


Figura 5-57. Análisis de conglomerados para las variables aplicando el método de Ward

Según la información extraída del análisis estadístico multivariante, se pueden distinguir tres grandes zonas de influencia humana sobre el estado de las aguas del estuario del río Guadalquivir. En primer lugar la zona urbana, que comprende Sevilla y sus alrededores, desde la población de la Algaba hasta Coria del Río y se encuentra caracterizada por contaminantes como los nutrientes nitrogenados,  $PO_4^{3-}$ , Mn, Co, Ni, Pb y durante 2008 también por SSV. Una segunda zona, de carácter agrícola, desde el punto G9 al G11, con COD y sólidos en suspensión, y finalmente una tercera parte que corresponde a la desembocadura y donde las variables dominantes son pH, salinidad, Cu, Cd, Zn, CTD, CID y OD. Dentro de esta división aparecen algunos

comportamientos intermedios como los que se han descrito para Ni y Pb, a caballo entre la zona urbana y la agrícola.

### Uso de Co como trazador de actividades urbanas

Como ha quedado de manifiesto anteriormente, la distribución de los contaminantes a lo largo de los sistemas fluviales guarda especial relación con las actividades que tienen lugar en los márgenes de los ríos. De entre las actividades más importantes se encuentran las relacionadas con zonas urbanas.

El estuario del Guadalquivir es un buen ejemplo de sistema afectado por zonas urbanizadas, debido a la presencia de la ciudad de Sevilla, que afecta al estuario prácticamente desde su origen. Además hay que tener en cuenta, como se ha descrito anteriormente, que los efectos de los vertidos urbanos de la ciudad de Sevilla pueden llegar de forma indirecta al estuario a través del río Guadaira, que es afluente del Guadalquivir.

Los trazadores, son sustancias que permiten relacionar su presencia y nivel de concentración a determinado tipo de actividades. En particular es fundamental para poder utilizar una sustancia como trazador, que se encuentre a bajas concentraciones de forma natural, para que pequeñas variaciones puedan ser detectadas y asociadas con actividades humanas.

En este sentido, el Co aparece como un potencial trazador de actividades antropogénicas debido a su bajo nivel de concentración a lo largo de todo el estuario, ya que se encuentra a niveles de los  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ , gracias a que sus niveles máximos se encuentran en la zona de influencia de Sevilla y debido también a que es un metal para el que los actuales tratamientos de aguas residuales urbanas no ofrecen rendimientos superiores al 20% en su eliminación [24,27], dando lugar a su vertido al medio.

Para el establecimiento de este metal como trazador de actividades urbanas se ha utilizado la información procedente de los apartados anteriores y se ha comparado su comportamiento con el de otras variables de reconocido carácter urbano como Mn,  $\text{NH}_4^+$  o  $\text{NO}_2^-$ . Además mediante la comparación con variables que no tienen origen urbano en este estuario, se ha podido cuantificar la influencia urbana en su perfil a lo largo de la zona de estudio.



## 1. Estudio de correlación

En primer lugar cabe destacar que el Co muestra su mayor nivel de concentración en la zona de máxima influencia urbana (Figura 5-28), coincidiendo además con el registrado para Mn,  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_2^-$ , mientras que este perfil es opuesto al de variables que se han definido como relacionadas con la desembocadura del río, como son la salinidad, Cd, pH y OD. Un factor a favor del uso de Co como trazador urbano es que no presenta diferencias significativas estacionales, como se ha descrito anteriormente, de forma que su aplicación no es dependiente de la época del año (Tabla 5-16).

Para confirmar la relación existente con variables urbanas y su distinto comportamiento con respecto a las asociadas a la desembocadura se ha realizado un estudio de correlación bivariada, utilizando los coeficientes de correlación Pearson para un  $\alpha=0,05$  ( $n=14$ ). Como se puede observar (Tabla 5-33) existe una correlación positiva del Co con Mn y  $\text{NO}_2^-$ , mientras que la correlación es negativa cuando se compara con salinidad, pH, OD y Cd.

Tabla 5-33. Tabla de correlación de Co con variables urbanas y relacionadas a la desembocadura.

Co	Co							
pH	-0,831	pH						
Cond.	-0,710	0,853	Cond.					
OD	-0,740	0,916	0,701	OD				
Mn	0,867	-0,739	-0,531	-0,791	Mn			
$\text{NH}_4^+$	-	-	-	-0,469	-	$\text{NH}_4^+$		
$\text{NO}_2^-$	0,761	-0,731	-0,558	-0,826	0,853	0,558	$\text{NO}_2^-$	
Cd	-0,522	0,892	0,96	0,513	-0,594	-0,539	-	Cd

Coefficientes de correlación de Pearson para  $\alpha=0,05$  ( $n=14$ )

## 2. Efecto de la contaminación proveniente del río Guadaira

Como se ha comentado anteriormente el río Guadaira transporta los efluentes procedentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales de la zona este de Sevilla. Teniendo en cuenta que el rendimiento de estas estaciones es bajo en cuanto a la eliminación del Co, se puede tomar como referencia para determinar su carácter urbano.

En la Figura 5-58 se puede apreciar que la concentración de Co disminuye considerablemente al abandonar el estuario la zona de influencia de Sevilla, pero que al llegar a la desembocadura del río Guadaira, el nivel de concentración vuelve a aumentar de forma importante, para volver a disminuir por efecto de dilución en el río. Este hecho apoya la hipótesis sobre el origen urbano del Co.

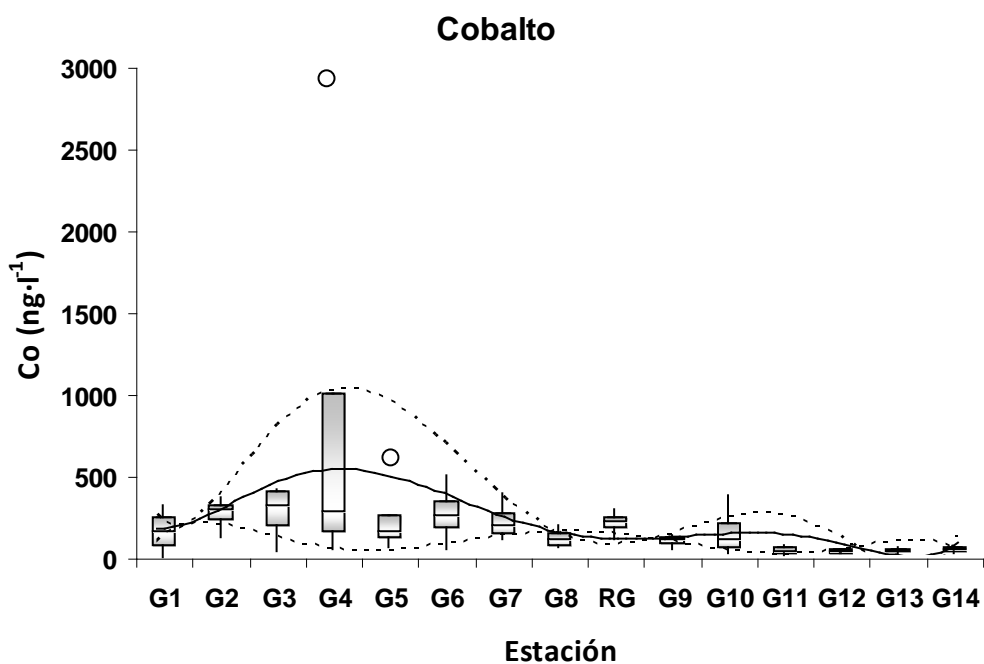


Figura 5-58. Gráfico de cajas y bigotes para el Co.

### 3. Análisis multivariante

En este caso se ha desarrollado un estudio de componentes principales centrado en las relaciones existentes entre el Co y las variables seleccionadas, de forma que se pueda evaluar su asociación a estas y a las estaciones de muestreo de la zona urbana. En este caso se ha realizado el análisis aplicando la rotación propia y se han obtenido dos *CPs* (Tabla 5-34).

Tabla 5-34. Componentes principales en el estudio del Co.

	Componente	
	1	2
pH	<b>0,93</b>	0,31
Salinidad	<b>0,83</b>	0,45
DO	<b>0,88</b>	0,05
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-0,65	0,57
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	<b>-0,90</b>	0,37
Mn	<b>-0,88</b>	0,35
Co	<b>-0,91</b>	0,05
Cd	<b>0,90</b>	0,39

Se puede comprobar que todas las variables salvo el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> aparecen claramente definidas en el *CPI*. Además se puede observar como el Co aparece con el mismo signo que NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y Mn, mientras que Cd, salinidad, pH y OD muestran signo contrario. El

siguiente gráfico de saturaciones (Figura 5-59) muestra una clara división en dos zonas, la primera que abarca las estaciones G2-G6, que constituyen la zona más afectada por Sevilla, representada por Co, Mn y  $\text{NO}_2^-$ . La segunda se asocia a la zona salina (G11-G14) donde se aprecian Cd, pH, salinidad y OD.

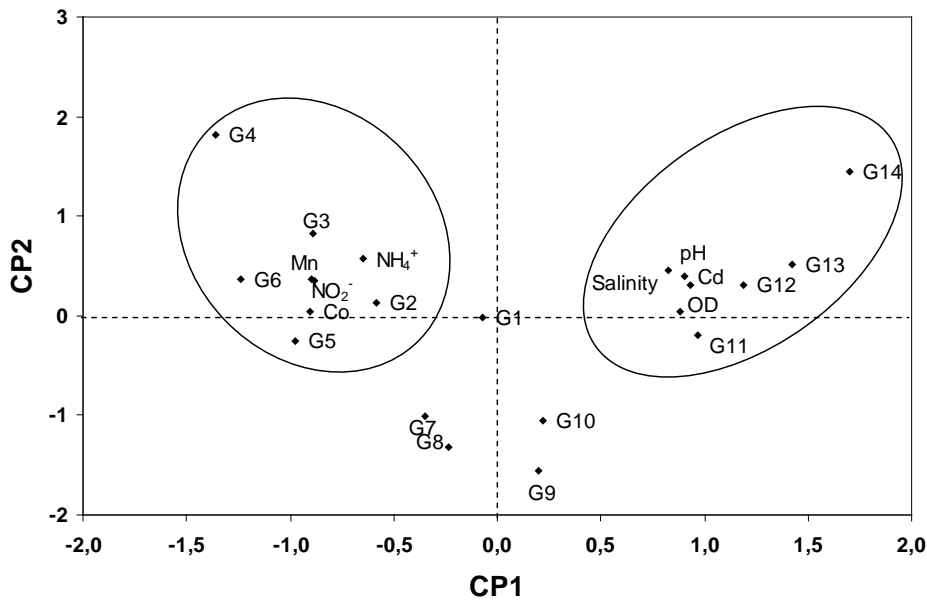


Figura 5-59. Gráfico de saturación

#### 4. Cuantificación de la influencia urbana en la concentración de Co

Para determinar la influencia que tienen los aportes externos sobre la concentración de Co se ha utilizado como recurso la relación que existe entre la variable que se utiliza como trazador de una actividad con otra variable que se encuentre a concentraciones naturales. Este recurso ha sido anteriormente usado para establecer el uso de Ag como trazador de actividades urbanas tomando como referencia al Pb en la Bahía de San Francisco [48].

En este caso se ha utilizado el Cd como referencia, por sus bajas concentraciones en la zona urbana y su aumento lineal con la salinidad, por lo que se puede pensar que su comportamiento es conservativo,  $R^2=0,93$  (Figura 5-60).

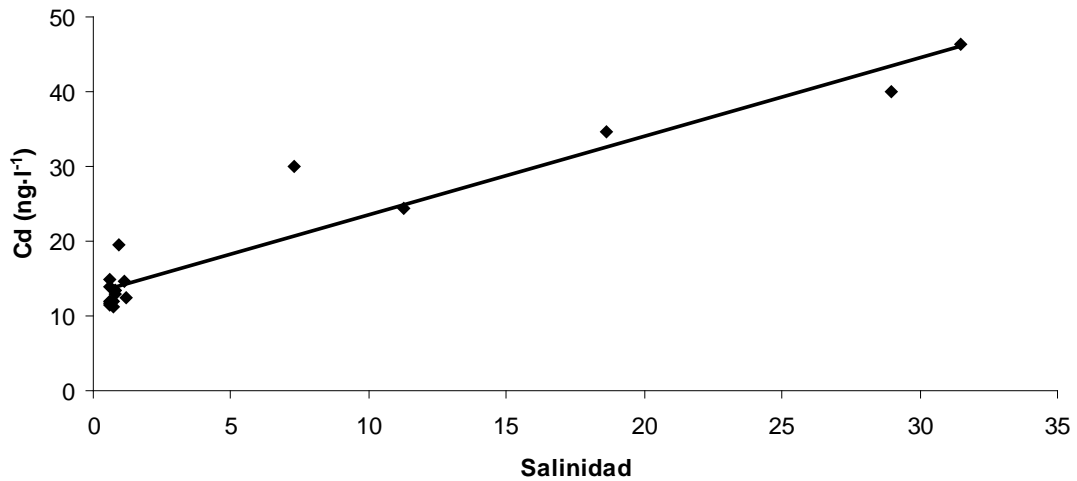


Figura 5-60. Crecimiento lineal de la concentración de Cd con la salinidad

Teniendo esto en cuenta se ha calculado la relación Co/Cd a lo largo del estuario del Guadalquivir y se ha observado un máximo en la zona de máxima influencia urbana (Figura 5-61). Como se aprecia, la relación Co/Cd disminuye al abandonar la zona urbana hasta que el estuario llega al río Guadaira, donde vuelve a aumentar, por efecto de la carga contaminante que arrastra. Se ha establecido como criterio para determinar que el nivel de Co está por encima del natural una relación Co/Cd= 6.

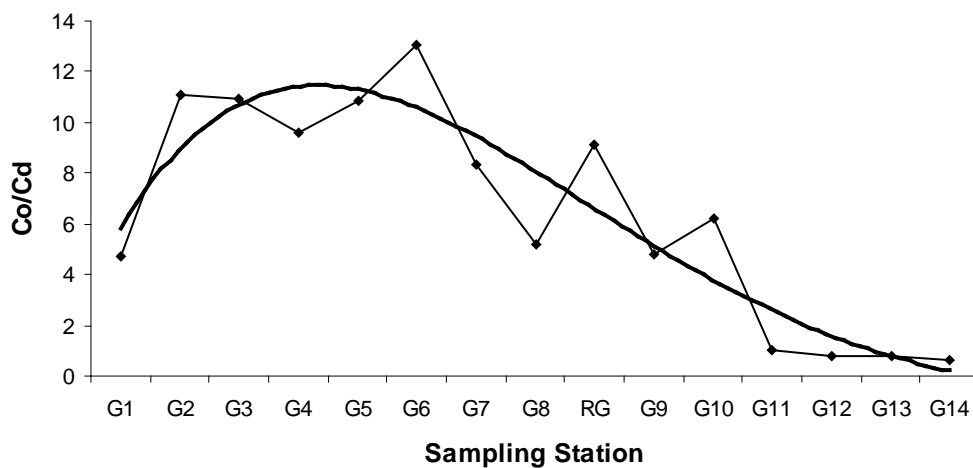


Figura 5-61. Relación de concentraciones Co/Cd a lo largo del estuario del Guadalquivir.

Teniendo en cuenta todos los resultados mostrados anteriormente y las relaciones existentes entre variables y zonas de muestreo se puede establecer el Co como trazador de actividades urbanas.

## Bibliografía

1. Mendiguchía, C.; Moreno, C.; Galindo-Riaño, M.D. and García-Vargas, M. (2004) *Using chemometric tools to assess anthropogenic effects in river waters: A case study; the Guadalquivir river (Spain)*. Analytica Chimica Acta **515**, 143-149.
2. Mendiguchía, C.; Moreno, C. and García-Vargas, M. (2007) *Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients*. Chemosphere **69**, 1509-1517.
3. Actherberg, E.P.; Braundgardt, C.; Morley, N.H.; Elbaz-Poulichet, F. and Leblanc, M. (1999) *Impact of los Frailes mining spill on riverine, estuarine and coastal waters in southern Spain*. Water Research **33**, 3387-3394.
4. Bhatt, M.P. and Gardner, K.H. (2008) *Variation in DOC and trace metal concentration along the heavily urbanized basin in Kathmandú Valley, Nepal*. Environmental Geology **96**, 1-10.
5. Point, D.; Bareille, G.; Amoroux, D.; Etcheber, H. and Donard, O. (2007) *Multielemental speciation of trace elements in estuarine waters with automated on-site UV photolysis and resin chelation coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry*. Journal of Environmental Monitoring **9**, 157-167.
6. Dassenakis, M.; Scoullou, M. and Gaitis, A. (1997) *Trace metals transport and behaviour in the Mediterranean estuary of Acheloos river*. Marine Pollutin Bulletin **34**, 103-111.
7. Gan, H.; Zhuo, M.; Li, D. and Zhou, Y. (2008) *Quality characterization and impact assessment of highway runoff in urban and rural area of Guangzhou, China*. Environmental Monitoring and Assessment **140**, 147-159.
8. Skoulikidis, N.T. (2009) *The environmental state of rivers in the Balkans-A review within the DPSIR framework*. Science of the Total Environment **407**, 2501-2516.
9. Laryushkin-Zheleznyi, B.V. and Novikov, A.V. (2005) *On the distribution of mineral nitrogen forms in polluted waters reaches in urban territories*. Water Resources **32**, 537-544.
10. Ahad, J.M.E.; Ganeshram, R.S.; Spencer, R.G.M., Uher, G.; Upstill-Goddard, R.C. and Cowie, G.L. (2006) *Evaluating the sources and fate or anthropogenic dissolved inorganic carbon (DIN) in two contrasting North Sea estuaries*. Science of the Total Environment **372**, 317-333.
11. Shirasuna, H.; Fukushima, T.; Matsushige, K.; Imai, A. and Ozaki, N. (2006). *Runoff and loads of nutrients and heavy metals from an urbanized area*. Water Science and Technology **53**, 203-213.
12. Directiva 91/676/CEE. Relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos procedentes de fuentes agrarias..
13. Lorite-Herrera, M.; Hiscock, K. and Jiménez-Espinosa, R.; (2009) *Distribution of dissolved inorganic and organic nitrogen in river water and*

- groundwater in an agriculturally-dominated catchment, south-East Spain.* Water Air Soil Pollution **198**, 335-346.
14. Neal C.; Davies, H. and Neal, M. (2008) *Water quality, nutrients and the water framework directive in an agricultural region: The lower Humber Rivers, northern England.* Journal of Hydrology **350**, 232-245.
  15. Terrado, M.; Barceló, D. and R. Tauler (2006) *Identification and distribution of contamination sources in the Ebro river basin by chemometrics modelling coupled to geographical information systems.* Talanta **70**, 691–704.
  16. Kannel, P.R.; Lee, S.; Kanel, S.R.; Khan, S.R. and Lee, Y.S. (2007) *Spatial-temporal variation and comparative assessment of water quality in urban river system: A case study of the river Bagmati (Nepal).* Environmental Monitoring and Assessment **129**, 433-459.
  17. Jarvie, H.P.; Withers, P.J.A; Hodgkinson, R.; Bates, A.; Neal, M.; Wickham, H.D.; Harman, S.A. and Armstrong, L. (2008) *Influence of rural land use on streamwater nutrients and their ecological significance.* Journal of Hydrology **350**, 166-186.
  18. Braungardt, C; Achterberg, E.P.; Nimmo, M (1998) *On-line voltammetric monitoring of dissolved Cu and Ni in the Gulf of Cádiz, south-west Spain.* Analytica Chimica Acta **377**, 205-215.
  19. Tetzlaff, B.; Kuhr, P.; Vereecken, H. and Wendland, F. (2009) *Aerial photograph-based delineation of artificially drained areas as a basis for water balance and phosphorous modelling in large river basins.* Physics and Chemistry of the Earth **34**, 552-564.
  20. Thévenot, D.R.; Moilleron, R.; Lestel, L.; Gromaire, M.C.; Rocher, V, Cambier, P.; Bonté, P.; Colin, J.L.; Pontevés, C. and Meybeck, M. (2007) *Critical budget of metal sources and pathways in the Seine River basin (1994-2003) for Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb and Zn.* Science of the Total Environment **375**, 180-203.
  21. Komárek, M.; Száková, J.; Rohošková M.; Javorská, H.; Chrastný, V. and Balík, J. (2008) *Copper contamination of vineyard soils from small wine producers: A case study from the Czech Republic.* Geoderma **147**, 16-22.
  22. Garcia-Luque, E., Forja, J.M., DelValls, T.A., Gomez-Parra, A., 2003. *The behaviour of heavy metals from the Guadalquivir estuary after the Aznalco´llar mining spill: field and laboratory surveys.* Environ. Monit. Assess. **83**, 71–88.
  23. Karvelas, M.; Katsoyiannis, A. and Samara, C. (2003) *Occurrence and fate of heavy metals in the wastewater treatment process.* Chemosphere **53**, 1201-1210.
  24. Directiva 2008/105/CE. Relativa a normas de calidad ambiental en el ambito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/891/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE
  25. Buzier, R.; Tusseau-Vuillemin, M.H.; Kerisbulck, M. and Mouchel, J.M. (2008) *Inputs of total and labile trace metals from wastewater treatment*

- plants effluents to the Seine River. Physics and Chemistry of the Earth.* **112**, 1011-1018.
26. Franco-Uría, A.; López-Mateo, C.; Roca, E. and Fernández-Marcos, M.L. (2009) *Source identification of heavy metals in pastureland by multivariate analysis in NW Spain.* Journal of Hazardous materials **165**, 1008-1015.
  27. Buzier, R. Tusseau-Vuillemin, M.H.; dit Meriadec, C.M.; Rousselot, O. and Mouchel, J.M. (2006) *Trace metal speciation and fluxes within a major French wastewater treatment plant: Impact of successive treatment stages.* Chemosphere **65**, 2419-2426.
  28. Chen, M.; Li, X.M.; Yang, Q.; Zeng, G.M.; Zhang, Y.; Liao, D.X.; Liu, J.J.; Hu, J.M. and Guo, L. (2008) *Total concentrations and speciation of heavy metals in municipal sludge from Changsha, Zhuzhou and Xiangtan in middle-south region of China.* Journal of Hazardous Materials **160**, 324-329.
  29. Soto-Jiménez, M.F. and Flegal, A.R. (2009) *Origin of lead in the Gulf of California Ecoregion using stable isotope analysis.* Journal of Geochemical Exploration **101**, 209-217.
  30. Elbaz-Poulichet, F.; Garnier, J.M., Guan, D.M.; Martín, J.M. and Thomas, A.J. (1996) *The conservative behaviour of trace metals (Cd, Cu, Ni, and Pb) and As in the surface plume of stratified estuaries: Example of the Rhone River (France) Estuary.* Coastal and Shelf Science **42**, 289-310.
  31. N'guessan, Y.M.; Probst, J.L; Bur, T. and Probst, A.; (2009) *Trace elements form stream bed sediments form agricultural catchments (Gascogne region, SW France) Where do they come from?.* Science of the Total Environment **407**, 2939-2952.
  32. Luoma, S.N.; Ho, Y. and Bryan, G.W. (1995) *Fate, bioavailability and toxicity of silver in estuarine environments.* Marine Pollution Bulletin **31**, 44-54.
  33. Raymond, P.A.; Oh, N.H.; Turner, R.E. and Broussard, W. (2009) *Anthropogenically enhanced fluxes of water and carbon from the Mississippi River.* Nature **451**, 449-452.
  34. de la Paz, M.; Gómez-Parra; A. and Forja, J. (2007) *Inorganic carbon dynamic and air-water CO<sub>2</sub> exchange in the Guadalquivir Estuary (SW Iberian Peninsula).* Journal of Marine Systems **68**, 265-277.
  35. Almeida, C.A.; Quintar, S.; González, P. and Mallea, M.A. (2007) *Influence of urbanization and tourist activities on the water quality off the Potrero de los Funes River (San Luis-Argentina).* Environmental Monitoring and Assessment **133**, 459-465.
  36. Okamura, H.; Aoyama, I.; Liu, D.; Maguire, R.J.; Pacepavicius, G.J. and Lau, Y.L. (2000) *Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment.* Water Research **34**, 3523-3530.
  37. Qednow, K. and Püttmann, W. (2009) *Temporal concentration changes of DEET, TCEP, terbutryn and nonylphenols in freshwater streams of Hesse, Germany: possible influence of mandatory regulations and voluntary environmental agreements.* Environmental Science and Pollution Research **16**, 630-640.



38. Noppe, H, Ghekiere, A.; Verslycke, T.; Wulf, E.D.; Verheyden, K.; Monteyne, E.; Polfliet; K.; van Caeter, P.; Janssen, C.R. and De Brabander, H.F. (2007) *Distribution and ecotoxicity of triazines in the Scheldt Estuary*. Environmental Pollution **147**, 668-676.
39. Pennington, P.L.; Scott and G.I. (2001) *Toxicity of atrazine to estuarine phytoplankton Pavlova sp. (prymnesiophyceae): Increased sensitivity after a long-term, low-level population exposure*. Environmental Toxicology and Chemistry **20**, 2237-2242.
40. Liu, B.; McConnell, L.L. and Torrents, A. (2002) *Herbicide and insecticide loadings from the Susquehanna River to the Northeast Chesapeake Bay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry **50**, 4385-4392.
41. Zulin, Z.; Huasheng, H.; Xinhong, W.; Jianqing, L.; Weiqi, C. and Li, X. (2002) *Determination and load of organophosphorus and organochlorine pesticides at water from Jiulong River Estuary, China*. Marine, Pollution Bulletin **45**, 397-402.
42. Phillips, P. and Chalmers, A. (2009) *Wastewater effluent, combine sewer overflows, and other sources of organic compounds to Lake Champlain*. Journal of the American Water Resources Association **45**, 45-57.
43. Xie, Z.; Ebinghaus, R.; Flöser, G.; Caba, A. and Ruck, W. (2008) *Occurrence and distribution of triclosan in the German Bight (North Sea)*. Environmental Pollution **156**, 1190-1195.
44. DeLorenzo, M.E.; Keller, J.M.; Arthur, C.D.; Finnegan, M.C.; Harper, H.E.; Winder, V.L. and Zdankiewicz, D.L. (2008) *Toxicity of the antimicrobial compound triclosan and formation of the metabolite methyl-triclosan in estuarine systems*. Environmental Toxicology **23**, 224-232.
45. Miller, J.N. and Miller, J.C. (2005) *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Fifth edition. Pearson Education Limited, Harlow.
46. Ramis, G. and García, M.C. (2001) *Quimiometría*. Ed. Síntesis, 2001.
47. Ortiz, M.C. y Sarabia, L.; (2007) *Temas Avanzados de Quimiometría*. Ed. M. Blanco y V. Cerdá, Servei de Publicacions i Intercanvi Científic. Universitat Illes Balears, Illes Balears.
48. Sañudo-Wilhelmy SA, Flegal AR, Anthropogenic silver in the Southern California Bight: a new tracer of sewage in coastal waters (1992) Environ. Sci. Technol., 26, 2147-2151

## **Capítulo 6. Caracterización de la entrada de contaminantes por vía fluvial y atmosférica al estuario del río Guadalquivir. Estudios de predicción de la contaminación.**

La contaminación fluvial y en particular la de las aguas superficiales, supone un problema, desde varios puntos de vista que afecta tanto al ser humano como al medio que lo rodea. Las vías de entrada que no suponen un vertido directo por parte del hombre se pueden separar en tres grupos: las procedentes de la atmósfera, las entradas a través de sus afluentes y la removilización de los sedimentos. De estos tres compartimentos en este trabajo se han estudiado los dos primeros, de forma que se ha evaluado la influencia que tienen los cuatro ríos afluentes previamente mencionados, Rivera de Huelva (RH), Dársena (D), Río Guadaira (RG) y Río Guadiamar (BT); sobre el estuario del río Guadalquivir, así como los efectos de la contaminación atmosférica que es llevada al río por la lluvia, evaluando para ello, cinco puntos representativos del estuario: Alcalá del Río (G1) en la cabecera, San Juan de Aznalfarache (G5) y Gelves (G6) en la zona más urbana y Brazo del Este (G10) y Trebujena (G11) en la parte central y más próximos a la desembocadura.

El estudio del aporte vía afluentes es en general tratado como el de cualquier otro vertido directo al cauce del río desde una fuente puntual, ya que sus desembocaduras se encuentran localizadas. Por ejemplo, Berzas-Nevado y col., [1] han realizado un estudio integral de la contaminación del río Tajo y han evaluado uno de sus afluentes, el río Jarama como una fuente puntual de contaminación.

Mientras, los aportes de contaminantes a las aguas superficiales desde las precipitaciones pueden tener dos orígenes fundamentales: el primero es la introducción directa desde el agua de lluvia y el segundo es atribuible a la escorrentía, tanto agrícola como urbana [2,3].

Para poder tener una idea de la contaminación aportada por la precipitación se puede recurrir a algunos datos de concentración de metales referidos al agua de lluvia en distintos lugares del mundo, así como a datos calculados a escala global, y compararlos con los obtenidos para este estudio en las aguas superficiales del estuario del río Guadalquivir, pudiendo observarse que para algunos metales como Zn, Pb y Cd es

frecuente que el agua de lluvia presente concentraciones superiores a las que se han analizado en las aguas superficiales del sistema objeto de estudio (Tabla 6-1).

Tabla 6-1. Concentración metálica en agua de lluvia.

Elemento	Mediterráneo oriental <sup>[4]</sup>	Norteamérica (EE.UU.) <sup>[5]</sup>	Media global <sup>[6]</sup>	Oriente medio <sup>[7]</sup>	Río Guadalquivir*
Cu	3,1	0,95	5,4	4,22	3,22
Mn	4,51	1,2	5,7	3,66	29,36
Ni	11	0,75	2,4	1,86	4,66
Co	0,51	0,045	-	0,15	0,213
Zn	124	3,7	36	96,5	1,39
Pb	6,4	4,5	12	2,38	0,947
Cd	4,3	0,31	0,5	9,5	0,021

Unidades:  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . \* Concentración metálica media determinada en este estudio para las aguas superficiales del río Guadalquivir.

El primer paso para realizar el estudio de aportes fluviales y atmosféricos de contaminantes a las aguas superficiales del río Guadalquivir ha sido establecer la caracterización de la contaminación en el río. A continuación se ha procedido a la evaluación y comparación de los datos obtenidos durante el estudio general del estuario con los ofrecidos por los ríos afluentes, así como con el comportamiento de las variables para los muestreos selectivos después de la lluvia. Para estos muestreos se han tomado muestras de agua superficial en las 24 horas posteriores a los episodios de lluvia, como se ha explicado anteriormente (Capítulo 4).

En primer lugar, utilizando las líneas de tendencia para el comportamiento de las variables que se han mostrado en los gráficos de cajas y bigotes del capítulo anterior, se han comparado los resultados obtenidos para muestreos generales y sistemáticos, así como para los afluentes. Además, aprovechando la información ofrecida por ACP y CA sobre distribución y clasificación de las zonas del río, se ha realizado un análisis discriminante para establecer el carácter de la contaminación aportada por las fuentes seleccionadas, que se podría utilizar como modelo predictivo.

### Aportes de contaminación fluvial y atmosférica.

La comparación gráfica de los niveles de concentración de contaminantes observados para el estudio de contaminación global del estuario con los correspondientes a las fuentes fluviales y atmosféricas es el primer paso para establecer su influencia sobre el río. A continuación se muestran los gráficos de concentración

media de las variables estudiadas para cada punto de toma de muestra. Se ha realizado la comparación de las curvas de tendencia con los diagramas de cajas y bigotes correspondientes a los datos obtenidos para los afluentes y tras las precipitaciones para establecer si en algún caso suponen un aporte de contaminación al estuario de río Guadalquivir. En primer lugar se ha realizado el estudio para los contaminantes inorgánicos, de los que como ya se ha visto anteriormente, se ha realizado un estudio más exhaustivo. Los contaminantes orgánicos se han tratado de forma independiente.

En los gráficos se presentan en color azul las cajas correspondientes a los ríos afluentes, mientras que en rojo se muestran las que pertenecen a los muestreos selectivos.

### 1. Variables inorgánicas

Los afluentes del río Guadalquivir en su zona estuárica presentan distinto comportamiento según la zona del río estudiada. En general se puede considerar, que aquellos que suponen una entrada de contaminantes, estos son de origen urbano.

De los afluentes estudiados, se puede observar que el aporte más importante lo representa el río Guadaira (RG), que ofrece valores de concentración por encima de los descritos para el estado general del río en las estaciones previas al mismo. En concreto, los contaminantes aportados son  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , Co, Mn, Pb y COD. No hay que olvidar que el río Guadaira conduce los efluentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales de la zona este de Sevilla, por lo que presenta un marcado carácter urbano en la composición de sus aguas (Figura 6-1 y Figura 6-2). Además, para este afluente se aprecia una disminución del pH y el OD asociada también a la contaminación urbana (Figura 6-2).

De estos contaminantes, Mn,  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  aparecen también valores más altos (Figura 6-1), que para la tendencia general en el punto de muestreo situado en el Brazo de la Torre. Este punto se puede ver afectado tanto por la presencia de cultivos de arroz aguas arriba del río Guadiamar como por las piscifactorías que se localizan a la desembocadura del mismo.

La dársena del Guadalquivir no se presenta en general como una entrada de contaminación, sino como una agente dilutor de la misma en la zona urbana. Esto se observa, por ejemplo en el caso del  $\text{NO}_2^-$  o el Co, que se ha establecido como trazador urbano y que en la dársena se presenta en el mismo nivel de concentración marcado por

la tendencia general (Figura 6-1). Este punto es especialmente importante en el caso de la Ag, cuya concentración aumenta considerablemente (Figura 6-2). Esto está relacionado con las actividades industriales que tienen lugar la zona de Sevilla, donde las más importantes se pueden relacionar con el astillero de Sevilla, el paso de buques y la obra de la nueva esclusa que se ha realizado durante el periodo de estudio. De esta forma la dársena se comporta como un foco importante de este metal, haciendo que su nivel de concentración en general en la parte central aumente, tendiendo esto como consecuencia que aparezca en los ACP relacionada con zonas agrícolas. Teniendo esto en cuenta se puede considerar la Ag como trazador de actividades industriales en el estuario del Guadalquivir. También se puede observar un aumento de la concentración de carbono total en este punto.

Finalmente, el río Rivera de Huelva no se muestra como foco de ningún contaminante de forma especial, aunque se puede observar concentraciones de OD inferiores a las de la tendencia general (Figura 6-2), además de algún valor elevado de algunos metales pesados, que se podrían relacionar con contaminación urbana (Figura 6-1 y Figura 6-2)

Por otro lado y con respecto a la precipitación atmosférica, se puede decir que en general, las aguas superficiales del estuario del río Guadalquivir no experimentan grandes variaciones tras los episodios de lluvia. Sin embargo, algunos efectos destacables han podido observarse y se describen a continuación. De los estudios realizados se desprende que los efectos producidos por las lluvias en el estuario no muestran un patrón común, sino que son diferentes en cada una de las estaciones estudiadas. En la zona más urbana (G5-G6) las lluvias provocan generalmente una mayor variabilidad en las concentraciones, así como la dilución de los contaminantes en el río. Sin embargo, en la zona más salina la variabilidad de las concentraciones es generalmente menor.

Los efectos más importantes que presentan los episodios de lluvia han sido observados para la estación de muestreo situada al inicio del mismo (G1, Alcalá del Río), siendo los contaminantes sobre los que muestra la mayor influencia son Co y Mn, que se han descrito anteriormente como netamente urbanos[8] (Figura 6-1). En cuanto al núcleo de la zona urbana se aprecia un aumento neto de la concentración de Cd (G5-G6) como consecuencia de la precipitación (Figura 6-3). Además también se observa

una disminución del pH en esta zona, que se puede considerar normal debido al aporte desde la lluvia de los distintos óxidos de nitrógeno o azufre (Figura 6-2)

Por último, variables como Cu, Zn, carbono total, inorgánico no aparecen introducidas de forma clara en el estuario del Guadalquivir por vía fluvial o por la precipitación (Figura 6-2 y Figura 6-3).

