
*Desarrollo y aplicación de metodología mediante
la simulación de las condiciones digestivas de
peces para la evaluación de la biodisponibilidad
de metales en sedimentos marinos.*

Tesis Doctoral

Mirella Peña Icart

Cádiz, 2012





“Desarrollo y aplicación de metodología mediante la simulación de las condiciones digestivas de peces para la evaluación de la biodisponibilidad de metales en sedimentos marinos.”

Memoria presentada por la Licenciada en Educación Especialidad Química
Dña. Mirella Peña Icart
Para optar por el grado de Doctor en Química por la Universidad de Cádiz

Fdo. Mirella Peña Icart

La presente Tesis Doctoral ha sido dirigida por los doctores D. Carlos Moreno Aguilar, Profesor Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz, D. Mario Simeón Pomares Alfonso, Investigador Titular del Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales de la Universidad de La Habana y Dña. Carolina Mendiguchía Martínez, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz, y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente.

Puerto Real a 5 de octubre de 2012

Fdo: Carlos Moreno Aguilar

Fdo. Mario Simeón Pomares Alfonso

Fdo. Carolina Mendiguchía Martínez

D. Dominico Antonio Guillén Sánchez, Profesor Titular y Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

CERTIFICA

Que el presente trabajo ha sido realizado íntegramente en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz y en el Laboratorio Universitario de Caracterización de la Estructura de la Sustancia del Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales de la Universidad de La Habana, bajo la dirección conjunta de los profesores D. Carlos Moreno Aguilar, D. Mario Pomares Alfonso y Dña. Carolina Mendiguchía Martínez, y reúne las condiciones exigidas para optar por el grado de Doctor en Química.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado, en Puerto Real a 5 de octubre de 2012

Fdo. Dominico Antonio Guillén Sánchez

La presente Tesis Doctoral forma parte de los estudios realizados bajo el soporte económico del PROGRAMA IBEROAMERICANO DE DOCTORADO, convenio firmado entre las Universidades de Cádiz y La Habana.

Los trabajos descritos en la presente memoria de tesis se encuentran recogidos en las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones:

Mirella P. Icart, Margarita Villanueva, Carlos Toledo, Joelis Rodríguez, Moni Behar and Mario Pomares. (2011) *Comparative Study of Digestion Methods EPA 3050B (HNO₃-H₂O₂-HCl) and ISO 11466.3 (aqua regia) for Cu, Ni and Pb Contamination Assessment in Marine Sediments*. Marine Environmental Research 72, 60-66.

Peña-Icart, M.; Mendiguchía Martínez, C.; Villanueva Tagle, M.; Pomares Alfonso, M.; Moreno Aguilar, C. *Extraction of metals from marine sediments by simulating the conditions of the digestive systems of aquatic species. Comparison with Acid acetic methods*. (En preparación)

Peña-Icart, M.; Mendiguchía Martínez, C.; Villanueva Tagle, M.; Moreno Aguilar, C.; Pomares Alfonso, M. *Spatial and temporal evaluation of metals in marine sediments originated from aquaculture effluents in Puerto Real, Spain*. (En preparación)

Congresos:

Estimation of metals bioavailability from marine sediments by fish digestive fluids extraction. Mirella Peña-Icart, Carolina Mendiguchia Martínez, Margarita Villanueva Tagle, Mario Pomares Alfonso, Carlos Moreno Aguilar. XII Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA, Córdoba 2010), *Póster*.

Estimación de la disponibilidad de 16 metales en sedimentos marinos simulando condiciones digestivas de especies marinas. Mirella Peña-Icart, Carolina Mendiguchia

Martínez, Margarita Villanueva Tagle, Mario Pomares Alfonso, Carlos Moreno Aguilar. Jornada Científica 25 Aniversario del IMRE, junio 2011, *Póster*.

Desorción de metales en sedimentos simulando la digestión de los peces. Mirella Peña- Icart, Carolina Mendiguchía Martínez, Margarita Villanueva Tagle, Mario Pomares Alfonso, Carlos Moreno Aguilar. Congreso XX Conferencia de Química, Universidad de Oriente, Diciembre 2011, *Póster*.

Efectos del tamizado en el análisis de metales en sedimentos marinos de origen acuícola. Peña-Icart, M.; Mendiguchía-Martínez, C.; Sanz-López, D.; Villanueva Tagle, M.; Pomares-Alfonso, M. and C. Moreno-Aguilar. ISMS12 International Symposium in Marine Sciences. Enero 2012, *Póster*.

Multivariate analysis for studying the desorption of metals from marine sediments. Mirella Peña Icart, Carolina Mendiguchía Martínez, Margarita Villanueva Tagle, Carlos Moreno, Mario Pomares Alfonso. XIII Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica (GRASEQA, Málaga 2012), *Póster*.

Estudio de contaminación por metales pesados en sedimentos del Río San Pedro en la Bahía de Cádiz, España y de la Bahía de Cienfuegos, Cuba. Mirella Peña Icart, Margarita Villanueva Tagle, Carolina Mendiguchía Martínez, Carlos Moreno Aguilar, Mario Pomares Alfonso. VIII Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química, QUIMICACUBA 2012, octubre 2012, *Ponencia oral aceptada*.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que me han apoyado en este largo y difícil camino que culmina con la defensa hoy de mi tesis doctoral. Todos y cada una de ellas han contribuido a mi superación profesional y personal.

En primer lugar agradecer a mis tutores, quienes han estado a mi lado desde el comienzo de este largo viaje. Al Dr. Mario Pomares, quien me recibió un buen día en la Universidad y me ha acompañado hasta el final de esta etapa, a quien debo en gran medida lo logrado profesionalmente, por su optimismo a toda prueba. Al Dr. Carlos Moreno, quien se aventuró en aceptarme sin saber a ciencia cierta lo que se iba a encontrar, quien ha sido tutor, jefe, amigo, quien ha tenido infinita paciencia, y de quien he aprendido no sólo de química, sino de historia, geografía, fútbol y de Cádiz, quien ha estado siempre dispuesto a escucharme. A la Dra. Carolina Mendiguchía, quitando los formalismos, a Carol, quien ha sido la perfecta anfitriona, gracias a quien he conocido un poquito de España y mejor aún, de Andalucía, con quien he podido contar en las buenas y en las menos buenas, quien empezó siendo una compañera del laboratorio y terminó siendo una amiga para siempre.

Quisiera agradecer también al Programa Iberoamericano de Doctorado por el financiamiento durante estos cuatro años, y aquellos que lo dirigen, por darme la oportunidad de compartir mis estudios entre la Universidad de Cádiz y Universidad de la Habana, así como a ambas administraciones por encargarse de los trámites necesarios para el correcto desarrollo de mis estancias.

Al Aula Iberoamericana de Posgrado (AUIP) por el financiamiento otorgado para la correcta finalización del presente trabajo.

Al tribunal, al Dr. Manuel Valiente, a la Dra. Mariló Granados, al Dr. Gorka Arana y a la Dra. Rocío Rodríguez, quienes estuvieron de acuerdo en compartir y evaluar esta tesis. Especialmente a la Dra. Margarita Villanueva, quien ha sido mi otro apoyo durante este largo camino, de quien he aprendido también el tesón y la constancia.

A mis amigos, los de Cuba y los de España, parte imprescindible de mi vida.

A los de Cádiz, que me han hecho sentir en una segunda casa. Al Dr. Juan Pinto, simplemente a Juan, en quien he podido apoyarme cuando lo he necesitado, por su infinita bondad, compañero de incontables cafés, por ser unas de las mejores personas que he conocido, por saber ser amigo. A la Dra. Cristina Vergel, Cris, quien compartió de estudiante las cosas que sólo los estudiantes entendemos, a esa compañera de laboratorio devenida en amiga para toda la vida, jerezana de nacimiento y de convicción, de quien extrañaré sus ocurrencias, y en especial su ay omá!!!! Al Dr. José López, Jose, quien me ha enseñado un poquito de incertidumbre, cuando todavía tenía yo la incertidumbre de si lograba llegar a la meta, compañero de senderismos, cafés, botellas, de largas charlas, boda inolvidable y amigo. A la MSc. María Victoria, Vicky, amiga inagotable de quien he aprendido el optimismo, la alegría, las ganas de vivir y el hacerlo al máximo. Al Dr. Manuel Pedro, Manuel para todos, quien siempre está dispuesto a echarte una mano, quien siempre te estimula a seguir adelante, y también por qué no, a sus barbacoas que siempre me han despedido de Cádiz con el corazoncito encogido. Al Dr. Mostapha Benomar, Musta, quien a pesar de la distancia siempre que he necesitado ayuda me ha respondido.

A la Dra. Gemma Albendín, Gemma, por su apoyo, por su franqueza, por su generosidad, al Dr. Juan Jose, Juanjo, por ser también compañero de meriendas, cafés y playitas, quien siempre tiene la respuesta más insólita en el trivial, y correcta.

A esas personas que de una manera indirecta también han hecho más gratas mis estancias en Cádiz, a Rojo, por sus vastos temas de conversación, por tener siempre una charla agradable y por mi primera tarta de manzana, a Ali, por su dulzura y su alegría. A Antonio, quien ha mostrado infinita bondad y se atrevió a dejarme un volante, quien me demostró que cuando hablamos de infinito, no existen diferencias y a Hieru, ese hermanito español que me encontré, por su bondad y transparencia, por su espontaneidad y buen humor.

A los Dres. Maribel, Juana Mari, Luis, Inma, compañeros de almuerzos, ferias, cafés, barbacoas, y de trabajo. De quienes también he aprendido.

Al Lic. Antonio Benítez, Beni, con quien he pasado largas jornadas de mediciones, por su paciencia y por haberme ayudado a entender un poquito más los equipos de análisis instrumental.

Al Dr. Barbero, Ger, por una cata diferente y divertida, por su optimismo y por su ánimo al final de esta etapa, por mostrarme uno de los paisajes más bellos de Andalucía, nos vemos en los Nobel.

A los compañeros del departamento, Loli, Marga, Estrella, José Luis, Hafida; Clara, María José, María Dolores Bellido, quienes de una u otra forma han tenido que ver con mi trabajo, con quienes he compartido además ferias, bodas y barbacoas.

A la comunidad cubana en Cádiz, a Maitee, Javi, Juan, Andy, Maikel, Ceci la infiltrada, Hugo, quienes han mantenido nuestro pedacito de identidad, y me han recordado que cubano no es una condición, es una actitud ante la vida, no importa dónde estés.

A todos mis compañeros cubanos que emprendieron conmigo esta aventura de hacernos Doctores, los que empezaron y ya no están o ya cumplieron su objetivo, compañeros de piso y de metas, Erick, Kike, Betty, Katy, con quienes he compartido dudas y temores y hasta conceptos químicos, especialmente a esas dos amigas encontradas en este viaje, Tania y Yurima, confidentes, apoyo, peleas y sobre todo, alegrías.

Cerrando España y abriendo Cuba, no quiero dejar de agradecer a mis amigos de Asturias, Mercy, Emilio y Susy, amigos en Cuba y en España, gracias a quienes conocí Oviedo, con quienes siempre he podido contar y siempre me han apoyado, me han hecho reír y hasta reflexionar. A ti mi señora del vestido carmelita.

A mis compañeros de trabajo en el IMRE y la facultad, Sheyla, Juani, Ody, Soane, Yanio, Alen, Manolo, Camilo, Marilyn, Leyanis, Álvaro, Yula, Ana Margarita por compartir no sólo evaluaciones, fiestas, trabajos voluntarios y reuniones, sino también momentos de alegrías y tristezas.

A esas compañeras que el tiempo ha convertido en amigas, Toki y Yami, por aguantarme ocho horas cada día de cada semana, por tenerme paciencia en mis perretas y quejas.

A Ana Isa, esa amiga que me abrió las puertas del IMRE cuando llegué a penas siendo una joven llena de ilusiones, y que además me abrió las puertas de su casa y su corazón.

A Delmis, esa amiga ya no me acuerdo desde cuándo, que siempre me ha hecho reír aún cuando parece imposible que suceda, mi camaroncito duro cuando el inglés y yo no nos entendemos. A Aldo y Adis, esos amigos que siempre me tienen presente y que cuando los necesito enseguida me dicen – Aquí estoy!!!!!! A Annette y Mirelys, amigas probadas, con quien siempre se puede conversar. A mi guajira, mi espejo, Yamile, quien a pesar de la distancia nunca me ha olvidado, ni yo a ella, quien siempre está pendiente y se preocupa por mis problemas. A Tita, por aguantarme y por entenderme, a Luismila, por siempre estar dispuesta a escucharme y aconsejarme. A Osmany, por demostrarme que la vida siempre te puede dar una nueva sorpresa, quien ha marcado mi paso profesional en los últimos tiempos, con quien puedo hablar pues siempre me escucha sin llegar a perder la paciencia, por los cafés, las meriendas, las fiestas, y sobre todo, por saber ponerme los pies en la tierra cuando me desví del camino.

A mi familia, sin quienes no hubiera podido transitar este largo y agotador camino. A mi papá, por su apoyo e interés en mi avance profesional y personal. A Norma y Franquito, por alegrarse con cada logro.

A mi tía favorita, mi segunda mamá, con la que siempre he podido contar. A mis primos y primas Wicho, Yoyi, Edy, Ivo, Aylenn, Yorka, Kevo, Luiso, Taly y hasta a Yamilis, que más que primos son mis hermanos, por ser la familia unida y feliz, por cada fin de año, día de las madres, y cada médico también. Por preocuparse en cada paso que doy.

A mi cuñi favorita, Yadira, quien me ha soportado cada perreta, y sobre todo, por apoyar a mi mami en nuestra ausencia.

A mi hermano Luis, mi referente profesional, cuya voluntad se encuentra a toda prueba, quien no duda en apoyarme y me quiere.

A mi mamá, por su amor incondicional, por ser mi bastón cuando me he caído y siempre me ayuda a levantar, quien ha estado a mi lado en cada momento de mi vida y ha sido el apoyo necesario cuando todo parece complicarse.

Por último, agradecerme a mí, no por chovinismo ni por autosuficiencia, sino por tener la mucha buena suerte de contar con personas tan especiales como las mencionadas aquí.

Perdón a aquellos que he olvidado.

A mi persona favorita, mi mamá

A quien más admiro, Luis

ÍNDICE

Índice	
Objetivos	1
Capítulo I. Introducción	5
<i>I.1. Efectos de la contaminación por metales</i>	8
<i>I.2. Metales en el medio acuático</i>	11
Capítulo II. Evaluación de los parámetros de la preparación previa de la muestra	19
<i>II.1. Introducción</i>	20
<i>II.1.1. Toma de muestra</i>	20
<i>II.1.2. Pretratamiento de la muestra</i>	21
<i>II.1.2.1. Tamizado</i>	22
<i>II.1.2.2. Secado</i>	26
<i>II.1.2.3. Almacenamiento y conservación</i>	27
<i>II.2. Desarrollo experimental</i>	28
<i>II.2.1. Toma de muestras</i>	28
<i>II.2.2. Pretratamiento de las muestras</i>	30
<i>II.2.3. Digestión y análisis de las muestras</i>	32
<i>II.2.4. Análisis estadístico de los resultados</i>	33
<i>II.3. Resultados</i>	34
<i>II.3.1. Efecto de las condiciones de tamizado</i>	34
<i>II.3.2. Efecto del tiempo de tamizado</i>	36
<i>II.3.3. Efecto del material del tamiz</i>	37
<i>II.3.4. Efecto del tamaño de grano</i>	40
Capítulo III. Simulación de los procesos digestivos de peces mediante métodos químicos	49
<i>III.1. Introducción</i>	50
<i>III.1.1. Biodisponibilidad y ecotoxicidad</i>	50
<i>III.1.1.1. Métodos para evaluar la biodisponibilidad</i>	53
<i>III.1.2. Métodos de digestión química para evaluar la biodisponibilidad de metales en sedimentos</i>	56

III.1.3. Métodos de digestión total	58
III.1.4. Métodos de digestión parcial	59
III.1.4.1. Digestión parcial fuerte	59
III.1.4.2. Digestión parcial débil	60
III.1.4.2.1. Ácido clorhídrico	61
III.1.4.2.2. Ácido acético	64
III.1.5. Técnicas analíticas empleadas para la determinación de metales	66
III.1.5.1. Espectrometría de Absorción Atómica	67
III.1.5.2. Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Acoplado por Inducción	69
III.1.5.3. Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado por Inducción	69
III.2. Desarrollo experimental	71
III.2.1. Estudio de la composición mineralógica de la muestra	71
III.2.2. Análisis de la materia orgánica de la muestra	71
III.2.3. Métodos de digestión de la muestra de sedimento	72
III.2.3.1. Digestión con ácido clorhídrico	73
III.2.3.2. Digestión con ácido nítrico	73
III.2.3.3. Digestión con ácido acético	74
III.2.4. Análisis estadístico de los resultados	74
III.3. Resultados	76
III.3.1. Caracterización de la muestra	76
III.3.1.1. Composición mineralógica	76
III.3.1.2. Contenidos totales de metales	77
III.3.1.3. Materia orgánica	78
III.3.2. Estudio de los métodos químicos para simular el proceso digestivo de los peces	79
III.3.2.1. Método del ácido clorhídrico	79
III.3.2.1.1. Efecto del pH en el porcentaje de	80

extracción	
III.3.2.1.2. Efecto de la temperatura en el porcentaje de extracción	82
III.3.2.1.3. Efecto del tiempo en el porcentaje de extracción	84
II.3.3. Estudio multivariado de las condiciones de digestión	87
II.3.4. Balance de masas	93
II.3.5. Estudio de biodisponibilidad con HCl	95
3.6. Método con HNO ₃	96
III.3.6.1. Balance de masas	98
III.3.6.2. Estudio de biodisponibilidad con HNO ₃	99
III.3.7. Método con HOAc (0,11 M y 25 %)	99
III.3.7.1. Balance de masas	101
III.3.7.2. Estudio de biodisponibilidad con HOAc 25 %	103
Capítulo IV. Simulación de los procesos digestivos de peces mediante métodos enzimáticos	109
IV.1. Introducción	109
IV.1.1. Sistema digestivo de los peces y alimentación	111
IV.1.1.1. Pepsina	112
IV.1.1.2. Tripsina	113
IV.1.2. Simulación de las condiciones digestivas de los organismos marinos empleando enzimas presentes en la digestión	114
IV.1.3. Extracción de metales empleando jugos gástricos de especies marinas	119
IV.2. Desarrollo experimental	123
IV.2.1. Desorción de metales empleando pepsina	123
IV.2.2. Desorción de metales empleando tripsina	123
IV.2.3. Desorción de metales empleando una mezcla de pepsina + tripsina	124
IV.3. Evaluación de métodos enzimáticos para simular los procesos	124

<i>digestivos de los peces</i>	
IV.3.1. Método de pepsina	124
IV.3.1.1. Balance de masas	126
IV.3.1.2. Estudio de biodisponibilidad con pepsina/HCl	127
IV.3.2. Método de tripsina	134
IV.3.2.1. Balance de masas	135
IV.3.2.2. Estudio de biodisponibilidad con Tripsina	136
IV.3.3. Método combinado de Pepsina + Tripsina	137
IV.3.3.1. Balance de masas	140
IV.3.4. Comparación entre los diferentes métodos empleados para simular las condiciones digestivas de los peces	141
Capítulo V. Validación del método propuesto para evaluar la biodisponibilidad de metales en sedimentos	151
V.2. Validación parcial de la determinación por ICP-MS	152
V.3. Validación parcial del método de digestión	154
V.3.1. Determinación del límite de detección y cuantificación del método de digestión propuesto	155
V.3.2. Precisión	156
V.4. Estimación de la Incertidumbre	159
V.4.1. Incertidumbre de la preparación del patrón intermedio	162
V.4.2. Incertidumbre de la preparación de los patrones de calibración	163
V.4.3. Incertidumbre de la concentración del metal en la muestra en disolución	164
V.4.4. Incertidumbre del método de digestión	164
V.4.5. Contribución de los focos de incertidumbre	165
V.4.6. Incertidumbre expandida de la determinación de los metales en la muestra de sedimento	168
Capítulo VI. Aplicación del método propuesto para evaluar la biodisponibilidad de metales en sedimentos de dos ecosistemas marinos	173

VI.1. Estimación de la “toxicidad potencial” de un sedimento mediante las concentraciones totales de los metales	174
VI.1.1. Guías de Calidad de Sedimentos	175
VI.1.2. Normalización respecto a un elemento conservativo	178
VI.2. Factor de Enriquecimiento	180
VI.3. Índice de Geoacumulación	181
VI.4. Estimación de la biodisponibilidad de un sedimento mediante digestiones parciales	183
VI.5. Estudio de los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos, Cuba	188
VI.5.1. Caracterización de las zonas de muestreo y toma de muestras	188
VI.5.2. Concentración total de metales en la muestras de Cienfuegos	190
VI.5.2.1. Comparación con otras campañas de muestreo	192
VI.5.2.2. Estimación del Factor de Enriquecimiento	194
VI.5.2.3. Evaluación del Índice de geoacumulación	197
VI.5.2.4. Posibles efectos toxicológicos de los metales sobre la biota	198
VI.5.2.5. Evaluación de la biodisponibilidad mediante la primera etapa del BCR	203
VI.5.2.6. Aplicación del método de digestión de HCl (12 horas y 20° C)	205
IV.5.3. Estudio de los sedimentos de Río San Pedro, España	209
VI.5.3.1. Caracterización de las muestras de RSP	211
VI.5.3.1.1. Composición mineralógica de las muestras de RSP	211
VI.5.3.1.2. Concentración total de metales en las muestras de RSP	212
VI.5.3.1.3. Comparación con otras campañas de muestreo	213
VI.5.3.1.4. Estimación del Factor de Enriquecimiento	215
VI.5.3.1.5. Evaluación del Índice de geoacumulación	216

VI.5.3.1.6. Posibles efectos toxicológicos de los metales sobre la biota	218
VI.5.3.1.7. Evaluación de la biodisponibilidad mediante la primera etapa del BCR	224
VI.5.3.1.8. Aplicación del método de digestión de HCl (12 horas y 20° C)	226
Conclusiones	235
Anexos	

El **objetivo general** del presente trabajo es *desarrollar y aplicar una metodología que permita evaluar con mayor exactitud la fracción del contenido total de metales presentes en los sedimentos acuáticos que pueda pasar a los organismos marinos mediante los procesos digestivos.*

Para ello se han planteado varios **objetivos específicos**, todos ellos encaminados al cumplimiento del objetivo general:

1. Evaluar la influencia de los parámetros del pretratamiento de la muestra, tiempo de tamizado, tamizado en húmedo y seco, tamaño de grano y material del tamiz, en el contenido total de metales en la porción de ensayo del sedimento.
2. Estudiar la extracción hacia la fase acuosa de metales presentes en el sedimento bajo diferentes condiciones de la digestión que simulen en el laboratorio el sistema digestivo de los organismos marinos. Para ello se estudiarán diferentes valores de pH del medio, tiempo de contacto y

temperatura, así como la acción de diferentes reactivos químicos y enzimáticos en la extracción de metales en los sedimentos.

3. Seleccionar el método de digestión más adecuado para simular la extracción de metales del sedimento durante los procesos digestivos de los organismos marinos.
4. Validar los principales parámetros de desempeño de la metodología propuesta.
5. Aplicar la metodología propuesta a muestras reales procedentes de ecosistemas marinos de interés en los litorales cubano y español.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Como resultado del desarrollo científico-tecnológico de la humanidad, el medio ambiente ha sufrido un considerable deterioro, siendo éste uno de los mayores problemas a los que se enfrenta el hombre actual. Esto ha conllevado un aumento paulatino del interés por su cuidado, conservación y protección. Para conseguir este objetivo se hace necesaria la identificación de las principales fuentes de las sustancias que pueden llegar al medio y deteriorarlo, puesto que de este modo será posible su control y seguimiento. Sin embargo, existen variedad de criterios para clasificar estas fuentes de sustancias. Uno de ellos es considerar si estas fuentes están o no localizadas o identificadas, de modo que se pueden diferenciar en puntuales, cuando la entrada del contaminante tiene localización geográfica precisa, o difusa en los

casos en que no es posible localizar geográficamente esa fuente en un sitio perfectamente definido¹.

Por otro lado, otra clasificación que puede resultar más interesante desde el punto de vista de control de la contaminación es la que se muestra en la Figura I.1, la cual permite identificar una contaminación de origen natural relacionada con la introducción de sustancias nocivas al medio ambiente sin la intervención del hombre, como por ejemplo la actividad volcánica, la erosión, los incendios forestales, etc., y otra contaminación relacionada con la actividad humana.

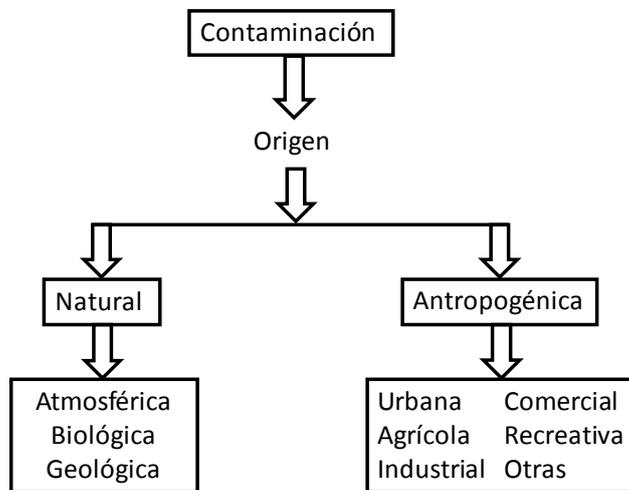


Figura I.1. Clasificación de la contaminación según su origen.

Tomando como base el segundo tipo mencionado, podemos decir que el incremento acelerado de la contaminación y la diversificación de los contaminantes están estrechamente vinculados a actividades antropogénicas, tales como la agricultura, la industria, el crecimiento demográfico, el aumento del comercio marítimo o el turismo, entre otras.

¹ Páez-Osuna, F. (2005) *Fuentes de metales en la zona costera marina*. p. 329-342. En: A.V. Botello, J. Y C. Agraz-Hernández (Eds). *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico, y Tendencias*, 2da Edición. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Nal. Auton. de México, Instituto Nacional de Ecología, 696p.

Es por tanto en este tipo de actividades donde el hombre puede ejercer un mayor control para evitar el aumento de la concentración de sustancias nocivas al medio ambiente en general. Dentro de todas las sustancias procedentes de las actividades antropogénicas, los metales presentan un considerable interés debido a su potencial toxicidad, incluso a bajas concentraciones^{2,3,4}, aunque no hay que olvidar que los metales aparecen de forma natural en formaciones rocosas, sedimentos, agua y organismos vivos, formando diferentes compuestos⁵.

De manera general se considera que la contaminación ambiental tuvo su auge después de la Revolución Industrial del siglo XIX. Sin embargo, Nriagu sugiere que la contaminación por metales comenzó durante épocas mucho más antiguas, coincidiendo con la domesticación del fuego, que conllevó a la deposición de pequeñas cantidades de metales traza liberados durante la combustión, provocando la alteración de algunos de los niveles de metales en los ecosistemas⁶.

Por otro lado, son varios los estudios relacionados con la contaminación ambiental antropogénica en épocas antiguas en diversos tipos de muestras, tales como: sedimentos de lagos, glaciares, atmósfera, etc.^{6,7,8,9,10,11}. Estas investigaciones concuerdan en que el aumento de las concentraciones de metales en esta época, tales como el Pb y el Cu, tienen su origen en el período de descubrimiento de los metales y alcanzaron sus máximos niveles durante el Imperio Romano¹².

² Arain, M.B.; Kazi, T.G.; Jamali, M.K.; Afridi, H.I.; Jalbani, N.; Sarfraz, R.A.; Baig, J.A.; Kandhro, G.A.; Memon, M.A. (2008) *Time saving modified BCR sequential extraction procedure for the fraction of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in sediment samples of polluted lake*. Journal of Hazardous Materials 160, 235-239.

³ Altmann, L.; Sveinsson, K.; Krämer, U.; Weishodd-Houben, M.; Turfeld, M.; Winneke, G.; Wiegand, H. (1998) *Visual functions in 6-year-old children in relation to lead and mercury levels*. Neurotoxicology and Teratology 20, 9-17.

⁴ Nürnberg, H.W. (1984) *The voltammetric approach in trace metal chemistry of natural waters and atmospheric precipitation*. Analytica Chimica Acta 164, 1-21.

⁵ Alloway, B.J.; Ayres, D.C. (1993) *Chemical Principles of Environmental pollution*, Chapman and Hall, London.

⁶ Nriagu, J.O. (1996) *A history of global metal pollution*. Science 272, 223-224.

⁷ Hong, S.; Candelone, J-P.; Patterson, C.C.; Boutron, C.F. (1996) *History of ancient copper smelting pollution during Roman and Medieval times recorded in Greenland Ice*. Science 272, 246-249.

⁸ Martínez, A.; Pontevedra, X.; Nóvoa, J.C.; García-Rodeja, E. (1997) *Four thousand years of atmospheric Pb, Cd and Zn deposition recorded by the ombrotrophic Peat Bog of Penido Vello (Northwestern Spain)*. Water, Air, & Soil Pollution 100, 387-403.

⁹ Shotyk, W.; Cheburkin, A.K.; Appleby, P.G.; Fankhauser, A.; Kramers, J.D. (1996) *Two thousand years of atmospheric arsenic, antimony, and lead deposition recorded in an ombrotrophic peat bog profile, Jura Mountains, Switzerland*. Earth and Planetary Science Letters 145, 1-7.

¹⁰ Bränvall, M.L.; Bindler, R.; Emteryd, O.; Renberg, I. (2001) *Four thousand years of atmospheric lead pollution in northern Europe: a summary from Swedish lake sediments*. Journal of Paleolimnology 25, 421-435.

¹¹ Martínez, A.; Novoa, J.C.; Pontevedra, X.; García-Rodeja E.; Llana, C. (1977) *Paleopollution: evidence of anthropic atmospheric pollution in Galicia (NW Spain) in the last 4,000 years*. Gallaecia 16, 7-22.

¹² Martínez, A.; García-Rodeja, E.; Weiss, D. (2002) *Atmospheric Pb deposition in Spain during the last 4600 years recorded by two ombrotrophic peat bogs and implications for the use of peat as archive*. Science of the Total Environment 292, 1-5.

Sin embargo, fue con el descubrimiento y posterior desarrollo de la minería, donde comenzó un estrecho vínculo entre la contaminación por metales pesados y las actividades del hombre. Actualmente se estima que la minería moviliza anualmente una cantidad de materiales de la superficie terrestre del mismo orden de magnitud que procesos geológicos esenciales, tales como la formación de montañas o de la corteza oceánica, o los procesos de erosión a escala global, por lo que constituye una de las fuentes de metales al medio más importante¹¹. Conjuntamente a las actividades mineras, en la actualidad se considera que las principales fuentes de metales al medio proceden de las actividades urbanas e industriales, así como de la agricultura. Todas estas actividades han producido un aumento de la concentración de metales en el medio, pudiendo llegar a afectar a los organismos vivos.

I.1. Efectos de la contaminación por metales

Aunque es bien conocido que muchos metales, en concentraciones muy bajas, son esenciales para los organismos vivos, por encima de determinados límites resultan perjudiciales llegando a provocarles incluso la muerte¹³. Muchos de estos metales pueden introducirse en los organismos vivos en porciones menores, a través de los alimentos, el agua y el aire. Sin embargo, el principal problema se presenta debido a que muchos de ellos persisten en el medio durante largos períodos de tiempo y pueden bioacumularse en los organismos vivos a través de la cadena trófica.

Hasta hace unos años estos problemas se relacionaban con los llamados metales pesados, que eran definidos según su densidad y masa atómica^{13,14}. Sin embargo, muchos ya consideran el término de metal pesado como obsoleto aunque hay autores que definen a los metales pesados como aquellos cuyas densidades se encuentran entre 3-6 g.cm⁻³¹³. Duffus plantea que cualquier idea de definir a los “metales pesados” sobre la base de la densidad debe ser abandonada, debido a que este tipo de concepto se presta a confusiones¹³. Actualmente, se ha extendido el estudio de los

¹³ Duffus, J.H. (2002) *Heavy metals-a meaningless term?* Pure Applied Chemistry 74, 793–807.

¹⁴ der Perk, M-V. (2006) *Soil and water contamination from molecular to catchment scale*. Taylor and Francis-Balkema. London, UK.

llamados metales traza. En general, se clasifican como metales traza aquellos que se encuentran en una concentración inferior a 1000 mg/L en la corteza terrestre¹⁵, aunque en ocasiones el término de metales traza se ha confundido con los requerimientos nutricionales mínimos de un organismo específico¹³.

A lo largo de la historia del hombre y su desarrollo existen numerosos ejemplos de desastres que han producido un aumento de la concentración de metales en el medio, produciendo la destrucción de los hábitats e inclusive, la muerte de seres humanos. Uno de los ejemplos más destacados es el desastre ocurrido en la ciudad de Minamata (Japón). En los años 50 la empresa petroquímica Chisso vertió a una bahía cercana entre 70-150 toneladas de mercurio, el cual contaminó la población de pescados y mariscos trayendo como consecuencia un brote de envenenamiento por metilmercurio¹⁶. En 1956 empezaron a aparecer los primeros casos de enfermedades neurológicas, pero no fue hasta 1959 que se comenzó una investigación de las causas de las mismas.

Otro ejemplo de las consecuencias del aumento de los metales pesados en el medio es la llamada enfermedad de Itai-Itai, aparecida a finales de la década de los 40 y provocada por el Cd procedente de las minas Mitsui, ubicadas en la parte superior de la cuenca del río Jinzu, Japón, que contaminó a cultivos de arroz y aguas del río. Este envenenamiento provocó una enfermedad grave con implicaciones renales y óseas, que afectó fundamentalmente a las mujeres entre 45-70 años. En 1967, se realizó un extenso estudio epidemiológico de la enfermedad de Itai-Itai en todos los habitantes de más de 30 años de edad en la cuenca del río Jinzu y los distritos adyacentes, demostrándose la relación dosis-respuesta entre la enfermedad Itai-Itai y la concentración de Cd en el arroz¹⁷.

También se puede mencionar el desastre de Bhopal (India), ocurrido el 3 de diciembre de 1984 al producirse una fuga de 42 toneladas de isocianato de metilo procedente de

¹⁵ Duffus, J.H. (1980) *Environmental toxicology*. Edward Arnold Publishers Limited, London, UK.

¹⁶ Fujiki, M.; Tajima, S. (1992) *The pollution of Minamata Bay by mercury*. Water Science & Technology 25, 133-140.

¹⁷ Nogawa, K.; Yamada, Y.; Honda, R.; Ishizaki, M.; Tsuritani, I.; Kawano, S.; Kato, T. (1983) *The relationship between Itai-Itai disease among inhabitants of the Jinzu River basin and Cadmium in rice*. Toxicology Letters 17, 263-266.

una fábrica de pesticidas hacia la atmósfera¹⁸. Esta catástrofe afectó alrededor de 200000 personas, provocando la muerte de 2000 de ellas.

Otros ejemplos que se pueden mencionar como desastres ecológicos provocados por metales pesados son el de Puerto Esperanza (Australia) donde se produjo un aumento de la concentración de Pb entre los años 2005-2007 afectando tanto a niños como adultos¹⁹, además del desastre de Alamosa (Colorado, Estados Unidos) en donde se produjo un derrame de cianuro y metales pesados procedentes de la minería contaminando el Río Alamosa. Este derrame afectó a la vida acuática a lo largo de 17 millas del río. Fueron identificados el Fe, Al, Zn y Cu entre los metales que causaron la muerte a grandes poblaciones de peces²⁰.

Finalmente hay que comentar el desastre de Aznalcóllar (España) el 25 de abril de 1998, donde ocurrió la ruptura de una presa que contenía el depósito de lixiviados de una mina de pirita provocando el derramamiento de 4,5 hm³ de aguas ácidas y mineral de pirita. El desastre provocó la inundación de las llanuras aluviales de los ríos Agrio y Guadiamar, y el aumento en las zonas afectadas de las concentraciones de una gran cantidad de metales²¹.

Como se puede observar en estos ejemplos, una gran mayoría de los desastres ecológicos relacionados con los metales traza han repercutido principalmente en el medio acuático, alcanzando su efecto al hombre a través de la cadena trófica, bien por la ingesta directa de los organismos acuáticos o por el uso de las aguas contaminadas en actividades agrícolas. Es por el ello que el conocimiento de la concentración de metales en el medio acuático, así como los ciclos biogeoquímicos de estas sustancias en el medio, son de especial interés para conocer la extensión y riesgo de la contaminación y de esta manera poder ejercer un mejor control sobre la misma.

¹⁸ Jasanoff, S. (1988) *The Bhopal disaster and right to know*. Social Science & Medicine 27, 1113-1123.

¹⁹ Rossi, E. (2008) *Low Level Environmental Lead Exposure – A Continuing Challenge*. Clinical Biochemist Reviews 29, 63–70.

²⁰ Eisler, R.; Wiemeyer, S.N. (2004) *Cyanide Hazards to Plants and Animals from Gold Mining and Related Water Issues*. Review of Environmental Contamination and Toxicology 183, 21-54.

²¹ Benito, G.; Benito-Calvo, A.; Gallart, F.; Martín-Vide, J.P.; Regües, D.; Bladé, E. (2001) *Hidrological and geomorphological criteria to evaluate the dispersion risk of waste sludge generated by the Aznalcóllar mine spill (SW Spain)*. Environmental Geology 40, 417-428.

I.2. Metales en el medio acuático

Una vez que los metales llegan al medio acuático, se distribuyen en sus diferentes compartimentos: agua, sedimentos y biota. Los metales no son biodegradables y por tanto, no se eliminan del medio acuático porque participan en un ciclo global ecológico durante el cual se transforman en diferentes especies químicas (ej.: complejos) que en ocasiones no permiten su eliminación del medio^{4,22}. El conocimiento de estos ciclos geoquímicos es de vital importancia para el estudio de metales en el medio ambiente. Aunque a lo largo de estos ciclos los metales pasan por los distintos compartimentos ambientales, es en los sedimentos donde se acumulan fundamentalmente²³. Esto implica que los contenidos de metales en sedimentos resulten de extrema utilidad en los estudios de calidad ambiental, debido a que en ellos se acumulan los metales por largos períodos de tiempo.

Aunque se conocen varias definiciones de sedimentos, en general se entiende que son aquellos depósitos que se acumulan en el fondo de los ecosistemas acuáticos y que están compuestos de diversos materiales (variados en tamaños, mineralogías y formas) provenientes de diferentes fuentes (terrestres, autógenas, biogénicas). Los sedimentos constituyen, por tanto, una mezcla compleja de fases sólidas que pueden incluir arcilla, sílice, materia orgánica, óxidos metálicos tales como el MnO_2 , Al_2O_3 , FeO , carbonatos, sulfatos y minerales, así como una variada población bacteriológica^{24,25}.

En particular, los sedimentos actúan como acumuladores de metales de diversas procedencias, reflejando no sólo la composición natural del lugar, sino también la actividad humana que se desarrolla en el mismo, por lo que son ampliamente

²² Moalla, S.M.N.; Awadallah, S.M.N.; Rashed, M.N.; Soltan, M.E. (1998) *Distribution and chemical fractionation of some heavy metals in bottom sediments of Lake Nasser*. Hydrobiologia 364, 31–40.

²³ Sánchez Urias, J.E.; Sanz Medel, A. (1998) *Inorganic and methylmercury speciation in environmental samples*. Talanta 47, 509–524.

²⁴ *Canadian Council of Ministers of the Environment, 1999. Canadian Sediment Guidelines for the protection of the aquatic life.*

²⁵ Nascimento, Marcos Roberto Lopes do. *Proposição de Valores de Referência para Concentração de Metais e Metalóides em Sedimentos Limnicos e Fluviais da Bacia Hidrográfica do Rio Tietê, SP*. Tesis doctoral 2003, Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Departamento de Química.

utilizados para la evaluación de la contaminación por metales en los ecosistemas^{2,26,27}.

Sin embargo, los sedimentos no sólo constituyen un reservorio de metales, sino que pueden actuar además como fuentes de contaminación porque los metales no se encuentran enlazados a ellos permanentemente, y pueden ser liberados al medio por cambios en las condiciones ambientales, tales como el potencial redox, el pH, el oxígeno disuelto y la presencia de ligandos orgánicos^{28,29,30,31}. Se puede decir que debido a su forma de asociación, los metales son susceptibles o no de solubilizarse durante las variaciones físico-químicas del medio. Por ejemplo, un proceso de desoxigenación que ocurra en las capas más próximas al sedimento, provoca la reducción química de los óxidos en fase sólida, produciendo una disminución de la concentración de Fe y Mn en los mismos y por tanto, un aumento de metales en la fase acuosa. Además, la reducción de ambos elementos puede ser causa de la solubilización de otros metales adsorbidos en la misma fracción del sedimento que los contiene, entre ellos el Cr, Ni y Zn³². El pH afecta principalmente a la especiación química y la movilidad de muchos metales, jugando asimismo un importante papel en las interacciones de los metales con parámetros tales como la dureza del agua y con los compuestos orgánicos^{32,33,34}. Por ejemplo, cuando aumenta progresivamente la concentración de iones hidróxido, el Cd²⁺ forma secuencialmente diferentes especies hidroxiladas. Otros metales muestran un comportamiento similar. Además, los

²⁶ Arain, M.B.; Kazi, T.G.; Jamali, M.K.; Afridi, H.I.; Jalbani, N.; Sarfraz, R.A.; Baig, J.A.; Kandhro, G.A.; Memon, M.A. (2008) *Time saving modified BCR sequential extraction procedure for the fraction of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in sediment samples of polluted lake*. Journal of Hazardous Materials 160, 235-239.

²⁷ Peña-Icart, M.; Villanueva Tagle, M.E.; Alonso-Hernández, C.; Rodríguez Hernández, J.; Behar, M.; Pomares Alfonso, M.S. (2011) *Comparative study of digestion methods EPA 3050B (HNO₃-H₂O₂-HCl) and ISO 11466.3 (aqua regia) for Cu, Ni and Pb contamination assessment in marine sediments*. Marine Environmental Research 72, 60-66.

²⁸ Singh, A. K.; Hasnain, S. I.; Banerjee, D. K. (1999) *Grain size and geochemical partitioning of heavy metals in sediments of the Damodar River- a tributary of the lower Ganga, India*. Environmental Geology 39, 90-98.

²⁹ Parizanganeh, A. (2008) *Grain size effect on trace metals in contaminated sediments along the Iranian coast of the Caspian Sea*. Sengupta, M. and Dalwani, R. (Editors). Proceedings of Taal2007: The 12th World Lake Conference: 329-336.

³⁰ Acosta, V., Lodeiros, C., Senior, W. (2002) *Niveles de metales pesados en sedimentos superficiales en tres zonas litorales de Venezuela*. INCI. 27 (12), 686-690.

³¹ Vaithyanathan, P.; Ramanathan, A.L.; Subramanian, V. (1993) *Transport and distribution of heavy metals in Cauvery river*. Water, Air, & Soil Pollution 71, 13-28.

³² Baruah, N.K., Kotoky, P., Bhattacharyya, K.G., Borah, G.C. (1996) *Metal speciation in Jhanji River sediments*. The Science of the Total Environment 193, 1-12.

³³ Bilos, C., Colombo, J.C., Rodríguez, M.J. (1998) *Trace metals in suspended particles, sediments and Asiatic clams (Corbicula fluminea) of the Río de la Plata Estuary, Argentina*. Environmental Pollution 99, 1-11.

³⁴ Rovira, J.V. (1993) *Estudio de la contaminación por metales pesados del Río Jarama*. Tesis doctoral, Madrid, 360.

cambios de pH pueden influir significativamente en la adsorción o desorción de cationes por las sustancias orgánicas.

Por tanto, aunque algunos autores consideran que los metales acumulados en los sedimentos son, en general, poco disponibles para los organismos acuáticos, los sedimentos son el transporte de muchos metales que se pueden reciclar mediante reacciones químicas y biológicas hacia la columna de agua, aumentando su biodisponibilidad³⁵. Es por ello que los metales y metaloides acumulados en los sedimentos pueden constituir un problema ambiental debido a su posible transferencia hacia el medio acuático y desde ahí incluirse en la cadena alimenticia.

Por otro lado, la distribución de los metales trazas en los sedimentos se encuentra bajo la influencia de las fuentes naturales o antropogénicas, que los suministran y movilizan¹. Esto unido a la facilidad de los sedimentos para retener los elementos metálicos, hace que estos materiales permitan mostrar el pasado de los océanos y ríos y la carga ambiental al que éstos han sido expuestos, considerándose archivos históricos para estudios de contaminación³⁶. Es por ello que el análisis de sedimentos marinos posee una gran importancia en la solución de variados problemas, tanto de carácter científico como económico.

Entre las características ventajosas que tiene el empleo de los sedimentos como indicadores de contaminación se pueden mencionar³⁷:

1. varios de los contaminantes se pueden encontrar en concentraciones más elevadas que en el agua lo que facilita su determinación;
2. permiten evaluar la contaminación histórica (en el tiempo) y son más estables que las columnas de agua de mayor variabilidad espacial y temporal en su contenido de contaminantes;
3. los sedimentos contaminados, junto a la columna de agua contaminada, afectan a los organismos bentónicos y a otros organismos asociados al sedimento;

³⁵ Arain, M.B.; Kazi, T.G.; Jamali, M.K.; Jalbani, N.; Afridi, H.I.; Baig, J.A. (2008) *Speciation of heavy metals in sediment by conventional, ultrasound and microwave assisted single extraction methods: A comparison with modified sequential extraction procedure*. Journal of Hazardous Materials 154, 998–1006.

³⁶ Urrutia, R.; Yevenes, M.; Barra, R. (2002) *Determinación de los niveles basales de metales traza en sedimentos de tres lagos andinos de Chile: Lagos Chungará, Laja y Castor*. Boletín de la Sociedad Chilena Química 47, 457-467.

³⁷ *Toxicological Benchmarks for Screening Contaminants of Potential Concern for Effects on Sediment-Associated Biota: 1997 Revision*. ES/ER/TM-95/R4. http://www.esd.ornl.gov/programs/ecorisk/benchmark_reports.html.

4. son parte integral del medio acuático, proveyendo hábitat, alimentos, y áreas de cría para muchos organismos acuáticos;
5. son reservorios y fuentes de contaminación hacia la columna de agua.

Por todo lo expuesto anteriormente, se puede concluir que el estudio de las concentraciones de los metales en los sedimentos sigue siendo de gran interés científico y medioambiental. Por esta razón, esta tesis está encaminada al estudio de la biodisponibilidad de algunos metales en sedimentos, mediante la propuesta de una metodología de digestión de sedimentos en el laboratorio, que simule las condiciones digestivas de los peces, para poder establecer una aproximación más real de la extracción de los metales asociados a los sedimentos en especies marinas a través de su proceso digestivo. Para ello se ha realizado un estudio con diferentes ácidos y enzimas, algunas de ellas presentes en los sistemas digestivos de las especies marinas con estómago. En total se evaluaron hasta 14 metales en las muestras de sedimentos: Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Ti, V y Zn. Los resultados obtenidos se han evaluado mediante diversas herramientas estadísticas, como el Análisis de Componentes Principales, para estudiar la extracción de un gran número de elementos mediante el uso de diferentes métodos de digestión de sedimentos.

De esta manera la presente tesis consta de seis capítulos. El actual es la Introducción del trabajo, que aborda temas básicos como el origen de la contaminación y los metales en los ecosistemas marinos. El segundo capítulo trata sobre la fase de pre-tratamiento de las muestras, donde se evalúan como las condiciones de tamizado, almacenamiento, secado y material del tamiz pueden afectar la concentración de los metales en las muestras. Por otro lado, en este capítulo se analiza la concentración de los metales en los diferentes tamaños de granos. En el tercer capítulo se expone un estudio de desorción de metales mediante diferentes reactivos ácidos, para lo que se han estudiado diferentes condiciones de pH, tiempo y temperatura de contacto, así como las diferentes propiedades químicas de cada uno de los ácidos evaluados. En el cuarto capítulo se presenta un estudio similar pero con dos de las enzimas más importantes del sistema digestivo de los peces, la pepsina y la tripsina, evaluándose la acción de cada una de ellas en la desorción de los metales en los sedimentos. Se

concluye en este capítulo con la selección de una metodología que posteriormente será aplicada. En ambos capítulos, III y IV, los estudios se realizan bajo las condiciones del sistema digestivo de los peces teniendo en cuenta el pH, tiempo, temperatura y tipo de enzimas. Previo a la aplicación del método propuesto se realizó la validación parcial del mismo, cuyos resultados se recogen en el capítulo V. Finalmente, en el capítulo VI se aplica la metodología seleccionada a muestras de sedimentos de la Bahía de Cienfuegos y de la Bahía de Cádiz, previa validación de los parámetros de desempeño de la misma. Con ello se evalúa la biodisponibilidad de los metales en estas muestras de sedimentos procedentes de dos ecosistemas de alto valor ecológico en Cuba y España, respectivamente, cumpliendo así además uno de los objetivos colaborativos del Programa Iberoamericano de Doctorado en Ciencias.

**CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE LAS
OPERACIONES PREVIAS DE
PREPARACIÓN DE LA MUESTRA**

II. EVALUACIÓN DE LAS OPERACIONES PREVIAS DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

En la evaluación de la concentración de metales en los sedimentos no sólo influye el método de digestión que se aplique, puesto que antes, es preciso someter a los sedimentos a otro tipo de procesos. Dos de las etapas fundamentales en este tipo de estudio las constituyen el muestreo y el pretratamiento de las muestras antes de su digestión y cuantificación. De hecho, antes del muestreo los sedimentos se encuentran en equilibrio o estado estacionario con el medio circundante. Una vez que ocurre el muestreo, este equilibrio puede romperse. Así sucede con el cambio del pH o del potencial redox, la temperatura, etc., que puede provocar una modificación de la composición físico-química del sedimento y, consecuentemente, reestructuración debido a estos cambios³⁸. Por esta razón las etapas de muestreo y pretratamiento de las muestras tienen gran importancia en la evaluación de la concentración de los

³⁸ Bordas, F.; Bourg, A.C.M. (1998) *A critical evaluation of sample pretreatment for storage of contaminated sediments to be investigated for the potential mobility of their heavy metal load.* Water, Air, & Soil Pollution 103, 137–149.

metales en los sedimentos, debido a que durante las mismas pueden ocurrir modificaciones en dichas concentraciones que será preciso evitar.

II.1. INTRODUCCIÓN

El proceso de preparación de muestras y en particular de sedimentos consta de cuatro etapas fundamentales:

1. Toma de muestra o muestreo
2. Pretratamiento de la muestra
3. Conservación de la muestra y
4. Transformación de la muestra de acuerdo al tipo de análisis que se realizará.

A continuación se abordarán en este capítulo las tres primeras etapas, mientras que la cuarta será objetivo de capítulos siguientes.

II.1.1. Toma de muestra

Una etapa fundamental en todo proceso analítico lo constituye la toma de muestra, ya que se pueden cometer errores que anulen completamente todo el proceso de análisis.

En la toma de muestras se deben tener en cuenta diferentes factores del tipo físico, como son la profundidad de recolección, la granulometría de las muestras y la posibilidad de penetración en el fondo marino de los equipos para el muestreo. Otro aspecto a tener en cuenta es el objetivo para el que se toma la muestra, ya sea para la determinación de materia orgánica, de metales u otras variables físico-químicas.

En la actualidad se conocen varias técnicas de muestreo de sedimentos. Dos de las fundamentales son el muestreo superficial y el muestreo a profundidad o muestra testigo. La primera de ellas se puede realizar con diferentes modelos de dragas y cucharas como la Van Veen, Petersen, Ponar, Shipek, Franklin-Anderson, Dietz-LaFond y la Smith-McIntyre. Una de las ventajas de este tipo de técnica es que se pueden tomar muestras de sedimentos en su estado original, sin causar grandes

disturbios en la superficie, ni tampoco modificaciones en el estado original de los metales presentes³⁹. Por otra parte, el muestreo a profundidad o toma de testigo como también se le conoce, se puede realizar a diferentes profundidades, permitiendo estudiar la evolución de la contaminación antropogénica a lo largo del tiempo. Sin embargo, tiene como desventaja que se requiere habilidad y familiarización del operario para la manipulación de los equipos de muestreo debido a que son más complejos. Además, se necesita mayor conocimiento de la zona, como por ejemplo de la profundidad del agua, del efecto del clima imperante o de la naturaleza de los sedimentos, entre otros⁴⁰. Generalmente, este segundo tipo de muestreo se utiliza exclusivamente cuando se requiere realizar un estudio histórico de la contaminación de la zona. Es el muestreo superficial, entre 5 y 10 cm, el más utilizado para estudios de contaminación ambiental debido a que esta capa superficial puede ejercer mayor efecto sobre la biota, ya que se encuentra en contacto directo con el agua y algunos organismos vivos que habitan directamente sobre ella.

II.1.2. Pretratamiento de la muestra

Una vez tomadas las muestras, las mismas pueden ser sometidas a un tratamiento preliminar o pretratamiento. Se entiende por pretratamiento de muestra a la etapa intermedia entre el muestreo y el tratamiento para su análisis. El pretratamiento se encuentra condicionado por las propiedades de cada muestra, es decir, por sus características⁴¹. Para las muestras de sedimentos el pretratamiento puede definirse en dos etapas fundamentales, la primera de ellas es la selección del tamaño de grano o partícula (tamizado), y la segunda el secado para su posterior molturación y homogenización.

³⁹ Groot, A.J.; Zschuppe, K.H.; Salomons, W. (1982) *Standardization of methods of analysis for heavy metals in sediments*. Hydrobiologia 92, 689-695.

⁴⁰ Glew, J.R.; Smol, J.P.; Last, W.M. (2001) 5. *Sediment core collection and extrusion*. En: W. M. Last & J. P. Smol (eds.), *Tracking Environmental Change Using Lake Sediments. Volume 1: Basin Analysis, Coring, and Chronological Techniques*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

⁴¹ Cámara, C.; Fernández, P.; Martín-Esteban, A.; Pérez-Conde, C.; Vidal, M. (2002) *Toma y tratamiento de muestras*. Síntesis, España.

II.1.2.1. Tamizado

En el estudio de la contaminación por metales en sedimentos se deben considerar las diferentes texturas (tamaño de grano) y la mineralogía de las muestras colectadas en diversas regiones para poder establecer estudios comparativos. Por otro lado, se debe tener en cuenta el impacto antropogénico al que se encuentran sometidos los sedimentos, así como otras fuentes naturales de contaminación, ya que muestras tomadas en puntos muy próximos pueden presentar contenidos de metales y composiciones mineralógicas muy diferentes^{42,43}.

Uno de los factores que más repercute en la concentración de metales en el sedimento es el tamaño de partícula de la porción de ensayo que se analiza, precisamente por ser uno de los parámetros que más afecta las interacciones, procesos de adsorción y desorción del metal con el sedimento. Los elementos traza de origen antropogénico se concentran principalmente en las fracciones de arcilla del sedimento, constituidas fundamentalmente por las partículas de diámetro menor que 63 μm ^{24,28,44,45,46}. El enriquecimiento de estas fases se debe al fuerte poder de adsorción de las arcillas minerales, que constituyen una gran parte de las mismas, así como a la abundancia de los grupos carboxilos, fenólicos, carbonatos y sulfatos que participan en la adsorción⁴⁷. También se atribuye a la gran área superficial que tienen las partículas pequeñas con relación a su volumen, lo que favorece la adsorción de los metales en las mismas^{28,29,48}. La tendencia de unión de los metales a las partículas de diámetro menor a 63 μm se relaciona también con la co-precipitación y complejación

⁴² Ščančar, J.; Milačič, R.; Horvat, M. (2000) Comparison of various digestion and extraction procedures in analysis of heavy metals in sediments. *Water, Air, & Soil Pollution* 118, 87-99.

⁴³ Pérez Santana, S.; Pomares Alfonso, M.; Villanueva Tagle, M.; Peña Icart, M.; Brunori, C.; Morabito, R. (2007) *Total and partial digestion of sediments for the evaluation of trace element environmental pollution*. *Chemosphere* 66, 1545-1553.

⁴⁴ Salomons, W.; Förstner, U. (1984) *Metals in the Hydrocycle*. Springer-Verlag, Berlin.

⁴⁵ Krungal, B.S.; Fainshtein, G.; Cohen, A. (1992) *Grain size effect on anthropogenic trace metal and organic matter distribution in marine sediments*. *The Science of the Total Environment* 116, 15-30.

⁴⁶ Krungal, B.S. (1989) *Unusual Grain Size Effect on Trace Metals and Organic Matter in Contaminated Sediments*. *Marine Pollution Bulletin* 20, 608-611.

⁴⁷ Bartels, J.M. (2001) *Methods of soil analysis*. Part 3. Chemical methods. Soil Science of America, American Society of Agronomy Inc.

⁴⁸ Singh, A.K., Hasnain, S.I., Banerjee, D.K. (1999) *Grain size and geochemical partitioning of heavy metals in sediments of the Damodar River- a tributary of the lower Ganga, India*. *Environmental Geology* 39, 90-98.

de los mismos en las capas superficiales de los sedimentos⁴⁹. Así, en la superficie de los sedimentos, se pueden adsorber los complejos formados entre los metales y los ácidos húmicos presentes en el agua^{28,29}. En cuanto a la precipitación de los metales, los aniones sulfato, carbonato, hidróxido y fosfato juegan un importante papel y en presencia de Al, Fe o Mn puede además ocurrir una co-precipitación de otros metales presentes en las aguas^{28,50}.

Por otro lado, en ocasiones se ha observado un enriquecimiento de la concentración de metales en las fracciones gruesas y se argumenta que las partículas gruesas podrían documentar mejor el impacto antropogénico debido a su limitado transporte y largo tiempo de residencia^{48,51}. En este sentido, Krumgalz observó un enriquecimiento elevado inusual de metales pesados y materia orgánica en la fracción de arena gruesa e intermedia (> 250 μm y > 500 μm) explicando este fenómeno por la formación de grandes aglomerados (> 250 μm), durante el tamizado en seco a partir de las partículas más pequeñas del sedimento previamente ya enriquecidas en los elementos estudiados durante su permanencia en el lecho marino^{45,46}. En particular, se ha reportado el enriquecimiento de la fracción gruesa en muestras con altos contenidos orgánicos debido a la formación de clusters o aglomerados de fracciones finas que ocurre en el secado y durante el tamizado en seco⁴⁶. También se ha mencionado como posible causa de este enriquecimiento de la fracción gruesa el incremento en el espesor del recubrimiento de Fe y Mn o a la formación de nódulos de estos metales^{52,53}. Y por último, se ha llegado a plantear que una posible causa de este enriquecimiento pueda deberse a la presencia de minerales pesados detríticos y productos de desechos de partículas gruesas^{54,55}.

⁴⁹ Bolan, N.S., Adriano, D.C., Naidu, R. (2003) *Role of phosphorus in (Im)mobilization and bioavailability of heavy metals in the soil-plant system*. Environmental Contamination Toxicology 177, 1-44.

⁵⁰ Adriano, D.C. (2001) *Trace elements in terrestrial environment*. Biogeochemistry, bioavailability and risk of Metals. Springer, New York USA.

⁵¹ Moore, J.N.; Brook, E.J.; Johns, C. (1989) *Grain size partitioning of metals in contaminated, coarse-grained river floodplain sediment: Clark Fork River, Montana, U.S.A.* Environmental Geology Water Science 14, 107-115.

⁵² Calvert, S.E.; Price, N.B. (1977) *Geochemical variation in ferromanganese nodules and associated sediments from the Pacific Ocean*. Marine Chemistry 5, 43-74.

⁵³ Delgado, J.; Nieto, J.M.; Boski, T. (2010) *Analysis of the spatial variation of heavy metals in the Guadiana Estuary sediments (SW Iberian Peninsula) based on GIS-mapping techniques*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 88, 71-83.

⁵⁴ Borovec, Z. (2000) *Elements in size-fractionated bottom sediments of the Elbe River in its Czech part*. Aquatic Science 62, 232-251.

⁵⁵ Förstner, U. (1982) *Accumulative phases for heavy metals in limnic sediments*. Hydrobiologia 91, 269-284.

Sin embargo, se encuentra más extendida la hipótesis de que la fracción gruesa de los sedimentos actúa como diluyente de la concentración de los metales que se encuentran en la fracción fina^{56,57,58}. Esto conlleva, por tanto, una gran dificultad para realizar comparaciones de niveles de metales en los sedimentos tomados en diversas partes del mundo y con granulometrías diferentes.