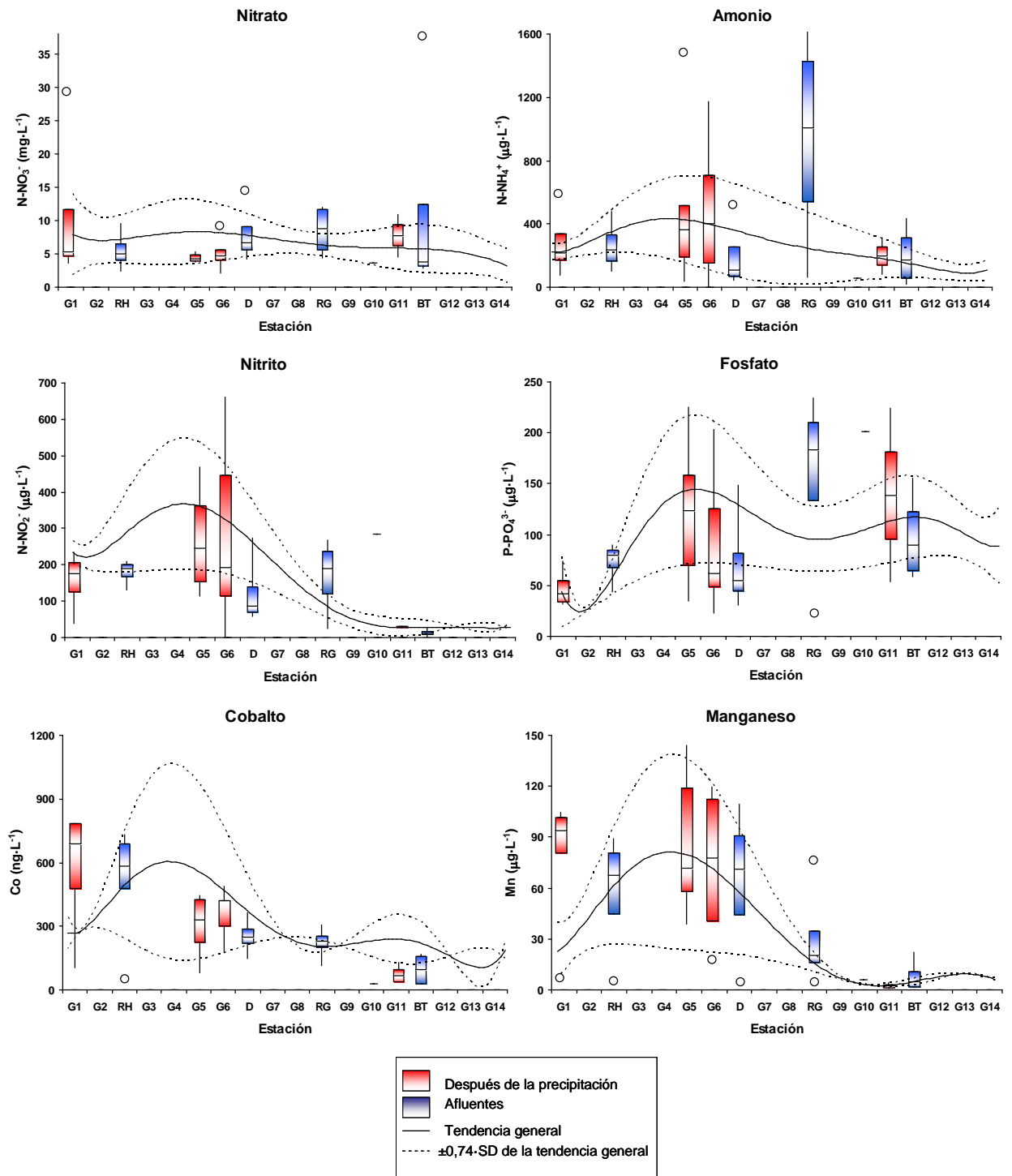


Figura 6-1. Aportes fluviales y atmosféricos en el río Guadalquivir (I)

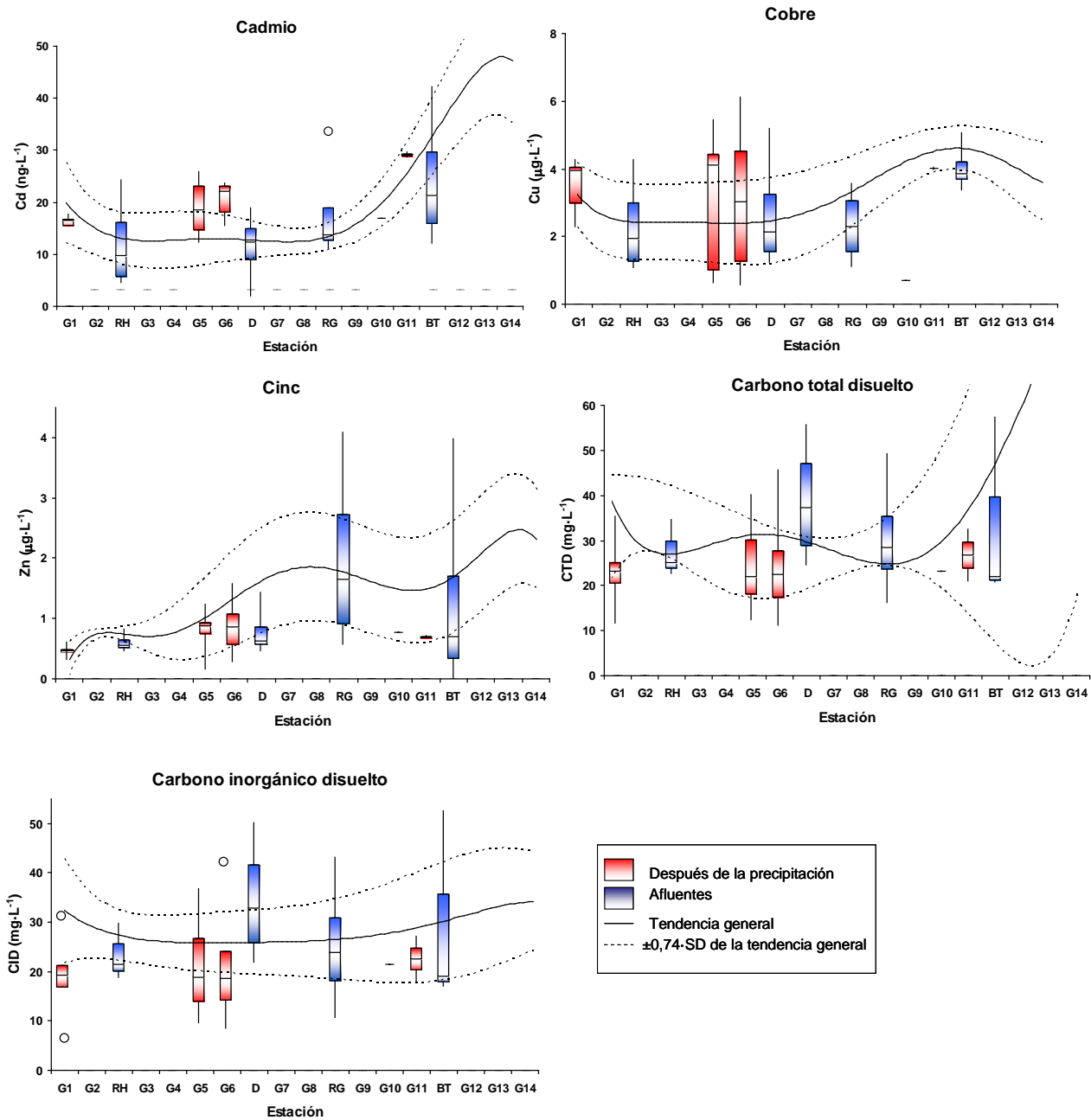


Figura 6-2. Aportes fluviales y atmosféricos en el río Guadalquivir (II)

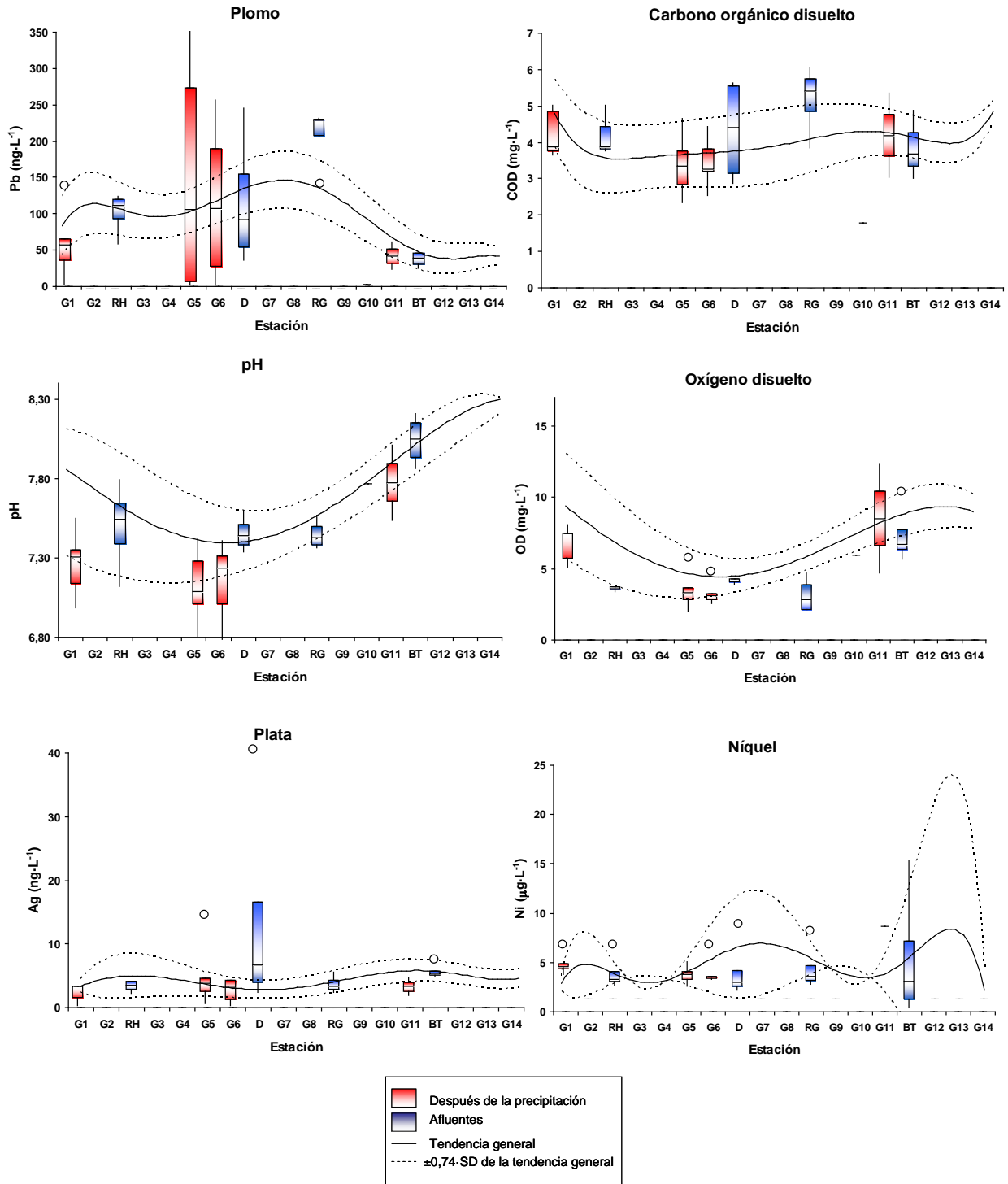


Figura 6-3. Aportes fluviales y atmosféricos en el río Guadalquivir (III)



## 2. Sólidos en suspensión

Como se ha podido comprobar mediante el análisis de la varianza y las técnicas multivariantes, el comportamiento de los sólidos en suspensión, tanto totales como volátiles ha sufrido variaciones importantes durante el periodo de estudio, tanto en su concentración como en su distribución, por lo que el estudio de sus aportes externos al río se realiza de forma independiente.

Se puede observar como la concentración en los afluentes se encuentra en todos los casos por debajo de los valores que marcan el estado general del río (Figura 6-4). Por lo tanto, el aporte de SST sobre el río se debe a otras entradas como escorrentías, removilización de sedimentos por efecto de la navegación y sobretodo el efecto de las lluvias en que tuvieron lugar en Noviembre de 2007 y que causaron la apertura de la presa de Alcalá del Río, que produjo la introducción de material particulado en suspensión en el estuario desde su inicio. Este fenómeno ha tenido gran repercusión social y económica, habiendo aparecido en la prensa por los problemas que ha provocado tanto a nivel turístico como pesquero a lo largo de todo el estuario.

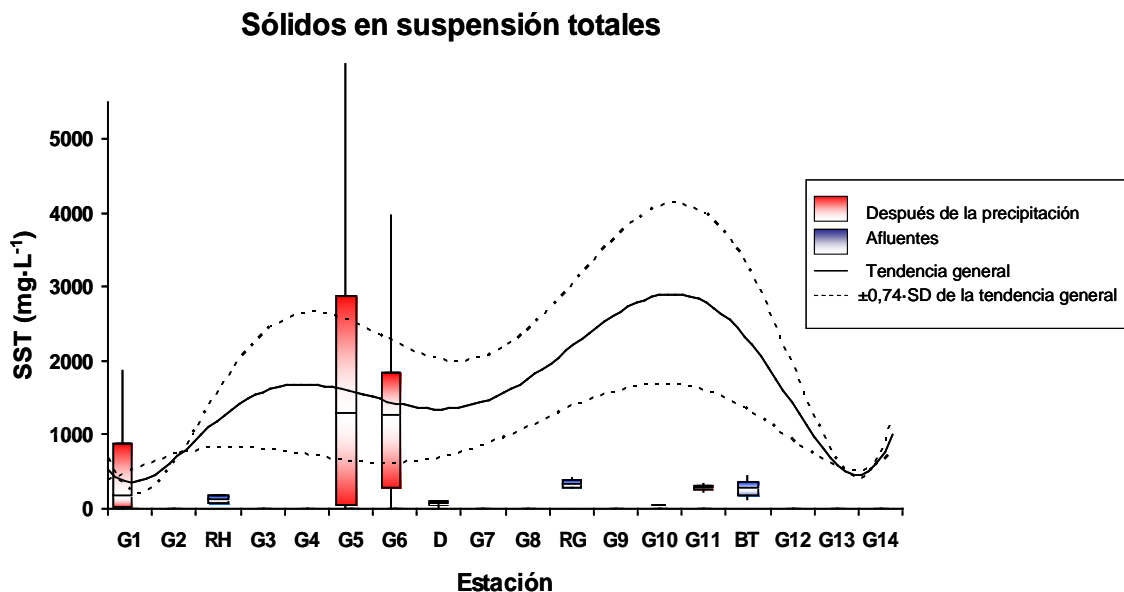


Figura 6-4. Aportes fluviales y atmosféricos de SST

Como se puede observar en el gráfico, los episodios de precipitación tienen una gran influencia sobre el comportamiento que los sólidos han mostrado durante el periodo de estudio. Los valores más altos se corresponden con la apertura de la presa de Alcalá del Río el 21 de noviembre de 2007, registrándose un día después valores de  $5416 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de sólidos en suspensión totales en el punto G5. Desde este momento, el

comportamiento de los sólidos y su distribución espacial ha variado, de forma que han pasado de ser variables típicamente agrícolas a relacionarse con el área urbana. A este cambio de comportamiento también han contribuido las obras del metro de Sevilla, que han mantenido este elevado nivel de sólidos en la zona urbana, sobre todo para el punto G5. La influencia de los sólidos se ha hecho notar en otras variables estudiadas, aunque sin provocar ninguna distorsión en su distribución espacial.

### 3. Variables orgánicas

Se han comparado los valores de concentración de compuestos orgánicos encontrados en el río tras los muestreos sistemáticos con los recogidos después de la lluvia para las cinco estaciones anteriormente consideradas como representativas para las variables inorgánicas. Los resultados de los muestreos sistemáticos se muestran en diagramas de cajas y bigotes, mientras que los correspondientes a los muestreos después de la lluvia se representan como diagrama de dispersión correspondiente al punto de muestreo. Se podría considerar que en los casos en los que existe un aporte o dilución son aquellos en los que el valor después de la lluvia se encuentra fuera de la caja y el bigote. Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

- Pesticidas triazínicos

Para los muestreos realizados después de la lluvia se puede apreciar en general un nivel superior de concentración para simazina, terbutrín y atrazina en las estaciones G5 y G11, mientras que para terbutilazina no se aprecia una variación del nivel de concentración de en ninguno de los puntos de toma de muestra (Figura 6-5).

De este grupo de compuestos la simazina y la atrazina tienen un límite de concentración establecido en  $4000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $2000 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivamente en la DMA-2008, estando los valores registrados en el estuario del Guadalquivir después de la lluvia dentro de los valores permitidos por dicha norma.

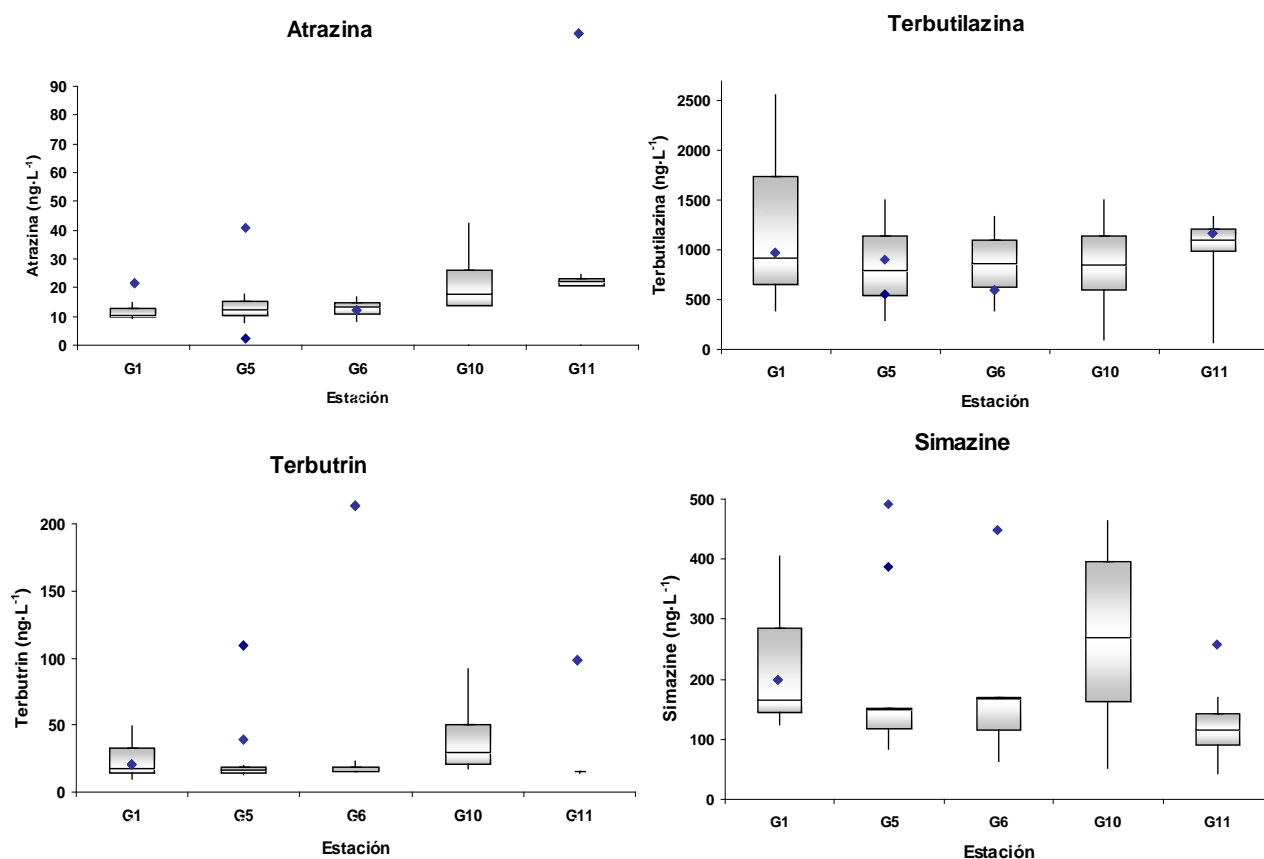


Figura 6-5. Efecto de la precipitación sobre la concentración de pesticidas triazínicos en río Guadalquivir

- Herbicidas cloroacetanilídicos

Se puede apreciar que la concentración de metalaclo aumenta en los casos estudiados en todas las estaciones en las que se han recogido muestras, siendo mayor el aumento en la estación G11, que es una zona agrícola en la que la presencia de estos herbicidas es habitual. El alaclo presenta el mismo comportamiento, con aumentos en todos los puntos, pero que en ningún caso rebasan los límites establecidos en la DMA-2008 de  $700 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figura 6-6).

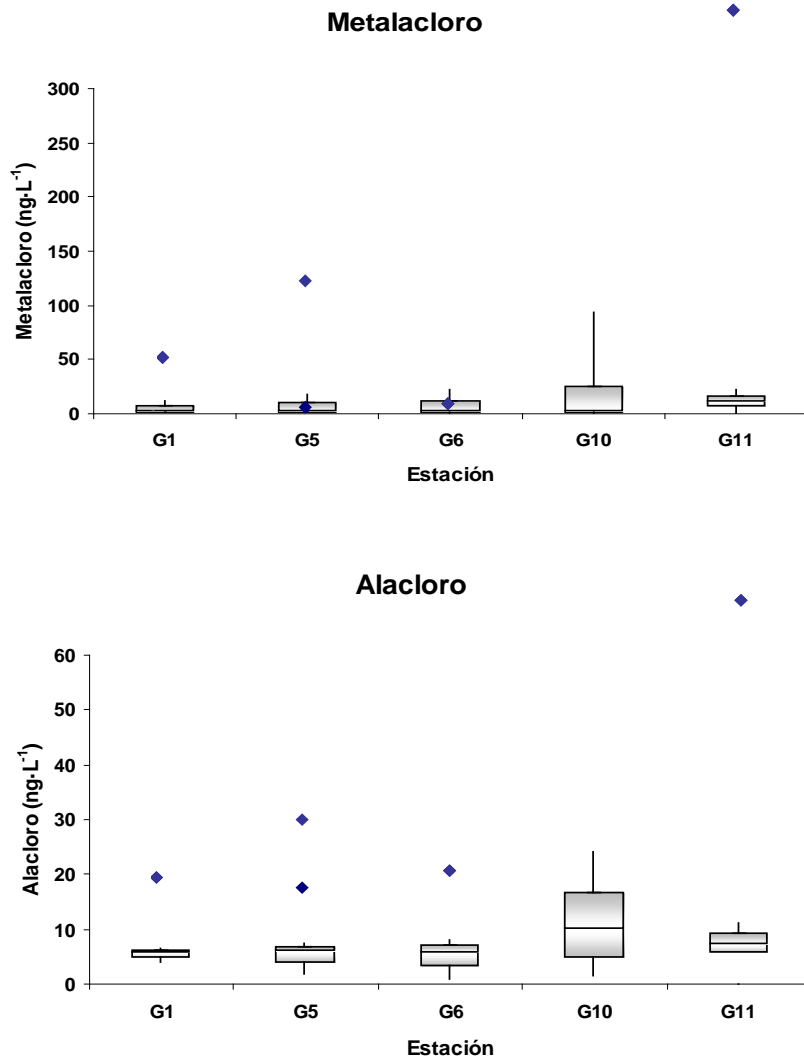


Figura 6-6. Gráficos de cajas y bigotes para metalachloro y alacloro para los muestreos generales y selectivos

- Lindano

La concentración de lindano aportada por el agua de lluvia no presenta influencia en la que se ha determinado para los muestreos sistemáticos como habitual (Figura 6-7), ya que como se puede observar, aparece siempre dentro de los valores marcados por las cajas y bigotes. Además, al igual que los contaminantes orgánicos anteriores no rebasa el límite marcado por la DMA-2008 y establecido en 40 ng·L<sup>-1</sup>.

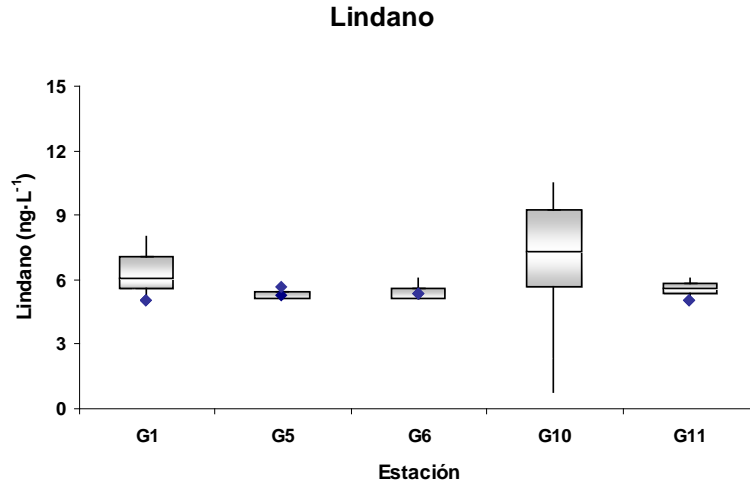


Figura 6-7. Aportes atmosféricos de lindano

- Dimetoato

En el caso del dimetoato se podrían comentar dos efectos opuestos en función de la zona estudiada. En primer lugar no se aprecia una tendencia general a aumentar su concentración como consecuencia de la lluvia en la zona inicial del estuario (G1-G6), aunque en algún caso se hayan registrado concentraciones superiores a las habituales. En segundo lugar se podría considerar la dilución de este compuesto en la estación G11 como consecuencia de la lluvia (Figura 6-8).

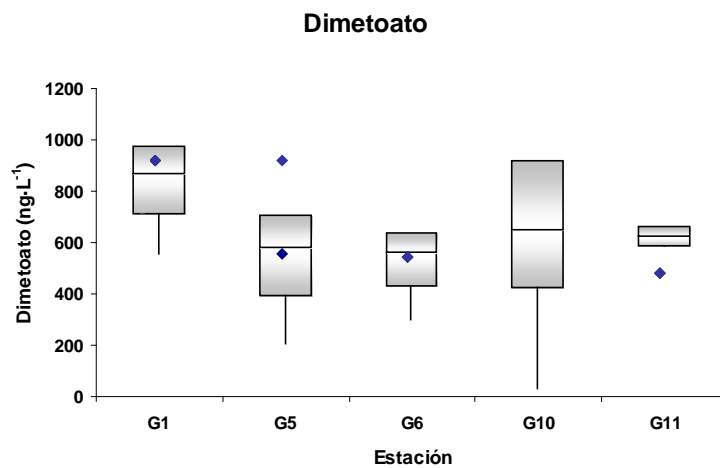


Figura 6-8. Aportes de dimetoato como consecuencia de la lluvia

- Metildihidrojasmonato

Este compuesto es utilizado como fragancia en diversos perfumes. Como se puede apreciar sólo en la estación de muestreo G5 se registran concentraciones superiores de este compuesto como consecuencia de la lluvia. Este punto de muestreo se encuentra en una zona urbana, por lo que este aumento de concentración debido a la precipitación no es extraño.

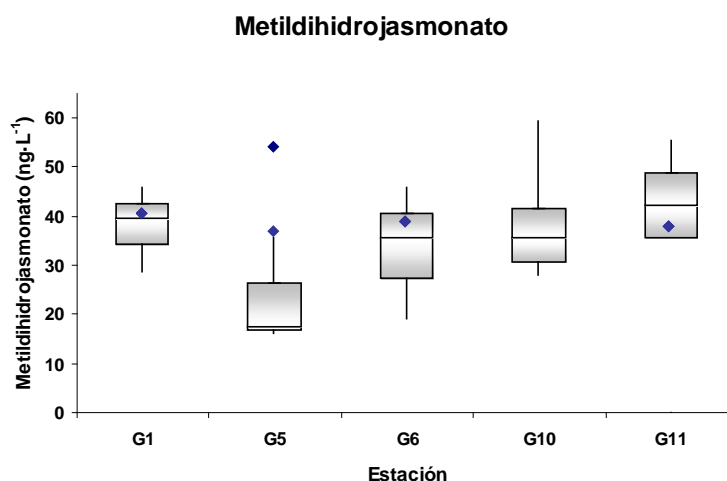


Figura 6-9. Aportes atmosféricos de metildihidrojasmonato.

- Compuestos que no se ven afectados por la precipitación.

Este grupo está formado por compuestos que en general son utilizados en zonas urbanas o industriales, como son la cafeína, el triclosan y el tris-cloroetilfosfato. Los dos primeros están muy relacionados con la actividad urbana y doméstica, mientras que el segundo, al ser un retardante de llama en plásticos, también presenta aplicaciones industriales y agrícolas.

Como se puede comprobar (Figura 6-10), se podría hablar de un efecto de dilución por parte de la lluvia para estos compuestos en las estaciones de muestreo estudiadas.

Con los resultados obtenidos se puede establecer que los contaminantes orgánicos para los que las precipitaciones tienen una mayor influencia son los pesticidas triazínicos y los herbicidas acetanilídicos. En cualquier caso, aunque los datos registrados para el estudio de estos contaminantes son escasos, apuntan hacia una

potencial línea de investigación para un mayor entendimiento de la contaminación del estuario del Guadalquivir.

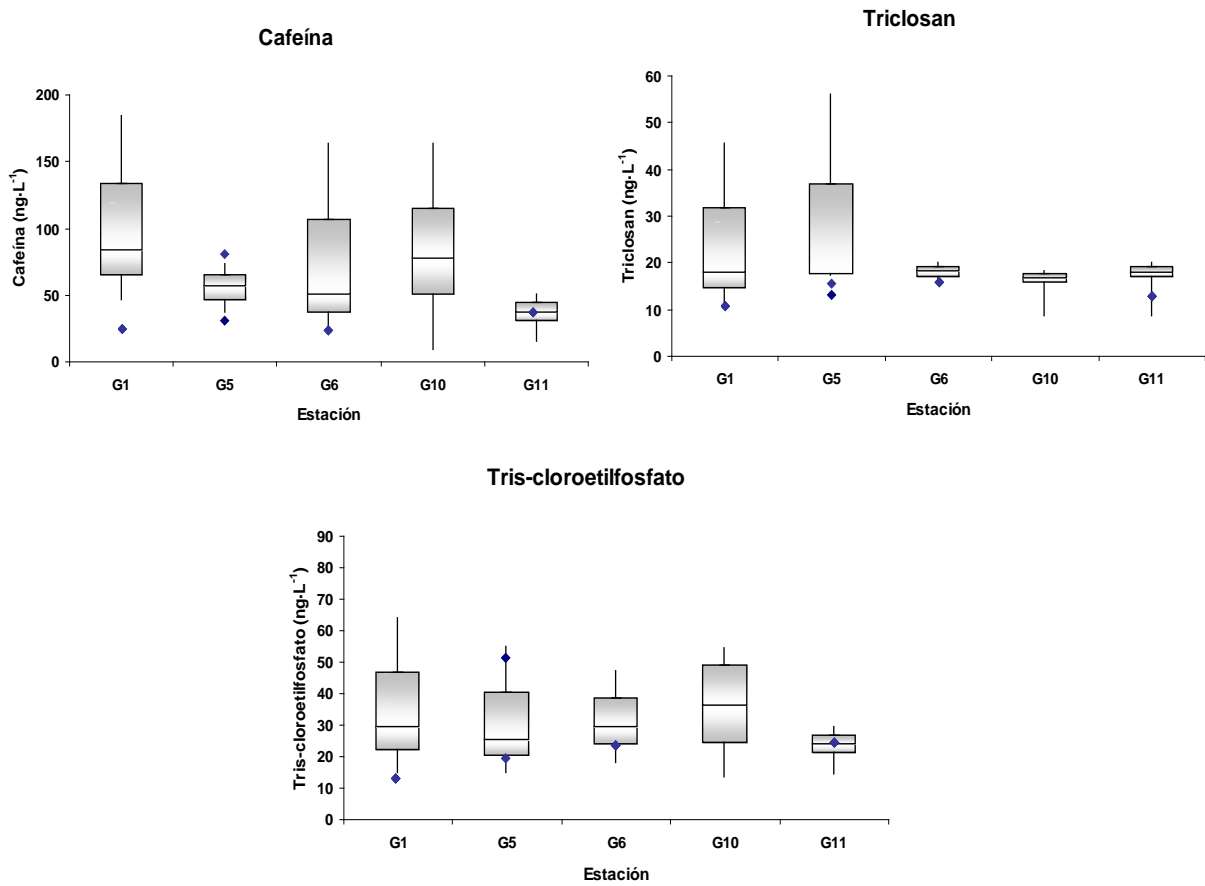


Figura 6-10. Efecto de la lluvia sobre cafeína, triclosan y tris-cloroetilfosfato.

## Carácter de los aportes fluviales y atmosféricos de contaminantes

La caracterización de los aportes fluviales y atmosféricos de contaminantes se ha realizado utilizando un análisis predictivo, mediante la construcción de un modelo que permita pronosticar la pertenencia de los mismos a una categoría determinada (en este caso zona geográfica) en base a sus características, ha sido utilizado en este caso el análisis discriminante.

### 1. Análisis discriminante

Para construir un modelo posteriormente aplicable es necesario contar con una serie de objetos cuya categoría sea conocida y para los que también se conozcan las variables predictoras. La pertenencia de estos objetos a las categorías es supuesta y la

comprobación de que su asignación es correcta forma parte del análisis. El conjunto de objetos que se utiliza para la construcción del modelo se conoce como “conjunto de entrenamiento” y sirve para predecir la clasificación de los nuevos objetos cuando se haya construido el modelo.

Una de estas técnicas de análisis clasificatorio es el análisis discriminante lineal. En este tipo de análisis se construyen modelos algebraicos explícitos denominados funciones discriminantes, que son combinación lineal de las variables predictoras. Como el resto de las técnicas clasificadoras, para que el modelo construido sea consistente es necesario que cumpla las siguientes condiciones [13]:

- El conjunto de entrenamiento debe estar constituido por un mínimo de cuatro objetos independientes de cada categoría, de modo que su dispersión interna quede bien representada
- Las variables predictoras deben contener información discriminante, es decir, deben ser capaces de distinguir entre categorías.

El fundamento del análisis discriminante consiste en maximizar la varianza existente entre categorías a la vez que se minimice dentro de estas, de forma que la separación sea lo más efectiva posible para realizar la clasificación. Esta separación se consigue mediante las funciones discriminantes. Para estas funciones se determina un valor que permite distinguir la pertenencia a una u otra categoría dependiendo de que el valor de la función para la variable en cuestión sea mayor o menor que el determinado como límite.

Con una función discriminante se puede distinguir entre dos grupos, por lo que para distinguir entre tres grupos es necesario definir dos funciones discriminantes. La primera función discriminante permite distinguir un grupo de categorías de los otros dos y la segunda función se utiliza para diferenciar variables entre las categorías restantes.

Las funciones discriminantes se construyen de una en una, buscando direcciones en el espacio que hagan máximo el valor del parámetro  $\lambda'$ , que se define como el cociente entre la suma de cuadrados de las distancias euclídeas de los objetos en distintos grupos en la dirección que indica la función discriminante ( $SC_D$ ) y la misma suma entre los objetos de una misma categoría ( $SC_I$ ) (Ecuación 6-1). De esta forma se genera una función discriminante menos que grupos se generan, ofreciendo cada vez



que se crea una nueva un valor de  $\lambda'$  menor, pero siempre manteniendo la ortogonalidad [14].

$$\lambda' = \frac{SC_D}{SC_I}$$

Ecuación 6-1

El uso del parámetro  $\lambda'$  presenta el problema de que no está acotado, por lo que su valor varía en función del número de grupos y la distancia entre los mismos. Debido a esto, en lugar de este factor se puede utilizar la lambda de Wilks ( $\lambda_w$ ) (Ecuación 6-2). Este parámetro toma valores próximos a 0 cuando existe una separación nítida entre categorías, mientras que si solapan los grupos, ofrece valores próximos a la unidad.

$$\lambda_w = \frac{1}{1 + \lambda}$$

Ecuación 6-2

Una vez que se construyen las funciones discriminantes se pueden representar en el plano, de forma que se genera con dos funciones un espacio dividido en tres categorías. Para cada una de las regiones definidas existe un centroide en torno al cual se distribuyen las variables pertenecientes a ese grupo. Cuanto mayor sea la separación entre los centroides mayor será la separación entre grupos y por tanto la clasificación.

Las funciones representadas en el mapa territorial permiten establecer fronteras entre categorías. En el análisis discriminante lineal la probabilidad de que una variable pertenezca a un grupo decrece de forma lineal al aumento de la distancia desde el centroide, de forma que los puntos en los que se produce un solapamiento entre la probabilidad de que una variable pertenezca a uno u otro grupo se establece una línea de frontera.

A partir de aquí resta aplicar las funciones discriminantes construidas a los valores de nuevas variables utilizadas para la clasificación, de las cuales se quiera conocer la pertenencia a un grupo. El valor de las funciones permitirá situarlas dentro del mapa territorial en la región que les corresponda.

## 2. Clasificación territorial del estuario del río Guadalquivir en base a sus aguas

Antes de clasificar los aportes tanto fluviales como atmosféricos, es necesario establecer una serie de criterios que permitan determinar las características que debe poseer una posible fuente de contaminación, para identificar el grupo al que pertenece.

Con esto en mente y aplicando el análisis discriminante se ha generado un modelo matemático que permite diferenciar entre los distintos grupos identificados en el río para realizar la predicción del comportamiento de los aportes. En primer lugar, basado en el resultado obtenido en los análisis de componentes principales y conglomerados, se ha establecido el comportamiento a priori de las estaciones de muestreo.

A partir de los datos registrados para las variables utilizadas en cada una de las estaciones se ha generado el modelo predictivo. Para que las variables puedan ser utilizadas en el modelo deben presentar tanto una distribución normal como superar la prueba de tolerancia. Para este estudio se han utilizado todas las variables estudiadas en el presente trabajo a excepción de los compuestos orgánicos y los sólidos en suspensión volátiles, para los que no se cuenta con datos del muestreo de febrero de 2007. En el caso de que las variables no presentaran una distribución normal se han realizado las transformaciones correspondientes (ANEXO IV). De los parámetros utilizados, únicamente el carbono orgánico disuelto no ha superado la prueba de tolerancia, por lo que ha sido excluido del modelo.

Las estaciones de muestreo, han sido clasificadas en tres grupos fundamentales (Tabla 6-2), en función de su localización geográfica, identificados como urbano, agrícola y la desembocadura, obteniéndose por tanto dos funciones discriminantes. De esta forma se ha obtenido un autovalor de 4,26 para la función discriminante 1 ( $F1$ ), explicando un 77,1 % de la varianza de la distribución de los datos y un autovalor de 1,26 para la función discriminante 2 ( $F2$ ) para explicar un 22,9% de la varianza. Así la lambda de Wilks observada entre  $F1$  y  $F2$  es de 0,084, mientras que para  $F2$  es de 0,441.

Tabla 6-2. Estaciones correspondientes a cada grupo

Grupo	Estaciones
Urbano	G1-G8
Agrícola	G9-G11
Estuario	G12-G14

Los coeficientes estandarizados de las variables en la funciones muestran información del grado de relación de las mismas con cada una de las funciones discriminantes, de forma análoga a la que lo hacen las cargas en los componentes principales (Tabla 6-3).

Tabla 6-3. Coeficientes estandarizados de las funciones discriminantes

Variable	F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>
pH	0,236	0,231
Salinidad	0,340	0,859
OD	1,127	-0,708
SST	-0,212	-0,567
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0,001	0,020
Cu	0,191	-0,100
Pb	-0,085	-0,354
CID	-1,813	0,227
CTD	1,981	0,395
NTD	-0,788	0,491
Log(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	-0,498	0,991
Log(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0,175	0,040
Log(Mn)	-0,138	0,064
Log(Ni)	-0,100	0,586
Log(Cd)	0,220	0,079
Log(Co)	-0,042	-0,185
Log(Zn)	-0,403	-0,068
Log(Ag)	0,046	-0,243
Raíz(NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	-0,007	0,572

Además se puede calcular la matriz de estructura, que ofrece información relativa al grado de correlación de cada variable con las funciones discriminantes, donde se puede observar que el mayor peso y con comportamiento opuesto se ofrece en la primera función para variables pertenecientes al estuario y la zona urbana, por lo que es esta función la que permitirá distinguir entre estos dos grupos. Por otro lado se observa como la mayor correlación en la F<sub>2</sub> pertenece a las variables con características agrícolas (Tabla 6-4).

Esta matriz de estructura se utiliza para determinar las coordenadas de los centroides que caracterizan cada uno de los grupos (Tabla 6-5). Hay que tener en cuenta que deben estar suficientemente diferenciados para poder realizar una buena clasificación, ya que en torno a ellos se van a establecer las fronteras entre las regiones del mapa territorial en el que se distribuyen las estaciones de muestreo.

Tabla 6-4. Coeficientes de la matriz de estructura de las funciones discriminantes.

Variable	F1	F2
pH	0,555	0,101
Salinidad	0,406	0,309
Log(Cd)	0,376	0,144
Raíz(NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	-0,337	0,335
OD	,330	-0,054
Log(Mn)	-0,319	0,274
Log(Co)	-0,303	0,031
Pb	-0,269	-0,125
Log(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	-0,232	0,048
Cu	0,230	-0,170
Log(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	-0,186	0,044
CTD	0,142	0,039
CID	0,135	0,049
Log(Ni)	-0,105	-0,022
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	-0,078	0,023
SST	-0,059	-0,447
NTD	-0,053	0,117
Log(Ag)	0,100	-0,115

Tabla 6-5. Coordenadas de los centroides en el mapa territorial.

Grupo	F1	F2
Urbano	-2,043	0,552
Agrícola	0,355	-1,775
Estuario	2,732	0,836

Al inicio de la construcción del modelo se ha asumido que las estaciones de muestreo pertenecen a un determinado grupo dentro del conjunto de los datos; tras la definición de las funciones discriminantes se puede comprobar si alguno de los puntos de muestreo no pertenece al grupo inicialmente pronosticado. En el presente caso se ha comprobado como para el grupo de puntos considerados urbanos, el 100% de las predicciones se cumple en el modelo, mientras que para las estaciones agrícolas, el carácter establecido a priori se cumple para el 81,3% de los casos y para el estuario es del 93,8%.

A partir de los datos obtenidos en la construcción del modelo y el cálculo de la posición de los centroides se puede realizar un reparto de las zonas del río en forma de mapa territorial (Figura 6-11). Cada una de las estaciones de muestreo tiene en este mapa unas puntuaciones que permiten situarla a los lados de una determinada frontera, de modo que puede determinarse a que grupo pertenece. En el mapa territorial se puede

observar además cuáles son las estaciones que se han considerado en un grupo a priori y que después han sido asignadas por el modelo a su grupo real. Para las estaciones urbanas se puede comprobar que la estación G2 presenta carácter agrícola para el muestreo de noviembre de 2008, mientras que la G14 (desembocadura) lo hace para abril de 2008. Por otro lado el punto de muestreo G9 situado en la zona agrícola, presenta desviaciones hacia la parte urbana. Finalmente cabe destacar el comportamiento de la estación G1 que encontrándose en la zona geográfica de Sevilla se puede asemejar en cuanto a características a la zona agrícola o a la desembocadura.

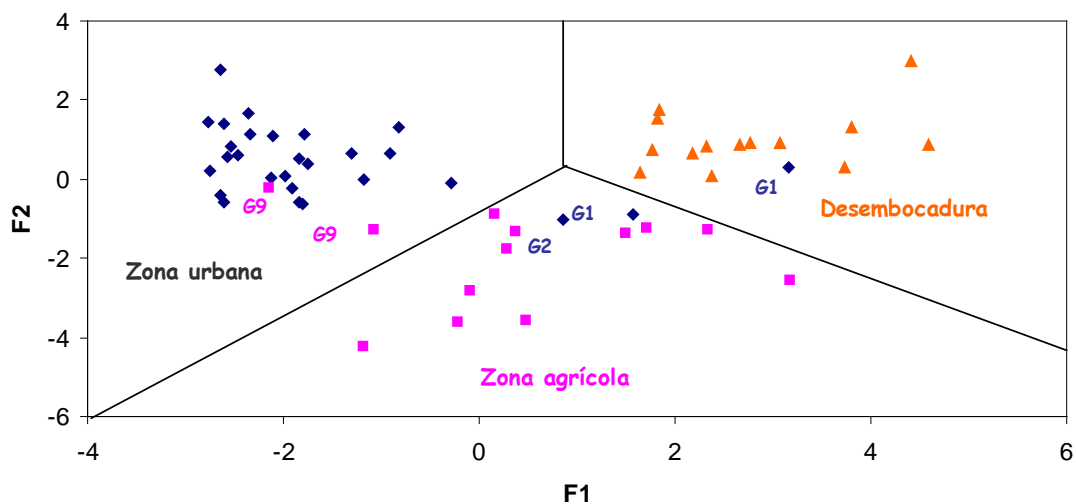


Figura 6-11. Mapa territorial definido por las funciones discriminantes ● Grupo urbano, ■ Grupo agrícola, ▲ Grupo desembocadura.

Es interesante, para comprobar la bondad del ajuste del modelo a la distribución de los datos utilizados, realizar un análisis de probabilidad de pertenencia de las estaciones a los grupos que se les han asignado. De esta forma se presentan el grado de definición de cada estación de muestreo en su grupo (Figura 6-12), donde se puede observar las altas probabilidades obtenidas en cada caso para los grupos asignados a cada estación.

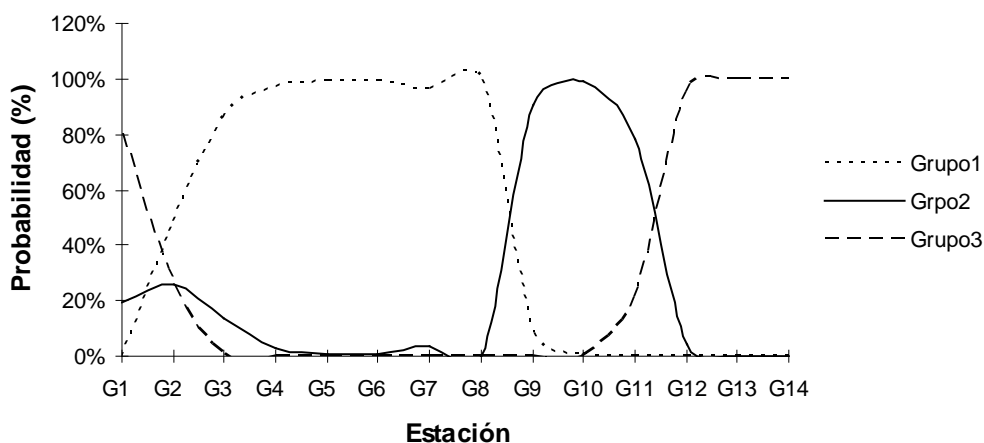


Figura 6-12. Probabilidad de pertenencia de cada estación al grupo asignado

Por último, el objetivo del análisis discriminante se cumple con la definición de las funciones discriminantes en base a sus coeficientes no tipificados para las variables empleadas. De esta forma, si se realiza el análisis de los contaminantes en una muestra de agua, en base a los valores de concentración determinados, se podrá predecir el carácter de la contaminación de ese punto en función de su posición en el mapa territorial. Las funciones discriminantes definidas en este caso son las siguientes (Tabla 6-6).

Tabla 6-6. Coeficientes no tipificados para las funciones discriminantes.

Variable	F1	F2
pH	1,021	0,998
Cond.	0,057	0,145
DO	0,476	-0,299
SST	-0,001	-0,003
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0,000	0,000
Cu	0,144	-0,075
Pb	-0,002	-0,008
CID	-0,170	0,021
CTD	0,179	0,036
NTD	-0,064	0,040
Log(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	-1,615	3,212
Log(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0,369	0,083
Log(Mn)	-0,217	0,101
Log(Ni)	-0,282	1,650
Log(Cd)	0,900	0,324
Log(Co)	-0,115	-0,504
Log(Zn)	-1,127	-0,190
Log(Ag)	0,157	-0,821
Raíz(NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	-0,001	0,121
Constante	-11,200	-10,439

### 3. Carácter de los aportes de los ríos afluentes del estuario al Guadalquivir

Una vez que se ha establecido el modelo predictivo, se ha utilizado para evaluar las características de los aportes debidos a los ríos afluentes sobre el Guadalquivir. Establecer este tipo de comportamiento es importante para entender el tipo de contaminación que aportan. En el mapa territorial se puede observar la localización de los afluentes para cada uno de los muestreos (Figura 6-13).

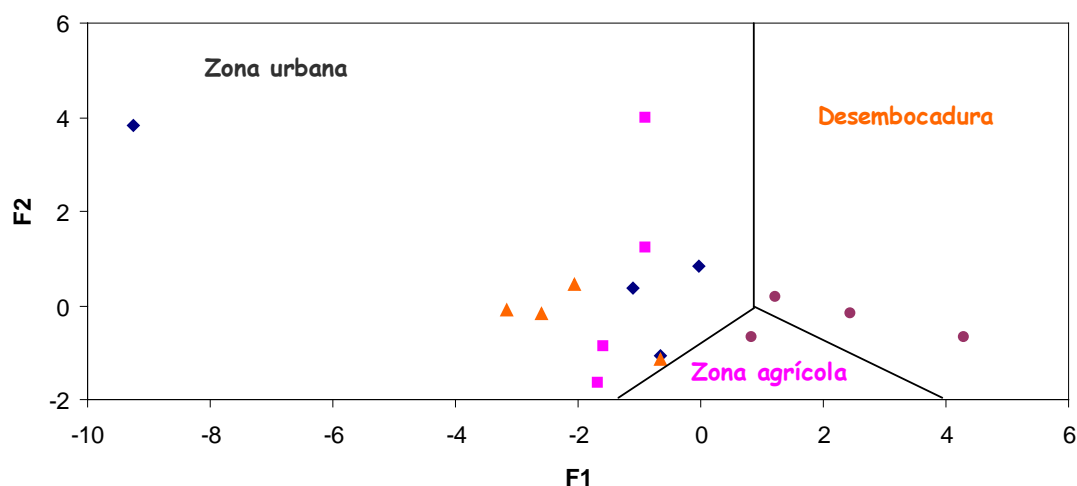


Figura 6-13. Posición de los afluentes en el mapa territorial. Rivera de Huelva (■), Dársena (■), Río Guadaira(▲) y Brazo de la Torre (●)

Se pueden establecer dos grandes grupos en cuanto al carácter químico de los afluentes. Por un lado, la dársena del río (D), el río Guadaira (RG) y el Rivera de Huelva (RH) presentan en general características urbanas, mientras que el río Guadamar (BT) se asocia con las estaciones de la desembocadura. En cuanto a comportamientos particulares se puede observar que el BT se puede encontrar bien en la zona agrícola o la desembocadura, ya que está localizado en una zona de gran actividad agrícola, pero afectado por la marea de forma considerable.,

En la zona urbana se puede observar que el río Guadaira es el que presenta en general el mayor carácter urbano, mientras que el Rivera de Huelva es el que presenta en general un carácter más cercano a la frontera con la zona agrícola de forma habitual. Sin embargo, este río aparece desplazado a un carácter más urbano en uno de los muestreos (octubre de 2007).

#### 4. Carácter de la contaminación aportada por las lluvias

La aplicación del análisis discriminante en el estudio del aporte de contaminación desde las precipitaciones abarca tanto la lluvia propiamente dicha como los efectos de la escorrentía que provoca. En este sentido se trata de ver qué grupo de contaminantes tiene mayor influencia sobre las aguas superficiales del río Guadalquivir y si tienen algún efecto sobre la composición general de las mismas. El análisis de los aportes de la precipitación se ha realizado teniendo en cuenta los sólidos en suspensión y sin ellos, para comprobar la importancia del aumento de su concentración en el año 2008.

El mapa territorial (Figura 6-14) para el caso de los aportes debidos a la precipitación atmosférica ofrece un comportamiento muy especial para el caso de las estaciones de muestreo G5 y G6 para el día 22 de noviembre de 2007, fecha en la que tuvo lugar la apertura de la presa de Alcalá del Río, y en la que se registraron valores de sólidos en suspensión del orden de los  $g \cdot L^{-1}$ . Se puede observar que ésta es la variable dominante para estas muestras, ya que estos puntos se sitúan en la zona agrícola y muy alejados del resto, cuando son los que deberían ofrecer una mayor influencia urbana.

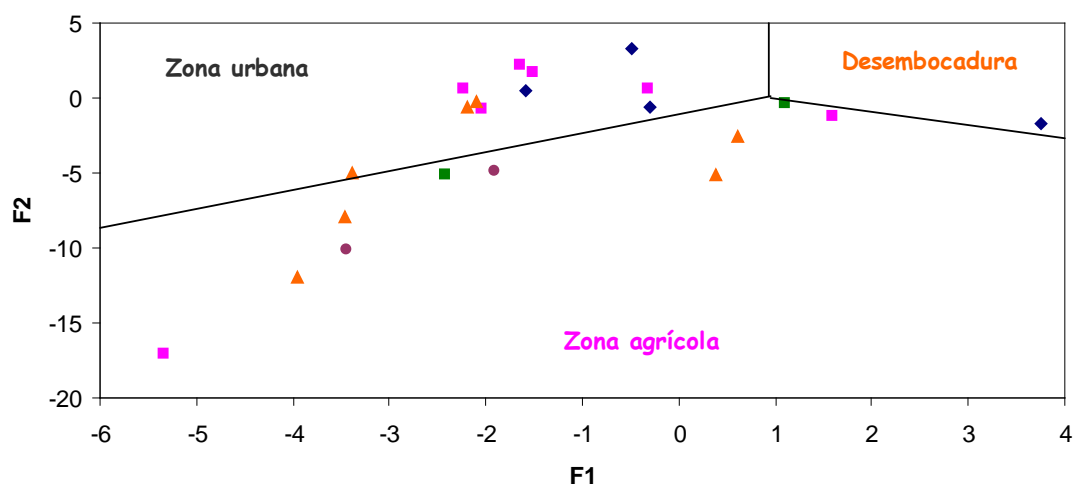


Figura 6-14. Mapa territorial para los muestreos selectivos. G1(■), G5(■), G6(▲), G10(●) y G11(■).

El resto de las estaciones de muestreo se ve afectado también por el efecto del aumento de sólidos en suspensión en el río. Los casos que ofrecen una interpretación más sencilla son las estaciones G10 y G11 que presentan carácter agrícola. El punto G11, aparece y próximo a la línea de frontera entre las zonas agrícola y estuárica; viéndose afectado en cierto modo su carácter agrícola por el estado de la marea y teniendo como consecuencia la entrada de agua de mar fresca.



A continuación se puede estudiar el comportamiento de la estación de muestreo G1, que en el estudio general muestra una calidad similar a la zona del estuario y donde las actividades humanas son típicamente agrícolas. En este estudio después de la lluvia, aparece asociado a la zona urbana del mapa territorial, esto viene a confirmar el efecto observado en los diagramas de cajas y bigotes anteriores, en los que las variables Co y Mn experimentan aumentos importantes para esta estación después de la lluvia. En el resto de los muestreos se presenta en la zona agrícola, haciéndolo de forma más clara en aquellos que corresponden a fechas posteriores a la apertura de la presa de Alcalá del Río.

En último lugar y de forma conjunta se pueden evaluar los efectos de las precipitaciones sobre las estaciones situadas en la ciudad de Sevilla (G5 y G6). Para ambas se observa un cambio a la zona agrícola a partir de noviembre de 2007. Aunque anteriormente, su carácter era netamente urbano.

Como se ha podido comprobar, el efecto que ha tenido la apertura de la presa en el inicio del estuario sobre la distribución de las estaciones de muestreo en el río Guadalquivir es muy importante. Su magnitud es tal que puede enmascarar otros efectos que tengan lugar sobre la caracterización de la contaminación aportada por las precipitaciones, por lo que se ha decidido realizar el análisis discriminante eliminando los sólidos en para comprobarlo.

## Bibliografía

1. Berzas-Nevado, J.J.; Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.; Guzman-Bernardo, F.J., Jiménez-Moreno, M., Ortega-Tardío, S, Sánchez- Herrera Fornieles, M.M.; Martítrn-Nieto Ríos, S. and Doncel- Pérez, A. (2009) *Integrated pollution evaluation of the Tagus River in Central Spain*. Environmental Monitoring and Assessment. **156**, 461-477.
2. Kayhanian, M.; Stransky, C.; Bay, S.; Lau, S-L. and Stenstrom, M.K. (2008) *Toxicity of urban highway runoff with respect to storm duration*. Science of the Total Environment **389**, 386-406.
3. Zhu, Y.; Liu, P.; Liu, H.; Zhang, H. and Chen, L. (2009) *Pollutant washoff characterization of expressway runoff in Shanghai*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **83**, 298-402.
4. Al-Momani, I. F.; Aygun, S. and Tuncel, G. (1998). *Wet deposition of major ions and trace elements in the Eastern Mediterranean basin*. Journal of Geophysical Research **103**, 8287-8299.
5. Dasch, J. M. and Wolff, G. (1989). *Trace inorganic species in precipitation and their potential use in source apportionment studies*. Water, Air and Soil Pollution **43**, 401-412.
6. Galloway, J. N.; Thornton, J. D.; Norton, S. A.; Volchok, H. L.; McLean and R. A. (1982). *Trace metals in atmospheric deposition: A review and assessment*. Atmospheric Environment **16**, 1677-1700.
7. Al-Momani, I.; Momani, K.A.; Jaradat, Q.M.; Massadeh, A.M.; Yousef, Y.A. and Alomary, A.A. (2008) *Atmospheric deposition of major and trace elements in Amman, Jordan*. Environmental Monitoring and Assesment **136**, 209-218.
8. Kang, J-H.; Lee, Y.S.; Ki, S.J.; Lee, Y.G.; Cha, S.M.; Cho, K.H. and Kim, J.H. (2009) *Characteristics of wet and dry weather heavy metals discharges in the Yeonsang watershed, Korea*. Science of the Total Environment **407**, 3482-3493.
9. Sañudo-Wilhelmy, S.A. and Flegal, A.R. (1992) *Anthropogenic silver in the Southern California bight: A new tracer for sewage in coastal waters*. Environmental Science and Technology **26**, 2147-2151.
10. Riba, I.; DelValls, T.A.; Forja, J.M. and Gómez-Parra, A. (2002) *Influence of Aznalcollar mining spillon the vertical distribution of heavy metals in sediments form the Guadalquivir estuary (SW Spain)*. Marine Pollution Bulletin **44**, 39-47.
11. Anatolaki, Ch. and Tsitouridou, R. (2009) *Relationship between acidity and ionic composition of wet precipitacion. A two years study at an urban site. Thessaloniky, Greece*. Atmospheric Research **92**, 100-113.
12. Packett, R.; Dougall, C.; Rohde, K. and Noble, R.; (2009) *Agricultural lands are hot-spot for annual runoff polluting the sourthern Great Barrier Reef lagoon*. Marine Pollution Bulletin **58**, 976-986.
13. Ramis, G. and García, M.C. (2001) *Quimiometría*. Ed. Síntesis, 2001.

14. Miller, J.N. and Miller, J.C. (2005) *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Fifth edition. Pearson Education Limited, Harlow.

## Conclusiones

1. La espectroscopía de absorción atómica en horno de grafito (GFAAS) permite realizar la determinación de metales pesados como Cu y Mn, en agua salina, por el método de las adiciones estándar utilizando calentamientos longitudinal y transversal del horno de grafito.
2. La determinación de Cu y Mn en aguas de estuario se puede realizar de forma directa, utilizando una recta de calibrado con patrones acuosos sencillos mediante calentamiento transversal y aplicando los modificadores de matriz adecuados. Estos son HF/Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> para Cu y Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> para Mn.
3. Se ha validado el método de determinación directa de Cu y Mn en agua de estuario mediante GFAAS y se han identificado las principales fuentes de incertidumbre, siendo estas las operaciones de pipeteo de volúmenes en la preparación de patrones intermedios para la calibración, así como la determinación instrumental, debido a las variaciones en la señal ofrecida por muestras y patrones.
4. La aplicación de un sistema de membrana líquida de volumen (MLV), permite realizar el transporte de Ag utilizando el sulfuro de triisobutilfosfina (TIBPS) como transportador con un rendimiento medio del 59,54% de reextracción.
5. El estudio de blancos del método mediante la técnica de ICP-MS, para 10 medidas repetidas del blanco ofrece un resultado  $7,65 \pm 1,61 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ . Este método errores relativos por debajo del 10% en la determinación de Ag en agua de red y agua natural al nivel de concentraciones de los  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$  cuando se compara con el método de referencia basado en la extracción líquido-líquido con APDC/DDDC.
6. El uso de membranas líquidas soportadas (MLS) en configuración de fibra hueca presenta factores de enriquecimiento de 1000 veces para el transporte de Ag.
7. Este método presenta una concentración media de los blancos de  $1,76 \pm 0,19 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ . Además se ha realizado la determinación de diferentes muestras reales, obteniéndose errores relativos inferiores al 10% a niveles de  $2 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ .

8. El sistema de MLV propuesto se ha utilizado para el fraccionamiento de Ag en aguas naturales. El sistema ha mostrado la capacidad de discriminar la  $Ag^+$  de la unida a materia orgánica y la que se encuentra formando complejos clorados.
9. La determinación de Carbono total, carbono inorgánico y nitrógeno total disuelto en aguas naturales está afectada por la salinidad de las muestras, por lo que es necesario utilizar una curva de calibración distinta para rangos de salinidad de 5 unidades.
10. No se han apreciado diferencias estacionales en la distribución y concentración de contaminantes en el estuario del río Guadalquivir. Sin embargo si se han observados cambios en la concentración de algunas variables como SST y SSV entre los años 2007 y 2008. Además se han apreciado diferencias temporales entre muestreos para algunas variables, siendo destacable oxígeno disuelto, amonio y nitrato en el primer muestreo con respecto de los siguientes, en coincidencia con un episodio de Bloom algal.
11. La distribución espacial de los contaminantes no se ha visto afectada a lo largo del periodo de estudio salvo para las variables sólidos en suspensión y sólidos volátiles. Estas variables aparecen ligadas en el año 2007 a la zona agrícola, mientras que en 2008 se ha producido un aumento a tener en cuenta en la zona urbana.
12. El estuario del río Guadalquivir se puede dividir en tres zonas en base a la calidad de sus aguas:
  - La primera zona abarca las estaciones de muestreo G2-G8, y es fundamentalmente de influencia urbana, representada por valores elevados de la concentración de las variables Pb, Co, Ni, Mn, NTD,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $NH_4^+$  y  $PO_4^{3-}$ . Además se observan en esta zona valores mínimos de pH y OD.
  - La segunda zona abarca la parte central del estuario y se relaciona con actividades agrícolas (G9-G11). En esta región se pueden considerar como representativas las variables SST y SSV-07, así como el COD.
  - La zona final del estuario comprende las estaciones más próximas a la desembocadura (G12-G14), donde variables como pH, OD, salinidad, Cd, Cu, CTD y CID presentan valores máximos. De entre estas variables, el

Cd presenta una variación lineal con el aumento de salinidad que permite considerar su comportamiento en el estuario como conservativo.

- Como caso particular, la estación situada en la cabecera del estuario (G1), enmarcada en una zona agrícola con cierta influencia urbana, presenta una calidad de aguas similar a las de la desembocadura.

13. El Co se puede utilizar como trazador de la actividad urbana en el río Guadalquivir. Además la relación de concentración existente Co/Cd permite determinar el carácter urbano de la presencia de este metal.
14. Los afluentes del río Guadalquivir tienen influencia en la calidad de sus aguas, siendo de especial importancia el río Guadaira como vehículo de contaminación urbana, procedente de efluentes de EDARUs en la zona central del río. Por otro lado, la dársena del río Guadalquivir se podría considerar un foco de concentración de Ag que se podría relacionar con actividades industriales. El resto de afluentes estudiados: Rivera de Huelva y Río Guadiamar no presentan efectos considerables.
15. Las lluvias que han tenido lugar durante el periodo de estudio se han mostrado como una entrada de contaminación de tipo urbano tanto en la cabecera del estuario (G1), contribuyendo a un aumento de la concentración de Co y Mn como en la zona urbana, donde se han registrado concentraciones más elevadas de Cd en la zona urbana (G5 y G6).

## English summary

<b>1. Introduction .....</b>	<b>299</b>
<b>2. In-house validation of direct Cu and Mn determination by Atomic Absorption Spectrometry in estuarine waters.....</b>	<b>301</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>301</b>
<b>Materials and methods .....</b>	<b>302</b>
<b>Results and discussion .....</b>	<b>302</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>308</b>
<b>Bibliography .....</b>	<b>309</b>
<b>3. Chemical speciation of Ag in natural waters based on a liquid membrane system ....</b>	<b>313</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>313</b>
<b>A new contamination-free method for the determination of traces of anthropogenic silver in freshwaters.....</b>	<b>315</b>
<b>Determination of silver ultra-traces in natural waters by hollow fiber liquid membrane based technique .....</b>	<b>321</b>
<b>Application of liquid membranes to the chemical speciation on silver in natural waters .....</b>	<b>324</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>328</b>
<b>Bibliography .....</b>	<b>329</b>
<b>4. Chemometric-assisted study of atmospheric and fluvial pollutant inputs in the Guadalquivir River estuary.....</b>	<b>331</b>
<b>Material and methods.....</b>	<b>332</b>
<b>Results and discussion .....</b>	<b>335</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>350</b>
<b>Bibliography .....</b>	<b>351</b>





## Introduction

Pollution control of natural water resources has become a necessity since this precious good presents economical, environmental and health implications. Besides, water pollution levels are related with human land uses; namely, industrial, urban, and agricultural activities have to be taken into account.

Among the different pollutants, which may be present in natural waters, inorganic nutrients and heavy metals are of main importance. On the one hand, Nutrients are often related with urban and agricultural activities, leading to eutrofication episodes. On the other hand, heavy metals are interest is due to their toxicity and bioaccumulability at very low concentrations.

Taking this into account, new strategies for the establishment of natural waters quality is essential. In this sense, new analytical methods and the use of chemometrics are required to obtain reliable results and conclusion. Then, in this work the development of new methods for heavy metals quantification has been conducted. Moreover, chemometrics have been employed for the interpretation of environmental data.

In particular, the determination of heavy metals in estuaries presents inconvenients due to the increasing salinity near to the river mouth. Thus, optimizing the direct determination of heavy metals, free of matrix effects, is desired in terms of accuracy, economy and the generation of residues. Moreover, the validation of these methods allows the comparability of the results obtained in different laboratories.

The total concentration of heavy metals in natural waters is an important parameter to understand their behaviour. However, knowing the distribution of the different species of a metal in the environment is more interesting. This fact, is supported by the different toxicity of the different species. With this in mind, Liquid Membranes (LM) started to be applied in 1990s as a clean technique for the determination of heavy metals ultra-traces and the speciation of their fractions.

Finally, once the analytical information has been generated, chemometrics can be used in its interpretation. In particular, the use of multivariate analysis appears as a useful tool to asses relationships among sampling sites and variables that can be used as tracers for human activities. Even more, they can be used to create prediction models that allow determining the characteristics of pollution inputs in natural systems.



# In-house validation of direct Cu and Mn determination by Atomic Absorption Spectrometry in estuarine waters

## Introduction

Heavy metals are considered important pollutants of natural waters. For instance, Cu and Mn have environmental implications, affecting to aquatic life [1]. Since these metals present concentrations in the level of  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  or below [2,3]. Due to the increasing salinity alongside estuaries, direct determinations are not possible using spectrometric techniques without sample pre-treatment. The aim of the present work is measuring heavy metals in estuarine samples directly. Thus, Graphite Furnace Atomic Absorption Spectroscopy (GFAAS) is offered as an alternative for free-handling and direct determination of metals in estuarine samples [4]. Two options are presented depending on the heating of the graphite furnace: longitudinal [5] or transversal [6], the last one with L'vov platform [7]. Finally, the comparison of longitudinal and transversal heating adaptability to the increasing saline content of samples allows selecting the most adequate technique for direct determination of Cu and Mn.

GFAAS were previously reported for analyzing these metals in relatively saline samples [5,8]. Moreover, different furnace program conditions and the use of matrix modifiers were employed to maximize sensitivity and to minimize matrix effects. For the both metals (Cu and Mn), the most used matrix modifiers could be divided into two groups: the first one is formed by substances that react with salts in the sample at low temperature; the second one is constituted by chemicals that retain the metal at high temperature in the graphite tube during the ash step [9]. As an example, López García et al., [10] postulated the use of HF to eliminate NaCl of saline samples during the drying step of the graphite furnace program. Furthermore, this modifier was applied for Cu and Mn determination [11]. In addition, a cooling step can be employed between the ashing and atomization steps to avoid sample condensation inside the tube extremes [8], when using longitudinal heating in conjunction with matrix modifiers.

Validation of analytical methods is essential to guarantee their applicability. With this in mind, the aim of validation procedures is confirming that the proposed method is suitable for resolving real analytical problems. Moreover, different validated methods allow comparing

measures conducted in diverse laboratories for the same analyte. Hence, the fitness for purpose of new methods is necessary to offer reliable analytical information [12].

In order to offer reliable results, giving accurate measurements is as important as knowing the uncertainty contribution of each step on the final result. Actually, this is agree with the concept of traceability [13]. In the background of traceability, appears the concept of uncertainty as “a parameter associated with the result of a measurement, that characterises the dispersion of the values that could be reasonably be attributed to the measurand” [14].

Firstly, the problem needs to be formulated. Moreover, agree with the EURACHEM/CITAC guidelines [12], the traditional concept of analyte should be substituted by the idea of measurand. This concept takes into account the analyte, the sample matrix and, pre-treatments [14].

## Materials and methods

- Analytical Instruments

Two atomic absorption spectrophotometers have been used. In both cases Cu and Mn were measured at a wavelength of 324.8 nm and 279.5 nm respectively. For longitudinal heating of the graphite furnace a UNICAM-M Series GF-95 was employed, while in the case of transversally heated furnaces, a AAnalyst-800 was used (Perkin Elmer, USA). Graphite tubes for transversal heating had an L'vov platform installed; however, the ones applied for longitudinal heating did not have it. Different hollow cathode lamps were used for different instruments, being purchased from Perkin Elmer (USA) in the case of transversal heating and from Thermo (UK) in the case of longitudinal. For background correction, both Zeeman and deuterium lamp were utilized in the longitudinal heating instrument, but for the transversally heated tubes, the instrument only uses the Zeeman effect correction.

## Results and discussion

- Optimization of Mn and Cu determination

For the both metals, analysis conditions were optimized for longitudinally and transversally heated graphite furnaces. In the case of the longitudinal one, Zeeman Effect and D<sub>2</sub> lamp were employed, while for transversal heating only Zeeman Effect was used. In addition, matrix modifiers were applied to minimize matrix effects, and also the graphite furnace conditions were optimized.

- Cu and Mn atomization

In the case of Mn, 5 µg of Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> per 20 µL samples were added as matrix modifier. Afterwards, ash/atomization diagrams were constructed to obtain optimum conditions for both types of heating using Zeeman and Deuterium correction. On the one hand, the required ash temperature when Zeeman Effect is applied is higher than for D<sub>2</sub> Lamp. On the other hand, optimum atomization temperature is lower in the case of Zeeman Effect. Optimized conditions are presented in Table 1.

Table 1. Optimized conditions for Mn

Step	Dry1	Dry2	Ash		Atomizationn	Clean-out
Temperature (°C)	110	130	Transversal <sup>1</sup>	1300	1900	2450
			Longitudinal <sup>1</sup>	1300	1900	
			Longitudinal <sup>2</sup>	1150	2200	
Ramp (°C·s <sup>-1</sup> )	1	15	10		0	1
Time (s)	20	15	20		3	3
Measurement					on	
Gas flow (L·min <sup>-1</sup> )	250	250	250			250

<sup>1</sup> Background correction, Zeeman.

<sup>2</sup> Background correction, D<sub>2</sub>.

For Cu, 8 µg of HF and 5 µg per 20µL samples were needed to avoid matrix effects. In this case, ash/atomization optimization study showed that for longitudinal heated tubes, softer conditions are required. Optimized conditions are presented in Table 2.

Table 2. Optimized conditions for Cu

Step	Dry1	Dry2	Ash		Atomizationn	Clean-out
Temperature (°C)	110	130	Transversal <sup>1</sup>	1200	2150	2450
			Longitudinal <sup>1</sup>	950	1950	
			Longitudinal <sup>2</sup>	950	1950	
Ramp (°C·s <sup>-1</sup> )	1	15	10		0	1
Time (s)	20	15	60		3	3
Measurement					on	
Gas flow (L·min <sup>-1</sup> )	250	250	250			250

<sup>1</sup> Background correction, Zeeman.

<sup>2</sup> Background correction, D<sub>2</sub>.

- Matrix influence on Cu and Mn determination

Once operational conditions were optimized, the direct determination suitability was compared with the standard additions method. For this reason, a *t-Student* test was carried out. For Mn, no significant differences are observed when D<sub>2</sub> lamp is used in the case of longitudinal heating; however, for the Zeeman Effect, only transversal heating does not offer

statistical differences between the both methods. The same trend could be observed for Cu, but in this case the use of matrix modifiers is essential.

Finally, accuracy was compared against the certified reference material CRM-SLEW-3. The direct determination of Cu and Mn is accurate only in the case of transversally heated furnaces and always in the presence of matrix modifiers.

- Method validation

In order to evaluate the fitness for purpose of the method, confirmation of identity and selectivity, limit of detection and quantification, linear range, trueness, bias, robustness, sensitivity, and uncertainty must be taken into account [12].

Confirmation of has been evaluated comparing the results of the proposed method with reference methods such as the direct ICP-MS determination in the case of Mn and the liquid-liquid extraction with APDC/DDDC followed by ICP-MS determination for Cu [15]. In both cases, 8 samples with salinity 1-30 were analysed and no significant differences were observed. Selectivity is marked by the characteristics of the employed technique, and its study has been completed during the optimization process were the direct determination and the standard additions method were compared (Figure 1).