Por este motivo, varios autores plantean que para poder comparar la concentración de metales en distintas muestras, se deben aplicar métodos de corrección que minimicen los efectos de la granulometría, proponiendo que la fracción por debajo de un tamaño determinado sea la que se someta a análisis^{46,48,59,60}. Así, se han estudiado diferentes fracciones con el propósito de conocer el tamaño de partícula en la cual se enlazan mayor cantidad de metales: $< 2 \mu\text{m}$ ^{61,62}, $< 16 \mu\text{m}$ ^{61,63}, $< 20 \mu\text{m}$ ^{64,65}, $< 63 \mu\text{m}$ ^{45,46,61,65,66}, $< 75 \mu\text{m}$ ⁶⁷ y $< 125 \mu\text{m}$ ⁶¹. En otros trabajos se utiliza directamente la fracción granulométrica por debajo de 2 mm^{68,69} en la cual sólo se eliminan los restos más gruesos. Una de las conclusiones a las que arriba Horowitz es que el tamaño de grano, la superficie del mismo y la fase geoquímica están tan interrelacionados que puede ser difícil diferenciar entre los efectos individuales de los tres⁶¹.

⁵⁶ Birch, G.F.; Evenden, D.; Teutsh, M.E. (1996) *Dominance of point source in heavy metal distributions in sediments of a major Sydney estuary (Australia)*. Environmental Geology 28, 169-174.

⁵⁷ Luiz-Silva, W.; Riberiro, R.H.; Chavez, G.; Machado, W. (2006) *Variabilidade espacial e sazonal da concentração de elementos-traço em sedimentos do sistema estuarino de Santos-Cubatão (SP)*. Química Nova 29, 256-263.

⁵⁸ Greaney, K.M. (2005) *An assessment of heavy metal contamination in the marine sediments of Las Perlas Archipelago, Gulf of Panama*. Tesis de Master, School of Life Sciences Heriot-Watt University, Edinburgh.

⁵⁹ Förstner, U.; Patchineelam, S.R. (1980) *Chemical associations of heavy metals in polluted sediments from the Lower Rhine River*. Particulates in Water. Chapter 7. Advances in Chemistry 189, 177-193.

⁶⁰ Vaithyanathan, P.; Ramanathan, A.L.; Subramanian, V. (1993) *Transport and distribution of heavy metals in Cauvery river*. Water, Air, & Soil Pollution 71, 13-28.

⁶¹ Horowitz, A.J.; Elrick, K.A. (1987) *The relation of stream sediment surface area, grain size and composition to trace element chemistry*. Applied Geochemistry 2, 437-451.

⁶² Irion, G.; Müller, G. (1987) *Heavy Metals in the Environment*. Proceeding International Conference New Orleans, LA. 2, 38-41.

⁶³ De Groot, A.J. (1964) *Mud transport studies in coastal waters from the western Scheldt to the Danish frontier*. Deltic and Shallow Marine Deposits. L.M.Y.U. van Straaten, Dev. Sedimentology 1, 93-103.

⁶⁴ Ackermann, F. (1980) *A procedure for correcting the grain size effect in heavy metal analyses of estuarine and coastal sediments*. Environmental Technology Letters 1, 518-527.

⁶⁵ Ackermann, F.; Bergmann, M.; Schleichert, G.U. (1983) *Monitoring of heavy metals in coastal and estuarine sediments - a question of grain-size: <20 μm versus <60 μm*. Environmental Technology Letters 4, 317-328.

⁶⁶ Tam, N.F.Y.; Wong, Y.S. (2000) *Spatial variation of heavy metals in surface sediments of Hong Kong mangrove swamps*. Environmental Pollution 110, 195-205.

⁶⁷ Martincic, D.; Kwokal, Z.; Stoeppler, M.; Branica, M. (1989) *Trace metals in sediments from the adriatic sea*. Science of the Total Environment 83, 135-147.

⁶⁸ Diz, H.R. (2005) *An assessment of sediment contamination in Presque Isle Bay, PA, with historical comparisons*. Aquatic Ecosystem Health & Management. 8 (1), 21-31.

⁶⁹ Adami, G.; Aleffi, F.; Barbieri, P.; Favretto, A.; Predonzani, S. & Reisenhofer, E. (1997) *Bivalves and heavy metals in polluted sediments: A chemometric approach*. Water, Air, & Soil Pollution 99, 615-622.

A pesar de esta gran variabilidad en los estudios, son muchas las investigaciones que proponen trabajar con la fracción < 63 μm por diversas razones³⁹.

- Los metales de origen antropogénico se encuentran fundamentalmente ligados a esta fracción.
- Debido a la elevada relación que se encuentra entre los metales en esta fracción y la materia en suspensión, ya que la suspensión es la forma de transporte de las partículas presentes en el sedimento.
- La técnica de tamizado de esta fracción es rápida y sencilla y no afecta a las concentraciones de los metales de la muestra.
- Se puede realizar una mejor comparación con los trabajos encontrados en la literatura, debido a que son numerosas las investigaciones que trabajan con este tamaño de partícula.

Por todo lo antes expuesto las muestras de sedimentos no se analizan en su totalidad, si no, por regla general, en su fracción por debajo de 63 μm , lo cual permite realizar comparaciones entre resultados de diferentes zonas. Para ello se realiza previamente al tratamiento un tamizado de las muestras.

El tamizado es un método físico que se emplea para separar mezclas de partículas de diferentes tamaños. Las partículas del tamaño deseado pasan a través del tamiz, que puede estar constituido por un tejido de hilos metálicos o de plástico que se entrecruzan formando una malla de diferente tamaño de luz o bien puede tratarse de placas metálicas perforadas. Estas mayas o placas permiten sólo el paso de aquellas partículas de un tamaño menor al de la luz del tamiz empleado.

Existen varios tipos de tamizado dependiendo de la técnica empleada, como el tamizado seco y el húmedo o el manual y mecánico. El primero de ellos se emplea generalmente con materiales que tienen poca humedad o que fueron secados previamente. En el caso de los sedimentos el tamizado en seco sólo se puede emplear si las muestras han sido liofilizadas previamente³⁹. En algunos casos se sugiere que las muestras se liofilicen cuando van a ser guardadas por largos períodos de tiempo, así como cuando se ha realizado el tamizado como paso posterior al secado³⁸.

En el tamizado húmedo se realiza la adición de agua al sedimento con el objetivo de que el líquido arrastre las partículas de la muestra más finas a través del tamiz. En este caso es preciso tener en cuenta que el agua añadida puede producir la lixiviación de los metales más móviles asociados al sedimento. Como ambos tipos de métodos tienen sus ventajas y desventajas, Soares y *col.* realizan una comparación entre el tamizado en seco y en húmedo, obteniendo diferencias entre ambos métodos, siendo el tamizado en húmedo el más eficiente, con alrededor de un 63 % de recuperación de la fracción fina respecto al porcentaje obtenido por el tamizado en seco⁷⁰. Sin embargo, para la fracción de 500 μm los porcentajes de recuperación fueron similares con ambos tipos de tamizado. Por otro lado también obtienen mayor concentración de metales en las muestras que fueron tamizadas por vía húmeda, probablemente debido a una mayor eficiencia en la desagregación de las partículas finas. En la misma línea, otros autores proponen el tamizado húmedo para los estudios de metales pesados para evitar la subestimación de la fracción fina que se produce con el tamizado en seco^{70,71}.

Para el caso del tamizado manual y mecánico, la diferencia radica fundamentalmente en el empleo de un equipo (tamizadora) que permite de manera mecánica realizar esta operación. Este equipo facilita y agiliza el proceso de tamizado.

II.1.2.2. Secado

Debido a los diferentes contenidos de humedad que pueden presentar los sedimentos, es necesario realizar un paso previo de secado de las muestras, de forma tal que los resultados finales puedan ser referidos al peso seco. De este modo se facilita la comparación del resultado de diferentes áreas. En el caso del tamizado en seco este es un paso previo a la disgregación de la muestra y posterior tamizado, mientras que

⁷⁰ Soares, H.M.V.M.; Boaventura, R.A.R.; Machado, A.A.S.C.; Esteves da Silva, J.C.G. (1999) *Sediments as monitors of heavy metal contamination in the Ave river basin (Portugal): multivariate analysis of data*. Environmental Pollution 105, 311-323.

⁷¹ Cobelo-García, A.; Prego, R. (2004) *Influence of point sources on trace metal contamination and distribution in a semi-enclosed industrial embayment: the Ferrol Ria (NW Spain)*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 60, 695-703.

en el tamizado en húmedo éste es el paso posterior al tamizado y previo a la disgregación de la muestra.

Las muestras de sedimentos se pueden secar a la temperatura ambiente o en estufa abarcando un amplio rango de temperaturas, entre 30 - 110° C. En todos los casos el tiempo de secado debe ser suficiente como para eliminar toda la humedad de la muestra, finalizando la etapa de secado cuando se obtiene un peso constante de la misma. Se plantea que para la determinación de metales no volátiles, cualquiera de los procedimientos de secado es aceptable, sin embargo, por encima de 40° C se pueden producir pérdidas significativas de mercurio³⁹. También se recomienda trabajar a esta temperatura para evitar los cambios mineralógicos en las muestras⁵². Por tanto, la temperatura preferida por algunos investigadores para secar las muestras es la de 40° C, aunque es posible utilizar otras temperaturas dependiendo del elemento a analizar. Por ejemplo, Brook y Moore secan sus muestras a 70° C, probablemente para evitar la pérdida de As que posteriormente analizan en su estudio⁷².

Una vez que la muestra se ha secado, se necesita disgregarla y homogenizarla, mediante la molturación empleando, por ejemplo, un mortero de ágata. Con este paso se logra aumentar la superficie de contacto y que la digestión ocurra por igual en toda la muestra. Una vez terminado este paso, se pasa a almacenar la muestra para su posterior tratamiento químico o análisis.

II.1.2.3. Almacenamiento y conservación

Las muestras se almacenan dos veces durante todo el proceso de análisis, la primera de ellas es a su llegada al laboratorio, antes del pretratamiento, y la otra luego del pretratamiento hasta su digestión.

Una vez tamizadas, secadas y disgregadas, las muestras deben ser almacenadas para su posterior análisis. Es por ello que se debe controlar no sólo las temperaturas máximas y mínimas de almacenamiento, sino también la humedad y el efecto que la luz puede producir sobre las muestras⁴¹. Bordas propone que para cortos períodos de

⁷² Brook, E.J.; Moor, J.M. (1998) *Particle-size and Chemicals control fo As, Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, and Zn in bed sediment from the Clark Fork river, Montana (U.S.A.)*. The Science of the Total Environment 76, 247-266.

tiempo, almacenar las muestras de sedimentos a 4° C es suficiente, pero no más de dos semanas. Los sedimentos anóxicos deben ser preservados evitando el contacto con el oxígeno atmosférico, e independientemente del método utilizado para almacenar la muestra, debe inhibirse la actividad microbiana debido a que puede producir cambios en algunas especies químicas³⁸. Por otro lado, también sugiere que para largos períodos de tiempo, las muestras deben liofilizarse o secarse.

Concluyendo, para realizar el tratamiento previo de las muestras, así como su posterior conservación, el trabajo debe realizarse de manera tal que se evite la contaminación por metales y la pérdida de constituyente o elementos volátiles antes del análisis. En este estudio se ha evaluado el efecto que diferentes tipos de tamizados provoca en las concentraciones de metales en muestras de sedimentos, así como el efecto que provoca el tamaño de grano sobre dicha concentración.

II.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

II.2.1. Toma de muestras

Para estudiar el efecto que tiene el pretratamiento de los sedimentos sobre la concentración de metales se utilizaron cinco muestras de un ecosistema de gran importancia ambiental de la Bahía de Cádiz, denominado Río San Pedro (RSP).

Como se observa en la Figura II.1, el RSP se ubica concretamente en una zona situada en las Marismas del Río Guadalete, al oeste de la Provincia de Cádiz. Durante el período Cuaternario, el RSP constituía una brazo del Río Guadalete, sin embargo, fue cortado artificialmente en la década de los 50 al desecarse parte de las marismas situadas al norte de Puerto Real⁷³. Es por ello que en la actualidad el RSP tiene una longitud de 12 km y es catalogado como un brazo de mar cuyas aguas proceden de la

⁷³ Mendiguchía, C. (1999) *Estudios sobre acumulación de metales pesados en sedimentos de zonas de explotación acuícola de alto valor ecológico*. Tesina de Licenciatura, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz.
28

Bahía de Cádiz⁷⁴. Su margen oriental baña el pueblo de Puerto Real, fluyendo principalmente por el Pinar de La Algaida, mientras que su margen occidental fluye junto al término municipal del Puerto de Santa María, bañando las marismas de Los Toruños⁷³, que constituye un parque metropolitano.



Figura II.1. Mapa de la zona de muestreo de Río San Pedro en la Bahía de Cádiz.

La toma de muestras fue realizada en los cinco sitios señalados en la Figura II.1, con el empleo de una draga Eckman-Birge (Figura II.2). Posteriormente los sedimentos fueron envasados en bolsas de polietileno y refrigerados hasta su tratamiento previo.

⁷⁴ Mendiguchía, C.; Moreno, C.; Manuel-Vez, M.P.; García-Vargas, M. (2006) *Preliminary investigation on the enrichment of heavy metals in marine sediments originated from intensive aquaculture effluents*. *Aquaculture* 254, 317–325.

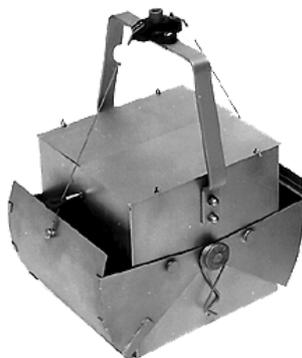


Figura II.2. Draga Eckman-Birge empleada en el muestreo.

Los sitios muestreados cubrieron distintas fuentes antropogénicas. El punto RSP1 se encuentra en la zona más externa del brazo de mar, alejado de las influencias acuícolas, y recibe poca influencia antropogénica, limitada al impacto de los astilleros cercanos al mismo. El punto RSP2 recibe aportes del poblado de Río San Pedro, mientras que el punto RSP3 se encuentra cercano a una carretera con alta densidad de tráfico y recibe el aporte de la ciudad del Puerto de Santa María. Los puntos RSP4 y RSP5 reciben el aporte de la granja acuícola cercana, encontrándose cerca de los mismos el centro de investigaciones y las instalaciones para el cultivo de peces (dorada), respectivamente.

II.2.2. Pretratamiento de las muestras

Con el objetivo de evaluar el efecto sobre la concentración de metales en las muestras en estudio, se realizó el análisis después de someterlas a tamizados de forma manual y mecánica, por vía húmeda y seca. En el caso del tamizado manual, que se realizó siempre por vía húmeda, se pesó una porción de sedimento de 100 g y se pasó a través de un tamiz de tamaño de poro de 63 μm , añadiendo lentamente agua milli-Q y con la ayuda de una espátula se movió el sedimento para facilitar el paso del mismo a través del poro del tamiz. Finalmente se recogió el sedimento junto al agua que

atravesó el tamiz y se secó en estufa a una temperatura de 105° C hasta peso constante.

El tamizado mecánico se realizó tanto por vía húmeda como por vía seca. En ambos casos se usó la tamizadora que se muestra en la Figura II.3 (A). Para el tamizado en húmedo se pesaron 100 g del sedimento y se trasvasaron al tamiz superior. Dependiendo del análisis a realizar, se utilizaron tamices de diferentes tamaños de poro. Se puso en marcha la tamizadora y se añadió dos veces agua milli-Q en cantidad aproximada a 1 L a intervalos de cinco minutos. Al finalizar el ciclo se enjuagó el tamiz con suficiente agua hasta que ésta salió transparente. Se recogió la fracción tamizada y se puso a secar en estufa a 105° C hasta peso constante. Para el tamizado en seco se procedió secando en primer lugar la muestra en estufa a 105° C hasta peso constante. Posteriormente se tamizó en ausencia de agua y con la ayuda de un pincel se trasvasó el sedimento tamizado a un vaso de precipitados previamente tarado.

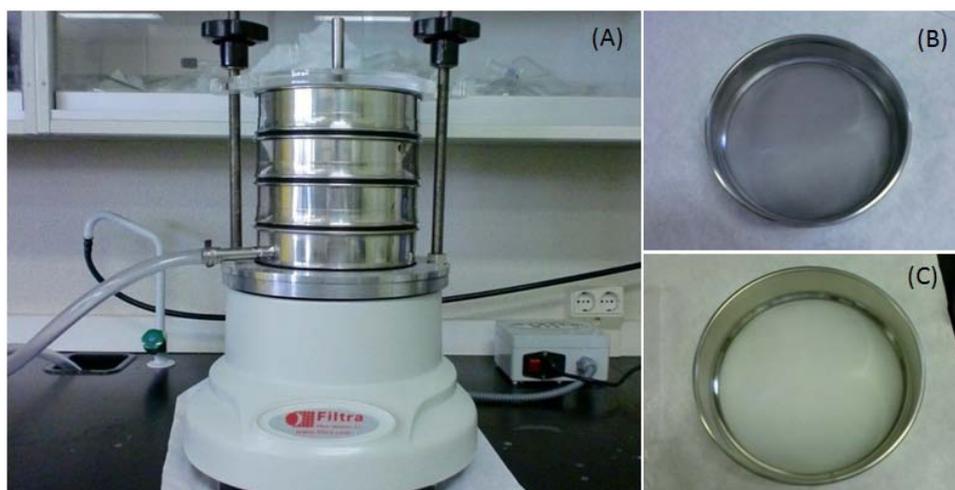


Figura II.3. Tamizadora empleada en el estudio (A). A la derecha los tamices empleados: (A): Tamiz metálico y (B): Tamiz de plástico.

En todos los casos se calculó el porcentaje de cada fracción tamizada a partir de los pesos del sedimento obtenido en cada tamiz respecto al peso total de la porción de

sedimento empleada. Finalmente, y con el objetivo de estudiar el efecto del material del tamiz en las muestras se pasó una porción de muestra por una torre de tamices plásticos (nylon) y otra por una de tamices metálicos (Figura II.3 (B) y (C)). Este estudio se realizó por vía húmeda y tamizado mecánico.

Finalmente, con el objetivo de conocer la concentración de los metales en los diferentes tamaños de granos, se instaló una torre de tamices de diferentes tamaños de luz en la tamizadora. Los diámetros evaluados fueron: < 63 μm , 63 μm - 2 mm y > 2 mm. Una vez tamizadas las distintas fracciones fueron secadas a 40° C y molturadas con mortero de ágata. En este caso se optó por una temperatura menor debido a que se iba a realizar la determinación de la concentración de varios metales, entre ellos el Pb y el As.

En todos los casos de tamizado mecánico se utilizaron una potencia del nivel 8 y un ciclo de 9 s.

II.2.3. Digestión y análisis de las muestras

Como ya se ha mencionado, la digestión de las muestras es una de las etapas determinantes en la detección y cuantificación de los metales en los sedimentos cuando la determinación se realiza mediante las técnicas analíticas más comúnmente empleadas que requieren la transformación del sedimento a fase líquida. Existe gran variedad de normas internacionales para la digestión total o parcial de las muestras. Los métodos que emplean la fusión de la muestra, con ayuda de una mezcla fundente, no son recomendables para la determinación de elementos trazas por razones bien fundamentadas en la literatura⁷⁵. En su lugar se emplean las conocidas digestiones ácidas. En este caso, para el análisis de la concentración total de los metales se realizó una digestión total ácida empleando una modificación del método EPA 3052⁷⁶. El objetivo de esta modificación, fundamentalmente, es el de reducir la cantidad de

⁷⁵ Agemian, H.; Chau, A.S.Y. (1976) *Evaluation of extraction techniques for the determination of metals in aquatic sediments*. Analyst, 101, 761-767.

⁷⁶ Benomar, M.; Mendiguchía, C.; Er-Raioui, H.; Marhraoui, M.; Lafraoui, G.; Oulad-Abdellah, M.K.; García-Vargas, M.; Moreno, C. (2012) *Analysis of heavy metals in sediments from northern moroccan coast using simple and low-cost methodology*. The Open Environmental Pollution & Toxicology Journal 3, (Suppl 1-M6) 47-54.

muestra a digerir, conllevando a una reducción de la cantidad de reactivos empleados. El método consiste en pesar aproximadamente 0,25 g de muestra y trasvasarla a un reactor de politetrafluoroetileno (PTFE), adicionándole 4 ml de HNO₃ concentrado y 1 ml de HF. Posteriormente se coloca en un horno microondas siguiendo un programa de dos etapas. La primera consiste en un calentamiento durante 5 minutos con una potencia de 500 W y una temperatura de 130° C, mientras que en la segunda etapa se mantiene durante 16,5 minutos a una temperatura de 180° C y una potencia de 1000 W. Posteriormente las muestras se dejan enfriar hasta temperatura ambiente y se les añade alrededor de 12 ml de disolución de ácido bórico al 5 % para eliminar el exceso de HF. Finalmente, las muestras digeridas se trasvasan cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 ml y se enrasan con agua milli-Q.

Finalmente se determinó la concentración total de los metales en las disoluciones con un espectrómetro de emisión atómica con plasma acoplado por inducción (ICP-OES), utilizando la adición de un estándar interno de Li. Por este motivo la concentración total de Li fue determinada en otra porción de la muestra digerida mediante un Espectrómetro de Absorción Atómica, en modo de emisión, al que se acopló un sistema de inyección en flujo (FIA) para realizar la adición de la disolución buffer (KCl 2%) a las muestras. En este caso se trabajó con una llama de aire/acetileno, flujo de C₂H₂ de 1,0 l·min⁻¹ y de aire de 5,0 l·min⁻¹, ancho de banda espectral de 0,5 nm, altura del quemador de 10 mm y una longitud de onda de 670,8 nm.

II.2.4. Análisis estadístico de los resultados

Para realizar las comparaciones entre los resultados obtenidos con los diferentes tipos de tamizado, se calculó la concentración media de tres réplicas de digestión en cada condición experimental de las muestras de sedimento de RSP, sus respectivas desviaciones estándar e intervalos de confianza ($\alpha = 0,05$, $n = 3$). En primer lugar, para conocer la exactitud de la metodología de digestión total empleada se comparó mediante una prueba estadística t la concentración media experimental con la concentración conocida en una muestra de referencia certificada (MAR GBW 07313).

La comparación entre las concentraciones del metal obtenido en la misma fracción del sedimento, pero con diferentes tipos de tamices se realizó mediante una prueba de significación t de comparación de dos medias experimentales.

Finalmente, para evaluar las relaciones entre los metales y su distribución en los diferentes tamaños de grano y sitios de muestreo se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP). Como el Cd en la fracción del sedimento con tamaño de grano $< 500 \mu\text{m}$ se incorporó debajo del límite de detección, su valor fue sustituido por la mitad de dicho límite y así poder evaluar dicho metal⁷⁷. Para una mejor comprensión de los resultados se aplicó una rotación Varimax, así como las nuevas componentes principales se seleccionaron según el principio de Kaiser, que considera como relevante las nuevas componentes principales cuyo autovalor es > 1 ⁷⁷. También se consideró la variabilidad explicada por cada una y la variabilidad total explicada. Las cargas fueron empleadas para evaluar el impacto de las variables originales sobre las nuevas componentes, mientras que las puntuaciones de las nuevas componentes seleccionadas fueron utilizadas para evaluar las similitudes y las diferencias entre los sedimentos estudiados. Por último, el estudio de agrupamiento jerárquico se aplicó para evaluar las distancias entre las muestras y conjuntos de datos y confirmar los resultados obtenidos mediante el ACP.

II.3. RESULTADOS

II.3.1. Efecto de las condiciones de tamizado

A continuación se exponen los resultados obtenidos para las diferentes condiciones de tamizado estudiadas, así como cuáles fueron las mejores condiciones de tamizado que serán empleadas en estudios posteriores.

En primer lugar, se procedió al estudio de la eficiencia de tamizado de acuerdo a la técnica empleada. Para ello se compararon los porcentajes de la fracción fina (< 63

⁷⁷ Reid, M.K.; Spencer, K.L. (2009) *Use of principal components analysis (PCA) on estuarine sediment datasets: The effect of data pre-treatment*. Environmental Pollution 157, 2275–2281.

μm) obtenidos mediante tamizado manual y mecánico, tanto en vía húmeda como seca para el segundo caso. En la Figura II.4 se muestran los resultados de recuperación como porcentaje del peso de la fracción menor a $63 \mu\text{m}$ recuperada respecto al peso total de la porción de sedimento pesada. Como se observa el tamizado mecánico por vía húmeda resultó ser el más eficiente, debido a que se obtiene mayor cantidad de muestra en las fracciones tamizadas, así como resultados más reproducibles que en el tamizado mecánico seco. Resultados similares fueron obtenidos por Soares y *col.*⁷⁰. La menor reproducibilidad del tamizado mecánico seco puede deberse a que la muestra se recoge en ausencia de agua y no se arrastra la totalidad de las partículas del fondo del tamiz. Por tanto, ocurre una pérdida no constante de peso de muestra.

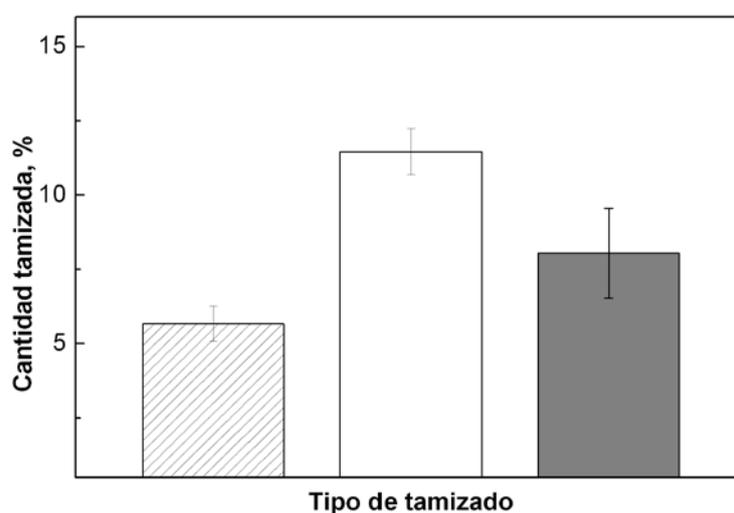


Figura II.4. Efecto del tipo de tamizado en cantidad de la fracción $< 63 \mu\text{m}$ tamizada respecto al total pesado. (▨): Manual, (□): Mecánico vía húmeda y (■): Mecánico vía seca. Las barras de error representan la desviación estándar del análisis.

Por las razones antes mencionadas se escogió el tamizado mecánico por vía húmeda para los estudios posteriores.

II.3.2. Efecto del tiempo de tamizado

Una vez seleccionado el tamizado mecánico vía húmeda, se estudió el tiempo necesario para recuperar la mayor cantidad de las fracciones tamizadas. Para ello se evaluaron tres tiempos, 5, 10 y 15 minutos. De manera general se obtuvieron muy bajos porcentajes en las fracciones: menor a 2 mm, entre 630 μm - 2 mm y entre 63 - 630 μm , encontrándose la mayor cantidad de la muestra en las fracción < 63 μm para los diferentes tiempos. Los resultados obtenidos para dicha fracción se muestran en la Figura II.5. Los resultados para el resto de los tamaños de grano se pueden encontrar en el Anexo 1.

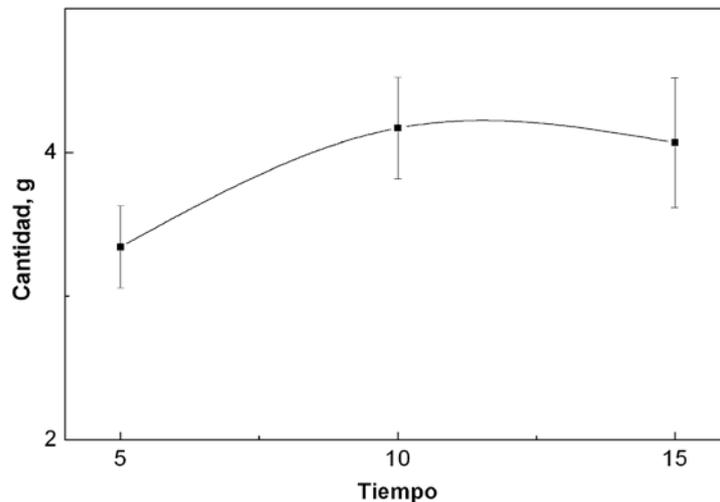


Figura II.5. Influencia del tiempo de tamizado en el porcentaje de la fracción tamizada < 63 μm . Las barras de error representan la desviación estándar del análisis.

Como se puede observar en la figura, la cantidad de muestra tamizada de fracción fina (< 63 μm) aumenta cuando el tiempo aumenta de 5 a 10 minutos, y se mantiene constante si el tiempo se aumenta hasta los 15 minutos. Por tanto, 10 minutos es tiempo suficiente para arrastrar la mayor cantidad de muestra posible de dicha fracción durante el tamizado y fue seleccionado para los estudios posteriores.

Una vez establecidas las condiciones de tamizados se procedió a la separación de las fracciones de las partículas > 2 mm, entre 2mm – 63 µm, y < 63 µm, usando ambos tipos de tamices de las cinco muestras de RSP. La Tabla II.1 muestra los porcentajes de cada fracción tamizada para ambos materiales.

Tabla II.1. Composición granulométrica de las muestras de RSP obtenidas con tamices de materiales diferentes. Los resultados están expresados en %.

MUESTRA	TAMIZ	> 2 mm	2 mm- 63 µm	< 63 µm	TOTAL
RSP1	METÁLICO	19,2	71,5	0,73	91,4
	PLÁSTICO	17,2	81,4	0,85	99,5
RSP2	METÁLICO	6,9	91,4	5,71	104,1
	PLÁSTICO	2,6	94,9	4,2	101,7
RSP3	METÁLICO	0,18	5,5	89,2	94,9
	PLÁSTICO	0,16	7,2	83,8	91,2
RSP4	METÁLICO	20,1	15,04	57,1	92,2
	PLÁSTICO	23,3	12,6	58,8	94,7
RSP5	METÁLICO	1,31	29,3	62,04	92,7
	PLÁSTICO	2,4	28,2	66,1	96,7

Como se puede apreciar, la fracción predominante en las muestras RSP1 y RSP2 es la que se encuentra entre 2 mm - 63 µm, mientras que en las muestras RSP3, RSP4 y RSP5 la fracción predominante es la fina, es decir, la inferior a 63 µm. Este hecho se debe a que las muestras RSP1 y RSP2 se corresponden a la zona del RSP donde existe una mayor renovación de agua y por tanto, mayor movimiento y transporte de la fracción fina. Por el contrario, en los puntos RSP3, RSP4 y RSP5 existe escaso movimiento de aguas que favorece la deposición del material más fino.

II.3.3. Efecto del material del tamiz

Para realizar la comparación de la influencia del material del tamiz sobre la concentración de metales en los sedimentos, se analizaron la concentración total de

todos los elementos en la fracción menor a 63 μm , tamizada tanto con el tamiz metálico como con el plástico mediante tamizado mecánico en húmedo por 10 minutos. Primeramente se evaluó el sesgo del método de digestión para garantizar el correcto desempeño del mismo. Para ello se realizó la digestión total de una muestra de referencia certificada y las concentraciones se compararon con su valor certificado. Las concentraciones medidas de metales en la muestra de referencia certificada se aparecen en la Tabla II.2 junto con las concentraciones de referencia y los resultados de la prueba t de comparación de un valor experimental con un valor certificado.

Tabla II.2. Resultados de la prueba t para la muestra de referencia certificada expresados en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Elemento	$C_c \pm u_s$	$C_m \pm s$	$t_{\text{experimental}}$	Prueba t
Al	13,75 \pm 0,09	13,3 \pm 0,4	1,95	Aceptado
As	5,8 \pm 0,8	5,9 \pm 0,9	0,19	Aceptado
Cd*	-	0,13 \pm 0,07	-	
Co	76,7 \pm 1,2	72,2 \pm 5,4	1,44	Aceptado
Cr	58,4 \pm 1,3	57,4 \pm 5,2	0,33	Aceptado
Cu	424,8 \pm 8	414 \pm 11	1,72	Aceptado
Fe	6,58 \pm 0,07	6,3 \pm 0,3	1,62	Aceptado
Li*	-	40,6 \pm 6,4	-	
Mn	0,43 \pm 0,01	0,41 \pm 0,09	0,39	Aceptado
Ni	150 \pm 4	149,2 \pm 1	1,39	Aceptado
Pb	29,3 \pm 1,1	26 \pm 8	0,80	Aceptado
Ti*	-	3787 \pm 24	-	
V	112 \pm 5	111 \pm 9	1,35	Aceptado
Zn	160 \pm 3	156 \pm 11	0,63	Aceptado

$t_{\text{tabla}} = 4,30$ para $n-1=2$, $\alpha=0,05$. C_c : concentración certificada, C_m : Concentración medida. *metales no certificados en la muestra

Los resultados de la aplicación de la prueba estadística t ($n = 3$ y $\alpha = 0,05$) no mostraron diferencias significativas entre la concentración certificada y la determinada en el MRC para ninguno de los metales cuantificados lo que garantiza la confiabilidad de los resultados.

Una vez cuantificadas las muestras, como primer resultado se puede mencionar que la concentración obtenida para todos los metales fue similar independientemente del tipo de tamiz empleado, mostrándose el Ni como ejemplo en la Figura II.6.

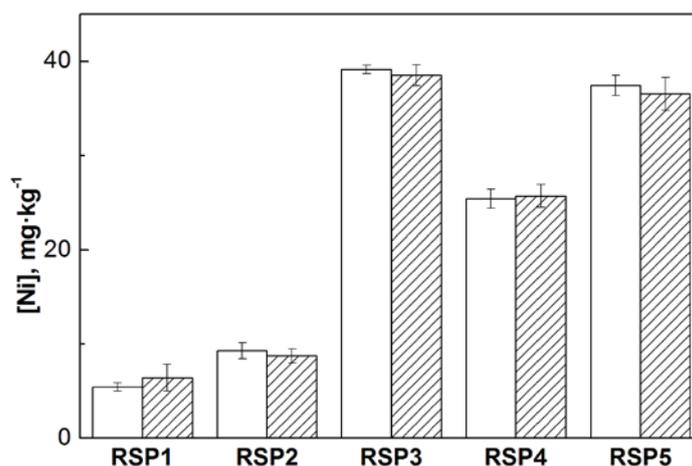


Figura II.6. Efecto del material del tamiz en la concentración de Ni, (□): tamiz metálico y (▨): tamiz plástico. Las barras de error representan la desviación estándar.

Esta similitud dentro de los límites del error experimental se demostró mediante una prueba t de comparación de dos medias experimentales, no encontrándose diferencias significativas entre los dos tipos de material de los tamices para un intervalo de confianza del 95 % ($\alpha = 0,05$) para todos los metales y muestras estudiados. La tabla de los resultados de la prueba t para todos los metales estudiados se muestra en el Anexo 2 de este trabajo.

Los resultados obtenidos nos permiten concluir que, para las muestras de sedimentos evaluadas, se puede utilizar indistintamente cualquiera de los dos tipos de tamices, plástico o metal, sin correr el riesgo de afectar la concentración de los metales mediante contaminación debido al material del tamiz.

II.3.4. Efecto del tamaño de grano

Para evaluar la relación entre el tamaño de grano y la concentración de los metales en la muestra de sedimentos que se analiza se comparó la concentración determinada en las fracciones menores de 63 μm y de 500 μm . La selección de la fracción fina se encuentra ampliamente respaldada por la literatura, como antes se ha expuesto. La fracción menor a 500 μm fue también considerada en el presente estudio porque existen trabajos sobre metales en el RSP para este tamaño de grano y de este modo permitiría realizar la comparación de los resultados actuales con los anteriormente reportados^{73,74}.

De manera general se observaron dos comportamientos bien definidos. El primero incluye a la mayoría de los metales (As, Cd, Co, Cu, Li, Mn, Ni, Pb, Ti, V, Zn y materia orgánica), los cuales mostraron una mayor concentración en la fracción menor a 63 μm que en la fracción menor a 500 μm . Este comportamiento se muestra en la Figura II.7, donde se representan los resultados obtenidos para el Cu a modo de ejemplo.

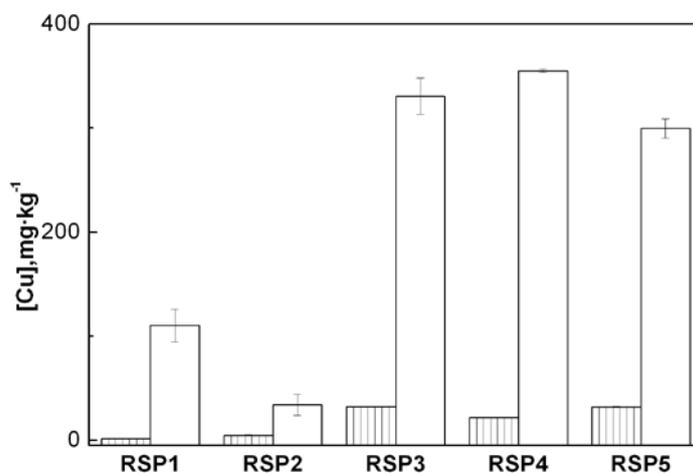


Figura II.7. Comparación de la concentración de Cu determinada a (□): < 63 μm y (▨): < 500 μm . Las barras de error representan la desviación estándar.

Como se mencionó en la Introducción, los metales de origen antropogénico se concentran fundamentalmente en la fracción fina de los sedimentos, tal y como se obtiene en el presente trabajo.

Como se ha comentado previamente, este comportamiento es el que se observa para los metales en los sedimentos de manera general. El enriquecimiento de la fracción < 63 μm se debe que las partículas pequeñas presentan mayor área específica respecto a su volumen que las partículas mayores. Este hecho produce un aumento significativo de la superficie total de interacción con los metales presentes en el medio para una misma cantidad dada de sedimento cuando las partículas son menores, lo que conduce a una mayor retención de la cantidad de metales²⁸. Como se comentó en la Introducción, esta tendencia frecuentemente se atribuye a los procesos de adsorción, co-precipitación y complejación de los metales que se favorecen en la superficie de las partículas.

El segundo grupo de metales, que está formado por el Al, Cr y Fe, mostró sin embargo, un comportamiento opuesto, como se puede observar en la Figura II.8 donde se muestran los resultados obtenidos para el Fe a modo de ejemplo. En este caso, la concentración obtenida en la fracción menor a 500 μm es mucho mayor que la obtenida para la fracción menor a 63 μm . La concentración obtenida para todos los metales en ambos tamaños de grano se puede encontrar en el Anexo 3.

Este comportamiento ha sido observado anteriormente por otros autores para algunos metales, como el Cd, Cu, Pb, Zn, Fe, Mn^{45,46,51,72}, y se atribuye a varios procesos, como se ha descrito en la Introducción de este capítulo. En el presente caso, es probable que el enriquecimiento en Al y Fe de la fracción de 500 μm pueda deberse fundamentalmente a la presencia de minerales detríticos, presentes en la composición mineralógica de los sedimentos analizados.

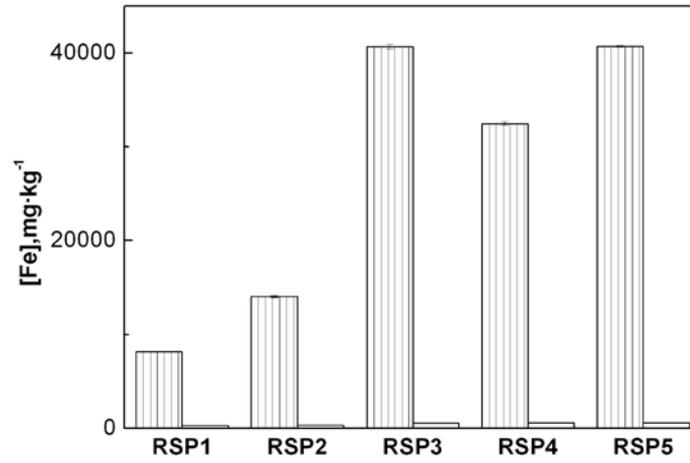


Figura II.8. Efecto del tamaño de grano en la concentración de Fe a (□): < 63 μm y (▨): < 500 μm. Las barras de error representan la desviación estándar.

En la Figura II.9 se muestra el difractograma para la muestra RSP1 menor a 500 μm a modo de ejemplo, donde se puede apreciar la anortita, silicato del grupo de los feldespatos, que en su composición química pueden contener al Al.

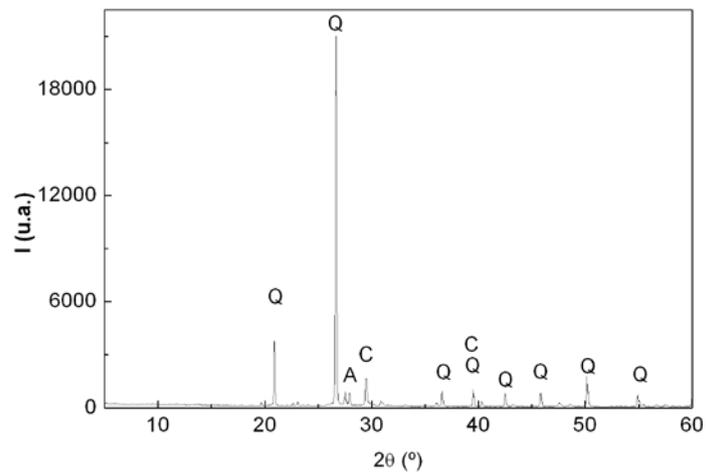


Figura II.9. Difractograma de la muestra RSP1 menor a 500 μm. Q: cuarzo, C: calcita y A: anortita.

Para poder evaluar la relación y comportamiento de los metales en las dos fracciones analizadas, así como la tendencia espacial de las muestras, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP). Los resultados de las cargas y puntuaciones se muestran en la Figura II.10.

Durante la reducción de variables se identificaron tres componentes principales (CP1, CP2 y CP3), las cuales en su conjunto representan un 92,8 % de la variabilidad total contenida en los datos.

La variabilidad explicada por la CP1 es del 48,1 %. Las cargas indican que la contribución principal sobre esta componente corresponde al As, Co, Cu, Ni, Ti, V y Zn, metales traza y medios que con excepción del Co y el Ti, son elementos tóxicos y/o indicadores de la contaminación antropogénica. Todos ellos están asociados, fundamentalmente, a la fracción fina del sedimento, como se destaca particularmente bien en la Figura II.10 para la fracción menor de 63 μm de los sedimentos colectados en los sitios RSP3-RSP5. La segunda componente principal representó un 30,5 % del total de la varianza. En esta componente se agruparon fundamentalmente los elementos litogénicos Al, Fe, Cr y Li, así como el Cd con influencia negativa sobre esta componente. En CP3, con una varianza explicada de 14,15 %, se reflejó sólo la influencia de una variable original, el Mn. La materia orgánica distribuye su carga entre las CP1 y CP3, nótese que tiene cargas entre 0,5 y 1 en ambas componentes, mientras que la carga sobre la componente 2 es menor a 0,5.

Por otro lado, cuando se analizan las puntuaciones se puede observar en la Figura II.10 una clara diferenciación de las muestras analizadas por las el tamaño de sus partículas (< 63 μm y < 500 μm), agrupándose principalmente en dos componentes diferentes. La mayoría de las muestras (RSP3-RSP5) de 63 μm se agruparon en el extremo positivo del eje x, en la CP1, mientras que en el extremo positivo del eje y, CP2, se agruparon la mayoría de las muestras analizadas (RSP3-RSP5) de la fracción < 500 μm (Figura II.10).

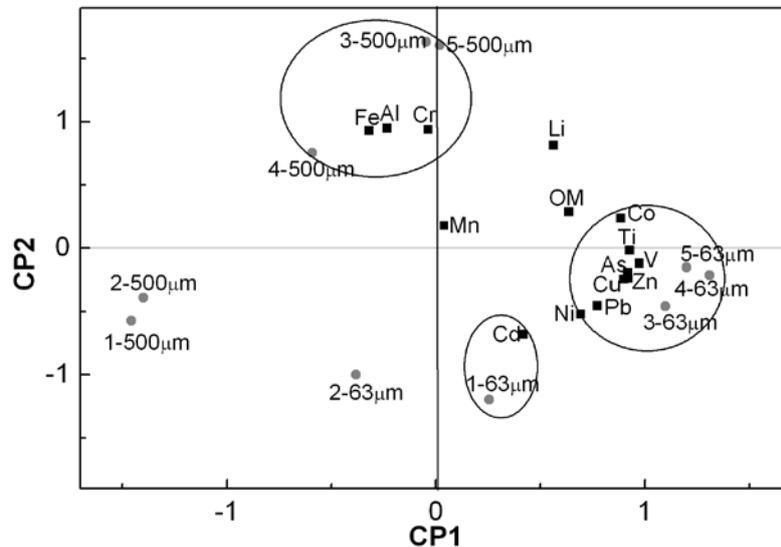


Figura II.10. Representación de las cargas y las puntuaciones sobre el espacio de las nuevas componentes. CP1 vs CP2.

También se puede observar una diferenciación de las muestras RSP1 y RSP2 de 500 μm agrupadas en el extremo izquierdo del mismo eje, destacando así el bajo contenido en esas dos muestras de los elementos traza y medios indicadores de contaminación. Como se mencionó previamente, las muestras ubicadas en la parte interior del brazo de mar (3, 4 y 5) reciben mayor impacto antropogénico, principalmente de la granja acuícola. Estos resultados corroboran con mayor claridad lo observado para ambos tamaños de grano durante el análisis univariado previo.

Resulta interesante también la asociación entre la muestra RSP2 de fracción fina y el Mn en contraste con la asociación de las muestras RSP3, RSP4 y RSP5 de diámetro $< 500 \mu\text{m}$ a los elementos Fe, Al y Cr. Cuando en realidad todos son básicamente de origen litológico y sin embargo aparecen asociados a diferentes tamaños de grano. Esto pudiera indicar la presencia de algún tipo de mineral de Mn que se acumula preferentemente en la fracción fina de la muestra RSP2. Por otro lado, el Mn es el único metal que mostró un comportamiento diferente a lo largo del río en la fracción fina, siendo similar la concentración del mismo en todos los sitios de muestreo.

A modo de conclusión, las mejores condiciones de tamizado para las muestras estudiadas fueron el tamizado mecánico vía húmeda, con un tiempo de tamizado de 10 minutos. Por otro lado, las muestras de RSP pueden ser tamizadas con tamices plásticos o metálicos, sin correr el riesgo de contaminar la misma con metales a partir del material del tamiz. Además, como era de esperar, la mayoría de los metales se concentran en la fracción fina, menor a 63 μm , y sólo el Al y Fe muestran mayor concentración en la fracción más gruesa (menor a 500 μm). Por tanto, se decidió realizar los estudios posteriores sobre la fracción menor de 63 μm , para evitar posibles diluciones de los metales debido a la granulometría y obtener resultados más fácilmente comparables con otros obtenidos en distintas áreas del mundo.

**CAPÍTULO III. SIMULACIÓN DE
LOS PROCESOS DIGESTIVOS DE
PECES MEDIANTE MÉTODOS
QUÍMICOS**

III. SIMULACIÓN DE LOS PROCESOS DIGESTIVOS DE PECES MEDIANTE MÉTODOS QUÍMICOS

Se ha mencionado anteriormente el riesgo que implica la contaminación por metales para la vida en el planeta debido a su toxicidad, persistencia y naturaleza bioacumulativa, así como que los sedimentos han sido usados frecuentemente para la evaluación de dicha contaminación. Se conocen hasta el momento muchos métodos de digestión de sedimentos que permiten evaluar la fracción biodisponible de metales en los mismos, sin embargo, cada vez es mayor el interés por conocer realmente qué fracción de esos metales pasan a los organismos acuáticos a través de la ingestión directa de los sedimentos. Por esta razón, la presente tesis centra su atención en la búsqueda de un método que permita simular en el laboratorio las condiciones que se encuentran en el sistema digestivo de los peces en que produce la extracción de los metales presentes en partículas del sedimento que ha sido ingerido. Esto permitiría una mejor evaluación desde el laboratorio de la cantidad de metales que efectivamente se incorpora al tracto digestivo del organismo acuático. Este tema se

abordará en dos capítulos, el primero dedicado a los métodos químicos y el segundo a los métodos enzimáticos.

III.1. INTRODUCCIÓN

III.1.1. Biodisponibilidad y ecotoxicidad

La biodisponibilidad es utilizada frecuentemente como el indicador clave del riesgo potencial que suponen los productos químicos, metales y otras sustancias para el medio ambiente. Sin embargo, el término biodisponibilidad se define en muchas ocasiones de manera inadecuada, con múltiples ambigüedades en la literatura al no estar claro el concepto sobre el cual se define⁷⁸.

El término biodisponibilidad tuvo su origen natural en la farmacología/toxicología, y desde su introducción su definición ha sido usada dependiendo de la disciplina ambiental y del organismo receptor.

Algunos autores definen la biodisponibilidad como la fracción de la cantidad total de una sustancia química en un compartimento medioambiental que, dentro de un período de tiempo determinado, está disponible o se puede hacer disponible para la absorción por plantas y otros organismos bien por la vía directa a partir del medio circundante, o por la ingestión de alimentos. Por tanto, la biodisponibilidad en su concepto más amplio debe ser estudiada como un proceso dinámico, en el cual se debe tener en cuenta de manera explícita la exposición significativa y la ruta de captación de los metales, los flujos químicos para determinadas especies biológicas, así como la dependencia del tiempo^{79,80}. Por otro lado, la biodisponibilidad ha sido definida en términos de absorción de las plantas⁸¹. En el mismo se plantea que un

⁷⁸ Naidu, R.; Semple, K.T.; Megharaj, M.; Juhasz, A.L.; Bolan, N.S.; Gupta, S.K.; Clothier, B.E.; Schulin, R. (2008) *Bioavailability: Definition, assessment and implications for risk assessment*. Developments in Soil Science 32, Chapter 3, 39-51.

⁷⁹ Peijnenburg, W.J.G.M.; Jager, T. (2003) *Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues*. Ecotoxicology and Environmental Safety 56, 63-77.

⁸⁰ Peijnenburg, W.J.G.M.; Zablotskaja, M.; Vijver, M.G. (2007) *Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction*. Ecotoxicology and Environmental Safety 67, 163-179.

⁸¹ Gupta, A.K.; Sinha, S. (2006) *Chemical fractionation and heavy metal accumulation in the plant of Sesamum indicum (L.) var. T55 grown on soil amended with tannery sludge: Selection of single extractants*. Chemosphere 64, 161-173.

elemento químico es biodisponible si está presente como, o puede ser transformado fácilmente a, especies de iones libres, que se pueden mover hacia las raíces de las plantas en una escala de tiempo relevante para el crecimiento y desarrollo de las mismas, y que una vez absorbido por la raíz, afecta el ciclo de vida de las plantas. Por otra parte, también se ha definido en términos de absorción de las plantas la fracción de metales extraíbles que se correlaciona con la captación total de metal en las plantas⁷⁸. Otras definiciones han sido dadas en términos más generales de absorción en microorganismos y organismos superiores, e incluso, en términos de biodegradación⁷⁸. En la primera de estas dos últimas definiciones se han referido al grado en que un producto químico en una fuente potencial es libre para la captación, o para ser desorbido fisiológicamente, pudiendo ser absorbido a través del tracto gastrointestinal llegando de esta manera a la sangre. Además, en el caso de los microorganismos se puede definir desde la perspectiva de su metabolismo, su capacidad para crecer en estos productos químicos, cambiar su fisiología y tal vez su modulación de la respuesta genética^{82,83,84}. En el segundo caso, para la definición de biodisponibilidad descrita en términos de biodegradación se refiere al grado en el que un contaminante está disponible para la conversión biológica, la cual es una función del sistema biológico, las propiedades físico-químicas de los contaminantes y los factores ambientales.

Finalmente, muchos autores definen la biodisponibilidad como la máxima cantidad de un contaminante que se encuentra disponible o disuelto en el medio gastrointestinal de un organismo^{85,86}. Una de las ventajas de este concepto es que tiene en cuenta la liberación de metales en el sistema digestivo de los organismos, por esta razón esta

⁸² Peijnenburg, W.J.G.M.; Posthuma, L.; Eijsackers, H.J.P.; Allen, H.E. (1997) *A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37, 163–172.

⁸³ Beresford, N.A.; Mayes, R.W.; Cooke, A.I.; Barnett, C.L.; Howard, B.J.; Lamb, C.S.; Naylor, G.P.L. (2000) *The importance of source-dependent bioavailability in determining the transfer of ingested radionuclides to ruminant-derived food products*. *Environmental Science and Technology* 34, 4455-4462.

⁸⁴ Ruby, M.V.; Schoof, R.; Brattin, W.; Goldade, M.; Post, G.; Harnois, M.; Mosby, D.E.; Casteel, S.W.; Berti, W.; Carpenter, M.; Edwards, D.; Cragin, D.; Chappell, W. (1999) *Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment*. *Environmental Science and Technology* 33, 3697-3705.

⁸⁵ Turner, A.; Olsen, Y.S. (2000) *Chemical versus enzymatic digestion of contaminated estuarine sediment: Relative importance of iron and manganese oxides in controlling trace metal bioavailability*. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 51, 717-728.

⁸⁶ Bignasca, A.; Ianni, C.; Magi, E.; Rivo, P. (2011) *Using proteolytic enzymes to assess metal bioaccessibility in marine sediments*. *Talanta* 86, 305-315.

definición es a la que se hará referencia durante todo el presente trabajo cuando se use el término de biodisponibilidad.

Teniendo en cuenta este concepto, la biodisponibilidad de los metales asociados a los sedimentos dependerá en gran medida de la movilidad de los metales hacia el medio gástrico, así como de la capacidad de los organismos de asimilarlos por la ingestión directa de los sedimentos⁸⁷.

Como es bien sabido, la movilidad de un metal depende de una variedad de procesos químicos, físicos y biológicos como se muestra en la Figura III.1. Dentro de los procesos químicos encontramos la disolución/precipitación, desorción/adsorción y complejación/agregación. Para los procesos físicos se pueden mencionar la advección/resuspensión, difusión/asentamiento y la fotólisis/entierro. Por último, entre los procesos biológicos encontramos la degradación, transformación, producción de heces y filtración⁸⁷.

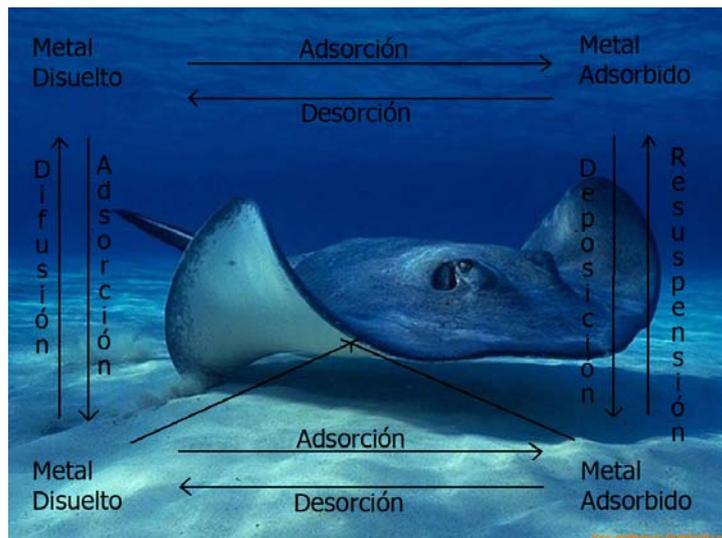


Figura III.1. Procesos que influyen en la movilidad de los metales en el medio acuático.

⁸⁷ Amiard, J.C.; Geffard, A.; Amiard-Triquet, C.; Crouzet, C. (2007) *Relationship between the lability of sediment-bound metals (Cd, Cu, Zn) and their bioaccumulation in benthic invertebrates*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 72, 511-521.

Por todo lo expuesto hasta este momento podemos decir que el concepto de biodisponibilidad es complejo, puesto que es específico a la relación especie-metal-sedimento, y no es necesariamente equivalente a la cantidad de metal que se absorbe dentro del tejido de un organismo. A su vez, la movilidad de los metales también dependerá del pH del entorno gastrointestinal de los organismos acuáticos, de los cationes y la capacidad de intercambio iónico de los sedimentos, su contenido de arcilla y materia orgánica, entre otros.

III.1.1.1. Métodos para evaluar la biodisponibilidad

Existen diferentes aproximaciones al estudio de la biodisponibilidad, sin embargo hasta el momento no existe un método estandarizado para evaluarla. A esta falta de consenso se une el hecho de que la biodisponibilidad se encuentra influenciada por diferentes factores como las propiedades del medio, forma química del elemento y tiempo de exposición del organismo, lo cual dificulta aún más su evaluación. Para ello se han propuesto diversos métodos que abarcan desde ensayos químicos hasta pruebas con microorganismos, invertebrados, plantas y organismos superiores⁷⁸.

Entre los métodos más utilizados para evaluar la biodisponibilidad en los sedimentos se pueden encontrar las pruebas químicas, los ensayos de toxicidad, la estimación o medición de la bioacumulación directamente del medio ambiente, la estimación de biodisponibilidad utilizando las propiedades del suelo o sedimento, reactivos para conocer la potencial biorremediación, conocimiento de la bioaccesibilidad (mediante extracciones fisiológicas), biosensores microbianos y pruebas en animales⁷⁸.

La forma más común de conocer la biodisponibilidad de un metal en los sedimentos está relacionada con la disponibilidad del mismo a diferentes reactivos químicos (extracciones simples) o a mezclas de los mismos por etapas (extracciones secuenciales), así como con la relación entre la disponibilidad del metal y las diferentes fases mineralógicas del sedimento a la que se encuentra asociado. A pesar de tener una base empírica, se ha demostrado en algunos casos, que la concentración obtenida con estos métodos correlaciona con la encontrada en

diferentes organismos y plantas^{81,88}. Los ensayos para el estudio de la fracción biodisponible de metales a menudo se basan en la solubilización por ataques químicos relativamente débiles respecto a la matriz del sedimento⁸⁹. Entre las fases más biodisponibles de los sedimentos podemos mencionar los carbonatos, la débilmente adsorbida y la intercambiable. Por tanto, los metales enlazados a las mismas, serán más biodisponibles que si se encontraran enlazados a fases más resistentes. Por otro lado, los métodos secuenciales se han desarrollado también con el objetivo de estudiar la especiación de los metales en los sedimentos, y por tanto, su biodisponibilidad de acuerdo a su forma de asociación. También se puede mencionar que es posible evaluar la biodisponibilidad de manera operacional, en la cual los reactivos utilizados para extraer el metal del sedimento se seleccionan para simular las condiciones que ocurren en el estómago de los organismos^{85,90,91,92,93,94,95}.

Otra de las formas para evaluar la biodisponibilidad es el estudio de toxicidad en los organismos. Las pruebas de toxicidad se basan en el estudio de la respuesta tóxica que provoca la inhibición de diferentes funciones del organismo. También se evalúa la biodisponibilidad mediante estudios de bioacumulación de los contaminantes, que pueden ser obtenidos mediante el análisis de los niveles de los metales en los tejidos de los organismos. Tal es el caso de la estimación de la bioacumulación mediante la fórmula $BAF = C_b/C_m$, donde C_b es la concentración del contaminante en los tejidos, C_m la concentración en el medio (sedimentos) y BAF el factor de bioacumulación⁷⁸. Por otra parte, se puede predecir de manera cualitativa la biodisponibilidad de un sedimento teniendo en cuenta sus propiedades físicas y químicas. Por ejemplo, la

⁸⁸ Langston, W.J.; Burt, G.R.; Pope, N.D. (1999) *Bioavailability of metals in sediments of the Dogger Bank (central North Sea): a mesocosm study*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 48, 519-540.

⁸⁹ Mayer, L.M.; Chen, Z.; Findlay, R.H.; Fang, J.; Sampson, S.; Self, R.F.L.; Jumars, P.A.; Quetel, C.; Donard, O.F.X. (1996) *Bioavailability of sedimentary contaminants subject to deposit-feeder digestion*. Environmental Science and Technology 30, 2641-2645.

⁹⁰ Ettajani, H.; Amiard, J.C. (1995) *Biodisponibilité de quelques métaux fixés sur les matières en suspension (MES) en milieu estuarien*. Hydroécologie Appliquée 7, 75-89.

⁹¹ Ettajani, H.; Amiard-Triquet, C.; Jeantet, A.Y.; Amiard, J.-C. (1996) *Fate and effects of soluble or sediment-bound arsenic in oysters (Crassostrea gigas Thun)*. Archives of the Environmental Contamination and Toxicology 31, 38-46.