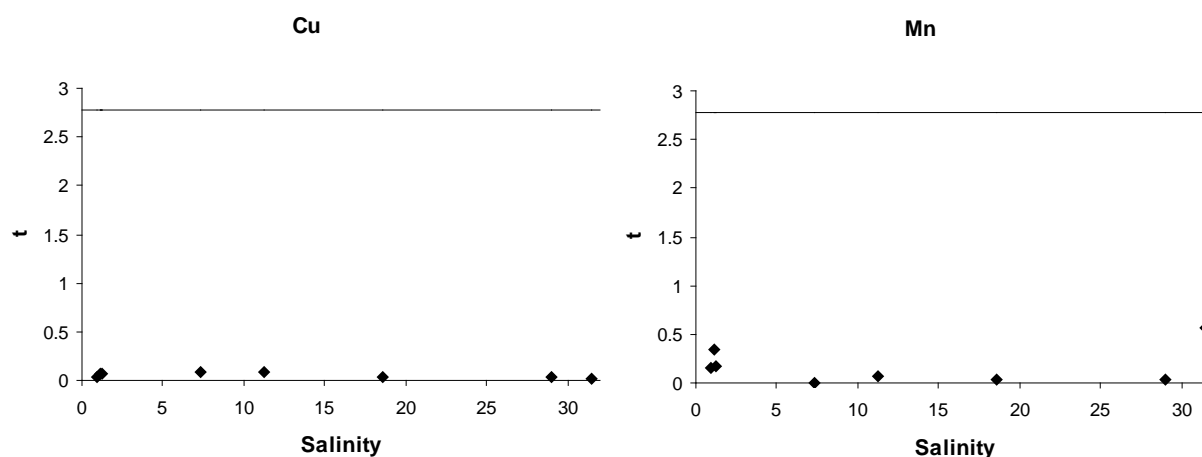


Figure 1. Confirmation of identity for Cu and Mn.

On the one hand, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) define the minimum levels of analyte which gives a signal that can be distinguished from the blank. LOD was determined as  $(Y_b + 3S_b - n)/m$ , while  $LOQ = (Y_b + 10S_b - n)/m$  [16]. In particular, LOQ was  $0.46 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for Cu and  $0.33 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for Mn. On the other hand, the linear range determines the maximum concentration of application. It was evaluated using a quality

coefficient (QC%) (1), which determines the deviation of the experimental concentration of the standards from the calibration curve. A QC(%) value of 5% when a new standard is included was used to determine the linear range, which corresponds to  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  for both metals [17]. Finally, sensitivity was defined as the gradient of response of the method, and it can be related with the slope of the calibration curve, being higher in this case for Mn determination.

$$QC(\%) = 100 \cdot \sqrt{\frac{\left(\frac{Y_i - \hat{Y}}{\bar{Y}}\right)^2}{N-1}} \quad (1)$$

Trueness was evaluated on the basis of accuracy and precision. The first one is related with the recovery of analyte concentration when compared with a reference value. In this work a certified reference material SLEW-3 of estuarine water, corresponding to a 96.8% for Cu and a 104.9% in the case of Mn (Figure 2). Secondly, precision was evaluated in terms of repeatability, measuring 3 replicates of 3 samples during the same day, with a value of 99.54% for Cu and 97.42% for Mn; but also in terms of reproducibility, measuring 3 replicates of 4 samples analyzed each six months during 2 years, with a 98.22% for Cu and 95.66% for Mn.

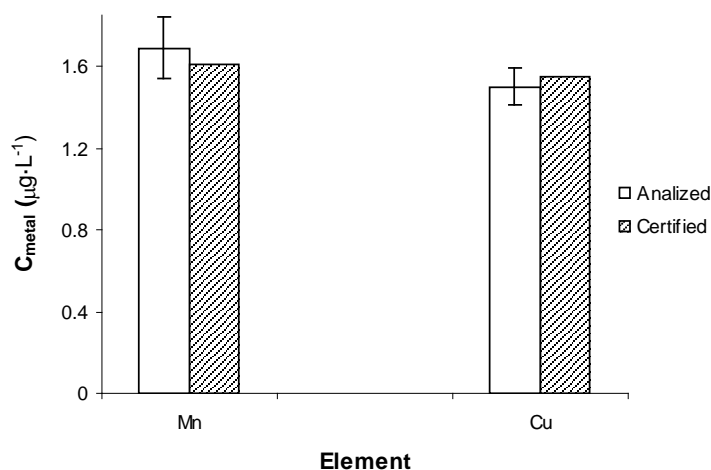


Figure 2. Recovery(%) for Mn and Cu determination

Differences in the results when conditions of application are changed can be assessed as robustness and recovery analysis. Robustness was evaluated as the influence of the environment in the laboratory, measuring the loss of solvent when samples are left in the autosampler during a period of time, being recommended to do not leave them for more than 120 minutes. Recovery analysis allowed determining the effect of salinity on method response



for known additions of analyte concentration. Average recovery for Cu was 97.5% while for Mn was 93.6%, when 6 samples with salinity from 1 to 30 were analyzed.

- Uncertainty

Uncertainty ranges all possible experimental sources of variability of the results [18]. In order to obtain the method global uncertainty, each source of deviation has to be independently studied ( $u_s$ ); afterwards a combined uncertainty is calculated ( $u_c$ ) applying the errors propagation law (2). The last step is the establishment of the expanded uncertainty ( $U$ ), which results from multiplying  $u_c$  by a covering factor  $k$  ( $k=2$ , for 95% confidence level) [12]. Needed calculations, were run using the Kragten method [19] in an Excel ® sheet.

$$u_y^2 = \left(\frac{\partial y}{\partial p}\right) \cdot u_p^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial q}\right) \cdot u_q^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial r}\right) \cdot u_r^2 + \dots + 2\rho_{pq} \cdot \left(\frac{\partial y}{\partial p}\right) \cdot \left(\frac{\partial y}{\partial q}\right) \cdot u_p \cdot u_q + \dots \quad (2)$$

In the present work several steps have to be taken into account [31]: preparation of an intermediate calibration standard from a certified one, preparation of calibration standards, instrumental measurement, and determination of metal concentration applying a calibration curve. All this sources of uncertainty can be summarized in a cause-effect diagram (Figure 3).

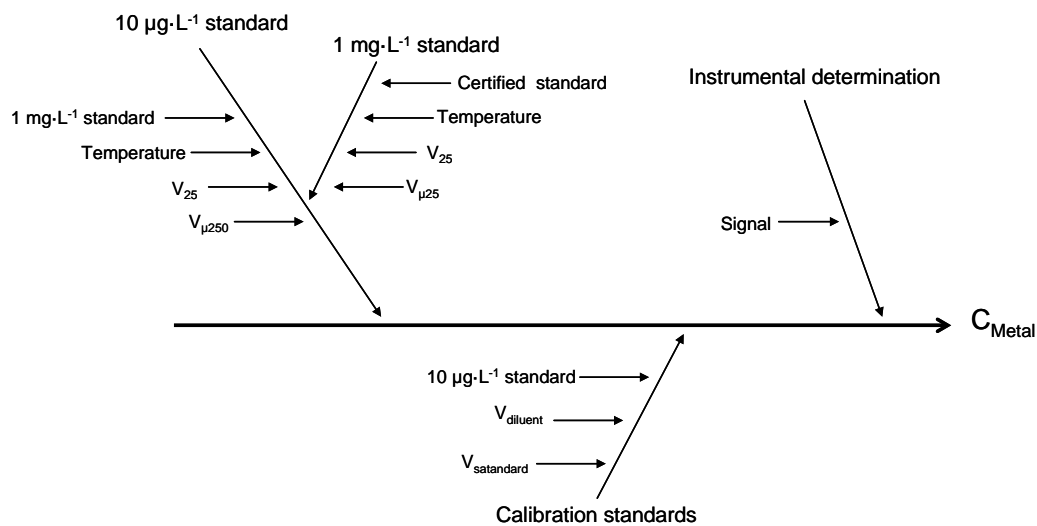


Figure 3. Cause-effect diagram for Cu and Mn analysis

For volumetric operations, also the effect of temperature was taken into account [21], and in all cases, the experimental uncertainty due to 10 replicates was also included for standard uncertainty determination (3). Finally,  $u_c$  calculi are referred to the determination of metals in the SLEW-3 sample.

$$u_c = \sqrt{\left(\frac{u_{cert}}{\sqrt{6}}\right)^2 + (u_{rep})^2 + \left(\frac{u_{temp}}{\sqrt{3}}\right)^2} \quad (3)$$

For both metals, the preparation of a  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  intermediate standard was conducted by dilution from a  $1000\pm 2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  certified one, via the preparation of  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  standard solution (4). A relative standard uncertainty of 2.54% was obtained for the intermediate standard preparation. Uncertainty of this step is influenced mainly by pipeting 25  $\mu\text{L}$  (72.2%).

$$C_{10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}} = C_{Cert.Std.} \cdot \left(\frac{V_{\mu 25}}{V_{25}}\right) \cdot \left(\frac{V_{\mu 250}}{V_{25}}\right) \quad (4)$$

In the case of calibration standards, preparation was conducted employing the instrument auto-sampler from the intermediate one. The auto-sampler injects constant volume aliquots in the graphite tube, varying the amount of the diluent and the standard, as observed in equation 5. Until this step the  $u_c$  value for both metals coincides since the certified standard and employed materials have the same characteristics, being 2.98% RSu in the case of a  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  standard. The most important source of uncertainty in this case corresponds to the intermediate standard (72.9%).

$$C_{Calib.Std.} = C_{Std. 10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}} \cdot \frac{V_{Std.}}{V_{Std.} + V_{dil.}} \quad (5)$$

Metallic concentrations were calculated after instrumental determination by interpolation between the immediately upper and lower standards (6). The uncertainty of this step corresponds to the standards preparation and the signal of samples and standards. In this case RSu(%) is 2.69% for Cu and 6.62% for Mn. These differences are due to Cu concentration is mainly affected by the deviation of the signal of the sample (68.1%), while for Mn it is affected mostly by the signal of the  $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  standard (62.9%).

$$C_{Metal} = \frac{C_{Lower std.} \cdot (S_{Upper std.} - S_{sample}) + C_{Upper std.} \cdot (S_{sample} - S_{Lower std.})}{S_{Upper std.} - S_{Lower std.}} \quad (6)$$

Finally,  $U$  was calculated multiplying  $u_c$  by a covering factor  $k=2$ . Then, the results can be expressed as the *analyte concentration*  $\pm U$ . In the case of Cu a concentration of  $1.63\pm 0.09 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  was determined, in good agreement with the reference value of  $1.55\pm 0.12 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . For Mn  $1.72\pm 0.23 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  were obtained, and can be compared with the reference material  $1.66\pm 0.22 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figure 4).

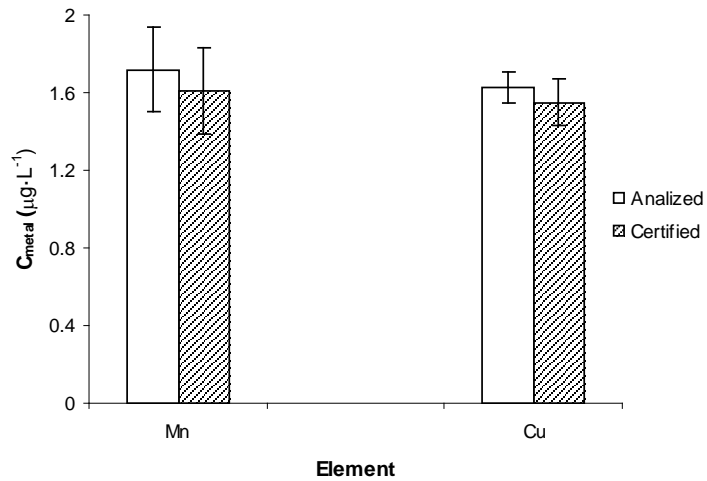


Figure 4. Comparison between analyzed and certified concentrations

### Conclusion

In conclusion, the use of GFAAS allows the direct determination of Cu and Mn in estuarine waters when transversal heating, the corresponding matrix modifiers and proper termic conditions are used. Furthermore, the validation of the method permits to obtain reliable concentrations data, and also establish the sources of uncertainty.

## Bibliography

1. Frías-Espericueta, M.G.; Voltolina, D.; Osuna-López, I. and Izaguirre-Fierro, G (2009) *Toxicity of metal mixtures to the pacific White shirmp *Litopenaeus vannamei* postlarvae*. Marine Environmental Research **68**, 223-226.
2. Mendiguchía, C.; Moreno, C. and García-Vargas, M. (2007) *Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients*. Chemosphere **69**, 1509-1517.
3. Thévenot, D.R.; Moilleron, R.; Lestel, L.; Gromaire, M.C.; Rocher, V, Cambier, P.; Bonté, P.; Colin, J.L.; Pontevés, C. and Meybeck, M. (2007) *Critical budget of metal sources and pathways in the Seine River basin (1994-2003) for Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb and Zn*. Science of the Total Environment **375**, 180-203.
4. Cabon, J.Y. and Le Bihan, A. (1995) *The determination of Cr, Cu and Mn in seawater with transversally heated graphite furnace atomic absorption spectrometry*. Spectrochimica Acta Part B, Atomic Spectroscopy **50**, 1703-1716.
5. Slavin, W. (1988) *Graphite furnace AAS for biological materials*. Science of the Total Environment **71**, 17-35.
6. Mariconti, F. (1992) *Latest innovation in graphite furnace atomic absorption spectrometry technique*. Microchemical Journal **46**, 418-421.
7. L'vov, B.V. (1990) *Recent advances in absolute analysis by graphite furnace atomic absorption by graphite furnace spectrometry*. Spectrochimica Acta Part B **45**, 633-655.
8. Pi-Guey, S. and Shang-da, H. (1998) *Direct and simultaneous determination of copper and manganese in seawater with a multielement graphite furnace atomic absorption spectrometer*. Spectrochimica Acta Part B; Atomic spectrometry **53**, 699-708.
9. Welz, B.; Schlemmer, G. and Mudakavi, J.R. (1992) *Palladium-nitrate magnesium-nitrate modifier for electrothermal atomic absorption spectrometry. Part 5. Performnce for the determination of 21 elements*. Journal of Analytical Atomic Spectrometry **7**, 1257-1271.
10. López-García, I.; Sánchez-Merlos, M. and Hernández-Córdoba, M. (1999) *Use of hydrofluoric acid to decrease the background signal caused by sodium chloride in electrothermal atomic absorption spectrometry*. Analitica Chimica Acta **396**, 279-284.
11. Cabon, J.Y. (2002) *Determination of Cu and Mn in seawater by graphite furnace atomic absorption spectrometry with the use of hydrofluoric acid as a chemical modifier*. Spectrochimica Acta Part B, Atomic Spectroscopy **57**, 939-950.
12. *The fitness for purpose of analytical methods* (1998) Eurachem. First Edition.
13. *Traceability in Chemical measurements* (2003) Eurachem/CITAC. Eds., Ellison, S.L.R.; King, B.; Röslein, M.; Salit, M. and Williams, A.
14. International vocabulary in metrology: Basic and general concepts and associated terms (VIM) (2008) JCGM ©.
15. Pino, V.; Hernández-Martín, I.; Ayala, J.H.; González, V. and Alfonso, A.M. (2007) *Evaluation of the uncertainty associated to the determination of heavy metals in seawater using graphite furnace atomic absorption spectrometry*. Analytical letters **40**, 3322-3342.

16. Miller, J.N. and Miller, J.C. (2005) *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Fifth edition. Pearson Education Limited, Harlow.
17. Vankeerberghen, P. and Smeyers-Verbeke, J. (1992) *The quality coefficient as a tool in decisions about the quality of calibration in graphite furnace atomic absorption spectrometry*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **15**, 195-202.
18. *Quantifying uncertainty in analytical measurements* (2000) Eurachem/CITAC, Second Edition. Eds., Ellison, S.L.R., Rosslein, M.; Williams, A.
19. Kragten, J. (1994) *Tutorial review. Calculating standard deviations and confidence intervals with an universally applicable spreadsheet technique*. *The Analyst* **119**, 2161-2165.
20. Maroto, A.; Riu, J.; Boqué, R.; Rius and F.X (1999) *Estimating uncertainty in routine analysis*. *Trends in Analytical Chemistry* **18**, 577-584.
21. Duta, S.; Robouch, P.; Barbu, L. and Taylor, P. (2007) *Practical aspects of the uncertainty and traceability of spectrochemical measurement results by electrothermal atomic absorption spectrometry*. *Spectrochimica Acta Part B* **62**, 337-343.





# Chemical speciation of Ag in natural waters based on a liquid membrane system

## Introduction

Silver total concentration has been used as a tracer for urban activities because its employment in photographic and film industry [2]. Although these uses have decreased with the use of digital technologies, new applications such as biocide for medical, textile, and self-care products have appeared [2,3]. Despite, this interest silver determination in natural waters presents difficulties due to its low concentration in pristine ( $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [4] and polluted ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [5] waters. Furthermore, speciation of silver is then of main importance since the different toxicity its different fractions. While free silver is not toxic for humans, it presents influence on aquatic life [6]. Moreover, the chloro-complex  $\text{AgCl}^0$  is the most toxic specie, while the next  $\text{AgCl}_n^{(n-1)-}$  are less toxic when n value increases [7]. Besides Ag accumulation is dependent on the COD concentration and salinity of water.

As a consequence of its low concentration and matrix effects, very sensitive techniques combined with pretreatment procedures have to be applied for its determination; mainly liquid-liquid extraction has been used [8]. Liquid-liquid extraction is tedious and generates important amounts of residues, but something essential in the case of traces analysis is avoiding sample handling contamination risk. Therefore, liquid membranes constitute a free-of-handling alternative -previously applied for determination of heavy metals in natural waters [9].

The use of liquid membranes (LMs) as a sample pretreatment technique is related to their ability to perform analyte enrichment as well as sample-matrix separation. This procedure has been followed since their first applications within the hydrometallurgical industry in the 1970s [10]. Among the different advantages of LMs, when compared to the LLE and SPE techniques, are lower sample volume, cost and time of analysis [11]. Besides, LMs enable higher analyte-enrichment factors and selectivity [10]. Furthermore, LMs are greener than LLE and SPE, since they involve lower volumes of organic reagents, and are suitable for easy miniaturization and automation, offering an excellent sample treatment alternative for “green” analytical chemistry [13].

Many LM configurations are described in the literature, although they can be classified into three basic types: bulk LMs (BLMs); emulsion LMs (ELMs); and, supported LMs



(SLMs). BLMs need a considerable volume of organic phase separating the donor and the receiving phases to allow analyte transport from the former to the latter [5]. Nevertheless, the main function of BLMs is to optimize data for ELMs and SLMs, given their low interfacial surface areas and mass transfer rates [15]. ELMs comprise a water-in-oil-in-water emulsion (formed by an organic solvent and surfactant-stabilized water) stirred into an aqueous source solution. The disadvantages of this configuration relate to emulsion stability and breakage [15]

Finally, SLMs are undoubtedly the most extensively used LMs due to their high enrichment factor, low reagent consumption and wide variety of configurations. The organic phase in SLMs is used to impregnate the pores of the hydrophobic polymeric membrane separating donor and acceptor solutions. In the case of HF configuration, the hydrophobic support is tubular. One of the aqueous solutions flows inside the tube and the other remains outside. This configuration provides a very large surface area, thus leading to very high enrichment factors [44].

Facilitated transport of silver through a liquid membrane may be carried out by means of a variety of chemical carriers, most of them containing donor electron atoms such as N, O or S to bond the metal [33,19], with decreasing stability  $S < O < N$  following Pearson's HSAB order [20]. Among the commercial carriers for silver extraction that contains sulphur, triisobutylphosphine sulphide, TIBPS (Cyanex 471X ©) is a solvating reagent that allowed the selective recovery of high concentrations of silver from acidic hydrometallurgical wastes [39] (Figure 5). Besides, Vajda et al. [41] studied the extraction equilibrium of silver by TIBPS liquid BLM system.

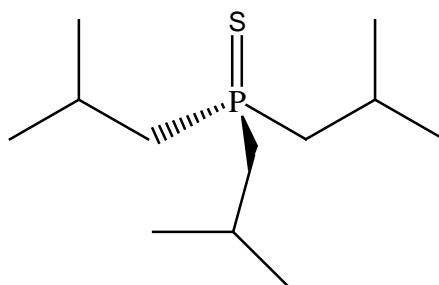


Figure 5. Tri-isobutylphosphine sulphur

Heavy metals speciation by the use of liquid membranes has been previously reported. This methodology is based on the different transport efficiency of metals through the membranes in presence of different ligands [43]. Bayen et al. [24] studied the influence of  $Cl^-$

and  $\text{CO}_3^{2-}$  on Cd, Cu and Pb transport through liquid membranes to establish their complexation. Hollow fibers have been employed in heavy metals speciation [25,26]; for instance, Romero and Jönsson (2005) [27] used them for Cu speciation in natural waters, studying the influence of humic acids and estimating this way, the Cu labile fraction

### A new contamination-free method for the determination of traces of anthropogenic silver in freshwaters

Liquid membranes appear as an useful tool for the quantification of heavy metals. They offer a clean alternative, for water samples pre-treatment. In this work, the study of a liquid membrane system for the analysis of silver ultra-traces has been conducted. In order to optimize the system, the influence of different ligands, which are present in natural waters, and physic-chemical variables have been study.

- Materials and methods

- Apparatus

Liquid-liquid extraction experiments were performed using screw cap tubes shaken in a REAX2 (Heidolph Instruments, Germany) overhead shaker. Liquid membrane experiments were carried out using a homemade glass beaker-in-a-beaker type cell which consisted in two concentric beakers, containing the sample (external beaker, 75 mm inner diameter, 160 ml volume) and the receiving solution (internal beaker, 25 mm inner diameter, 24 ml volume) (Figure 6). Aqueous solutions were stirred with a model Ikamag-RH magnetic stirrer (Janke & Kunkel, Germany). Concentrations of silver in aqueous solutions were measured by a SolaarM Atomic Absorption Spectrometer (Thermo Scientific, USA) and an X7 Quadrupole ICP-MS (Thermo Scientific, USA). A model 4330 pH-meter (Jenway, UK) was used to measure pH.

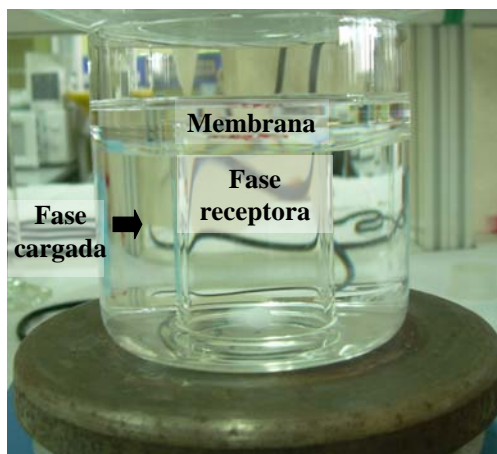


Figure 6. BLM system employed for Ag transport

- Procedure

Solvent Extraction Experiments:

Several experiments were performed to evaluate the influence of pH (1-9) in the extraction of silver by TIBPS from nitrate media and the effect of potential interfering anions present in freshwaters ( $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{Cl}^-$ ). Experiments were performed with  $1\text{ mg L}^{-1} \text{ Ag}^+$  and the corresponding interfering ions at a fixed pH. Aqueous solutions were mixed for 20 minutes with 4.5mM TIBPS in toluene (molar ratio 1:500 Ag:TIBPS). After that, the remaining concentration of silver in the aqueous solution was measured by flame atomic absorption spectroscopy (F-AAS). To study the re-extraction process,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  and  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  were evaluated.

Liquid Membrane Experiments

The transport of silver took place from the external aqueous solution (sample) to the inner one, through the organic layer containing the chemical carrier, TIBPS (Figure). In this case, 36 mL of organic solution were used. To optimise the system, 2-hour experiments were performed and 1.6-mL aliquots of stripping solution were taken every 30 minutes to measure silver concentration, while 1.6ml of clean solution were added to keep the volume constant. After F-AAS measurement, silver concentrations were corrected taking into account the metal amount contained into the aliquots of receiving solution previously removed. The system was optimized in terms of chemical composition of feed and stripping solution as well as TIBPS concentration in the organic phase. To characterize silver transport through the liquid membrane we use the permeability coefficient ( $P$ ) [4]:

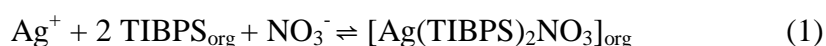
$$-Ln[Ag] = \frac{S}{V_f} \cdot P \cdot t - Ln[Ag]_0$$

Where  $S$  is the effective membrane area,  $V_f$  the volume of sample, and  $[Ag]_0$  and  $[Ag]$  are the silver concentration in the sample at time 0 and  $t$ , respectively.

- Results and discussion

- Liquid-liquid extraction

The extraction process is based on the co-extraction of nitrate ions [38](1). A nitrate concentration of  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  or higher was needed for a quantitative extraction of  $1 \text{ mg L}^{-1}$  silver ions.



To evaluate the effect of other anions that may be present in freshwaters, different concentrations of  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  (2.5-10 mM) and  $\text{Cl}^-$  (0.001-35  $\text{g L}^{-1}$ ) were added to a feed solution. For each anion, the extraction was studied between pH 1 and 9. No influence in the extraction of silver was observed, except for sulphate anions, which precipitates silver and strongly inhibits its extraction for  $\text{pH} > 8$  and  $[\text{SO}_4^{2-}] > 5 \text{ mM}$ .

The reextraction of silver from an organic solution containing TIBPS by  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  and  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  became independent on reagent concentration, but while quantitative silver reextraction was obtained with sulphite (10 mM), thiosulphate allowed recovering about 85%.

- Bulk liquid membrane

### System optimization

The BLM system is based on the following chemical equilibrium (Figure 7):

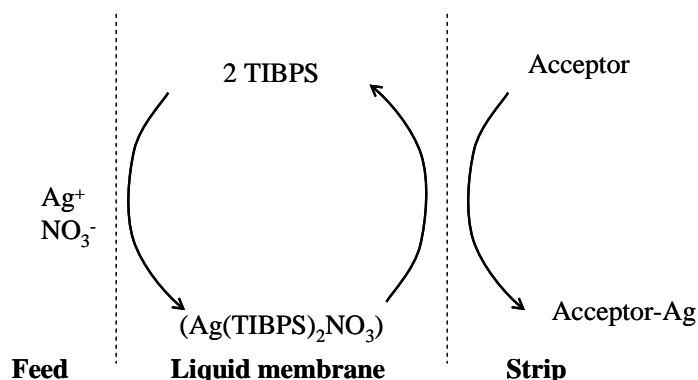


Figure 7. Ag transport through a liquid membrane using TIBPS as carrier.

The system was optimised by studying both chemical and hydrodynamic variables controlling its performance (Figure 8). An increase in  $P$  is observed with nitrate addition, up

to 0.1 mM, and then, silver permeation decrease. This fact may be related to the predominance of the two silver species formed in organic solution. At lower nitrate concentration  $\text{Ag}(\text{TIBPS})_2\text{NO}_3$  will be the predominant species and when nitrate concentration increases the predominance of  $\text{Ag}_2(\text{TIBPS})_3(\text{NO}_3)_2$  increases as well, and it probably presents a lower permeation through the liquid membrane. As optimum nitrate concentration, 0.1 mM was selected. The influence of the concentration of TIBPS in the liquid membrane was studied within the range 1-18 mM. As reported in figure 3,  $P$  increased up to 4.5 mM (selected as optimum), and then, the transport of silver through the membrane became independent on carrier concentration. A similar behaviour was observed when the concentration of  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  in the stripping solution was studied. In this case, a concentration of 10 mM was selected as optimum value. Once the chemical variables were optimised, the hydrodynamics of the system were also studied, in terms of variation of  $P$  with stirring rate. As expected, the higher the stirring rate, the better the mixing of the interfaces and then, as may be seen, the permeability coefficient increased from 100 up to 900 r.p.m. For higher rates, the membrane was broken and mixing of both aqueous solutions was observed.

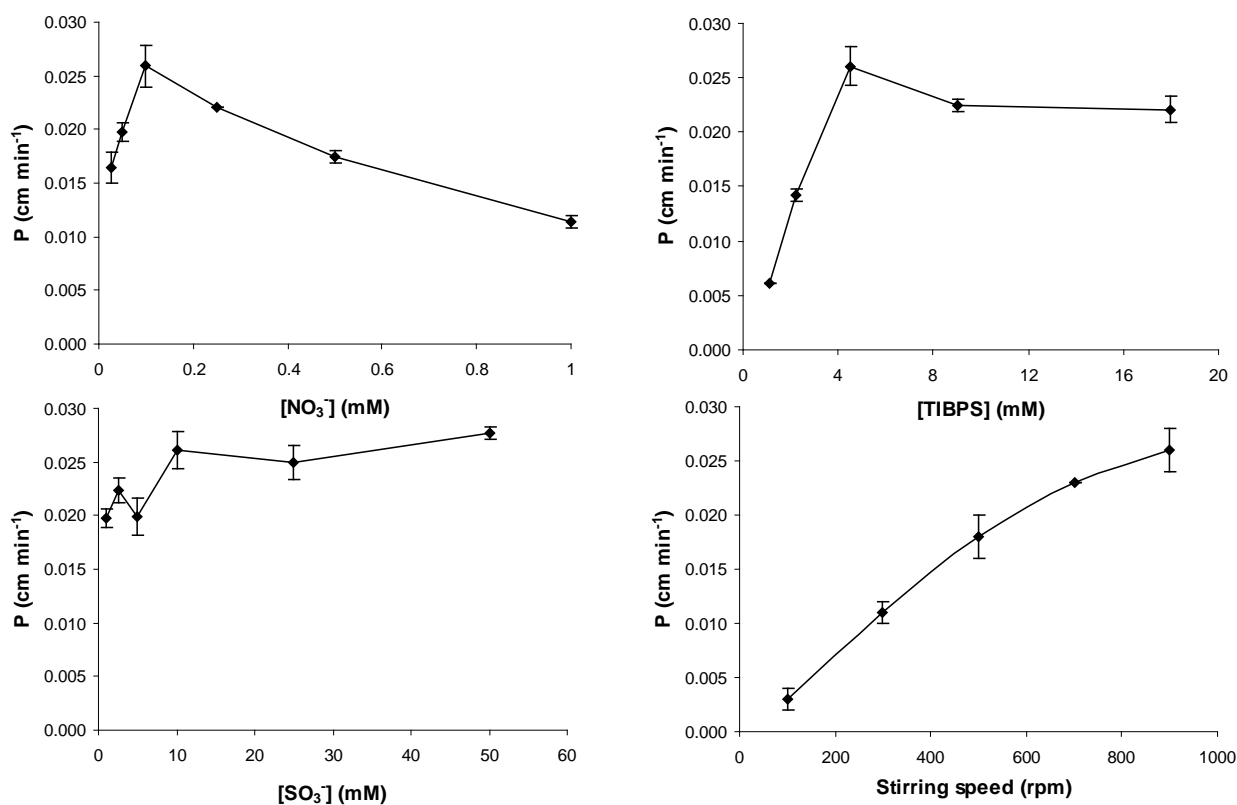


Figure 8. Optimization of chemical and hydrodynamic conditions.

### Analysis of real samples

As a previous step for its application to the analysis of real samples, the preconcentration yield of the system was determined by using up to six different samples of known concentration of silver between 20 and 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ . As observed in Figure 9, the preconcentration yield was independent on initial silver concentration in the sample and, after 3-4 hours, it was almost constant allowing calculating an average yield of  $59.5 \pm 1.9\%$  (). Under these conditions a total preconcentration factor of 4.0 times was obtained [30].

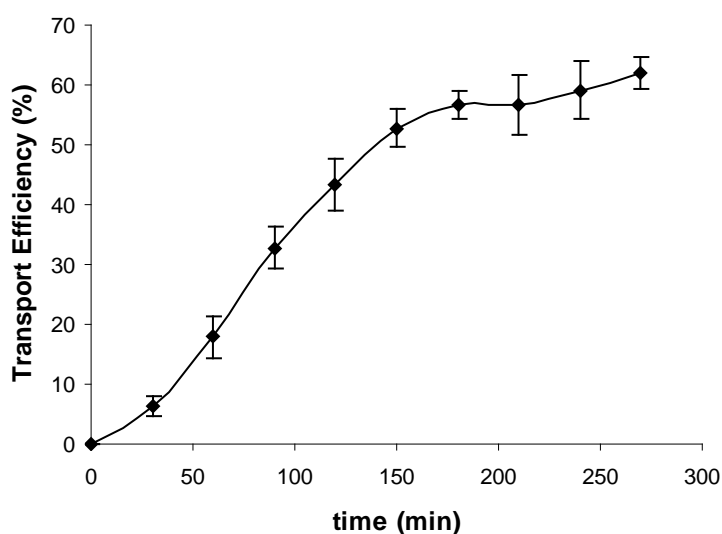


Figure9. Transport efficiency against time

Under optimum conditions, ten blank experiments were carried out, and blank concentration was found to be  $0.033 \pm 0.006 \mu\text{g L}^{-1}$ . Finally, the new method was applied to the determination of silver in several samples of tap and non-polluted river water, previously spiked with different silver concentrations in the ppb and ppt-levels. The results obtained are reported in Table 3. As may be observed, the analysis of both synthetic and real samples provided precise and accurate results both at the ppb and ppt-levels.

Table 3. Application of the proposed method to Ag determination

Sample	<sup>1</sup> Known ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	BLM ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\varepsilon_r$ (%)
Synthetic	0.70±0.02	0.72±0.04	2.8
	0.43±0.02	0.46±0.04	7.0
Tap water	17.96±0.01	17.24±0.2	-4.0
	0.44±0.04	0.40±0.03	4.5
River water	17.03±0.01	15.39±0.08	-9.6
	0.48 <sup>2</sup>	0.46 <sup>2</sup>	-4.2
	0.27 <sup>2</sup>	0.28 <sup>2</sup>	3.7

<sup>1</sup> Measured by ICP-MS

<sup>3</sup> Only one replicate has been measured

## Determination of silver ultra-traces in natural waters by hollow fiber liquid membrane based technique

In this case, a supported liquid membrane was developed. A hollow fiber membrane (HFM) was selected due to its potential in the enrichment of chemical species from water samples. In particular, HFM are characterized because among the SLM types, they offer the highest volume ratio between the donor and acceptor phase.

- Materials and methods

- Apparatus

Membrane experiments were conducted employing polypropylene Q3/2 Accurel PP capillary hollow fiber membranes (Membrana, Germany), with a 0.280 mm internal diameter, 0.050 mm wall thickness and  $10^{-4}$  mm pore size was. Insulin syringes 0.5 mL from BD Micro-Fine (Beckton Dickinson, USA) were used to fill the fibers with the acceptor solution. Glass beakers with screw cap were employed to keep the samples during the extraction process. Paraffin film was used for closing the extremes of the fibers and a RO10 power magnetic stirrer (IKA-WERKE, Germany) was used for shaking them during the experiments. A pH 211 Microprocessor pH meter was used for measuring pH (Hanna, USA). Concentrations of silver were measured by a GBC 932 AA atomic absorption spectrophotometer (GB, Australia) and a AAnalyst-800 (Perkin Elmer, USA).

- Procedure

First, hollow fibers were cut to obtain an internal volume of 20 $\mu$ L, then an insulin syringe filled with the acceptor solution was connected to the fiber and 100  $\mu$ L were passed through the fiber, drop by drop, in order to clean the lumen and to fill the fiber before impregnating with the organic phase. Afterwards, the fiber, still connected to the syringe was immersed in the organic phase containing the carrier during 1 minute. Once the fiber was impregnated with the organic phase, the rest of the acceptor solution was flushed (395  $\mu$ L) avoiding bubbles inside the fiber (Figure10. HFM employed for Ag transport).





Figure10. HFM employed for Ag transport

Paraffin film was used to close the fiber extremes, making a loop, and then the fiber was immersed in milli-Q water to remove the organic solvent excess. After 30 seconds, the fiber was introduced in the sample (50 mL) containing the corresponding silver concentration and 0.1M  $\text{KNO}_3$ . The sample was then stirred during the experiment time. After finishing the transport, the fiber was placed out from the donor phase and the extremes were cut. In this moment, using an empty syringe, the acceptor solution was dropped in a flask for further analysis in FAAS for optimization experiments or GFAAS for ultratrace analysis.

- Results and discussion

- System Optimization

Previously optimized conditions for BLM were employed as initial. However, silver extraction from the feed solution into the organic membrane was negligible. This is due to toluene does not impregnate the fiber pores. Thus, dihexylether, which has been previously employed for hollow fiber membranes, was selected. As it can be observed, in these conditions silver extractions reaches 90% when 0.5M TIBPS is employed (Figure 11).

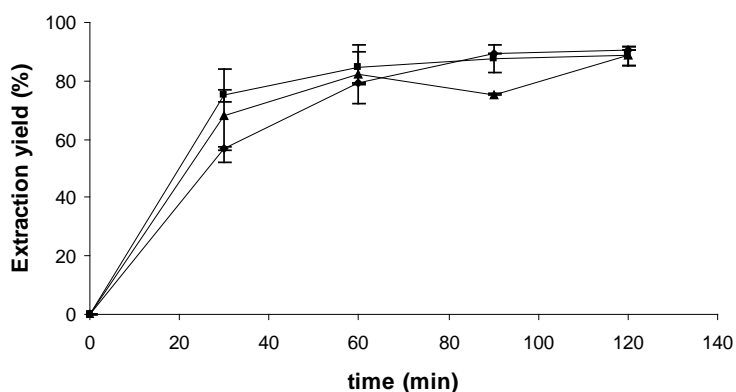


Figure 11. Extraction efficiency for TIBPS dissolved in dihexylether [TIBPS] 0,1M ▲, 0,5M ■, 1M ◆.