⁹² Lee, B.G.; Luoma, S.N. (1998) *Influence of microalgal biomass on absorption efficiency of Cd, Cr and Zn by two bivalves from San Francisco Bay*. Limnology and Oceanography 43, 1455-1466.

⁹³ Wang, W.X.; Yang, Q.L.; Fan, W.; Xu, Y. (2002) *Bioavailability of sedimentary metals from a contaminated bay*. Marine Ecology Progress Series 240, 27-38.

⁹⁴ Ojo, A.A.; Wood, C.M. (2007) *In Vitro análisis of the bioavailability of six metals via the gastro-intestinal tract of the rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)*. Aquatic Toxicology 83, 10-23.

⁹⁵ Abd El Gawad, SSI. (2009) *The Mollusk Gastropod Lanistes carinatus (Olivier, 1984) as a biomonitor for some trace metals in the Nile river*. International Journal of Zoological Research, 1-11.

biodisponibilidad de muchos contaminantes guarda relación inversa con el contenido orgánico en los suelos, la biodisponibilidad del plomo está estrechamente relacionada a los cambios de pH y la forma en la que se encuentra este contaminante. Por tanto, en este último caso, si se cuenta con la información adecuada, se puede predecir de manera cualitativa la biodisponibilidad de los contaminantes⁷⁸.

Existe igualmente una serie de metodologías con el objetivo de conocer la biodisponibilidad de los contaminantes transmitidos por el suelo para evaluar el potencial de biorremediación. La mayoría de los trabajos se han centrado en la evaluación de los métodos de extracción no exhaustivos con disoluciones “suaves”. Los alcoholes de bajo peso molecular primarios (metanol, etanol, propanol y butanol) se han utilizado para evaluar la biodisponibilidad de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAH). Se pueden mencionar varios trabajos donde encuentran correlación entre los PAH extraídos y los PAH biodegradables en suelos. Por otro lado, también se ha encontrado correlación entre la concentración extraída de PAH con el uso de hidroxipropil-b-ciclodextrina (HPCD) y la concentración de los PAH producto de la degradación microbiana, siendo un método de determinación rápida, robusta, y reproducible para evaluar la degradación microbiana en suelos^{96,97}.

Los estudios de disponibilidad o bioaccesibilidad fisiológica (PBET por sus siglas en inglés) emplean métodos basados en la fisiología y ensayos gastrointestinales de las especies a evaluar. Así, pueden utilizar contenido gastrointestinal de diferentes especies o diferentes enzimas presentes en el sistema gastrointestinal de los mismos para simular las condiciones de dicho sistema.

En general, se conocen dos formas fundamentales para simular las condiciones del sistema digestivo en los organismos: por la vía química, donde se emplean reactivos que representen el pH del estómago o del intestino, y por la vía enzimática con algunas de las enzimas presentes en los sistemas digestivos de los organismos.

En este capítulo se abordan las digestiones químicas, mientras que las enzimáticas serán tratadas en el capítulo siguiente.

⁹⁶ Liste, H.H.; Alexander, M. (2000) *Plant-promoted pyrene degradation in soil*. Chemosphere 40, 7–10.

⁹⁷ Reid, B.J.; Stokes, J.D.; Jones, K.C.; Semple, K.T. (2000) *Nonexhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability*. Environmental Science and Technology 34, 3174–3179.

III.1.2. Métodos de digestión química para evaluar la biodisponibilidad de metales en sedimentos

Para evaluar el contenido total de metales en un sedimento es preciso, en general, realizar una etapa de digestión previa a la determinación instrumental por espectrometría de absorción/emisión. Técnicas que indudablemente son muy empleadas con estos fines tanto en laboratorios de rutina como en investigaciones ambientales en todo el mundo. Existen otras técnicas, por ejemplo las conocidas técnicas analíticas nucleares, como la Fluorescencia de Rayos X y el Análisis por Activación Neutrónica (AAN), cuya principal ventaja es que son no destructivas. Pero estas técnicas tienen algunas limitaciones, por ejemplo, el alto costo del equipamiento para el AAN y la relativa dificultad en la preparación de patrones de calibración en fase sólida comparada con su preparación en fase líquida. También se pueden mencionar los elevados límites de detección en algunos casos⁹⁸. Sus limitaciones han impedido que las técnicas antes mencionadas hayan podido sustituir a otras como las espectrometrías de absorción y emisión atómica. Por otro lado, el estudio de la biodisponibilidad, en cualquiera de sus acepciones, requiere la extracción de solo una parte de los metales presentes en el sedimento, lo que es imposible hacer analizando directamente la muestra en fase sólida. En la actualidad se conocen una gran variedad de métodos de digestión para la transformación del sedimento a fase líquida. Estos métodos se pueden clasificar según los siguientes criterios (ver también la Figura III.2):

1. Simple (de una etapa) o secuenciales (de varias etapas): en cada etapa se introduce un extracto en fase líquida del sedimento para la cuantificación.
2. Los métodos simples pueden ser totales o parciales: cuando la porción de ensayo es transformada total o parcialmente a fase líquida.
3. Los métodos de digestión simple pueden ser mediante fusión o digestión ácida. En el primer caso la muestra es previamente transformada a una fase, con el uso de

⁹⁸ Hoenig, M. (2001) *Preparation steps in environmental trace element analysis-facts and traps*. Talanta 54, 1021-1038.

alguna mezcla fundente, que luego es fácilmente soluble en ácidos. En el segundo caso solo se emplean ácidos.

4. Los métodos de digestión parcial pueden ser de digestión fuerte o débil: según la naturaleza del ácido o mezcla de ácidos empleado.
5. Por último, los métodos parciales de digestión débil pueden emplear reactivos químicos, como los ácidos por ejemplo, o reactivos enzimáticos como la tripsina y pepsina.

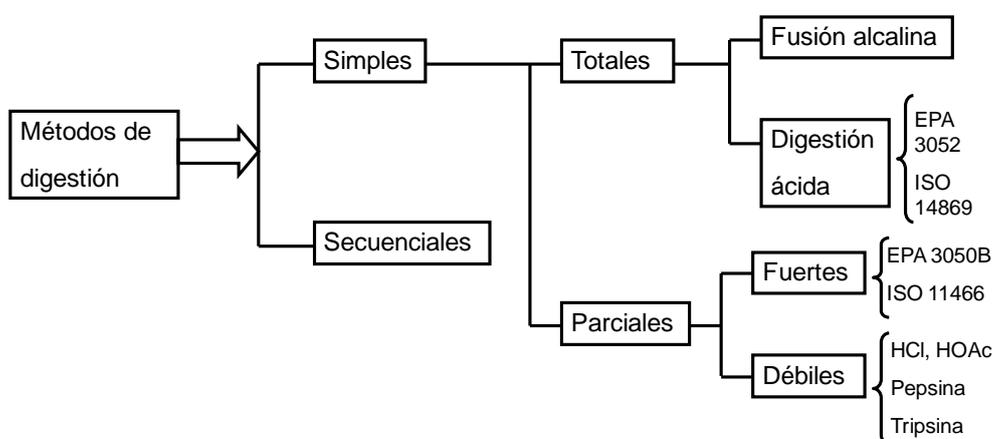


Figura III.2. Una clasificación de los métodos de digestión.

La selección del método de digestión depende, entre otros factores, de la composición química y mineralógica de la muestra, de los elementos a determinar, de la cantidad de muestra disponible, de los recursos materiales que el laboratorio posea, de la precisión y exactitud deseada, del entrenamiento del personal técnico y del tiempo disponible para el análisis⁹⁹. El objetivo final del análisis deber ser también considerado, en particular cuando se pretende evaluar la biodisponibilidad de los metales en partículas del sedimento ingeridas por especies marinas.

Es recomendable realizar diversos ensayos para elegir un método adecuado al objetivo final que se persigue con el análisis, aunque alguna de las características a conseguir son rapidez, económico y simple, que introduzca la menor contaminación en

⁹⁹ Chao, T.T.; Sanzalone, R.F. (1992) *Decomposition techniques*. Journal of Geochemical Exploration 44, 65-106.

el empleo de varios reactivos y que presente la exactitud adecuada, lo que se traduce en la mayor confiabilidad de los resultados obtenidos.

La mayoría de los métodos simples o secuenciales, representados en la Figura III.2, han sido utilizados ampliamente para el estudio de contenidos de metales en sedimentos^{43,75,100,101,102,103,104}. Sin embargo, no existe un consenso internacional acerca de un único método de digestión que conlleve a la interpretación homogénea de los resultados obtenidos en diferentes partes del mundo²⁷. Los métodos simples (de una etapa) son muy convenientes para el análisis de rutina debido a su rapidez y simplicidad y han sido ampliamente utilizados, aunque los métodos secuenciales también tienen un gran campo de aplicación^{75,100,101,102,103}.

Dentro de los métodos simples se pueden encontrar métodos de digestión total o parcial, siendo estos últimos los más interesantes para evaluar la biodisponibilidad de metales en sedimentos.

III.1.3. Métodos de digestión total

Aunque los métodos de digestión total no aportan información suficiente sobre la biodisponibilidad de los metales, siguen siendo de gran interés en los estudios ambientales, y su uso, combinado con el de otros métodos parciales, contribuye a obtener la fracción del metal más biodisponible^{27,42,43}.

Generalmente, el reactivo más utilizado para este tipo de tratamiento es el ácido fluorhídrico (HF) combinado con otras mezclas y ácidos, puesto que es el único que permite la digestión de la fase silicatada que frecuentemente abunda en todo tipo de

¹⁰⁰ Sutherland, R.A. (2002) *Comparison between non-residual Al, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn released by a three-step sequential extraction procedure and a dilute hydrochloric acid leach for soil and road deposited sediment*. Applied Geochemistry 17 (4), 353-365.

¹⁰¹ Townsend, A.T.; Snape, I.; Palmer, A.S.; Seen, A.J. (2009) *Lead isotopic signatures in Antarctic marine sediment cores: A comparison between 1 M HCl partial extraction and HF total digestion pre-treatments for discerning anthropogenic inputs*. Science of the Total Environment 408, 382-389.

¹⁰² UNEP/IOC/IAEA, February 1995. *Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter*. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 63. United Nations Environment Programme.

¹⁰³ Larner, B.L.; Palmer, A.S.; Seen, A.J.; Townsend, A.T. (2008) *A comparison of an optimised sequential extraction procedure and dilute acid leaching of elements in anoxic sediments, including the effects of oxidation on sediment metal partitioning*. Analytica Chimica Acta 608, 147-157.

¹⁰⁴ de Andrade Passos, E.; Alves, J.C.; dos Santos, I.S.; do Patrocínio, J.; Alves, H.; Garcia, C.A.B.; Spinola, A.C. (2010) *Assessment of trace metals contamination in estuarine sediments using a sequential extraction technique and principal component analysis*. Microchemical Journal 96, 50-57.

sedimento¹⁰⁵. El HF es el único ácido que disuelve completamente la red cristalina de Si, liberando todos los metales asociados, tales como el Al, Fe y Li, que son ampliamente usados en los estudios de normalización⁹⁸. De este modo se consigue la disolución total de la muestra y la determinación de prácticamente todos los elementos presentes en la misma, exceptuando el Si, que se volatiliza durante la evaporación a sequedad⁹⁸. Sin embargo, el uso de este reactivo conlleva un procedimiento largo, peligroso y problemático por lo que no se recomienda para los análisis de rutina¹⁰⁶. Por otra parte, cuando la muestra contiene altos contenidos de cromo, se suele recurrir a la fusión para que sea disuelta eficientemente, dificultando aún más el proceso e introduciendo posibles contaminaciones y pérdidas de metales por los reactivos y temperaturas usados respectivamente.

A pesar de que los métodos totales brindan una medida exacta del contenido total de metales acumulados, como se ha comentado, este criterio no es suficiente para predecir la capacidad de movilización de los mismos hacia el medio acuático, así como para predecir la toxicidad de estos contaminantes para los animales acuáticos^{28,81,87,104}, para lo cual los métodos parciales son mucho más adecuados.

III.1.4. Métodos de digestión parcial

Actualmente existe una gran variedad de métodos de digestión parcial, pudiendo dividirse fundamentalmente en dos grandes grupos, los métodos de ataque fuerte y los de ataque moderado o débil.

III.1.4.1. Digestión parcial fuerte

Entre los métodos parciales encontramos los de ataque fuerte, que generalmente emplean ácidos fuertes, y permiten la disolución parcial de casi todos los elementos excepto los silicatos insolubles⁹⁸. Estos métodos se emplean ampliamente para la

¹⁰⁵ Davidson, Ch.M.; Thomas, R.P.; McVey, S.E.; Perala R.; Littlejohn, D.; Ure, A.M. (1994) *Evaluation of a sequential extraction procedure for the speciation of heavy metals in sediments*. *Analytica Chimica Acta* 291, 277-286.

¹⁰⁶ Sastre, J.; Sahuquillo, A.; Vidal, M.; Rauret, G. (2002) *Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction*. *Analytica Chimica Acta* 462, 59-72.

evaluación de los niveles de contaminación en la monitorización ambiental^{27,42,43,106}. Como ejemplos de reactivos que se utilizan en este tipo de digestión encontramos el ácido nítrico (HNO₃), el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) o combinación de ambos, el agua regia, el ácido sulfúrico (H₂SO₄) y el ácido perclórico (HClO₄) entre otros^{27,107,108,109,110}.

El HNO₃ es muy utilizado para la descomposición de la materia orgánica, debido a que es un agente oxidante fuerte. Se usa comúnmente para descomponer sulfuros, seleniuros, telurios, arseniuros y sulfoarseniuros mediante la degradación oxidativa⁹⁹. No es efectivo en la disolución de óxidos de Mn y Fe, y en ocasiones se usa en presencia de H₂SO₄, el cual degrada parcialmente al material más resistente por el aumento de la temperatura de ebullición⁹⁹. Sin embargo, la relativa alta densidad de este ácido, junto a la del ácido fosfórico, por ejemplo, puede introducir interferencias en el análisis mediante las técnicas de la emisión y absorción atómica, que son fácilmente evitables con otros ácidos. Por esta razón también se usa el ácido nítrico con HClO₄, que continúa la oxidación después de ser eliminado el nítrico, y con el H₂O₂ por sus propiedades oxidantes, contribuyendo a la degradación de la materia orgánica con mayor rapidez y evita las mencionadas interferencias⁹⁸.

Algunos autores han empleado el HNO₃ concentrado para estimar la concentración total extraíble de metales en los sedimentos y poder realizar comparaciones con otros métodos de digestión más débiles⁸⁵.

III.1.4.2. Digestión parcial débil

Los métodos parciales débiles son usados para simular en el laboratorio la transferencia natural de los elementos desde la muestra hacia otro compartimento del medio ambiente. Por ejemplo, para estudiar la asimilación de elementos trazas desde el suelo hacia la planta, así como para conocer la fracción del elemento que se

¹⁰⁷ USEPA, 1996. *Acid digestion of sludges, solids and soils*, USEPA 3050B, In SW-846 Pt 1. Office of Solid and Hazardous Wastes, USEPA, Cincinnati, OH.

¹⁰⁸ ISO, 1995. *Soil quality, extraction of trace elements soluble in aqua regia*, ISO 11466.3.

¹⁰⁹ DIN, Januar 1983. *Deutsche norm: Schlamm und Sedimente (gruppe S)*, DIN 38414, Teil 7.

¹¹⁰ AS 4479.2—1997. Australian Standard. Analysis of soils Part 2: Extraction of heavy metals and metalloids from soil by aqua regia—Hotplate digestion method.

podiera liberar desde el sedimento como consecuencia de cambios que ocurran en el medio, tales como la variación del pH. Son por ello, los métodos más adecuados para estudiar la biodisponibilidad de los metales en los sedimentos.

Entre los reactivos más comunes en este tipo de digestión podemos encontrar el ácido clorhídrico (HCl) a diferentes concentraciones y el ácido acético (HOAc), además de algunas sales entre las que se destacan el cloruro de potasio (KCl), el nitrato de amonio (NH_4NO_3), el cloruro de aluminio (AlCl_3), y algunos agentes quelatantes, tales como el cloruro de calcio (CaCl_2), el ácido etilendiaminotetraacético (AEDT), y el ácido dietilentriaminopentaacético (ADTP), empleados para disolver determinadas fracciones de suelos y sedimentos^{111,112}. Otras digestiones débiles que se recogen en la literatura incluyen reactivos enzimáticos, tales como la pepsina, la tripsina y la proteinasa K, pero estos últimos serán analizados en detalle en el capítulo siguiente. Para nuestro estudio, centraremos la atención en este capítulo en el HCl y el HOAc y otros estudios comparativos de las extracciones químicas y sus correlaciones con los organismos marinos.

III.1.4.2.1. Ácido clorhídrico

El HCl es el ácido más empleado, dentro del grupo de los halogenuros de hidrógeno, para la disolución de muestras geológicas. Disuelve a los carbonatos, fosfatos, boratos y sulfatos, con excepción de la barita, así como solubiliza los sulfuros volátiles ácidos (AVS por sus siglas en inglés). Además, es mejor disolvente que el ácido nítrico para el Fe y el Mn asociados a los sedimentos, debido a su propiedad reductora y a la capacidad del anión Cl^- para formar complejos⁹⁹.

El ácido clorhídrico diluido es uno de los reactivos utilizados para disolver la fase no silicatada de una variedad de sólidos del medio ambiente. Para ello se han propuesto diversas condiciones experimentales, variando la concentración del HCl y el tiempo de

¹¹¹ Rao, C.R.M; Sahuqillo, A.; Lopez Sanchez, J.F. (2008) *A review of the different methods applied in environmental geochemistry for single and sequential extraction of trace elements in soils and related materials*. Water, Air, & Soil Pollution 189, 291–333.

¹¹² Rauret, G. (1998) *Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment*. Talanta 46, 449-455.

extracción. Así se encuentran ejemplos que varían desde 0,5, 1 y 24 horas de extracción, y concentraciones de 0,05 M y 1 M^{75,100,113,114}. Este ácido diluido ha sido propuesto para satisfacer los requerimientos esenciales de la disolución mínima de los silicatos detríticos⁷⁵, y para predecir la biodisponibilidad de los metales en diferentes especies de invertebrados marinos¹¹³.

Su uso en estudios de biodisponibilidad en sedimentos se debe a que está naturalmente presente en los jugos gástricos de especies marinas y es conocido que entre sus principales funciones está la de activar la coenzima de la pepsina, favoreciendo de esta manera el proceso digestivo. Por esta razón, el HCl ha sido también empleado para estudios de liberación de drogas simulando la digestión en humanos¹¹⁵. En el caso de los peces, el pH del estómago puede variar entre 2 - 5 dependiendo del tiempo transcurrido desde la ingestión del alimento. Aunque en ayunas, el pH del estómago puede ser de hasta 1¹¹⁶. Sin embargo, son pocos los trabajos encontrados que emplean el HCl para estudiar la desorción de los metales simulando las condiciones de digestión gástrica de organismos acuáticos. En los trabajos revisados, prácticamente todos se encuentran enfocados a especies detritívoras u organismos filtradores.

Entre ellos podemos mencionar el trabajo de Luoma y Bryan, en el cual realizan un estudio comparativo entre la concentración de Pb en los tejidos blandos del organismo detritívoro *Scrobicula plana* y las características físico-químicas de los sedimentos estuarinos de Inglaterra y Francia. En este trabajo concluyen que la biodisponibilidad de este metal está controlada fundamentalmente por el Fe, pudiendo predecirse esta concentración en bivalvos a partir de la relación Pb/Fe extraída del sedimento con HCl 1 N¹¹⁷.

¹¹³ Ying, W.; Batley, G.E.; Ahsanullah, M. (1992) *The ability of sediment extractants to measure the bioavailability of metals to three marine invertebrates*. The Science of the Total Environment 125, 67-84.

¹¹⁴ McCready, S.; Birch, G.F.; Taylor, S.E. (2003) *Extraction of heavy metals in Sydney Harbour sediments using 1M HCl and 0.05M EDTA and implications for sediment-quality guidelines*. Australian Journal of Earth Sciences 50, 249-255.

¹¹⁵ Castela-Papin, N.; Cai, S.; Vatie, J.; Keller, F.; Souleau, C.H.; Farinotti, R. (1999) *Drug interactions with diosmectite: a study using the artificial stomach-duodenum model*. International Journal of Pharmaceutics 182, 111-119.

¹¹⁶ Guillaume, J.; Kamskik, S.; Bergot, P.; Métailler, R. (2004) *Nutrición y alimentación de los peces y crustáceos*. Ediciones Mundi-Prensa, Capítulo 4. Fisiología digestiva y digestibilidad de los nutrientes en los peces. Pág. 53, 57-73.

¹¹⁷ Luoma, S.N.; Bryan, G.W. (1978) *Factors controlling the availability of sediment-bound lead to the estuarine bivalve Scrobicularia plana*. Journal of the Marine Biological Association, UK 58, 793-802.

En otro trabajo, Bryan y Langston realizan una revisión sobre la biodisponibilidad, la acumulación y los efectos de los metales en los sedimentos de estuario del Reino Unido¹¹⁸. En la misma plantean que se han encontrado correlaciones entre el Sn en las almejas y el Sn inorgánico de los sedimentos extraído por el HCl 1 N, así como que la concentración de Cr en dos especies detritívoras es directamente proporcional al Cr total en el sedimento.

Por otra parte, Turner y *col.*, estudian un método de digestión in Vitro con pepsina, donde uno de los objetivos es el de discriminar si las extracciones son debido a la digestión ácida o enzimática, así como establecer la idoneidad del método estándar con pepsina para el uso habitual en estudios ambientales¹¹⁹. Estos autores plantean que el principal mecanismo de digestión y liberación de metales en sedimentos contaminados, en presencia de la pepsina (tema que se abordará en el siguiente capítulo), es debido a la disolución con HCl de la superficie o del material inorgánico hidrogenado accesible, tales como los óxidos amorfos. También exponen que el mecanismo en presencia de la pepsina provoca la re-adsorción de algunos metales (Al, Cu y probablemente el Fe) a las superficies de las partículas digeridas. Por tanto, plantean que el uso del HCl diluido por sí solo, no proporciona un sustituto adecuado para la digestión biológica del sedimento contaminado, siendo necesaria la presencia de algunas enzimas que se encuentran en el sistema digestivo de los organismos marinos.

En otro trabajo de Turner y Olsen se realiza una comparación de la extracción de Fe, Cu, Mn y Zn, bajo la acción de diferentes reactivos químicos (ácidos y no ácidos), enzimáticos y una extracción con fluido gastrointestinal (GI) de *Pleuronectes Platessa* L. ajustados a pH = 2 y pH = 7 (aGI y GI respectivamente)⁸⁵. Para los metales estudiados, la extracción con HCl fue superior a la obtenida con el resto de los reactivos evaluados, excepto para el Fe, cuya concentración con este ácido fue inferior respecto a la obtenida con el oxalato de amonio, mientras que las concentraciones de Cu y Mn fueron similares entre ambas extracciones. Por otro lado,

¹¹⁸ Bryan, G.W.; Langston, W.J. (1992) *Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review*. Environmental Pollution 76, 89–131.

¹¹⁹ Turner, A., Henon, D.N., Dale, J.L.L., (2001) *Pepsin-digestibility of contaminated estuarine sediments*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 53, 671–681.

con el objetivo de analizar la especiación o localización del Cu y Zn biodisponibles respecto a los óxidos, realizan una normalización de cada uno de estos metales con el Fe y el Mn, concluyendo que la fase receptora dominante de Cu y Zn biológicamente disponible es la de Mn. La justificación la basan en que obtienen menores concentraciones de Cu y Zn cuando están normalizados respecto al Fe con los reactivos ácidos que con el fluido gastrointestinal, mientras que en la relación Cu o Zn/Mn las extracciones ácidas son similares a las gástricas, siendo el Mn más biodisponible que el Fe. Por último, concluyen que el HCl 1 M sobreestima la fracción de Fe lixiviada, puesto que obtiene una extracción del 72 % respecto a la del aGI, y por ende, influye en una mayor extracción de los metales asociados a esta fase, respecto al resto de los métodos comparados.

Por otro lado, Ettajani y Amiard realizan un estudio sobre sedimentos de estuario para evaluar la biodisponibilidad de Ag, As, Cd, Cu, Pb y Zn en primavera y verano⁹⁰. Para ello sometió los sedimentos a tratamientos teniendo en cuenta diferentes salinidades, el pH, para este último con HCl 0,1 N (pH encontrado en el tracto digestivo de los bivalvos) y la acción de las enzimas digestivas principales de los organismos detritívoros en sedimentos colectados en dos estaciones, primavera y verano. El primer resultado al que arriban es que la desorción de los metales con HCl varía dependiendo de las estaciones y son relativamente superiores en primavera, tanto en los sedimentos del fondo como en los superficiales, de manera general, siendo más importantes esta diferencia para Cd, As y Pb.

III.1.4.2.2. Ácido acético (HOAc)

El ácido acético es uno de los métodos de digestión más empleados para extraer los metales más débilmente enlazados al sedimento, y según varios autores, es un buen estimador de la contaminación antropogénica debido a que disuelve las fases más lábiles del sedimento^{27,42,102,120,121}. El empleo de este método con HOAc, definido

¹²⁰ Sahuquillo, A.; Rigol, A.; Rauret, G. (2003) *Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments*. Trends in Analytical Chemistry 4, 152-159.

operacionalmente, se basa en la liberación de los metales débilmente enlazados en posiciones de intercambio iónico, compuestos amorfos de Fe y Mn, carbonatos y los metales débilmente asociados a la materia orgánica, fases a las que se asocian los metales de origen antropogénico. Así, este método deja intacta la red cristalina y los minerales de Fe y Mn más resistentes y algunos compuestos orgánicos¹²¹. Las concentraciones más utilizadas en la literatura para estudios de lixiviación de metales con HOAc son 0,11 M, correspondiendo a la primera etapa del método de digestión secuencial propuesto por la Oficina Comunitaria de Referencia (BCR por sus siglas en inglés)^{43,86,122,123}, 0,43 M^{123,124}, y el 25 %^{27,85,102,121}.

De la misma manera en la que se han encontrado pocos trabajos que estudien la desorción de metales simulando condiciones de pH del tracto gastrointestinal de especies marinas con ácido clorhídrico, también son pocos los trabajos que muestran esta clase de estudios con el HOAc o que realicen comparaciones de alguno de estos métodos con la lixiviación obtenida por métodos que simulen las condiciones de digestión de dichas especies.

Entre ellos, el trabajo de Turner y Olsen, mencionado anteriormente, donde se plantea que el ácido acético al 25 % es el que mejor representa la fracción biodisponible respecto a la obtenida con el contenido gastrointestinal estudiado para el Mn, y por tanto, para el Cu y Zn por encontrarse presumiblemente asociados a esta fase. Ellos deducen que este comportamiento es probablemente debido a que la tendencia reductora del ión acetato es muy cercana a la de las enzimas naturales, así como porque el pH del HOAc al 25 % (pH = 1,73) es similar al encontrado generalmente en las condiciones gástricas⁸⁵. Por otra parte, Bignasca y *col.* realizan dos estudios comparativos de diversos métodos de digestión, entre los que se encuentra la primera etapa del BCR⁸⁶. Para el primer estudio se comparó la concentración de metales obtenida por la pepsina sin activar, es decir, en ausencia de HCl, frente al método del

¹²¹ Loring, D.H.; Rantala, R.T.T. (1992) *Manual for the geochemical analyses of marine sediments and suspended particulate matter*. Earth-Science Reviews 32, 235-283.

¹²² Quevauviller, Ph.; Rauret, G.; López-Sánchez, J.-F.; Rubio, R., Ure, A.; Muntau, H. (1997) *Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure*. The Science of the Total Environment 205, 223-234.

¹²³ Cappuyns, V.; Swennen, R. (2008) "Acid extractable" metal concentrations in solid matrices: A comparison and evaluation of operationally defined extraction procedures and leaching tests. *Talanta* 75, 1338-1347.

¹²⁴ Ure, A.M. (1996) *Single extraction schemes for soil analysis and related applications*. The Science of the Total Environment 178, 3-10.

HOAc 0,11 M. En este caso, las movilidades de la pepsina y el HOAc 0,11 M son muy similares y diferentes al resto de los métodos evaluados, presumiblemente debido a la ausencia de medio ácido. En el segundo caso evaluaron la movilidad de tres métodos de digestión enzimáticos (pepsina/HCl, proteasa k y tripsina en una disolución reguladora de H₃PO₄/NaOH pH = 7,5) con la obtenida a partir de la primera etapa del BCR, observando que las concentraciones obtenidas con la pepsina son iguales o superiores para algunos metales que las extraídas por el HOAc. A partir de ambos resultados, los autores concluyen que la liberación de los metales en los sedimentos está definida fundamentalmente por el pH ácido del medio de la enzima activada, siendo cercano a 1 en la enzima y de 2,8 para el HOAc 0,11 M⁸⁶.

Una vez realizada la disolución de la muestra de sedimento se hace necesaria la detección y cuantificación de los metales presentes en dicha disolución, es por ello que se emplean diferentes técnicas analíticas para la determinación de los metales.

III.1.5. Técnicas analíticas empleadas para la determinación de metales

Las técnicas analíticas que se emplean con mayor frecuencia son la Espectroscopía de Absorción Atómica (**EAA**), en cualquiera de sus variantes: con llama, por generación de hidruros u horno de grafito, y la Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado por Inducción (ICP-MS) o la Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-AES)^{125,126,127,128}, todas de gran exactitud, bajos límite de detección y reproducibilidad, pero con el inconveniente de ser técnicas destructivas

¹²⁵ Sastre, J.; Sahuquillo, A.; Vidal, M.; Rauret, G. (2002) *Determination of Cd, Cu, Pb and Zn in environmental samples: microwave-assisted total digestion versus aqua regia and nitric acid extraction*. Analytica Chimica Acta 462, 59-72.

¹²⁶ Klemm, W.; Bombach, G. (1995) *Trace element determination in contaminated sediments and soils by ultrasonic slurry sampling and Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometry*. Fresenius Journal Analytical Chemistry 353, 12-15.

¹²⁷ Prichard, E.; Mackay, G.M. (1996) *Inorganic analytes, sample preparation in trace analysis: A structured approach to obtaining reliable results*, Chapter 3. J. Points, Royal Society of Chemistry, Cambridge.

¹²⁸ Arpadjan, S.; Vuchkova, L.; Kostadinova, E. (1997) *Sorption of arsenic, bismuth, mercury, antimony, selenium and tinon dithiocarbamate loaded polyurethane foam as a preconcentration method for their determination in water samples by simultaneous inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and electrothermal atomic absorption spectrometry*. Analyst 122, 243-246.

y además, tienen la necesidad de transformar las muestras sólidas a líquidas antes de ser analizadas¹²⁹.

III.1.5.1. Espectrometría de Absorción Atómica

La Espectrometría de Absorción Atómica es una técnica que permite determinar la concentración de más de 62 metales diferentes en una disolución. Aunque esta técnica fue descubierta alrededor del siglo XIX, la forma moderna se desarrolló principalmente durante la década de los 50.

La técnica se basa en que los electrones de los átomos gaseosos pueden ser promovidos a orbitales de mayor energía mediante la absorción de radiación electromagnética a una determinada longitud de onda. Esta longitud de onda se refiere específicamente a una transición de electrones en un elemento en particular, y por lo general, cada longitud de onda corresponde a un solo elemento. La cantidad de energía absorbida se relaciona con la cantidad de átomos del elemento mediante la ley de Lambert- Beer, pudiendo por tanto, realizar análisis cuantitativos.

Para determinar los constituyentes atómicos de una muestra primeramente es necesario atomizarla para obtener átomos en estado gaseoso que puedan absorber la radiación. Para poder atomizar una muestra en absorción atómica, frecuentemente se usa una llama, pero también existen otros atomizadores, tales como el horno de grafito.

La Espectrometría de Absorción Atómica (**EAA**) es una técnica muy difundida, por tanto permite la comparación de resultados, tiene un costo razonable y su manipulación instrumental es sencilla. Presenta pocas interferencias espectrales, las cuales están bien caracterizadas, además de buena sensibilidad y precisión^{130,131,132}. Entre las desventajas en el caso de la llama podemos mencionar los elevados límites

¹²⁹ Sneddon, J., Hardaway, C., Bobbadi, K. and Reddy, A. (2006) *Sample preparation of solid samples for samples for metal determination by atomic spectroscopy-An overview and selected recent applications*. Applied Spectroscopy Reviews 41, 1-14.

¹³⁰ Rucandio, I. (1997) *La espectrometría de absorción atómica y sus aplicaciones medioambientales. Medidas de contaminantes inorgánicos ambientales*. CIEMAT. España.

¹³¹ Tsalev, D.L.; Dedina, J. (1995) *Hydride generation atomic absorption spectrometry*. Wiley.

¹³² Robinson, J. W. (1996) *Atomic spectroscopy*. Second Ed. Marcel Dekker, Inc. New York. ISBN 0-8247-9742-6.

de detección, en ocasiones superiores a los que se encuentran en las muestras a analizar. Por regla general, no permite la determinación simultánea de elementos. Ya para finales del siglo XX se introduce el uso de la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica con fuente de radiación continua. La principal modificación consiste en el empleo de una lámpara de arco de Xe en lugar de las de cátodo hueco tradicionales, así como un sistema de monitoreo continuo de emisiones entre 190 y 850 nm, que permite una determinación analítica multielemental. Este tipo de equipo de EAA presenta mejoras significativas respecto a los equipos tradicionales. Entre las ventajas de esta técnica se puede mencionar la mejora de la estabilidad de la señal. Este aspecto combinado con la radiación de mayor intensidad de la lámpara de Xe, provoca que se obtenga señal en niveles más bajos de los analitos, conllevando a una mejora de los límites de detección. Como segunda y tercera ventajas podemos mencionar la mejora en la corrección de fondo y la ampliación del rango lineal respectivamente. Permite además determinar elementos no metálicos debido a su potencial de controlar las líneas moleculares y por último, sólo se emplea una lámpara¹³³. Es una técnica que se está utilizando para la determinación de metales en diferentes tipos de muestras, entre las que destacan fertilizantes, petróleo, polímeros y alimentos entre otras^{134,135,136,137}.

¹³³ Resano, M.; Rello, L.; Flórez, M.; Belarra, M.A. (2011) *On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines*. Spectrochimica Acta Part B 66, 321–328.

¹³⁴ Maranhão, T.A.; Silva, J.S.A.; de Andrade, R.M.; Bascuñan, V.L.A.F.; de Oliveira, F.J.S.; Curtius, A.J. (2012) *Determination of As and Hg in acetic acid extract by vapor generation coupled to atomic spectrometry for solid waste classification*. Microchemical Journal, <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.06.001>.

¹³⁵ Nunes, A.M.; Acunha, T.S.; Oreste, E.Q.; Lepri, F.G.; Vieira, M.A.; Curtius, A.J.; Ribeiro, A.S. (2011) *Determination of Ca, Cu, Fe and Mg in Fresh and Processed Meat Treated with Tetramethylammonium Hydroxide by Atomic Absorption Spectrometry*. Journal of Brazilian Chemical Society 22, 1850-1857.

¹³⁶ Resano, M.; Briceño, J.; Belarra, M.A. (2009) *Direct determination of Hg in polymers by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry. A comparison of the performance of line source and continuum source instrumentation*. Spectrochimica Acta Part B 64, 520–529.

¹³⁷ Freire, A.S.; Santelli, R.E. (2012) *Trace elements determination in high salinity petroleum produced formation water by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry after matrix separation using Chelex-100® resin*. Spectrochimica Acta Part B 71-72, 92-97.

III.1.5.2. Espectrometría de Emisión Atómica con Plasma Acoplado por Inducción

La Espectrometría de Emisión Atómica es una técnica espectroscópica que analiza las longitudes de onda de los fotones emitidos por los átomos durante su transición desde un estado excitado hacia un estado inferior de energía. Cada elemento emite un conjunto característico de longitudes de onda discretas en función de su estructura electrónica.

La espectrometría de emisión se desarrolló a finales del siglo XIX, y los esfuerzos teóricos por explicar los espectros de emisión atómica condujeron a la mecánica cuántica. La espectrometría de emisión atómica también suelen llamarla espectrometría de emisión óptica, debido a la naturaleza de la luz que emite.

Las técnicas que emplean plasmas acoplados por inducción, pueden realizar una rápida y multielemental determinación en las muestras. También presentan mejores límites de detección que la absorción atómica con llama, mayor estabilidad, mayor sensibilidad y mayor capacidad de excitación de los espectros atómicos e iónicos gracias a las altas temperaturas que alcanzan. Por otro lado, es una técnica de detección simultánea de más de 20 elementos. En la actualidad los costos de los Espectrómetros de Emisión Atómica con Plasma Acoplado por Inducción se han reducido considerablemente a niveles competitivos, aunque continúa siendo relativamente menos económica que los sistemas más simples de absorción atómica con llama.

III.1.5.3. Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado por Inducción

La espectrometría de masas con plasma acoplado por inducción es una técnica de análisis inorgánico capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la Tabla Periódica. También se puede decir que es una variante de las técnicas de análisis por espectrometría de masas. Su principal característica es que posee unos límites de detección para la mayoría de los elementos que la hace ideal para el

análisis de elementos traza. Los límites de detección se encuentran en el intervalo de la partes por trillón, generalmente 2 - 3 órdenes de magnitud menores que con ICP-AES. Por otra parte, el espectro de masa inorgánico es más sencillo y fácil de interpretar. Otra de sus ventajas radica en su alta precisión cuando se emplean adecuadamente los métodos de estandarización interna, siendo una técnica rápida y multielemental, además de permitir detectar más de un isótopo del mismo elemento¹³⁸. Esta técnica combina dos propiedades analíticas que la convierten en un potente instrumento en el campo del análisis de trazas multielemental. Por un lado, obtiene una matriz con menos interferencias debido a la eficiencia de ionización del plasma de Ar y por otro lado, presenta una alta relación señal-ruido característica en las técnicas de espectrometría de masas. Sin embargo, como desventaja podemos mencionar que el gas utilizado en el plasma puede provocar la formación de especies poliatómicas que interfieren en la determinación.

A modo de conclusión podemos decir que se conocen muchos métodos de digestión que permiten evaluar la biodisponibilidad de los metales en los sedimentos, sin embargo, pocos de ellos han sido empleados de manera tal que simulen las condiciones digestivas de las especies marinas. Algunos de los trabajos analizados concluyen que el pH del medio es el factor fundamental que influye en la extracción de los metales, aunque por sí sólo el HCl puede llegar a subestimar la concentración de Fe y por tanto, la de aquellos metales enlazados a esta fracción. A continuación se expone el estudio comparativo de la eficiencia de extracción de varios métodos de digestión que emplean reactivos químicos sobre los catorce metales en sedimentos considerados en la presente tesis. En un capítulo posterior se evaluarán otros métodos de extracción enzimática.

¹³⁸ Cocherie, A.; Robert, M. (2007) *Direct measurement of lead isotope ratios in low concentrations environmental samples by MC-ICP-MS and multi-ion counting*. Chemical Geology 243, 90-104.
70

III.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para evaluar la extracción de los metales por los distintos sistemas químicos estudiados se utilizó una muestra compuesta a partir de diferentes sedimentos tomados en una granja de cultivo intensivo de peces, conocidos por el nombre de dorada, que se encuentra ubicada en la Bahía de Cádiz. Al tratarse de sedimentos que reciben una cantidad moderadamente alta de residuos, fundamentalmente debido a las heces de los propios organismos que allí se cultivan, la concentración de metales en las muestras se esperó que fueran suficientemente altas para permitir el estudio.

Las muestras fueron colectadas con una draga Eckman-Birge (Figura II.2) y ya en el laboratorio fueron tamizadas a 500 μm . Posteriormente fueron secadas a 105° C para el estudio de las condiciones de tamizado y a 40° C para la comparación de la influencia del material de tamiz en la concentración de los metales. Posteriormente, las muestras tamizadas fueron molturadas en mortero de ágata. Finalmente, los sedimentos fueron debidamente almacenados en frascos de polietileno y guardados hasta su análisis.

III.2.1. Estudio sobre la composición mineralógica de la muestra

La composición mineralógica se caracterizó con el objetivo de conocer las fases principales que componen la muestra y se realizó a través de una Difracción de Rayos X (DRX). La DRX se efectuó con un Difractómetro D8 Advance (Bruker) y radiación monocromática Cu K α ($\lambda = 1,54183$) con filtro de Ni, fijando un intervalo angular de 10-110° 2θ , con paso angular de 0,025/ 2θ y un tiempo de conteo de 5 segundos en cada paso.

III.2.2. Análisis de la materia orgánica (MO) de la muestra

Es conocida la relación existente entre la materia orgánica y los metales en los sedimentos, actuando la primera como agente secuestrante de los segundos gracias a

su elevada capacidad de complejación. Este hecho es de suma importancia en las zonas donde los aportes de materia orgánica a los sedimentos pueden ser abundantes, tal y como sucede en las zonas de cultivos acuícolas como la que se estudia en el presente trabajo. Existen varias metodologías para la determinación de la materia orgánica: 1. Mediante la cuantificación del Carbono Orgánico Total (COT), 2. Por la determinación de la materia volátil, también llamada pérdida por ignición (LOI por sus siglas en inglés) y 3. La llamada otra materia orgánica (OMO), que es la diferencia entre el LOI y el COT ($OMO = LOI - COT$)⁷³.

En este caso, la MO se determinó en el sedimento mediante el análisis de la LOI y de COT. Para el primero de los casos se puso en una mufla aproximadamente 1 g de muestra de sedimento durante 3 horas a 500° C. El valor de materia orgánica se calculó mediante la diferencia de peso de la muestra antes y después de la calcinación. Para determinar el Carbono Orgánico Total (COT) se utilizó un equipo analizador que mide el carbono total (CT), donde el COT se obtiene por la diferencia entre el CT obtenido antes y después de eliminar el carbono inorgánico mediante la adición de HCl concentrado gota a gota a las muestras de sedimentos secos y previamente pesados (entre 200-400 mg). Cada muestra fue analizada por duplicado.

III.2.3. Métodos de digestión de la muestra de sedimento

En primer lugar se realizó una digestión total de la muestra basada en la modificación del método EPA 3052 anteriormente mencionada cuya confiabilidad fue evaluada con una muestra de referencia certificada como se explicó en el capítulo II. De este modo es posible evaluar los contenidos totales de los metales de la muestra en estudio y realizar las comparaciones del porcentaje de extracción obtenidos con otras metodologías respecto al total. Posteriormente se compararon las eficiencias de extracción de diferentes métodos de digestión parciales débiles que podrían simular las condiciones gástricas de los organismos marinos. En concreto se estudia la extracción bajo diferentes condiciones con HCl. Este ácido se escogió debido a que es el que se encuentra naturalmente en el sistema digestivo de los organismos marinos.

Posteriormente se comparó la eficiencia de extracción del HCl con otros ácidos, el HOAc y el HNO₃.

Todas las digestiones de este capítulo se realizaron por triplicado y con su respectivo blanco de digestión.

La concentración extraída por los métodos parciales fue determinada mediante un espectrómetro de masa con plasma acoplado por inducción (ICP-MS) y adición de estándar interno de Ga-Rh-Bi y con gas CCT (1 % amoníaco y el resto de helio) para la corrección del efecto de matriz.

III.2.3.1. Digestión con ácido clorhídrico (HCl)

Para realizar este estudio se prepararon seis disoluciones de HCl con pH de 1 a 6. Este rango fue seleccionado debido a que abarca el espectro de pH que se puede encontrar en el estómago de algunas especies marinas¹¹⁶. Para realizar la extracción se adicionaron 25 ml de cada disolución de HCl a 0,25 g de sedimento en un reactor de politetrafluoretileno. Posteriormente los reactores se agitaron mecánicamente a una temperatura y durante un tiempo dentro del intervalo estudiado para cada parámetro y las muestras parcialmente digeridas fueron filtradas al vacío con un filtro de acetato de celulosa de diámetro de poro de 0,45 µm. De esa disolución se tomaron aproximadamente 23 ml y se enrasó en 25 ml. Finalmente el filtrado fue reservado en frascos de polietileno hasta su análisis.

Siguiendo esta metodología se realizaron estudios a temperaturas de extracción de 10°, 20° y 40° C y los tiempos de extracción de 1, 12 y 24 horas.

III.2.3.2. Digestión con ácido nítrico

La extracción con ácido nítrico se realizó siguiendo la metodología que se expone a continuación. Se pesaron aproximadamente 0,25 g de muestra de sedimento y se colocaron en un reactor de PTFE. Seguidamente se adicionaron 25 ml de HNO₃ a pH = 1 y se dejó en agitación mecánica durante 12 horas a 40° C. Finalmente, las

muestras digeridas fueron filtradas siguiendo la misma metodología utilizada para el HCl.

III.2.3.3. Digestión con ácido acético

En este caso se siguieron dos métodos de digestión diferentes. En el primer caso, se usó una concentración de ácido acético (HOAc) 0,11 M, siendo este procedimiento similar a la primera etapa del método de extracción secuencial de tres etapas BCR^{42,86,122}. Para llevarlo a cabo se pesaron 0,25 g de sedimento y se trasvasaron a un reactor de PTFE. Posteriormente se adicionaron 25 ml de HOAc 0,11 M y se agitó mecánicamente durante 10 horas a 40° C. El pH final de esta disolución fue de 2,87.

Para la segunda extracción (HOAc 25 %), el procedimiento es similar al utilizado por Turner y Olsen⁸⁵. Se pesaron 0,25 g de sedimento seco aproximadamente y se colocaron en un reactor de PTFE. Posteriormente se agregaron 25 ml de la disolución de HOAc y se agitó mecánicamente durante 16 horas y a 40° C. El pH final de esta disolución es igual a 1,73.

Las muestras digeridas por ambos métodos fueron filtradas siguiendo la misma metodología empleada para el método de HCl. Finalmente, las disoluciones filtradas fueron reservadas en frascos de polietileno hasta su análisis.

III.2.4. Análisis estadístico de los resultados

Para todos los metales estudiados se calculó la concentración media de tres réplicas de digestión en cada condición experimental, sus respectivas desviaciones estándar e intervalos de confianza ($\alpha = 0,05$, $n = 3$) para realizar las comparaciones estadísticas.

En primer lugar se realizó un ANOVA para la evaluación del efecto de las diferentes condiciones de pH, tiempo y temperatura, en todo el intervalo de variación de cada variable, sobre la extracción de metales en el método de HCl. Previamente se comprobó si las muestras cumplían con la normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homogeneidad de varianza (prueba de Levene). Todos los metales cumplieron con la normalidad, excepto el Fe y Li. El Li cumplió con la normalidad

mediante el empleo de la raíz cuadrada de la concentración, y el Fe a través de la transformación logarítmica. Posteriormente al análisis de la varianza, en el caso de que los factores estudiados mostraran diferencias significativas sobre la variable, se aplicó la prueba de Tukey para encontrar dónde se encontraban esas diferencias. Estas pruebas se realizaron empleando el programa Statistica 8. Además, se realizó un Análisis de Componentes Principales (ACP) para evaluar la capacidad de extracción del método con HCl en las diferentes condiciones experimentales. Antes de realizar el análisis, los valores de concentración no detectados fueron reemplazados por la mitad de su correspondiente límite de detección^{77,139}.

La evaluación estadística demostró altos coeficientes de correlación entre todas las variables estudiadas, la prueba de Bartlett (cuyo nivel de significación fue 0.000) y la prueba de Kaiser-Meyer-Olkin indicaron la conveniencia de realizar un análisis de reducción de la dimensionalidad por medio del Análisis de Componentes Principales (ACP)¹⁴⁰. El ACP se realizó inicialmente sin rotación, con dos y tres nuevas componentes, y en los casos que fueron necesarios, se aplicó además la rotación Varimax para facilitar la interpretación de los datos mediante una mejor definición de las variables originales sobre las nuevas componentes principales. La significación de los autovalores de cada componente se evaluó según el principio de Kaiser, en el cual se aceptan aquellas componentes con autovalores >1. Las cargas se consideraron significativas cuando fueron >0,6^{77,141}.

Las nuevas componentes también fueron seleccionadas basadas en la variabilidad explicada de los datos^{141,142}. Las cargas fueron consideradas para evaluar el impacto de las variables originales en las nuevas componentes, mientras que las puntuaciones de las nuevas componentes principales seleccionadas fueron empleados para evaluar las similitudes y las diferencias entre los casos estudiados.

¹³⁹ Petrovic, D.; Todorovic, M.; Manojlovic, D.; Krsmanovic, V.D. (2009) *Speciations of Trace Metals in the Accumulation Bogovina on the Crni Timok River*. Polish Journal of Environmental Studies 18, 873-884

¹⁴⁰ Cela, R. (1994). *Avances en Quimiometría Práctica*. Ed. Univ. Stgo. de Compostela.

¹⁴¹ DelValls, T.A.; Forja, J.M.; González-Mazo, E.; Gómez-Parra, A.; Blasco, J. (1998) *Determining contamination sources in marine sediments using multivariate analysis*. Trends in Analytical Chemistry 17, 181-192.

¹⁴² Arambarri, I.; Garcia, R.; Millan, E. (2003) *Assessment of tin and butyltin species in estuarine superficial sediments from Gipuzkoa, Spain*. Chemosphere 51, 643-649.

Finalmente se realizó un análisis de conglomerados para corroborar los resultados obtenidos por el ACP. Para ello se utilizó el método de la vinculación intergrupos y la distancia euclídea. El ACP y el análisis de conglomerados se realizaron empleando el programa SPSS 16 para Windows.

III.3. RESULTADOS

III.3.1. Caracterización de la muestra

La muestra de sedimentos a utilizar en los estudios posteriores se caracterizó mediante el análisis de su composición mineralógica, de los contenidos totales de los catorce metales estudiados y del contenido de MO.

III.3.1.1. Composición mineralógica

En primer lugar, la composición mineralógica de la muestra de sedimentos se caracterizó mediante Difracción de Rayos X, mostrándose el difractograma obtenido en la Figura III.3.

Como puede apreciarse, las fases fundamentales son el cuarzo (SiO_2), la calcita (CaCO_3) y la mica. El cuarzo representa alrededor del 53 % de la composición mineralógica, mientras que la calcita representa cerca del 36 % y la mica el 11 %. Estos resultados concuerdan con los propuestos por Achab y Gutiérrez, donde concluyen que el cuarzo es el mineral más importante en los sedimentos de la Bahía de Cádiz, con cerca de un 62 % y se concentra fundamentalmente en la fracción más fina. Además plantean que a pesar del carácter siliciclástico de los sedimentos de la Bahía, los mismos presentan un contenido medio de carbonatos, alrededor del 23 %, así como que la calcita es el mineral predominante en la fracción de carbonatos, siendo el segundo mineral más abundante en la Bahía después del cuarzo. Por último, también los autores refieren que otro componente terrígeno en la Bahía de Cádiz es la

mica, mineral que se concentra en las sub-fracciones más finas y están prácticamente ausentes en las fracciones más gruesas, aunque presentando poca abundancia¹⁴³.

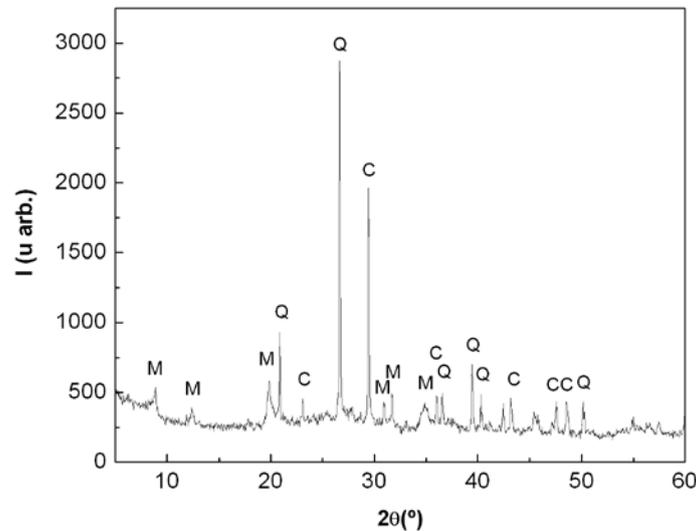


Figura III.3. Diffractograma de la muestra de sedimento. M: Mica, C: Calcita y Q: Cuarzo.

III.3.1.2. Contenidos totales de metales

Respecto a la concentración total de metales en la disolución del sedimento, en la Tabla III.1 se puede observar que el Al, Fe y Ti constituyen los elementos mayoritarios en esta muestra, mientras que resto de los metales pueden clasificarse como elementos traza.

Es posible que parte del Al, Cr, Fe, Mn, Li, V y Zn pueden encontrarse formando parte de la estructura de la mica que constituye aproximadamente el 20 % de la muestra, tal y como se ha comentado en el apartado anterior¹⁴⁴.

¹⁴³ Achab, M; Gutiérrez, J.M. (2005) *Nature and distribution of the sand fraction components in the Cádiz Bay bottoms (SW-Spain)*. Revista de la Sociedad Geológica de España 18, 133-143.

¹⁴⁴ Pauling, L. (1930) *The structure of the micas and related minerals*. Proceedings of the National Academy of Sciences 16, 123-129.

Tabla III.1. Concentración total de los elementos determinados en la muestra de sedimento.

Elemento	[Metal] \pm s, mg·kg ⁻¹
Al	66342 \pm 11
As	10,8 \pm 0,2
Cd	0,11 \pm 0,01
Co	7,6 \pm 0,5
Cr	85 \pm 2
Cu	25,9 \pm 0,8
Fe	36111 \pm 58
Li	21,5 \pm 0,9
Mn	532 \pm 17
Ni	37 \pm 1
Pb	44 \pm 2
Ti	3692 \pm 13
V	116 \pm 2
Zn	73 \pm 3

III.3.1.3. Materia orgánica

Como ya se conoce, la materia orgánica es una de las fases del sedimento que puede acumular metales en elevada proporción. Por tanto, la evaluación de su concentración resulta imprescindible para los estudios de metales en los sedimentos. En este caso, como ya se ha comentado, se evaluó la concentración de MO como LOI y COT, mostrándose los resultados obtenidos en la Tabla III.2.

Tabla III.2. Materia orgánica (LOI) y carbono orgánico total (COT) determinados en la muestra de sedimento estudiada.

Muestra	LOI (%)	COT (%)
Sedimentos	9,7	1,4

Como se puede observar en la Tabla III.2, el 9,7 % del total de la muestra se corresponde a la materia orgánica (LOI) y sólo el 1,4 % se corresponde con el carbono orgánico, siendo el valor de la LOI moderadamente elevado¹⁴⁵. Este hecho puede relacionarse con la existencia de los cultivos acuícolas, ya que es conocida la relación existente entre la materia orgánica y la presencia de este tipo de actividad económica. En este sentido, Mendiguchía y *col.*, obtienen resultados similares para el contenido de MO en sedimentos tomados en la zona de la Bahía de Cádiz, que reciben el impacto de la granja acuícola⁷⁴. Pawar y *col.* encontraron contenidos similares de MO determinada por LOI en sedimentos cercanos a granjas acuícolas, siendo superiores a los determinados en el punto de control. En el caso de estos autores, el contenido de MO fue de 9,4 y 10,3 % en las zonas de Tashima y Yokota respectivamente¹⁴⁵.

III.3.2. Estudio de métodos químicos para simular el proceso digestivo de los peces

III.3.2.1. Método del ácido clorhídrico

Como se ha comentado anteriormente, la extracción con HCl se realizó en distintas condiciones de pH, temperatura y tiempo de contacto. Para evaluar el efecto que ejerce cada una de estas variables en todo el intervalo estudiado de cada una de ellas sobre el proceso de extracción, se realizó un estudio de análisis de varianza (ANOVA). En la Tabla III.3 se muestran los resultados obtenidos para cada factor estudiado en términos de probabilidad.

Como se puede observar en la Tabla III.3, el efecto de los factores, en el intervalo total de variación de cada uno de ellos, fue significativo para la extracción de todos los elementos, con la excepción del Cd, cuya extracción no presentó diferencia para los distintos tiempos de extracción, pudiendo quizás relacionarse con aspectos experimentales dado los bajos límites de detección de este elemento.

¹⁴⁵ Pawar, V.; Matsuda, O.; Yamamoto, T.; Hsshimoto, T.; Rajendran, N. (2001) *Spatial and temporal variations of sediment quality in and around fish cage farms: A case study of aquaculture in the Seto Inland Sea, Japan*. Fisheries Sciences 67, 619-627.

Tabla III.3. Resultados del ANOVA para los factores estudiados.

Factor	p < 0,05	p > 0,05
pH	Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Se, Ti, V, Zn	-
Tiempo	Al, As, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Ti, V, Zn	Cd
Temperatura	Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Se, Ti, V, Zn	-

Una vez llegado a este punto, se realizó el análisis de los post-hoc empleando la prueba de Tukey para cada uno de los metales, con el objetivo de localizar las diferencias observadas, las cuales se explican a continuación para cada factor.

III.3.2.1.1. Efecto del pH en el porcentaje de extracción

Como cabía esperar, para todos los metales la variación del pH fue significativa independientemente del intervalo de tiempo y temperatura. En la Tabla III.4 se muestran los porcentajes de extracción para los dos primeros pH evaluados a 12 horas y 40° C a modo de ejemplo. Como se puede observar, se obtuvieron comportamientos bien diferenciados dividiéndose los metales principalmente en dos grupos. En el primero de ellos se obtuvo extracción por encima del límite de detección a pH = 1, mientras que para el segundo grupo se obtuvo extracción por encima del límite de detección a solo pH = 1 y pH = 2 para todo el intervalo de tiempo y temperatura evaluados. Como se observa en la Tabla III.4, en el primer grupo encontramos al Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Pb y Zn, mientras que el segundo grupo lo conforman el Li, Mn, Ti y V. No obstante, para estos últimos metales el porcentaje de extracción obtenido a pH = 2 fue mucho menor que a pH = 1, siendo esta disminución mucho más notable en el caso del Mn. Este resultado se corroboró con la prueba de Tukey en el análisis de post-hoc, que mostró que las diferencias se encuentran principalmente entre las concentraciones obtenidas a pH = 1 y el resto de pHs para todo el intervalo de tiempo y temperatura estudiados. Si se continúa el aumento del pH por encima de 2, las concentraciones se encuentran por debajo del límite de detección. Este mismo comportamiento fue observado para el resto de las condiciones

de tiempo (10, 20 y 40^o) y temperatura (1, 12 y 24 horas) estudiadas. El resto de los resultados de extracción a los diferentes tiempos y temperaturas de contacto se muestran en el Anexo 4.

III.4. Efecto del pH en el porcentaje de extracción del HCl (12 horas y 40° C).

Elemento	[Metal], %	
	pH = 1	pH = 2
Al	4,4	< 0,4
As	39,8	< 2,3
Cd	72,7	< 18,2
Co	90,9	< 2,6
Cr	5,9	< 4,8
Cu	51	< 4,6
Fe	8,9	< 1
Li	36,7	<u>5</u>
Mn	92,5	10,5
Ni	32,2	< 3,1
Pb	26,8	< 10,5
Ti	1,6	0,4
V	21,7	16,6
Zn	34,2	< 0,014

Como se puede observar en los porcentajes de extracción obtenidos a pH = 1 los metales más móviles fueron el Mn y Co con una extracción del 92,5 % y 90,9% respectivamente. Por otro lado, el As, Cd, Cu, Li, Ni, Pb, V y Zn muestran elevadas movilidades, mientras que el Al y el Ti fueron los elementos menos extraídos, y consecuentemente los menos móviles con HCl a pH = 1.

III.3.2.1.2. Efecto de la temperatura en el porcentaje de extracción

Para el caso de la temperatura también se observaron diferencias significativas para todos los metales estudiados, fundamentalmente por las extracciones a 10° C, que fueron significativamente diferentes y menores a las dos temperaturas restantes, siendo generalmente menores que el resto de las temperaturas evaluadas. Este resultado lo podemos observar en la Figura III.4, en la cual se muestra el porcentaje de extracción de todos los metales en función de la temperatura y el tiempo para pH = 1. Los resultados para pH = 2 se pueden encontrar en el Anexo 4.

Como se puede apreciar en la Figura III.4, se obtiene menor extracción a 10° C para todos los metales y condiciones, exceptuando el de Pb a 24 horas, que no mostró diferencias entre las extracciones a 10 y 20° C. Por otro lado, en general a 40° C se encontraron las mayores extracciones para los mayores tiempos de extracción, con la excepción del As, Cd y Pb a 12 horas y el As y Cd para 24 horas que no mostraron diferencias significativas entre los resultados a 20° y 40° C. Este resultado fue previamente descrito mediante el análisis de varianza (ANOVA), en el cual se observó que la temperatura presentó diferencia significativa para todos los catorce metales evaluados.