Taking into account possible chemical differences in the system due to the change of the solvent, different acceptors were evaluated. In this sense,  $S_2O_3^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$ ,  $SCN^-$ , diethyltriaminepentacetic acid (DTPA) and  $NH_3$  were used. In all cases, the experiments were run during 4 hours. As a result, only sulphur containing ligands offered a measurable transport (Figure12). In particular, 1M  $S_2O_3^{2-}$  was the most efficient acceptor, giving an enrichment of  $669 \pm 65$ .

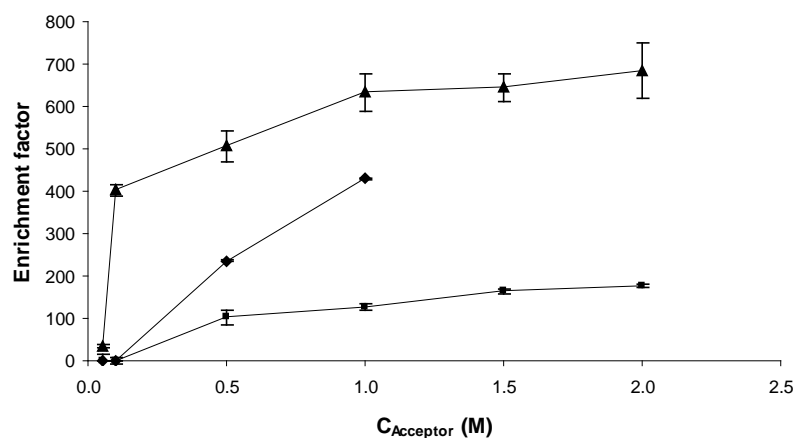


Figure12. Enrichment factor for the different acceptor agents.  $Na_2S_2O_3$  ▲,  $SO_3^{2-}$  ■, KSCN ◆

Afterwards, in order to increase the enrichment factor, TIBPS concentration was optimized. As it can be observed, the enrichment factor increases with TIBPS concentration until 0.1M, but decreases at higher concentrations (Figure 13). This could be related with a lower retention at lower TIBPS concentration. Finally, operation time was studied, and maximum yield was obtained at 4 hours. A decrease can be observed from 4 to 8 hours, which

could be related with silver precipitation. Enrichment factor under optimized conditions was  $1053 \pm 16$  times.

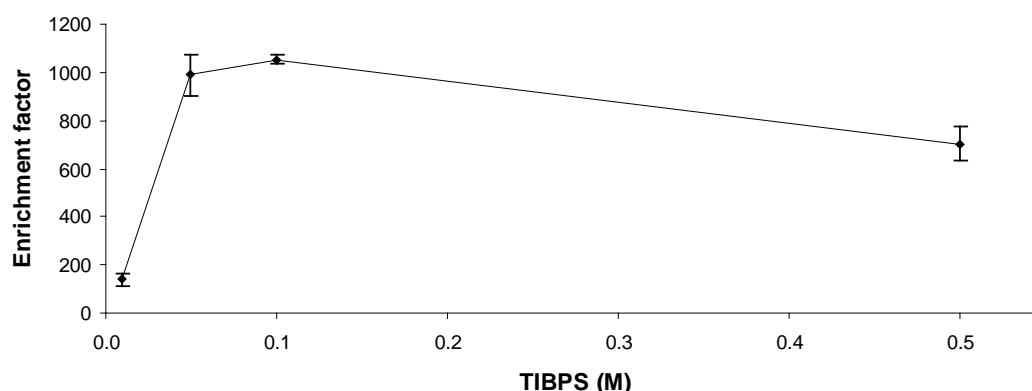


Figure 13. Effect of TIBPS on silver pertraction

- Application to real samples

Once the method was optimized, different real samples spiked with Ag from 0.1 to 1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  were analyzed to study the effects of the samples matrix. Since the enrichment factor was not affected the determination of ten blank samples was conducted and a  $1.76 \pm 0.19 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$  was obtained.

Finally, different samples from the Guadalquivir River (Spain) were analyzed and the results were compared with the liquid-liquid extraction with APDC/DDDC as reference (). As it can be observed (Table 4), HFM are a useful tool for the determination of silver ultra-traces in natural waters.

Table 4. Application of HFM to silver determination.

Sample	$C_{\text{Analyzed}} (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	RSD (%)	$C_{\text{Reference}} (\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery (%)
G1 10/07	1.85	4.55	1.90	97.11
G6 02/07	2.02	7.12	2.18	92.62
G1 11/08	4.00	3.22	4.21	95.09
G5A 11/08	4.36	2.16	4.33	100.70
G7 04/08	2.72	0.96	2.49	109.05

### Application of liquid membranes to the chemical speciation on silver in natural waters

A bulk liquid membrane system was proposed for the speciation of silver in natural waters. The most important silver species that can be found in the environment are related with the complexation by organic matter and chloride ions (Figure 14). In this case, silver

speciation is based on the assumption of humic acids and  $\text{Cl}^-$  affect  $\text{Ag}^+$  transport across the membrane, forming complexes, which cannot be transported through it. Then only  $\text{Ag}^+$  is supposed to be transported through the organic phase. This effect has been quantified using the variations on permeability and enrichment factors.

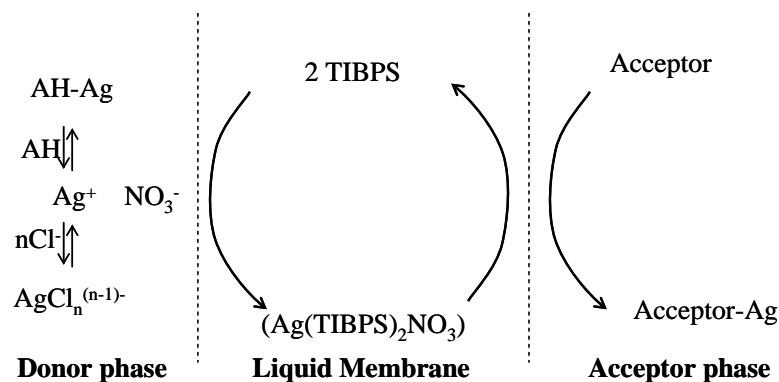


Figure 14. Silver transport in the presence of organic matter and chloride

- Materials and methods

- Apparatus

Liquid membrane experiments were carried out using the same BLM system applied for the quantification of total silver. Concentrations of silver in aqueous solutions were measured by a SolaarM Atomic Absorption Spectrometer (Thermo Scientific, USA). Organic matter concentration was measured by a total organic carbon analyzer Analytikjena© multi N/C 3100 (Analytikjena, Germany). Ultraviolet digester was used for organic matter degradation (Methron, Germany).

- Procedure

For all experiments feed solutions contained  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  silver and the corresponding concentration of humic acids and  $\text{NaCl}$ . Operation conditions were those optimized for the total silver concentration analysis, previously proposed [30]: Permeability was studied during the two first hours and calculated; while for pertraction yield, 4 hours of running were set. To study the both, the permeability and the pertraction yield evolution,  $1.6 \text{ mL}$  aliquots of stripping solution were taken every 30 minutes to measure silver concentration, as described in the case of total silver concentration.

Organic matter was added as humic acids (HA) salts and measured as dissolved organic carbon by subtraction, using a total and inorganic carbon analyzer. Digestion of humic acid

charged feed solutions was conducted during 90 minutes in a UV digester and in presence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10%). For salinity influence, NaCl was used as a source of  $\text{Cl}^-$  ions.

- Results and discussion

- Effect of AH and NaCl

Organic matter was added as humic acids and measured as dissolved organic carbon (DOC) in the range from 0-100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of DOC. A linear decrease of transport efficiency was observed with  $\text{Log}(\text{DOC})$ , offering a regression coefficient  $R^2=0.995$ . Also in the case of salinity, a linear decrease ( $R^2=0.981$ ) was appreciated with the increasing  $\text{Log}(\text{Cl}^-)$  in the range 0-35  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of NaCl (Figure15).

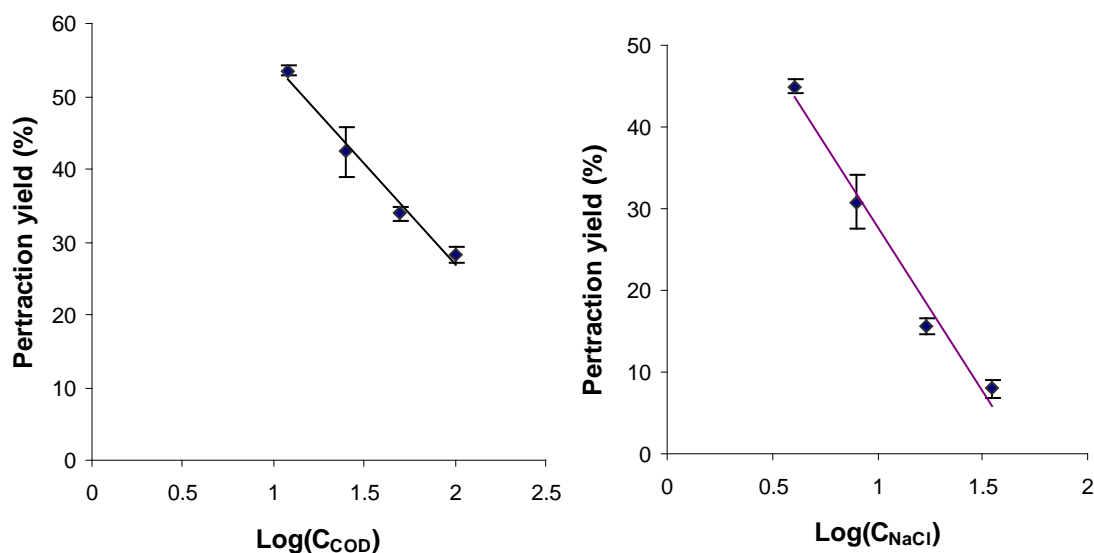


Figure15. Effect of organic matter and salinity on silver pertraction

The combined effect of AH and  $\text{Cl}^-$  has been study fixing the concentration of one ligand and varying the concentration of the other. This has been conducted in salinity conditions from 0 to 17  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of NaCl and 0-100  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  of DOC. As a result, the behavior of silver transport has been observed and a linear decrease of pertraction yield is achieved for the combined presence of the used reagents. A set of fit curves has been obtained for each ligand in the different studied conditions (Figure 16).

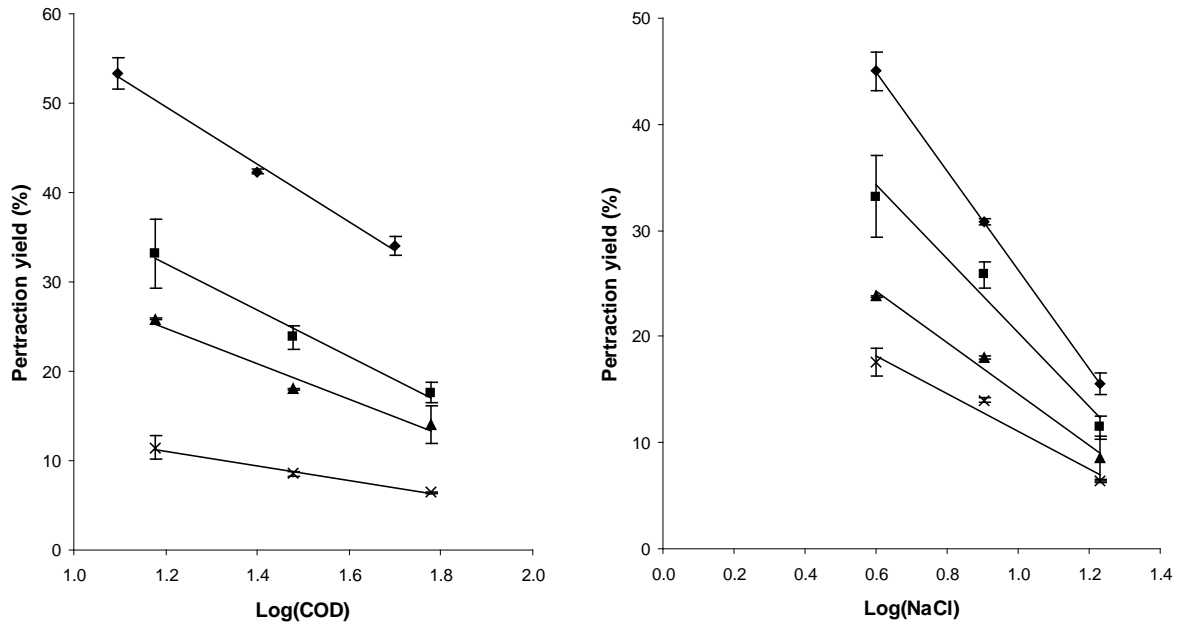


Figure 16. Combined effect of organic matter and salinity on Ag transport

- Estimation of free silver concentration

The chemical equilibriums that can take place in the donor phase between Ag and ligands, can be summarized by the following mass balance (2):

$$Ag_0 = Ag^+ + AgAH + AgCl_n^{(n-1)-} \quad (2)$$

Using the obtained fit curves for the variation of silver pertraction with ligands concentration, the pertraction yield in the presence of AH and  $Cl^-$  can be calculated, when DOC and conductivity are known (3).

$$\begin{aligned} Y_{sal}(\%) &= a \cdot \log(C_{COD}) + b \\ Y_{COD}(\%) &= a \cdot \log(C_{NaCl}) + b \end{aligned} \quad (3)$$

The pertraction yield in absence of ligands was previously set in 59.54%. Then, this value can be used as a reference to calculate the  $Ag_0$  concentration in the donor phase.  $Ag^+$  concentration is the corresponding to the calculated  $Y(\%)$  and can be measured by the liquid membrane. With these data and using the following equation,  $Ag_0$  can be estimated (4).

$$Ag_0 = Ag^+ \frac{Y_{ligand}(\%)}{Y(\%)} \quad (4)$$

The concentration of retained silver, in the feed solution by AH and  $Cl^-$  can be calculated by difference between  $Ag_0$  and  $Ag^+$  (5).

$$Ag_0 = Ag^+ + Ag_{retained} \quad (5)$$

Finally, silver speciation was conducted by the BLM system for samples with different concentration of DOC and NaCl (Table 5).

Table 5. Application of BLM to the especiation of Ag in natural waters

DOC (mg·L <sup>-1</sup> )	NaCl (g·L <sup>-1</sup> )	C <sub>Ag</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )			Recovery (%)
		Ag <sup>+</sup>	Ag <sub>0</sub> (BLM)	Ag <sub>0</sub> (FAAS)	
20	0	130	170	193	88
30	8	76	238	215	110
60	17	52	205	220	93
60	4	87	185	196	94
15	8	19	207	214	97
15	17	20	104	100	104
20	0	130	89	98	91

## Conclusion

Liquid membranes are a useful tool for sample pre-treatment in the analysis of ultra-traces of heavy metals in natural waters. In particular, silver determination at the ppt level can be conducted by the both, the BLM and the HFM, when TIBPS is used as carrier. Moreover, these systems are sensitive to the presence of different ligands such as organic matter and Cl<sup>-</sup> ions, in the case of Ag transport. This fact allows to use them for Ag speciation in natural waters.

## Bibliography

1. Sañudo-Wilhelmy, S.A. and Flegal, A.R. (1992) *Anthropogenic silver in the Southern California bight: A new tracer for sewage in coastal waters*. Environmental Science and Technology **26**, 2147-2151.
2. Benn, T.M.; Westerhoff, P. *Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics*, Environ. Sci. Technol. **2008**, 42, 4133-4139.
3. Meakins, M. (2009) *Silver and new technology: dressings and devices*. Surgical infections **10**, 293-296.
4. Barriada, J.L.; Tappin, A.D.; Evans E.H. and Actherberg, E.P. (2007) *Dissolved silver measurements in seawater*. TRAC-Trends in Analytical Chemistry **26**, 809-817.
5. Essumang, D.K. and Nortsu, B.K. (2008) *Analysis of silver in the water column of the Pra and Eture estuaries in Ghana*. Chemistry and Ecology **24**, 297-303.
6. Bielmyer, G.K.; Brix, K.V. and Grosell, M. (2008) *Is Cl<sup>-</sup> protection against silver toxicity due to chemical speciation?*. Aquatic Toxicology **87**, 81-87.
7. Nichols, J.W.; Brown, S.; Wood, C.M.; Walsh, P.J. and Playle, R.C. (2006) *Influence of salinity and organic matter on silver accumulation in Gulf toadfish (Opsanus beta)*. Aquatic Toxicology **78**, 253-261.
8. Buck, N.J., Gobler, C.J. and Sañudo-Wilhelmy, S.A. (2005) *Dissolved trace element concentrations in the Eas River-Long Island Sound System: Relative importance of autochthonous versus allochthonous sources*. Environmental Science and Technology **39**, 3528-3537.
9. Mendiguchía, C.; García-Vargas, M. and Moreno, C. (2008) *Screening of dissolved heavy metals (Cu, Zn, Mn, Al, Cd, Ni, Pb) in seawater by a liquid-membrane-ICP-MS approach*. Analytical and Bioanalytical Chemistry **391**, 773-778.
10. N.N. Li, US Patent 3,410,794, 1968.
11. Jönsson, J.A. and Mathiasson, L.; (1999) *Liquid membrane extraction y analytical preparation. I. Principles*. TRAC-Trends in Analytical Chemistry **18**, 318-325.
12. Jönsson, J.A. and Mathiasson, L.; (1999) *Liquid membrane extraction y analytical preparation. II. Applications*. TRAC-Trends in Analytical Chemistry **18**, 325-334.
13. Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M. (2008) *Green Analytical Chemistry*. TRAC-Trends in Analytical Chemistry **27**, 497-511.
14. Bartsch, R.A. and Way, J.D. (1996) *"Chemical Separations with Liquid Membranes"*. ACS Symposium Series 642.
15. Noble, R.D. and Way, J.D. *Liquid Membranes, Theory and Applications*, ACS Symposium Series 347, American Chemical Society, Whashington, DCC, USA, 1987.
16. Pesavento, M.; Alberti, G. and Bieszu, R. (2009) *Analytical methods for the determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review*. Analytica Chimica Acta **631**, 129-141.
17. Sirlin, C.; Burgard, M.; Leroy, M.J.F. and Prevost, M. (1990) *Silver nitrate refining using supported liquid membranes*. Journal of Membrane Science **54**, 299-305.



18. Arous, O.; Gherrou, A. and Kerdjoudj, H. (2004) *Removal of Ag(I), Cu(II), and Zn(II) ions with a supported liquid membrane containing cryptands as carriers*. *Desalination* **161**, 1681-1693.
19. Lachowicz, E.; Rozanska, B and Teixidor, F. (2002) *Comparison of sulphur and sulphur-oxygen ligands as ionophores for liquid-liquid extraction and facilitated transport of silver and palladium*. *Journal of Membrane Science* **210**, 279-290.
20. Pearson, R.G. (1968) *Hard and soft acids and bases, HSAB, Part I: Fundamental Principles*. *Journal of chemical education* **45**, 581-587.
21. Hubicki, Z. and Hubicka, H. (1995) *Studies on the removal of silver(I) from nitrate solutions by Cyanex-471X*. *Hydroetallurgy* **37**, 207-219.
22. Vajda, M.; Schlosser, S. and Kovakova, K. (2000) *Pertraction of silver through bulk liquid membranes*. *Chemical Papers* **54**, 423-429.
23. Parthasarathy, N. and Buffle, J. (1994) *Capability of supported liquid membranes or metal speciation in natural waters: application to copper speciation*. *Analytica Chimica Acta* **284**, 649-659.
24. Bayen, S.; Gunkel-Grillon, P.; Worms, I.; Martin, M. and Buffle, J. (2009) *Influence of inorganic complexes on the transport of trace metals through permeation liquid membrane*. *Analytica Chimica Acta* **646**, 104-110.
25. Sigg, L.; Black, F.; Biffle, J.; Cao, J.; Cleven, R.; Davidson, W.; Galcerán, J.; Gunkel, P.; Kalis, E.; Kistler, D.; Martin, M.; Noel, S.; Nur, Y.; Odzak, N.; Puy, J.; Van Riemsdijk, W.; Temminghoff, E.; Tercier-Waeber, M.L.; Toepperwien, S.; Town, R.M., Unsworth, E.; Warnken, K.W.; Weng, L.; Xue, H. and Zhang, H. (2006) *Comparison of analytical techniques for dynamic trace metal speciation in natural freshwaters*. *Environmental Science and Technology* **40**, 1934-1941.
26. Gunkel-Grillon, P. and Buffle, J. (2008) *Speciation of Cu(II) with a flow-through permeation liquid membrane: Discrimination between free copper, labile and inert Cu(II) complexes, under natural water conditions*. *Analyst* **133**, 954-961.
27. Romero, R. and Jönsson, J.A. (2005) *Determination of free copper concentrations in natural waters by using supported liquid membranes extraction under equilibrium conditions*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **381**, 1452-1459.
28. Danesi, P.R: (1984) *Permeation of metal species by supported liquid membranes*. *Separation Science and Technology* **19**, (857-894).
29. Muñoz, M.; Palet, C. and Valiente, M. (1990) *An immobilized liquid membrane containing triisobutyl phosphine sulphide for the selective separation of silver from base metals*. *Analytical Letters* **23**, 1591-1606.
30. López-López, J.A.; García-Vargas, M., Moreno, C. (2010) *A new contamination-free method for the determination of traces of anthropogenic silver in freshwaters*. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. *Accepted Manuscript*.

# Chemometric-assisted study of atmospheric and fluvial pollutant inputs in the Guadalquivir River estuary

## Introduction

Classification of fresh waters can be based on quality requirements for a specific use, e.g. drinking or domestic, public, industrial, agricultural, recreational, etc [1]. The main difference between these types of waters is the amount of impurities that contains. Special interest present those systems which have been human modified [2], since they are easily affected by point and non point sources of anthropic pollution as well as by rain events [2,3].

On the one hand, point sources are often related with discrete anthropogenic pollution inputs such as sewage or industrial effluents [4,5]. In this sense their identification is easier than for non-point sources. Also tributary rivers could be included as point inputs [6], and in general they present important influence on the rivers they tribute, overall when they carry industrial or mining residues [7]. On the other hand, non-point inputs use to be associated with agriculture runoff, which enters a water body in a diffuse way [8-10]. Rain can be classified as a diffuse source that can affect water courses by direct precipitation [11] or by runoff [12].

In general rain water composition is domain by inorganic anions such as  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  and  $\text{Cl}^-$ ; however, in heavily industrialized areas low pH values and high  $\text{NH}_4^+$  have been reported [13]. Also total nitrogen,  $\text{PO}_4^{3-}$ , and dissolved organic carbon (DOC) should be taken into account [2]. In the case of heavy metals, a reduction of their concentration in rain water has been observed during the last 25 years, mainly due to industry control and the employment of unleaded fuels [14,15], but several heavy metals still appear at important level near urban areas [16].

The Guadalquivir River supposes the largest source of freshwater in the Spanish Atlantic basin. The river estuary flows from the Alcala del Rio dam, and through the urban and industrialized area of Seville (about 700,000 inhabitants) in the upper estuary, until the Doñana National Park in its mouth. During 2007-2008, this river was affected by heavy rains, which promoted a distortion on its water quality. In this work, chemometrics have been employed to study the atmospheric inputs received by the river

after precipitations, as well as the fluvial discrete ones related by the main tributaries of the Guadalquivir River estuary.

### Material and methods

- Study site

The present work has been conducted on the tide zone effect of the Guadalquivir River (SW Spain). This river supposes the main resource of freshwater in the Southern Spanish region, being the second largest river in the whole country. Moreover, alongside its length the riverside population is over 4 million inhabitants. The investigated longitude corresponds with the navigable part of the river. In this course, 14 sampling stations have been selected to conduct the study (Figure 17).

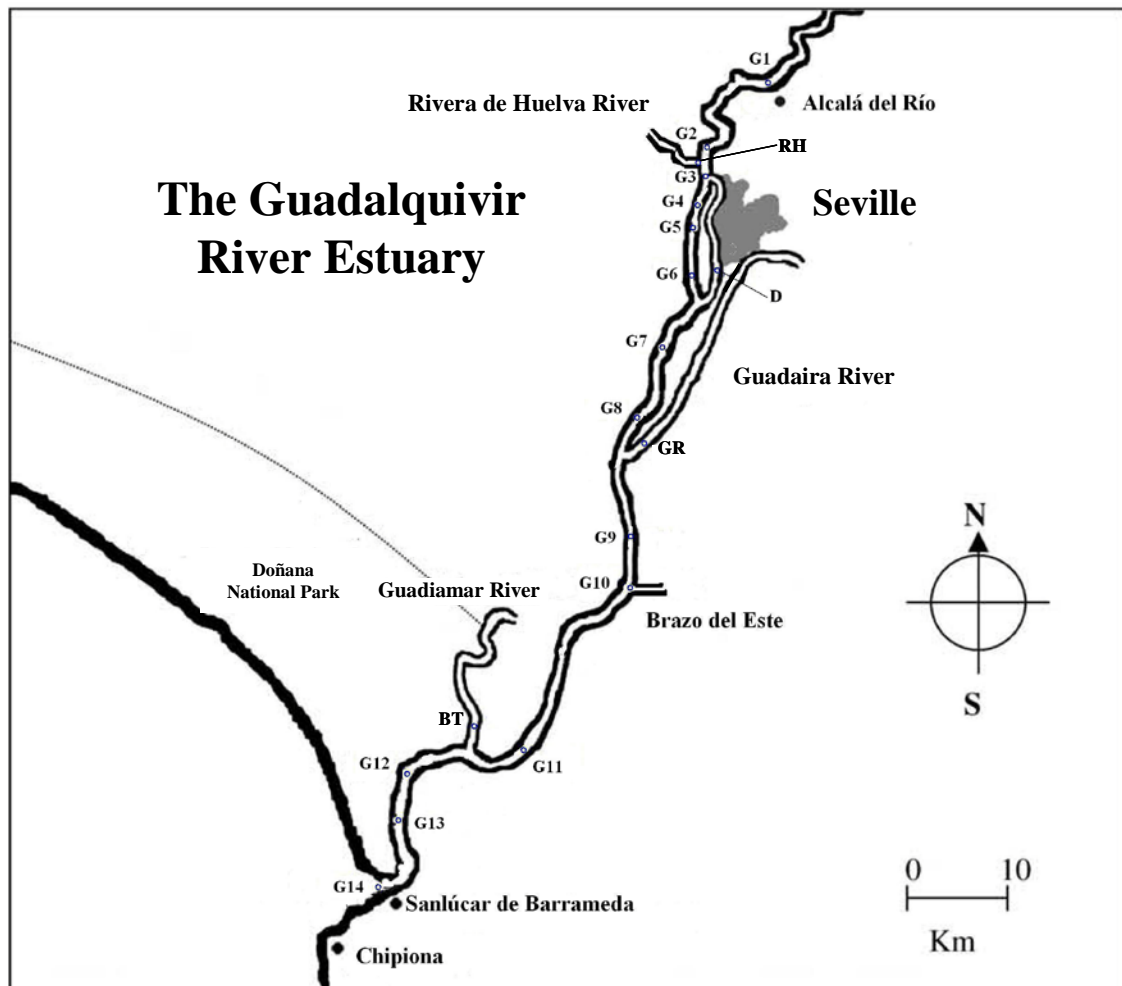


Figure 17. Map of the study site

The first zone is an urbanized part affected by the city of Seville -situated 20 Km from the top of the estuary- and its outskirts (G1-G6), with a population about 700,000 inhabitants, where, also Seville's harbour and industries must be considered. The second part is affected by agriculture and small villages, where untreated waste water spills could be expected (G7-G9). The last one ranges stations G10-G14; and it is characterized the tide effect and the riverside presence of The Doñana National Park. Finally [17]. Four tributary rivers have been chosen: Rivera de Huelva River (RH), Seville's dock (D), Guadaira River (GR), Guadiamar River (BT), to study fluvial pollution inputs.

- Samples collection and conservation

Sampling campaigns took place after the wet season (February-2007 and April-2008) and the dry one (October-2007 and November-2008) to set background pollution. Samples from tributary rivers were also collected during these campaigns. For rain pollution study, samples were collected in four reference locations: G1 on the top of the estuary; G5 and G6 as urban places; and G10 and G11 as agriculture affected. Samples were always taken within the following 24 hours after the rain events. Sample collections were conducted using two crafts from the Andalusia Environmental Authority (AMAVI and Dunas de Doñana). Different samples were collected for physic-chemical parameters, inorganic nutrients, carbon species and total nitrogen, and heavy metals. All samples were picked pumping water through a PTFE tube into the corresponding container.

Plastic containers were used for suspended matter and pH, dissolved oxygen, temperature, and conductivity. These samples were not filtered prior to variables determination; however, the rest were filtered by a 0.45 $\mu$ m pore sized acid-washed-polypropylene Calyx Capsule (Osmonics, USA). For nutrients and carbon species, samples were collected in HCl washed bottles and stored frozen. Containers for the first ones were made in plastic, but for the second ones they were made in dark glass.

In the case of trace metals, 500 mL LDPE (low density polyethylene) 3N HCl cleaned bottles were used. To provide reliable and accurate heavy metals data, clean techniques were used for handling and analyzing samples. All material coming in contact with samples was acid pre-cleaned and stored in double LDPE bags. Samples for dissolved trace metals analyses were acidified using suprapur HNO<sub>3</sub> inside a laminar

flow cabin (HEPA 1000 filter) to avoid contamination, stored for one month, and then analyzed.

- Analytical procedure

Determination of salinity, pH and dissolved oxygen was conducted in-situ by an electrochemical portable device (Sension 156, Hach Co., USA). Suspended solids were determined by gravimetry [18]. Spectrophotometric methods were used for nutrients determination [19,20]. Total dissolved nitrogen, and carbon species were determined by a multi N/C 3100 carbon and nitrogen analyzer (Analytikjena, Germany).

For Co, Cd, Ag, Pb, Ni, and Zn, samples were pre-concentrated in a Clean Room by solvent extraction with 1-pyrrolidine-dithiocarbamate/diethylammonium-diethyldithiocarbamate [21] and then quantified on a Series X7 (Thermo Electron, USA) inductively coupled plasma mass spectrometer, employing  $^{89}\text{Y}$ ,  $^{103}\text{Rh}$ , and  $^{209}\text{Bi}$  as internal standards. In the meanwhile, Mn and Cu were determined directly by Transversally Heated Graphite Furnace Atomic Spectroscopy (Perkin-Elmer, USA) [22]. Standard solutions of heavy metals were prepared from a  $1000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  certified standard solutions.

- Statistical procedures

Box and whiskers graphics were used to summarize background pollution distribution and to show the importance of tributary rivers and rain as pollution sources. Trend lines for background pollution were constructed using average background concentration, and a limit of  $\bar{x} \pm 0.74 \cdot \text{SD}$  was established for normal expected values. Values over these limits were significant on the quality the estuary. A polynomial fit was employed for trend lines construction. Afterwards, two-way ANOVA was performed to establish possible spatial and seasonal differences of pollutants concentration. Previously, normality and homogeneity were analyzed by the Kolmogorov-Smirnov and Levene tests respectively. When ANOVA could not be used, the Kruskal-Wallis test was employed [23].

Multivariate analysis was used to asses the relationship among the variables and with sampling locations. Principal Components Analysis (PCA) was applied to obtain composite variables providing information about the existence of patterns and on the meaning of latent factors responsible of them [24]. Eigenvalues bigger than 1 were used to extract the principal components (PCs). Different rotations were applied to

summarize or refine the information. Cluster analysis (CA) was used to classify the variables and sampling sites; in particular, minimum inter-groups distance and Ward's method were applied [23].

Chemical characterization of the selected pollution inputs was completed by discriminant analysis [25]. A predictive model, for tributary rivers and rain events classification, was constructed. Discriminant functions were developed to discern the chemical properties of urban, agriculture and the estuary areas. Normality and tolerance tests were previously carried out for all variables.

## Results and discussion

- Background pollution

Attending to ANOVA and Kruskal-Wallis results, no seasonal differences have been observed; however, differences between samples collections for some variables are discussed later on. Firstly, measured concentrations have been summarized in box-whiskers plots and variables have been grouped in chemical families. Secondly, relationships and classifications have been discussed.

- Physic-chemical parameters.

In spite all samples were collected in the tidal effect zone, salinity varied with the distance only G11-G14, being the mixture point of river and seawater between G10 and G11 [17]. Variations of salinity within the different sampling campaigns are dependent, mainly of the tide. In the opposite, pH and DO present a distribution with minimum values in Seville's area (G4-G7) [26]. Low values of these variables are related urban sewage, which promotes water acidification and deoxygenation. Significant differences have been observed for the first sampling in the case of DO, if compared with the rest (Figure 18).

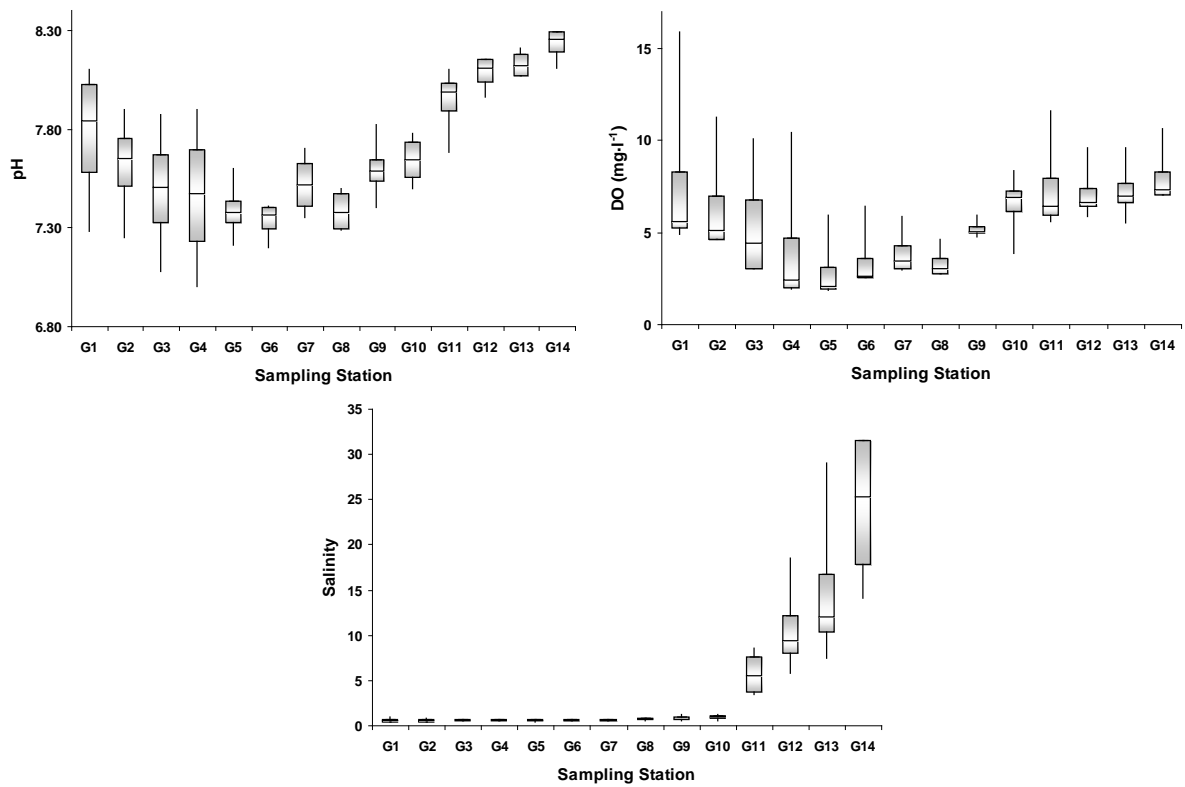


Figure 18. Profile for pH, DO and salinity

For TSS, different behaviour was observed between 2007 and 2008. In 2007, TSS show a maximum located in G11, which coincides with the increase of salinity [27]. However, for 2008 a new maximum has been observed in the urban part (G5-G6). The new one, has appeared after a succession of heavy rainstorms (November 2007) in combination with the opening of the Alcalá del Río dam. In the case of VSS, two maximum have been registered during the whole period. The first one is located in Seville (G4-G6) and related with organic particles from urban sewage and the second one is associated with the TSS maximum in G11. An increase of VSS urban maximum has been appreciated, as a consequence of the TSS increase (Figure 19).