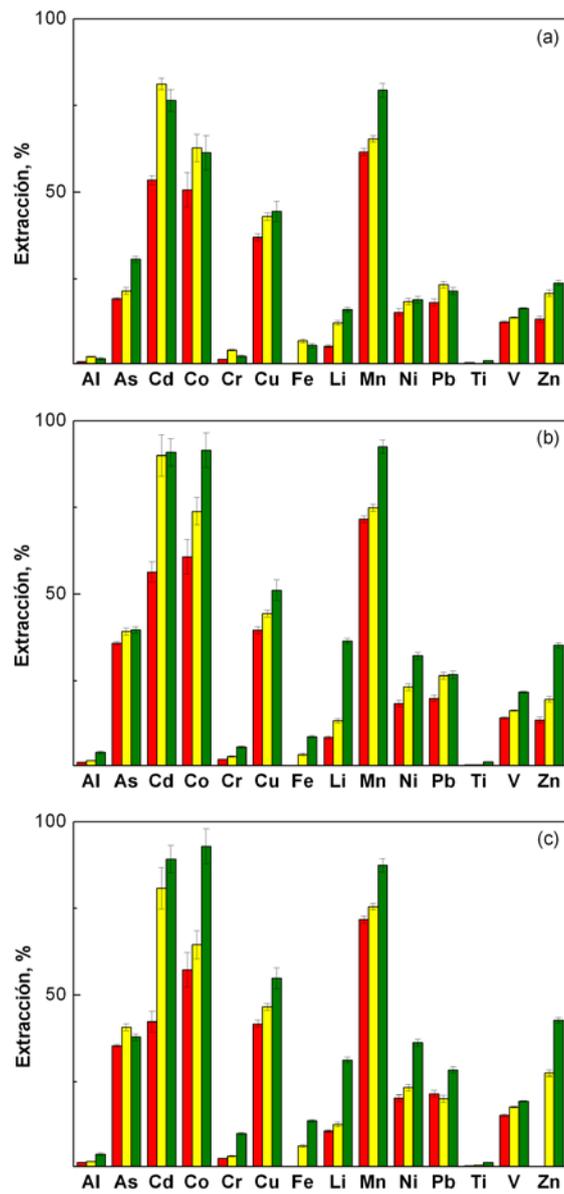


Figura III.4. Variación de la extracción de metales con la temperatura y tiempo para pH = 1. (■): 10° C, (■): 20° C y (■): 40° C y tiempos (a): 1h, (b): 12h y (c): 24h.

III.3.2.1.3. Efecto del tiempo en el porcentaje de extracción

Para el caso del tiempo, como se observa en la Figura III.4, la mayoría de los metales mostró diferencias significativas debido a que para 1 hora de digestión se obtiene una concentración menor al resto de los tiempos estudiados, excepto para el Fe, donde a 10° C no hubo variación de la extracción en el tiempo, debido a que prácticamente no hay extracción (0,2 - 0,3 %). Para el Cd el tiempo no fue significativo, y se debe a que no hubo variación en la extracción entre los tres tiempos para 10°, 20° y 40° C.

Una inspección más detallada de los datos revela que, una vez evaluada la extracción de los metales en función del tiempo y la temperatura se diferencian tres grupos fundamentales.

Para el primer grupo, donde se encuentran la mayoría de los metales (Al, As, Co, Cr, Cu, Li, Mn, Ni, Pb, Ti, V y Zn), la extracción del metal parece ser bifásica, con una liberación inicial rápida durante las primeras 12 horas de digestión, como se observa en la Figura III.5 para el Ni a modo de ejemplo. Pasado ese tiempo, la extracción es mucho más lenta o se detiene su incremento observándose un valor prácticamente similar para las 24 horas de digestión. Este efecto se hace más notable a 40° C. El comportamiento bifásico es similar al observado por Turner y *col.*¹¹⁹ para la extracción de un reducido número de elementos (Cu, Mn y Zn) mediante el empleo de la pepsina en disolución ácida a pH = 1, así como a los resultados obtenidos por Chen y Mayer para Cu y Pb en estudios in vitro usando fluidos digestivos reales extraídos de organismos vivos¹⁴⁶.

¹⁴⁶ Chen Z.; Mayer, L. (1999) *Sedimentary metal bioavailability determined by the digestive constraints of marine deposit feeders: gut retention time and dissolved amino acids*. Marine Ecology Progress Series Ser. 176, 139-151.

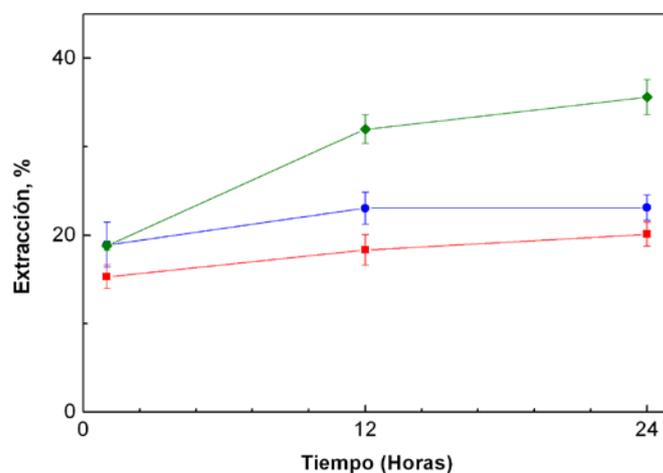


Figura III.5. Variación en la extracción de Ni con el tiempo para diferentes temperaturas: (■): 10° C, (●): 20° C y (◆): 40° C.

En el segundo grupo, donde encontramos al Fe, la concentración aumenta con el aumento del tiempo de digestión, por lo que se hace necesario continuar aumentando el tiempo hasta 24 horas para obtener la máxima lixiviación de Fe, como se puede observar en la Figura III.6. En este caso, el comportamiento bifásico no fue observado, y la extracción aumentó constantemente con el aumento del tiempo. Este mismo comportamiento también fue observado por Turner y *col.* para el Fe¹¹⁹.

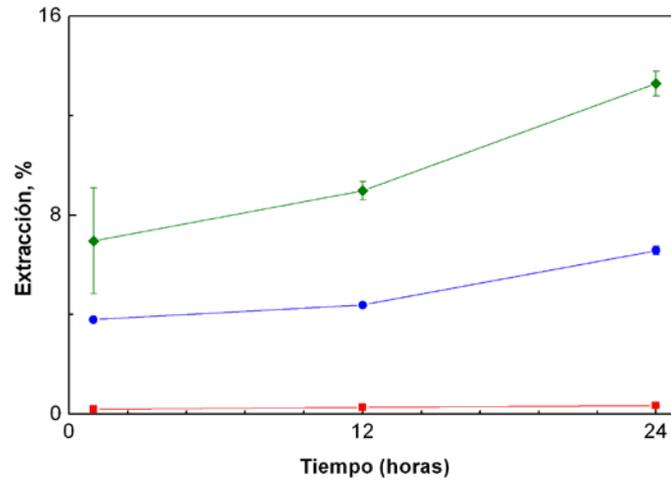


Figura III.6. Variación en la extracción de Fe con el tiempo para diferentes temperaturas de digestión: (■): 10° C, (●): 20° C y (◆): 40° C.

El tercer grupo está compuesto por el Cd, cuya extracción no se ve afectada por la variación del tiempo, como se puede observar en la Figura III.7. En este caso, la extracción varía con la temperatura, como en el resto de los metales estudiados.

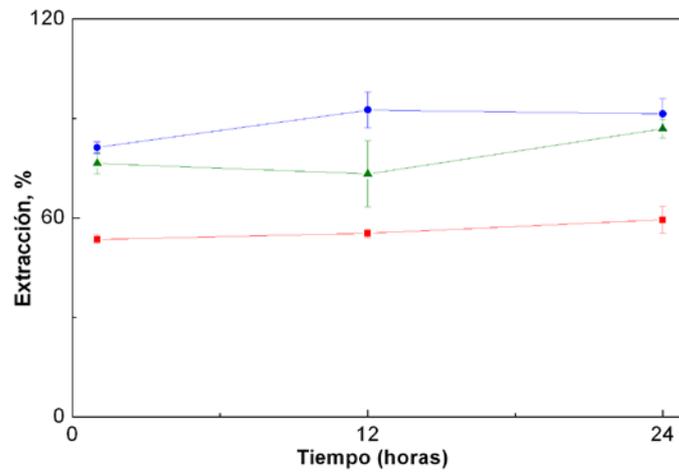


Figura III.7. Variación en la extracción de Cd con el tiempo para diferentes temperaturas: (■): 10° C, (●): 20° C y (◆): 40° C y pH=1.

III.3.3. Estudio multivariado de la extracción en las diferentes condiciones de digestión

Finalmente, la extracción del método de HCl fue analizada como un sistema multifactor mediante un análisis de componentes principales (ACP) para evaluar el efecto de las distintas condiciones sobre los diferentes metales desde un punto de vista conjunto. En este estudio, la concentración de cada uno de los catorce metales (variables originales) es una función de las diferentes condiciones experimentales del tratamiento del sedimento. Las condiciones experimentales son mostradas en la Tabla III.5.

Tabla III.5. Condiciones experimentales de extracción (pH, temperatura y tiempo) evaluados en el ACP.

Condiciones	pH	Temperatura	Tiempo
1	1	10°	1h
2	1	10°	12h
3	1	10°	24h
4	1	20°	1h
5	1	20°	12h
6	1	20°	24h
7	1	40°	1h
8	1	40°	12h
9	1	40°	24h
10	2	10°	1h
11	2	10°	12h
12	2	10°	24h
13	2	20°	1h
14	2	20°	12h
15	2	20°	24h
16	2	40°	1h
17	2	40°	12h
18	2	40°	24h

Para este ACP sólo se consideraron los resultados a pH = 1 y 2, debido a que son los únicos en los que se produjo extracción de los metales. De esta manera, se preparó una matriz de datos (concentraciones) de 14 columnas que corresponden a los catorce metales variables originales: Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Ti, V, Zn y 18 filas correspondientes a cada una de las condiciones experimentales de estudiadas.

Después de la reducción de los variables, se conformaron dos nuevas componentes, componente principal 1 (CP1) y componente principal 2 (CP2) que explican el 94,81 % de la variabilidad total contenida en los datos. En la CP1 se agrupó la mayoría de las variables (con cargas superiores a 0,8), mientras que el Cr comparte su influencia sobre la CP1 (0,729) y CP2 (0,640), pudiéndose observar este resultado en la Tabla III.6.

Tabla III.6. Cargas de las nuevas componentes.

Variable	CP1	CP2
Al	0,968	0,196
As	0,927	-0,326
Cd	0,911	-0,212
Co	0,986	-0,142
Cr	0,729	0,640
Cu	0,975	-0,213
Fe	0,843	0,474
Li	0,824	0,394
Mn	0,965	-0,225
Ni	0,996	-0,009
Pb	0,977	-0,165
Ti	0,930	0,104
V	0,978	-0,189
Zn	0,964	-0,064

Con el objetivo de obtener una mejor definición de las variables en las nuevas componentes, se aplicó una rotación Varimax, después de la cual se conformaron dos componentes principales que explicaron el 94,81 % de la variabilidad total contenida en los datos. En la Tabla III.7 se muestran las cargas de dichas componentes rotadas.

Tabla III.7. Cargas de las nuevas componentes rotadas.

Variable	CP1	CP2
Al	0,678	0,718
As	0,946	0,268
Cd	0,867	0,351
Co	0,888	0,452
Cr	0,227	0,943
Cu	0,919	0,388
Fe	0,416	0,874
Li	0,446	0,797
Mn	0,918	0,373
Ni	0,820	0,566
Pb	0,894	0,428
Ti	0,700	0,621
V	0,908	0,409
Zn	0,825	0,503

En la CP1 se agruparon As, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, V y Zn, mientras que en la CP2 se agruparon el Cr, Fe y Li, los elementos de mayor y menor movilidad respectivamente como se mencionó previamente. Por otro lado, Al y el Ti presentan prácticamente igual peso sobre ambas componentes. Esto pudiera indicar dos fuentes o tipos diferentes de procedencia de ambos metales. En el gráfico de puntuaciones, mostrados en la Figura III.8, se puede observar que todas las condiciones experimentales en las cuales el pH = 2 (de las condiciones 10 a la 18) tienen su peso en el extremo izquierdo sobre la CP1. Mientras que en el extremo opuesto derecho de

la propia CP1 se agruparon el resto de las condiciones experimentales (de la condición 1 a la 9) que corresponden al pH = 1. La inclusión de las variables originales en esta misma figura demuestra que todos los metales se asocian principalmente a las condiciones de extracción de pH = 1, debido a que son éstas las condiciones experimentales con mayor extracción.

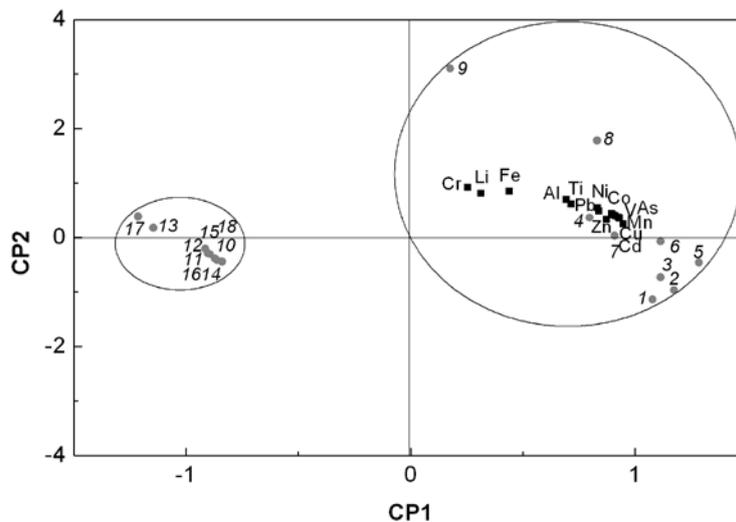


Figura III.8. Cargas y puntuaciones de las condiciones estudiadas en el espacio de las CP1 y CP2.

De los resultados obtenidos se deduce por tanto, que el pH es el parámetro físico químico entre los estudiados, que mayor influencia tiene sobre los resultados, ya que según su valor se realizan las agrupaciones tanto de variables originales (metales) como de condiciones experimentales diferentes estudiadas.

Para estudiar más detalladamente el efecto de las otras variables, tiempo y temperatura, en la extracción de los catorce metales se decidió repetir el ACP sólo para aquellas condiciones de pH = 1, puesto que son las condiciones que producen la extracción de todos los metales.

De esta manera se redujo la matriz de datos anterior de dieciocho a las nueve primeras filas correspondientes a las condiciones de digestión a pH = 1 y manteniendo las mismas catorce columnas de metales ya evaluadas anteriormente. Después de 90

aplicado el ACP se obtuvieron dos nuevas componentes, CP1 y CP2, que explican el 85,86 % de la variabilidad contenida en los datos. En Tabla III.8 se puede observar que se agruparon en la CP1 el Al, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Ti y V, mientras que en la CP2 se agruparon el As con carga positiva y el Cd en el extremo opuesto, con carga negativa. El Zn es el único elemento que comparte pesos similares en ambas componentes. Resulta interesante que el As y Cd, posiblemente los dos más tóxicos de los estudiados, no se agrupen junto al resto de los elementos.

Tabla III.8. Cargas de las nuevas componentes para pH = 1.

Condiciones	CP1	CP2
Al	0,969	-0,131
As	0,363	0,793
Cd	0,397	-0,561
Co	0,957	0,123
Cr	0,907	-0,204
Cu	0,976	0,024
Fe	0,908	-0,280
Li	0,968	0,099
Mn	0,888	0,388
Ni	0,973	-0,143
Pb	0,866	-0,093
Ti	0,812	0,363
V	0,906	0,305
Zn	0,697	-0,616

Una vez definidas las cargas sobre las nuevas componentes, se calcularon las puntuaciones de todas las condiciones de extracción a pH = 1, cuyos resultados se pueden apreciar en la Figura III.9. Prácticamente todos los metales se agrupan con las condiciones de mayor temperatura (40° C) y tiempo de digestión (entre 12 y 24 horas). El As, Cd y Zn se separaron de este comportamiento. El Cd y el Zn tienen menor

carga sobre la CP1 que el resto de los elementos e influyen básicamente con un mayor peso positivo sobre la CP2. Parece ser, por tanto, que después del pH, el factor que mejor define el comportamiento de las variables es la temperatura, puesto que en virtud de este parámetro se realizan los agrupamientos en este segundo ACP, donde la variable pH no ha sido considerada.

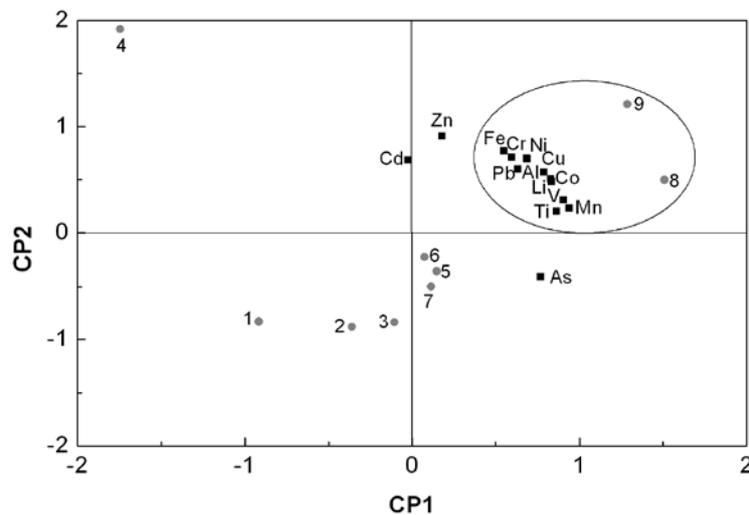


Figura III.9. Puntuaciones de las nuevas componentes para la extracción con HCl a pH = 1.

De manera general, estos resultados confirman el análisis univariado realizado. En general, es el pH la variable que más influye sobre la extracción de los elementos y que aumenta con el aumento del tiempo de digestión y la temperatura en el intervalo estudiado. Este comportamiento es similar para la mayoría de los elementos estudiados.

El resultado del análisis de conglomerados se representa mediante un dendrograma en la Figura III.10, en el cual se confirma el resultado obtenido por el ACP realizado. En este caso se puede observar que el comportamiento se divide en tres grupos. En el primero se agrupan las condiciones experimentales de tiempo y temperatura mayores (8 y 9), las cuales ya mostraban un comportamiento diferente a los otros elementos en

el ACP. En el segundo grupo se encuentran las condiciones 4, 5 y 6 de temperatura intermedia (20° C), mientras que en el tercer grupo se encuentran las condiciones de menor temperatura (1, 2 y 3) y la de menor tiempo para 40° C (condición 7).

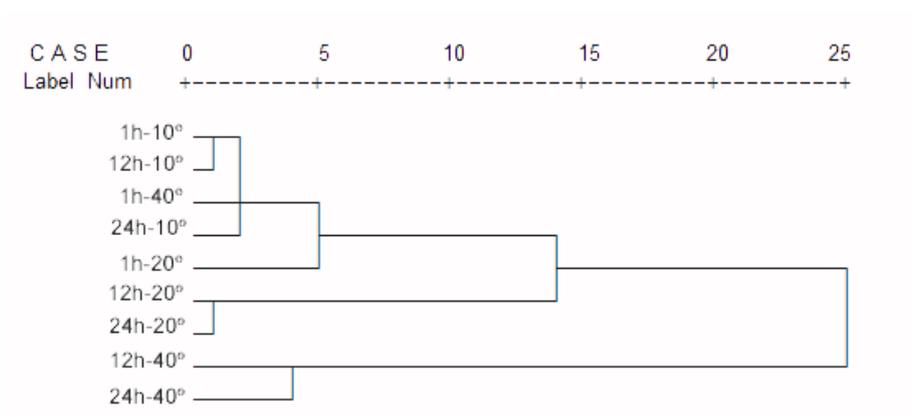


Figura III.10. Dendrograma para las diferentes condiciones de temperatura y tiempos evaluados sólo a pH = 1.

En este punto, se decidió seleccionar el método de ácido clorhídrico a pH = 1, temperatura = 40° C y tiempo de digestión de 12 horas como el método de referencia para posteriores consideraciones y comparación con otras metodologías, debido a que éstas son las condiciones donde se obtiene la máxima extracción de la mayoría de los metales estudiados. De esta manera, cualquier riesgo de subestimación de la concentración del elemento que se transfiere al estómago de las especies acuáticas desde las partículas del sedimento durante los procesos digestivos, es desechado, debido a que las condiciones seleccionadas producen la máxima extracción entre todas las posibles condiciones que se pudieran encontrar en un caso real.

III.3.4. Balance de masas

Para todas las dieciocho condiciones experimentales de pH, temperatura y tiempo estudiadas se realizó un balance de masas como indicador de la validez de la metodología. Este indicador fue seleccionado porque no existen sedimentos de

referencia certificados para los métodos de digestión parcial considerados en este trabajo. Para efectuar el balance de masas todos los residuos obtenidos fueron digeridos totalmente por el método modificado USEPA 3052 y se determinó la concentración total de los metales en los residuos. La suma de la concentración de metal presente en el residuo (C_r) más la concentración de metal extraído por el proceso de digestión parcial (C_{disol}) se comparó con la concentración total de la muestra previamente determinada (C_t). El Balance de Masa (BM) se expresó como porcentaje de recuperación mediante la siguiente ecuación:

$$\text{BM} = \left(\frac{C_{\text{disol}} + C_r}{C_t} \right) * 100$$

Los resultados obtenidos a pH = 1, tiempo de 12 horas y temperatura de 40° C se muestran como ejemplo en la Tabla III.11.

Como se puede observar, para la todos los metales investigados, el BM fue mayor o cercano al 90 % y la precisión en la determinación dada por la desviación estándar relativa fue entre 89 y 99 %, demostrando la validez de los resultados obtenidos para estas condiciones de trabajo. Por otro lado, el valor del BM para el resto de las condiciones experimentales se encontró entre el 85 – 90 %. En estos casos la concentración determinada en el residuo fue cercana, pero por debajo límite de cuantificación del elemento lo que pudiera explicar esta moderada disminución de la recuperación. Los resultados obtenidos para el resto de las condiciones de digestión se muestran en el Anexo 5.

Por tanto, de esta manera se asegura el correcto desempeño del método de digestión parcial con HCl, para el cual, obviamente, no se cuenta con muestra de referencia certificada.

Tabla III.11. Balance de Masa (BM) para el método de digestión de HCl a pH = 1, 12 horas y 40° C.

Elemento	[metal] ± s, mg·kg ⁻¹			BM, %
	Disolución	Residuo	Total	
Al	2925 ± 47	61359 ± 6	66342 ± 11	97 ± 3
As	4,3 ± 0,2	5,8 ± 0,3	10,8 ± 0,2	93 ± 1
Cd	0,08 ± 0,03	0,021 ± 0,008	0,11 ± 0,01	92 ± 1
Co	6,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1	7,6 ± 0,5	98 ± 4
Cr	5,0 ± 0,1	78,5 ± 0,2	85 ± 2	98 ± 3
Cu	13,2 ± 0,4	10,5 ± 0,3	25,9 ± 0,8	92 ± 5
Fe	3220 ± 76	29098 ± 1	36111 ± 58	90 ± 3
Li	8,0 ± 1,0	14,2 ± 0,1	21,5 ± 0,9	99 ± 1
Mn	492 ± 10	30,7 ± 0,2	532 ± 17	98 ± 1
Ni	11,9 ± 0,2	24,9 ± 0,1	37,0 ± 1,0	99 ± 1
Pb	11,8 ± 0,5	27,5 ± 0,4	44,0 ± 2,0	89 ± 3
Ti	58 ± 2	3586 ± 1	3692 ± 13	98 ± 1
V	25,2 ± 0,6	78,7 ± 0,1	116,0 ± 2,0	97 ± 1
Zn	25,0 ± 1,0	42,3 ± 0,4	73,0 ± 3,0	92 ± 1

III.3.5. Estudio de biodisponibilidad con HCl

A continuación se realizó un estudio comparativo de la extracción de los diferentes elementos con HCl pH = 1, 12 horas y 40° C. Los elementos Co y Mn fueron los más biodisponibles al ser completamente extraídos respecto a su total, con porcentajes de extracción entre el 90 – 100 %, seguidos por el Cd, Cu y el Zn con un 72, 51 y 34,2 % respectivamente (Tabla III.4). Para el resto de los elementos la extracción se mantuvo por debajo del 35 %, siendo el Al y el Ti los metales menos extraídos (~ 2 – 5 %) y por tanto, los menos biodisponibles probablemente por su mayor asociación a la fase de silicatos. Se puede concluir, por tanto, que los metales Mn, Co, Cu, Cd y Zn se encuentran más biodisponibles para los organismos acuáticos, pudiendo provocar algunos de los efectos adversos mencionados previamente.

Estos resultados son comparables con otros obtenidos previamente para el Al, Fe, Mn, Zn y Ti mediante el empleo del HCl a concentraciones más elevadas (0,3 M) que las usadas en este trabajo¹⁰⁰. Sin embargo, en este caso se obtuvieron mayores porcentajes de extracción para Cu y Ni que los alcanzados por el método propuesto en el presente trabajo, mientras que para el Cr y el Pb los porcentajes fueron menores. Las diferencias en las extracciones obtenidas en ambos casos pudieran estar relacionadas con las diferentes formas de asociación de los metales en los distintos sedimentos así como a la diferencia en la concentración de HCl utilizado²⁷.

III.3.6. Método con HNO₃

Para evaluar si la selección de un tipo u otro de ácido influye sobre el proceso, se realizó un estudio para el HNO₃ en las condiciones de mayor extracción seleccionadas previamente con el HCl, siguiendo la metodología descrita en la parte experimental.

Primeramente se realizó una prueba t de comparación de dos medias experimentales, cuyos resultados se muestran en la Tabla III.12. Para el caso del Cr y V no se realizó la prueba t debido a que no se obtuvo extracción con HNO₃ por encima del límite de detección.

Como se puede observar en la Tabla III.12 existen diferencias significativas para los elementos As, Cu, Fe, Pb, Ti, y Zn, mientras que no hay diferencias significativas entre ambos métodos de digestión para el Al, Cd, Co, Mn y Li.

En la Tabla III.12 también se muestra la concentración obtenida mediante el empleo de ambos métodos. Como se puede observar, para el As, Cu, Fe, Pb, Ti y Zn, el HNO₃ extrajo mayor cantidad del metal que el HCl, probablemente debido al poder oxidante que tiene este ácido, que permite disolver parte de la materia orgánica liberando los metales enlazados a la misma, tal es el caso del As, Cu, Pb y Zn⁹⁹.

Tabla III.12. Resultados de la prueba t para la comparación de las concentraciones obtenidas con el HNO₃ y el HCl expresadas en mg·kg⁻¹.

Metal	[metal] ± s, mg·kg ⁻¹			Prueba t
	HCl	HNO ₃	t _{experimental}	
Al*	2925 ± 47	2959 ± 291	1,7	Aceptado
As	4,3 ± 0,2	11,5 ± 3	4,3	Rechazado
Cd	0,08 ± 0,03	0,1 ± 0,04	1,2	Aceptado
Co	6,91 ± 0,08	7,0 ± 0,7	0,1	Aceptado
Cr	5,0 ± 0,1	< 0,8	-	-
Cu	13,2 ± 0,4	3,5 ± 0,3	4,5	Rechazado
Fe	3220 ± 76	27498 ± 2	8,5	Rechazado
Li	8 ± 1	14 ± 1	2,0	Aceptado
Mn	492 ± 10	37,5 ± 0,4	0,7	Aceptado
Ni	11,9 ± 0,2	14 ± 3	2,2	Rechazado
Pb	11,8 ± 0,5	25 ± 2	3,7	Rechazado
Ti	58 ± 2	14,2 ± 0,6	40,2	Rechazado
V	25,2 ± 0,6	< 4,7	-	-
Zn	25 ± 1	37 ± 2	3,0	Rechazado

t_{tabla} (n = 4, α = 0,05) = 2,78 y * t_{tabla} (n = 2, α = 0,05) = 4,30

Por otro lado, el Cr y V se encontraron por debajo del límite de detección mostrando, por tanto, una mayor extracción por el método de HCl, probablemente debido a que una fracción de los mismos puede estar enlazada a fases susceptibles a la formación de complejos. En este caso podría estar predominando la acción complejante del ion Cl⁻ por encima de la acción oxidativa del nítrico. Además, el hecho de que el HNO₃ se encuentre diluido puede estar contribuyendo a que algunas fases orgánicas más resistentes, en la que pudieran estar enlazados estos metales, no puedan ser disueltas.

Finalmente, el Al, Cd, Co, Li, Mn y Ni fueron disueltos en igual proporción por ambos ácidos, pudiéndose pensar que la propiedad predominante es la ácida para la

disolución de estos metales, que podrían encontrarse enlazados fundamentalmente a la fase carbonatada.

III.3.6.1. Balance de Masas

En la Tabla III.13 se muestran los resultados del BM realizado para el método de HNO₃ siguiendo la misma metodología que se empleó con el HCl. Los resultados del Cr y V no se muestran por encontrarse por debajo del límite de detección en la disolución con HNO₃.

Tabla III.13. Balance de Masa (BM) para el método de digestión de HNO₃.

Elemento	[metal] ± s, mg·kg ⁻¹			BM, %
	Disolución	Residuo	Total	
Al	2959 ± 291	61856 ± 4	66342 ± 11	98 ± 1
As	11,5 ± 3	0,050 ± 0,003	10,8 ± 0,2	106 ± 1
Cd	0,10 ± 0,04	0,009 ± 0,008	0,11 ± 0,01	99 ± 2
Co	7,0 ± 0,7	0,05 ± 0,01	7,6 ± 0,5	93 ± 6
Cu	20,0 ± 3,0	3,5 ± 0,3	25,9 ± 0,8	91 ± 8
Fe	5334 ± 424	27498 ± 2	36111 ± 58	91 ± 9
Li	6,0 ± 0,9	14,0 ± 1,0	21,5 ± 0,9	98 ± 3
Mn	492 ± 67	38,0 ± 1,0	532 ± 17	99,5 ± 0,1
Ni	14 ± 3	21 ± 1	37 ± 1	95 ± 4
Pb	15 ± 1	25 ± 2	44 ± 2	91 ± 6
Ti	14 ± 1	3601 ± 6	3692 ± 13	98 ± 3
Zn	33 ± 4	37 ± 2	73 ± 3	96 ± 3

Como se observa en la tabla para la mayoría de los metales las recuperaciones estuvieron en el rango de 91 – 106 % con una precisión dada por la desviación estándar relativa fue entre 0,5 a un 9 %. Con lo cual queda demostrado el buen desempeño analítico del método de ácido nítrico.

III.3.6.2. Estudio de biodisponibilidad con HNO₃

Observando el porcentaje de extracción obtenido para el HNO₃ es posible concluir que los metales más biodisponibles fueron el As, Cd, Co y Mn con porcentajes de extracción entre el 93 – 106 %, seguidos por el Cu con un 79 % de extracción. Para el resto de los metales la extracción se mantuvo por debajo del 46 %, siendo el Al y el Ti los menos extraídos (~ 0,4 – 4,5 %), y por tanto, los menos biodisponibles como ocurría para el HCl.

El orden de biodisponibilidad de los metales para la extracción con HNO₃ fue el siguiente: As> Mn> Cd> Co> Cu> Zn> Ni> Pb> Li> Fe> Al> Ti. Se puede pensar, por tanto, que el As, Cd, Co y Mn se encuentran más biodisponibles, liberándose además otros metales que pudieran estar asociados al Mn.

Si comparamos este orden con el del HCl (Mn> Co> Cd> Cu> As> Li> Zn> Ni> Pb> V> Fe> Cr> Al> Ti) podremos notar algunas diferencias. El As, por ejemplo, pasa de una biodisponibilidad intermedia con el HCl a ser el más biodisponible con el HNO₃, mientras que el Li pasa de ser más biodisponible que el Zn, Ni y Pb con HCl, a ser menos biodisponible que estos metales con el nítrico. Esto puede deberse probablemente a que este metal se encuentra en alguna fase que se disuelve mediante la acción complejante del ión Cl⁻.

Para evaluar otros posibles efectos sobre la extracción y completar el estudio de métodos de digestión químicos, se realizará a continuación una comparación con otros métodos que han sido utilizados en la bibliografía, basados en el empleo del HOAc.

III.3.7. Método con HOAc (0,11 M y 25 %)

Una vez evaluada la extracción de dos digestiones con ácidos fuertes y diferentes propiedades, ácidos y agente complejante para el HCl y ácidos y oxidantes para el

HNO₃, tiene sentido realizar una comparación con otro ácido con propiedades complejante, pero cambiando la fortaleza del ataque. Para este estudio utilizamos el HOAc a dos concentraciones (0,11 M y 25 %) siguiendo la metodología descrita en la parte experimental.

Se escoge el HOAc, además, porque es un método propuesto con frecuencia para disolver las fases más lábiles del sedimento, carbonatos e intercambiable, y por tanto, propuesto para extraer los metales más biodisponibles. Los resultados obtenidos por ambos métodos se pueden observar en la Tabla III.14.

Tabla III.14. Comparación de la extracción con ambos métodos de HOAc.

Elemento	[metal] ± s, mg·kg ⁻¹		t _{experimental}	Prueba t
	[HOAc], 25 %	[HOAc], 0,11 M		
Al	391 ± 26	< 235	-	
As	1,40 ± 0,03	< 0,2	-	
Cd	0,08 ± 0,06	0,025 ± 0,009	9,5	Rechazado
Co	3,6 ± 0,2	1,43 ± 0,05	22,7	Rechazado
Cr	< 4	< 4	-	
Cu	1,50 ± 0,09	<1	-	
Fe	936 ± 72	<698	-	
Li	0,63 ± 0,03	0,370 ± 0,003	15,2	Rechazado
Mn	23 ± 0,2	23,4 ± 0,7	0,5	Aceptado
Ni	2,3 ± 0,1	1,16 ± 0,05	13,1	Rechazado
Pb	5,6 ± 0,3	<5,4	-	
Ti	< 4	< 4	-	
V	9,1 ± 0,5	<4,8	-	
Zn	0,013 ± 0,001	<0,01	-	

t_{tabla} (n = 4, α = 0,05) = 2,78

Una primera conclusión de estos resultados se relaciona con las diferentes concentraciones de metales extraídos por ambos métodos a pesar de que los dos han

sido utilizados con un mismo fin: evaluar la biodisponibilidad de los metales hacia los organismos vivos.

Para comparar ambos métodos se realizó una prueba t de comparación de dos medias experimentales para $\alpha = 0,05$ y $n = 6$ con los metales que se encontraron por encima del límite de detección por ambos métodos. Como se puede apreciar en la Tabla III.14, hay diferencia significativa entre las concentraciones de Cd, Co, Li y Ni, mientras que ambas concentraciones de Mn no muestran diferencias.

En la Tabla III.14 se puede observar que con HOAc 0,11 M la extracción de metales es muy baja, ya que para este método la mayoría de los metales no pudieron ser determinados por encontrarse por debajo del límite de detección. Sólo se cuantificaron el Cd, Co, Li, Mn y Ni. Sin embargo, en un estudio similar realizado por Bignasca y *col.*, estos autores obtienen, además, extracción para el Cr, Cu, Fe, Pb y Zn, siendo inferiores al 40 % las concentraciones obtenidas de todos los metales detectados⁸⁶. Las discrepancias entre ambos resultados puede deberse a las posibles diferencias en la composición (elemental y estructural) entre ambas muestras estudiadas. Por otro lado, el método de HOAc 25 % extrajo a la mayoría de los metales en cantidades apreciables, exceptuando al Cr y el Ti, los cuales se encontraron por debajo del límite de detección. Como se puede observar en la tabla, este último método extrajo mayor cantidad para casi todos los metales respecto al HOAc 0,11 M, probablemente debido a la diferencia de pH entre ambos métodos, el cual es de 2,87 y 1,73 para el HOAc 0,11 M y al 25 % respectivamente. La única excepción a este comportamiento se obtuvo para el Mn, el cual se extrajo en cantidades similares independientemente de la concentración del ácido acético utilizado. Esta extracción puede estar influenciada por la alta movilidad de este metal observada en otros ataques ácidos, y que fue extraído con HCl tanto a pH = 1 como a pH = 2.

III.3.7.1. Balance de Masas

Siguiendo la misma metodología de los métodos anteriores, se realizó el BM a los elementos detectados para cada concentración del ácido acético usado como extrayente. Las Tablas III.15 y III.16 muestran los resultados obtenidos.

Tabla III.15. Balance de Masa (BM) para el método de digestión de HOAc 0,11 M.

Elemento	[metal] ± s, mg·kg ⁻¹			BM, %
	Disolución	Residuo	Total	
Cd	0,10 ± 0,04	0,009 ± 0,002	0,11 ± 0,01	99 ± 1
Co	1,43 ± 0,05	5,9 ± 0,1	7,6 ± 0,5	96 ± 3
Li	0,37 ± 0,01	20,9 ± 0,1	21,5 ± 0,9	99 ± 1
Mn	23,4 ± 0,1	505,9 ± 0,8	532 ± 17	99 ± 1
Ni	1,16 ± 0,05	33 ± 2	37 ± 1	92 ± 7

Para el método del HOAc 0,11 M, el BM se encontró entre 92 - 99 %, asegurándose de esta manera el correcto desempeño analítico del mismo.

Tabla III.16. Balance de Masa (BM) para el método de digestión de HOAc 25 %.

Elemento	[metal] ± s, mg·kg ⁻¹			BM, %
	Disolución	Residuo	Total	
Al	391 ± 26	60370 ± 15	66342 ± 11	92 ± 4
As	1,40 ± 0,03	8,7 ± 0,3	10,8 ± 0,2	94 ± 6
Cd	0,08 ± 0,06	0,02 ± 0,01	0,11 ± 0,01	91 ± 9
Co	3,6 ± 0,2	3,5 ± 0,1	7,6 ± 0,5	93 ± 7
Cu	1,50 ± 0,09	23,8 ± 0,8	25,9 ± 0,8	98 ± 2
Fe	936 ± 72	31601 ± 2	36111 ± 58	90 ± 9
Li	0,63 ± 0,03	19 ± 1	21,5 ± 0,9	91 ± 9
Mn	23,00 ± 0,02	508 ± 4	532 ± 17	99,8 ± 0,1
Ni	2,3 ± 0,1	32 ± 2	37 ± 1	93 ± 5
Pb	5,6 ± 0,3	36,7 ± 0,2	44 ± 2	96 ± 4
V	9,1 ± 0,5	101 ± 1	116 ± 2	95 ± 5
Zn	0,013 ± 0,001	71 ± 1	73 ± 3	97 ± 3

Para todos los metales representados en la Tabla III.16, el BM fue superior al 90 %, encontrándose entre el 90 – 99 %. Los metales que no se representaron no se detectaron en la disolución de HOAc 25 % (por debajo del límite de detección). De esta forma, también se aseguró el correcto desempeño analítico de este método de digestión.

III.3.7.2. Estudio de biodisponibilidad con HOAc 25 %

La biodisponibilidad y el resto de las comparaciones fueron realizadas con el método de HOAc 25 % debido a que con la primera etapa del BCR fueron detectados pocos metales. La biodisponibilidad del HOAc 25 % fue: Cd > Co > As > Pb > V > Ni > Cu > Mn > Li > Fe > Al > Zn. De este resultado se puede plantear que los metales más biodisponibles con este método fueron el Cd, Co y As, mientras que los menos biodisponibles fueron el Cr y el Ti, los cuales no fueron detectados en el extracto. Recordemos que estos elementos están presentes a concentraciones de $85 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $3692 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ respectivamente en el sedimento analizado.

Seguidamente se realizó una prueba t para conocer si existen diferencias significativas entre la concentración extraída con el HOAc y la obtenida con el HCl, los resultados se muestran en la Tabla III.17. A los elementos Cr y el Ti no se les aplicó la prueba debido a que no fueron detectados por el HOAc. Como se puede observar en la tabla, para todos los metales, exceptuando el Cd, se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas por cada uno de los métodos de digestión comparados, siendo mayor la extracción con el método de HCl, exceptuando el Cd, cuya concentración con este ácido fue similar a la obtenida con HOAc 25 %.

Tabla III.17. Resultados de la prueba t para la comparación de las concentraciones obtenidas por el HOAc y el HCl expresadas en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Metal	[metal] \pm s, $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$			Prueba t
	HCl	HOAc	$t_{\text{experimental}}$	
Al	2925 \pm 47	391 \pm 26	133,6	Rechazado
As*	4,3 \pm 0,2	1,40 \pm 0,03	29,5	Rechazado
Cd	0,08 \pm 0,03	0,08 \pm 0,06	0,04	Aceptado
Co	6,9 \pm 0,1	3,6 \pm 0,2	32,2	Rechazado
Cr	5,0 \pm 0,1	-	-	-
Cu*	13,2 \pm 0,4	1,5 \pm 0,1	45,0	Rechazado
Fe	3220 \pm 76	936 \pm 72	37,7	Rechazado
Li*	8,0 \pm 1,0	0,63 \pm 0,03	9,6	Rechazado
Mn*	492 \pm 10	23,0 \pm 0,1	83,4	Rechazado
Ni	11,9 \pm 0,2	2,3 \pm 0,1	77,2	Rechazado
Pb	11,8 \pm 0,5	5,6 \pm 0,3	17,5	Rechazado
Ti	58,0 \pm 2,0	-	-	-
V	25,2 \pm 0,6	9,1 \pm 0,5	36,8	Rechazado
Zn*	25,0 \pm 1,0	0,013 \pm 0,001	33,8	Rechazado

$t_{\text{tabla}} (n = 4 \text{ y } \alpha = 0,05) = 2,78$ y $*t_{\text{tabla}} (n = 2 \text{ y } \alpha = 0,05) = 4,30$

Finalmente, al compararse la biodisponibilidad del HOAc respecto a la del HCl se pueden observar algunas diferencias. El Cd, As, Pb y V pasaron a ser elementos más móviles con el HOAc que con el HCl, mientras que el Cu, Mn y Zn disminuyeron su movilidad con el empleo del HOAc. Estas diferencias en las movilidades de los elementos puede deberse al tipo de ataque de los ácidos. Mientras que el HCl es un ácido fuerte, el HOAc es un ácido débil, así como el pH empleado de HCl ($\text{pH} = 1$) es más ácido que el pH del acético al 25 % ($\text{pH} = 1,73$). Por otro lado, en la literatura se plantea que el HCl remueve más eficientemente al Mn, mientras que el HOAc 25 % no

extrae eficientemente los nódulos de Fe y Mn¹⁴⁷, resultado que se corrobora en este trabajo. Para el caso del Cu y el Zn pudiera ser que una fracción de estos metales se encuentre asociada a la fase de Mn, y por ende no esté siendo extraída igualmente por el HOAc. Estos resultados sugieren que con el empleo del HOAc, se corre el riesgo de subestimar la concentración de los metales disponibles y pudieran existir riesgos para la biota y no ser detectados. Por otro lado, estos resultados confirman los comentarios realizados por Luoma¹⁴⁸ durante la extracción de un número limitado de elementos (Ag, Cd, Co, Cu, Pb y Zn), el cual expresa que, aparentemente, el método de HCl es la mejor técnica para la determinación de disponibilidad biológica de los metales en comparación con otras técnicas simples, como por ejemplo el método de HOAc 25 %.

Como conclusión importante de estos resultados se puede decir que, a pesar de su uso extendido, el HOAc puede subestimar la concentración de metales extraídos bajo condiciones gástricas debido a su bajo poder ácido. Por otro lado, las propiedades oxidantes del HNO₃ pueden contribuir a la sobreestimación de los elementos a estudiar. El HCl no presenta dichas propiedades oxidantes, mientras que sus propiedades ácidas y formadoras de complejos son mucho más fuertes que las que presentan el HOAc. Se debe recordar además, que es el HCl el que se encuentra naturalmente presente en el estómago de las especies marinas y, por tanto, parece ser el más adecuado para simular las condiciones digestivas. No obstante, no es el único componente del jugo gástrico responsable del proceso digestivo, en el cual también intervienen diferentes enzimas. En el siguiente capítulo se estudiará el efecto de dos enzimas en la extracción de metales. Así, se determinará si son necesarias o no en el desarrollo de un método de digestión que simule en el laboratorio los procesos digestivos y que permita evaluar los metales más biodisponibles del sedimento en el entorno digestivo.

¹⁴⁷ Chester, R.; Hughes, M.J. (1967) *A chemical technique for the separation of ferro-manganese minerals, carbonates minerals and adsorbed trace elements from pelagic sediments*. *Chemical Geology* 2, 249-262.

¹⁴⁸ Luoma, S.N.; Bryan, G.W. (1982) *A Statistical Study of Environmental Factors Controlling Concentrations of Heavy Metals in the Burrowing Bivalve *Scrobicularia plana* and the Polychaete *Nereis diversicolor**. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 15, 95-108.

**CAPÍTULO IV. SIMULACIÓN DE LOS
PROCESOS DIGESTIVOS DE PECES
MEDIANTE MÉTODOS
ENZIMÁTICOS**

IV. SIMULACIÓN DE LOS PROCESOS DIGESTIVOS DE PECES MEDIANTE MÉTODOS ENZIMÁTICOS

IV.1. INTRODUCCIÓN

Como se ha mencionado anteriormente, el riesgo ecotoxicológico que posee un sedimento contaminado va a depender de la movilidad de los metales hacia el agua, así como de la capacidad de los organismos vivos de asimilarlos directamente desde las partículas sedimentarias ingeridas⁸⁷.

Como se ha visto, una de las metodologías que permite conocer la biodisponibilidad de los metales es la que simula la absorción digestiva de las sustancias unidas a partículas del sedimento ingeridas por los organismos marinos.

En este sentido, la extracción de metales de los sedimentos bajo las condiciones que prevalecen en el tracto digestivo de los organismos acuáticos ha sido presentada

como una posible vía para predecir la absorción digestiva de estos elementos desde las partículas. Principalmente se han encontrado dos posibles formas de realizar este estudio. La primera de ellas usando directamente jugos gástricos extraídos previamente del organismo acuático^{85,89,149,150}, y la segunda mediante el empleo de enzimas a los pHs que habitualmente están presentes en los jugos gástricos de los organismos^{85,86,91,119,151}. Estos estudios tienen gran importancia ya que reflejan una mejor aproximación a lo que realmente pudiera estar ocurriendo en los peces y otras especies marinas al ingerir las partículas de sedimentos.

Sin embargo, los modelos experimentales de las cadenas alimenticias que han sido diseñados para determinar la retención de metales en los organismos acuáticos, se han centrado principalmente en los filtradores, aunque se han publicado algunos trabajos sobre otras especies como la trucha, encontrándose en algunos casos correlación entre la asimilación de metales en organismos acuáticos y la movilidad de los metales en los sedimentos^{90,91,92,93,94}.

Son, por tanto, mucho más escasos los trabajos donde se simulan las condiciones digestivas de otros organismos marinos como los peces, que también pueden ingerir partículas procedentes del sedimento durante su proceso digestivo. Por este motivo, éste ha sido uno de los objetivos de la presente tesis, cuyo desarrollo se expone en este capítulo.

Después de efectuada previamente la comparación de la extracción de diferentes métodos químicos, en este capítulo se evalúan algunos métodos enzimáticos que simulen las condiciones digestivas de los peces y se realiza una comparación de los mismos con el método de HCl seleccionado anteriormente (en las condiciones experimentales de 12 horas y 40° C a pH = 1). En los métodos enzimáticos se ha trabajado con las dos principales enzimas presentes en la digestión de los organismos acuáticos, la pepsina, que actúa básicamente en el estómago y la tripsina en el intestino.

¹⁴⁹ Wang, W.X.; Yan, Q.L.; Fan, W.; Xu, Y. (2002) *Bioavailability of sedimentary metals from a contaminated bay*. Marine Ecology Progress Series 240, 27-38.

¹⁵⁰ Fan, W.; Wang, W.-X. (2003) *Extraction of spiked metals from contaminated coastal sediments: a comparison of different methods*. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 2659-2666.

¹⁵¹ Rigaud, S.; Di Giorgio, C.; Radakovitch, O.; Garnier, J.M.; De Méo, M. (2012) *Genotoxicity of sediment extracts of the Berre lagoon (France)*. Chemosphere 88, 937-944.

IV.1.1. Sistema digestivo de los peces y alimentación

Los peces, como cualquier ser vivo, requieren tomar del medio en que se desarrollan las sustancias nutritivas para crecer y cumplir con sus funciones vitales. Es por ello que el conocimiento de su sistema digestivo es de gran importancia para la acuicultura y desarrollo en general de las especies marinas.

Entre los peces óseos existen muchas adaptaciones especiales del tracto digestivo y esto es debido a los distintos regímenes alimenticios¹⁵². El tubo digestivo se inicia en la boca, al igual que el resto de los vertebrados y continúa sucesivamente con la faringe, esófago, estómago e intestino, terminando en el ano como se muestra en la Figura IV.1.

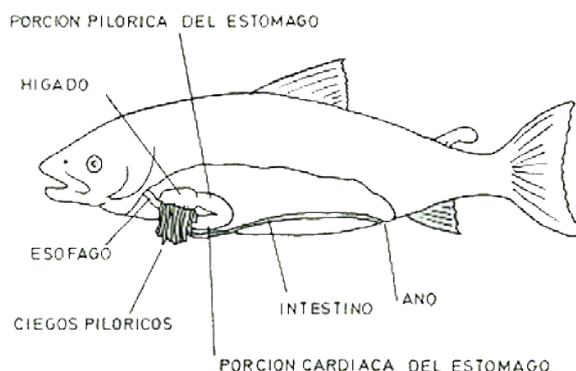


Figura IV.1. Sistema digestivo de los peces carnívoros.

De todo el sistema digestivo, el estudio que se presenta en el siguiente capítulo centrará su atención en el estómago y el intestino. El estómago tiene una serie de capas musculosas y varios estratos de tejido conjuntivo adyacente. En el epitelio estomacal existen principalmente dos tipos de células excretoras¹¹⁶:

¹⁵² Edward, C.; Hume, I.D. (1995) *Comparative physiology of the vertebrate digestive system*. Cambridge University Press, UK.

1. Células adelomorfas: su función es la de producir pepsinógeno, sustancia precursora de la pepsina, su misión es el desdoblamiento de las grandes moléculas de proteína

2. Células parietales: Su misión es secretar ácido clorhídrico (HCl) para producir un medio ácido en el estómago que propicia el correcto funcionamiento de la pepsina. Así mismo, el HCl tiene la misión de eliminar las bacterias introducidas con el alimento y ayudar a la desnaturalización de las proteínas.

El estómago tiene tres funciones fundamentales:

1. Almacenamiento de los alimentos mientras no pasen al intestino

2. Tratamiento físico de los alimentos

3. Primer tratamiento químico de los alimentos en presencia de HCl y pepsina.

Seguidamente se encuentra el intestino, quien presenta numerosas variaciones según la especie. Por regla general, el intestino de los peces herbívoros es más largo que el de los carnívoros¹¹⁶. La digestión en el intestino tiene lugar gracias a la acción de productos secretados por la propia pared intestinal y por las glándulas anexas: hígado y páncreas. El pH del intestino es neutro (pH ~ 7) en la parte anterior y ligeramente alcalino en la parte posterior. El páncreas es el encargado de la secreción de tripsina, una enzima cuya función fundamental es la de hidrolizar péptidos en sus componentes estructurales básicos conocidos como aminoácidos¹¹⁶. Esto es necesario para el proceso de absorción de las proteínas presentes en los alimentos, por tanto, la tripsina realiza la hidrólisis de los enlaces peptídicos.

Como bien se ha mencionado, dos de las enzimas más importantes presentes en el sistema digestivo de los vertebrados son la pepsina y la tripsina. A continuación se exponen algunas de las propiedades de estas dos enzimas.

IV.1.1.1. Pepsina

La pepsina es una proteasa gástrica de los vertebrados que es secretada en el estómago y su función fundamental es la degradación de las proteínas, proporcionando péptidos y aminoácidos en un ambiente muy ácido. El precursor de la

pepsina es el pepsinógeno, que cuando pierde aminoácidos queda en forma de pepsina pudiendo finalmente actuar como proteasa¹¹⁶. Esta enzima, en su estructura primaria cuenta con 327 aminoácidos, de los cuales, 43 son aminoácidos ácidos y sólo 4 aminoácidos básicos¹¹⁹. Es más activa a un pH entre 2 - 3 y se desactiva permanentemente a un pH superior a 6¹¹⁶. Por tanto, esta enzima se puede usar como representativa del medio gástrico a nivel de estómago^{85,86,119}.

La digestión con pepsina es importante en muchos organismos bénticos y los vertebrados, pero no es importante en invertebrados. El conocimiento de la digestibilidad mediante la pepsina es de interés y puede revelar mecanismos generales mediante enzimas que son más representativos de los organismos acuáticos.

La pepsina es ampliamente utilizada en acuicultura para examinar la digestibilidad de las dietas, entre otros objetivos. Por otro lado, también se ha descrito un método estándar de digestión in vitro por la Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC por sus siglas en inglés)¹⁵³. Este método fue empleado por Turner y Olsen para evaluar la bioaccesibilidad para Al, Fe, Mn y Zn, demostrándose en este trabajo que la bioaccesibilidad es dependiente de la concentración de las enzimas en el sistema digestivo⁸⁵. Este método se puede emplear para examinar la digestibilidad de los sedimentos contaminados, o específicamente, la fracción soluble del metal en el estómago.

IV.1.1.2. Tripsina

La tripsina es una proteasa representativa de los invertebrados, aunque también se encuentra en los vertebrados, que rompe los enlaces peptídicos de las proteínas, todavía incapaces de ser adsorbidas tal cual, mediante hidrólisis formando péptidos de menor tamaño y aminoácidos todavía incapaces de ser adsorbidas tal cual¹¹⁶. Esta enzima es producida en el páncreas y secretada en el intestino delgado siendo esencial para la digestión^{85,86}. La tripsina se compone de 223 residuos de

¹⁵³ Helrich, K. (2005) *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (fifteenth edition)*. AOAC, Arlington.

aminoácidos¹⁵⁴. La tripsina se activa a pH básico, aunque el pH óptimo para el funcionamiento de la misma es entre 7 - 8 y la temperatura óptima es de alrededor de 37° C¹¹⁶.

A continuación se examinarán algunos trabajos publicados donde se realizan diferentes estudios de desorción de los metales empleando estas enzimas y jugos gástricos naturales.

IV.1.2. Simulación de las condiciones digestivas de los organismos marinos empleando enzimas presentes en la digestión

Anteriormente se ha comentado extensamente el concepto de biodisponibilidad de los metales en los sedimentos y la importancia que el conocimiento de la misma tiene para el medio ambiente.

La manera más común de conocer esta biodisponibilidad está relacionada con la reactividad del contaminante a diferentes reactivos químicos, así como con la relación entre la disponibilidad del metal y las diferentes fases geoquímicas del sedimento. La base fundamental de esta aproximación es totalmente empírica, al demostrarse en algunos casos que la concentración extraída del sedimento con estos reactivos químicos correlaciona con la encontrada en diferentes organismos detritívoros^{88,155,156}. En otras ocasiones se ha realizado una definición operacional, en la cual el metal biodisponible sería extraído por reactivos que simulan las condiciones que se encuentran en el estómago de los organismos¹⁵⁷.

¹⁵⁴ Liu, Y.; Cao, R.; Qin, P.; Liu, R. (2012) *Assessing the potential toxic effect of one persistent organic pollutant: Non-covalent interaction of dicofol with the enzyme trypsin*. *Spectrochimica Acta Part A* 89, 210–215.

¹⁵⁵ Bryan, G.W.; Langston, W.J. (1992) *Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review*. *Environmental Pollution* 76, 89–131.

¹⁵⁶ Goodyear, K.L.; McNeill, S. (1999) *Bioaccumulation of heavy metals by aquatic macro-invertebrates of different feeding guilds: a review*. *The Science of the Total Environment* 229, 1–19.

¹⁵⁷ Jin, Z.W.; Simkins, S.; Xing, B.S. (1999) *Bioavailability of freshly added and aged naphthalene in soils under gastric pH conditions*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2751–2758.

En el caso de los peces, se conocen dos rutas fundamentales de exposición a metales¹⁵⁸:

1. La principal vía de entrada de estos productos químicos en especies de peces es a través de las branquias o el transporte de los contaminantes disueltos en el agua a través de membranas biológicas y el intercambio iónico, etc.
2. La ruta secundaria es a través de la ingestión de partículas de alimentos o de los sedimentos con posterior transporte a través del intestino

Los estudios revelan que la ruta gastrointestinal es la vía más importante particularmente para la absorción de metales¹⁵⁸.

En el capítulo anterior ya se han comentado distintas aproximaciones mediante el uso de reactivos químicos, principalmente ácidos. El mayor problema con esta aproximación es que mientras la selectividad geoquímica se ha demostrado, la significación biológica de estos métodos no ha sido rigurosamente demostrada. Es por ello que se considera un estudio más apropiado aquel que incorporen, además, enzimas presentes en el tracto gastrointestinal de especies marinas, ya que son compuestos que se encuentran realmente presentes en el proceso digestivo.

Sin embargo, son pocos los trabajos encontrados donde se estudie la desorción de metales en sedimentos empleando diferentes enzimas presentes en el tracto digestivo de especies marinas, especialmente son pocos los que evalúan a la pepsina y la tripsina.

Varios de estos estudios realizaron, además, la comparación de estos procesos con otros métodos como el de HCl y HOAc comentados en el capítulo anterior. A este respecto, Amiard y *col* realizaron un estudio de biodisponibilidad del Pb en moluscos, empleando técnicas que simulaban las condiciones que prevalecen en el tracto digestivo. Para ello evaluaron diferentes enzimas como la α -amilasa, pepsina, lisozima, peptidasas y fosfatasas ácidas y alcalinas, todas a sus pH correspondientes¹⁵⁹. Entre las conclusiones fundamentales, estos autores sugieren que el efecto de los cambios de pH es más importante que el efecto de las enzimas

¹⁵⁸ Gupta, A.; Rai, D.K.; Pandey, R.S.; Sharma, B. (2009) *Analysis of some heavy metals in the riverine water, sediments and fish from river Ganges at Allahabad*. Environmental Monitoring Assess 157, 449–458.

¹⁵⁹ Amiard, J.C.; Ettanjani, H.; Jeantet, A.Y.; Ballan-Dufrançais, C.; Amiard-Triquet, C. (1995) *Bioavailability and toxicity of sediment-bound lead to a filter-feeder bivalve Crassostrea gigas (Thunberg)*. BioMetals 8, 280-289.

sobre la liberación del Pb a partir del contenido intestinal de los bivalvos. Por otro lado, obtienen mayor liberación de Pb cuando se trata el sedimento con HCl 0,1 N que con las enzimas, cuestionándose la significación biológica del resultado obtenido con este ácido. En este trabajo se plantea que las mayores desorciones del Pb están más expuestas a las condiciones de pH solamente, por encima de la combinación de las condiciones de pH y enzimas. Por último, los resultados obtenidos con el modelo experimental de una cadena de alimentación sobre la transferencia del Pb desde los sedimentos hacia las ostras sugieren que ni la acción enzimática ni la lixiviación a bajos pH promueven la liberación de cantidades importantes de Pb.

En una línea de trabajo similar, Turner y Olsen⁸⁵, estudian la extracción de Cu, Fe, Mn y Zn en sedimentos mediante diferentes tipos de reactivos (ácidos, no ácidos y enzimáticos), comparando los resultados entre todos ellos. Entre los reactivos más importantes se pueden mencionar el HNO₃ concentrado, el HCl 1 M y el HOAc 25 % como métodos químicos ácidos, y entre los enzimáticos, la pepsina, la tripsina, así como experimentos in vitro con el contenido gástrico de *Pleuronectes platessa* L. ajustados a dos pH diferentes. Entre los principales resultados obtienen que la pepsina extrae mayor cantidad de metales que los reactivos no ácidos propuestos para disolver las fracciones soluble e intercambiable (agua de mar y acetato de amonio), sugiriendo que la complejación por ligandos enzimáticos es un mecanismo importante en el medio digestivo. Además, encuentran que el modelo gastrointestinal disuelve mayor cantidad de metal que el modelo enzimático. También los autores en este trabajo exponen que el Mn presenta mayor movilidad que el Fe de manera general, sugiriendo que el principal mecanismo de liberación es por la formación de complejos superficiales y la disolución reductiva de los óxidos de Mn, siendo un proceso que se ve aumentado a bajos pH. Este trabajo realiza una comparación además de los reactivos químicos frente a la extracción con la pepsina y la tripsina. En este caso, la extracción con ácido acético (HOAc) es la que mejor representa la fracción disponible de Mn, Cu y Zn, porque se corresponde con los resultados de los estudios con los fluidos gástricos, sugiriendo que la tendencia reductora del ion acetato es similar a los ligandos encontrados en el medio ambiente digestivo, así como el pH del HOAc es similar al encontrado en estos ambientes. Parte de las

conclusiones de este trabajo plantea que cuando el fluido gastrointestinal es acidificado aumenta la solubilización del Fe, Mn y Zn, pero se reduce la solubilización del Cu, mientras que la fracción de Fe está sobre-estimada por la aplicación del HCl y el oxalato de amonio⁸⁵.

En otro trabajo de Turner y *col.* se realiza un estudio de las condiciones a tener en cuenta para la extracción de cinco metales por un método estándar para la digestión de sedimentos *in Vitro* con 2 % de pepsina en 0,075 N HCl¹¹⁹. El objetivo del mismo es evaluar la fracción "biodisponible" o "soluble en el estómago" del carbono, nitrógeno, minerales y elementos trazas. La primera conclusión a la que arriban es que la extensión de los procesos biológicos y químicos envueltos en la digestión de los sedimentos es muy diferente a la de los procesos envueltos en la digestión de alimentos. Plantean que la digestión de sedimentos está restringida a la hidrólisis del material rico en nitrógeno y proteínas, el cual comparado con la dieta de los vertebrados, es bajo en abundancia y con poco valor nutricional, y que con la posible excepción del Mn, éstas no son fases significativas para contener metales. También proponen que el principal mecanismo de liberación de metales mediante el método estándar de pepsina aparentemente es debido aparentemente a la disolución por el HCl de los sedimentos superficiales o del material hidrogenado inorgánico accesible, tales como los óxidos amorfos. Concluyen además que el uso del HCl diluido sólo no es un indicador de respuesta biológica a la digestión de sedimentos contaminados debido a que sobreestima la concentración del Cu, Al, Fe y Zn. Terminan concluyendo que si bien tiene como inconveniente que la digestión de la enzima activa es más fuerte que la de los jugos gástricos naturales, la pepsina es más representativa de las condiciones de medición de biodisponibilidad de los contaminantes en el jugo gástrico que los métodos convencionales, y es suficientemente simple y barata para ser aplicada como análisis de rutina para estudios a gran escala.

Por su lado, Bignasca y *col.* probaron dos enzimas proteolíticas (pepsina y tripsina) para evaluar la biodisponibilidad de los metales (Al, As, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V y Zn) en sedimentos marinos⁸⁶. Los autores estudiaron algunas condiciones de trabajo, entre las que se pueden mencionar el tiempo de incubación, la concentración de las enzimas y la proporción disolución/sólido, y evaluaron además los mecanismos de

liberación de los metales empleando las enzimas sin tratar y desnaturalizadas. Todos los resultados fueron comparados con los obtenidos para la proteasa K en un trabajo previo de los autores¹⁶⁰.

En el caso de la pepsina, plantearon que el mecanismo es totalmente diferente al de la proteasa K, debido a que pertenecen a fases diferentes de la digestión. La principal diferencia radica en el pH al que ambas se activan, pepsina a pH ácido y la proteasa K a un pH cercano al neutro. Por otro lado, los resultados de la concentración bioaccesible de la pepsina no fueron mostrados debido a que obtuvieron baja reproducibilidad y por tanto, valores pocos confiables. Los autores plantearon que estos resultados pueden ser debidos a la alta especificidad de la enzima en la hidrólisis de los enlaces peptídicos. En este caso, sólo se mostraron los resultados de las extracciones de los metales. También comentaron la importancia del control del pH ya que puede variar desde ácido a un pH cercano al neutro al ponerse en contacto la pepsina con la muestra, por la acción del HCl frente a la fase de carbonatos. En estas condiciones de pH la pepsina se desactiva, y por tanto, se puede suponer que la fracción de metales liberados a mayores tiempos se debe fundamentalmente a la formación de complejos con la enzima.

La comparación de la tripsina con la proteasa K mostró que los valores de metales obtenidos eran menores con la tripsina en todos los casos. Al igual que con la pepsina, los resultados de la concentración bioaccesible de la enzima sola no se mostraron debido a que no fueron reproducibles y por tanto, no son confiables, probablemente por la misma razón previamente dada. Concluyen además, que como la tripsina y la proteasa K, son representativas del mismo momento del proceso digestivo, es más recomendable el uso de la segunda para estudios medioambientales.

Por último, los autores también realizaron dos comparaciones entre estas extracciones y la primera etapa de la extracción secuencial BCR (ácido acético al 0,11 M), operacionalmente definido para la fracción de carbonatos. La primera de ellas se realizó entre el la pepsina sin tratar y el HOAc y la segunda entre la pepsina activada

¹⁶⁰ Ianni, C.; Bignasca, A.; Magi, E.; Rivaró. (2010) *Metal bioavailability in marine sediments measured by chemical extraction and enzymatic mobilization*. *Microchemical Journal* 96, 308-316.

(con el HCl) y el HOAc. Los autores concluyeron que el ácido acético sobreestima la fracción determinada por la pepsina sola, claro está, si no se toma en cuenta la contribución del HCl, fundamental en la activación de la enzima. Por tanto, si se toma en cuenta la presencia de HCl, la fracción biodisponible medida por la pepsina/HCl a menudo es similar o superior a la encontrada con el HOAc, para los elementos Al, As, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, V y Zn. Sólo el Cd y el Pb mostraron menores extracciones con la pepsina respecto al HOAc. Finalizan el trabajo evaluando la validez de los resultados según la movilidad de los metales y el factor de enriquecimiento. Así, concluyen que la proteasa K muestra mayor capacidad de reproducción de los procesos naturales⁸⁶.

IV.1.3. Extracción de metales empleando jugos gástricos de especies marinas

En los últimos años se ha desarrollado un nuevo método para desorber y disolver metales desde las partículas de sedimentos simulando las condiciones reales del tracto digestivo de especies marinas, fundamentalmente de invertebrados. Para ello se recogen los líquidos digestivos de animales y se realiza una digestión in Vitro de los sedimentos para luego cuantificar los metales extraídos¹⁶¹. Estos estudios han proporcionado datos importantes que permiten evaluar los ligandos químicos presentes en los fluidos digestivos que más influyen en la desorción de los metales desde las partículas de los sedimentos ingeridos, sugiriendo que la desorción es un requisito previo para la posterior asimilación de los metales por los organismos¹⁶¹. El estudio de extracción de metales por jugos gástricos a partir de animales acuáticos permite, por tanto, evaluar la biodisponibilidad potencial del metal hacia el interior del estómago de los animales. En esta línea de investigación, la fracción del metal extraída por los jugos gástricos obtenidos de los propios organismos detritívoros podría representar el máximo nivel de biodisponibilidad de los metales desde el sedimento⁹³.

¹⁶¹ Griscom, S.B.; Fisher, N.S. (2004) *Bioavailability of sediment-bound metals to marine bivalve mollusc: An overview*. Estuaries 27, 826-838.

Mayer y *col.* realizaron un estudio biomimético en el cual miden directamente la solubilización de contaminantes por fluidos digestivos obtenidos de dos organismos detritívoros, *Arenicola marina* y *Parastichopus californicus*⁸⁹. En este trabajo los autores encontraron una alta y neta concentración de metales en los fluidos digestivos procedente del sedimento. Debido al gran impacto antropogénico de las áreas de estudio se encontraron grandes concentraciones de Cu en las muestras y, para una muestra, concentraciones significativas de Pb. Tras la incubación con los sedimentos del puerto que presentaban altos niveles de contaminación de Cu, los líquidos digestivos de ambas especies mostraron un gran aumento en la concentración de este metal disuelto. Sin embargo, no hubo cambios importantes en la concentración de Li, Co, Rb, Al y Mo, entre otros.

Otro grupo de autores estudiaron la biodisponibilidad de Cd, Cr y Zn, en bivalvos, específicamente almejas (*Mactra veneriformis*) y organismos detritívoros (*Sipunculus nudus*)¹⁴⁹. Para este fin cuantifican y correlacionan los metales extraídos empleando jugos gástricos con las concentraciones de los metales en las diferentes fases mineralógicas determinados mediante una extracción secuencial. Los autores demuestran que existe una marcada diferencia en la asimilación de los metales por los organismos bentónicos estudiados en relación a los sedimentos contaminados. El Cd y el Zn fueron apreciablemente asimilados por las almejas, aunque la concentración de metales en los sedimentos estudiados tiene poca influencia en la digestión y asimilación de los metales por estos bivalvos. Mencionan que los metales se retienen en el intestino por más tiempo en los organismos detritívoros estudiados que en las almejas, siendo una de las causas el tamaño de cada especie. Por otro lado, la biodisponibilidad del Cd en los organismos filtradores aumenta con el aumento de la contaminación en el sedimento, esto es resultado del aumento de la lixiviación de la fase fácilmente intercambiable y la disminución de la extracción en la fase reducible. Plantean que este comportamiento del Cd pueda deberse a que la liberación de este metal de la fase fácilmente intercambiable probablemente se encuentra controlada por la desorción en el intestino animal, mientras que la inhibición del Cd en la fase reducible pueda estar provocada por la competencia entre el Cd y el Fe por los ligandos disponibles en el intestino. También encuentran una correlación entre la

asimilación del Cd y el carbono orgánico total (COT) en los sedimentos, concluyendo que el COT no es el único factor que afecta la asimilación del Cd en estos sedimentos contaminados. Por consiguiente, la eficiencia de asimilación del Cd se correlacionó directamente con la extracción de este metal por los jugos gástricos in vitro en los detritívoros estudiados, mientras que no se encontró correlación para el Cr y el Zn.

Otro grupo de investigadores estudiaron la extracción del Hg inorgánico, su especiación y biodisponibilidad en sedimentos preparados artificialmente¹⁶². Estos autores realizaron una comparación de la extracción de Hg a través de diferentes métodos de digestión, entre los que incluyeron el jugo gástrico de la especie *Sipunculus nudus*, así como un estudio de especiación de metales donde se realizó una extracción secuencial donde el segundo paso fue la extracción del metal soluble en los ácidos del estómago (pH = 2 HCl/HOAc). Concluyeron que la arcilla y el complejo Hg-materia orgánica inhibe la extracción del metal por el contenido gastrointestinal¹⁶².

Por otra parte, en el trabajo mencionado anteriormente de Turner y Olsen, realizaron una comparación de los diferentes extractantes, químicos (ácidos y no ácidos) y enzimáticos, con la concentración obtenida con el fluido gastrointestinal (sin acidificar y acidificado) del *Pleuronectes platessa* L. para definir operacionalmente la fracción biodisponible de contaminantes⁸⁵. Este fluido generalmente solubilizó mayor cantidad de metales que los modelos enzimáticos, lo cual sugiere que existe una gran afinidad de los metales enlazados a los sedimentos por los grupos funcionales enzimáticos presentes en el ambiente natural gastrointestinal. Los autores plantean que cuando el fluido gastrointestinal es acidificado a pH = 2, la solubilización de Fe, Mn y Zn aumenta, pero se reduce la del Cu posiblemente como resultado de la readsorción de los complejos de Cu en los sitios de sorción de las partículas restantes o en nuevos sitios expuestos. Los resultados obtenidos sugieren que la disolución del Fe y Mn enlazados a los sedimentos se lleva a cabo por solubilización reductiva mediante la formación de complejos orgánicos en las superficies de las partículas. Los autores plantean que este mecanismo aumenta en condiciones de pH bajos, siendo

¹⁶² Zhong, H.; Wang, W.-X. (2008) *Effects of sediment composition on inorganic mercury partitioning, speciation and bioavailability in oxic surficial sediments*. Environmental Pollution 151, 222-230.

considerablemente más efectivo para el caso del Mn, el cual se disuelve el 80 % del total, mientras que para el Fe sólo se disuelve el 5 % del total. Por tanto, estos resultados sugieren que los metales enlazados a los óxidos de Mn son más biodisponibles que los enlazados a los óxidos de Fe.

También se puede mencionar el trabajo de Fan y Wang en el cual realizan una comparación de diferentes métodos de digestión para Cd, Cr y Zn en sedimentos contaminados¹⁵⁰. Los métodos fueron agua de mar normal, agua de mar acidificada a pH = 5, agua de mar con sodio dodecil sulfato 1 % (SDS) y el contenido gástrico del gusano *Sipunculus nudus*. Como primera conclusión plantean que, en general, la extracción con el contenido gástrico es superior al resto de los métodos empleados para los metales estudiados. Por otro lado, la correlación obtenida entre la concentración de Cd y varios de los métodos estudiados, entre los que se incluyen el uso del contenido gástrico y el agua de mar, puede indicar que la desorción de este metal no está necesariamente controlada por la actividad digestivo-enzimática y sí, al parecer, por los parámetros físicos-químicos del proceso de desorción. Resultados similares se encontraron para el Zn, aunque siendo menor dicha correlación. Por otro lado concluyen que la disminución del pH aumenta la extracción de los metales.

En general, el método que aplica el jugo gastrointestinal es eficaz y confiable, sin embargo, tiene como aspecto negativo la necesidad de sacrificar gran cantidad de animales para obtener dicho jugo. Es por ello que sigue siendo necesario desarrollar otros métodos en el laboratorio que simulen las condiciones encontradas en ambientes gastrointestinales, ya sea mediante el empleo de ácidos, o incorporando diferentes enzimas presentes en la digestión. En el capítulo anterior se han expuesto los resultados obtenidos para algunos métodos usando extrayentes ácidos. A continuación se analizan los resultados obtenidos del estudio de desorción con pepsina y tripsina realizado en este trabajo.

IV.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Para evaluar la influencia en la extracción de los metales por dos de los tipos de enzimas más importantes en la digestión de los peces, se trabajó con la misma muestra compuesta utilizada en el capítulo anterior.

Para ello se realizaron diferentes digestiones con las enzimas pepsina y tripsina siguiendo los procedimientos que se explican a continuación.

IV.2.1. Desorción de metales empleando pepsina

Para realizar este estudio, 25 ml de disolución de pepsina acidificada (0,15 % w/v de pepsina ajustada a pH = 1 con HCl) fueron añadidos a 0,25 g de muestra de sedimento en un reactor de PTFE y a continuación se agitaron mecánicamente a 40° C y durante 12 horas. A continuación, las muestras se filtraron a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm de diámetro y se siguió la misma metodología utilizada en el método con HCl. La enzima utilizada fue la Pepsina A de la mucosa del estómago porcino con una actividad de 600 unidades por mg de proteína. Este estudio también se realizó para los pH 2, 3 y 4.

IV.2.2. Desorción de metales empleando tripsina

El estudio con la enzima representativa de las condiciones digestivas del intestino de los peces se realizó mediante la siguiente metodología. Se pesaron 0,25 g de muestra de sedimento al que se le añadieron 25 ml de disolución de tripsina (0,15 % w/v de tripsina II-S ajustada a pH 7,6 con NaOH) en un reactor de PTFE y se puso a reaccionar durante 12 horas a 40° C. A continuación se siguió el mismo procedimiento de filtrado y conservación de los métodos anteriores.

IV.2.3. Desorción de metales empleando una mezcla de pepsina + tripsina

Este estudio se realizó para conocer la influencia de la mezcla de ambas enzimas en la extracción de metales en los sedimentos. Por otro lado se evaluó la influencia del tiempo de contacto de cada enzima en la extracción de los metales. Así, se realizó un primer estudio con un tiempo de contacto de seis horas para cada enzima y un total de 12 horas de digestión. En el segundo estudio fueron doce horas de contacto para cada enzima para un total de 24 horas de digestión.

Para ello, se pesaron alrededor de 0,25 g de sedimento por triplicado y se agregaron en un reactor de PTFE al que se le adicionaron 25 ml de disolución de pepsina (siguiendo las condiciones de la digestión con pepsina a pH = 1) agitándose mecánicamente durante seis horas a 40° C. Posteriormente se agregaron 25 ml de disolución de tripsina (siguiendo las condiciones de la digestión con tripsina), subiendo el pH de la disolución a 8,2 y se continuó agitando por otras seis horas a 40° C. Finalmente, la muestra fue filtrada siguiendo el mismo procedimiento previamente descrito en los otros métodos.

Este mismo procedimiento se repitió pero aumentando el tiempo de digestión a 12 horas para cada una de las enzimas. Al primero de los métodos de combinación de pepsina + tripsina le llamaremos Pep+Trip (6h) y al segundo Pep+Trip (12h).

IV.3. Evaluación de métodos enzimáticos para simular los procesos digestivos de los peces

IV.3.1. Método de pepsina

En primer lugar, se realizó un estudio de extracción de metales pesados a un pH en un intervalo entre 1 y 4, representativo de las condiciones gástricas, a una temperatura de 40° C y un tiempo de contacto de 12 horas. De esta manera, se pudo estudiar la influencia de los pH en la desorción del metal bajo condiciones similares de

tiempo de contacto y temperatura seleccionados como referencia para el método de HCl estudiado.

Como se observó para la extracción con HCl, el método de pepsina (peps/HCl) mostró dos comportamientos diferentes. Por un lado, el Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Ni, Pb y Zn mostraron extracciones por encima del límite de detección sólo para pH = 1. Por otro lado, el Mn, V y Ti mostraron también extracciones por encima del límite de detección para pH = 2, como se observa en la Tabla IV.1. Cuando se aumentó el pH a 3 y 4, las concentraciones extraídas de todos los metales quedaron por debajo del límite de detección.

IV.1. Efecto de la variación del pH en la extracción con pepsina.

Elemento	[Metal], %	
	pH = 1	pH = 2
Al	3,2	< 0,3
As	38	< 2,5
Cd	72,7	< 17
Co	78,7	< 2,4
Cr	5,8	< 4,9
Cu	56,4	< 5
Fe	9,5	< 1,1
Li	14	< 1,7
Mn	74,4	8,5
Ni	31,4	< 2,9
Pb	24,8	< 9
Ti	0,8	0,2
V	18,3	1,7
Zn	46,3	< 0,06

Este comportamiento es similar al observado para la extracción con HCl, excepto para el Li, que con la peps/HCl no fue detectado a pH = 2. Para el As, Cd, Cr, Ni, Pb, Ti y V los porcentajes de extracción se encuentran en el mismo orden, siendo cercanos o

similares en muchos casos. Sin embargo, para el Al, Co, Cu, Fe, Li, Mn y Zn los porcentajes de extracción obtenidos por los métodos de HCl (pH = 1) y peps/HCl (pH = 1) presentaron algunas diferencias que se expondrán más adelante.

IV.3.1.1. Balance de masas

Una vez más se realizó el BM para este método de digestión parcial. Sólo los resultados para pH = 1 se muestran en la Tabla IV.2, mientras que el resto de los resultados para pH = 2 se pueden encontrar en el Anexo 6.

Tabla IV.2. Balance de Masa (BM) para el método de digestión de peps/HCl a pH =1, 12 horas y 40° C.

Elemento	[metal] ± s, mg·kg ⁻¹			BM, %
	Disolución	Residuo	Total	
Al	2130 ± 15	59707 ± 12	66342 ± 11	93 ± 4
As	4,1 ± 0,1	6,0 ± 0,3	10,8 ± 0,2	94 ± 6
Cd	0,08 ± 0,03	0,021 ± 0,008	0,11 ± 0,01	100 ± 1
Co	5,98 ± 0,06	1,2 ± 0,1	7,6 ± 0,5	94 ± 3
Cr	4,9 ± 0,3	77 ± 3	85 ± 2	96 ± 3
Cu	14,6 ± 0,7	8,9 ± 0,4	25,9 ± 0,8	91 ± 6
Fe	3439 ± 58	30690 ± 66	36111 ± 58	95 ± 5
Li	3,0 ± 0,3	17 ± 2	21,5 ± 0,9	93 ± 5
Mn	395,9 ± 0,4	120 ± 6	532 ± 17	97 ± 3
Ni	11,6 ± 0,2	25 ± 2	37 ± 1	98,9 ± 0,7
Pb	10,9 ± 0,7	29 ± 1	44 ± 2	90 ± 5
Ti	30 ± 2	3658 ± 6	3692 ± 13	99 ± 1
V	21,2 ± 0,6	87 ± 3	116 ± 2	93 ± 5
Zn	33,8 ± 0,1	38 ± 4	73 ± 3	98 ± 2

Como se puede observar en la tabla, la recuperación estuvo entre un 90 - 99 %. Para el pH = 2, los resultados estuvieron entre un 88 – 95 % de manera general. Los

valores inferiores al 90 % pueden deberse a que se está trabajando con concentraciones muy cercanas al límite de cuantificación en las disoluciones de pepsina.

Una vez más, con estos resultados, se aseguró el correcto desempeño analítico del método de digestión parcial estudiado.

IV.3.1.2. Estudio de biodisponibilidad con peps/HCl

A continuación se realizó un estudio de la biodisponibilidad de los metales considerados con peps/HCl (pH = 1), donde el orden encontrado fue Co > Mn > Cd > Cu > Zn > As > Ni > Pb > V > Li > Fe > Cr > Al > Ti. El Cd, Co y el Mn fueron extraídos en un 73, 79 y 74 % respectivamente. El Cu y el Zn se extrajeron por su parte en un 56 y un 46 % respectivamente, seguidos por el As con un 38 %, mientras el resto de los metales fueron extraídos por debajo del 31 %, siendo el Al, Cr y Ti los menos lixiviados (~ 0,8 - 6 %). Cuando se compara este orden de biodisponibilidad con el obtenido por el método de digestión con HCl (pH = 1) se concluye que nuevamente el Cd, Co y Mn son los elementos más biodisponibles, mientras que el Al, Cr y Ti los menos biodisponibles. Por otro lado, si comparamos estos resultados de extracción con pepsina, con los publicados por Bignasca y *col.*⁸⁶, se puede observar que en su estudio, para ambos casos, el Cd y el Mn son los elementos más móviles, mientras que el Fe y el Cr los menos móviles. Sin embargo, el Zn y el Ni muestran diferencias entre el presente estudio y el de Bignasca y *col.*, siendo ambos metales más móviles que el Cu en el presente trabajo probablemente debido a las posibles diferencias en la asociación de los metales en ambos sedimentos. En los sedimentos estudiados por Bignasca y *col.* predomina la calcita como fase fundamental, con cerca de un 60 %, mientras que en el sedimento evaluado en el presente trabajo la calcita se encuentra en menor proporción, con alrededor del 36 %, pudiéndose encontrar más biodisponibles algunos metales en las muestras estudiadas por Bignasca y *col.*^{86,163}.

¹⁶³ Bellucci, L.C.; Frignani, M.; Paolucci, D.; Ravanelli, M. (2002) *Distribution of heavy metals in sediments of the Venice Lagoon: the role of the industrial area*. The Science of the Total Environment 295, 35–49.

Por otra parte, cuando se comparan los comportamientos de extracción de los metales para los métodos de digestión con peps/HCl y HCl (pH = 1) las biodisponibilidades fueron similares de manera general. Como se aprecia en la Tabla IV.3, al aplicarse una prueba t de una sola cola para la comparación de dos medias experimentales para una cola, se observa que las diferencias fueron significativas para el Al, Co, Li, Mn, Ti, V y Zn, observándose mayores extracciones para la peps/HCl en el caso del Zn, y menores para el Al, Co, Li, Mn, Ti y V. Este resultado se aprecia en la Figura IV.2, donde se muestran los porcentajes de extracción de los métodos con peps/HCl y HCl (pH = 1) para los metales detectados.

Tabla IV.3. Resultados de la prueba t para la comparación de las concentraciones extraídas por la peps/HCl y el HCl (pH = 1) expresadas en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Metal	[metal] \pm s, $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$			Prueba t
	HCl	pepsina	$t_{\text{experimental}}$	
Al	2925 \pm 47	2130 \pm 175	5,3	Rechazado
As	4,3 \pm 0,2	4,1 \pm 0,4	0,6	Aceptado
Cd*	0,08 \pm 0,03	0,080 \pm 0,004	1,6	Aceptado
Co	6,91 \pm 0,08	6,0 \pm 0,7	2,6	Rechazado
Cr	5,0 \pm 0,1	4,9 \pm 0,4	0,4	Aceptado
Cu	13,2 \pm 0,4	14,6 \pm 5	0,5	Aceptado
Fe	3220 \pm 76	3439 \pm 350	1,1	Aceptado
Li	8 \pm 1	3,0 \pm 0,6	2,3	Rechazado
Mn	492 \pm 10	396 \pm 38	4,2	Rechazado
Ni	11,9 \pm 0,2	11 \pm 1	0,4	Aceptado
Pb	11,8 \pm 0,5	11 \pm 1	1,0	Aceptado
Ti	58 \pm 2	30,1 \pm 4	12,4	Rechazado
V	25,2 \pm 0,6	21 \pm 2	2,8	Rechazado
Zn	25 \pm 1	33,8 \pm 0,8	9,0	Rechazado

$t_{\text{tabla}} (n = 4, \alpha = 0,05) = 2,13$ y $t_{\text{tabla}} (n = 2, \alpha = 0,05) = 4,30$

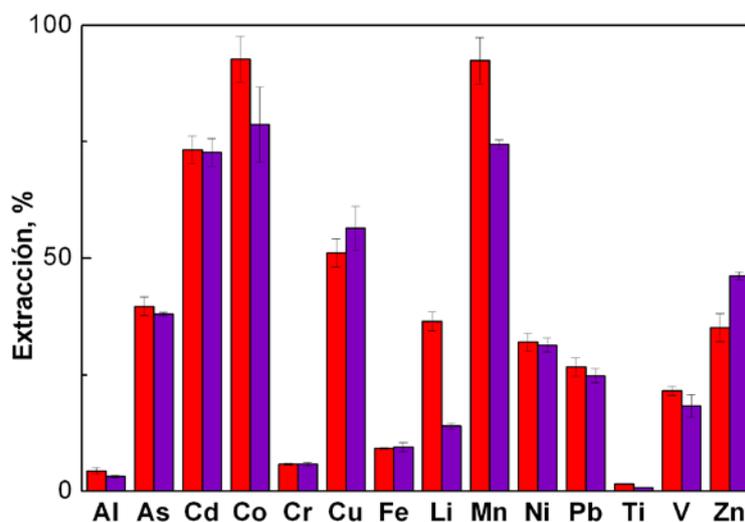


Figura IV.2. Comparación de la extracción de metales obtenida con el HCl: (■) y Peps/HCl: (■).

El hecho de que ambos métodos muestren extracciones similares para As, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni y Pb, indica que la presencia de pepsina no varía la extracción del HCl. Sin embargo, la reducción en la extracción de Al, Co, Li, Mn, Ti y V; y el aumento del Zn si indican un efecto sinérgico propiciado por la presencia de pepsina que influye en la extracción del analito.

La mayor extracción obtenida para un grupo de elementos en presencia sólo de HCl concuerda con algunos resultados encontrados en la literatura. Tal es el caso de Amiard y *col.*, que plantean que el efecto del pH influye más en la extracción de los metales que la acción de la enzima en sí¹⁵⁹, o el de Turner y *col.*, que concluyen que el principal mecanismo de liberación de metales es debido a la acción del HCl y no a la pepsina¹¹⁹.

Para el caso del Zn, en el cual la concentración obtenida con la pepsina es superior a la obtenida con el HCl, se propone en algunos trabajos en la literatura, que el mecanismo de acción de la pepsina para disolver metales de los sedimentos pudiera ser a través de la formación de complejos metal-enzima, de manera tal que a la acción del pH se le uniría este mecanismo de acción de formación de complejos^{85,86,119}.

Del estudio con peps/HCl se puede concluir que la mayor importancia la tiene la acción positiva del carácter ácido del HCl en la extracción de los metales estudiados que de la enzima en sí, cuya presencia puede incluso llegar a reducir la extracción de algunos metales. Sólo la extracción del Zn es significativamente mayor en presencia de Pepsina que con el ácido sólo.

Aunque son varios los autores que señalan la posibilidad de que el mecanismo de extracción de metales debido a la acción de la pepsina sea mediante la formación de complejos, hasta el momento no se han encontrado referenciados trabajos en los que se demuestre mediante alguna técnica la presencia del complejo metal-pepsina. En este trabajo se decidió realizar un estudio por espectrometría ultravioleta con el objetivo de comprobar la posible formación de un compuesto entre los metales y la pepsina que favorezca la extracción, ya que en el caso del zinc se observó mayor lixiviación en presencia de la enzima. Estos estudios, aunque no concluyente, sí permitieron establecer diferencias entre el comportamiento metal-enzima para los diferentes metales estudiados.

Para ello se evaluaron los espectros de una disolución de metal a una concentración determinada, de una disolución de pepsina (2 %) y de una disolución con la mezcla de ambos (al ponerse en contacto ambas disoluciones previamente mencionadas), todas ellas en matriz de HCl (pH = 1). Es de esperar que si no se forma algún tipo de compuesto entre el metal y la enzima el espectro resultante de la mezcla debe coincidir con la suma de los espectros individuales (disoluciones independientes de metal y pepsina). De este modo se obtuvieron espectros para todos los metales, comentando a continuación los ejemplos más significativos.

Para la mayoría de los metales el espectro resultante de la mezcla se correspondió con la suma de los espectros individuales, no presentando evidencias de formación de complejos enzima-metal. Este resultado se muestra en la Figura IV.3 para el Cd a modo de ejemplo, donde se puede observar que no hay diferencia entre la señal de la mezcla y la de los espectros individuales en todo el intervalo del espectro estudiado.

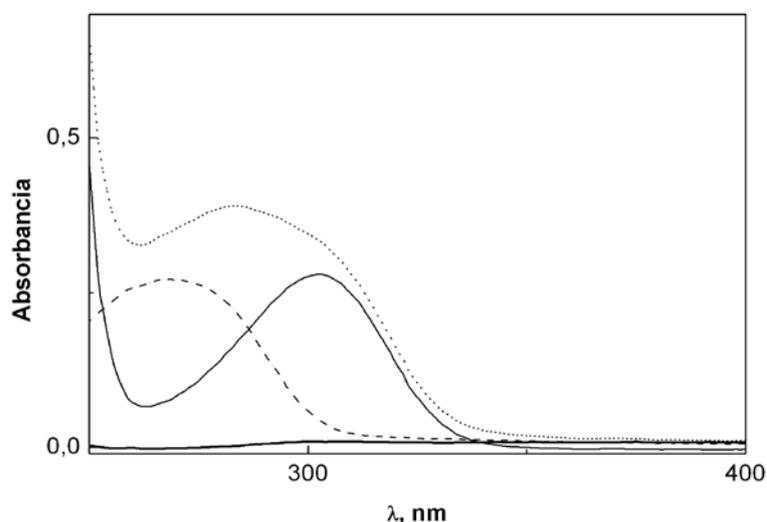


Figura IV.3. Espectro de ultravioleta del Cd frente a la pepsina. (—): A_{Cd} , (- -): A_{peps} , (· · ·): $A_{Cd+peps}$ y (—): $[A_{Cd}+A_{peps}-A_{Cd+peps}]$.

Un segundo comportamiento diferenciado fue el observado para los metales cobre y zinc, en los que sí pudo establecerse diferencias en los espectros de absorción registrados. El primero de ellos se muestra en la Figura IV.4, pudiendo observar que el rango de longitud de onda a la que absorbe cada compuesto se diferencia totalmente, lo que facilita la interpretación de los resultados. Se ha decidido no mostrar en la gráfica las absorbancias mayores a 0,5 por la diferencia de escala entre los dos espectros. En la figura es posible observar claramente que al mezclarse ambos compuestos se produce un descenso en las absorbancias de las bandas que corresponden a cada uno de ellos, de modo que la diferencia en este caso es menor a cero en el rango de longitudes de onda en que absorbe el cobre. Esto pone de manifiesto que en la mezcla la cantidad de metal y/o pepsina disminuye en relación a la inicial, pudiendo deberse a que se produce la formación de un nuevo compuesto (Cu-pepsina) entre ambos.

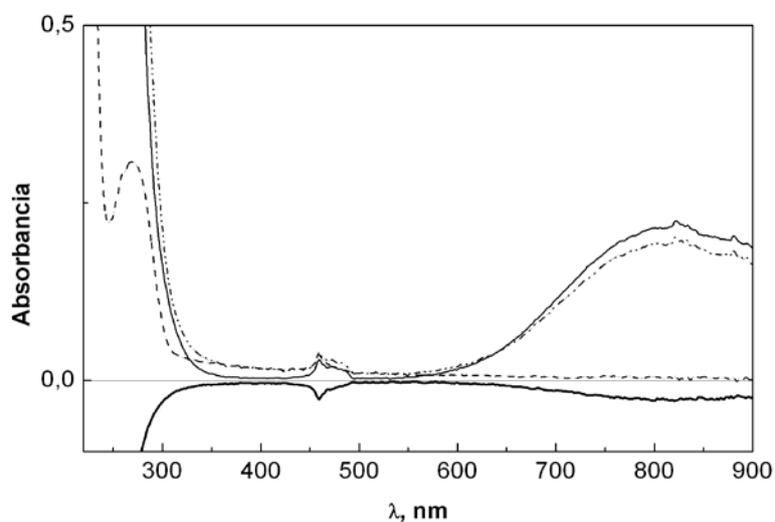


Figura IV.4. Espectro de ultravioleta del Cu frente a la pepsina. (—): A_{Cu} , (- -): A_{peps} , (- · -): $A_{Cu+Peps}$ y (—): $[A_{Cu} + A_{peps} - A_{Cu+peps}]$.

Aunque este resultado parece indicar que, como señalan algunos autores, la pepsina podría extraer el Cu mediante la formación de complejos, las extracciones obtenidas en este trabajo en presencia de HCl con y sin pepsina no muestran diferencias significativas, como se muestra en la Tabla IV.3. Esto podría significar que los complejos no son suficientemente fuertes como para competir con los enlaces del metal al sedimento o bien que la formación de este complejo puede ser en cantidades tales que la extracción adicional por este mecanismo no es significativa.

Un comportamiento similar se ha observado para el Zn, representado en la Figura IV.5, en la cual, a pesar de que ambas señales, la del metal y la de la pepsina, se encuentran muy cercanas, al restarlas de la mezcla nuevamente el valor de absorbancia es inferior a cero, con lo cual se podría estar formando un compuesto entre el Zn y la pepsina.

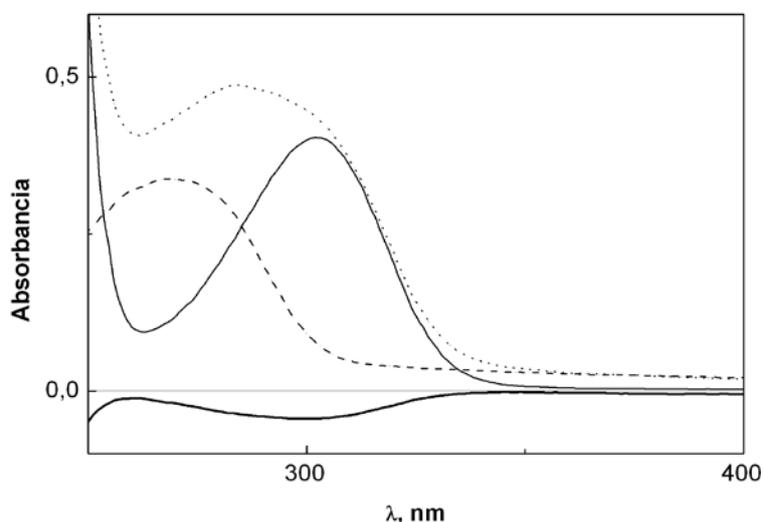


Figura IV.5. Espectro de ultravioleta del Zn frente a la pepsina. (—): A_{Zn} , (· · ·): A_{peps} , (- · -): $A_{Zn+Peps}$ y (—): $[A_{Zn}+A_{peps}-A_{Zn+peps}]$.

Al contrario de lo observado en el caso del Cu, para el Zn sí que existe un aumento significativo de la extracción en presencia de pepsina, como muestra la Tabla IV.3, por lo que en este caso el mecanismo de formación de complejos sí podría tener mayor importancia durante el proceso.

Del estudio con pepsina se puede concluir que, en general, parece ser más importante la acción del pH que de la enzima en sí. La acción de esta enzima afecta relativamente poco la extracción de los metales. Solo la extracción del Zn es significativamente mayor que con el ácido sólo. Con vistas a la selección de un método que simule en el laboratorio la extracción de metales en partículas del sedimento ingeridas por especies marinas, la selección del método de HCl sin la pepsina parece ser más adecuado, porque en última instancia produciría una cierta sobreestimación de la extracción para algunos elementos. Es preferible correr este riesgo, que el de la subestimación que se produciría al incluir la Pepsina.

IV.3.2. Método de Tripsina

A continuación se expondrán los resultados obtenidos del estudio con trips/NaOH a pH = 7,8. Como se puede observar en la Tabla IV.4, donde se muestra la concentración de los metales extraída por el método de tripsina en la muestra de sedimento y sus respectivos porcentajes de extracción, se obtuvo poca extracción de los metales estudiados mediante el empleo de este método. La mayoría de los metales se encontraron por debajo del límite de detección, con la excepción del As, Co, Cu, Li, Ni, y Zn.

Tabla IV.4. Resultado de la extracción con el método de Tripsina.

Metal	[metal] ± s, mg·kg⁻¹	Extracción, %
Al	< 230	-
As	0,4 ± 0,1	3,7
Cd	< 0,021	-
Co	0,30 ± 0,01	3,9
Cr	< 4,2	-
Cu	7,4 ± 0,5	28,6
Fe	< 304	-
Li	0,63 ± 0,1	2,9
Mn	< 20	-
Ni	3,1 ± 0,3	8,4
Pb	< 4,7	-
Ti	< 3	-
V	< 5	-
Zn	2,2 ± 0,5	3

En general, la cantidad de cada metal extraída fue menor al 4 % del contenido total presente en los sedimentos, exceptuando el Cu con un 28,6 % y el Ni con un 8,4 %. Por tanto, se obtiene menor biodisponibilidad de los metales evaluada por la acción de esta enzima respecto a la biodisponibilidad evaluada con las extracciones con HCl (pH

= 1) y pepsina, lo que se aprecia en la Figura IV.6. Esto puede deberse a que la tripsina es representativa de otra parte del sistema digestivo de los peces, el intestino, con un pH del medio diferente, de 7,8. En estas condiciones de pH la acción ácida del HCl es totalmente inhibida, lo que confirma la importancia de la acción del pH del medio para la extracción de metales respecto a la acción enzimática.

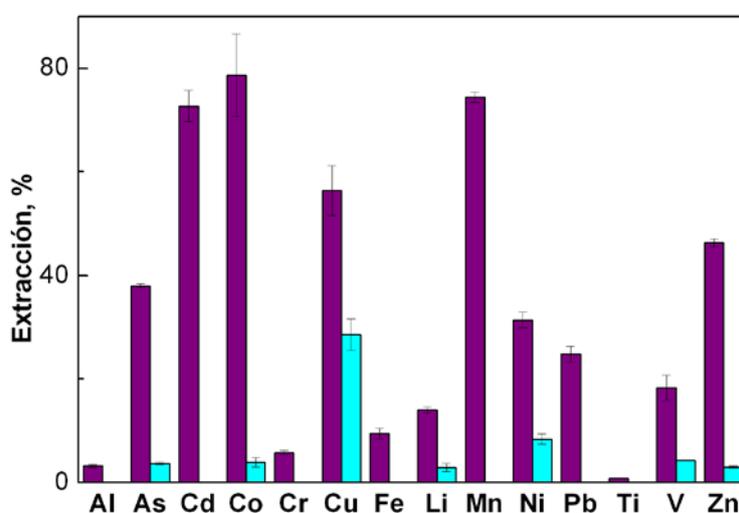


Figura IV.6. Porcentajes de extracción de los metales con las digestiones de (■): peps/HCl y (■): trips/NaOH. Las barras de error representan la desviación estándar.

IV.3.2.1. Balance de masas

Siguiendo la misma metodología empleada hasta el momento, se realizó el BM para los elementos que fueron detectados. En la Tabla IV.5 se muestra la concentración de metales en la disolución, la concentración obtenida en el residuo y el porcentaje de recuperación de cada metal.

Como puede observarse, todas las recuperaciones son mayores al 90 %, por tanto, se garantiza el correcto desempeño analítico del método evaluado, para este caso, el método de Tripsina.

Tabla IV.5. Balance de Masa (BM) para el método de digestión de Tripsina/NaOH a pH =7,8.

Elemento	[metal] ± s, mg·kg ⁻¹			BM, %
	Disolución	Residuo	Total	
As	0,4 ± 0,1	9,4 ± 0,7	10,8 ± 0,2	91 ± 5
Co	0,30 ± 0,01	7 ± 1	7,6 ± 0,5	96 ± 3
Cu	7,4 ± 0,5	16 ± 1	25,9 ± 0,8	90 ± 4
Li	0,6 ± 0,1	19 ± 3	21,5 ± 0,9	91 ± 6
Ni	3,1 ± 0,3	31 ± 3	37 ± 1	92 ± 5
Zn	2,2 ± 0,5	68 ± 6	73 ± 3	96 ± 4

IV.3.2.2. Estudio de biodisponibilidad con tripsina

Como se ha mencionado anteriormente, la biodisponibilidad de los metales con el método de digestión de trips/NaOH, fue menor que la obtenida con las digestiones ácidas y con la peps/HCl de manera general. No sólo se detectaron menor número de metales, sino también los que pudieron ser cuantificados muestran bajos porcentajes de extracción respecto al resto de los métodos. El orden de biodisponibilidad con la trips/NaOH fue Cu > V > Ni > Co > As > Zn = Li > Cr. Si se comparan estos resultados con el método de HCl pH =1 y con la peps/HCl, se observan muchas diferencias. Entre las diferencias encontradas se encuentran el Cu y el Ni fueron los elementos más biodisponibles con tripsina que con los dos métodos mencionados previamente, mientras que el Zn y el Li pasaron a ser los elementos menos biodisponibles con el empleo de la trips/NaOH.

De manera general, se confirma la fuerte influencia del pH en la liberación de los metales en los sedimentos, donde la digestión con pepsina ocurre a un pH fuertemente ácido y la digestión con la Tripsina, a un pH básico. Teniendo en cuenta este resultado, se pudiera pensar que la fase más importante en la extracción de los metales del sedimento en el sistema digestivo de los peces, es la que tiene lugar en el estómago, debido fundamentalmente al bajo pH en esta zona. El intestino tiene menor influencia en la extracción o movilización de los metales presentes en los sedimentos.

Cuando se comparan los resultados de extracción con trips/NaOH de este trabajo con los de Bignasca y *col.* se pueden encontrar similitudes en los órdenes de movilidad. Sin embargo los porcentajes de extracción obtenidos en la presente tesis fueron superiores a los encontrados en el trabajo previamente citado⁸⁶. Por otra parte, los elementos Cd, Cr, Fe, Mn y Pb, los cuales no fueron detectados en este trabajo, si fueron extraídos en el trabajo de Bignasca y *col.*⁸⁶. En ambos trabajos el Cu es el elemento más móvil bajo la acción de la tripsina, sin embargo, son notables algunas diferencias entre ambos trabajos. Tal es el caso del Zn, que resultó ser uno de los metales menos móviles en este estudio, sin embargo es el segundo elemento más móvil en el trabajo citado. Finalmente, se encontró un comportamiento contrario para el Ni, que es el segundo metal más móvil en el presente trabajo y es uno de los menos móviles reportado por Bignasca y *col.* Las desigualdades entre ambos trabajos pudieran explicarse por las diferencias en la composición de los sedimentos evaluados en ambos estudios. Por último, en ambos trabajos la extracción de los metales con pepsina es superior a la obtenida con la tripsina.

IV.3.3. Método combinado de Pepsina + Tripsina

Los resultados obtenidos para los dos métodos evaluados, para diferentes tiempos de contacto de los sedimentos con las enzimas, se muestran en la Figura IV.7 como porcentajes de extracción para cada metal.

Se debe comenzar mencionando que el Cr y Ti se encontraron por debajo del límite de detección para ambos métodos evaluados, por esta razón no se encuentran representados en la Figura IV.7. Sólo el As, Cd, Cu, Li y Ni se encontraron por encima del límite de detección por el método Pep+Trip (12h), mientras que el Al, As, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, V y Zn fueron detectados por el método Pep+Trip (6h). Para el método de digestión Pep+Trip (6h) el porcentaje extraído fue superior al 25 % para la mayoría de los metales estudiados, mientras que, contrariamente a lo esperado, la extracción disminuyó notablemente con el aumento del tiempo de contacto a doce

horas de digestión para cada enzima, siendo menor al 25 % la lixiviación de los metales por el método Pep+Trip (12h), excepto para el Cd.

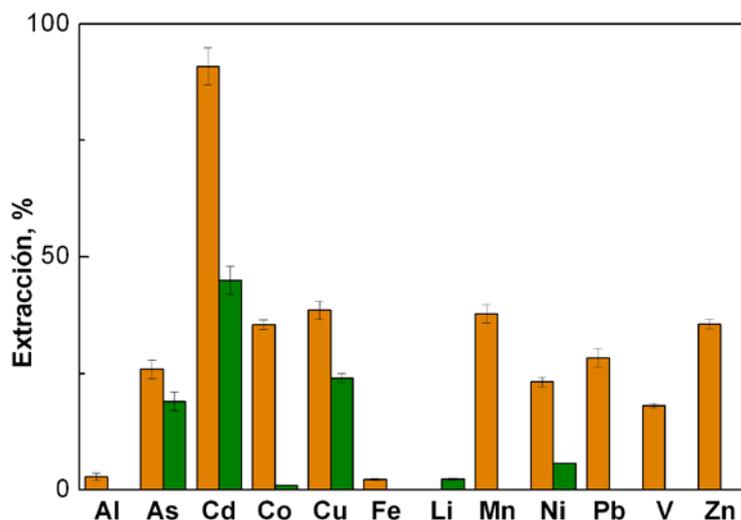


Figura IV.7. Comparación de los porcentajes de extracción de los metales para el método de pepsina y tripsina. (■): Pep+Trip (6h) y (■): Pep+Trip (12h).

En primer lugar, se puede plantear que, como se ha mencionado previamente, la digestión debe ocurrir durante las primeras seis horas de contacto, bajo la acción de la pepsina en condiciones ácidas. Al añadirse la tripsina, bajo condiciones básicas, la extracción no sólo se detiene, sino que parece comenzar un proceso de precipitación de los metales o readsorción en el sedimento debido al cambio brusco del pH, que como se ha comentado anteriormente pasa de pH = 1 a 8 aproximadamente. Por otro lado, la extracción con el método de Pep+Trip (6h), obtiene resultados intermedios entre la extracción con HCl o peps/HCl y el método de trips/NaOH solo. En el caso del método de HCl o peps/HCl, la extracción se extendió a doce horas, que es donde la mayoría de los metales alcanzan el máximo de extracción. El resultado obtenido con la mezcla de enzimas también sugiere que seis horas no son suficientes para extraer el metal disponible mediante la primera fase de la digestión. Sin embargo, como se

puede observar, para el Cd no es necesario el aumento del tiempo de extracción, puesto que con seis horas se extrae alrededor del 90 % del metal disponible a esta reacción. Este resultado con la mezcla de enzimas para la extracción de Cd coincide con la extracción de este metal por el HCl pH = 1 realizado previamente, donde la variación del tiempo no era significativa para la extracción de este metal.

El orden de biodisponibilidad para el método Pep+Trip (6h) fue Cd> Cu> Mn> Zn> Co> Pb> As> Ni> V> Al> Fe, mientras que para el método Pep+Trip (12h) fue Cd> Cu> Co> As> Ni> Li. En ambos casos los elementos más biodisponibles fueron el Cd y el Cu, sin embargo, las biodisponibilidades del resto de los metales varían significativamente. Tal es el caso del Mn, Zn, Ni, V, Al, Fe los cuales no fueron detectados por el método de doce horas, mientras que el Li se encontró por debajo del límite de detección por el método de Pep+Trip (6h).

Cuando se comparan estos resultados con los métodos de HCl y de peps/HCl, son evidentes algunas diferencias. El Cu pasa a ser el segundo elemento más biodisponible bajo la acción de ambos métodos combinados, por lo que se puede pensar que este metal se encuentra parcialmente asociado a alguna fase muy lábil que puede estarse disolviendo durante las primeras horas de reacción. Por otro lado, el Co y el As pasaron a ser menos biodisponibles que el Zn y el Pb respectivamente. En este caso puede estar ocurriendo una precipitación o re-adsorción del Co y el As debido al cambio brusco del pH, lo cual conlleva a una disminución de su biodisponibilidad. El Pb y el V, mantienen el mismo porcentaje de extracción que los obtenidos por los métodos de HCl y peps/HCl, mientras que el Zn mantiene el mismo porcentaje de extracción que el método de HCl. Se debe recordar que el Zn fue más extraído por el método de la peps/HCl que con el HCl. En el caso de los metales que no fueron detectados, pudiera pensarse que el proceso de precipitación o re-adsorción debido al cambio brusco del pH es mayor que para el Co y el As, de ahí su disminución en la biodisponibilidad. Esta posible re-adsorción fue mencionada por Bignasca y *col.*, donde incluye al Cu como ejemplo de los metales que pueden ser re-adsorbidos bajo los efectos del cambio de pH⁸⁶. Por otro lado, cuando se compara la movilidad del método Pep+Trip (12h) con los métodos de HCl pH = 1 y el de Pepsina, no se muestran diferencias entre los órdenes de movilidad, pero si en los porcentajes

de extracción, que como ya se ha mencionado, son menores por el método de pepsina y tripsina.

De manera general, se puede pensar que la principal extracción de metales desde los sedimentos, dentro del tracto digestivo de las especies acuáticas, tendrá lugar en el estómago debido a la acción del HCl del medio, segregado en este órgano tras la llegada del bolo alimenticio.

IV.3.3.1. Balance de masas

Como se ha hecho anteriormente a lo largo de todo el trabajo, se evaluó el porcentaje de recuperación de ambos métodos mediante el estudio de un Balance de Masas. Las Tablas IV.6 y IV.7 muestran los resultados obtenidos.

Tabla IV.6. Balance de Masa (BM) para el método de digestión de Pep+Trip (6h).

Elemento	[metal] ± s, mg·kg ⁻¹			BM, %
	Disolución	Residuo	Total	
Al	1878 ± 84	60003 ± 12	66342 ± 11	93 ± 4
As	2,8 ± 0,4	7,1 ± 0,2	10,8 ± 0,2	92 ± 6
Cd	0,10 ± 0,02	0,010 ± 0,002	0,11 ± 0,01	100 ± 2
Co	2,7 ± 0,1	4,4 ± 0,1	7,6 ± 0,5	93 ± 2
Cu	10,0 ± 0,2	13,9 ± 0,6	25,9 ± 0,8	92 ± 1
Fe	805 ± 23	32330 ± 66	36111 ± 58	92 ± 4
Mn	201 ± 3	120 ± 6	532 ± 17	97 ± 3
Ni	8,6 ± 0,1	26 ± 3	37 ± 1	94 ± 2
Pb	12,5 ± 0,1	30 ± 3	44 ± 2	97 ± 3
V	21 ± 1	90 ± 5	116 ± 2	96 ± 4
Zn	26 ± 3	39,3 ± 0,4	73 ± 3	89 ± 5

Como se puede observar en la Tabla IV.6, para todos los metales el porcentaje de extracción se encontró por encima del 90 % cuando se usa el método de Pep+Trip

(6h), excepto para el caso del Zn, donde se recuperó un 89 % del total presente en la muestra. Se demuestra así el buen desempeño analítico del procedimiento.

Tabla IV.7. Balance de Masa (BM) para el método de digestión de Pep+Trip (12h).

Elemento	[metal] ± s, mg·kg ⁻¹			BM, %
	Disolución	Residuo	Total	
As	2,0 ± 0,3	7,8 ± 0,4	10,8 ± 0,2	91 ± 2
Cd	0,05 ± 0,01	0,058 ± 0,001	0,11 ± 0,01	98 ± 2
Co	1,6 ± 0,06	5,7 ± 0,3	7,6 ± 0,5	96 ± 3
Cu	6,0 ± 1,0	18,3 ± 0,7	25,9 ± 0,8	94 ± 4
Li	0,50 ± 0,02	20 ± 3	21,5 ± 0,9	95 ± 5
Ni	2,1 ± 0,1	33 ± 2	37 ± 1	95 ± 3

Como se puede observar en la Tabla IV.10, todas las recuperaciones del BM para el método de Pep+Trip (12h) estuvieron por encima del 90 %, mostrando el correcto desempeño analítico del método estudiado.

IV.3.4. Comparación de los diferentes métodos empleados para simular las condiciones digestivas de los peces

Para una mejor interpretación de los resultados e identificación de las relaciones entre los diferentes metales y procedimientos de extracción, así como posibles tendencias ocultas en los resultados, fue conveniente la realización de un Análisis de Componentes Principales (ACP) que permita agrupar los metales y los métodos de digestión según sus comportamientos.

La matriz de los datos se conformó con las concentraciones extraídas de los catorce elementos estudiados: Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Ti, V y Zn ordenados en catorce columnas, por los nueve procedimientos estudiados y que fueron ordenados en nueve filas. Los elementos constituyen las variables originales y las nueve filas corresponden a los nueve métodos de digestión: HCl pH = 1, HCl pH = 2,

HNO₃, HOAc 0.11 M, HOAc 25 %, peps/HCl, trips/NaOH, Pep+Trip (6h) y Pep+Trip (12h).

Como resultado de la aplicación del ACP, las variables originales fueron reducidas a las dos primeras componentes, CP1 y CP2 siguiendo el criterio de seleccionar las componentes con autovalor > 1. Las mismas explican el 88,1 % (CP1: 74.2 % y CP2: 13,9 %) del total de la variabilidad contenida en los datos iniciales.

Para conocer cuáles de las variables iniciales fueron mejor representadas en cada una de las nuevas componentes seleccionadas se calculó la matriz de cargas, la cual se muestra en la Tabla IV.8.

Tabla IV.8. Cargas de las nuevas variables resultantes del ACP sin rotación

	Componente	
	1	2
Al	0,989	-0,012
As	0,834	-0,505
Cd	0,777	-0,258
Co	0,940	-0,035
Cr	0,597	0,713
Cu	0,915	-0,227
Fe	0,926	-0,221
Li	0,869	0,158
Mn	0,991	0,052
Ni	0,986	-0,073
Pb	0,932	-0,210
Ti	0,705	0,643
V	0,458	0,728
Zn	0,941	-0,058

Como se puede observar, prácticamente todos los metales influyen sobre la CP1, exceptuando el Cr y V que tienen mayor carga sobre la CP2. El Ti también que comparte la carga sobre la CP2 y la CP1.

Con el objetivo de obtener una mejor definición de la influencia de cada una de las variables originales en las nuevas componentes, se aplicó una rotación del tipo varimax.

De esta manera se conformaron dos nuevas componentes principales, las cuales explican igualmente el 88,1 % de la variabilidad total contenida en los datos. Las cargas sobre las nuevas componentes se muestran en la Tabla IV.9.

Tabla IV.9. Cargas de las nuevas variables resultantes del ACP con rotación varimax

	Componente	
	1	2
Al	0,887	0,436
As	0,972	-,074
Cd	0,810	0,121
Co	0,854	0,394
Cr	0,210	0,906
Cu	0,918	0,211
Fe	0,926	0,221
Li	0,704	0,534
Mn	0,861	0,495
Ni	0,913	0,380
Pb	0,926	0,234
Ti	0,339	0,892
V	0,080	0,856
Zn	0,866	0,373

Como puede observarse en la Tabla IV.9, la mayoría de los metales (Al, As, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb y Zn) muestran mayores cargas sobre la CP1, mientras que el Cr, Ti y V se definen completamente sobre la CP2. Esto pudiera explicarse porque el Cr, Ti y V son de los elementos menos móviles según todos los métodos de digestión aplicados. Por lo tanto, puede sugerirse que la CP2 representa los metales con menor movilidad. Estos resultados también pueden ser apreciados en la Figura IV.8, donde se muestran las cargas y puntuaciones de las nuevas componentes principales.

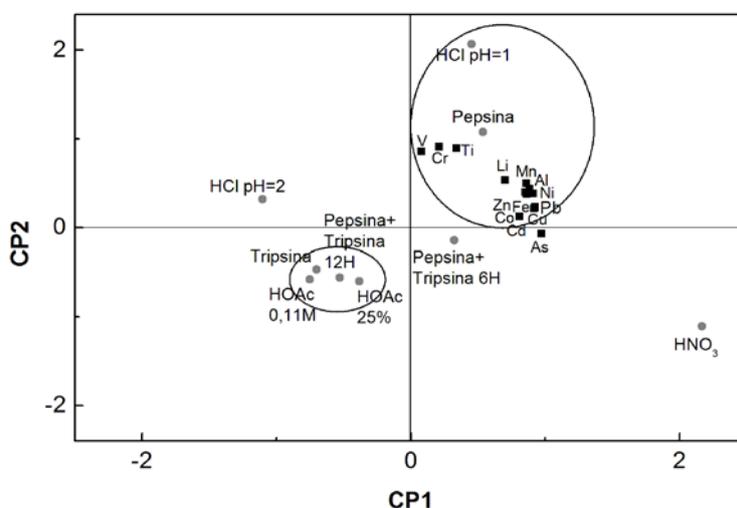


Figura IV.8. Representación de las cargas y las puntuaciones en el espacio de las nuevas componentes.

Las puntuaciones de los nueve métodos de digestión se representaron dentro del espacio de las CP1 y CP2, como se puede observar en la Figura IV.8. El método de HNO₃ fue perfectamente diferenciado del resto de los métodos, localizándose en el extremo derecho del eje de la CP1, mostrando las mayores puntuaciones asociadas a este componente. Este hecho concuerda con la mayor extracción observada para este método para la mayoría de los elementos (Al, As, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb y Zn) determinados que aparecen mejor agrupados sobre CP1 y diferenciados del V, Cr y Ti, mejor agrupados en CP2. Los métodos de HCl (pH = 1) y peps/HCl tienen mayores

puntuaciones positivas sobre la CP2, agrupándose entre sí, lo que sugiere que ambos métodos tienen un comportamiento relativamente similar entre sí y diferenciado del resto de los métodos estudiados. Este comportamiento diferenciado de ambos métodos respecto al resto se asocia principalmente a los elementos Cr, Ti y V representados por la CP2. Son precisamente estos dos métodos (HCl pH = 1 y peps/HCl) los que mayor concentración extraen de Cr, Ti y V. Estos métodos obtienen elevados porcentajes de extracción para el Al, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb y Zn representados por la CP1. Sin embargo, el agrupamiento observado en la Figura IV.8 indica que es más significativa su diferenciación del resto de los métodos respecto a la mayor extracción de Cr, Ti y V. Los dos métodos de digestión de HOAc (0,11 M y 25 %), trips/NaOH y el métodos Pep+Trip (12h) se agruparon entre sí y relativamente cercanos al eje de coordenadas pero con ligeras y aproximadamente similares cargas sobre las CP1 y CP2. Esto indica que la extracción de estos cinco métodos se diferencia significativamente del resto y que este comportamiento incluye por igual a todos los elementos que se encuentran representados por ambas componentes CP1 y CP2, lo cual confirma el resultado previo del estudio univariado y comparativo de los mismos, donde se observó que son los métodos que producen una menor extracción. Los métodos de HCl pH = 2 y Pep+Trip (6h) se alejaron de los grupos, lo que indica un comportamiento diferenciado del resto. Este es posiblemente el método que extrae menor cantidad de los elementos representados por la CP1.

Por último, la proximidad de los métodos de HCl pH = 1 y peps/HCl confirma la similitud de la extracción de cada uno para la mayoría de los elementos estudiados, confirmando que el efecto de la enzima es despreciable en comparación con el efecto del pH, que es común en ambos métodos, y que se ha planteado por otros autores en trabajos previos⁸⁶.

Por último, se realizó el Análisis de Conglomerados para comprobar la formación de grupos diferentes de métodos como parece intuirse en el ACP. El dendrograma se muestra en la Figura IV.9, donde se pueden apreciar dos grandes grupos de métodos. En el primero encontramos los métodos de HCl (pH = 1), HNO₃, peps/HCl y Pep+Trip (6h) los que indudablemente obtienen, de manera general, mayores porcentajes de extracción. Dentro de este grupo, se diferencian tres subgrupos, el primero para el

HNO₃ que se separa del resto, mientras los métodos con peps/HCl y HCl pH = 1 se agrupan en el segundo, demostrando que ambos métodos tienen comportamientos similares entre si y a la vez diferentes del HNO₃. En el tercer grupo se encuentra el método de Pep+Trip (6h). El resto de los métodos que, de manera general, producen las menores extracciones, se agrupan en el segundo grupo del dendrograma. El análisis de conglomerados corrobora, por tanto, los resultados obtenidos por el ACP.