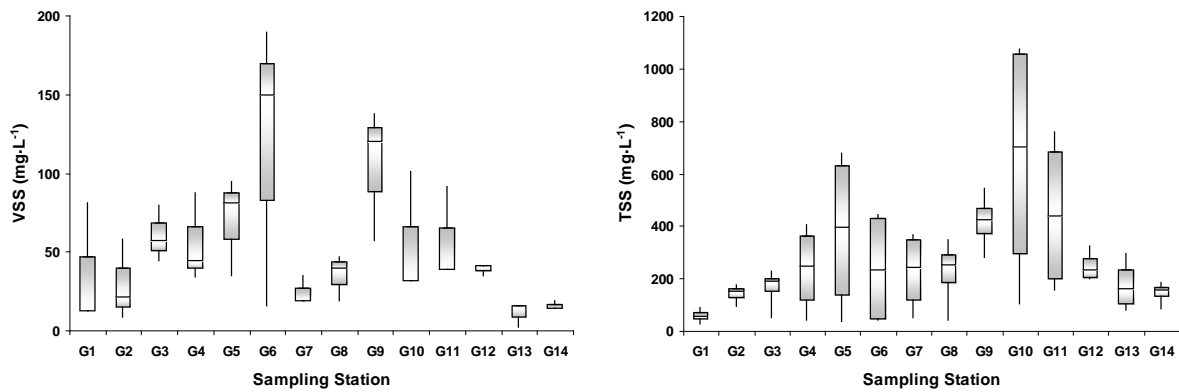


Figure 19. Distribution of VSS and TSS along the estuary

- Total dissolved nitrogen, inorganic nutrients, and carbon species.

TDN profile is irregular alongside the estuary, with maximum values in the urban part (G2-G6) and the lower estuary (G11-G14). It is domain by inorganic nutrients (Figure 20), mostly by nitrate, which presents similar distribution [28,29]. Due to its concentrations,  $\text{NO}_3^-$  determination has been declared as a priority in this area [30]. Nitrate, shows the same temporal variations observed for DO. Also,  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NH}_4^+$  have been determined, and offer opposite distribution as for pH and DO, with maximum related to urban sewage [31]. Finally,  $\text{PO}_4^{3-}$  presents maximum concentrations in the urban area (G4-G6) [32] and the agriculture one (G10-G12) [33], with progressive but not significant variability.



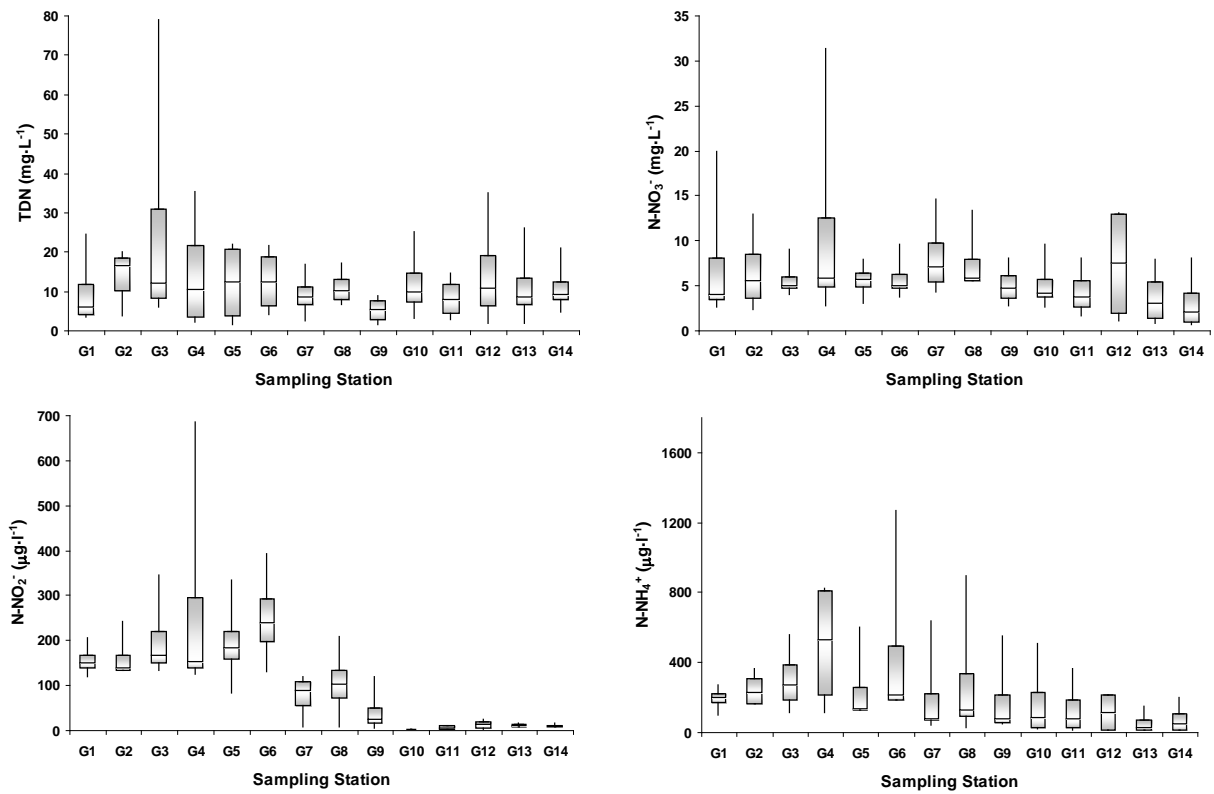


Figure 20. Observed profile for TDN and inorganic nutrients

In the case of carbon speciation, TDC and DIC distribution is similar to the one observed for salinity [34]. Moreover, temporal and spatial differences have not been observed. However in the case of DOC, maximum values have been determined for the upper estuarine (G1), but the most interesting data corresponds to G9 where a permanent increase is observed for all campaigns [35] (Figure 0-21).

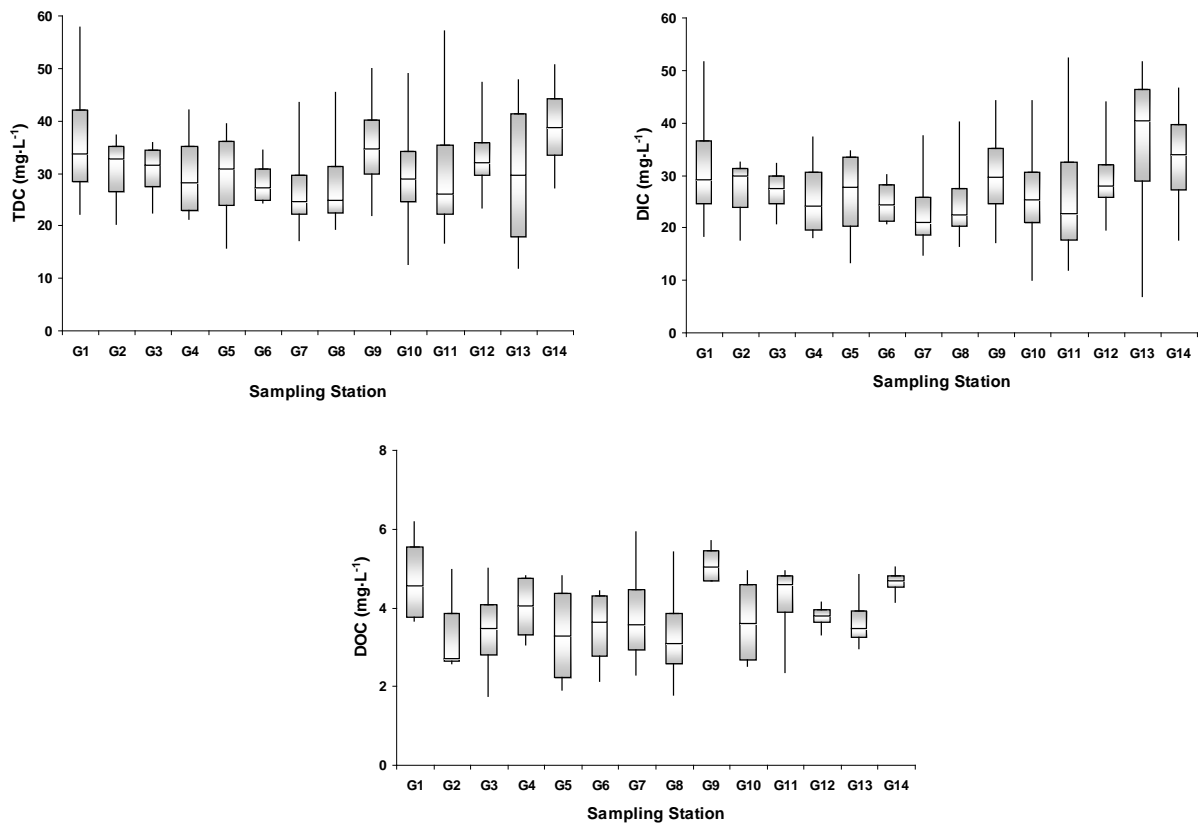


Figure 0-21. Distribution of TDC, TIC, and DOC along the estuary

- Heavy metals

Attending to their profiles, heavy metals could be classified in three groups (Figure 22). The first one presents maximum in the Seville's region, and could be related with urban sewage. Mn, Co are representative of this area [4,36]. Moreover, Pb presents a maximum at the end of this part (G4-G6), but appears at higher concentration in the transition between the urban and agricultural regions (G7-G8) [37].

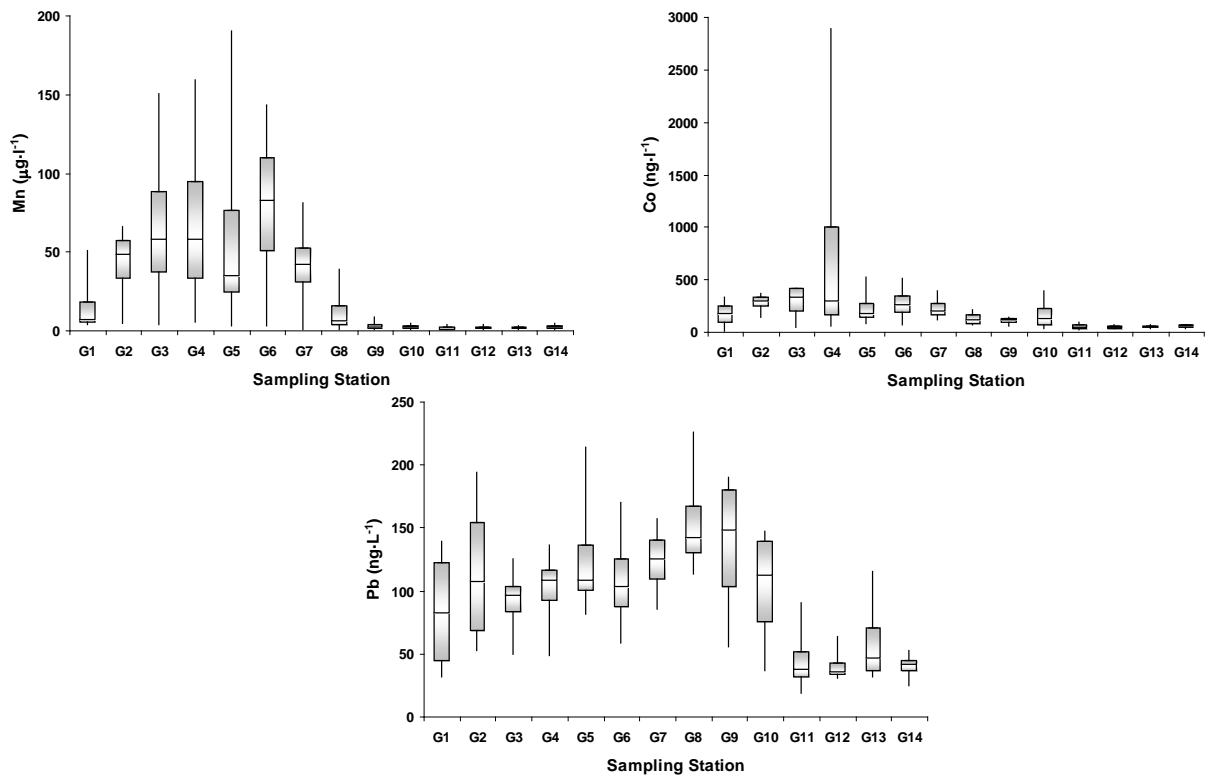


Figure 22. Heavy metals which present maximum concentration near to Seville

As it has been described for Pb, also Ni presents a mixed behaviour, with a maximum in G7-G8 [38], while its highest concentrations have been registered in the last part of the estuary, where concentrations over 40 µg·L<sup>-1</sup> have been determined (G12-G13). In addition, Zn behaviour can be compared with Pb and Ni in the urban area; however, its main trend is to increase with salinity in the tide affected area (Figure 23).

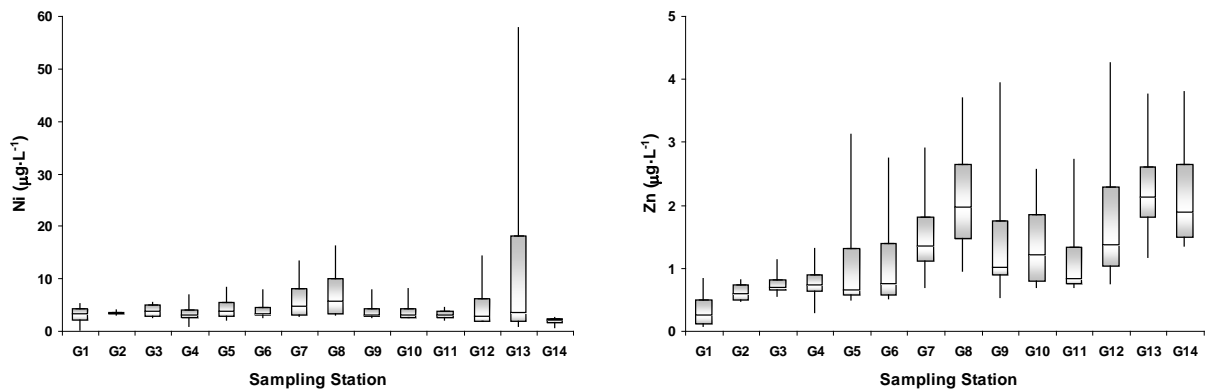


Figure 23. Heavy metals with a maximum after Seville's agglomeration

Concluding, Cu, Ag, and Cd, present an increase in the last part of the estuary, which appears related with salinity (Figure24). In particular, Cd profile is independent of distance until the saline area, where it increases linearly with salinity [36,39]. In contrast, Cu and Ag present different behaviour in the upper estuary, because Cu level is maximum in the agricultural region [8], while Ag offers an irregular distribution in Seville's zone [5]. Finally, their profiles differ from Cd, because they present a decrease in the last sampling site, so their behaviour could not be considered conservative.

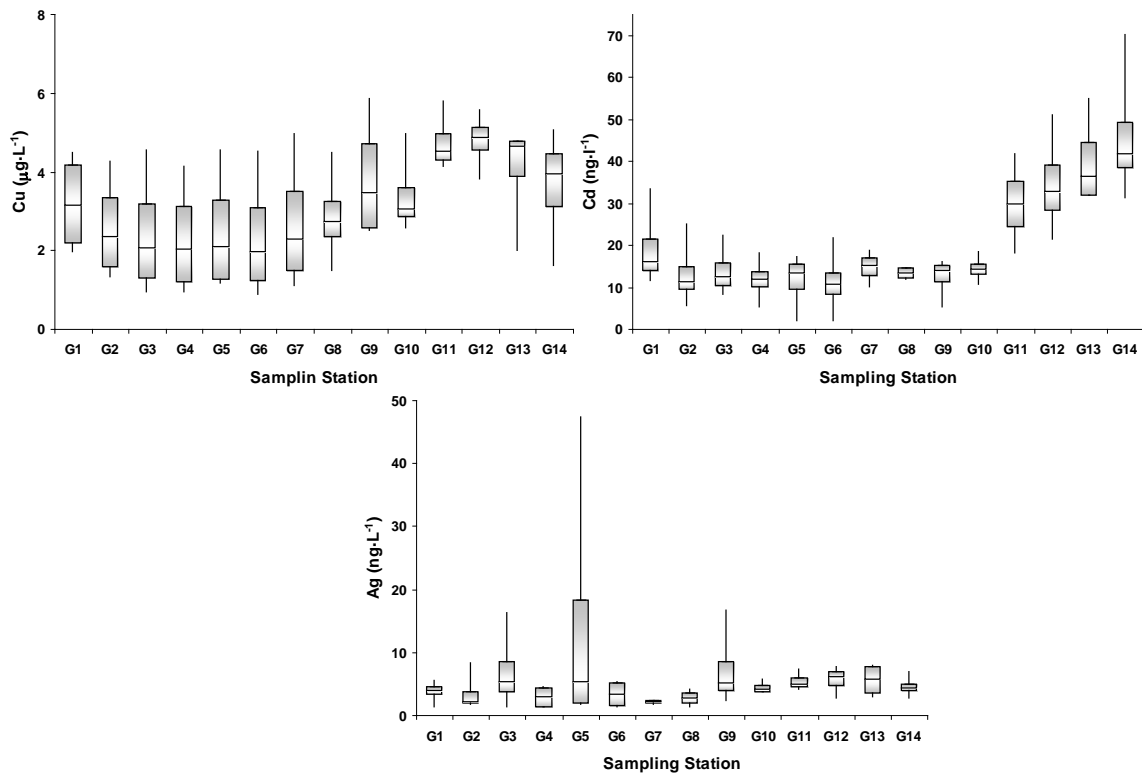


Figure24. Heavy metals with increasing concentrations in the river mouth

- Relationship between variables and sampling stations.

PCA has been applied using all the studied variables. Different rotations of the Euclidean space have been employed to clarify the behaviour of some of them. Afterwards, the both, the chemicals and the sampling stations have been classified by CA. Since TSS and VSS, offer significant differences between 2007 and 2008, they have been treated as different variables.

- Principal Components Analysis

Firstly, applying the normal rotation, 6 PCs allow explaining a 88.80% of the variance. On the one hand, PC1 is represented by pH, DO, Salinity, Cu, Cd, DIC, and TDC with positive value, and  $\text{NO}_2^-$ , Mn, Co, Pb, and Ni with negative, so their behaviour is the opposite alongside the estuary. On the other hand, in PC2: TSS-07, VSS-07 and Ag present positive values, and TDN offers negative. Mixed distributions are observed for  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{NH}_4^+$ , which appear in PC1 and PC2, and also for DOC, that is spread in PC1 and PC3. Finally,  $\text{PO}_4^{3-}$  is expressed in PC5 and TSS-08 in PC6.

This information can be summarized in a saturation graphic of loads and sampling stations scores (Figure 25). Three groups can be observed: stations G2-G8 associated with Pb, Co, Mn, Ni,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ , TDN,  $\text{PO}_4^{3-}$ , TSS-08, and VSS-08 define the urban area; The agriculture one G9-G11, characterized by COD, Ag, TSS-07, and VSS-07; and G12-G14 and G1, as the estuaric and clean part with TDC, DIC, Cu, DO, pH, Zn, Cd, and Salinity. This confirms the change in TSS solid behaviour 2007-2008. Since some variables are not clearly define by one PC, a Varimax rotation has been used to clarify their behaviour.

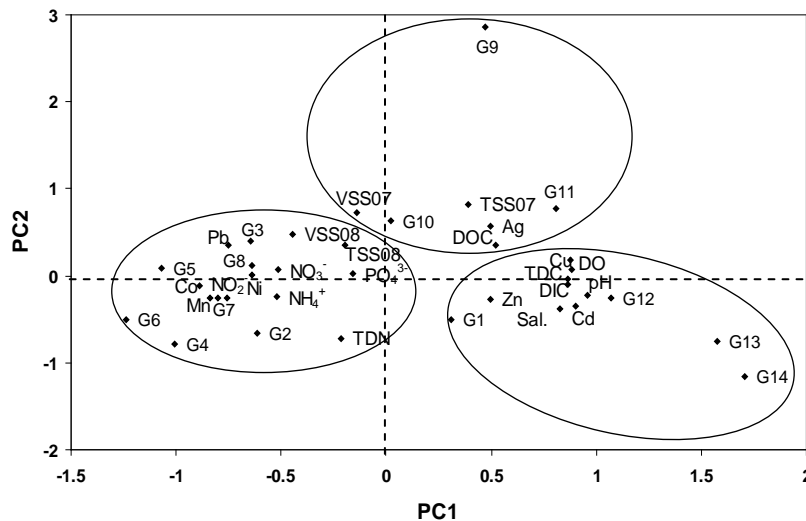


Figure 25. Saturation Graphics for Normal Rotation

Varimax rotation offers a new rotated space (Figure 26), where some shades in distribution are appreciated. In PC1, loads for estuarine variables such as pH, Salinity, DO, Cd, DIC, and TDC are positive, and for  $\text{NO}_3^-$ , Pb, and Ni are negative. For PC2, urban pollutants:  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ , Mn, and Co offer a negative load, while Ni offers a

positive value. This separation of urban and estuarine variables in two PC for Varimax confirms the presence of a transition zone between urban-agriculture (G7-G8) represented by Pb and Ni.

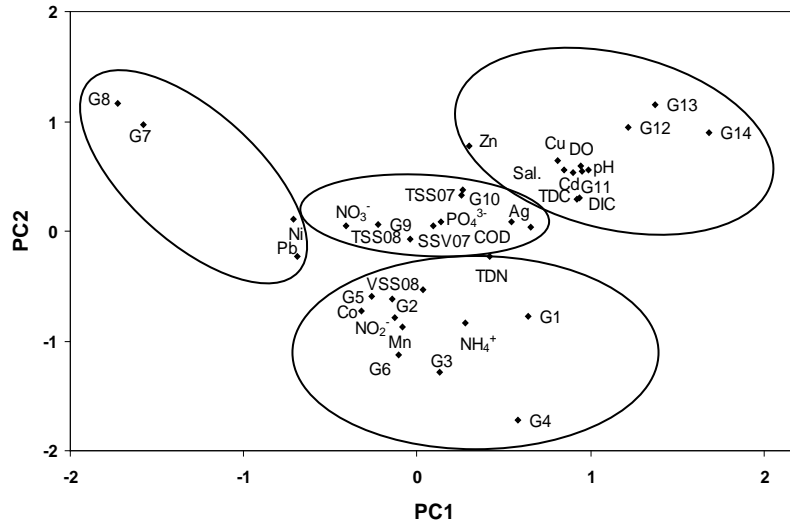


Figure 26. Saturation Graphics for Varimax Rotation

#### - Cluster Analysis

CA has been first applied to and then to variables. In the both cases, the minimum inter-groups distance (MID) and Ward's method have been employed to explain possible shades in their classification. In the case of sampling stations two groups are observed when MID is used (Figure 27). The first one G12-G14 limits the river mouth, and also the agriculture part (G10-G11), where G1 is included. The other group is related with urban sites and presents three divisions: G2-G3, previous to Seville; G4-G6 in the city core; and G7-G8 as urban-agriculture region. As for PCA, G1 and G9 appear with different behaviour when Ward's method is applied. Thus, G1 can be associated with estuarine and urban areas, while G9 is related to the agriculture part (Figure 27).

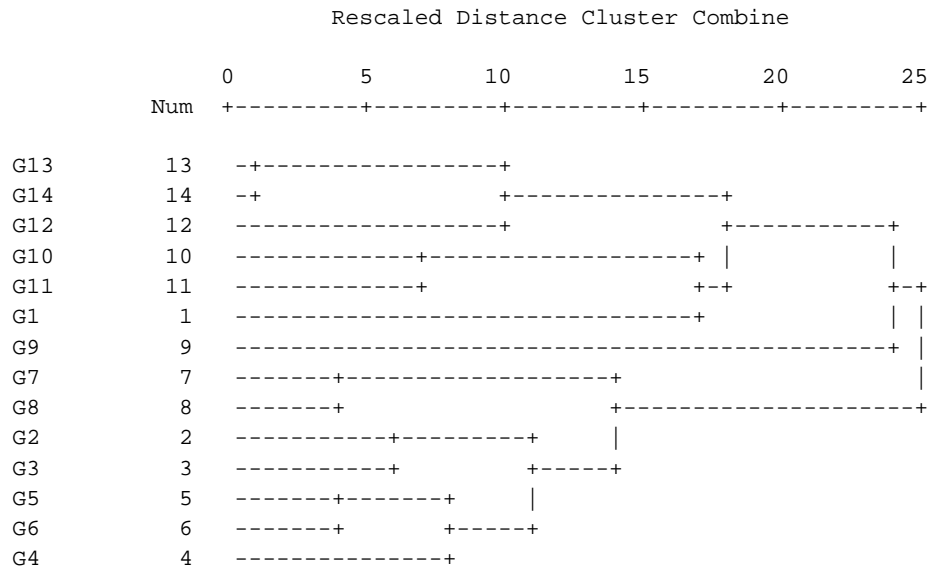


Figure 27. Obtained dendrogram for sampling sites, employing MID method

For variables, two main groups have been obtained applying MID (Figure 28). The first one is divided in two: the estuary, with DIC, TDC, pH, Cd, Salinity, DO, Cu, and Zn ; and the central area with TSS-07, VSS-07 and Ag. The other group can be separated and Pb, Ni,  $PO_4^{3-}$ ,  $NO_3^-$ , and TSS-08 define the end of the urban part, while VSS-08, Co, Mn,  $NO_2^-$ , and  $NH_4^+$  do it Seville. Finally, Ward's method confirms the relationship of TDN, with urban variables.

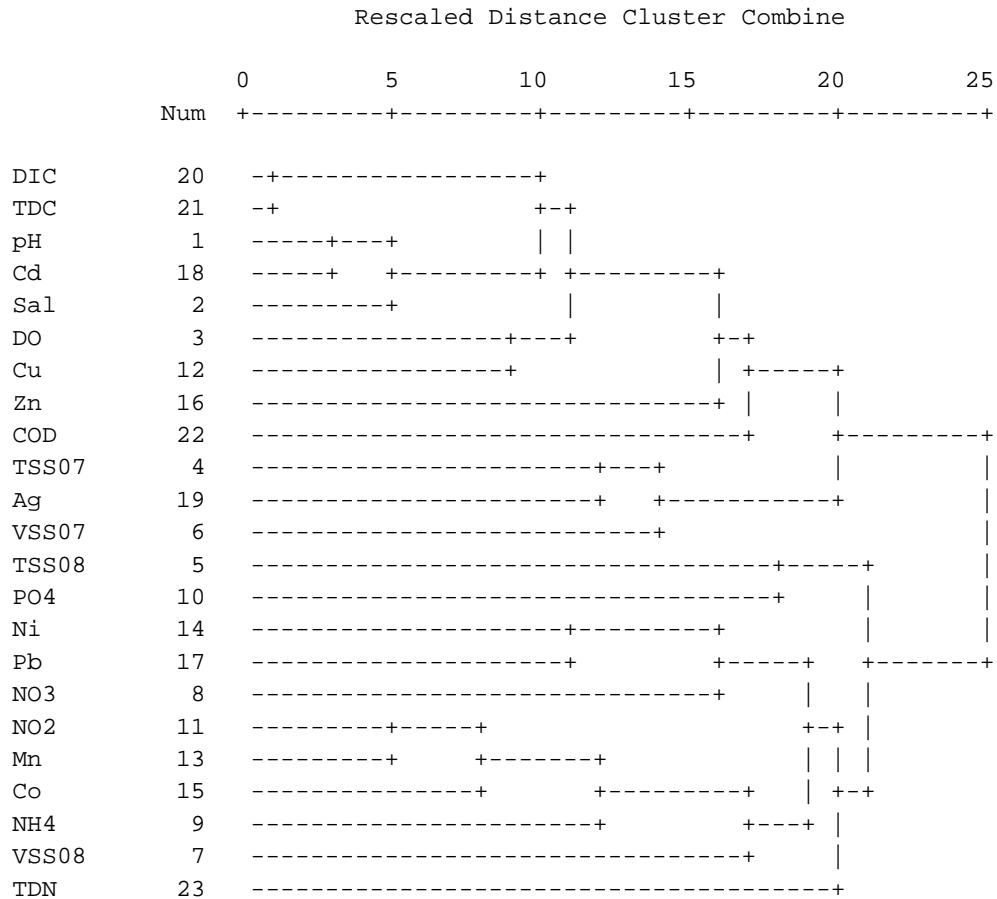


Figure 28. Dendrogram for variables employing MID method

- Fluvial and atmospheric inputs

Fluvial and atmospheric inputs have been first evaluated by box-whiskers graphics and discussed in the basis of their spatial distribution in three groups: urban, agriculture, and the river mouth. Afterwards, discriminant analysis has been applied to characterize pollutants inputs.

- Rain and tributary inputs.

Rain appears as an important input of urban pollution (Figure 29). In G1, Co and Mn concentration is importantly increased after rain events. This can be related with the runoff from the riverside Alcalá del Río village [40]. Moreover, in the core of the urban area (G5-G6) Pb, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and NO<sub>2</sub><sup>-</sup> present limits over the general trend, but a decrease of pH due to rain [41] (Figure 31). In the case of agriculture variables, TSS offer an especial behavior since its distribution changed after heavy rain events in November 2007 in combination with opening of the Alcalá del Río dam [2]. As it can be observed, TSS affected mainly the urban area, where concentrations moved from 39.00 mg·L<sup>-1</sup>-



5.42 mg·L<sup>-1</sup>. Finally, from estuaric variables, only Cd shows an increase in Seville's region [16].

Tributary rivers have also been taken into account (Figure 29, Figure 30). Guadaira River (GR), which conducts the effluents from WWTPs from Seville city, shows higher level of Co, Mn Pb, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, and PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, as well as lower pH and DO, compared with the main river (Figure 9 and Figure 10) [36]. Also a decrease of DO, and an enrichment of Mn and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> is observed for the Guadiamar River (BT), explained by agriculture and the presence of small towns. Finally, Seville's dock (D) offers important concentrations of Ag but a decrease of other urban pollutants as PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> and NO<sub>2</sub><sup>-</sup>.

- Inputs characterization: discriminant analysis

The aforementioned rain episodes of November 2007 caused an increase in the concentration of TSS that masked the effects of other variables. Thus, two discriminant models have been constructed, the first one included TSS and the second was built in the absence of TSS. In both cases, DOC was not taken into account because it did not pass the tolerancy test. VSS were omitted because concentration data were not enough.

In the first case, the model was constructed using three groups in the training set: the urban, the agriculture and the estuaric ones. Two discriminant functions have been built to explain a 77.1% (F1) and a 22.79% (F2), respectively. Then, a territorial map has been obtained using the standardized coefficients of the functions and the structure matrices used to calculate centroids position. Previous to model application, probability of finding the stations in their group is 100%, 81.3%, and 93.8% for urban, agriculture and the river mouth.

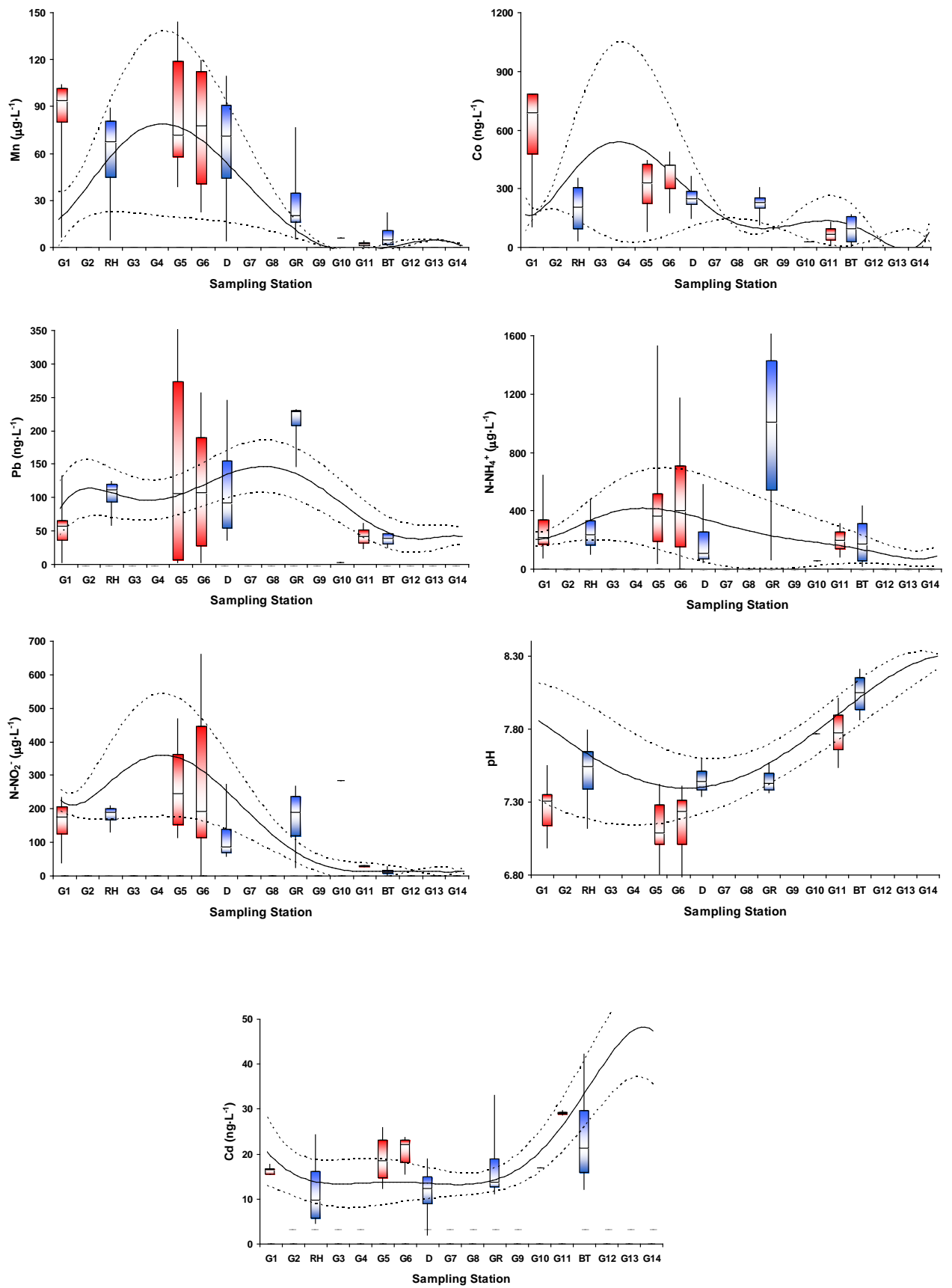


Figure 29. Effect of rain and tributary rivers (I)

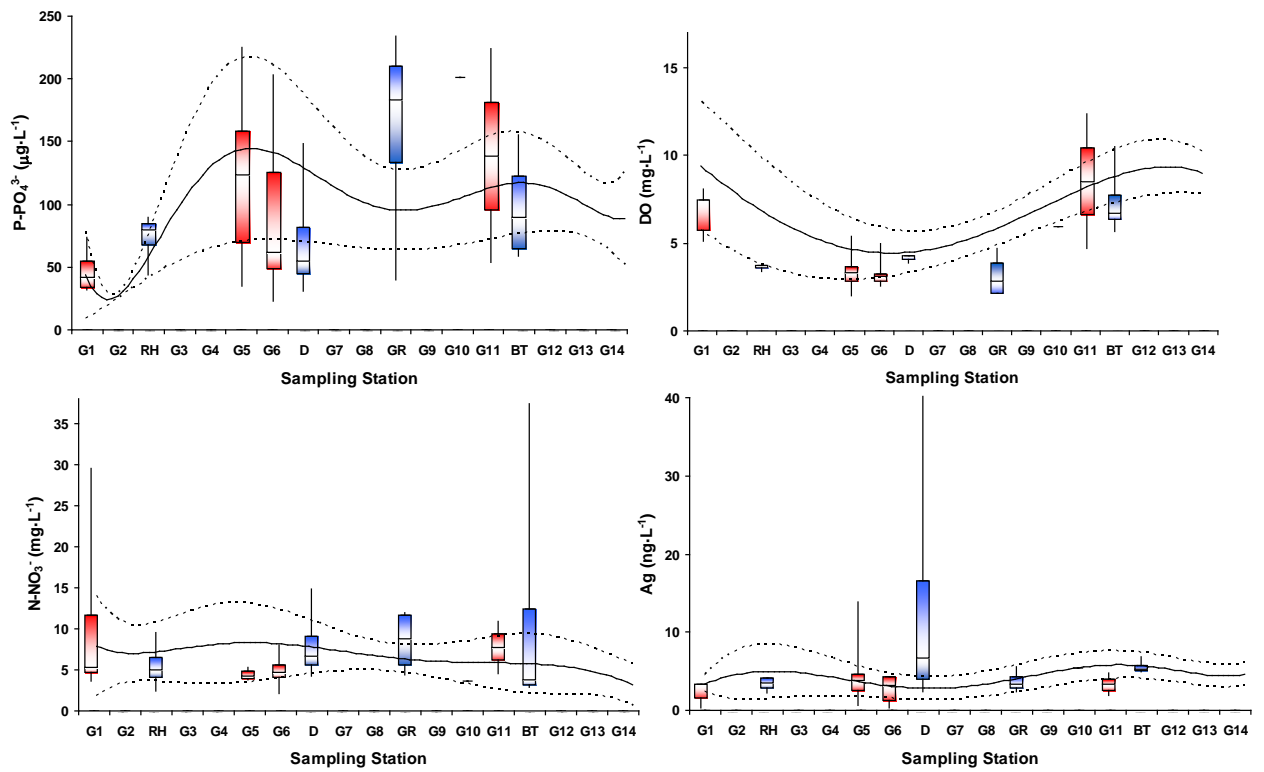


Figure 30. Effects of rain and tributary rivers (II)

Employing the non standardized coefficients of discriminant functions the scores for sampling sites after rain events and tributaries can be calculated and represented in the territorial map. In the case of tributary rivers two groups can be established (Figure 31), being Rivera de Huelva, Seville's dock, and Guadaira River considered urban polluted. Finally, the Guadianar River appears affected by the tide effect. Only in some cases, Guadianar River, Rivera de Huelva and Guadaira River appear as agriculture polluted.

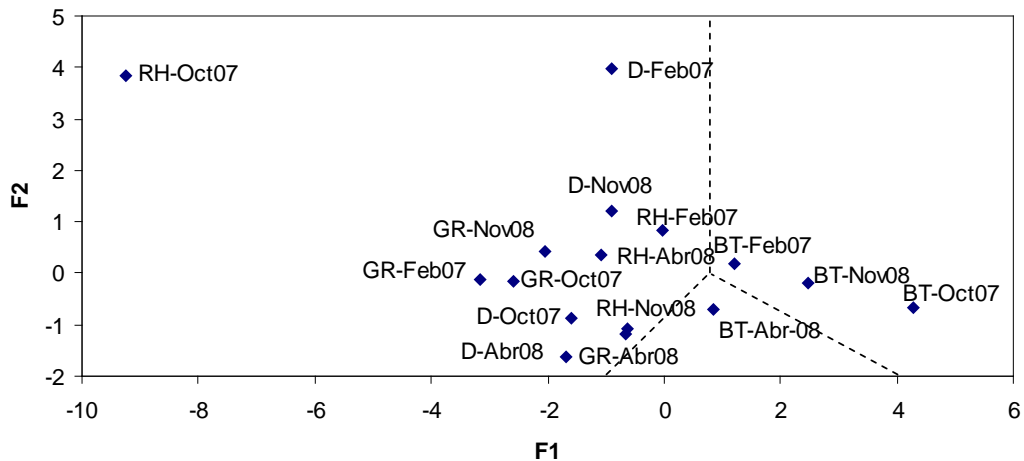


Figure 31. Position of tributary rivers in the territorial map

For rain events, when the TSS have been taken into account (Figure 32), is interesting studying the behavior of urban locations (G5 and G6), which present agriculture characteristics for sampling campaigns after 11/22<sup>nd</sup>/2007. Moreover, G1 appears in the urban region before November 2007, due to Mn and Co increase, but in the agriculture one after this date. Finally, for G10 and G11, rain does not show any influence on pollutants concentration.

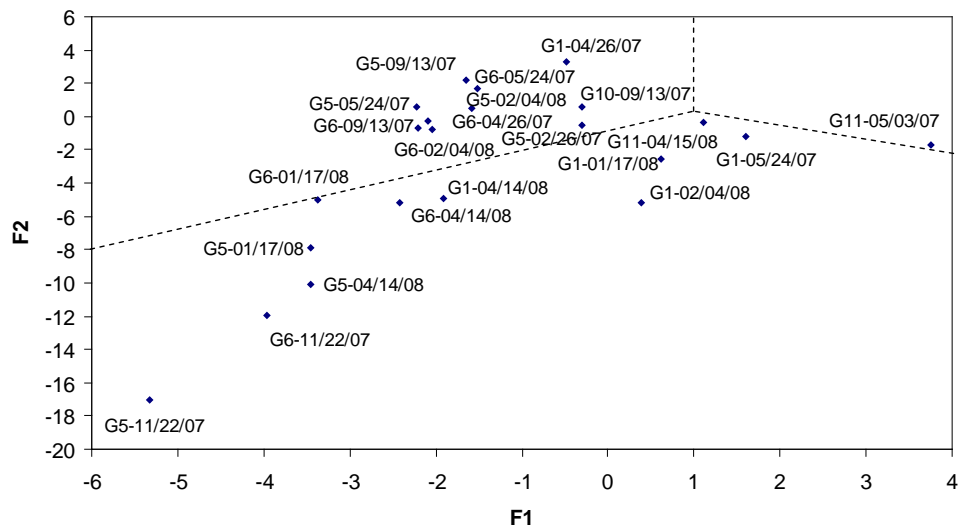


Figure 32. Position of sampling sites in the territorial map, after rain events, including TSS

## Conclusion

Fluvial and atmospheric pollution sources present important influence on the quality of river waters. Establishing the background pollution of an estuary is essential to evaluate and characterize external inputs. In particular the Guadalquivir River is a human modified system, which has been affected by heavy rains and the opening of a dam on its top during 2007-2008. In conclusion, chemometric tools such as PCA, CA, box-whiskers graphics, and discriminant analysis have permitted studying the effects of chemical variables and assessing their origin and characteristics in the selected system. A continuous monitoring and the inclusion of new variables should lead to an improvement of the designed models in the description of the river.

## Bibliography

1. [Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council establishing a framework for the Community action in the field of water policy](#). Official Journal (OJ L 327) on 22 December 2000.
2. Packett, R.; Dougall, C.; Rohde, K. and Noble, R.; (2009) *Agricultural lands are hot-spot for annual runoff polluting the southern Great Barrier Reef lagoon*. Marine Pollution Bulletin **58**, 976-986.
3. Rouvalis, A.; Karadima, K.; Zioris, I.V.; Sakkas, V.A.; Alabanis, T. and Iliopoulou-Georgudaki, J. (2009) *Determination of pesticides and toxic potency of rainwater samples in western Greece*. Ecotoxicology and Environmental Safety **72**, 828-833.
4. Buzier, R. Tusseau-Vuillemin, M.H.; dit Meriadec, C.M.; Rousselot, O. and Mouchel, J.M. (2006) *Trace metal speciation and fluxes within a major French wastewater treatment plant: Impact of successive treatment stages*. Chemosphere **65**, 2419-2426.
5. Sañudo-Wilhelmy, S.A. and Flegal, A.R. (1992) *Anthropogenic silver in the Southern California bight: A new tracer for sewage in coastal waters*. Environmental Science and Technology **26**, 2147-2151.
6. Berzas-Nevado, J.J.; Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C.; Guzman-Bernardo, F.J., Jiménez-Moreno, M., Ortega-Tardío, S, Sánchez- Herrera Fornieles, M.M.; Martítrn-Nieto Ríos, S. and Doncel- Pérez, A. (2009) *Integrated pollution evaluation of the Tagus River in Central Spain*. Environmental Monitoring and Assessment. **156**, 461-477.
7. Vicente-Martorell, J.J.; Galindo-Riaño, M.D.; García-Vargas, M. and Granado-Castro, M.D. (2008) *Heavy metal speciation of stuarine sediments affected by acid mine drainage in the Tinto and Odiel estuary, Spain. Relationship to bioconcentration of fish tissues*. Fresenius Environmental Bulletin **17**, 1744-1754.
8. [Komárek, M.](#); [Száková, J.](#); [Rohošková M.](#); [Javorská, H.](#); [Chrastný, V.](#) and [Balík, J.](#) (2008) *Copper contamination of vineyard soils from small wine producers: A case study from the Czech Republic*. Geoderma **147**, 16-22.
9. N'guessan, Y.M.; Probst, J.L; Bur, T. and Probst, A.; (2009) *Trace elements from stream bed sediments form agricultural catchments (Gascogne region, SW France) Where do they come from?*. Science of the Total Environment **407**, 2939-2952.
10. Franco-Uría, A.; López-Mateo, C.; Roca, E. and Fernández-Marcos, M.L. (2009) *Source identification of heavy metals in pastureland by multivariate analysis in NW Spain*. Journal of Hazardous materials **165**, 1008-1015.
11. Kayhanian, M.; Stransky, C.; Bay, S.; Lau, S-L. and Stenstrom, M.K. (2008) *Toxicity of urban highway runoff with respect to storm duration*. Science of the Total Environment **389**, 386-406.

12. Zhu, Y.; Liu, P.; Liu, H.; Zhang, H. and Chen, L. (2009) *Pollutant washoff characterization of expressway runoff in Shanghai*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **83**, 298-402.
13. Aleksic, N.; Roy, K.; Sistla, G.; Dukett, J.; Houck, N. and Casson, P. (2009) *Analysis of cloud and precipitation chemistry at Whiteface Mountain , NY*. Atmospheric Environment **43**, 2709-2716.
14. Ruhling, A. and Tyler, G. (2004) *Changes in the atmospheric deposition of minor and rare elements between 1975 and 2000 in south Sweden, as measured by moss analysis*. Environmental Pollution **131**, 417-423.
15. Berg, T.; Aas, W.; Pacyna, J.; Uggerud, H.T. and Vadset, M. (2008) *Atmospheric trace metals concentrations at Norwegian Background sites during 25 years and it relation to Europeans emissions*. Atmospheric Environment **42**, 7494-7501.
16. Debout K.; Flament, P. and Bertho, M.L. (2004) *Cd, Cu, Pb y Zn concentrations in atmospheric wet deposition at a coastal station in western Europe*. Water, Air and Soil Pollution **151**, 335-359.
17. Mendiguchía, C.; Moreno, C.; Galindo-Riaño, M.D. and García-Vargas, M. (2004) *Using chemometric tools to assess anthropogenic effects in river waters: A case study; the Guadalquivir river (Spain)*. Analytica Chimica Acta **515**, 143-149.
18. Martín Galvín, R. (1995) *Análisis de aguas y ensayos de tratamiento*. Ed. Gestió i Promoció Editorial, S. A: Barcelona.
19. Rodier, J. (1990) *Análisis de las aguas*. Ed. Omega, Madrid.
20. Tovar, A.; Moreno, C.; Manuel-Vez, M.P. and García-Vargas, M. (2002) *A simple automated method for the speciation of dissolved inorganic nitrogen in seawater*. Analytica Chimica Acta **469**, 2325-242.
21. Pino, V.; Hernández-Martín, I.; Ayala, J.H.; González, V. and Alfonso, A.M. (2007) *Evaluation of the uncertainty associated to the determination of heavy metals in seawater using graphite furnace atomic absorption spectrometry*. Analytical letters **40**, 3322-3342.
22. Cabon, J.Y. (2002) *Determination of Cu and Mn in seawater by graphite furnace atomic absorption spectrometry with the use of hydrofluoric acid as a chemical modifier*. Spectrochimica Acta Part B, Atomic Spectroscopy **57**, 939-950.
23. Miller, J.N. and Miller, J.C. (2005) *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. Fifth edition. Pearson Education Limited, Harlow.
24. Ortiz, M.C. y Sarabia, L.; (2007) *Temas Avanzados de Quimiometría*. Ed. M. Blanco y V. Cerdá, Servei de Publicacions i Intercanvi Científic. Universitat Illes Balears, Illes Balears (Palma).
25. Ramis, G. and García, M.C. (2001) *Quimiometría*. Ed. Síntesis, 2001.
26. Bhatt, M.P. and Gardner, K.H. (2008) *Variation in DOC and trace metal concentration along the heavily urbanized basin in Kathmandú Valley, Nepal*. Environmental Geology **96** , 1-10.

27. Dassenakis, M.; Scoullou, M. and Gaitis, A. (1997) *Trace metals transport and behaviour in the Mediterranean estuary of Acheloos river*. Marine Pollutin Bulletin **34**, 103-111.
28. Laryushkin-Zheleznyi, B.V. and Novikov, A.V. (2005) *On the distribution of mineral nitrogen forms in polluted waters reaches in urban territories*. Water Resources **32**, 537-544.
29. Lorite-Herrera, M.; Hiscock, K. and Jiménez-Espinosa, R.; (2009) *Distribution of dissolved inorganic and organic nitrogen in river water and groundwater in an agriculturally-dominated catchment, south-East Spain*. Water Air Soil Pollution **198**, 335-346.
30. Decreto 261/1998, de 15 de diciembre, por el que se designan las zonas vulnerables a la contaminación por nitratos procedentes de fuentes agrarias en la comunidad autónoma de Andalucía. 12 de enero de 1999.
31. Ahad, J.M.E.; Ganeshram, R.S.; Spencer, R.G.M., Uher, G.; Upstill-Goddard, R.C. and Cowie, G.L. (2006) *Evaluating the sources and fate of anthropogenic dissolved inorganic carbon (DIN) in two contrasting North Sea estuaries*. Science of the Total Environment **372**, 317-333.
32. Kannel, P.R.; Lee, S.; Kanel, S.R.; Khan, S.R. and Lee, Y.S. (2007) *Spatial-temporal variation and comparative assessment of water quality in urban river system: A case study of the river Bagmati (Nepal)*. Environmental Monitoring and Assessment **129**, 433-459.
33. Tetzlaff, B.; Kuhr, P.; Vereecken, H. and Wendland, F. (2009) *Aerial photograph-based delineation of artificially drained areas as a basis for water balance and phosphorous modelling in large river basins*. Physics and Chemistry of the Earth **34**, 552-564.
34. Raymond, P.A.; Oh, N.H.; Turner, R.E. and Broussard, W. (2009) *Anthropogenically enhanced fluxes of water and carbon from the Mississippi River*. Nature **451**, 449-452.
35. Almeida, C.A.; Quintar, S.; González, P. and Mallea, M.A. (2007) *Influence of urbanization and tourist activities on the water quality off the Potrero de los Funes River (San Luis-Argentina)*. Environmental Monitoring and Assessment **133**, 459-465.
36. Mendiguchía, C.; Moreno, C. and García-Vargas, M. (2007) *Evaluation of natural and anthropogenic influences on the Guadalquivir River (Spain) by dissolved heavy metals and nutrients*. Chemosphere **69**, 1509-1517.
37. Soto-Jiménez, M.F. and Flegal, A.R. (2009) *Origin of lead in the Gulf of California Ecoregion using stable isotope analysis*. Journal of Geochemical Exploration **101**, 209-217.
38. Buzier, R.; Tusseau-Vuillemin, M.H.; Kerisbulck, M. and Mouchel, J.M. (2008) *Inputs of total and labile trace metals from wastewater treatment plants effluents to the Seine River*. Physics and Chemistry of the Earth. Article in press.
39. Elbaz-Poulichet, F.; Garnier, J.M., Guan, D.M.; Martín, J.M. and Thomas, A.J. (1996) *The conservative behaviour of trace metals (Cd, Cu, Ni, and Pb)*



*and As in the surface plume of stratified estuaries: Example of the Rhone River (France) Estuarine*. Coastal and Shelf Science **42**, 289-310.

40. Ozsoy, T. and Ornektekin, S. (2009) *Trace elements in urban and suburban rainfall, Mersin, Northeastern Mediterranean*. Atmospheric Research **94**, 203-219.
41. Aleksic, N.; Roy, K.; Sistla, G.; Dukett, J.; Houck, N. and Casson, P. (2009) *Analysis of cloud and precipitation chemistry at Whiteface Mountain , NY*. Atmospheric Environment **43**, 2709-2716.

## ANEXO I

### Reactivos, disoluciones, instrumentación analítica y materiales

#### *Reactivos*

- Acetato amónico ( $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ): P.A., Merck (Alemania)
- Acetato de etilo ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ): HPLC, Scharlab (España)
- Ácido L(+) ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ): P.A., Merck (Alemania)
- Ácido clorhídrico 37% (HCl): P.A., Merck (Alemania)
- Ácido dietilentriaminopentacético, DTPA, ( $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_{10}$ ): Cristalizado, Sigma (Alemania)
- Ácido etilendiamintetraacético, EDTA, sal disódica, dihidrato ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ): P.A., Scharlab (España)
- Ácido fluorhídrico 40% (HF): P.A., Scharlab (España)
- Ácidos húmicos 98% Acros, (Bélgica)
- Ácido nítrico 65% ( $\text{HNO}_3$ ): P.A., Scharlab (España)
- Ácido nítrico 65% ( $\text{HNO}_3$ ): Suprapur, Scharlab (España)
- Ácido sulfúrico 97% ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ): P.A., Merck (Alemania)
- Bicarbonato sódico ( $\text{NaHCO}_3$ ): P.A., Merck (Alemania)
- Bromuro potásico (KBr): P.A., Merck (Alemania)
- Cadmio metálico 0,3-1,6 mm (Cd): Merck (Alemania)
- Carbonato Cálcico ( $\text{CaCO}_3$ ): P.A., Merck (Alemania)
- Cloroformo ( $\text{CHCl}_3$ ): P.A., Merck (Alemania)
- Cloruro amónico ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ): P.A., Merck (Alemania)
- Cloruro potásico (KCl); P.A., Merck (Alemania)
- Cloruro sódico (NaCl): P.A., Merck (Alemania)
- Citrato de trisodio ( $\text{C}_6\text{O}_7\text{H}_5\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ): P.A., Merck (Alemania)
- Dietilamonio dietilditiocarbamato (DDDC) ( $\text{C}_9\text{H}_{22}\text{N}_2\text{S}_2$ ): P.A., Scharlab (España)
- Dihexileter 97% ( $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}$ ): Purum, Fluka (Japan)
- Etanol 96% ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ): P.A., Merck (Alemania)
- Fenol ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ ): P.A., Merck (Alemania)
- Hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ): HPLC, Scharlab (España)
- Hidróxido sódico (NaOH): P.A., Merck (Alemania)
- Hipoclorito sódico disolución 5% p/v ( $\text{NaClO}$ ): P.A., Sharlab (España)

- Heptamolibdato de amonio tetrahidratado ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O): P.A., Merck (Alemania)
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH): P.A., Merck (Alemania)
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH): HPLC-Gradient, Scharlab (España)
- N-1-naftil-etilendiamina diclorhidrato (C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>): P.A., Merck (Alemania)
- Nitrato de paladio (Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>): 10g·L<sup>-1</sup>, Panreac (España)
- Nitrato potásico (KNO<sub>3</sub>): P.A., Merck (Alemania)
- Nitrito sódico (NaNO<sub>2</sub>): P.A., Merck (Alemania)
- Potasio dihidrogenofosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>): P.A., Merck (Alemania)
- 1-pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC) (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>NS<sub>2</sub>NH<sub>4</sub>): Fluka (Alemania)
- Sodio nitroprusiato dihidratado (Na<sub>2</sub>Fe(CN)<sub>5</sub>NO·2H<sub>2</sub>O): P.A., Merck (Alemania)
- Sulfanilamida (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S): P.A., Merck (Alemania)
- Sulfato de cobre (II) pentahidratado (CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O): P.A., Merck (Alemania)
- Sulfato amónico ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>): P.A., Merck (Alemania)
- Sulfito de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>): P.A., Scharlab, (España)
- Sulfuro de triisobutilfosfina (C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>PS): Cyanamide, (EE.UU.)
- Tartrato doble de antimonio y potasio (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KO<sub>7</sub>Sb·0,5H<sub>2</sub>O): P.A., Merck (Alemania)
- Tiocianato de sodio (NaSCN·5H<sub>2</sub>O): P.A., Merck (Alemania)
- Tiosulfato de sodio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>): P.A., Scharlab (España)
- Tolueno (C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>): Purísimo, Scharlab (España)

### *Disoluciones patrón*

#### *Metales*

- Cadmio: 1,000 ± 0,002 g·L<sup>-1</sup> en 2 % HNO<sub>3</sub>, ICP-MS, Panreac (España)
- Cobalto: 1,000 ± 0,002 g·L<sup>-1</sup> en 2,5% HNO<sub>3</sub>, ICP-MS, Panreac (España)
- Cobre: 1,000 ± 0,002 g·L<sup>-1</sup> en 2-3% HNO<sub>3</sub>, ICP-MS, Panreac (España)
- Níquel: 1,000 ± 0,002 g·L<sup>-1</sup> en 2,5% HNO<sub>3</sub>, ICP-MS, Panreac (España)
- Manganeso: 1,000 ± 0,002 g·L<sup>-1</sup> en 2,5% HNO<sub>3</sub>, ICP-MS, Panreac (España)
- Plata: 1,000 ± 0,002 g·L<sup>-1</sup> en 2,5% HNO<sub>3</sub>, ICP-MS, Panreac (España)
- Plomo: 1,000 ± 0,002 g·L<sup>-1</sup> en 2,5% HNO<sub>3</sub>, ICP-MS, Panreac (España)
- Zinc: 1,000 ± 0,002 g·L<sup>-1</sup> en 2% HNO<sub>3</sub>, ICP-MS, Panreac (España)
- Ytrio: 1,000 ± 0,002 g·L<sup>-1</sup> en 2% HNO<sub>3</sub>, ICP-MS, Panreac (España)
- Rodio: 1,000 ± 0,002 g·L<sup>-1</sup> en 2,5% HNO<sub>3</sub>, ICP-MS, Panreac (España)
- Bismuto: 1,000 ± 0,002 g·L<sup>-1</sup> en 2,5% HNO<sub>3</sub>, ICP-MS, Panreac (España)

#### Compuestos orgánicos:

- Alachlor: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
- Atrazine: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
- Atrazine-d5: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
- Cafeína: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
- Dimetoato: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
- Lindano: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
- Metalachlor: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
- Metildihidrojasmonato: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
- PCB-65: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
- PCB-166: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
- Simazine: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
- Triclosan: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
- Trifenilamina: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)
- Triscloroetilfosfato: 10ng/μL en hexano, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Alemania)

#### Materiales de Referencia

- NRC-SLEW3, metales pesados en agua de estuario, National Research Council, Canadá
- BCR-714, metales en agua de mar, IRMM, Bruselas (Bélgica)

#### *Disoluciones*

##### 2. Cloroformo para extracción de metales en agua de mar:

El cloroformo debe limpiarse antes de utilizarlo para las extracciones de metales en agua de mar y para la preparación de las disoluciones descritas a continuación. Esta limpieza se lleva a cabo en una sala blanca y se realiza siguiendo estos pasos:

- Se llena una botella de teflón con cloroformo, dejando vacío un espacio de 1 pulgada que se completa con agua milli-Q.
- Se agita con fuerza y se expulsa el agua apretando la botella. Repetir al menos cuatro veces.

### 3. Disolución de APDC/DDDC para extracción de metales en agua de mar

- Tarar un embudo de separación de teflón de 125 ml y pesar como mínimo 1,5 g de APDC y otros 1,5 g de DDDC dentro del embudo usando una espátula de teflón. Llevar a 100 mL con agua milliQ.
- Añadir 1 mL de hidróxido amónico para estabilizar el ligando.
- Limpiar la disolución por extracción con cloroformo.
- Añadir 5 mL de cloroformo, agitar durante 2 minutos y dejar separar 5 min. Sacar el cloroformo al bote de residuos y repetir dos veces usando 3mL de cloroformo.
- Transferir la disolución a un bote de teflón de 60 mL enjuagando primero el frasco con la disolución.
- Añadir 500µL de cloroformo. La disolución es útil por tres días a temperatura ambiente.

### 4. Acetato amónico para extracción de metales en agua de mar

- En una botella de 1L de polietileno preparar una disolución saturada de acetato amónico usando agua milli-Q.
- Limpiar la disolución mediante extracción con cloroformo y APDC/DDDC.
- Tomar 250 mL de la disolución en un embudo de decantación y añadir 1 mL APDC/DDDC y 8 mL de cloroformo. Agitar 2 min y dejar separar 5 min. Repetir dos veces usando 6 mL de cloroformo.
- Almacenar la disolución de acetato amónico a una botella de polietileno.

### *Instrumentación analítica*

- Agitador magnético, RO10, IKA-WERKE (Alemania)
- Balanza AA-160, Denver Instrument Company (EE.UU.)
- Bomba peristáltica Masterflex, Cole Parmer (EE.UU.)
- Cabezales Easy-Load Masterflex, Cole-Parmer (EE.UU.)
- Campana de flujo laminar con filtro absoluto HEPA, Crumair 9005-FL, Cruma (España)
- Campana de flujo laminar con filtro ULPA, Series CSB (Clase II según EN12469): EuroAire, TDI s.a. (España)
- Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas, TRACE-GC-MS Thermo-Finnigan, (Alemania)

- Electrodo de pH 211 Microprocessor pH-meter, Hanna (EE.UU.)
- Espectrofotómetro UV-VIS, Lambda 11, Perkin Elmer (EE.UU.)
- Espectrofotómetro de UV-VIS, 640-UV, Jenway (Reino Unido)
- Espectrofotómetro de absorción atómica, GNC 932 AA, GB (Australia)
- Espectrofotómetro de absorción atómica, SolaarM, Thermo (Reino Unido)
- Espectrofotómetro de absorción atómica, AAnalyst800, Perkin-Elmer (EE.UU.)
- Espectrómetro de masas con plasma acoplado inductivamente, Series X-7, Thermo (Reino Unido)
- Estufa Contern Cod. 2000209, Selecta (España)
- Jeringa de plástico de 0,5 mL BD-Micro-Fine (Beckton and Dickinson, EE.UU.)
- Micropipetas de volumen variable, Eppendorf (Alemania)
- Micropipetas de volumen fijo, Pipetman F, Gilson (Francia)
- Conductímetro-pHmetro 4330, Jenway (Reino Unido)
- Sonda multiparamétrica portátil (pH, T<sup>a</sup>, Conductividad, oxígeno disuelto), Sension 156, Hach (EE.UU.)
- Válvula de inyección, Modelo 1106, Omnifit (Reino Unido)

### *Materiales*

- Botes de polietileno de baja densidad, diferentes volúmenes, Azlon Bibby (Reino Unido)
- Botes de vidrio ámbar 250 mL, Scharlab (España)
- Calyx capsule polypropylene 0,45 µm, Osmonics Inc. (EE.UU.)
- Cartucho de preconcentración StrataX® de 100 mg de fase polimérica, Phenomenex, (USA)
- Columna cromatográfica 25x100 mm, Omnifit (Reino Unido)
- Columna cromatográfica capliar TBR-5, Teknokroma, (España)
- Fibra hueca capilar, Q3/2 Accurel PP, Membrana (Alemania)
- Precolumna cromatográfica desactivada, Teknokroma, (España)
- Cubetas de cuarzo de 1 y 5 cm de paso de luz, Starna Ltd. (EE.UU.)
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz para flujo continuo, Hellma (Alemania)
- Embudos de separación de Teflón, Nalgen Nunc. International, Cole-Parmer (EE.UU.)
- Filtro de microfibra de vidrio de 0,7 µm, Albus (España)
- Filtros de nylon de 0,5 µm, Millipore (EE.UU.)
- Matraces aforados de vidrio, diferentes volúmenes, Afora (España)

- Matraces aforados de polipropileno, diferentes volúmenes, Albus (España)
- Pipetas de vidrio, diferentes volúmenes, Afora (España)
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Tubos C-Flex, Cole-Parmer (EE.UU.)
- Tubos de Teflón, Cole-Parmer (EE.UU.)
- Tubos transportadores para flujo en continuo, PTFE, Omnifit (Reino Unido)
- Tubos de grafito con calentamiento longitudinal, Thermo (Reino Unido)
- Tubos de grafito con calentamiento transversal, Perkin-Elmer (EE.UU.)
- Vidrios de reloj, Afora (España)

## ANEXO II

### Concentración de las variables estudiadas para cada muestreo y estación de toma de muestra.

Los datos se encuentran divididos en dos bloques, el primero corresponden a los muestreos generales, mientras que el segundo lo hace con los muestreos selectivos. En ambos casos, cuando las concentraciones del contaminante no se han podido determinar se ha expresado en las tablas como el valor del límite de detección en cursiva.

Las unidades en las que se encuentran las concentraciones de las distintas variables son las siguientes:

- T: °C
- OD, SST, SSV,  $\text{NO}_3^-$ , COD, CID, CTD y NTD:  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .
- $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , Cu, Mn, Ni, Zn:  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .
- Cd, Pb, Ag, Co y compuestos orgánicos:  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 1. Muestreo general

##### 1.1. Materia inorgánica

#### Toma de muestras 1: Febrero de 2007

Variables físico-químicas:

Estación	Temperatura	pH	Salinidad	DO	SST
G1	11,9	8,10	0,7	15,90	53,00
G2	12,1	7,90	0,7	11,29	96,25
RH	11,9	7,79	0,7	10,70	81,50
G3	13,0	7,87	0,7	10,10	50,83
G4	13,2	7,63	0,7	10,44	44,00
G5	9,7	7,37	0,7	5,94	39,00
G6	9,7	7,41	0,7	6,42	49,17
D	10,9	7,60	0,7	7,65	47,00
G7	12,0	7,43	0,7	5,88	50,43
G8	12,9	7,50	0,7	4,61	41,25
RG	12,3	7,47	0,7	3,61	273,33
G9	13,2	7,58	0,7	5,95	545,00
G10	10,2	7,72	1,3	8,36	107,50
G11	11,8	8,01	3,4	11,58	160,00
BT	12,2	8,21	1,9	10,48	120,00
G12	13,6	8,06	5,8	9,61	260,00
G13	12,5	8,07	7,5	9,62	295,83
G14	13,2	8,11	14,1	10,61	152,50



Nutrientes:

Estación	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
G1	20,00	100,62	6,06	152,61
G2	12,90	363,24	26,24	135,66
RH	9,51	479,91	82,85	179,77
G3	4,02	562,05	63,18	157,44
G4	31,31	806,33	218,42	142,94
G5	7,97	600,14	332,73	182,50
G6	9,68	1270,94	150,95	258,17
D	14,88	583,03	148,38	274,68
G7	8,24	636,51	180,10	120,43
G8	13,39	895,13	71,44	208,07
RG	11,63	1317,13	164,25	268,76
G9	8,10	548,63	131,88	120,32
G10	9,62	512,20	251,21	1,83
G11	8,15	362,53	36,80	11,77
BT	37,44	436,53	58,63	27,72
G12	12,91	212,30	117,13	17,58
G13	7,99	148,67	147,47	12,85
G14	8,11	201,00	125,97	15,97

Metales

Estación	Cu	Mn	Ni	Co	Zn	Pb	Cd	Ag
G1	1,97	7,54	5,29	230,47	0,84	49,01	11,74	3,95
G2	1,66	43,45	3,55	374,65	0,71	74,49	11,63	1,79
RH	1,32	89,25	2,69	33,90	0,59	104,76	4,50	3,01
G3	1,44	68,09	2,54	416,15	0,72	96,98	8,27	1,48
G4	1,30	73,34	0,92	2892,29	0,74	136,21	5,32	1,48
G5	1,32	190,05	3,10	526,58	3,13	214,29	15,03	2,18
G6	1,34	98,92	2,75	509,88	2,75	170,74	10,75	1,73
D	1,67	57,54	2,15	242,26	1,43	60,55	11,25	2,33
G7	1,60	80,94	2,93	396,71	2,92	156,87	10,01	1,89
G8	2,63	38,65	3,21	210,68	3,70	225,73	11,88	2,07
RG	1,71	76,37	3,27	307,17	4,09	229,31	11,14	3,03
G9	2,51	8,47	3,04	147,70	3,95	190,41	16,02	2,41
G10	3,14	4,86	2,80	83,65	2,57	136,44	14,05	3,79
G11	4,13	0,57	2,25	68,24	2,72	90,65	18,20	4,19
BT	3,36	7,01	1,56	168,84	3,98	46,32	12,21	4,91
G12	5,56	2,05	2,07	66,39	4,26	63,91	21,42	2,70
G13	4,79	0,96	2,08	58,04	3,76	55,97	31,92	3,02
G14	4,28	1,04	1,94	48,90	3,80	42,20	42,55	2,78

Carbono y nitrógeno total:

Estación	CID	CTD	COD	NTD
G1	18,45	22,13	3,68	24,51
G2	-	-	-	-
RH	21,40	25,17	3,77	35,67
G3	25,90	29,05	3,14	78,98
G4	20,21	23,59	3,38	35,45
G5	13,32	15,67	2,35	20,19
G6	27,44	29,58	2,13	21,81
D	50,17	55,80	5,63	29,02
G7	14,79	17,10	2,30	9,21
G8	21,62	23,42	1,80	8,37
RG	10,64	16,30	5,66	13,62
G9	27,24	32,59	5,36	8,86
G10	25,95	28,47	2,52	10,98
G11	11,87	16,64	4,76	10,87
BT	17,02	20,69	3,67	7,61
G12	28,07	31,80	3,73	13,81
G13	51,69	55,30	3,60	9,23
G14	17,63	22,37	4,73	8,98

Toma de muestras 2: octubre de 2007

Variables físico-químicas:

Estación	Temperatura	pH	Salinidad	DO	SST	SSV
G1	20,6	7,28	0,9	4,90	29,12	12,94
G2	21,3	7,25	0,8	4,68	161,25	21,25
RH	21,5	7,48	0,7	3,76	90,98	20,95
G3	21,9	7,41	0,6	3,08	191,83	57,67
G4	23,1	7,31	0,6	1,91	143,89	34,38
G5	18,4	7,38	0,6	1,86	172,14	35,00
G6	21,1	7,33	0,7	2,56	41,76	15,88
D	20,4	7,48	0,6	4,28	36,75	17,25
G7	21,7	7,35	0,6	3,09	143,75	18,75
G8	19,9	7,46	0,8	2,80	236,00	47,00
RG	19,2	7,57	0,8	2,12	402,50	48,75
G9	18,6	7,82	1,2	5,09	443,75	57,50
G10	18,4	7,78	1,1	6,91	359,00	32,00
G11	21,0	8,10	7,3	6,72	215,00	38,75
BT	21,8	8,13	11,3	6,87	205,00	28,33
G12	21,4	8,15	18,6	6,62	206,56	41,11
G13	22,2	8,17	29	6,99	81,69	16,07
G14	21,6	8,29	31,5	7,07	85,00	14,32

Nutrientes:

Estación	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
G1	3,85	207,38	31,18	120,07
G2	4,04	293,77	36,49	143,03
RH	5,42	280,76	75,61	197,03
G3	4,97	324,96	78,97	346,11
G4	6,32	823,11	100,86	685,08
G5	5,52	130,86	269,41	335,40
G6	5,03	239,19	48,85	392,15
D	4,18	44,15	30,86	74,03
G7	14,58	83,74	99,53	71,16
G8	5,65	111,23	137,99	110,48
RG	4,36	1747,90	202,54	225,62
G9	2,73	57,82	78,61	4,37
G10	2,64	35,50	71,85	3,82
G11	1,69	35,80	104,74	3,69
BT	3,29	74,16	66,45	13,25
G12	1,16	14,56	89,81	25,24
G13	0,81	16,18	51,65	16,16
G14	0,65	16,18	28,68	6,98

Metales

Estación	Cu	Mn	Ni	Co	Zn	Pb	Cd	Ag
G1	2,26	3,73	0,18	10,18	0,08	31,97	17,47	1,48
G2	1,32	66,02	3,45	316,16	0,81	53,19	5,59	2,11
RH	1,09	77,71	3,33	352,17	0,83	57,96	6,14	2,16
G3	0,95	150,20	3,00	421,85	1,14	49,36	11,38	16,40
G4	0,97	159,30	3,21	380,93	1,32	48,70	12,28	1,48
G5	1,19	32,06	2,08	157,81	0,61	82,09	2,12	8,52
G6	0,89	143,30	3,25	295,30	0,94	58,70	2,00	4,99
D	1,24	84,38	2,71	258,26	0,60	35,70	2,00	8,69
G7	1,13	41,28	3,05	118,09	1,26	86,03	16,50	2,04
G8	1,51	4,77	3,37	89,40	1,63	113,37	12,53	1,48
RG	1,13	20,71	3,89	233,29	2,27	230,81	33,02	2,40
G9	2,60	0,58	3,19	55,47	1,02	55,63	5,48	16,80
G10	2,98	0,83	3,20	35,29	0,82	37,05	14,56	5,70
G11	4,35	0,52	2,79	28,68	0,79	18,90	33,12	7,31
BT	3,94	1,43	0,39	27,92	0,08	46,07	42,29	6,93
G12	3,82	0,73	1,91	35,98	1,62	36,43	35,18	7,86
G13	1,99	2,34	0,97	60,38	2,03	115,26	31,91	7,72
G14	1,62	3,13	0,73	67,88	2,26	52,53	31,30	4,36

Carbono y nitrógeno total:

Estación	CID	CTD	COD	NTD
G1	51,69	57,89	6,19	7,42
G2	17,63	20,20	2,57	16,68
RH	-	-	-	-
G3	32,17	35,94	3,77	6,10
G4	18,14	21,20	3,06	2,39
G5	22,59	26,81	4,22	1,47
G6	20,88	25,12	4,25	7,11
D	21,83	24,70	2,88	5,04
G7	21,94	25,10	3,16	2,44
G8	16,57	19,42	2,85	11,84
RG	26,87	30,72	3,85	13,45
G9	17,23	21,91	4,68	1,61
G10	9,92	12,67	2,75	25,30
G11	25,88	28,23	2,35	14,77
BT	19,09	22,09	3,00	24,99
G12	28,00	32,15	4,15	35,06
G13	36,22	39,18	2,96	26,01
G14	37,44	42,08	4,64	21,16