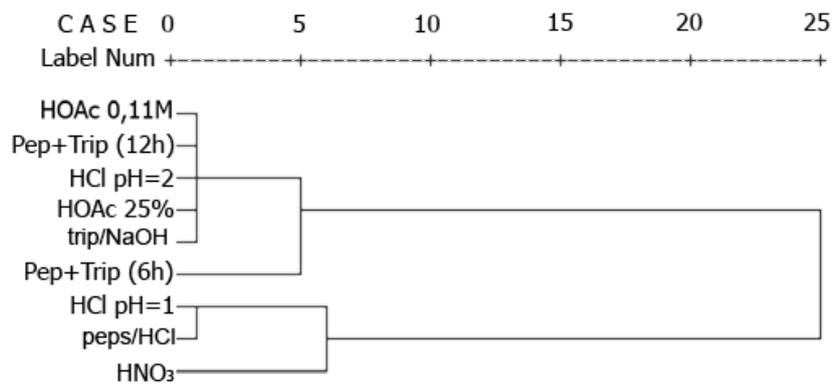


Figura IV.9. Conglomerados de los métodos de digestión

Concluyendo se puede decir que el método de peps/HCl extrajo para la mayoría de los metales concentraciones similares al método de HCl a pH = 1, esto sugiere que la enzima está ejerciendo un papel mínimo en la extracción de los metales, siendo fundamentalmente el pH la principal condición que influye en la lixiviación de los elementos. El método con Tripsina extrajo pocos metales, pues la mayoría se encontró por debajo del límite de detección. Los metales determinados mostraron porcentajes de extracción por debajo del 4 %, exceptuando el Cu y Ni con aproximadamente un 29 % y 8 % de lixiviación respectivamente. Los porcentajes obtenidos con Tripsina son inferiores a los obtenidos por los métodos de HCl y Pepsina, evidenciando que este método es representativo de otra parte del sistema digestivo de los peces, que ocurre a un pH básico a diferencia de los métodos de HCl y Pepsina, que ocurren a un pH ácido. Por otro lado, los métodos combinados de

Pepsina + Tripsina muestran comportamientos diferentes. En el caso del método que emplea seis horas de contacto de cada enzima, extrajo una concentración inferior a los métodos de Pepsina y HCl pH = 1, pero superior de manera general al método de Tripsina, mientras que el método combinado de mayor tiempo de contacto mostró menor efectividad en la lixiviación de los metales.

**CAPÍTULO V. VALIDACIÓN DEL
MÉTODO PROPUESTO PARA
EVALUAR LA BIODISPONIBILIDAD
DE METALES EN SEDIMENTOS**

V.1. VALIDACIÓN PARCIAL DEL PROCEDIMIENTO

La validación de un método es un requerimiento necesario e importante en la química analítica antes de su correcta aplicación. De manera general, la validación debe verificar que el método desarrollado es adecuado para su propósito a través de todo el rango de concentraciones del analito en los que se aplica¹⁶⁴. Es importante que los estudios de validación sean representativos, es decir, los estudios deberían, en la medida de lo posible, llevarse a cabo para proporcionar una visión realista de la variedad de efectos operativos durante el uso normal del método, así como para cubrir los intervalos de concentración y tipo de muestras dentro del ámbito del método. El desarrollo de un método y su validación se encuentran estrechamente ligados, y en muchas ocasiones no es posible determinar exactamente dónde termina el desarrollo del método y comienza su validación. Un método bien desarrollado debe ser fácil de validar¹⁶⁴.

¹⁶⁴ Rambla-Alegre, M.; Esteve-Romero, J.; Carda-Broch, S. (2012) *Is it really necessary to validate an analytical method or not? That is the question*. Journal of Chromatography A 1232, 101-109.

En el caso del presente trabajo, el problema planteado es la determinación de catorce metales en muestras de sedimentos marinos, mediante un tratamiento previo de la muestra y determinación por espectrometría de masas con plasma inductivamente acoplado. Una vez definido el problema analítico se debe proceder a especificar el mensurando, el cuál se encuentra definido por el Vocabulario Internacional de Términos Básicos y Generales en Metrología (VIM por sus siglas en inglés) como la cantidad que se pretende medir, e incluye el entorno y las operaciones previas a la aplicación del método¹⁶⁵. En la presente tesis el mensurando queda definido como la concentración de metal en una muestra seca de sedimento marino determinada mediante ICP-MS.

En este caso, la validación parcial se realizó en dos etapas fundamentales, la primera de ellas centrada en los parámetros de desempeño de la determinación instrumental y la segunda basada en los parámetros de la digestión de las muestras.

V.2. Validación parcial de la determinación por ICP-MS

En la Tabla V.1 se muestran los parámetros de la regresión de la curva para cada uno de los elementos evaluados a partir de seis patrones.

En el caso del límite de detección (LD) instrumental, la Eurachem cita que la Organización Internacional de Normalización (ISO por sus siglas en inglés) la cual define el LD como la concentración mínima detectable en una muestra, es decir, como la concentración real del analito en el material a analizar que conducirá con probabilidad $(1-\beta)$ a la conclusión de que la concentración del analito analizada es mayor que la de la matriz¹⁶⁶. Como LD se consideró por tanto, la concentración que corresponde a la señal promedio del blanco de calibración, más tres veces su desviación estándar como se muestra en la ecuación V.1¹⁶⁷:

¹⁶⁵ ISO Guide 99:2007, *International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms* (VIM). ISO, Geneva, (2007). <http://www.bipm.org> as JGCM 200:2008

¹⁶⁶ The Fitness for Purpose of Analytical Methods. Eurachem Guide, 1998.

¹⁶⁷ Pinto, J.J.; García-Vargas, M.; Moreno, C. (2012) *Enhanced spectrophotometric methods for trace metal determination in waters: zinc as an example*. Analytical Methods 4, 147-152.

$$LD = \frac{(Y_b + 3s_b) - n}{m} \quad V.1$$

Donde Y_b es la media de la señal medida diez veces del blanco de curva, s_b su desviación estándar, n la ordenada en el origen de la curva de calibración y m su pendiente. Por otro lado, el límite de cuantificación (LC) en este trabajo se determinó mediante la ecuación V.2:

$$LC = \frac{(Y_b + 10s_b) - n}{m} \quad V.2$$

En la Tabla V.1 se muestran los valores de LD y LC obtenidos para la técnica instrumental empleada.

Tabla V.1. Límites de detección y cuantificación de la técnica instrumental expresado en $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Metal	LD	LC
Al*	0,2	0,5
As	0,8	0,9
Cd	0,02	0,07
Co	1,6	1,7
Cr	0,6	0,7
Cu	6,3	7,0
Fe*	0,6	1,0
Li	4,0	4,8
Mn*	2,0	7,0
Ni	2,8	4,0
Pb	1,6	2,8
Ti	7,0	11,0
V	9,6	16,0
Zn	6,8	8,0

*LD y LC expresados en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Como se puede observar en la Tabla V.1 los LD y LC instrumentales son suficientes para el análisis de los metales en los sedimentos estudiados en el presente trabajo. En la tabla V.2 se muestran los parámetros de la regresión lineal determinados mediante el coeficiente de calidad de la curva de calibración.

Tabla V.2. Parámetros de la regresión lineal.

Metal	Pendiente (m)	Ordenada en el origen	R²
Al	276513	10510	0,9978
As	29,891	232,82	0,9994
Cd	60,915	7,7	0,9986
Co	610,56	3450,4	0,9969
Cr	372,01	1714,2	0,9992
Cu	388,43	336,48	0,9986
Fe	463636	28014	0,9997
Li	106,11	2429,4	0,9991
Mn	470,71	2170,6	0,9998
Ni	153,62	101,6	0,9983
Pb	180,96	1418	0,9981
Ti	23,241	134,46	0,9986
V	337,13	424,28	0,9947
Zn	106,11	2429,4	0,9997

V.3. Validación parcial del método de digestión

A continuación se validarán los LD y LC, la precisión de repetibilidad y reproducibilidad intermedia, así como se determinará la incertidumbre expandida del método de digestión propuesto en la presente tesis.

V.3.1. Determinación del límite de detección y cuantificación del método de digestión propuesto

Para la validación parcial del método de digestión se establecieron los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del mismo, bajo condiciones de reproducibilidad intermedia, con el mismo analista y equipo pero en tiempos diferentes (diferencia de un mes). Para este cálculo se tomó en cuenta la concentración de diez blancos de digestión independientes más tres y diez veces su desviación estándar como se establece en la norma Eurachem¹⁶⁶. Se sugiere realizar las medidas de diez blancos independientes para obtener una mayor aproximación de la dispersión de los resultados ofrecidos por el método¹⁶⁸. Para el cálculo del LD se utilizó la fórmula V.3.

$$LD = Y_b + 3s_b \quad V.3$$

Donde Y_b es la media de la señal de diez blancos de digestión y s_b su desviación estándar. Por otro lado, el LC se determinó mediante la ecuación V.4 que se muestra a continuación.

$$LD = Y_b + 10s_b \quad V.4$$

En la Tabla V.3 se muestran los resultados del LD y LC del método de digestión. Como se puede observar, fueron adecuados para la determinación de los metales en la muestra, siendo superiores a los obtenidos por la determinación instrumental, con lo cual, la detección y cuantificación de los metales estará condicionada al método de digestión aplicado. Estos límites son suficientes para realizar el análisis de los metales en las muestras estudiadas en el presente trabajo tal y como se demostrará en el próximo capítulo.

¹⁶⁶ López, J.A. (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*. Tesis doctoral, Universidad de Cádiz.

Tabla V.3. Límites de detección y cuantificación del método de digestión expresado en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Metal	LD	LC
Al	43	143
As	0,9	2,8
Cd	0,04	0,09
Co	1,8	3
Cr	0,7	1,7
Cu	6,8	7,5
Fe	22	73
Li	4,3	5,6
Mn	6,0	19,0
Ni	3,4	4,1
Pb	1,9	3,0
Ti	7,5	11,3
V	9,9	16,7
Zn	8,0	10,0

Por otro lado, se determinó la precisión mediante un estudio de repetibilidad y de reproducibilidad intermedia.

V.3.2. Precisión

La precisión da una idea de la dispersión de los resultados de las medidas realizadas, al cual pertenecen dos grados de precisión: la repetibilidad y la reproducibilidad, siendo la primera evaluada en una escala de tiempo corta, por un mismo analista, en un mismo laboratorio, mientras que la segunda se refiere a análisis en una escala de tiempo más larga, por diferentes laboratorios.

La repetibilidad se determinó realizando el análisis de tres réplicas independientes de la muestra por un mismo analista, durante el mismo día y equipo. La misma se expresó como la desviación estándar relativa (RSD) de los tres resultados individuales. En la Tabla V.4 se muestran los resultados obtenidos de repetibilidad para todos los metales evaluados en la muestra de sedimento.

Como se observa en la Tabla V.4, la repetibilidad expresada como RSD se encuentra por debajo o cerca del 5 % para todos los metales analizados lo cual es adecuado para el análisis¹⁶⁹.

Tabla V.4. Estudio de repetibilidad.

Metal	C_m, mg·kg⁻¹	s	RSD, %
Al	1295	18	0,1
As	4,2	0,1	2,4
Cd	0,099	0,001	1,010
Co	5,60	0,07	1,25
Cr	2,69	0,05	1,86
Cu	11,5	0,6	5,2
Fe	1382	15	1
Li	2,90	0,08	2,76
Mn	398	7	2
Ni	8,6	0,3	3,5
Pb	12,0	0,2	1,7
Ti	31,0	0,9	2,9
V	19,0	0,5	2,6
Zn	14	1	7

C_m: concentración media, s: desviación estándar

La reproducibilidad intermedia fue expresada como la desviación estándar relativa de seis réplicas independientes del análisis de la muestra natural para cada elemento

¹⁶⁹ Sutherland, R.A.; Tack, F.M.G.; Tolosa, C.A.; Verloo, M.G. (2001) *Metal extraction from road sediment using different strength reagents: impact on anthropogenic contaminant signals*. Environmental Monitoring and Assessment 71, 221–242.

estudiado. Las determinaciones se realizaron para cada concentración de los elementos por un analista, determinadas con un mes de diferencia y en el mismo equipo. La Tabla V.5 muestra los resultados de reproducibilidad intermedia para los catorce metales evaluados en la muestra de sedimento.

Tabla V.5. Estudio de reproducibilidad intermedia.

Metal	C_m, mg·kg⁻¹	s	RSD, %
Al	1299	272	2
As	4,2	0,1	2,4
Cd	0,101	0,001	0,990
Co	5,64	0,1	1,8
Cr	2,71	0,06	2,2
Cu	11,4	0,7	6,1
Fe	1390	18	1,3
Li	2,92	0,1	3,4
Mn	399	12	3
Ni	8,7	0,5	5,7
Pb	12	1,32	11
Ti	30,4	1,0	3,3
V	18,9	0,4	2,1
Zn	13	1	8

C_m: concentración media, s: desviación estándar

La reproducibilidad intermedia del método fue, para todos los elementos, inferior al 10 % de manera general. Los valores de RSD fueron comparables y adecuados para la determinación de metales en la muestra en estudio¹⁶⁹.

En el presente estudio se evaluó el sesgo del procedimiento mediante el BM en el capítulo III por no contarse con una muestra de referencia certificada para digestiones parciales.

V.4. Estimación de la Incertidumbre

La incertidumbre, definida según el Vocabulario Internacional de Términos Básicos y Generales en Metrología (VIM por sus siglas en inglés), es *un parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores de una magnitud que son atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza*¹⁶⁵. Este concepto tiene una profunda influencia en muchos aspectos de la química analítica, tanto prácticos como teóricos y se debe entender como un valor añadido para el resultado de la medición tanto para el laboratorio, como para el cliente^{170,171}. Contribuyendo al estudio de la trazabilidad del método en cuestión.

La incertidumbre debe tener en cuenta cada uno de los factores que puedan provocar variabilidad en los datos obtenidos aplicando un método determinado, siendo cada uno de los pasos del proceso analítico fuente de incertidumbre¹⁶⁸.

Con el objetivo de cuantificar la incertidumbre, se calculan las incertidumbres de cada una de las fuentes que pueden provocar variabilidad en los datos obtenidos, la misma puede expresarse como desviación estándar o incertidumbre estándar (u_i). Una vez establecida la u_i de cada una de las fuentes, se procede a calcular la incertidumbre combinada (u_c), la cual se determina mediante la ley de la propagación de la incertidumbre, la cual se determina mediante la ecuación V.5¹⁶⁷:

$$u_c(y(x_1, x_2, \dots)) = \sqrt{\sum_{i=1}^n c_i^2 u(x_i)^2} \quad \text{V.5}$$

Para la presentación de los datos finales se utiliza la incertidumbre expandida (U), que ofrece un intervalo en el que la confianza de que se encuentre el valor es mayor. Este

¹⁷⁰ Jiménez-Chacón, J.; Álvarez-Prieto, M. (2009) *Modelling uncertainty in a concentration range*. Accreditation and Quality Assurance 14, 15-27.

¹⁷¹ Álvarez-Prieto, M.; Jiménez-Chacón, J.; Montero-Curbelo, A. (2009) *Do we need to consider metrological meanings of different measurement uncertainty estimation?* Accreditation and Quality Assurance 14, 623-634.

intervalo se obtiene mediante la multiplicación de la incertidumbre combinada (u_c) por un factor de cobertura k que se selecciona para un nivel de confianza dado^{167,172}.

Para poder estimar la incertidumbre de la medida se deben seguir una serie de pasos:

1. Definición del mensurando
2. Descripción de cada etapa del proceso y función modelo que la describe
3. Identificación de las fuentes de incertidumbre
4. Cuantificación de los componentes de la incertidumbre (u_s)
5. Cálculo de la incertidumbre combinada (u_c)
6. Cálculo de la incertidumbre expandida (u_k)
7. Evaluar el peso relativo de cada foco en la incertidumbre expandida

Por último, los resultados deben expresarse en un lenguaje universal, que no dé lugar a confusiones¹⁷³.

- Identificación de los focos de incertidumbre

El objetivo fundamental de esta etapa es la de identificar los pasos del proceso analítico que pueden afectar la variabilidad del resultado final. Una forma de representar estos focos de incertidumbre lo constituyen los diagramas de causa/efecto, los cuales pueden ser usados para evitar repetir una causa o para evitar olvidar efectos relevantes o correlaciones entre las variables.

El método propuesto en este trabajo presenta una serie de etapas cuya incertidumbre afecta la variabilidad del resultado final. En este sentido, se debe tener en cuenta no sólo la pureza de los reactivos de trabajo sino también las operaciones realizadas durante el proceso de análisis, así como las condiciones del laboratorio.

En tal sentido, los focos de incertidumbre del método propuesto para la digestión de metales biodisponibles al entorno gastrointestinal de los peces en los sedimentos se representan en la Figura V.1, mediante el diagrama de causa/efecto:

¹⁷² JCGM Guide 100, Evaluation of Measurement Data—Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, 2008.

¹⁷³ Traceability in chemical measurements (2003) Eurachem/CITAC. Eds., Ellison. S.L.R.; King, B.; Röslein, M.; Williams, A.

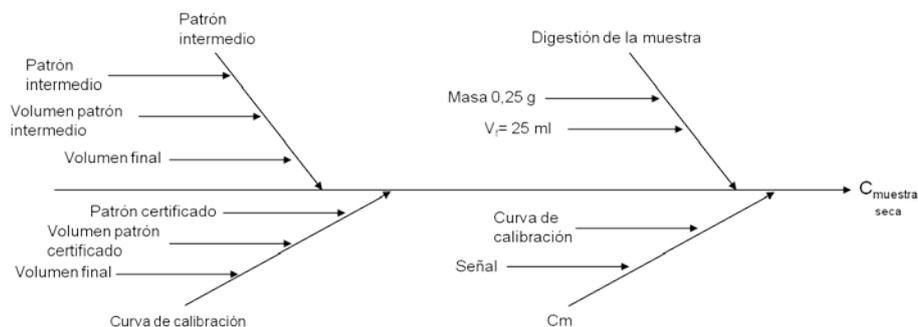


Figura V.1. Diagrama causa-efecto de propagación de la incertidumbre

- *Digestión de la muestra a determinar:* Para esta etapa se pesó exactamente alrededor de 0,25 g de sedimento seco (m), a la cual se le añaden 25 ml de disolución y se llevó a cabo la digestión de la muestra a 20° C por 12 horas. La disolución resultante se llevó a un volumen final utilizando un matraz aforado de 25 ml.
- *Preparación de un patrón intermedio:* En los casos donde la concentración de los patrones de la curva de calibración era muy pequeña, se preparó un patrón intermedio de una concentración determinada a partir del patrón de 1000 mg.l⁻¹ con el objetivo de evitar pipetear volúmenes muy pequeños.
- *Preparación de los patrones de la calibración:* Los diferentes patrones fueron preparados mediante dilución del patrón intermedio, tomándose un volumen correspondiente y llevándolo a un volumen final de 25 ml en el matraz aforado.
- *Determinación instrumental:* Consiste en el registro de las señales de los patrones y de las muestras mediante el ICP-MS.
- *Expresión de los resultados:* La concentración final determinada en las muestras se calculó mediante la interpolación en la curva de calibración lineal utilizando la señal registrada en la etapa de determinación instrumental.

La forma más habitual de calcular la incertidumbre, es mediante la ley de la propagación de la incertidumbre. Para este propósito se pueden utilizar distintos

métodos numéricos en su establecimiento, siendo el más empleado el método de Kragten, el cual es fácil de implementar en hojas de cálculo¹⁷⁴.

Para este trabajo se tuvo en cuenta en la determinación de la u_s de cada etapa los datos certificados correspondientes a la balanza analítica, el material volumétrico empleado y las medidas repetidas en el laboratorio. En el caso de la incertidumbre de la balanza analítica, por seguir una distribución rectangular, se dividió su incertidumbre estándar certificada por $\sqrt{3}$, mientras que la incertidumbre del material volumétrico se dividió por $\sqrt{6}$ por seguir una distribución triangular¹⁷⁵.

A continuación se muestra el cálculo de las incertidumbres estándar, acumulada y expandida obtenidas para el cobre como elemento representativo. El mismo procedimiento se llevó a cabo para cada uno de los metales estudiados.

V.4.1. Incertidumbre de la preparación del patrón intermedio

El patrón intermedio de $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ se preparó mediante la dilución del patrón certificado de Cu de $1000 \pm 2 \cdot \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. La ecuación V.6 responde al modelo para el cálculo de la incertidumbre de este patrón:

$$C_{1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}} = \frac{C_{1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}} \cdot V_{25 \mu\text{l}}}{V_{25 \text{ ml}}} \quad \text{V.6}$$

En la Tabla V.6 se puede observar la incertidumbre calculada del patrón intermedio donde se expresa además la desviación estándar relativa de la incertidumbre (RSu).

¹⁷⁴ Kragten, J. (1994) *Tutorial review. Calculating standard deviations and confidence intervals with an universally applicable spreadsheet technique*. The Analyst 119, 2161-2165.

¹⁷⁵ V Curso Principios y aplicaciones de metrología en química. Aspectos prácticos de la ISO-17025. TrainMIC 2012, Madrid.

V.6. Incertidumbre de la preparación del patrón intermedio.

Elemento	Magnitud	Unidades	Valor	u_s	u_c	RSu (%)
Cu	$C_{\text{patrón certificado}}$	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	1000	2		0,2
	$V_{25\text{ml}}$	ml	25	0,02		0,08
	$V_{25\mu\text{l}}$	μl	25	0,4		1,6
	$C_{\text{patrón } 1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}}$	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	1	-	0,02	2

V.4.2. Incertidumbre de la preparación de los patrones de calibración

La preparación de los patrones de la curva de calibración tiene en cuenta la incertidumbre del patrón intermedio, así se utiliza dicha incertidumbre con u_s para calcular la u_c del siguiente paso. Para ello se ha seguido ecuación V.7:

$$C_{\text{patrón mg}\cdot\text{l}^{-1}} = \frac{C_{1\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}} \cdot V_{2,3 \text{ ml}}}{V_{25 \text{ ml}}} \quad \text{V.7}$$

En la Tabla V.7 se muestra el cálculo de la incertidumbre del patrón de $0,092 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de la curva de Cu a modo de ejemplo.

V.7. Incertidumbre de la preparación de los patrones de la curva de calibración.

Elemento	Magnitud	Unidades	Valor	u_s	u_c	RSu (%)
Cu	$C_{1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}}$	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	1	0,02		2
	$V_{25\text{ml}}$	ml	25	0,02		0,08
	$V_{2,3 \text{ ml}}$	ml	2,3	0,01		0,4
	$C_{0,092 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}}$	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0,092	-	0,0008	0,9

V.4.3. Incertidumbre de la concentración del metal en la muestra en disolución

La concentración de los metales (C) se calculó mediante la interpolación de la señal de la muestra en la curva de calibración, entre la señal (S) de los patrones inferior y superior siguiendo la ecuación V.8:

$$C_{\text{muestra}} = \frac{C_{\text{patrón inf}} \cdot (S_{\text{patrón sup}} - S_{\text{muestra}}) + C_{\text{patrón sup}} \cdot (S_{\text{muestra}} - S_{\text{patrón inf}})}{S_{\text{patrón sup}} - S_{\text{patrón inf}}} \quad \text{V.8}$$

Las fuentes de incertidumbre en esta etapa son la preparación de los patrones así como la señal instrumental de patrones y muestras que se pueden observar en la Tabla V.8.

Tabla V.8. Incertidumbre de la concentración del metal.

Elemento	Magnitud	Unidades	Valor	u_s	u_c	RSu
Cu	$C_{\text{patrón } 0,092\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}}$ 1	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0,092	0,0008		0,9
	$C_{\text{patrón } 0,12\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}}$	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0,120	0,0009		0,8
	$S_{\text{patrón } 0,092\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}}$ 1	abs·s	35448	1026		2,9
	$S_{\text{patrón } 0,092\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}}$ 1	abs·s	48594	1647		3
	$S_{\text{Cu muestra}}$	abs·s	43476	10		0,02
	$C_{\text{Cu muestra}}$	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	0,109		0,002	2

V.4.4. Incertidumbre del método de digestión

En la etapa final del proceso, se procedió a calcular la incertidumbre del método propuesto en el presente trabajo de digestión para evaluar la biodisponibilidad de los metales en los sedimentos. En esta etapa se tuvo en cuenta la masa pesada, el

volumen final y la concentración de la muestra en la disolución. Para este cálculo se siguió el modelo V.9:

$$C_{\text{muestra seca}} = \frac{C_{\text{m disol}} \cdot V_{\text{final}}}{m_{\text{pesada}}} \quad \text{V.9}$$

En la Tabla V.9 se muestran los valores de cada foco de incertidumbre tomado en consideración.

Tabla V.9. Incertidumbre de la concentración final en la muestra seca.

Elemento	Magnitud	Unidades	Valor	u_s	u_c	RSu
Cu	m_{pesada}	g	0,25	0,002		1,0
	V_{final}	ml	25,00	0,04		0,2
	$C_{\text{m disol}}$	mg·l ⁻¹	0,109	0,002		2
	$C_{\text{muestra seca}}$	mg·kg ⁻¹	10,91	-	$5 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^{-5}$

V.4.5. Contribución de los focos de incertidumbre

Una vez calculada la incertidumbre expandida se procedió a evaluar los focos que contribuyen a la variabilidad de los resultados. Definir la contribución de cada foco de incertidumbre permite identificar los puntos del método a los que se les debe prestar la debida atención y se encuentran susceptibles de mejorar. En la Figura V.2 se muestra el resultado obtenido.

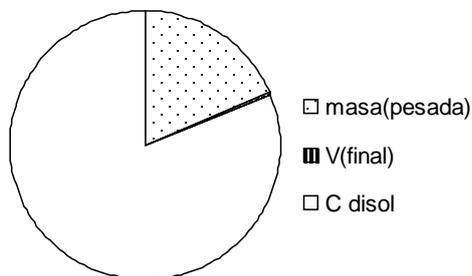


Figura V.2. Contribución a la incertidumbre del método.

En este caso, la mayor contribución a los focos de la incertidumbre es debida a la concentración en la disolución seguida de la pesada de la muestra. Para la concentración de la disolución se debe analizar los focos de incertidumbre, para ver cuáles tienen mayor influencia y se debe tratar de mejorar. Para ello se pasó a evaluar la contribución de los focos que influyen en la variabilidad de los resultados en la determinación de la concentración en la disolución.

En el caso de la determinación de la concentración medida en la disolución, los focos de incertidumbre son fundamentalmente debidas a la señal del patrón inferior y superior así como la concentración del patrón máximo, como se puede observar en la Figura V.3.

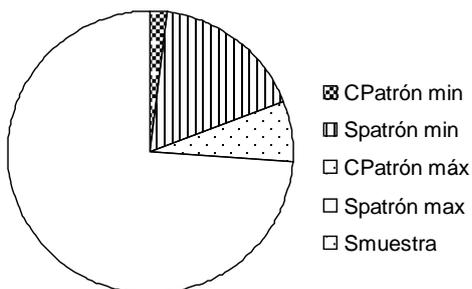


Figura V.3. Contribución a la incertidumbre de la muestra.

Por otra parte, la concentración de los patrones inferior y superior también contribuye, aunque en menor medida a los focos de incertidumbre. La incertidumbre de esta concentración puede estar determinada por la preparación del patrón intermedio. Para ello se analizarán los focos de incertidumbre de la preparación del mismo.

En el caso de los focos de incertidumbre en la preparación de la curva de calibración, el volumen del matraz es el que menos contribuye, siendo las contribuciones más importantes la preparación del patrón de $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y el volumen pipeteado de dicho patrón. Los resultados se muestran en la Figura V.4.

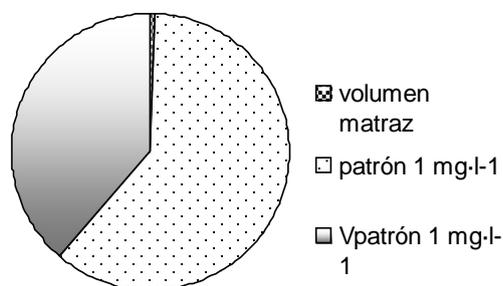


Figura V.4. Contribución a la incertidumbre de la preparación del patrón de $0,092 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

En el caso de todos los patrones intermedios la mayor contribución se corresponde con el volumen pipeteado del patrón de $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ al preparar las correspondientes diluciones, siendo mayor en la medida que se toma menor volumen, como se puede observar en la Figura V.5.

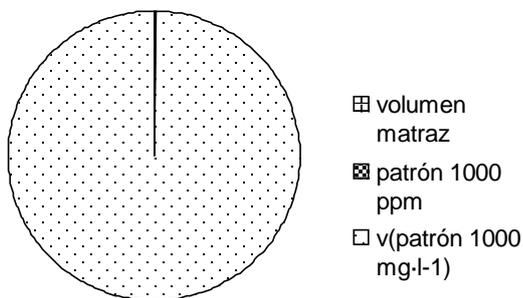


Figura V.5. Contribución de los focos de incertidumbre de la preparación del patrón primario.

V.4.6. Incertidumbre expandida de la determinación de los metales en la muestra de sedimento

Una vez que se ha calculado la incertidumbre combinada del método (u_c), se puede calcular finalmente la incertidumbre expandida multiplicando por el factor de cobertura k que asegure que la concentración del analito se encuentra en el rango determinado por la misma para un 95 % de confianza. El factor de cobertura se elige dependiendo del nivel de confianza que se quiere considerar. De esta manera, si se quiere un nivel de confianza de aproximadamente el 95 %, el factor de cobertura será $k = 2^{172}$. En la Tabla V.1 se muestran las concentraciones de todos los metales analizados y su incertidumbre para un 95 % de confianza, calculadas para todos los elementos estudiados en el presente trabajo.

Tabla V.10. Concentración de metales \pm U para la muestra estudiada. ($k = 2$)

Metal	[metal], mg·kg⁻¹	U
Al	1222	25
As	0,38	0,01
Cd	0,103	0,002
Co	4,8	0,4
Cr	3,7	0,7
Cu	13,80	0,04
Fe	1253	1
Li	4,3	0,4
Mn	368	12
Ni	9,1	2,0
Pb	10,7	2,0
Ti	17,9	0,9
V	111	9
Zn	11,0	2,0

Una vez establecido los parámetros de desempeño, se aplicó el método propuesto a dos ecosistemas de interés. Las zonas seleccionadas fueron, por un lado la Bahía de Cienfuegos en Cuba, y por otro, el Río San Pedro, ubicado en la Bahía de Cádiz (España).

**CAPÍTULO VI. APLICACIÓN DEL
MÉTODO PROPUESTO PARA
EVALUAR LA BIODISPONIBILIDAD
DE METALES EN SEDIMENTOS DE
DOS ECOSISTEMAS MARINOS**

VI. APLICACIÓN DEL MÉTODO PROPUESTO PARA EVALUAR LA BIODISPONIBILIDAD DE METALES EN SEDIMENTOS DE DOS ECOSISTEMAS MARINOS

Los sedimentos marinos acumulan metales derivados de los procesos naturales y antropogénicos y juegan un rol fundamental en la redistribución de estos elementos al agua y a la biota acuática. Generalmente se considera que un sedimento con elevadas concentraciones de metales es un sedimento peligroso para los organismos. Se cree que esas elevadas concentraciones provienen fundamentalmente de fuentes antropogénicas. Habitualmente se considera que esta concentración de metales de origen antropogénico es más biodisponible, y por consiguiente, más fácil de incorporarse a la cadena trófica mediante su asimilación por los organismos acuáticos. Por esta razón se determina en muchas ocasiones la concentración total de los sedimentos, para de esta manera, evaluar la contaminación antropogénica y así decidir si resulta perjudicial o no para la vida.

Para ello se han desarrollado diversos procedimientos que permiten la evaluación del riesgo potencial de los sedimentos, así como diferentes índices y guías de calidad que permiten valorar si existe enriquecimiento de metales en los mismos y su probable daño o no sobre la biota. Todas estas evaluaciones se realizan sobre la base de la concentración total de los metales en los sedimentos. Como se ha mencionado anteriormente, a pesar de que los métodos totales brindan una medida exacta sobre la contaminación por metales, este criterio no es suficiente para predecir la capacidad de movilización de los mismos hacia el medio acuático así como no predice necesariamente la toxicidad de estos contaminantes hacia los animales acuáticos^{27,81,87,104}.

Así, pudiera suceder que grandes concentraciones de metales en los sedimentos no impliquen que éstos puedan llegar a los organismos, por lo que también se realizan estudios que permiten evaluar la concentración de metales biodisponibles empleando extracciones parciales. A continuación se exponen algunas aplicaciones de todos estos criterios para evaluar el grado de biodisponibilidad y riesgo ecotoxicológico para los organismos de los metales en los sedimentos.

VI.1. Estimación de la “toxicidad potencial” de un sedimento mediante las concentraciones totales de los metales

Tradicionalmente, el nivel de contaminación de los sedimentos ha sido determinado mediante la comparación de las concentraciones totales de metales comparadas con los valores de fondo o de referencia. Para ello se han desarrollado diversas guías de calidad de sedimentos (GCS) en diferentes partes del mundo, basadas fundamentalmente en dos enfoques¹⁷⁶:

- 1- Un enfoque empírico o estadístico que permita establecer la relación entre la contaminación encontrada de los sedimentos y la respuesta tóxica observada en el medio.

¹⁷⁶ Burton, G.A. (2002) *Sediment quality criteria in use around the world*. Limnology 3, 65-75.

- 2- Un enfoque teórico que intenta explicar las diferencias entre las biodisponibilidades a través del equilibrio de partición.

VI.1.1. Guías de Calidad de Sedimentos

Los criterios de calidad de sedimentos han sido desarrollados para hacer frente a muchos problemas ambientales y poder regular la cantidad de metales que se vierten al medio ambiente, así como para establecer los niveles en que esos metales pueden producir efectos perjudiciales en los organismos vivos.

Las guías de calidad de sedimentos originales se desarrollaron comparando los valores de los compuestos determinados con los del fondo o de referencia, proveyendo poca información relacionada con el impacto potencial ecotoxicológico, mientras que las empíricas se basan en la química del sedimento combinando los datos de efectos biológicos obtenidos mediante estudios de campo o de laboratorio^{176,177}. Sin embargo, a pesar de las limitaciones de las primeras guías, permiten obtener una base para evaluar la calidad de los sedimentos.

El objetivo principal que persiguen las guías de calidad de los sedimentos es el de proporcionar datos cuantitativos basados en fuertes evidencias científicas para proteger la vida marina de los efectos adversos¹⁷⁷. Estos estudios permiten establecer la dosis-respuesta que describe la toxicidad aguda y crónica a diferentes compuestos químicos del sedimento de algunos organismos acuáticos¹⁷⁷. Sin embargo, estas condiciones ideales no pueden ser obtenidas en la práctica, y por tanto, la relación dosis-respuesta para todos los contaminantes químicos no se puede obtener para todos los organismos y para cualquier sitio del planeta. Por otro lado, el tema de la biodisponibilidad no está bien tratado en las guías de calidad debido a que sus valores se basan en la concentración total. No obstante, las guías de calidad sirven como punto de partida para evaluar los posibles efectos que los metales en los sedimentos pueden provocar en los organismos.

¹⁷⁷ Bjørgesæter, A.; Gray, J.S. (2008) *Setting sediment quality guidelines: A simple yet effective method*. Marine Pollution Bulletin 57, 221-235.

Se conoce gran cantidad de guías de calidad de sedimentos, entre las que se pueden mencionar por su frecuente utilización, la Guía de Calidad de Sedimentos para la Protección de la vida acuática de Canadá (SQG por sus siglas en inglés)¹⁷⁸, la Guía de Calidad de la Administración Nacional Oceánica y Atmosférica (NOAA por sus siglas en inglés)¹⁷⁹, la guía de calidad del Consejo de medio ambiente y conservación de Australia y Nueva Zelanda (ANZECC por sus siglas en inglés)¹⁸⁰, entre muchas otras. En todas ellas se establecen diferentes niveles de efectos tóxicos. En las Tablas VI.1 y VI.2 se muestran como ejemplos los niveles de las SQGs canadiense y la de la NOAA, respectivamente.

Tabla VI.1. Niveles guías para la vida acuática: sedimentos marinos. Guía de Calidad de sedimentos canadiense¹⁷⁸. Todas las concentraciones están expresadas en mg·kg⁻¹.

Metal	ISQG	PEL
As	7,24	41,6
Cd	0,7	4,2
Cr	52,3	160
Cu	18,7	108
Pb	30,2	112
Zn	124	271

¹⁷⁸ CCME, *Protocol for the Derivation of Canadian Sediment Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life*. Canadian Council of Ministers of the Environment 1995, CCME EPC-98E, Ottawa.

¹⁷⁹ NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) (1999) *Screening quick reference tables (SQUIRTs)* <<http://response.restoration.noaa.gov/cpr/sediment/squirt/squirt.html>>

¹⁸⁰ ANZECC (Australian and New Zealand Environment and Conservation Council) (1997) *ANZECC interim sediment quality guidelines*. Report for the Environmental Research Institute of the Supervising Scientist. Sydney, Australia.

Tabla VI.2. Niveles guías de calidad de sedimentos con efectos biológicos posibles, desarrollado por NOAA¹⁷⁹. Todas las concentraciones están expresadas en mg·kg⁻¹.

Metal	TEL	ERL	PEL	ERM
As	7,2	8,2	41,6	70
Cd	0,68	1,2	4,2	9,6
Cr	52,3	81	160	370
Cu	18,7	34	108	270
Ni	15,9	20,9	42,8	51,6
Pb	30,2	46,7	112	218
Zn	124	150	271	410

Las concentraciones propuestas en cada una de las guías establecen diferentes niveles de probabilidad de ocurrencia de efectos tóxicos sobre la vida acuática. En el caso de la NOAA, se han desarrollado las Tablas de Monitorización de Referencia Rápida (SQuiRT por sus siglas en inglés) con fines de selección que ha sido obtenida mediante el uso de diferentes enfoques. Esta guía se divide en varias categorías de manera creciente de efectos observables, que han sido derivadas a través de la utilización de varios enfoques diferentes¹⁸¹. De esta manera se puede mencionar el ISQG (valor guía del sedimento en la guía canadiense) y el TEL (nivel de efecto umbral en la guía de la NOAA), como el nivel de concentración del elemento o compuesto por debajo del cual no existe riesgo potencialmente tóxico para los organismos. EL ERL (rango de efectos bajos) es indicativo de las concentraciones por debajo de la cual rara vez se producen efectos adversos, mientras que el PEL (nivel de efecto probable) representa la concentración por encima de la cual es probable que los efectos adversos ocurran. Por último, el ERM (rango de efecto medio) representa la concentración por encima de la cual los efectos adversos pueden producirse con frecuencia¹⁸².

Un aspecto negativo respecto al uso de las guías de calidad viene dado por la falta de consenso respecto a los valores guías que puedan ser utilizados de manera

¹⁸¹ Spencer, K.L.; MacLeod, C.L. (2002) *Distribution and partitioning of heavy metals in estuarine sediment cores and implications for the use of sediment quality standard*. Hydrology and Earth System Sciences 6, 989-998.

¹⁸² MacDonald, D.D.; Ingersoll, C.G.; Berger, T.A.; (2000) *Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 39, 20-31.

generalizada. Por ejemplo al As tiene valor de ERL de $8,2 \text{ mg.kg}^{-1}$ por la norma de la NOAA y de 20 mg.kg^{-1} por la norma ANZEEC¹⁷⁶. Por otra parte, dependiendo de la guía que se tenga en cuenta, la evaluación de los riesgos tóxicos variará. Por ejemplo, la guía canadiense sólo muestra dos niveles dentro de su clasificación, mientras que la guía propuesta por la NOAA presenta varios niveles de clasificación. Esto, sumado a las limitaciones mencionadas anteriormente, implica que su uso e interpretación debe ser puramente informativo.

La NOAA resume la información de varias guías de calidad, como se observa en las Tablas VI.1 y V:2, en la cual los valores ISQG y TEL coinciden para los metales evaluados. Por tanto, en este trabajo sólo se consideró la guía propuesta por la NOAA. Las muestras fueron consideradas como no tóxicas cuando la concentración se encontró por debajo del TEL, como rara vez tóxicas cuando las concentraciones fueron superiores al ERL y muy tóxicas cuando el valor de concentración superó el ERM.

VI.1.2. Normalización respecto a un elemento conservativo

Se puede decir que la normalización es la relación lineal entre un elemento y un elemento conservativo que se utiliza para reducir la variabilidad de los metales traza causada por el tamaño de grano o por la mineralogía, además, también se utiliza para identificar las contribuciones anómalas del metal analizado¹⁸³. Se han establecido dos categorías bien definidas para normalizar los metales, la granulométrica y la geoquímica. La técnica granulométrica se basa en la normalización respecto al porcentaje que representa la fracción fina ($< 63 \mu\text{m}$) o de la fracción total de arcilla ($< 4 \mu\text{m}$) presentes en el sedimento¹⁸⁴. De esta manera se pueden comparar resultados obtenidos en diferentes sitios de muestreo.

¹⁸³ Loring, D.H. (1990) *Lithium - a new approach for the granulometric normalization of trace metal data*. Marine Chemistry 29, 155-168.

¹⁸⁴ Loring, D.H. (1991) *Normalization of heavy-metal data from estuarine and coastal sediments*. Journal of Marine Science 48, 101-115.

Por otro lado, la normalización geoquímica se basa en la comparación entre la concentración del metal en el sedimento y la concentración de otro elemento de “referencia” o también conocido como elemento conservativo.

Por otra parte, son varios los elementos que han sido empleados como referencia para normalizar en sedimentos, destacando el Al, carbono orgánico, Fe, Li^{185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193}. Otros metales como los elementos de las tierras raras, además del Cr, Mn, Ti, etc., también han sido empleados para normalizar, aunque su uso se encuentra menos extendido.

Como se puede observar, hay diversidad de criterios sobre cuál es el elemento que mejor permite normalizar a los metales en sedimentos. Según la literatura, la utilización de un elemento conservativo como normalizador requiere que se cumplan un número de suposiciones¹⁹⁴:

1. El normalizador debe co-variar proporcionalmente al contenido de origen natural del metal de interés
2. El normalizador debe ser insensible a las entradas procedentes de fuentes antropogénicas
3. El normalizador debe ser estable y no debe variar su composición debido a influencias ambientales tales como la reducción / oxidación, adsorción /

¹⁸⁵ Xia, P.; Meng, X.; Feng, A.; Yin, P.; Zhang, J.; Wang, X. (2012) *Geochemical characteristics of heavy metals in coastal sediments from the northern Beibu Gulf (SW China): the background levels and recent contamination*. Environmental Earth Sciences 66, 1337–1344.

¹⁸⁶ Pastorinho, M.R.; Telefer, T.C.; Soares, A.M.V.M.. *Heavy metals in urban channel sediments of Aveiro City, Portugal. Interdisciplinary studies on environmental chemistry — Biological Responses to Contaminants*, N. Hamamura, S. Suzuki, S. Mendo, C. M. Barroso, H. Iwata and S. Tanabe, 197–204. © by TERRAPUB, 2010.

¹⁸⁷ Windom, H.L.; Schropp, S.J.; Calder, F.D.; Ryan, J.D.; Smith, R.G.; Burney, L.C.; Lewis, F.G.; RawlInson, C.H. (1989) *Natural trace metal concentrations in estuarine and coastal marine sediments of the southeastern United States*. Environmental Sciences & Technology 23, 314-320.

¹⁸⁸ Banerjee, U.; Gupta, S. (2012) *Source and distribution of lead, cadmium, iron and manganese in the river Damodar near Asansol industrial area, West Bengal, India*. International Journal of Environmental Sciences 2, 1531-1542

¹⁸⁹ Sohrabi, T.; Ismail, A.; Nabavi, M.B. (2010) *Distribution and normalization of some metals in surface sediments from south Caspian Sea*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 85:502–508.

¹⁹⁰ Morse, J.W.; Presley, B.J.; Taylor, R.J. (1993) *Trace metal chemistry of Galveston Bay: Water, Sediments and Biota*. Marine Environmental Research 36, 1-37.

¹⁹¹ Daskalakis, K.D.; O' Connor, T.P. (1995) *Normalization and elemental sediment contamination in the coastal United States*. Environmental Sciences & Technology 29, 470-477.

¹⁹² Schropp, S.J.; Lewis, F.G.; Windom, H.L.; Ryan, J.D.; Calder, F.D.; Burney, L.C. (1990) *Interpretation of metal concentrations estuarine sediments of Florida using aluminum as a reference element*. Estuaries 13, 227-235.

¹⁹³ Hyun-Suk, J.; Seong-Taek, Y.; Byoung-Young, C.; Hyang-Mi, K.; Myungchae, J.; Soon-Oh, K.; Kyoung-Ho, K. (2010) *Geochemical studies on the contamination and dispersion of trace metals in intertidal sediments around a military air weapons shooting range*. Journal of Soils and Sediments 10, 1142–1158.

¹⁹⁴ Ho, H.H.; Swennen, R.; Cappuyns, V.; Vassilieva, E.; Tran, T.V. (2012) *Necessity of normalization to aluminum to assess the contamination by heavy metals and arsenic in sediments near Haiphong Harbor, Vietnam*. Journal of Asian Earth Sciences 56, 229–239.

desorción, y otros procesos diagenéticos tales como la lixiviación que puede alterar su contenido en los sedimentos.

VI.2. Factor de Enriquecimiento

Otro de los criterios ampliamente usados para evaluar el grado de contaminación de los sedimentos es el Factor de Enriquecimiento (FE), el cual es considerado como una forma de normalización geoquímica de los metales respecto a un elemento conservativo^{195,196}. Este criterio se basa en la suposición de que, bajo las condiciones naturales de sedimentación, existe una relación lineal entre el elemento de referencia y otros elementos en el sedimento¹⁹⁷. Como se ha comentado previamente, entre los elementos de referencia más utilizados en la literatura encontramos el Fe, Al y el Li^{141,195,196,198,199,200}.

El FE se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$FE = \frac{(C_x/C_{er})_{muestra}}{(C_x/C_{er})_{fondo}} \quad \text{VI.1}$$

Donde C_x representa la concentración del metal a evaluar y C_{er} la concentración del elemento de referencia.

¹⁹⁵ Davutluoglu, O.I.; Seckin, G.; Ersu, C.B.; Yilmaz, T.; Sari, B. (2011) *Assessment of metal pollution in water and surface sediments of the Seyhan River, Turkey, using different indexes*. Clean-Soil, Air, Water 39, 185-194.

¹⁹⁶ Amin, B.; Ismail, A.; Arshad, A.; Yap, C.K.; Kamarudin, M.S. (2009) *Anthropogenic impacts on heavy metals concentrations in the coastal sediments of Dumai, Indonesia*. Environmental Monitoring Assess 148, 291-305.

¹⁹⁷ Idris, A.M.; (2008) *Combining multivariate analysis and geochemical approaches for assessing heavy metal level in sediments from Sudanese harbors along the Red Sea coast*. Microchemical Journal 90, 159-163.

¹⁹⁸ Wu, Y.; Hou, X.; Cheng, X.; Yao, S.; Xia, W.; Wang, S. (2007) *Combining geochemical and statistical methods to distinguish anthropogenic source of metals in lacustrine sediment: a case study in Dongjiu Lake, Taihu Lake catchment, China*. Environmental Geology 52,1467-1474.

¹⁹⁹ Mohiuddin, K.M.; Otomo, K.; Ogawa, Y.; Shikazono, N. (2012) *Seasonal and spatial distribution of trace elements in the water and sediments of the Tsurumi River in Japan*. Environmental Monitoring and Assessment 184, 265-279.

²⁰⁰ Green-Ruiz, C.; Páez-Osuna, F. (2001) *Heavy metal anomalies in lagoon sediments related to intensive agriculture in Altata-Ensenada del Pabellón coastal system (SE Gulf of California)*. Environment International 26, 265-273.

El FE se usa para conocer la extensión de la contaminación de los sedimentos, siendo una herramienta efectiva para diferenciar la fuente de enriquecimiento de los metales entre antropogénica o natural^{196,199,201}.

En función de los valores de FE obtenidos se utiliza la clasificación que sugiere Acevedo y col. para conocer el grado de contaminación, tal y como se recoge en la Tabla VI.3²⁰¹.

Tabla VI.3. Grados de contaminación en función del FE.

Grado de contaminación	FE
No enriquecimiento	< 1
Enriquecimiento menor	< 3
Enriquecimiento moderado	3 - 5
Enriquecimiento moderadamente severo	5 - 10
Enriquecimiento severo	10 - 25
Enriquecimiento muy severo	25 - 50
Enriquecimiento extremadamente severo	> 50

De este modo, un FE menor a uno es indicativo de que no existe enriquecimiento respecto a los valores del fondo natural, es decir, que no existe una contribución de origen antropogénico.

VI.3. Índice de Geoacumulación

Otro criterio para evaluar el grado de contaminación por metales en los sedimentos es mediante el cálculo del Índice de Geoacumulación (I_{geo}). Según algunos autores, este criterio fue introducido por Müller, entre 1979-1981, aunque en 1969 ya se publicaba un trabajo que trataba sobre el tema en sedimentos de fondo^{202,203,204}. El I_{geo} permite

²⁰¹ Acevedo-Figueroa, D.; Jiménez, B.D.; Rodríguez-Sierra, C.J. (2006) *Trace metales in sediments of two estuarine lagoons from Puerto Rico*. Environmental Pollution 141, 336-342.

²⁰² Müller G (1969) *Index of geoaccumulation in sediments of the Rhine River*. GeoJournal 2,108-118.

²⁰³ Müller, G. (1979). *Schwermetalle in den sediments des Rheins — Veränderungen Seitt*. Umschan, 79, 778-783.

²⁰⁴ Müller, G. (1981). *Die Schwermetall belastung der sedimenten des Neckars und Seiner Nebenflusse*. Chemiker-Zeitung 6, 157-164.

la evaluación de la contaminación mediante la comparación de las concentraciones actuales con aquellas de períodos preindustriales fundamentalmente^{205,206}. El estudio de este Índice como indicador de contaminación de suelos y sedimentos es ampliamente reconocido en el mundo^{195,196,197,202,203,204,205,206,207,208,209,210}.

El método consiste en clasificar el grado de contaminación por metales de los sedimentos en siete grupos o clases, basados en el cálculo del I_{geo} mediante la fórmula:

$$I_{geo} = \log_2\left(\frac{C_n}{1,5B_n}\right) \quad \text{VI.2}$$

Donde C_n es la concentración del metal medida en la muestra de sedimento y B_n es la concentración del fondo. El factor 1,5 se introduce con el objetivo de minimizar el efecto en la variación de los valores de fondo debido a los efectos litogénicos¹⁹⁵, así como para analizar las fluctuaciones naturales en el contenido de una sustancia dada en el medio ambiente y las pequeñas influencias antropogénicas²¹⁰.

Los siete grupos o clases que permiten la clasificación del nivel de contaminación por metales en sedimentos fueron propuestos por Müller y se muestran en la Tabla VI.4²⁰⁴.

²⁰⁵ Krishna, A.K.; Govil, P.K. (2008) *Assessment of heavy metal contamination in soils around Manali industrial area, Chennai, Southern India*. Environmental Geology 54,1465–1472.

²⁰⁶ Förstner, U., Müller, G. (1981) *Concentrations of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in River Sediments: Geochemical background, man's influence and environmental impact*. GeoJournal 5.5, 417-432.

²⁰⁷ Kumar, S.P.; Patterson, J.K. (2009) *Assessment of metal concentration in the sediments cores of Manakudy estuary, south west coast of India*. Indian Journal of Marine Sciences 38, 235-248.

²⁰⁸ Jayaprakash, M.; Nagarajan, R.; Velmurugan, P.M.; Sathiyamoorthy, J.; Krishnamurthy, R.R.; Urban, B. *Assessment of trace metal contamination in a historical freshwater canal (Buckingham Canal), Chennai, India*. Environmental Monitoring and Assessment. DOI 10.1007/s10661-011-2509-5.

²⁰⁹ Alexakis, D. (2011) *Diagnosis of stream sediment quality and assessment of toxic element contamination sources in East Attica, Greece*. Environmental Earth Sciences 63, 1369–1383.

²¹⁰ Singh, M.; Ansari, A.A.; Müller G.; Singh, I.B. (1997) *Heavy metals in freshly deposited sediments of the Gomati River (a tributary of the Ganga River): effects of human activities*. Environmental Geology 29, 246–252.

Tabla VI.4. Grados de contaminación en función del I_{geo} .

Clases	Valor	Grado de contaminación
0	$I_{geo} < 0$	No contaminado
1	$0 < I_{geo} < 1$	De no contaminado a moderadamente contaminado
2	$1 < I_{geo} < 2$	Moderadamente contaminado
3	$2 < I_{geo} < 3$	De moderado a fuertemente contaminado
4	$3 < I_{geo} < 4$	Fuertemente contaminado
5	$4 < I_{geo} < 5$	De fuertemente a extremadamente contaminado
6	$5 < I_{geo}$	Extremadamente contaminado

VI.4. Estimación de la biodisponibilidad de un sedimento mediante digestiones parciales

Para establecer el impacto de los metales de los sedimentos no sólo es necesario considerar el contenido total de los mismos, sino también su movilidad y biodisponibilidad, puesto que de ella dependerá su capacidad de producir efectos adversos en los organismos al asimilar estos elementos. Por este motivo en los últimos años muchos trabajos han estado dedicados al desarrollo y modificación de métodos de digestión de la muestra que permitan extraer la fracción del metal biodisponible, tal y como se ha comentado en los capítulos anteriores.

Una de las formas más habituales de estimar qué fracción es más biodisponible ha sido mediante el uso de extracciones secuenciales. Este método permite establecer la cantidad de metal asociada a cada fase mineralógica, que a su vez está relacionada con la movilidad del elemento²¹¹. Son varios los trabajos que usan el método de extracción secuencial para estimar la biodisponibilidad de los metales enlazados en los sedimentos. Tal es el caso del trabajo de Vicente-Martorell y *col.* donde realizan un estudio de contaminación por metales en muestras de agua, sedimentos y dos especies de peces para conocer la biodisponibilidad de los mismos y así estudiar el

²¹¹ Yang, Z.; Wang, Y.; Shen, Z.; Niu, J.; Tang, Z. (2009) *Distribution and speciation of heavy metals in sediments from the mainstream, tributaries, and lakes of the Yangtze River catchment of Wuhan, China*. Journal of Hazardous Materials 166, 1186–1194.

posible impacto sobre la biota²¹². Para este estudio emplearon la digestión secuencial de tres etapas del BCR. En este estudio, los autores encontraron que el Cd, Zn y Cu fueron los elementos más disponibles de los estudiados. Por otro lado, como resultado del estudio de la acumulación de metales en branquias, hígado y músculos de dos especies de peces, encontraron altas concentraciones de Cu y Zn, fundamentalmente en el hígado, encontrándose además correlación entre el contenido del metal en los tejidos y las diferentes fracciones del metal en agua y sedimento. Por último, la dorada muestra correlaciones con los metales en las aguas, mientras que el lenguado se encuentra influenciado por los sedimentos.

El trabajo de Yang y *col.* por otra parte, realiza un estudio comparativo de concentración de metales en diversas muestras de sedimentos para finalmente evaluar el posible riesgo potencial de los metales estudiados. Este estudio lo realizan aplicando un método de digestión secuencial. También en este trabajo el Cd fue el elemento más móvil, seguido por el Cu y el Zn. Seguidamente realizan una evaluación del riesgo toxicológico potencial empleando la fórmula propuesta por Hakanson²¹³, concluyendo que los sedimentos estudiados presentan un riesgo bajo y moderado.

En otro trabajo consultado emplean el método de extracción secuencial propuesto por Tessier para evaluar la concentración de metales en sedimentos y peces²¹⁴. De acuerdo al resultado del fraccionamiento, estos autores también encontraron al Zn, Cd y Cu como los elementos más biodisponibles, siendo el Ni y el Co los menos biodisponibles de su estudio. Finalmente, los autores concluyen que las altas concentraciones de Zn, Cu, Cr y Pb en el pez estudiado se pueden atribuir a la asociación de dichos metales a la fracción biodisponible.

Por último, en el trabajo de Díaz-de Alba y *col.* se aplica la digestión secuencial para evaluar la movilidad de los metales en sedimentos de la Bahía de Algeciras²¹⁵. Sin embargo, en este trabajo el posible efecto sobre organismos acuáticos lo establecen

²¹² Vicente-Martorell, J.J.; Galindo-Riaño, M.D.; García-Vargas, M.; 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.

²¹³ Hakanson, L. (1980) *An ecological risk index for aquatic pollution control: a sedimentological*. Approach, Water Research 14, 975–1001.

²¹⁴ Sekhar, K.C.; Chary, N.S.; Kamala, C.T.; Suman, D.S.; Sreenivasa, A.S. (2003) *Fractionation studies and bioaccumulation of sediment-bound heavy metals in Kolleru lake by edible fish*. Environment International 29, 1001–1008.

²¹⁵ Díaz-de Alba, M.; Galindo-Riaño, M.D.; Casanueva-Marengo, M.J.; García-Vargas, M.; Kosore, C.M. (2011) *Assessment of the metal pollution, potential toxicity and speciation of sediment from Algeciras Bay (South of Spain) using chemometric tools*. Journal of Hazardous Materials 190, 177–187.

mediante las comparaciones con guías de calidad, el factor de enriquecimiento, el índice de geoacumulación y el factor de contaminación. De estos estudios concluyen que los sedimentos analizados se encuentran en estado prístino, exceptuando el As, Ni, Cr, Pb y Cd.

Por otro lado existen distintos métodos de digestión parcial que permiten estudiar la biodisponibilidad de los metales desde los sedimentos. Entre los métodos más empleados podemos mencionar la digestión total, el agua regia, así como otros métodos que emplean el HOAc, HCl, AEDT, ADTP, entre otros.

En el trabajo de Gupta se realiza un estudio de bioacumulación de diferentes metales en sedimentos, aguas de río, y músculos de dos especies de peces utilizando una mezcla de HNO₃, HClO₄ y H₂SO₄¹⁵⁸. Del estudio concluyeron que el Zn fue el metal de mayor acumulación en los sedimentos, seguido por el Pb, Cr, Cu y Cd. Por otro lado, encontraron que la tendencia de la acumulación de metales en los músculos fue similar a la hallada en agua y sedimentos, según el orden Zn > Pb > Cu > Cr > Cd, indicando que el Zn es el elemento que más se acumula en sedimentos y músculos.

En el trabajo anteriormente citado también se realizó una evaluación del riesgo potencial de los metales evaluados mediante la digestión con ADTP, obteniéndose extracciones significativas para el Cd, Co, Cu, Ni, Pb y Zn, con el siguiente orden de extracción Cu > Cd ≈ Pb > Zn > Co > Ni.

Un trabajo menos reciente realiza la extracción con siete métodos de digestión en muestras de sedimentos y en una especie de bivalvo, *Cerastoderma glaucum*²¹⁶. Los métodos estudiados fueron: HOAc 25 %, HCl 10 %, agua regia, HCl 6 M, HNO₃ 8 M, una mezcla de HCl/ HNO₃ (10:1) y, por último, la mezcla de HCl, HNO₃ y HF. En este trabajo sólo se encontró correlación entre el Fe determinado en el sedimento y en el bivalvo para los métodos de agua regia y HCl 6 M, no siendo significativas las correlaciones para el resto de los métodos y metales evaluados. Los autores atribuyen este comportamiento a que los métodos de extracción no son lo suficientemente selectivos para las diferentes fases químicas del sedimento.

²¹⁶ Arjonilla, M.; Forja, J.M.; Gómez-Parra, A. (1994) *Sediment analysis does not provide a good measure of heavy metal bioavailability to Cerastoderma glaucum (Mollusca: Bivalvia) in confined coastal ecosystems*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 52, 810—817.

Concluyendo, se conocen diversos criterios para evaluar el nivel de contaminación por metales en los sedimentos, sin embargo, todos estos criterios se basan en la determinación total de los metales. Sin embargo, la concentración total no provee información respecto a la movilidad, biodisponibilidad o toxicidad de los metales en los sedimentos. Por tanto, es posible que un sedimento contaminado por metales no manifieste efectos tóxicos, dependiendo de los procesos geoquímicos que controlan la biodisponibilidad del metal en el sedimento²¹⁷. Son muchos los trabajos que estudian la contaminación por metales en los sedimentos, sin embargo, son pocos los que relacionan dicha concentración con la posible asimilación de metales en los organismos acuáticos mediante el proceso de digestión. Es por ello que a continuación se mostrarán los resultados de la aplicación del método de digestión propuesto en este trabajo en la Bahía de Cienfuegos (Cuba) y el Río San Pedro en la Bahía de Cádiz (España), dos zonas de alto interés ambiental.