Toma de muestras 3: abril de 2008

Variables físico-químicas:

Estación	Temperatura	pH	Salinidad	DO	SST	SSV
G1	20,6	8,00	0,4	5,80	90,40	12,94
G2	21,3	7,70	0,4	4,60	175,00	8,75
RH	21,0	7,60	0,4	3,40	173,00	20,95
G3	21,2	7,60	0,5	5,70	228,00	45,00
G4	20,1	7,90	0,5	2,80	408,00	87,50
G5	20,2	7,60	0,4	2,20	678,30	95,00
G6	18,6	7,40	0,5	2,60	446,70	190,00
D	17,9	7,40	0,6	3,87	116,40	1,75
G7	17,9	7,60	0,6	3,78	370,00	18,75
G8	19,3	7,30	0,5	3,25	270,00	19,00
RG	18,9	7,40	0,5	4,71	280,00	45,00
G9	19,0	7,69	0,5	4,76	282,00	120,00
G10	19,0	7,57	0,6	3,89	1075,00	32,00
G11	20,0	7,90	8,6	5,57	760,00	38,75
BT	20,8	7,90	3,14	5,64	433,10	28,33
G12	20,2	7,90	10	6,62	201,00	41,11
G13	20,0	8,10	12,6	6,99	112,90	16,07
G14	21,6	8,30	31,5	7,07	188,00	14,32

Nutrientes:

Estación	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
G1	4,16	196,95	95,36	207,31
G2	7,03	162,95	104,68	242,74
RH	4,64	184,95	89,23	208,49
G3	5,00	111,95	61,50	178,76
G4	5,53	111,62	65,36	124,78
G5	5,85	147,29	82,86	83,39
G6	5,11	186,29	212,48	130,11
D	6,00	75,62	59,89	59,89
G7	5,86	77,95	82,18	105,86
G8	5,54	151,29	87,86	95,05
RG	11,90	699,49	234,00	151,45
G9	5,53	100,29	113,32	27,58
G10	4,16	138,69	84,68	2,85
G11	4,64	127,03	153,32	9,14
BT	4,17	267,80	155,82	8,87
G12	13,14	215,80	144,68	8,12
G13	4,52	16,44	163,47	9,35
G14	2,95	16,18	120,14	7,53

Metales

Estación	Cu	Mn	Ni	Co	Zn	Pb	Cd	Ag
G1	4,05	65,13	2,881	117,20	0,14	116,30	33,50	5,60
G2	4,27	45,74	3,197	139,77	0,47	194,40	25,08	8,40
RH	4,28	50,06	3,203	118,90	0,46	118,50	24,30	4,20
G3	4,56	39,20	4,885	49,80	0,68	95,67	22,27	6,04
G4	4,15	57,91	3,042	56,69	0,29	110,20	18,17	4,52
G5	4,56	30,87	4,442	77,98	0,51	110,20	17,46	47,50
G6	4,51	31,50	3,250	66,61	0,51	97,37	21,81	5,42
D	5,18	42,30	3,181	149,91	0,46	245,77	18,95	40,16
G7	4,98	6,92	13,371	236,12	1,45	117,10	18,71	2,49
G8	4,51	7,34	16,158	74,43	2,29	148,20	14,49	3,48
RG	3,57	20,02	2,800	228,61	0,57	229,30	14,18	5,61
G9	4,34	2,42	2,645	108,35	0,55	177,40	13,18	5,73
G10	4,99	2,85	2,556	392,54	0,69	88,97	10,86	3,72
G11	4,70	3,84	3,522	89,86	0,69	36,47	41,76	4,62
BT	3,80	21,92	15,312	154,47	0,45	25,66	17,06	5,32
G12	4,80	3,97	3,572	61,03	0,75	31,03	51,05	6,73
G13	4,51	3,58	57,765	67,17	2,23	38,03	55,02	7,99
G14	3,64	4,54	2,703	68,00	1,35	41,23	70,16	6,94

Carbono y nitrógeno total:

Estación	CID	CTD	COD	NTD
G1	26,64	30,42	3,78	4,53
G2	29,98	32,68	2,70	20,00
RH	18,86	22,73	3,87	20,22
G3	20,70	22,46	1,76	14,96
G4	37,39	42,19	4,80	17,14
G5	32,95	34,88	1,93	22,00
G6	21,39	24,39	3,00	18,00
D	27,10	30,35	3,26	24,42
G7	20,01	23,97	3,96	16,85
G8	23,16	26,50	3,34	17,09
RG	20,83	26,01	5,18	3,45
G9	32,20	36,91	4,70	3,36
G10	24,73	29,18	4,45	8,78
G11	19,54	23,95	4,41	4,80
BT	-	-	-	4,01
G12	19,51	23,39	3,89	7,74
G13	7,02	11,87	4,85	8,16
G14	30,32	35,36	5,04	4,73

Toma de muestras 4: noviembre de 2008

Variables físico-químicas:

Estación	Temperatura	pH	Salinidad	DO	SST	SSV
G1	14,8	7,68	0,4	5,40	65,40	81,00
G2	14,4	7,60	0,44	5,50	140,00	58,00
RH	14,5	7,12	0,5	3,74	173,00	95,00
G3	14,2	7,08	0,6	3,01	188,00	80,00
G4	13,2	7,00	0,6	2,04	348,80	45,00
G5	12,0	7,21	0,6	1,98	618,30	81,00
G6	14,4	7,20	0,6	2,68	421,70	150,00
D	14,9	7,34	0,6	4,28	91,40	56,00
G7	16,3	7,70	0,7	2,95	345,00	35,00
G8	16,2	7,30	0,8	2,75	350,00	40,00
RG	17,1	7,36	0,8	2,12	380,00	10,00
G9	15,7	7,40	0,8	5,01	405,00	138,00
G10	15,7	7,50	0,9	6,92	1050,00	101,00
G11	17,2	7,68	3,9	6,10	660,00	92,00
BT	16,9	7,86	5,8	6,57	342,10	50,00
G12	18,0	8,15	8,8	5,90	324,00	35,00
G13	17,4	8,21	11,4	5,54	212,90	2,00
G14	15,8	8,22	19,1	7,54	163,00	19,00

Nutrientes:

Estación	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
G1	2,66	271,82	27,49	146,95
G2	2,42	166,21	45,21	133,72
RH	2,43	103,18	43,37	132,42
G3	9,11	215,61	59,16	134,45
G4	2,76	251,06	57,40	164,97
G5	3,13	131,52	56,09	183,41
G6	3,82	190,76	55,74	221,43
D	7,21	146,21	49,07	96,22
G7	4,27	43,18	61,70	9,71
G8	6,11	27,58	72,14	8,25
RG	6,08	63,94	40,21	24,03
G9	3,96	53,48	64,25	22,42
G10	4,34	19,09	69,25	1,83
G11	3,03	16,18	114,42	1,83
BT	2,83	16,18	112,05	1,83
G12	2,26	16,18	105,39	1,83
G13	1,62	47,44	100,04	7,63
G14	1,11	80,63	75,39	8,61

Metales

Estación	Cu	Mn	Ni	Co	Zn	Pb	Cd	Ag
G1	4,49	51,36	4,05	332,44	0,37	139,35	14,98	4,21
G2	3,05	54,25	4,12	281,86	0,50	141,25	10,96	2,18
RH	2,58	57,78	6,25	292,06	0,53	123,74	13,29	4,02
G3	2,71	48,30	5,40	254,23	0,56	125,29	13,60	4,63
G4	2,79	43,16	6,92	207,16	0,75	107,57	11,76	4,33
G5	2,86	38,74	8,37	189,25	0,71	106,90	12,14	1,78
G6	2,62	67,25	7,96	238,06	0,59	110,13	10,55	1,48
D	2,59	109,40	7,36	365,31	0,66	124,16	13,55	4,55
G7	3,02	43,21	6,42	175,79	0,70	134,56	13,81	2,29
G8	2,84	8,53	7,94	145,17	0,96	135,90	14,56	4,21
RG	2,88	5,61	7,04	117,11	1,04	145,91	13,40	3,80
G9	5,86	2,45	8,00	132,71	1,02	119,13	14,82	4,64
G10	2,59	2,02	8,04	169,22	1,62	146,99	18,67	4,50
G11	5,81	1,77	4,47	38,52	0,88	39,11	26,73	5,52
BT	5,07	2,17	4,52	37,34	0,94	32,01	25,57	5,16
G12	4,97	1,52	14,27	39,36	1,12	34,58	30,62	5,55
G13	4,79	1,36	5,09	39,07	1,18	31,82	40,85	3,66
G14	5,06	1,77	2,13	32,26	1,54	24,52	41,07	4,45

Carbono y nitrógeno total:

Estación	CID	CTD	COD	NTD
G1	31,52	36,87	5,35	3,44
G2	32,42	37,40	4,98	3,73
RH	29,70	34,72	5,02	4,20
G3	29,01	34,01	5,00	9,04
G4	28,18	32,93	4,74	3,79
G5	34,63	39,44	4,81	4,51
G6	30,12	34,54	4,43	4,11
D	38,66	44,19	5,53	6,14
G7	37,62	43,54	5,92	8,01
G8	40,11	45,52	5,41	6,84
RG	43,26	49,31	6,04	7,57
G9	44,16	49,86	5,70	7,32
G10	44,12	49,06	4,95	3,10
G11	52,29	57,22	4,93	2,96
BT	52,52	57,40	4,88	2,76
G12	43,98	47,29	3,31	2,07
G13	44,51	47,87	3,36	1,88
G14	46,60	50,75	4,14	9,37



## 1.2. Materia orgánica

Muestreo	Estación	Simazine	Atrazine	Terbutryn	Metalachlor	Alachlor	Lindano	Dimetoato	Cafeína
oct-07	G1 10/07	404,37	14,97	48,73	0,78	5,94	7,97	868,34	184,59
oct-07	G5 10/07	84,65	17,62	19,94	1,07	6,27	5,15	206,08	73,09
oct-07	G6 10/07	168,15	16,57	23,05	0,52	5,98	5,15	301,61	163,27
oct-07	G10 10/07	51,07	20,64	17,08	0,62	5,36	5,15	30,47	15,29
oct-07	G11 10/07	43,54	20,72	14,67	0,36	5,74	5,15	12,53	18,00
abr-08	G1 04/08	165,02	9,49	17,28	12,04	6,58	5,15	553,69	47,08
abr-08	G5 04/08	152,54	12,44	16,15	18,56	7,55	5,15	582,90	36,85
abr-08	G6 04/08	63,01	13,26	15,06	21,60	8,11	5,15	564,97	24,13
abr-08	G10 04/08	130,60	20,38	33,39	67,61	9,45	5,15	466,64	9,33
abr-08	G11 04/08	140,17	22,09	48,28	87,65	10,12	5,15	462,19	15,22
nov-08	G1 11/08	124,50	10,50	10,10	3,10	4,00	6,10	1087,80	83,50
nov-08	G5 11/08	149,60	7,80	13,00	2,90	2,00	5,80	826,50	57,00
nov-08	G6 11/08	169,70	8,40	15,20	3,00	0,90	6,10	713,40	50,80
nov-08	G10 11/08	115,80	13,70	24,30	4,00	1,60	5,15	281,10	15,30
nov-08	G11 11/08	58,90	9,20	15,40	4,00	2,10	5,80	125,00	22,80

Muestreo	Estación	Metil- dihidrojasmonato	Triclosan	Tris- cloroetilfosfato	Terbutilazine
oct-07	G1 10/07	45,71	11,46	64,26	395,31
oct-07	G5 10/07	35,53	17,72	55,13	299,14
oct-07	G6 10/07	35,53	18,35	47,14	396,49
oct-07	G10 10/07	35,53	8,70	49,55	93,34
oct-07	G11 10/07	35,53	8,70	29,41	74,04
abr-08	G1 04/08	39,71	45,59	15,07	915,69
abr-08	G5 04/08	17,33	56,24	15,22	797,23
abr-08	G6 04/08	45,70	20,25	18,35	866,97
abr-08	G10 04/08	39,90	11,29	13,61	888,68
abr-08	G11 04/08	35,53	11,29	14,35	1001,30
nov-08	G1 11/08	28,80	18,00	29,70	2563,00
nov-08	G5 11/08	16,20	17,50	25,50	1496,30
nov-08	G6 11/08	19,00	15,90	29,70	1330,30
nov-08	G10 11/08	28,10	21,10	57,80	487,30
nov-08	G11 11/08	59,50	13,10	84,00	248,70

## 2. Muestreo selectivo

### 2.1 Materia inorgánica

#### Variables físico-químicas:

Fecha	Estación	Temperatura	pH	Salinidad	DO	SST
26/04/2007	G1	23,2	7,61	0,7	5,71	31,67
26/04/2007	G5	21,8	7,5	0,5	3,18	20,00
26/04/2007	G6	21,4	7,49	0,5	3,14	31,67
03/05/2007	G11	20,5	8,00	1,3	12,3	322,50
24/05/2007	G1	21,9	7,40	0,5	7,40	52,50
24/05/2007	G5	23,0	7,35	0,5	3,30	24,17
24/05/2007	G6	24,2	7,34	0,5	3,30	25,83
13/09/2007	G10	23,3	7,79	1,81	5,92	67,50
13/09/2007	G5	25,9	7,10	0,4	2,02	125,00
13/09/2007	G6	25,9	6,98	0,4	3,09	528,50
22/11/2007	G5	19,8	7,20	0,2	5,40	5416,00
22/11/2007	G6	17,4	7,33	0,3	4,95	3565,00
17/01/2008	G1	12,5	7,13	0,9	8,02	184,64
17/01/2008	G5	12,8	6,98	0,9	3,86	1675,83
17/01/2008	G6	13,7	6,96	0,9	2,78	1412,50
04/02/2008	G1	14,8	7,44	1,0	7,42	800,83
04/02/2008	G5	14,7	7,22	0,8	2,45	174,58
04/02/2008	G6	14,7	7,38	0,8	2,82	169,58
14/04/2008	G1	18,2	7,26	0,4	5,09	1695,00
14/04/2008	G5	20,5	7,41	0,3	3,37	3517,50
14/04/2008	G6	18,3	7,44	0,4	2,58	1930,00
15/04/2008	G11	23,3	7,60	4,6	4,68	220,71

Nutrientes:

Fecha	Estación	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
26/04/2007	G1	29,71	651,76	50,06	234,17
26/04/2007	G5	4,11	1533,82	225,36	398,31
26/04/2007	G6	2,34	1178,42	203,36	658,44
03/05/2007	G11	11,23	92,2	223,97	28,05
24/05/2007	G1	5,37	245,3	73,91	152,24
24/05/2007	G5	5,58	497,12	100,88	467,24
24/05/2007	G6	6,01	316,67	71,64	512,19
13/09/2007	G10	3,85	72,96	201,12	282,63
13/09/2007	G5	4,8	50,9	162,87	255
13/09/2007	G6	8,34	16,18	54,05	2,88
22/11/2007	G5	4,25	540,13	60,27	125,48
22/11/2007	G6	4,77	783,85	23,39	137,69
17/01/2008	G1	5,89	90,56	33,13	38,57
17/01/2008	G5	5,16	186,64	36,2	114,8
17/01/2008	G6	4,27	117,77	47,49	106,48
04/02/2008	G1	-	-	-	-
04/02/2008	G5	-	-	-	-
04/02/2008	G6	-	-	-	-
14/04/2008	G1	3,85	215,27	35,38	197,61
14/04/2008	G5	4,29	252,31	147,14	236,58
14/04/2008	G6	5,22	507,63	144,45	243,5
15/04/2008	G11	4,83	326,28	54,07	31,03

Metales

Fecha	Estación	Cu	Mn	Ni	Co	Zn	Pb	Cd	Ag
26/04/2007	G1	4,24	93,25	3,24	477,8	0,61	38,43	14,58	1,48
26/04/2007	G5	0,84	143,7	2,49	439,55	0,93	194,67	22,62	2,47
26/04/2007	G6	0,57	106,18	2,75	486,51	0,85	68,84	20,46	1,15
03/05/2007	G11	4,02	0,59	.	7,45	0,71	63,35	25,36	2,18
24/05/2007	G1	2,29	6,34	2,47	105,39	0,49	5,20	13,55	1,90
24/05/2007	G5	1,18	140,15	2,51	442,13	0,92	5,20	15,86	1,03
24/05/2007	G6	1,13	117,52	2,6	421,13	0,85	5,20	20,06	0,62
13/09/2007	G10	0,7	5,82	2,23	30,30	0,76	5,20	13,74	5,70
13/09/2007	G5	0,64	67,6	1,26	80,46	0,73	6,21	10,52	14,20
13/09/2007	G6	3,02	77,43	1,95	174,21	0,47	17,55	13,62	2,81
22/11/2007	G5	4,09	96,62	-	-	-	-	-	-
22/11/2007	G6	1,43	119	-	-	-	-	-	-
17/01/2008	G1	3,95	101,1	3,55	780,59	0,47	134,88	13,24	3,62
17/01/2008	G5	4,56	71,7	1,78	272,1	1,24	353,08	21,28	5,19
17/01/2008	G6	5,22	56,99	2,87	258,17	1,14	257,69	19,12	4,65
04/02/2008	G1	4,02	80,02	4,43	684,73	0,32	59,63	12,21	3,69
04/02/2008	G5	4,25	38,61	3,74	209,38	0,84	300,98	14,52	4,03
04/02/2008	G6	3,8	23,64	5,16	417,82	1,57	205,3	18,72	4,64
14/04/2008	G1	2,98	103,7	3,15	780,37	0,44	68,71	12,4	3,69
14/04/2008	G5	5,44	48,11	2,91	385,83	0,16	21,11	9,18	4,23
14/04/2008	G6	6,11	22,55	2,65	417,82	0,28	149,32	12,28	4,20
15/04/2008	G11	3,98	3,94	7,36	126,64	0,68	25,75	26,32	5,05

Carbono y nitrógeno total:

Fecha	Estación	CID (mg·L <sup>-1</sup> )	CTD (mg·L <sup>-1</sup> )	COD (mg·L <sup>-1</sup> )	NTD (mg·L <sup>-1</sup> )
26/04/2007	G1	19,51	23,39	3,88	3,24
26/04/2007	G5	17,23	21,91	4,68	13,82
26/04/2007	G6	18,86	22,73	3,87	4,47
03/05/2007	G11	18,14	21,20	3,06	5,54
24/05/2007	G1	7,02	11,87	4,85	1,95
24/05/2007	G5	9,92	12,67	2,75	2,20
24/05/2007	G6	8,79	11,34	2,55	2,89
13/09/2007	G10	21,62	23,42	1,80	2,46
13/09/2007	G5	28,00	32,15	4,15	7,48
13/09/2007	G6	14,99	18,25	3,26	4,72
22/11/2007	G5	11,23	14,58	3,35	3,80
22/11/2007	G6	13,68	16,96	3,28	3,32
17/01/2008	G1	30,32	35,36	5,04	10,97
17/01/2008	G5	25,88	28,23	2,35	4,85
17/01/2008	G6	41,38	45,83	4,45	12,92
04/02/2008	G1	17,02	20,69	3,67	9,65
04/02/2008	G5	36,86	40,26	3,40	9,08
04/02/2008	G6	21,94	25,10	3,16	10,44
14/04/2008	G1	21,40	25,17	3,77	5,95
14/04/2008	G5	19,09	22,09	3,00	4,61
14/04/2008	G6	26,64	30,42	3,78	6,35
15/04/2008	G11	27,24	32,59	5,35	6,22

## 2.2. MATERIA ORGÁNICA INERTE

Fecha	Estación	Simazine	Atrazine	Terbutryn	Metalachlor	Alachlor	Lindano	Dimetoato
22/11/2007	G5	372,28	9,88	92,18	1,68	14,30	8,80	468,52
22/11/2007	G6	425,52	16,86	175,84	4,07	16,76	9,21	438,22
14/04/2008	G1	205,88	23,77	21,20	38,17	15,86	8,04	1201,42
14/04/2008	G5	463,73	37,76	35,88	93,76	24,26	10,47	1200,89
15/04/2008	G11	257,87	87,15	83,66	292,93	56,10	7,97	313,85

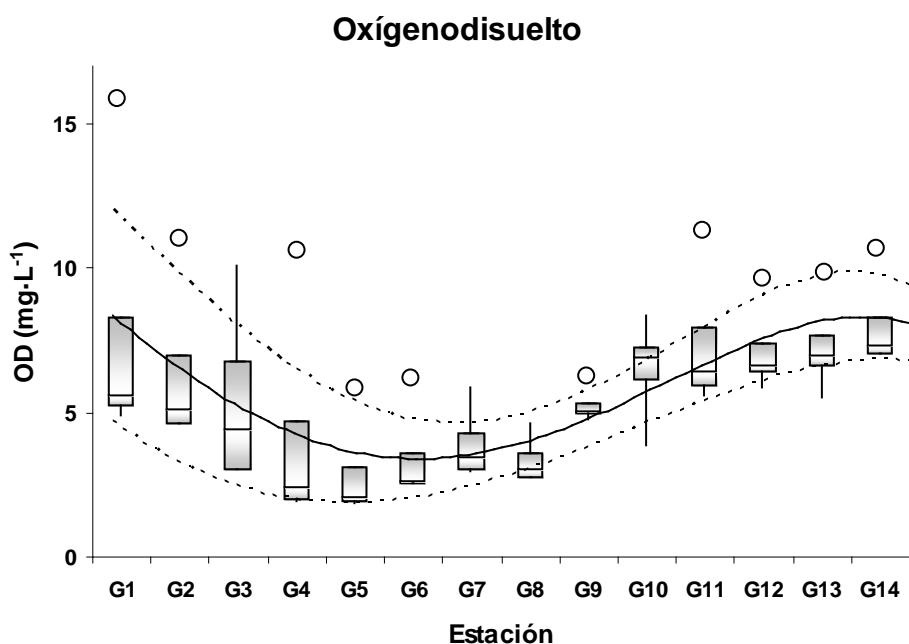
Fecha	Estación	Cafeína	Metil-dihidrojasmonato	Triclosan	Tris-cloroetilfosfato	Terbutilazine
22/11/2007	G5	31,86	59,38	49,38	14,00	54,54
22/11/2007	G6	22,24	38,41	49,38	16,61	26,25
14/04/2008	G1	23,57	40,58	49,38	11,29	15,57
14/04/2008	G5	98,76	35,53	49,38	16,35	22,04
15/04/2008	G11	40,04	36,90	49,38	13,60	27,45

## ANEXO III

**Estadística: gráficos de cajas y bigotes, pruebas de significación y cálculo de la contribución a la incertidumbre para el proceso de validación.**

### 1. Gráficos de cajas y bigotes.

En este trabajo se ha representado el comportamiento general de los contaminantes en el río Guadalquivir tanto en el espacio como en el tiempo, de forma que cada caja representa la distribución temporal de la variable estudiada para cada uno de los puntos de muestreo. Por otro lado se han construido líneas de tendencia de los contaminantes a lo largo del espacio, lo que se ha llevado a cabo utilizando un ajuste polinomial de la media obtenida para todos los muestreos generales en cada punto, mientras que los límites marcados como habituales en el río se ha considerado como 1,5·la desviación estándar de las concentraciones determinadas.



### 2. Pruebas de significación.

Para realizar la comparación de los valores determinados por dos métodos distintos o para determinar la existencia o no de diferencias significativa entre valores analizados en el laboratorio con los certificados para materiales de referencia, se realizó la prueba de significación correspondiente mediante un contraste de hipótesis (Miller y Miller, 2005). En este caso se utilizó la comparación de dos medias experimentales para

comparar métodos y la comparación con valor conocido para comparar con muestras de referencia.

### 2.1. Comparación de una media experimental con un valor conocido

En este caso la hipótesis nula supone que no existen diferencias significativas entre la media experimental y el dato conocido ( $H_0: \mu_1 = \mu_{\text{cert}}$ ). Esto quiere decir que las diferencias que existan sólo se deberán a errores aleatorios y el método estará libre de sesgo. Para decidir si existen estas diferencias se recurre al estadístico t, que se calcula como:

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)\sqrt{n}}{s}$$

Donde  $\bar{x}$  es la media de las medidas realizadas,  $\mu$  la media conocida,  $n$  el número de réplicas realizadas y  $s$  la desviación estándar de las medidas. Si el valor de  $t$  es inferior al tabulado para  $n-1$  grados de libertad se acepta la hipótesis nula.

### 2.2. Comparación de dos medias experimentales

La hipótesis nula que se plantea es que los dos resultados son iguales,  $H_0: \mu_1 = \mu_2$ ; siendo  $\mu_i$  la media de cada una de las distribuciones de medidas repetidas. Por lo tanto, se establece que la diferencia de las medias experimentales no difiere significativamente de 0. A partir de aquí, la desviación estándar ( $s$ ) de cada una de las distribuciones de datos puede ser estimada como  $s_1$  y  $s_2$ . Con estos datos es posible determinar el valor del estadístico t:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$$

Donde  $n_1$  y  $n_2$  son el número de medidas repetidas para la obtención del resultado y de donde  $s$  se puede calcular como:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)}$$

Donde el número de grados de libertad es  $n_1 + n_2 - 2$ .

Este método asume que las varianzas de las distribuciones no difieren de forma significativa, lo que se comprueba mediante el estadístico F:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

El valor de F siempre debe ser mayor que 1 y el resultado obtenido se compra con el valor tabulado según el nivel de significación y los grados de libertad del numerador y del denominador respectivamente ( $n_1-1$  y  $n_2-1$ ). Si el valor de F es menor que el tabulado se acepta la  $H_0$  de que las varianzas no difieren de forma significativa ( $H_0 : s_1^2 = s_2^2$ ).

### 3. Cálculo de incertidumbres para el proceso de validación.

El cálculo de incertidumbres se ha realizado utilizando el método de Kragten. A continuación se muestran los cálculos realizados para la determinación de la incertidumbre y de la contribución de los distintos factores de la misma en el cálculo de la  $u_c$  para la preparación de un patrón de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  desde un patrón certificado (Kragten, 1999).

Partiendo de la ecuación del modelo:

$$C_{\text{Patrón } 10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}} = C_{\text{Patrón Certificado}} \cdot \left( \frac{V_{\mu 25}}{V_{25}} \right) \cdot \left( \frac{V_{\mu 250}}{V_{25}} \right)$$

Y las incertidumbres estándar de cada una de las variables:

Elemento	Magnitud	unidades	Valor	u	RSu (%)
Cu	$C_{\text{Patrón certificado}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$1,00 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^2$	0,01
	$V_{\mu 25}$	L	$2,50 \cdot 10^{-5}$	$5,40 \cdot 10^{-7}$	2,16
	$V_{25}$	L	$2,50 \cdot 10^{-2}$	$2,78 \cdot 10^{-5}$	0,11
	$V_{\mu 250}$	L	$2,50 \cdot 10^{-4}$	$3,30 \cdot 10^{-6}$	1,32
	$C_{\text{Patrón } 10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>10,00</b>	<b><math>u_c</math></b>	<b>0,25</b>
Mn	$C_{\text{Patrón certificado}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$1,00 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^2$	0,10
	$V_{\mu 25}$	L	$2,50 \cdot 10^{-5}$	$5,40 \cdot 10^{-7}$	0,11
	$V_{25}$	L	$2,50 \cdot 10^{-2}$	$2,78 \cdot 10^{-5}$	2,16
	$V_{\mu 250}$	L	$2,50 \cdot 10^{-4}$	$3,30 \cdot 10^{-6}$	1,32
	$C_{\text{Patrón } 10\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	<b>10,00</b>	<b><math>u_c</math></b>	<b>0,25</b>

Para realizar los cálculos se construye una matriz cuadrada donde en filas y columnas se expresan las variables que contribuyen a la incertidumbre. Los elementos de la diagonal representan la aportación de la incertidumbre de cada una de las fuentes. Posteriormente se calcula en cada columna, y aplicando la ecuación modelo para esta etapa, la  $C_{10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$  que se obtendría teniendo en cuenta la fuente de incertidumbre que corresponde a esa columna.



	C patrón cert.	V <sub>μ25</sub>	V <sub>25</sub>	V <sub>μ250</sub>
C patrón cert.	$1,00 \cdot 10^6 + 1,00 \cdot 10^2$	$1,00 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^6$	$1,00 \cdot 10^6$
V <sub>μ25</sub>	$2,50 \cdot 10^{-5}$	$2,50 \cdot 10^{-5} + 5,40 \cdot 10^{-7}$	$2,50 \cdot 10^{-5}$	$2,50 \cdot 10^{-5}$
V <sub>25</sub>	$2,50 \cdot 10^{-2}$	$2,50 \cdot 10^{-2}$	$2,50 \cdot 10^{-2} + 2,78 \cdot 10^{-5}$	$2,50 \cdot 10^{-2}$
V <sub>μ250</sub>	$2,50 \cdot 10^{-4}$	$2,50 \cdot 10^{-4}$	$2,50 \cdot 10^{-4}$	$2,50 \cdot 10^{-4} + 3,30 \cdot 10^{-6}$
C <sub>10 μg·L<sup>-1</sup></sub>	10,00	10,02	9,98	1,01
u <sub>s</sub> (μg·L <sup>-1</sup> )	$2,00 \cdot 10^{-3}$	$2,16 \cdot 10^{-1}$	$-2,22 \cdot 10^{-2}$	$1,32 \cdot 10^{-1}$
u <sub>s</sub> <sup>2</sup> (μg·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$4,00 \cdot 10^{-6}$	$4,67 \cdot 10^{-2}$	$4,94 \cdot 10^{-4}$	$1,74 \cdot 10^{-2}$
Contribución (%)	$6,19 \cdot 10^{-3}$	72,34	$7,64 \cdot 10^{-1}$	26,92

Después, como  $u_s$  se calcula la diferencia en cada caso entre  $C_{10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}}$  cuando se ha tenido en cuenta la fuente de incertidumbre y sin tenerla en cuenta. Esto nos daría una estimación de la incertidumbre estándar de cada fuente de variabilidad. Calculando el cuadrado de cada una de estas diferencias se obtienen los sumandos de la expresión de la  $u_c^2$ , por lo que la raíz de la suma de cuadrados nos da el valor de la incertidumbre combinada para esta etapa.

$$u_y^2 = \left(\frac{\partial y}{\partial p}\right) \cdot u_p^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial q}\right) \cdot u_q^2 + \left(\frac{\partial y}{\partial r}\right) \cdot u_r^2 + \dots$$

$$\left(\frac{\partial y}{\partial p}\right) \cdot u_p \approx \frac{\Delta y}{\Delta p} \cdot u_p$$

La contribución (%) de cada una de las fuentes de incertidumbre a la incertidumbre combinada se calcula como el porcentaje de la incertidumbre estándar de cada una de ellas con respecto de la combinada:

$$\text{Contribución}(\%) = \frac{u_s^2}{u_c^2}$$

## ANEXO IV

### **Análisis de la varianza (ANOVA) para el estudio de diferencias estacionales en los datos de concentración de contaminantes.**

El análisis de la varianza que se ha realizado es el ANOVA factorial, teniendo en cuenta dos factores: el momento del muestreo y el punto de muestreo. De estos factores el más interesante es el del momento de los muestreos, ya que permite establecer la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre muestreos, que como se han realizado al final de las estaciones húmeda y seca, también debe permitir establecer diferencias en este sentido.

- Análisis de la varianza de dos factores

El análisis factorial de la varianza permite establecer la existencia de diferencias significativas entre dos distribuciones de datos gobernadas por distintos factores. En este caso como se ha comentado, el tiempo y el espacio. Para poder realizar el ANOVA es necesario que la distribución de los datos a analizar cumpla una serie de condiciones como son (Ramis y García, 2001):

- Normalidad de la distribución: el ANOVA supone una distribución de los datos, lo que se puede comprobar mediante el test de Kolmogorov-Smirnov de forma que atendiendo a un nivel de significación superior al 95% se puede establecer que la distribución se ajusta a una campana de Gauss. Cuando esto no se cumple, se pueden realizar transformaciones en los datos que permitan alcanzarla.
- Homogeneidad de varianzas: éste es el otro supuesto de partida del ANOVA y se puede determinar mediante el test de Levene, que permite comprobar que la la homogeneidad de varianzas mediante el estadístico  $W$ .

Cuando no se cumple ninguno de estos supuestos se puede utilizar a la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

Cuando se aplica el ANOVA de dos factores se construye una tabla de doble entrada donde se colocan respectivamente el factor 1 y el factor 2. En cada coordenada de la matriz que se genera se coloca la media de los datos obtenidos para cada caso, siendo  $r$  el nivel en columnas y  $c$  en filas. Mientras, en la última columna se sitúa la

suma del tamaño muestral para cada fila ( $T_i$ ). Lo mismo se hace en la última fila para cada columna ( $T_j$ ). Por último se suman  $T_i$  y  $T_j$  para conseguir el tamaño muestral de toda la distribución ( $T$ ), con  $N$  datos (Miller y Miller, 2005).

A partir de aquí se pueden obtener las ecuaciones correspondientes para el estudio de las variaciones intra-factores e inter-factores:

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad
Intra-factor 1	$\sum \frac{T_j^2}{r} - \frac{T^2}{N}$	c-1
Intra-factor 2	$\sum \frac{T_i^2}{c} - \frac{T^2}{N}$	r-1
Inter-factores	$\sum \sum x_{ij}^2 - \frac{T^2}{N}$	N-1

Utilizando estas expresiones se puede calcular el estadístico  $F$  a partir de las medias cuadráticas de los factores y la interacción como cociente entre la suma de cuadrados y los grados de libertad. El estadístico  $F$  permite establecer si existen diferencias debida a algún factor o a la interacción. En el caso de que estas diferencias existan se puede aplicar, a posteriori, el test de Tuckey para localizar donde se encuentran.

Este test se utiliza para identificar donde se encuentran las diferencias significativas en el caso de que hayan sido detectadas en el ANOVA. La hipótesis nula que se plantea es que no existen diferencias entre las medias muestrales cuando se comparan a pares. Así se puede calcular para cada par el estadístico  $q$  (Miller y Miller, 2005).

$$q = \frac{(\bar{x}_a - \bar{x}_b)}{\sqrt{\frac{s^2}{n}}}$$

Donde  $s^2$  es el error cuadrático medio del ANOVA y  $n$  el número de datos en  $a$  y  $b$ .

El valor de  $q$  se compara con el valor tabulado para un determinado nivel de significación y entonces se puede determinar si se cumple la hipótesis nula de que las

medias son iguales. Cuando la hipótesis nula no se cumple resulta de utilidad para identificar los puntos que hacen diferentes a las distintas poblaciones de datos.

- Test de Kruskal-Wallis

Es una prueba no paramétrica que se aplica para determinar la existencia de diferencias significativas entre distribuciones cuando no se cumplen los supuestos de partida del análisis de la varianza. En este caso la comparación se realiza entre las medianas de las distribuciones, mientras que para el ANOVA se trabaja con las medias. La  $H_0$  que se plantea es por tanto que no hay diferencias significativas entre las medianas.

Los resultados de al menos tres distribuciones se colocan en rangos, se calcula el rango total para los datos de las distintas distribuciones y se supone que teniendo medianas similares, el rango total para cada una de las muestras debe ser similar y entonces la suma de cuadrados sería mínima.

Para determinar la existencia de diferencias significativas se utiliza la distribución  $\chi^2$ . Si se nombran las muestras como A,B,C... con un número  $n_A, n_B, n_C...$  y los rangos totales,  $R_A, R_B, R_C...$ ,  $\chi^2$  se calcula como (Miller y Miller, 2005):

$$\chi^2 = \frac{12}{N^2 + N} \left\{ \frac{R_A^2}{n_A} + \frac{R_B^2}{n_B} + \frac{R_C^2}{n_C} + \dots \right\} - 3(N - 1)$$

Donde N es la suma de los  $n_i$ .

- Estudio de normalidad y homogeneidad de varianzas para la aplicación del ANOVA.

A continuación se muestran los resultados obtenidos para el test de Kolmogorov-Smirnov para la evaluación de la normalidad de la distribución.

Variable	Transformación	$\alpha$
pH		0,68
Cond		0,00
DO		0,50
SST		0,10
SSV		0,06
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		0,23
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>		0,07
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>		0,23
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	$\sqrt{NO_2^-}$	0,08
Cu		0,22
Mn		0,00
Ni	Ln(Ni)	0,25
Co		0,05
Zn	Ln(Zn)	0,68
Pb		0,22
Cd	Ln(Cd)	0,11
Ag		0,10
CID		0,95
CTD		0,75
COD		0,57
NTD	Ln(NTD)	0,85

A continuación se muestran los resultados de la prueba de Levene para el estudio de la homogeneidad de varianzas:

Variable	$\alpha$ .
pH	0,205
DO	0,371
SST	0,052
SSV	0,008
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,496
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	0,11
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0,025
Cu	0,000
Co	0,003
Pb	0,029
Ag	0,000
CID	0,667
CTD	0,602
COD	0,438
$\sqrt{NO_2^-}$	0,088
Ln(Ni)	0,155
Ln(Zn)	0,295
Ln(Cd)	0,088
Ln(NTD)	0,008