El primero de los ecosistemas, la Bahía de Cienfuegos, es una de las cinco bahías más importantes de Cuba. Representa una de las fuentes de reserva natural más significativas de la provincia de Cienfuegos, debido a las actividades pesqueras, el transporte marítimo, la industria turística y los parques naturales^{218,219}. Por estas razones, la Bahía de Cienfuegos ha sido explotada intensivamente, provocando un deterioro ecológico entre los que se pueden mencionar la pérdida de la biodiversidad, desplazamiento de las comunidades bentónicas, la reducción de los niveles de tamaño y captura de especies marinas comerciales y la erosión de la costa²¹⁹. La bahía es el receptor final de 116 fuentes de contaminación de las 131 identificadas en toda la provincia. De estas 116 fuentes, 54 son de origen industrial, 55 de origen pecuario y 22 de origen domésticas, donde sólo el 47 % de las fuentes reportadas presentan sistemas de tratamiento eficiente. La carga orgánica estimada en el 2009

²¹⁷ Garcia, C.A.B.; Barreto, M.S.; Passos, E.A.; Alves, J.P.H. (2009) *Regional geochemical baselines and controlling factors for trace metals in sediments from the Poxim River, Northeast Brazil*. Journal of the Brazilian Chemical Society 20, 1334-1342.

²¹⁸ Alonso-Hernandez, C.M.; Diaz-Asencio, M.; Munoz-Caravaca, A.; Delfanti, R.; Papucci, C.; Ferretti, O.; Crovato, C. (2006) *Recent changes in sedimentation regime in Cienfuegos Bay, Cuba, as inferred from ²¹⁰Pb and ¹³⁷Cs vertical profiles*. Continental Shelf Research 26, 153-167.

²¹⁹ Alonso-Hernandez, C.; Perez-Santana, S.; Munoz-Caravaca, A.; Dias-Asencio, M.; Gomez-Batista, M.; Brunori, C.; Morabito, R.; Delfanti, R.; Papucci, C. (2005) *Historical trend in heavy metals pollution in the sediments of Cienfuegos Bay, defined by ²¹⁰Pb and ¹³⁷Cs geochronology*. Nucleus 37, 20-26.

fue de 15000 Ton de DBO por año en este ecosistema²²⁰. Por todas estas razones, se comenzó un programa de investigación del medioambiente para definir las principales características físicas, químicas y biológicas de la bahía, cuyo conocimiento constituye la base para el correcto manejo del área²¹⁸. Estudios previos realizados en la bahía demuestran la presencia de metales en sedimentos, aguas y organismos marinos, siendo identificadas la termoeléctrica, la industria del plástico y las descargas urbanas las principales fuentes de contaminación por metales. Entre los más destacados se encuentran el V, Zn, Cr, Cd y Pb^{220,221,222}.

En el segundo ecosistema, Bahía de Cádiz (España), existen más de 2000 Has autorizadas para el cultivo acuícola. El mayor impacto ambiental de los últimos años fue debido a la desecación de alrededor de 5500 Has, con lo cual se perdió la mitad de la superficie de la bahía interior y ocasionó la corta del Río San Pedro y la desecación de gran parte de su cauce⁷³. Las aguas de este ecosistema bañan parte del Parque Natural Bahía de Cádiz, importante habitat por tanto, de especies migratorias de la avifauna y presenta gran diversidad de ecosistemas de transición marítimo-terrestre. El cuidado y protección de este ecosistema se encuentra recogido en el Plan Corrector de vertidos, desarrollado por la Junta de Andalucía y por el Plan de Ordenación de los Recursos Naturales del Parque Natural Bahía de Cádiz como zona C de protección⁷³.

Finalmente, los resultados del método propuesto en el presente trabajo serán comparados con los obtenidos con el método de HOAc 0,11 M, el cual es ampliamente utilizado en la literatura para estimar la fracción biodisponible de metales en sedimentos.

²²⁰ Alonso-Hernandez, C.; Perez-Santana, S.; Gomez-Batista, M.; Munoz-Caravaca, A.; Dias-Asencio, M.; Brunori, C.; Morabito, R. *Registros históricos de acumulación de metales pesados en los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos, Cuba. (artículo sin publicar).*

²²¹ González, H. (1991) *Heavy-metal surveys in sediments of 5 important Cuban bays*. Biogeochemistry 14, 113-128.

²²² González, H.; Ramírez, M.; Ablanedo, N. (1991) *Heavy-metals in fish (Micropogonias-Furnieri) from Cienfuegos bay, Cuba*. Marine Pollution Bulletin 22, 469-471.

VI.5. Estudio de los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos

VI.5.1. Caracterización de la zona de muestreo y toma de muestras

La Bahía de Cienfuegos se encuentra ubicada en la costa sur de Cuba y se trata de una típica bahía de bolsa, con un largo de 22 Km en dirección norte-sur y con un ancho de 3 Km en dirección este-oeste. Se encuentra unida al mar Caribe por un estrecho canal cuya longitud es de 3 Km. La presencia de un bajo submarino entre Cayo Carena y Punta Las Cuevas, divide a la bahía en dos zonas naturales⁴³. La ciudad de Cienfuegos se encuentra situada hacia el noreste de la bahía como se puede observar en la Figura VI.1.

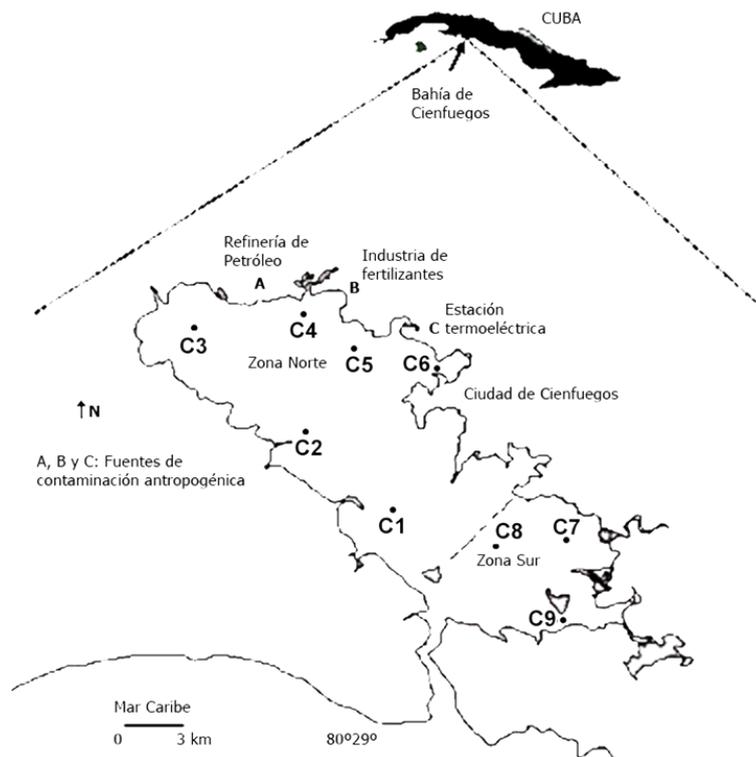


Figura VI.1. Mapa de la zona de muestreo de la Bahía de Cienfuegos.

La Bahía muestra composiciones mineralógicas bien definidas, predominando la calcita y los filosilicatos en la zona norte, mientras que en la zona sur aparecen fundamentalmente el feldespató, filosilicato, cuarzo y calcita. Por otro lado, en la zona cercana a la entrada de la Bahía predomina la dragonita, la calcita magnesífera y la calcita. Finalmente, podemos mencionar que la mayor parte de los sedimentos de la bahía están formados por arcilla y limo-arcilla, por tanto, cabe esperar que la mayoría de las muestras presenten un alto porcentaje de la fracción fina²¹⁸.

La Bahía de Cienfuegos recibe, fundamentalmente, el impacto directo de tres fuentes antropogénicas industriales: la refinería de petróleo y la industria de fertilizantes al norte; y más al nordeste la estación termoeléctrica. La zona sur recibe poco impacto antropogénico, principalmente por la desembocadura de los ríos Caonao y Arimao, que arrastran en sus cauces, fundamentalmente, desechos de la agricultura.

Durante los últimos años diversas campañas de muestreo han tenido lugar en la Bahía de Cienfuegos con el objetivo de evaluar diferentes parámetros, entre los que se encuentran los niveles de concentración de elementos trazas presentes en sus sedimentos. Las nueve muestras (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 y C9) escogidas en esta tesis para la aplicación del método propuesto se tomaron en una campaña realizada en el mes enero de 2012. Las mismas se colectaron en zonas cercanas a fuentes de contaminación de la Bahía.

La toma de muestras fue realizada por el Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos. En la toma de muestras se utilizó una draga Petersen, recogándose aproximadamente los primeros 10 cm de la superficie del fondo marino. Éstas fueron cuidadosamente seleccionadas para eliminar la presencia de restos de animales y plantas y preservadas en envases de polietileno a 4° C. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al Instituto de Ciencia y Tecnología de Materiales de la Universidad de La Habana, donde fueron secadas y envasadas para su traslado hacia Cádiz. Antes de realizar los análisis, las muestras se tamizaron con tamices de plástico de 63 µm de diámetro de poro y se secaron a 40° C durante 48 horas en estufa. Posteriormente se almacenaron a temperatura ambiente.

VI.5.2. Concentración total de metales en los sedimentos de Cienfuegos

En primer lugar se caracterizaron las muestras de la Bahía de Cienfuegos mediante el análisis de la concentración total de los catorce metales estudiados en este trabajo. El método de digestión total utilizado fue una modificación del EPA 3052, previamente descrito en el capítulo II. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas VI.5 y VI.6.

Tabla VI.5. Concentración total \pm desviación estándar en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de metales en sedimentos de la Bahía de Cienfuegos, Cuba. Parte I.

	Al	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe
C1	11636 \pm 12	2,79 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	3,90 \pm 0,10	11,2 \pm 0,4	11,4 \pm 0,1	7532 \pm 14
C2	20067 \pm 76	2,60 \pm 0,08	0,17 \pm 0,01	5,4 \pm 0,1	22,4 \pm 0,7	20,4 \pm 0,3	13057 \pm 18
C3	26840 \pm 76	3,00 \pm 0,02	0,30 \pm 0,01	8,0 \pm 0,1	21,7 \pm 0,4	25,87 \pm 0,04	22083 \pm 26
C4	20813 \pm 63	4,67 \pm 0,09	0,46 \pm 0,02	5,90 \pm 0,30	26,4 \pm 0,9	26,51 \pm 0,04	16676 \pm 17
C5	23300 \pm 81	3,23 \pm 0,02	0,20 \pm 0,01	5,90 \pm 0,70	25,14 \pm 0,09	31,3 \pm 0,2	15559 \pm 17
C6	24227 \pm 47	3,70 \pm 0,10	0,25 \pm 0,01	6,64 \pm 0,09	24,6 \pm 0,6	36,9 \pm 0,7	17612 \pm 29
C7	33448 \pm 5	3,55 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01	9,72 \pm 0,06	18,15 \pm 0,09	50,9 \pm 0,2	28263 \pm 43
C8	36958 \pm 26	4,40 \pm 0,10	0,16 \pm 0,01	10,46 \pm 0,01	22 \pm 2	38,2 \pm 0,3	28025 \pm 14
C9	49312 \pm 7	2,58 \pm 0,02	0,14 \pm 0,01	8,60 \pm 0,20	39,8 \pm 0,9	41,9 \pm 0,2	35683 \pm 14

Tabla VI.6. Concentración total \pm desviación estándar en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de metales en sedimentos de la Bahía de Cienfuegos, Cuba. Parte II.

	Li	Mn	Ni	Pb	Ti	V	Zn
C1	7,5 \pm 0,1	200 \pm 4	14,5 \pm 0,4	3,6 \pm 0,2	599 \pm 36	32,1 \pm 0,9	39,3 \pm 0,7
C2	17,1 \pm 0,3	155 \pm 3	27,7 \pm 0,7	4,0 \pm 0,1	962 \pm 40	54 \pm 1	26,5 \pm 0,5
C3	26,7 \pm 0,7	239 \pm 1	26,7 \pm 0,3	4,6 \pm 0,5	1500 \pm 4	67,1 \pm 0,2	33,6 \pm 0,1
C4	13,3 \pm 0,8	204,0 \pm 0,8	57,0 \pm 0,5	29 \pm 1	1100 \pm 3	70,1 \pm 0,3	37,5 \pm 0,3
C5	19,0 \pm 0,5	188 \pm 4	32 \pm 3	28,8 \pm 0,1	1048 \pm 26	62 \pm 6	42,2 \pm 0,5
C6	27,4 \pm 0,2	249 \pm 3	35,2 \pm 0,4	14,3 \pm 0,7	1160 \pm 18	86 \pm 3	138 \pm 2
C7	35,57 \pm 0,08	297,57 \pm 0,04	24,7 \pm 0,3	14,7 \pm 0,3	1783 \pm 2	78,1 \pm 0,6	46,9 \pm 0,3
C8	37,4 \pm 0,5	579 \pm 4	30,16 \pm 0,02	26,4 \pm 0,2	1752 \pm 20	78,9 \pm 0,9	54,7 \pm 0,8
C9	36,6 \pm 0,4	704 \pm 1	23,9 \pm 0,1	15,2 \pm 0,2	1687 \pm 22	67,5 \pm 0,3	52,2 \pm 0,1

Como se puede observar en ambas tablas, el Al, Fe y Ti son los elementos mayoritarios en las disoluciones de los sedimentos estudiadas, mientras que el Mn

puede considerarse un elemento de concentración intermedia. El resto de los elementos se pueden clasificar como traza de acuerdo a su concentración.

En general, las concentraciones más bajas para todos los metales se encontraron en la estación C1 con un menor impacto antropogénico. Cada metal presentó concentraciones elevadas en diferentes puntos dependiendo de las actividades desarrolladas en la zona y de la composición mineralógica del sedimento. En este sentido las muestras C7, C8 y C9 presentaron los mayores contenidos de Al, Fe, Li, Mn y Ti, debido a que estas muestras se tomaron en la zona sur de la bahía, en la cual predominan en su composición mineralógica los feldespatos y filosilicatos²¹⁸ (ver composición y estructura en el anexo 12). La mayor concentración de elementos litogénicos también pudiera estar relacionada con algún aporte adicional de esos elementos trasladados por los ríos que desembocan en esta zona, provenientes de alturas cercanas. Por otro lado, el Cu presentó altas concentraciones en la zona lo que puede explicarse igualmente por el aporte de ambos ríos, cuyos cauces corren por conocidos terrenos agrícolas cercanos a su paso, siendo el Cu un elemento que se relaciona con esta actividad al estar presente en los fertilizantes²²³.

Los puntos comprendidos entre C3 y C6 muestran las mayores concentraciones para la mayoría de los metales en la zona norte que comprenden las muestras desde la C1 hasta la C6, especialmente de Ni y Pb. En general, estas mayores concentraciones se pueden explicar, como se observa en la Figura V.1, porque las muestras antes mencionadas se encuentran cercanas a la Ciudad de Cienfuegos y a importantes industrias (como la de fertilizantes, refinería de petróleo y la termoeléctrica). Los residuos procedentes de estas actividades no reciben, en algunos casos, el tratamiento adecuado por ineficiencia de sus sistemas. También afectan esta zona los vertidos de hidrocarburos y de residuales procedentes del alcantarillado de la ciudad y de los buques del puerto²²⁰.

²²³ Rosas, H.; (2001) *Estudio de la contaminación por metales pesados en la cuenca del Llobregat*. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Catalunya.

VI.5.2.1. Comparación con otras campañas de muestreo

Comparando las concentraciones totales obtenidas en este trabajo (2012), con campañas de muestreo realizadas por el mismo centro en los años 2009 y 2011 se puede concluir que no existen grandes variaciones en el contenido de metales en las muestras²²⁴. Este resultado se puede observar en la Figura VI.2 (a) y (b) donde se muestran a modo de ejemplo las concentraciones de Cu y Pb respectivamente. El resto de los resultados se pueden encontrar en el Anexo 7 (a y b).

Como se puede observar en las figuras, no se aprecian grandes variaciones en las concentraciones de los metales en el tiempo, manteniendo un perfil similar para todos los casos. El Al, Cr, Fe, Li, Mn y Ti muestran un perfil similar al del Cu, siendo mayores las concentraciones en las muestras de la zona sur, mientras que el resto de los metales muestran un perfil similar al del Pb, siendo mayores las concentraciones, generalmente, en los puntos C5 y C6. Estos puntos se encuentran cercanos a fuentes de emisión antropogénicas, como se mencionó anteriormente. El resultado obtenido permite pensar que las fuentes de posible contaminación son estables, no aumentando significativamente su impacto sobre la bahía en el transcurso del tiempo.

²²⁴ Peña-Icart, M.; Mendiguchía, C.; Villanueva, M.; Moreno, C.; Pomares, M. (*datos sin publicar*).

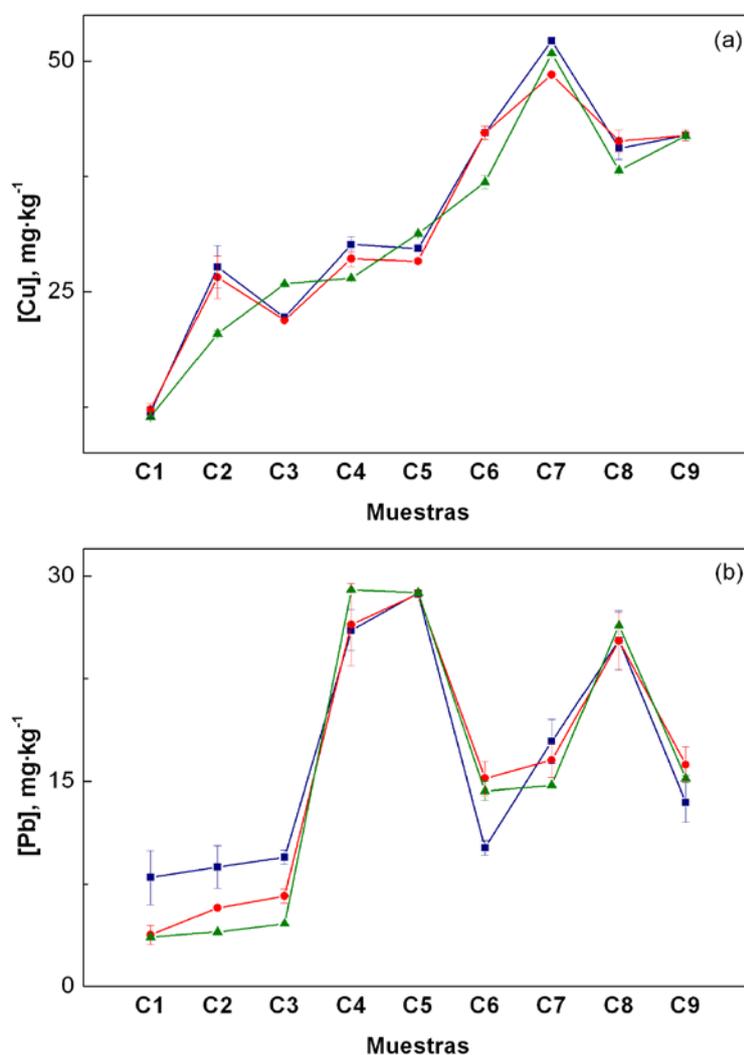


Figura VI.2. Comparación de la concentración de Cu y Pb en diferentes campañas de muestreo. (■): 2009, (●): 2011 y (▲) 2012.

Finalmente, para evaluar la influencia antropogénica sobre la concentración de los metales en los sedimentos estudiados, así como su posible riesgo toxicológico para la biota, se calcularon los Factores de enriquecimiento y el Índice de geoacumulación para los catorce metales estudiados, así como se compararon las concentraciones obtenidas con las propuestas por la guía de calidad de la NOAA. Posteriormente, se

aplicó el método propuesto por el presente trabajo con el objetivo de estudiar la biodisponibilidad de los metales en la zona y se comparó con los resultados obtenidos mediante la digestión con el primer paso de la extracción secuencial del BCR (ácido acético 0,11 M).

VI.5.2.2. Estimación del Factor de Enriquecimiento

Como se ha comentado anteriormente, el Factor de Enriquecimiento (FE) permite obtener el grado de contaminación antropogénica existente en una zona determinada. Para ello es necesario realizar la comparación de los valores de concentración total obtenidos con los de un valor de referencia o fondo. De todas las formas establecidas para calcular dicho valor, en este trabajo se eligieron, para todos los estudios donde fuera necesario, los valores medios de la corteza superior terrestre reportados por Rudnick y *col.* Estos datos son muy recientes y toman en consideración los estudios realizados previamente sobre este tema²²⁵. En la Tabla VI.7 se muestran los valores de referencia de los metales en estudio.

Tabla VI.7. Valores medios de los metales en la corteza superior terrestre.

Metal	[Metal], mg.kg⁻¹
Al	81458
As	4,8
Cd	0,09
Co	17,3
Cr	92
Cu	28
Fe	39177
Li	24
Mn	774,6
Ni	47
Pb	17
Ti	3835
V	97
Zn	67

²²⁵ Rudnick, R.L.; Gao, S. (2005) *Composition of the continental crust in R.L. Rudnick. The crust.* Elsevier. 194

Para el cálculo del FE no sólo se debe tener en cuenta la concentración del metal determinado en la zona de estudio, sino que este valor debe ser normalizado respecto a un elemento conservativo, como pueden ser el Al, Fe o Li. En este trabajo no se utiliza el Al como elemento conservativo debido que los sedimentos de Cienfuegos tienen abundante fracción mineralógica de feldespato, sobre todo en su zona sur, y se plantea en la literatura que estos minerales presentan un tamaño de grano variable, teniendo aproximadamente la misma cantidad de Al tanto en la fracción fina como en la gruesa¹⁸⁵. Por tanto, para la evaluación del FE en las muestras de Cienfuegos, se eligió al Li como elemento normalizador al considerar que se trata de un elemento conservativo y que los metales trazas se asocian a los mismos componentes mineralógicos que el Li, como son las micas, y minerales secundarios de arcillas^{183,189}. La Figura VI.3 muestra el FE de las muestras de la Bahía de Cienfuegos para todos los metales estudiados, calculado en cada caso como se describió previamente, así como los umbrales correspondientes a las diferentes categorías presentadas en la Tabla V.1 que fueron representadas en la figura como líneas discontinuas. Se debe recordar que cuando los valores se encuentran por debajo de 1 se clasifican los sedimentos como no enriquecidos mientras que cuando el valor se encuentra entre $1 > FE > 3$, el enriquecimiento es menor. Cuando los valores se encuentran entre 3 - 5 o de 5 - 10, se clasifican como muestras de enriquecimiento moderado a moderadamente severo.

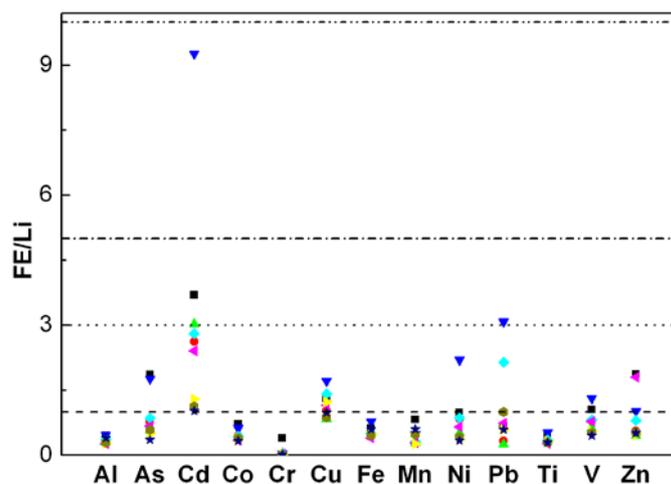


Figura VI.3. Factor de Enriquecimiento de los metales en los sedimentos de Cienfuegos. (■): C1, (●): C2, (▲): C3, (▼): C4, (◆): C5, (◆): C6, (●): C7, (●): C8 y (★): C9.

Como se puede observar en la Figura V.3, el Al, Co, Cr, Fe, Mn y Ti no presentan enriquecimiento en ninguna de las muestras analizadas, puesto que su valor es inferior a 1 para todos los sitios de muestreo según la escala propuesta por Acevedo en su trabajo²⁰¹. En general, el As, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn no mostraron enriquecimiento significativo en las muestras con algunas excepciones que se describen a continuación. Para la muestra C1 y C4 el Cd y el Pb, respectivamente, mostraron un enriquecimiento moderado (FE entre 3 - 5). Esta última muestra también mostró un enriquecimiento moderado para el V y moderadamente severo (FE entre 5 - 10) para el caso del Cd. Esto se debe, posiblemente, a que algunas de las muestras se encuentran en la zona cercana a las principales industrias de la provincia y la ciudad de Cienfuegos.

Sin embargo, se puede decir que, de manera general, los sedimentos de Cienfuegos presentan bajos niveles de enriquecimiento, pues en su mayoría no tienen enriquecimiento o el mismo es menor, de acuerdo a los grados de contaminación, excepto para los casos comentados anteriormente. De esta manera se puede concluir

que los sedimentos de Cienfuegos presentan, de manera general, una baja influencia antropogénica según el FE empleado.

VI.5.2.3. Evaluación del Índice de geoacumulación

Se evaluó el Índice de geoacumulación (I_{geo}) para las muestras mediante la ecuación VI.2 descrita anteriormente, mostrándose los resultados obtenidos en la Figura VI.4, junto con los niveles de referencia representados con las líneas discontinuas. En este caso, se debe tener en cuenta que cuando el I_{geo} es menor que cero, la muestra se clasifica como no contaminada. Por otro lado, cuando se encuentra entre $0 > I_{geo} > 1$, la muestra se encuentra de no contaminada a moderadamente contaminada mientras que cuando su valor se encuentra entre $1 > I_{geo} > 2$ la muestra se clasifica como moderadamente contaminada.

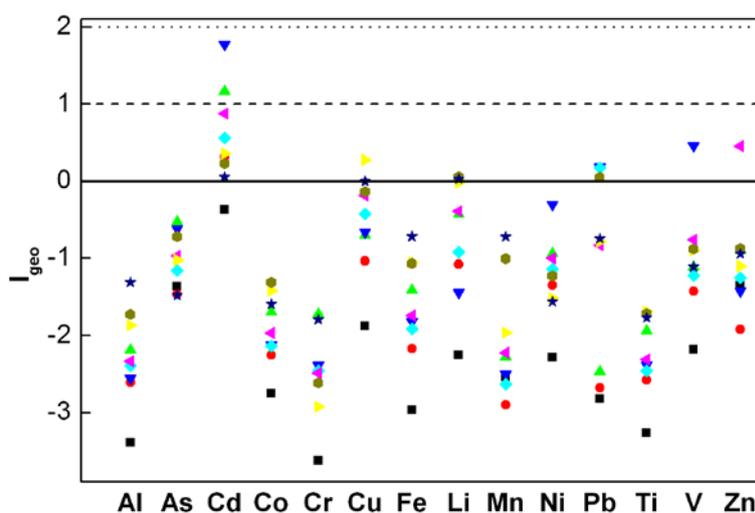


Figura VI.4. Índice de geoacumulación de los metales en los sedimentos de Cienfuegos. (■): C1, (●): C2, (▲): C3, (▼): C4, (◆): C5, (◄): C6, (►): C7, (●): C8 y (★): C9.

Como se puede apreciar para el Al, As, Co, Cr, Fe, Mn, Ni, Ti y Zn, ninguna de las muestras evaluadas presentan contaminación, puesto que tienen valores de I_{geo} inferiores a cero. Sin embargo, para el Cd prácticamente todas las muestras mostraron algún tipo de contaminación, siendo más acusado en la muestra C4, donde también se obtuvieron los mayores FE para este metal. Otros metales que presentaron algún tipo de contaminación fueron el Pb en la muestra C6 y C4, apareciendo en esta última también contaminación por V, probablemente relacionada con la cercanía de la refinería de petróleo. Para las muestras C7, C8 y C9 fueron varios los elementos que presentaron contaminación, como el Cd, Cu, Li y Pb. Esto puede deberse a las escorrentías de los ríos Caonao y Arimao, que desembocan en los puntos C8 y C9, cuyos cauces arrastran aguas residuales provenientes de la agricultura. Sólo la muestra C6 se clasificó de no contaminada a moderadamente contaminada para el Zn, coincidiendo con el enriquecimiento menor en esta muestra para este metal.

Estos resultados son, por tanto, coherentes con los obtenidos por el análisis del FE, pudiéndose concluir, de manera general y hasta el momento, que el principal efecto de la acción humana observado sobre los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos es la acumulación de Cd y Pb. Sin embargo, las concentraciones de estos elementos, aún cuando están enriquecidos en algunos sitios de muestreo, pueden no resultar perjudiciales para la biota según las normas que tienen en cuenta el efecto tóxico de los metales. Es por esta razón que a continuación se procederá a comparar las concentraciones de los metales en todas las muestras con los establecidos por la guía de calidad reconocida internacionalmente propuesta por la NOAA¹⁷⁹.

VI.5.2.4. Posibles efectos toxicológicos de los metales sobre la biota

A continuación se realizará la comparación de la concentración de As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn con las concentraciones de referencia dadas en la guía de calidad propuesta por la NOAA, mostrándose los resultados en las Figuras VI.5 a la VI.11, donde se observa la concentración de cada metal y sus correspondientes niveles guías

representados por líneas discontinuas. El resto de los metales no representados en las figuras no se estudiaron por no aparecer en las guías consultadas.

En primer lugar se puede mencionar que para ninguna de las muestras estudiadas, las concentraciones de As, Cd, Cr y Pb alcanzaron niveles lo suficientemente altos como para producir efectos tóxicos sobre la biota (por debajo del TEL), a pesar de que el Cd mostró FE e I_{geo} importante en todas las muestras. Cabe destacar que el Pb es uno de los elementos que mostró ligero enriquecimiento e I_{geo} para algunas muestras, sin embargo, el mismo no constituye un riesgo potencial para los organismos marinos como se observa en la Figura VI.8. Se debe recordar que el TEL se define como el nivel de concentración del elemento o compuesto por debajo del cual no existe riesgo potencialmente tóxico para los organismos vivos. Por otro lado, en la Figura VI.9 se observa el Zn, el cual se encontró entre el nivel de efecto umbral (TEL) y el rango de efectos bajos (ERL) para la muestra C6, siendo coherente este resultado con el obtenido en el FE, cuya clasificación fue la de enriquecimiento menor para esta muestra. Este hecho demuestra que, aunque existe un aporte antropogénico en la zona, el mismo no tiene por qué alcanzar niveles perjudiciales para la biota. No obstante, el conocimiento de la existencia de dichas fuentes permite mantener un control sobre sus vertidos y de esta manera evitar el aumento del enriquecimiento debido a la acumulación temporal.

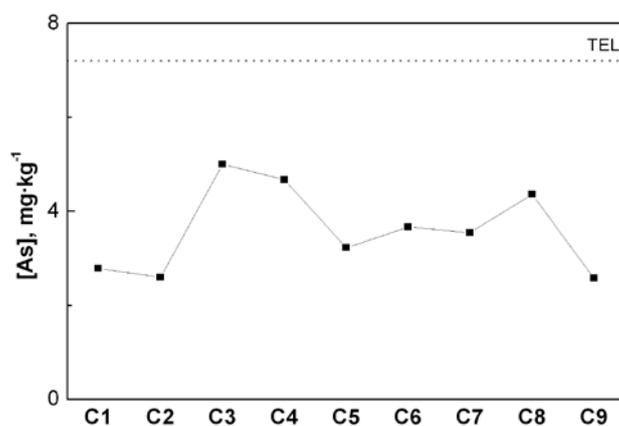


Figura VI.5. Comparación de la concentración de As con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

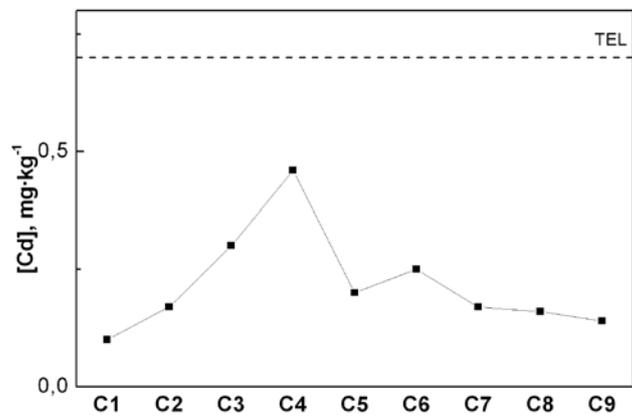


Figura V.6. Comparación de la concentración de Cd con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

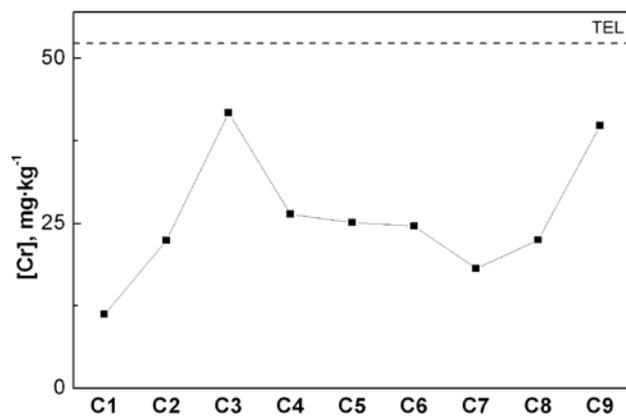


Figura VI.7. Comparación de la concentración de Cr con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

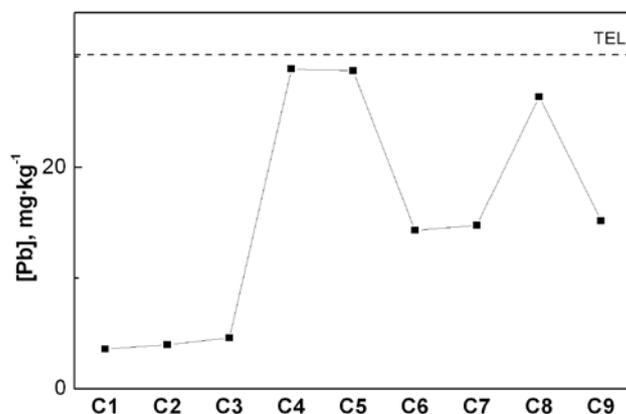


Figura VI.8. Comparación de la concentración de Pb con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

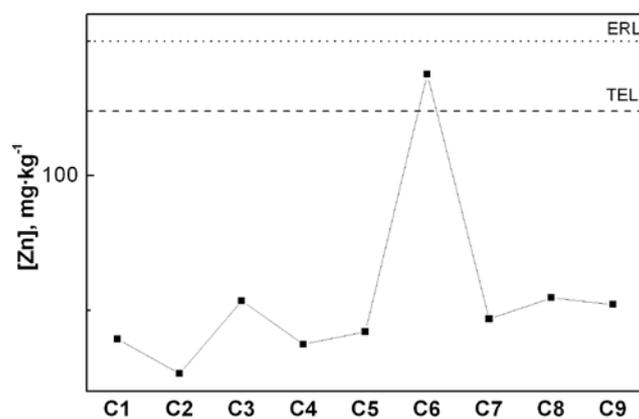


Figura VI.9. Comparación de la concentración de Zn con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

Para el Cu, como se puede observar en la Figura VI.10, sólo la muestra C1 estuvo por debajo del nivel de efecto umbral sobre la biota, mientras que las muestras de la C2 a la C5 se encontraron entre el nivel de efecto umbral y el nivel de efectos bajos, a pesar de que los valores de FE e I_{geo} no fueron relevantes para las mismas.

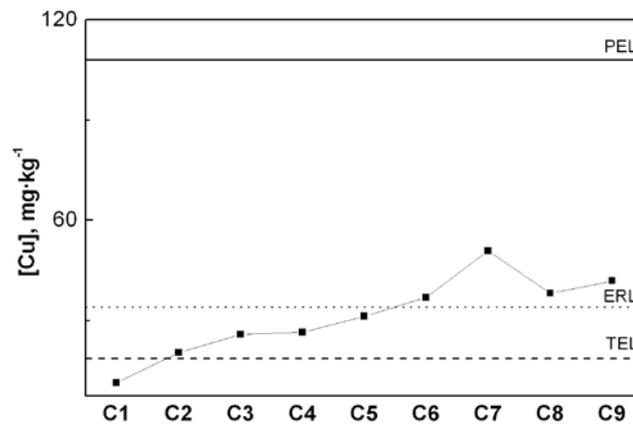


Figura VI.10. Comparación de la concentración de Cu con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

Por último, las muestras desde la C6 a la C9 se encontraron por encima del rango de efectos bajos pero alejadas del nivel de efectos probables como se puede observar en la Figura V.10. Este resultado es coherente con el obtenido previamente ya que se observó un enriquecimiento alto para muestra C6, y un I_{geo} de bajo a moderado para las muestras C7, C8 y C9.

Al analizarse el Ni podemos observar en la Figura VI.11 que sólo la muestra C1 no presenta riesgo alguno para la biota. Aunque sólo la muestra C4 superó el rango de efecto medio, mientras que el resto de los sitios se encuentran por debajo del nivel con efectos probables sobre la vida acuática. A pesar de no mostrar FE e I_{geo} considerables, las concentraciones de Ni para la mayoría de las muestras pueden tener un ligero efecto sobre los organismos vivos, siendo elevado para el caso de la muestra C4, debiéndose prestar la debida atención a este hecho por sus posibles efectos negativos sobre la biota.

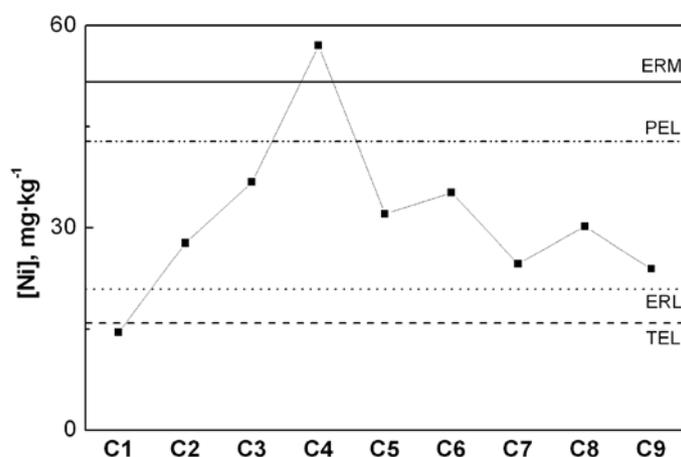


Figura VI.11. Comparación de la concentración de Ni con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

En resumen, se puede plantear que las muestras de la bahía de Cienfuegos presentan bajos índices de contaminación y enriquecimiento para la mayoría de los metales estudiados, con excepción de algunas muestras y elementos. Tal es el caso del Cd, que es el metal que más altos niveles de enriquecimiento presenta de manera general. Otro ejemplo es el V, que muestra algunos niveles de contaminación en los sedimentos C4 y C6, posiblemente por la influencia de la central termoeléctrica y la refinera de petróleo. Y por último, el Ni, que a pesar de no mostrar elevados valores de enriquecimiento ni contaminación, su concentración en la muestra C4 está por encima del nivel de efecto medio, constituyendo un riesgo potencial para la biota, siendo necesario, por tanto, el seguimiento de la contaminación por este metal.

VI.5.2.5. Evaluación de la biodisponibilidad mediante la primera etapa del BCR

Como se ha comentado anteriormente, la primera etapa del BCR es un método ampliamente utilizado para evaluar la biodisponibilidad de metales en sedimentos ya que disuelve los metales más móviles enlazados a la fracción intercambiable y de

carbonatos. Por esta razón, se realizó la digestión con este método a los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos. Posteriormente, estos resultados se compararon con los obtenidos por el método propuesto en el presente trabajo.

Una vez aplicado el método se puede observar que sólo para el Al, Cd, Cr, Fe y Mn se obtuvo una extracción por encima del límite de detección para todos los sedimentos, mientras que para el Zn sólo la muestra C9 estuvo por debajo del límite de detección. En la Tabla VI.8 se muestran los resultados de la extracción expresada en porcentajes de metal extraído respecto del total para todos los metales y muestras evaluados.

Como se puede observar en la tabla pocos metales pudieron ser detectados, y los que estuvieron por encima del LD tuvieron relativamente bajos porcentajes de extracción, excepto el Cd y el Mn en la mayoría de las muestras y el Zn con más del 50 % en las muestras C2, C4 y C5. Por tanto, puede considerarse que en general los metales de los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos presentan baja biodisponibilidad al ser evaluados por este método. Evidentemente, se puede pensar que los metales se encuentran asociados a otras fases además de la calcita, debido a que el HOAc está propuesto para disolver fundamentalmente a este mineral y los metales asociados a él.

Tabla VI.8. Fracción de metal biodisponible según el método de HOAc (0,11M) expresada en % respecto a la concentración total.

Metal	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
Al	1	1	1	1	1	1	1	1	0,1
As	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	45	< 10	<12	< 10
Cd	65	89	86	99	102	109	43	45	35
Co	< 11	< 11	< 11	< 11	< 11	< 11	< 11	< 11	< 11
Cr	3	3	2	3	3	3	2	3	0,2
Cu	< 6	< 6	< 6	15	< 6	< 6	9	13	< 6
Fe	1	1	1	0,5	1	0,5	4	4	0,2
Li	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	1	< 1
Mn	67	97	65	46	54	73	73	19	24
Ni	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
Pb	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Ti	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
V	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
Zn	12	76	48	52	52	12	27	15	< 7

Por otro lado, según la movilidad de los metales por el método de HOAc, se puede concluir que el Cd fue el elemento más móvil, seguido del Mn. En el caso del Cd, a pesar de su elevada movilidad, la concentración extraída no representa riesgo sobre los organismos marinos, debido a que su concentración total se encuentra por debajo del nivel umbral en la guía de calidad empleada. Por otro lado, el Zn en la muestra C6 y el Cu en la C4 se encuentran entre el umbral y el nivel de riesgo probable para la biota, sin embargo, estos metales mostraron baja biodisponibilidad en estas muestras, lo que puede indicar que es poco probable que los organismos marinos sean afectados por estos metales en esas zonas de muestreo. Similar conclusión se puede obtener para el Cu en las muestras C7 y C8, donde a pesar de estar entre los niveles de efectos bajos y probables, muestra baja movilidad, encontrándose poco biodisponible para la biota. Un caso especial es el Ni en la muestra C4, donde su valor se encuentra por encima del rango de efecto considerable, sin embargo, la movilidad de este metal fue inferior al 5 %, encontrándose inclusive por debajo del límite de detección para esta muestra, y por consiguiente se puede esperar que este metal no constituya un riesgo para los organismos debido a su muy baja biodisponibilidad. A continuación se comparan los resultados obtenidos mediante el método de HOAc con los obtenidos por el método propuesto en la presente tesis.

VI.5.2.6. Aplicación del método de digestión de HCl (12 horas y 20° C)

Una vez caracterizadas las muestras y evaluada su biodisponibilidad con el método de HOAc, se aplicó el método de digestión propuesto en este trabajo para conocer la biodisponibilidad de los metales hacia los organismos marinos mediante la digestión directa de los sedimentos. Los resultados de biodisponibilidad, asociada a la movilidad de los metales en cada sedimento se pueden observar en la Tabla VI.9, donde se muestran los porcentajes de extracción para los metales estudiados.

Tabla VI.9. Fracción de metal biodisponible según el método de HCl propuesto en el presente trabajo expresada en % respecto a la concentración total.

Metal	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
Al	12	9	11	10	10	10	15	14	3
As	49	65	44	59	55	66	31	25	43
Cd	70	96	101	102	104	93	60	38	42
Co	56	55	55	50	47	64	61	73	32
Cr	14	12	10	19	14	16	13	17	365
Cu	65	53	75	100	64	63	71	90	29
Fe	20	16	15	19	16	15	24	26	5
Li	53	23	15	30	21	15	11	11	11
Mn	101	84	71	55	69	82	105	22	27
Ni	35	30	32	43	47	37	31	34	20
Pb	95	100	102	72	39	65	31	27	14
Ti	2	1	1	1	2	1	1	1	1
V	55	59	67	102	77	83	39	36	25
Zn	37	84	94	83	92	100	61	50	17

En el grupo de los metales más biodisponibles se ubican el Mn, Cd, Co, Cu y Zn para la mayoría de las muestras, con porcentajes de extracción superiores al 50 %. Los metales As, Ni, Pb y V mostraron biodisponibilidad intermedia, con un porcentaje de extracción de entre 30 – 70 %, excepto el Pb en las muestras C1, C2, C3 y C4 y el V en las muestras C4, C5, C6 que mostraron biodisponibilidades más elevadas.

Como se puede observar, los metales menos biodisponibles de todo el estudio fueron el Ti, Al, Cr, Fe y Li, con extracciones inferiores al 30 % en la mayoría de las muestras, aunque Li en la muestra C1 resultó ser uno de los más móviles debido a su posible asociación a los óxidos de manganeso en el sedimento de ese sitio en particular²²⁶. Nótese que en otros sitios no se mantiene esa relación entre el Li y el Mn. En la Figura V.17a, se puede apreciar que el Mn en la muestra C1 fue extraído al 100 %, siendo, por tanto, el metal el más biodisponible que a su vez puede liberar a otros elementos, como el Li, que se encuentren asociados a sus compuestos.

²²⁶ Kabata-Pendias, A.; Pendias, H. (1992) *Trace element in soils and plants*, 1st ed. Boca Raton, F1: CRC Press, p. 365. 206

Es interesante destacar que en la muestra C9 se obtuvo la menor extracción para todos los metales. Este resultado se puede explicar debido a que en la zona sur de la bahía las fases mineralógicas predominantes son las más estables al ataque de diversos reactivos, como el cuarzo, los filosilicatos y los feldespatos.

Por otro lado, en la zona norte, especialmente para las muestras C4, C5 y C6 se observaron elevadas movilidades para la mayoría de los metales. En este sentido se debe destacar el V, cuyos mayores porcentajes de extracción se obtuvieron en estos sitios, coincidiendo con las zonas de mayor concentración total de este metal. El Ni, aunque en menor medida, también muestra un aumento de la biodisponibilidad en las mismas zonas que el V. Ambos metales se asocian principalmente a la industria petrolera, y son estos puntos los que reciben el impacto directo de la termoeléctrica y de la refinería de petróleo. Por otro lado, cabría esperar que la movilidad de muchos metales sea alta porque se trata de una zona donde la fase mineralógica que más abunda es la calcita.

Si se comparan estos resultados de biodisponibilidad con los riesgos toxicológicos establecidos mediante el empleo de las guías de calidad se pueden observar algunos hechos a destacar. Tal es el caso del Cd, cuya concentración total se encuentra por debajo del nivel umbral, no provocando efectos adversos a la biota, y sin embargo, es un metal muy biodisponible en el entorno gastrointestinal, siendo prácticamente liberado en su totalidad en las muestras de la C2 a la C6 y pudiendo ser asimilado por los organismos acuáticos de estas zonas. Otro caso a destacar es el del Cu, el cual es extraído en su totalidad en la muestra C4. Por tanto, todo el metal puede ser liberado en el estómago de los peces a través de la digestión de los sedimentos en este sitio y con ello, producir un efecto para estos organismos. Por otro lado, el Cu en las muestras C6, C7 y C8 se encontró entre el rango de efecto bajo y probable, con lo cual más del 50 % de este metal se encuentra disponible en el entorno gastrointestinal de los peces y por tanto, puede ejercer algún efecto negativo. Un caso al que se le debe dar seguimiento es al Ni en este mismo sitio (C4) debido a que su concentración se encuentra por encima del rango de efecto medio. Sin embargo, este metal presentó una biodisponibilidad intermedia y sólo se encuentra biodisponible una fracción inferior al 50 % del total determinado. Por último el Zn cuya concentración en la muestra C6

es superior al nivel umbral e inferior al rango de efectos bajos, se encuentra 100 % biodisponible los que aumenta la posibilidad de ser asimilado por los organismos y causar posibles efectos adversos.

Se debe destacar que la Bahía de Cienfuegos no presenta, en general, elevados niveles de contaminación, de acuerdo a los diversos criterios que emplean la concentración total del metal presente para evaluar la calidad del sedimento. Sin embargo, la mayoría de los metales, exceptuando a los elementos de origen litogénicos (Al, Fe, Li, Ti) y el Cr, presentan elevadas disponibilidades mediante la digestión con HCl, lo que facilita la presencia de estos elementos en el interior del sistema digestivo de los organismos marinos, debido precisamente a los procesos digestivos que como se ha demostrado en el presente estudio son mejor simulados por el HCl a las condiciones seleccionadas. Por otro lado, si se evalúa la biodisponibilidad de los metales en los sedimentos mediante el empleo del HOAc al 0,11 M, que corresponde con la primera etapa del BCR, se puede correr el riesgo de subestimar esta fracción y se puede arribar a conclusiones menos reales sobre el riesgo potencial que representan los metales para las especies marinas a partir de la subestimación de la fracción presente realmente en el entorno gastrointestinal de los peces. En la Figura VI.12 se muestra para el Zn, tomado como ejemplo, el porcentaje no extraído por el HOAc respecto al obtenido por el método propuesto en la presente tesis. A continuación se describe el comportamiento para el resto de los elementos estudiados. Para el Al, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Ti y Zn, se extrajo, en la mayoría de los casos, 50 % menos respecto al HCl. Sólo para algunas muestras y metales se obtuvo alguna extracción con HOAc respecto a lo extraído con el método propuesto. Por ejemplo, el HOAc extrajo el 1 % del total de As extraído por el método de HCl propuesto en el presente trabajo en la muestra C1 y alrededor de un 30 % de lo obtenido por el HCl en las muestras C7, C8 y C9. El HOAc extrae cerca de un 20 % del Cd obtenido con HCl en las muestras C6 y C9, mientras que se extrae alrededor de un 40 % y 16 % por HOAc respecto al HCl para el Li y el Mn respectivamente. Finalmente, el Pb y el V fueron lixiviados alrededor de un 20 % con HOAc respecto al obtenido por el método de HCl propuesto en las muestras C9 y C1 respectivamente. El resto de los metales se muestran en el Anexo 8.

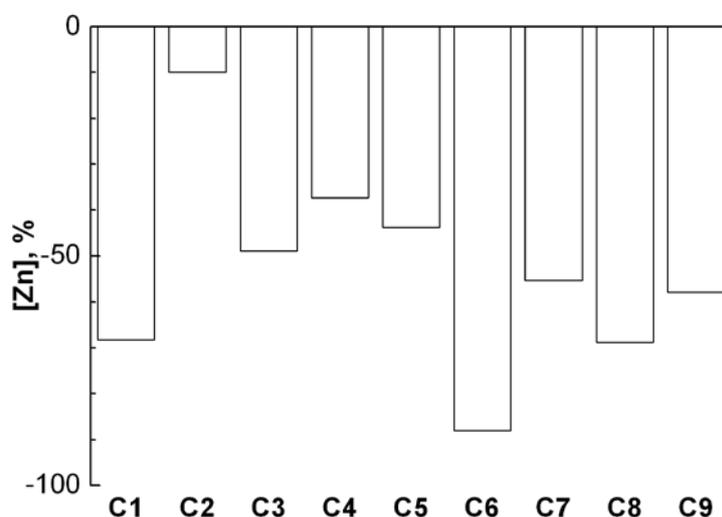


Figura VI.12. Porcentaje de Zn no extraído por HOAc respecto a lo obtenido por el método propuesto.

Por último, el método propuesto completa en buena medida la información que se obtiene al evaluar la contaminación de los metales en el sedimento con los diversos criterios, incluida la comparación con las concentraciones de referencia dadas en las guías de calidad. Partiendo de la premisa de que el método de digestión empleado en las guías es el total, se puede no prestar la debida atención a determinados metales por encontrarse por debajo del nivel umbral de riesgo tóxico. Sin embargo, como se puede observar, el Cd es un metal, que sin estar clasificado para los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos como potencialmente tóxico, es totalmente removido por el método propuesto en el presente trabajo, pudiendo pasar a través de la digestión hacia los organismos y participar en procesos de bioacumulación y biomagnificación a través de la cadena trófica.

VI.5.3. Estudio de los sedimentos de Río San Pedro

Para estudiar los sedimentos de Río San Pedro, se siguió la misma metodología de análisis que para los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos. En este caso se realizó

además un análisis de la composición mineralógica mediante DRX de las muestras debido a que no se contaba con esta información para las estaciones de muestreo. Posteriormente se analizaron los contenidos totales de los metales, se evaluaron el FE e I_{geo} y se compararon con las guías de calidad. Finalmente se realizó el estudio de biodisponibilidad con los métodos de la primera etapa del BCR y el propuesto en la presente tesis.

La zona y puntos de muestreo se muestran en la Figura II.1 en el capítulo de pretratamiento de las muestras. En primer lugar se debe recordar que el Río San Pedro está catalogado como un brazo de mar, con una longitud de 12 km. Gracias a la existencia de una depuradora en una de sus márgenes, las aguas residuales urbanas e industriales no son vertidas en la Bahía de Cádiz sin antes haber pasado por un tratamiento de depuración de las mismas. Sin embargo, los efluentes procedentes de las instalaciones acuícolas que se sitúan en la parte final del río, son vertidos a las aguas de RSP directamente sin tratamiento previo. En su tramo final el río posee forma de U. Esta zona tiene poca renovación de las aguas, producida sólo por las mareas lo cual favorece la acumulación de los sedimentos.

El muestreo se realizó en cinco puntos del RSP. El primero se encuentra ubicado en la desembocadura del mismo, mientras que el segundo punto corresponde a una zona intermedia, cercana a un pequeño núcleo urbano (población de Río San Pedro). Por último, los puntos RSP3, RSP 4 y RSP 5, se encuentran en el tramo final del RSP, recibiendo los puntos RSP 4 y RSP 5 la influencia de las instalaciones acuícolas. El punto RSP 3 se sitúa próximo a la Ciudad de El Puerto de Santa María y en las proximidades de una carretera con alta densidad de tráfico, sin embargo, en los puntos RSP 4 y RSP 5 se encuentran el centro de investigaciones y las instalaciones para el cultivo de la dorada respectivamente.

Una vez muestreados los sedimentos, se envasaron en bolsas de polietileno y fueron refrigerados hasta su tratamiento previo, descrito en el capítulo II. El tamaño de partícula al que se aplicó el método propuesto fue la menor de 63 μm .

VI.5.3.1. Caracterización de las muestras de RSP

En este caso se realizó un estudio de la composición mineralógica mediante la DRX de las muestras y posteriormente se analizaron los contenidos totales de los metales.

VI.5.3.1.1. Composición mineralógica de las muestras de RSP

En la Figura VI.13 se muestra el difractograma obtenido para la muestra RSP1 a modo de ejemplo. El resto de los gráficos se pueden encontrar en el Anexo 8.

Como se puede apreciar en la Figura VI.13, las fases más abundantes en los sedimentos de RSP, son la calcita y el cuarzo. La composición mineralógica semicuantitativa para todas las muestras estudiadas se lista en la Tabla VI.10.

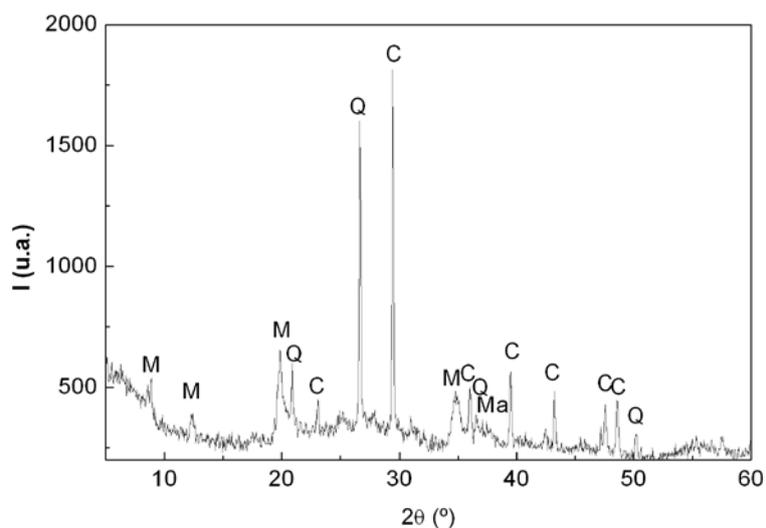


Figura V.13. Difractograma de la muestra de RSP1. Q: cuarzo, C: calcita, M: mica y Ma: magnetita

Tabla VI.10. Composición mineralógica semicuantitativa de las muestras de RSP. Las concentraciones están expresadas como porcentajes.

Muestra	Cuarzo	Calcita	Mica	Arcilla	Magnetita	Anortita
RSP1	30	51	15	-	4	-
RSP2	40	52	8	-	-	-
RSP3	44	52	4	-	-	-
RSP4	49	16	3	-	-	20
RSP5	35	37	9	3	-	3

La fase calcita predomina en las tres primeras muestras de RSP, mientras que el cuarzo es superior en la muestra RSP4. Como se ha comentado anteriormente se pudiera esperar que, en aquellas muestras con elevados contenidos de calcita, los metales sean más biodisponibles.

VI.5.3.1.2. Concentración total de metales en las muestras de RSP

Siguiendo la misma metodología de estudio empleada para los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos, inicialmente se realizó el análisis de la concentración total de los catorce metales evaluados en los cinco puntos de muestreo de Río San Pedro, cuyos resultados se pueden observar en la Tabla VI.11.

En los sedimentos de RSP, el Al, Fe y Ti se clasifican como elementos mayoritarios, mientras que el As, Cd, Co, Cr, Li y Pb son elementos traza en la muestra. El resto, Cu, Mn, Ni, V y Zn son elementos de concentración media. Se puede observar en la tabla que, de manera general, las mayores concentraciones de los metales se encontraron en las muestras RSP4 y RSP5, así como en la muestra RSP1 para el Cd, Cr, Cu, Ni, Ti, V y Zn. Se debe recordar que las muestras RSP4 y RSP5 reciben influencia de las instalaciones acuícolas y, debido a la poca renovación de las aguas, los sedimentos tienden a asentarse y, por tanto, a acumularse los metales en el tiempo.

Tabla VI.11. Concentración total \pm desviación estándar expresadas en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de las muestras en la fracción de $63\ \mu\text{m}$ de Río San Pedro, Cádiz.

Metal	RSP1	RSP2	RSP3	RSP4	RSP5
Al	1162 \pm 78	5643 \pm 30	3008 \pm 17	3460 \pm 19	3490 \pm 84
As	10,2 \pm 0,1	13,0 \pm 0,4	13,6 \pm 0,5	15,6 \pm 0,2	15,0 \pm 0,4
Cd	3,1 \pm 0,8	1,77 \pm 0,08	1,2 \pm 0,2	1,06 \pm 0,01	1,10 \pm 0,03
Co	10,3 \pm 0,9	13,1 \pm 0,1	13,6 \pm 0,2	15,6 \pm 0,2	15,0 \pm 0,2
Cr	24 \pm 2	9,4 \pm 0,1	18,9 \pm 0,6	18,3 \pm 0,8	17,7 \pm 0,1
Cu	110 \pm 2	34 \pm 1	331 \pm 2	355 \pm 1	300 \pm 9
Fe	298 \pm 25	341 \pm 23	553 \pm 18	605 \pm 4	595 \pm 7
Li	20,0 \pm 0,1	21,0 \pm 0,4	30,0 \pm 0,2	40,0 \pm 0,8	40,0 \pm 0,3
Mn	352 \pm 20	527 \pm 10	372 \pm 12	360 \pm 3	322 \pm 3
Ni	633 \pm 20	110 \pm 19	345 \pm 16	357 \pm 5	353 \pm 10
Pb	20 \pm 1	31 \pm 3	36,0 \pm 0,9	32 \pm 2	24 \pm 0,2
Ti	5111 \pm 1	3302 \pm 1	5004 \pm 1	4550 \pm 1	4885 \pm 1
V	165 \pm 8	115 \pm 7	340 \pm 10	359 \pm 15	353 \pm 14
Zn	149 \pm 15	93,6 \pm 1	143 \pm 2	138 \pm 2	130 \pm 2

La muestra RSP1 situada a la entrada del río en las aguas de la Bahía de Cádiz, pudiera presentar altas concentraciones de algunos metales debido a las actividades antropogénicas de la zona, entre las que se destaca la presencia de astilleros.

A continuación se comparó la concentración obtenida en los sedimentos del RSP en el año 2010 con otras campañas de muestreo realizadas en 1997, 1998 y 1999²²⁷.

VI.5.3.1.3. Comparación con otras campañas de muestreo

La Figura VI.14 muestra la distribución espacial y temporal de las concentraciones de Cu a modo de ejemplo para las diferentes muestras. El resto de los metales se pueden encontrar en el Anexo 10. El estudio comparativo, en particular, se realizó

²²⁷ Peña-Icart, M.; Mendiguchía Martínez, C.; Villanueva Tagle, M.; Pomares Alfonso, M.; Moreno Aguilar, C. Extraction of metals from marine sediments by simulating the conditions of the digestive systems of aquatic species. Comparison with Acid acetic methods. (En preparación)

para la fracción inferior a 500 μm por ser el tamaño de grano utilizado en los estudios previos realizados en esta zona^{74,228}. No se compararon al As, Cd, Li y V por no encontrarse datos de estos metales en los muestreos anteriores.

El primer resultado que podemos destacar es que se observó el mismo patrón de comportamiento en los diferentes sitios para las cuatro campañas, tanto para el 2010, como para las muestras de años anteriores, obteniéndose las mayores concentraciones en las muestras RSP3, RSP4 y RSP5 y las menores en las muestras RSP1 y RSP2. Por otro lado, se debe destacar que la concentración de los metales no mostró grandes variaciones entre los diferentes años de muestreo, aunque se observan algunas excepciones como el caso de la concentración de Cu para 1997 que fue superior a las obtenidas en el resto de los muestreos en el punto RSP5.

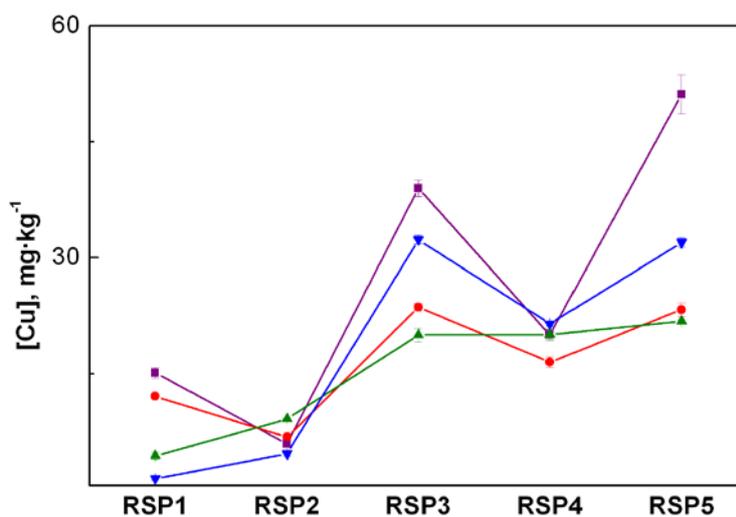


Figura VI.14. Comparación de la concentración de Cu en diferentes campañas de muestreo. (■): 1997, (●): 1998, (▲): 1999 y (▼): 2010.

²²⁸ Peña-Icart, M.; Mendiguchía Martínez, C.; Villanueva Tagle, M.; Moreno Aguilar, C.; Pomares Alfonso, M. *Spatial and temporal evaluation of metals in marine sediments originated from aquaculture effluents in Puerto Real, Spain*. (En preparación)

VI.5.3.1.4. Estimación del Factor de Enriquecimiento

Al igual que en el caso de la Bahía de Cienfuegos, para la estimación del FE se utilizó el Li como elemento referente, utilizando la ecuación VI.1 y los valores de la corteza mostrados en la Tabla VI.7. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura VI.15, donde se muestra el FE para todos los metales en las cinco muestras estudiadas.

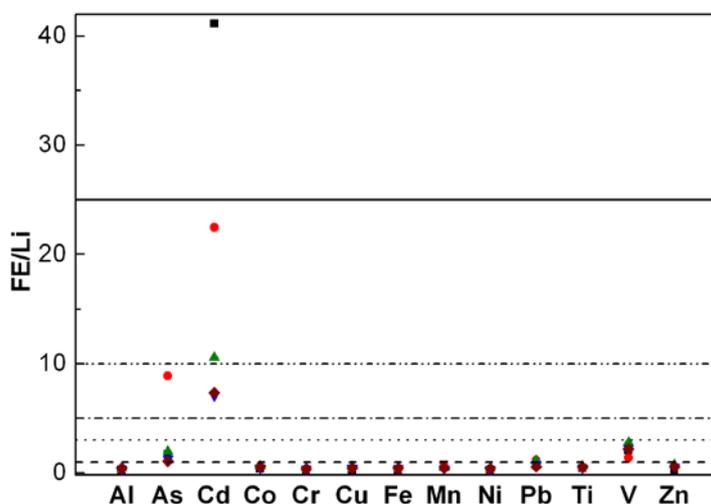


Figura VI.15. Factor de Enriquecimiento de los metales en los sedimentos de Río San Pedro. (■): RSP1, (●): RSP2, (▲): RSP3, (▼): RSP4 y (◆): RSP5.

Observando dicha figura se puede mencionar que el Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn y Ni no mostraron enriquecimiento en ninguna de las muestras, reflejándose en que dicho factor se encontró por debajo de 1 en todos los sitios. El Cd es el elemento más enriquecido de manera general en todas las muestras. Particularmente, presentó un enriquecimiento muy severo en la muestra RSP1, severo en las muestras RSP2 y RSP3 y moderadamente severo en las muestras RSP4 y RSP5. En las muestras RSP1 y RSP3 los elementos As, Pb, Ti, V y Zn mostraron un enriquecimiento menor.

En la muestra RSP2, además de los metales antes mencionados como no enriquecidos, también se incluye el Ti, mientras que el Pb, V y Zn presentan un enriquecimiento menor. Por último, para el As en esta misma muestra, se observa un enriquecimiento moderadamente severo. Cuando se analiza la muestra RSP4 se observa que, además de los metales Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn y Ni, el Ti no muestra enriquecimiento alguno, mientras que el As, Pb, V y Zn presentan un enriquecimiento menor, debido a que el valor de FE cumple con la condición $1 < FE < 3$. Al analizarse la muestra RSP5 tampoco se observa enriquecimiento para el As, Ti y Zn, mientras que el Pb y el V presentan un enriquecimiento menor. Si se comparan estos resultados con los obtenidos para los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos, se puede constatar que los sedimentos de Río San Pedro presentan niveles superiores de contaminación respecto a las muestras cubanas. Esto puede deberse a la baja renovación de las aguas del RSP, provocando el asentamiento de los sedimentos y la acumulación de los metales.

En resumen puede decirse que el sedimento RSP1 muestra enriquecimientos moderados para algunos metales, lo que conduce a pensar que, de acuerdo a su ubicación, estos niveles pueden deberse probablemente a una fuente procedente de la Bahía de Cádiz y no de las actividades acuícolas ubicadas dentro del propio RSP. El Cd, también presentó elevados niveles de enriquecimiento a lo largo de todo el río, por lo que resulta difícil identificar una única fuente de contaminación para este metal en la zona.

VI.5.3.1.5. Evaluación del Índice de geoacumulación

Como se hizo en el caso de la Bahía de Cienfuegos, se realizó la evaluación del I_{geo} para las muestras de RSP tomando como referencia para su interpretación y clasificación la Tabla V.2 de la introducción. En la Figura VI.16 se muestran los resultados de I_{geo} obtenidos para todas las muestras y metales evaluados.

Analizando los resultados se puede observar que para ningún punto de muestreo se encontró contaminación de Al, Co, Cr, Fe, Mn, Ti y V debido a que los valores de I_{geo}

de todas las muestras fueron menores que cero. Nuevamente el Cd mostró elevados niveles para todas las muestras analizadas, con un enriquecimiento de moderado a fuertemente contaminado para las muestras RSP2, RSP3, RSP4 y RSP5, mientras que para la muestra RSP1 estuvo en el rango de fuertemente a extremadamente contaminado. En la muestra RSP1 el As y el Li no mostraron contaminación, mientras que el Pb y el Zn se encuentran en el rango entre no contaminado a moderadamente contaminado. En el caso del Cu y del Ni los valores de concentración se encontraron entre moderadamente contaminado y fuertemente contaminado respectivamente.

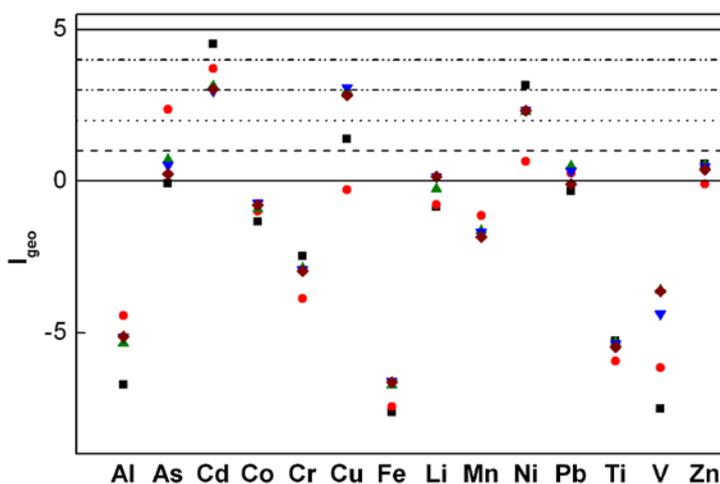


Figura VI.16. Índice de geoacumulación de los metales en los sedimentos de Río San Pedro. (■): RSP1, (●): RSP2, (▲): RSP3, (▼): RSP4 y (◆): RSP5.

Cuando se analiza la muestra RSP2 se encontraron las concentraciones de Li, Zn y Cu no contaminadas, el Ni y el Pb se encuentran en la categoría de no contaminados a moderadamente contaminado, y el As se clasificó de moderado a fuertemente contaminado. Además del Al, Co, Cr, Cu, Fe, Mn y Ni, el Li es otro de los metales no contaminados en la muestra RSP3, mientras que el As y Zn presentaron niveles entre no contaminado a moderadamente contaminado. El Ni muestra valores de moderado a fuertemente contaminado mientras que el Pb se clasifica como de no contaminado a

moderadamente contaminado. Por otro lado, al igual que ocurrió para el Cd, en esta muestra RSP3, se encuentra fuertemente contaminada en Cu. Por otro lado, en la parte más interna del río, en la muestra RSP5, el Li, Pb y Zn fueron otros metales que no mostraron contaminación, encontrándose en el rango de no contaminado a moderadamente contaminados para la muestra RSP4. Por último, el Ni y el Cu fueron los metales más contaminados en las muestras RSP4 y RSP5 después del Cd. El Ni se encontró de moderado a fuertemente contaminado para la muestra RSP4 y moderadamente contaminado para la muestra RSP5. Nuevamente se ve la influencia de los cultivos acuícolas en la zona, obteniéndose los niveles más altos de Cu y Ni en las muestras cercanas al centro de investigaciones y de la granja acuícola. Esto unido a la escasa renovación de sus aguas que favorece el depósito de materia fina, permite la acumulación de metales en esta zona del río.

Una vez evaluado el grado de contaminación de la zona y con el objetivo de analizar los posibles riesgos tóxicos para los organismos vivos se compararon las concentraciones de los metales en todas las muestras con los establecidos por dos de las guías de calidad reconocidas internacionalmente, las propuestas por NOAA^{178,179}.

VI.5.3.1.6. Posibles efectos toxicológicos de los metales sobre la biota

Como se hizo anteriormente, se realizó la comparación de la concentración sólo de As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn con ambas guías de calidad puesto que para el resto de los metales no existen valores establecidos en esas guías consultadas. Los resultados se muestran en las figuras VI.17 a la VI.23, donde se puede observar la concentración de cada metal y sus correspondientes niveles guías, mostrados en líneas discontinuas.

Como se puede observar en la Figura VI.17, sólo el Cr mostró valores de concentración por debajo del umbral del nivel de efecto en todas las muestras¹⁷⁹. Este resultado coincide con el obtenido para este elemento con el FE e I_{geo}, los que indicaron ausencia de contaminación en todas las muestras analizadas.

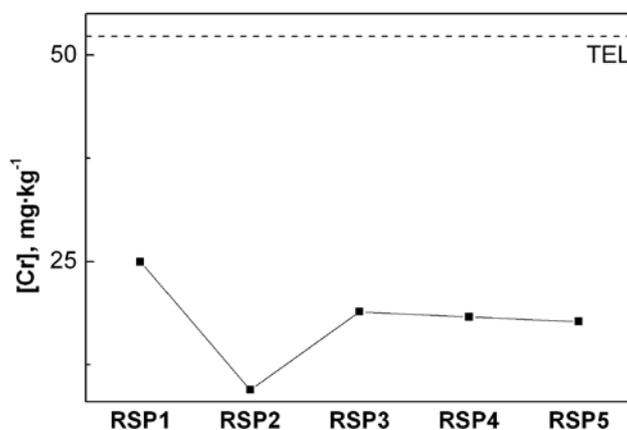


Figura VI.17. Comparación de la concentración de Cr con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

Para el Cd, representado en la Figura VI.18, las muestras RSP1 y RSP2 mostraron contaminación por encima del nivel de efectos bajos pero por debajo del nivel de efectos probables, siendo mayor la contaminación en la muestra RSP1. Este resultado coincide con el hecho de que la muestra RSP1 mostró el valor más elevado de FE de todas las muestras estudiadas, así como el mayor I_{geo} de todos los metales analizados en dicha muestra. Para el resto de las muestras se encontró por debajo del rango de efecto probable.

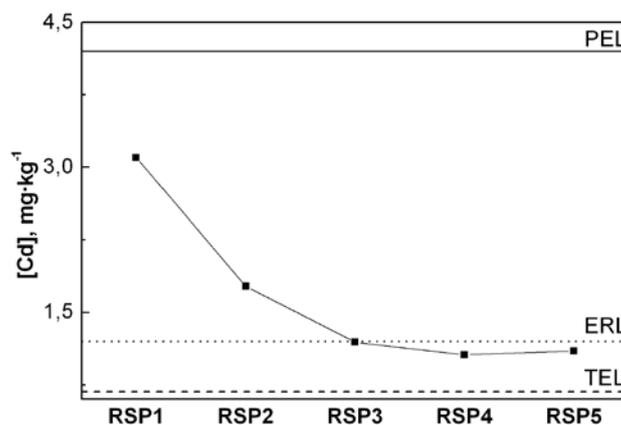


Figura VI.18. Comparación de la concentración de Cd con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

De esta manera se puede decir, que el Cd, en las muestras de RSP, constituye un riesgo potencial mayor para la biota existente en el río que las muestras de la Bahía de Cienfuegos.

En el caso del As, como se puede apreciar en la Figura VI.19, todas las muestras estuvieron por encima de la concentración del nivel de efecto bajo, pero alejadas del nivel de efecto probable. Sin embargo, la muestra RSP5 no mostró enriquecimiento alguno y la muestra RSP1 se clasificó como no contaminada de acuerdo a su I_{geo} . Al compararse estos resultados con los obtenidos en Cienfuegos, se puede observar que para el As, nuevamente el RSP muestra valores de concentración superiores, pudiendo provocar posibles efectos adversos para los organismos, debido a que, a diferencia de lo que ocurre en Cienfuegos, las concentraciones están por encima del nivel de efecto bajo en estos sedimentos.

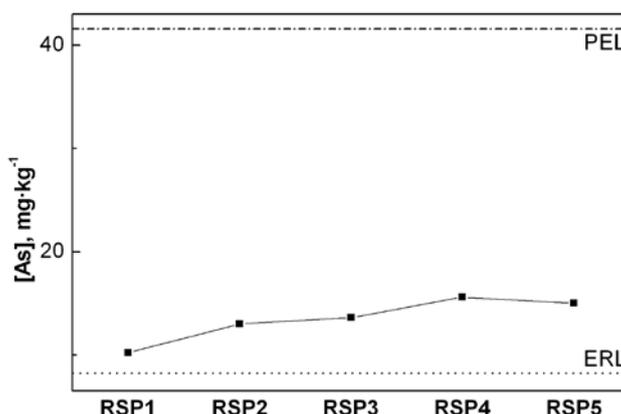


Figura VI.19. Comparación de la concentración de As con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

El Cu es uno de los metales que muestra mayor riesgo potencial de efectos adversos sobre la biota. Si se observa la Figura VI.20 se puede notar que todas las concentraciones se encuentran por encima del nivel umbral dado en la guía de calidad de la NOAA. Sólo la muestra RSP2 se encontró por debajo del rango de efecto biológico probable, encontrándose la muestra RSP1 muy cercana al mismo. El resto de las muestras presentaron concentraciones de Cu por encima del nivel de efectos

biológicos considerables. En este caso también se habían encontrado valores de enriquecimiento e I_{geo} altos indicando un posible aporte en la zona que puede llegar a ser perjudicial para los organismos.

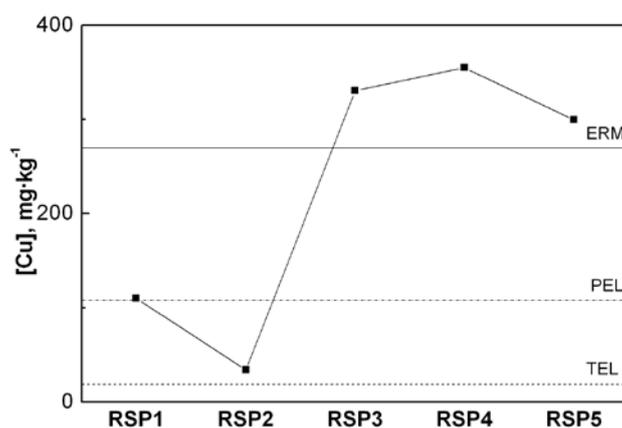


Figura VI.20. Comparación de la concentración de Cu con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

Todas las muestras analizadas para el Ni se encontraron por encima del nivel de efecto biológico considerable, por tanto, se le debe prestar especial atención a este metal y sus posibles fuentes de contaminación, sobre todo en la muestra RSP1, que presentó además un alto I_{geo} . Los resultados para Ni se pueden apreciar en la Figura VI.21.

Cuando se comparan los niveles de contaminación de Ni entre Cienfuegos y RSP. Se puede decir, de manera general, que los sedimentos del segundo ecosistema se encuentran notablemente más contaminados para este metal que los de la Bahía de Cienfuegos de manera general.

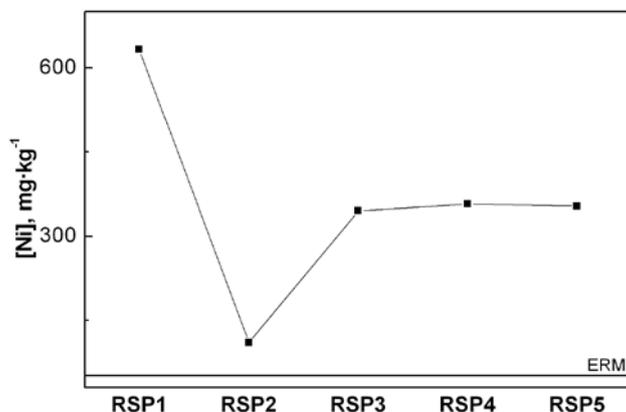


Figura VI.21. Comparación de la concentración de Ni con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

Para el Pb, Figura VI.22, las muestras RSP1 y RSP5 no muestran concentraciones que puedan causar efectos biológicos para los organismos marinos, mientras que el resto se encontró por encima del umbral y por debajo del nivel de efectos biológicos bajos, y tampoco representa grandes peligros para la biota. Ya se habían observado enriquecimientos bajos para este metal en todas las muestras, así como valores de I_{geo} inferiores a cero que lo clasifican como sedimento no contaminado por Pb, excepto en RSP3 que presentó una concentración entre no contaminado a moderadamente contaminado.

Nuevamente, los sedimentos de RSP presentan mayor grado de contaminación de Pb que los evaluados en la Bahía de Cienfuegos. Esta diferencia puede deberse en parte, a que se trata de dos ecosistemas marinos muy diferentes en cuanto a movimiento y renovación de sus aguas.

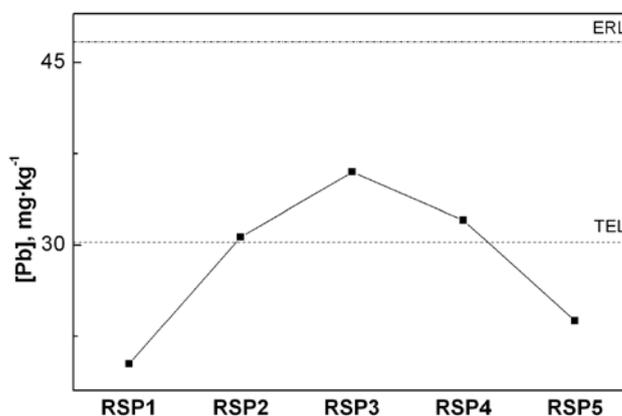


Figura VI.22. Comparación de la concentración de Pb con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

Para el Zn sólo la muestra RSP2 se encontró por debajo del umbral coincidiendo con la ausencia de contaminación en este punto, según los criterios previamente revisados. Sin embargo, para el resto de las muestras la concentración se encontró entre el nivel umbral y el nivel de efectos biológico bajo. Este resultado se puede observar en la Figura VI.23, donde se muestra las concentraciones del Zn en todos los sitios de muestreo y los valores umbral y del rango de efecto bajo.

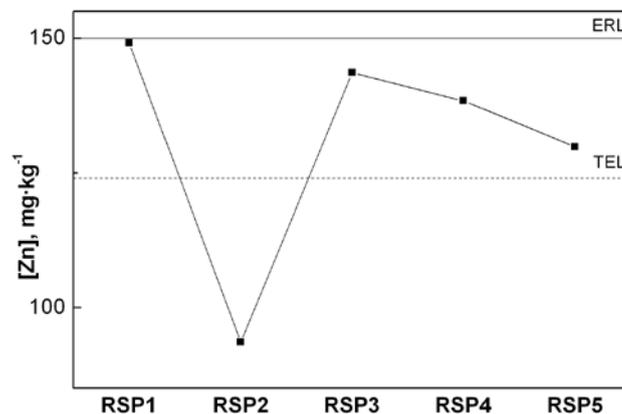


Figura VI.23. Comparación de la concentración de Zn con la guía de calidad de sedimentos NOAA.

En resumen, las muestras de RSP presentan un considerable FE e I_{geo} para algunos metales como el Cd, Cu, Ni y As, aunque sólo representan niveles de efectos biológicos probables y en algunos considerable el Cd, Cu y Ni. Por tanto, se le debe prestar especial atención a la contaminación por estos metales en los sitios analizados.

VI.5.3.1.7. Evaluación de la biodisponibilidad mediante la primera etapa del BCR

En primer lugar se evaluó la biodisponibilidad utilizando la primera etapa del método BCR. En este caso sólo el Al, Cd, Co, Cr, Mn, Ni y Zn fueron detectados por encima del límite de detección. Todos los metales detectados presentaron biodisponibilidades muy bajas, menores al 15 % de manera general, excepto el Mn, que presentó extracciones por encima del 64 %. Se pudiera concluir por tanto, que muy poca cantidad de metal se encuentra asociada a las fases de carbonatos e intercambiable, debido a que el HOAc está propuesto para disolver estas fases fundamentalmente.

Si se tiene en cuenta la movilidad de los metales por el método de HOAc se puede observar que el Mn es el elemento más biodisponible, con extracciones superiores al 65 % seguido por el Co (10 %) y el Zn (6 %), mientras que los menos móviles de los elementos detectados fueron el Al (0,1 %) y el Cd (2,6 %).

Por otra parte, a pesar de clasificarse los sedimentos de RSP como contaminados para algunos metales, por ejemplo el Cd, los mismos no constituyen un riesgo biológico debido a su baja biodisponibilidad. En la Tabla VI.12 se muestran los resultados de la extracción expresada en porcentajes para todos los metales y muestras evaluados.

Tabla VI.12 Fracción de metales biodisponibles según el método de HOAc expresada en % respecto al total.

Metal	RSP1	RSP2	RSP3	RSP4	RSP5
Al	7,4	0,1	2,3	2,6	2,4
As	< 9	< 9	< 9	< 9	< 9
Cd	2,6	6,1	6,9	8,7	6,8
Co	14,1	16,2	10,7	23,1	17
Cr	0,6	1,5	0,9	0,9	0,7
Cu	< 6	< 6	< 6	< 6	< 6
Fe	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
Li	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Mn	68	65	84	104	84
Ni	0,7	4	1	1	1
Pb	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Ti	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
V	< 2	< 2	< 2	< 2	< 2
Zn	6	15	12	8	6

Si se toman en cuenta los valores de referencia dados en las guías de calidad de los sedimentos se puede plantear que a pesar de que el As, Cu y Pb presentaron concentraciones en algunos casos elevados y de riesgo potencial importantes, estos metales no fueron extraídos en ninguna de las muestras analizadas, lo que sugiere que no constituyen riesgo alguno para la biota. Similar análisis se puede realizar para el Ni, que presenta en todas las muestras riesgos potenciales de daños, sin embargo, tiene bajas movilidades con el método de HOAc. Este hecho permite concluir que el Ni tampoco constituye un riesgo para los organismos acuáticos, a pesar de las concentraciones totales encontradas. Una conclusión análoga se puede mencionar para el Zn para los cinco puntos evaluados.

En comparación con los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos se puede observar que el Al, Co y Ni fueron más biodisponibles en RSP que en los sedimentos del ecosistema cubano. Sin embargo el Cd, Cr, Fe y Zn mostraron mayor biodisponibilidad

en los sedimentos de Cienfuegos. Sólo el Mn mostró movilidades similares en ambos ecosistemas mediante el empleo de la primera etapa del método BCR.

VI.5.3.1.8. Aplicación del método de digestión de HCl (12 horas y 20° C)

Una vez caracterizadas las muestras respecto a su contenido total y biodisponible con HOAc, se aplicó el método de digestión propuesto en este trabajo para conocer la biodisponibilidad de los metales hacia la biota mediante la digestión directa de los sedimentos. Los resultados de biodisponibilidad, asociada a la movilidad de los metales con HCl en cada muestra, se pueden observar en la Tabla VI.13. Los metales más biodisponibles fueron el Al, As, Co, Mn, Pb y Zn, con porcentajes de extracción superior al 50 % para el Mn y el Pb, mientras que para el resto se extrae entre un 20 y un 50 %. Los menos biodisponibles fueron el Cd, Cr, Cu, Fe, Li, Ni, Ti y V, con extracciones menores al 25 %, exceptuando el Cu en la muestra RSP2 con un 42 %. Para la mayoría de los metales la biodisponibilidad fue similar en todas las muestras evaluadas, probablemente debido a la similitud de su composición mineralógica, excepto algunas excepciones, como por ejemplo el Cu, Fe y V en las muestras RSP1 y RSP2, y el Mn en la zona final del río. La baja movilidad de los metales en los últimos puntos de muestreo, fundamentalmente en las muestras RSP4 y RSP5, coincide con la menor concentración de calcita encontrada de todas las muestras estudiadas, pudiendo este factor estar contribuyendo a la poca biodisponibilidad de los mismos.

Es importante señalar que los elementos Cu y Ni resultaron ser los menos biodisponibles para las muestras de RSP. Esto disminuye la posibilidad de riesgo para los organismos vivos, a pesar de que la mayoría de las muestras evaluadas se encontraban por encima del rango de riesgo biológico considerable.

Tabla VI.13 Fracción de metales biodisponibles según el método de HCl propuesto expresada en % respecto al total.

Metal	RSP1	RSP2	RSP3	RSP4	RSP5
Al	54	24	46	42	47
As	30	32	37	24	25
Cd	3	5	9,6	11	5
Co	40	34	33	37	28
Cr	6	14	9	8	9
Cu	17	42	5	4,8	5,8
Fe	17	25	10	5	5,6
Li	20	20	13	10	10
Mn	80	64	95	112	99
Ni	1	5	2	2	2
Pb	61	54	53	47	54
Ti	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2
V	15	19	7	6	7
Zn	17	29	26	19	20

Por otro lado, los porcentajes de extracción con el método propuesto son superiores para el Al, As, Co, Cr, Cu, Li, Ti, V y Zn respecto a la primera etapa del BCR, mientras que para el Fe fue inferior y para el Cd, Mn y Ni fueron similares. Se debe recordar que el método con HOAc está propuesto para la disolución de los carbonatos y la fase intercambiable, mientras que el HCl ataca además los óxidos de Fe y Mn gracias a su propiedad reductora⁹⁹. Por tanto, se puede concluir que al aplicarse el estudio con la primera etapa del BCR se puede subestimar la fracción real que puede ser disuelta en el entorno gastrointestinal de los peces, y de esta manera, arribar a conclusiones erróneas. Este resultado se demuestra además en la Figura VI.24 donde se describe el porcentaje de Zn no extraído por el método de HOAc respecto al HCl.

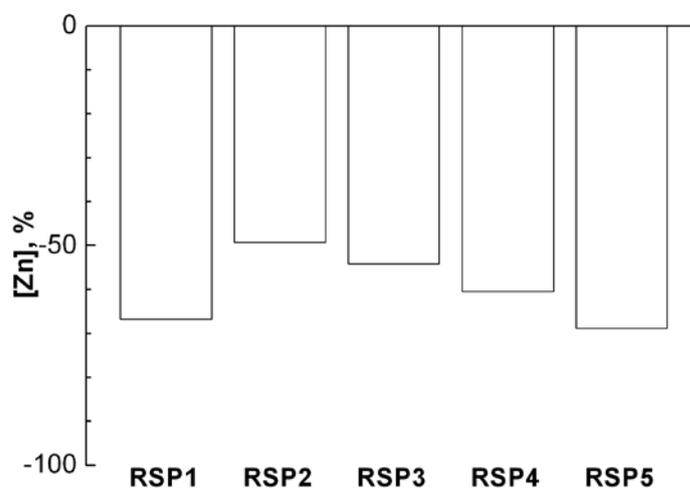


Figura VI.24. Porcentaje de Zn no extraído por HOAc respecto a lo obtenido por el método propuesto.

Al compararse las biodisponibilidades de los metales en los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos con los del Río San Pedro, se puede concluir que el As, Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Ti, V y Zn son más móviles en las muestras del ecosistema cubano, conllevando un mayor riesgo para los organismos marinos. Sólo el Cr, Li, Mn y Pb presentan movilidades similares en ambos ecosistemas, mientras que el Al se encuentra más biodisponible en los sedimentos de RSP. Por tanto, a pesar de encontrarse los sedimentos de RSP más contaminados conllevan menor riesgo para los organismos marinos que los de la Bahía de Cienfuegos, al presentar los metales menores movilidades y encontrarse los metales menos asequibles para la biota.

Por otro lado, si se comparan las concentraciones extraídas por ambos métodos parciales (HOAc BCR y el de HCl propuesto en la presente tesis) con los valores de posible riesgo ecotoxicológico propuesto por la NOAA, se observa en primer lugar que el método de HOAc del BCR extrae menor cantidad que el propuesto en este trabajo, con lo cual, se puede correr el riesgo de subestimar el riesgo real que pudiera representar ese metal en el entorno gástrico de los organismos marinos. Por otra parte, a pesar de presentar los metales totales riesgo en alguna medida en ambos ecosistemas, pueden no constituir realmente un peligro, debido a que presentan

biodisponibilidades por debajo de los niveles umbral o de efectos bajos fundamentalmente. En la Figura VI.25 se puede observar el As como ejemplo.

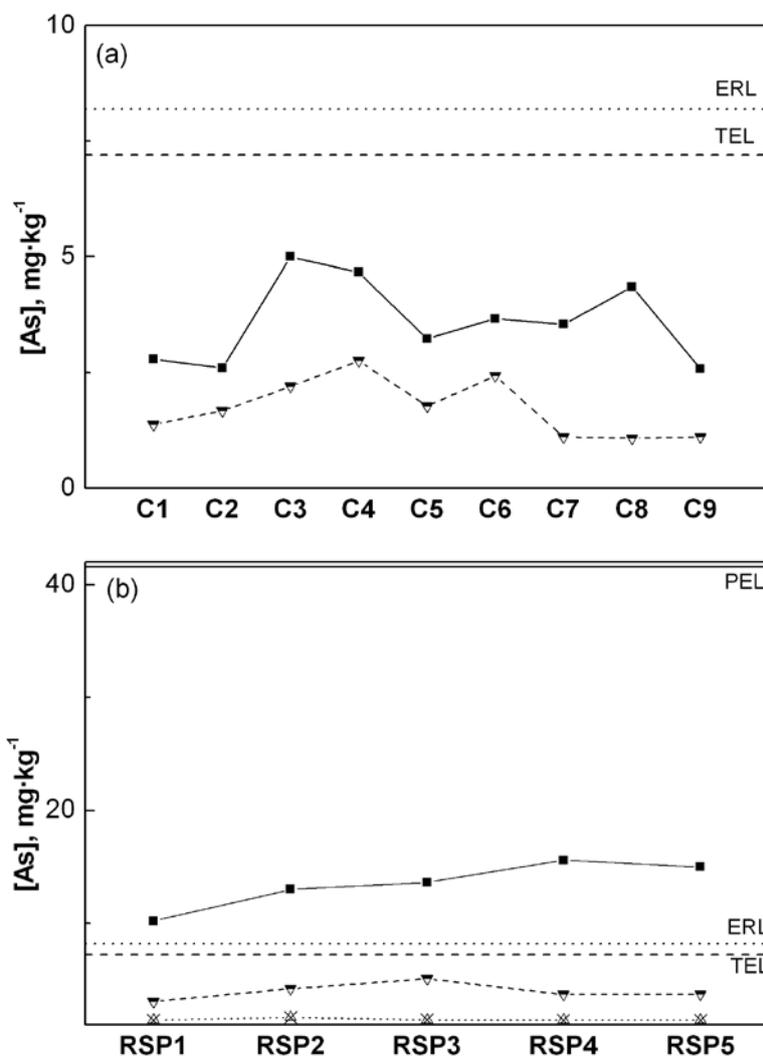


Figura VI.25. Comparación de las concentraciones biodisponibles (extraídas con HCl propuesto en esta tesis y el HOAc) y total con los valores de calidad propuestos por la NOAA.

En la (Figura VI.25) se muestran las concentraciones biodisponibles del As obtenidas por el método del Acido Acético y el propuesto en esta tesis con HCl, junto a las concentraciones totales, tanto para los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos (Figura VI.25 a) como para los sedimentos del Rio San Pedro (Figura VI.25 b). En ambos casos también se incluyen los valores de la guía de calidad de sedimentos para este elemento. En los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos (Figura VI.25 a) ambas concentraciones, la total y la biodisponible obtenida con HCl, se encuentran por debajo del nivel umbral (TEL); mientras que la extraída con el HOAc no se representa por estar debajo del límite de detección. Por tanto en los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos la evaluación de riesgo tóxico conduce a resultados similares, independientemente del tipo de digestión del sedimento empleada, ya que tanto la cocentración total como ambas biodisponibles son inferiores a la concentración del TEL.

Un análisis similar en el RSP no conduce a las mismas conclusiones. En este caso, las cinco muestras estudiadas mostraron concentraciones totales de As por encima del rango de efectos bajos (ERL). Sin embargo, ambas concentraciones biodisponibles se encontraron por debajo del umbral de efecto probable (TEL). Por tanto, si se evalúa el riesgo tóxico del As según NOAA, se concluye que en el RSP existe cierta probabilidad de que aparezcan efectos adversos sobre la biota, lo que requiere cierta atención en el control de este metal. Por el contrario, si se compara la fracción de ese As biodisponible, que directamente puede pasar al entorno gástrico del pez cuando este ingiere partículas del sedimento, se concluye que no existe riesgo de daño ya que está por debajo del TEL y no debe constituir un riesgo para los organismos marinos. Aunque, nuevamente se subestima dicha fracción biodisponible con el empleo del HOAc, también sucede que la evaluación de riesgo tóxico usando esta concentración biodisponible conduce al mismo resultado, es decir, tampoco debe producirse daño, ya que ambas cocentraciones biodisponibles están por debajo del TEL. Estas dos conclusiones bien diferentes respecto a la posibilidad de aparición o no de daños a la biota, cuando se compara la concentración total del As presente en el sedimento o su fracción biodisponible con las guías de calidad de sedimento, resulta

interesante e indica la conveniencia de continuar estudios en esta dirección. Similares resultados se obtienen para algunos de los otros elementos estudiados.

Finalmente, se puede concluir que si se utiliza el método de HOAc (BCR) para estimar la fracción biodisponible en el entorno gástrico de los organismos marinos, se corre el riesgo de subestimar la fracción real que puede pasar a través de la digestión directa de sedimentos hacia dichos organismos. El empleo del método propuesto en el presente manuscrito, sin embargo, da una aproximación más real de la concentración que se digiere en el entorno gástrico de las especies marinas.

CONCLUSIONES

1. Los parámetros del pretratamiento de la muestra tiempo de tamizado y tamaño de partícula del sedimento juegan un papel fundamental en la concentración total de los metales presentes en la porción de ensayo que se analiza. Los mejores resultados se obtuvieron con diez minutos de tamizado mecánico en húmedo independientemente de material del tamiz utilizado.
2. En las cinco muestras de Río San Pedro evaluadas se observó mayor concentración de As, Cd, Co, Cr, Cu, Li, Mn, Ni, Pb, Ti, V y Zn en la fracción del sedimento con diámetro de partícula menor a 63 μm , debido a que el área específica de contacto entre el sedimento y el medio natural aumenta significativamente cuando la muestra está constituida por partículas pequeñas y se retiene así mayor cantidad de metales. Sin embargo, la concentración del Al y el Fe fue mayor en la fracción con tamaño de grano entre 63 y 500 μm , debido fundamentalmente a la presencia en esta fracción de minerales detríticos, tales como el cuarzo donde pueden asociarse estos elementos.

3. El factor que mayor influencia tuvo en la extracción hacia la fase acuosa de metales presentes en el sedimento fue el pH. Es necesario un pH = 1 para extraer todos los metales estudiados. Un incremento a pH = 2 limita la extracción sólo al Li, Mn, Ti y V.
4. La temperatura fue el segundo factor que mayor influencia tuvo en la extracción de metales del sedimento. La máxima extracción se obtuvo a 40° C.
5. Los elementos más móviles, y por tanto, más biodisponibles utilizando el método del HCl fueron el Cd, Co y Mn debido a que fueron extraídos completamente, seguidos por el Cu y Zn. Los elementos menos móviles fueron el Al y el Ti, con una extracción inferior al 5 %.
6. Con el método del HNO₃ se obtuvieron mayores porcentajes de extracción para el As, Cu, Fe, Pb y Zn en comparación con el método del HCl, y menores porcentajes para el Cr y el V. En el primer caso las diferencias se asociaron con la acción oxidante del HNO₃ que podría disolver parte de la materia orgánica y por consiguiente, los metales enlazados en la misma. En el segundo caso la acción complejante del ion Cl⁻ podría tener una mayor influencia en el proceso de extracción.
7. La extracción con HOAc al 25 % fue siempre menor que la obtenida con el método del HCl excepto para el Cd que fue extraído en igual proporción por ambos métodos. En todos los casos el HOAc al 25 % extrajo mayor cantidad de metales que la primera etapa del método del BCR.
8. El método del HCl es el más adecuado para simular las condiciones digestivas de los organismos marinos mediante el uso de reactivos químicos debido a dos razones principales: es el ácido presente naturalmente en el sistema digestivo y, además, se demostró que los métodos basados en el HNO₃ y HOAc sobreestiman o subestiman, respectivamente, los contenidos de algunos metales.
9. La extracción con el método de la pepsina (en presencia de HCl pH = 1) mostró comportamientos similares a los obtenidos con el método del HCl, lo

- que demuestra que el efecto del pH del medio es más importante que la acción enzimática durante el proceso de digestión de los sedimentos.
10. La concentración de metales extraídos con el método de la tripsina/NaOH pH = 7,8 fue menor que la obtenida por el método de HCl, demostrando que la fase fundamental de la extracción de metales presentes en los sedimentos durante el proceso digestivo ocurre principalmente en el estómago, debido a los bajos pH de esa zona, y por tanto, la tripsina no juega un papel principal en el proceso.
 11. Durante la digestión continua mediante la pepsina y posteriormente la tripsina pueden ocurrir procesos de readsorción de algunos metales debido al aumento brusco del pH por la adición de la tripsina, por lo que no resulta un método adecuado para estudios de biodisponibilidad.
 12. De acuerdo a los resultados obtenidos, en el presente trabajo se propone el empleo del HCl a pH = 1 durante 12 horas de digestión a 20° C de temperatura, como método de digestión del sedimento para estimar la biodisponibilidad de metales. Este método simula la extracción de metales en las condiciones del tracto digestivo de los peces. La temperatura pudiera ajustarse según el ecosistema en particular.
 13. El método de digestión propuesto para determinar la fracción biodisponible de los metales en sedimentos ha sido validado mediante el estudio de los principales parámetros analíticos, demostrando que se trata de una metodología que permite obtener resultados fiables.
 14. Los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos en Cuba presentan bajos niveles de factor de enriquecimiento e índice de geoacumulación. Se concluye que son sedimentos poco contaminados en los cuales sólo el Cu y el Ni presentan algún riesgo potencial para los organismos marinos.
 15. Los sedimentos de Río San Pedro en la Bahía de Cádiz muestran, en general, altas concentraciones de metales. Los factores de enriquecimiento e índice de geoacumulación son altos en algunos casos. Para muchas muestras, el As, Cu, Pb y Zn mostraron algún riesgo de efecto tóxico sobre los organismos

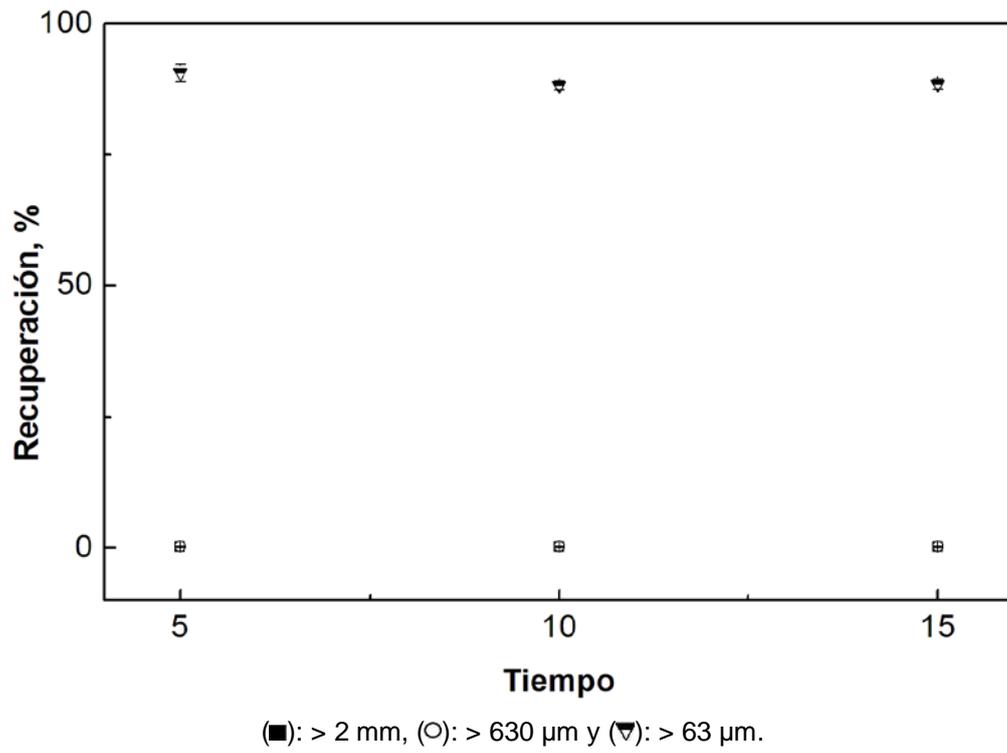
marinos. En particular, el Ni, se encontró por encima del nivel de efecto biológico medio en todas las muestras.

16. A pesar de que la concentración total de metales en los sedimentos de la Bahía de Cienfuegos fue menor, en términos generales, que en los del Río San Pedro, la fracción biodisponible es mayor y pudieran ser transferidos con mayor facilidad hacia el estómago de los peces a través de la digestión directa de los sedimentos.

ANEXOS

ANEXO 1

Recuperación de muestra bajo las diferentes condiciones de tiempo de tamizado.



ANEXO 2

Prueba t para comparar la concentración total de las muestras de Río San Pedro (RSP) tamizados con tamices plástico y metálico.

Muestra	RSP1	RSP2	RSP3	RSP4	RSP5
Al	1,2*	0,7	2,1	1,6	1,9
As	0,42	1,2	1,9	1,5	0,6
Cd	1,05	1,1	2,1	0,7	1,8
Co	1,9	1,97	2,2	1,1	0,0003
Cr	0,3	0,8	1,7	0,4	1,1
Cu	0,3	1,2	1,3	1,5	1,5
Fe	0,3	1,7	2,2	1,1	2,3
Li	2,02	1,2	1,4	1,9	1,3
Mn	0,7	0,9	0,3	0,3	1,98
Ni	1,1	0,54	0,34	0,2	0,4
Pb	2,3	2,4	0,99	0,77	0,71
Ti	0,5	0,5	1,6	1,4	0,2
V	0,3	2,0	0,7	0,5	1,2
Zn	2,0	2,6	1,5	0,7	1,7

$t_4 = 2,78$ y $*t_2 = 4,30$

ANEXO 3

Concentración de las muestras de Río San Pedro menor a 500 μm expresada en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Metal	500 μm				
	RSP1	RSP2	RSP3	RSP4	RSP5
Al	9934 \pm 59	14197 \pm 452	59238 \pm 770	39440 \pm 160	58951 \pm 1306
As	2,7 \pm 0.4	3,6 \pm 0.1	7,5 \pm 0.4	6,4 \pm 0.3	9,3 \pm .01
Cd	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Co	3,5 \pm 0.1	5,3 \pm 0.2	12,9 \pm 0.2	10,1 \pm 0.2	13,1 \pm 0.4
Cr	11 \pm 1	17,6 \pm 0.6	99 \pm 1	62 \pm 1	96 \pm 3
Cu	1,4 \pm 0,2	4,6 \pm 0,3	32,3 \pm 0,5	21,5 \pm 0,3	31,9 \pm 0,6
Fe	8169 \pm 51	14035 \pm 250	40691 \pm 105	32476 \pm 192	40725 \pm 88
Li	4,7 \pm 0,2	9,7 \pm 0,4	55,6 \pm 0,3	32,5 \pm 0,9	53 \pm 2
Mn	272 \pm 23	355 \pm 12	435 \pm 10	377 \pm 15	409 \pm 15
Ni	5,4 \pm 0,4	9,3 \pm 0,2	39,1 \pm 0,5	25 \pm 1	37 \pm 1
Pb	5,5 \pm 0,1	6,1 \pm 0,2	9,83 \pm 0,02	9,35 \pm 0,06	10,4 \pm 0,2
Ti	989 \pm 86	1130 \pm 80	3802 \pm 76	2656 \pm 55	3728 \pm 93
V	6,4 \pm 0,2	18 \pm 1	127,5 \pm 0,3	77 \pm 2	125 \pm 4
Zn	7,1 \pm 0,1	13,1 \pm 0,3	75,5 \pm 0,8	51 \pm 1	75 \pm 1

ANEXO 4

Efecto del pH en el porcentaje de extracción para HCl pH = 1, 10°, 20° y 40° C y los tres tiempos.

Metal	10° C						20° C						40° C			
	1 hora		12 horas		24 horas		1 hora		12 horas		24 horas		1 hora		24 horas	
	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2
Al	1,1	<0,3	1,5	<0,3	1,7	<0,3	2,6	<0,4	2,0	<0,4	1,9	<0,4	2,0	<0,4	4,1	<0,4
As	32,3	<2,5	35,9	<2,5	35,4	<2,5	21,5	<2,2	39,2	<2,2	40,7	<2,2	30,7	<2,3	37,9	<2,3
Cd	53,6	<18	56,4	<18	42,3	<18	105,1	<18,4	90,0	<18,4	90,8	<18,4	59,4	<18,2	69,2	<18,2
Co	50,7	<2,8	60,8	<2,8	67,3	<2,8	62,8	<2,5	73,9	<2,5	64,5	<2,5	61,4	<2,6	92,9	<2,6
Cr	1,8	<4,6	2,4	<4,6	2,9	<4,6	4,5	<4,7	3,2	<4,7	3,6	<4,7	2,7	<4,8	10,1	<4,8
Cu	37,0	<4,9	39,6	<4,9	41,7	<4,9	43,0	<4,7	44,4	<4,7	46,6	<4,7	44,5	<4,6	54,9	<4,6
Fe	0,2	<0,9	0,3	<0,2	0,3	<0,2	7,1	<0,7	3,8	<0,7	6,5	<0,7	5,8	<1	13,8	<1
Li	5,5	0,8	8,7	0,9	10,8	0,9	12,3	0,8	13,5	0,8	12,7	0,8	16,1	4,0	31,3	4,0
Mn	65,6	0,9	71,6	8,4	71,8	8,4	65,4	0,9	74,9	0,9	72,5	0,9	79,4	9,4	87,4	9,4
Ni	15,4	<2,9	18,5	<2,9	20,3	<2,9	24,5	<3,0	23,2	<3,0	23,3	<3,0	19,0	<3,1	36,3	<3,1
Pb	18,2	<10	20,0	<10	21,5	<10	23,3	<11	26,5	<11	20,1	<11	21,5	<10,5	28,4	<10,5
Ti	0,9	0,3	0,8	0,3	0,8	0,3	0,6	0,3	0,8	0,3	1,0	0,3	1,4	0,3	1,7	0,3
V	12,6	0,9	14,3	1,1	15,4	1,1	13,9	0,9	16,4	0,9	17,7	0,9	16,5	1,3	19,4	1,3
Zn	23,4	<0,019	23,7	<0,019	25,8	<0,019	40,9	<0,016	19,7	<0,016	27,5	<0,016	23,8	<0,014	42,7	<0,014

ANEXO 5

Balance de masas para los métodos de HCl para los dos primeros pH del estudio y 10°, 20° y 40° C de temperatura.

Metal	10° C						20° C						40° C			
	1 hora		12 horas		24 horas		1 hora		12 horas		24 horas		1 hora		24 horas	
	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2	pH = 1	pH = 2
Al	92±6	93±6	96±5	94±5	85±16	95±5	94±6	91±8	96±5	86±14	93±7	96±4	95±5	92±9	97±3	92±8
As	99±1	98±2	97±3	99±2	98±3	98±2	97±3	99±1	96±4	99±1	97±3	97±3	99±1	97±3	90±3	95±5
Cd	97±2	98±2	99±1	97±2	97±3	96±3	99±1	95±5	96±4	98±2	99±1	97±3	97±3	90±7	97±3	97±3
Co	97±3	99±1	95±4	97±3	97±3	99±2	97±3	98±2	96±4	94±5	98±1	98±2	95±5	93±7	99±1	99±1
Cr	90±6	91±7	92±7	91±9	90±9	93±5	91±9	90±10	94±5	92±8	91±9	95±5	95±5	90±7	91±7	90±9
Cu	99±1	99±1	97±3	96±4	98±2	99±1	98±2	97±3	99±1	98±3	99±1	98±2	99±1	94±5	90±6	97±3
Fe	94±5	95±5	96±4	99±1	98±2	99±1	96±4	94±6	97±3	98±1	99±1	97±2	95±5	90±9	92±6	97±3
Li	93±5	92±7	91±8	90±10	92±8	93±6	95±5	93±7	90±9	91±9	93±6	94±6	94±6	91±5	93±7	99±1
Mn	99±1	98±2	96±4	97±3	95±3	96±3	97±3	97±2	94±6	98±2	97±3	97±2	99±1	91±3	94±6	99±1
Ni	96±4	97±3	98±2	99±1	99±1	95±5	94±6	99±1	97±3	98±2	96±4	98±2	98±2	91±7	93±7	97±3
Pb	97±2	98±1	95±5	96±4	98±2	97±3	95±5	89±11	94±5	97±3	99±1	99±1	98±2	91±8	92±6	97±3
Ti	93±5	96±4	97±4	96±4	96±4	97±3	94±6	95±5	99±1	97±3	98±2	99±1	98±3	92±8	90±10	99±1
V	92±9	90±0	91±9	93±6	96±4	94±5	90±10	91±8	94±6	97±3	97±3	95±5	98±2	91±6	90±7	99±1
Zn	97±3	98±2	96±4	97±3	95±5	97±3	99±1	99±1	97±3	99±1	94±5	95±4	101±1	93±5	92±8	99±1

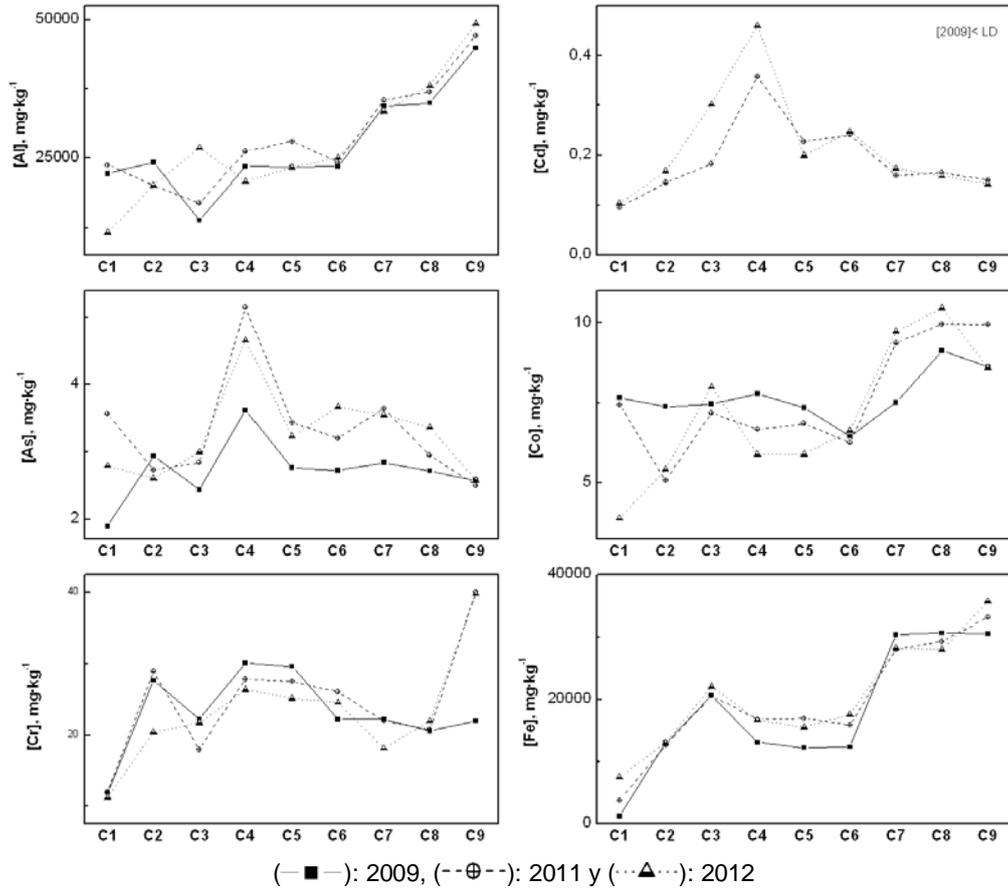
ANEXO 6

Balance de masas para el método de pepsina pH = 2.

Metal	pH = 2
As	88±12
Mn	95±5
Ti	89±11
V	95±5

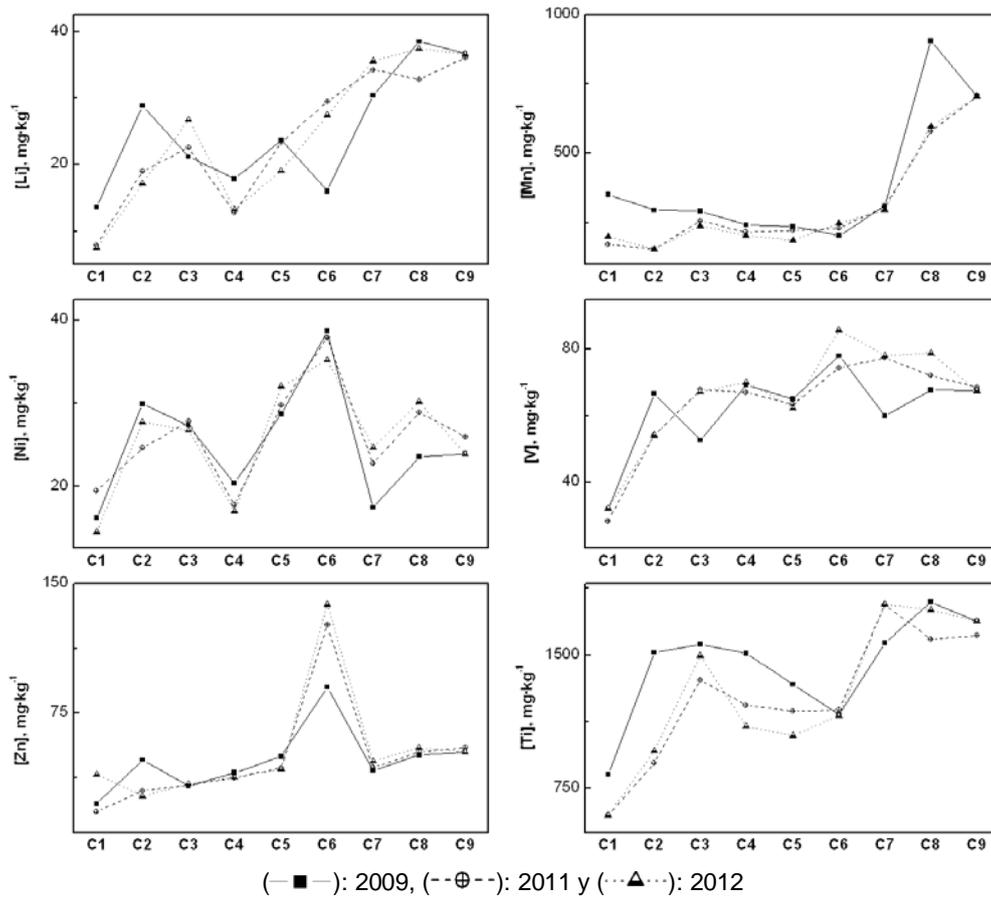
ANEXO 7a

Comparación de la concentración de los metales de las muestras de Cienfuegos con otros muestreos.

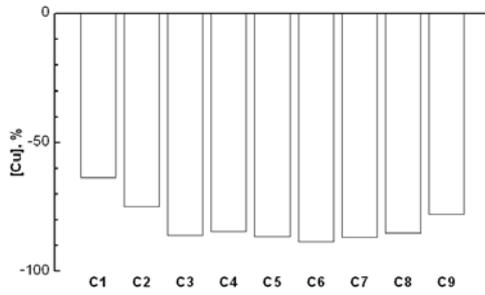
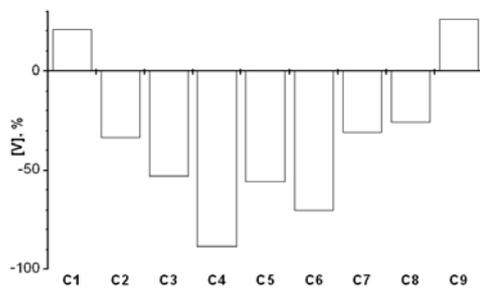
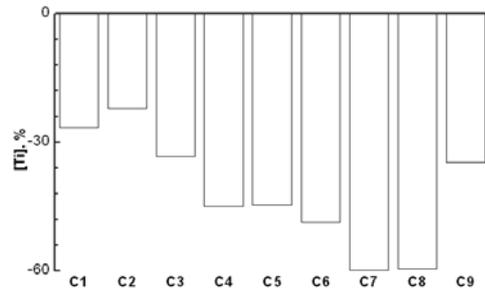
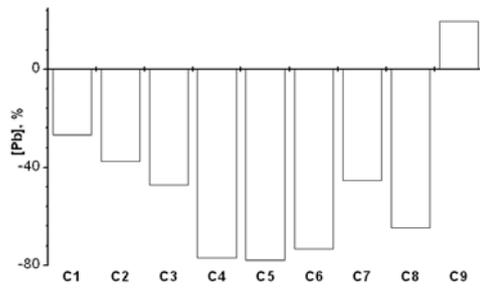
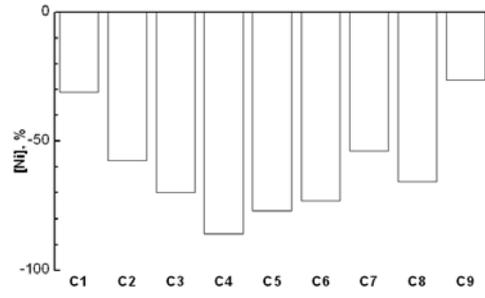
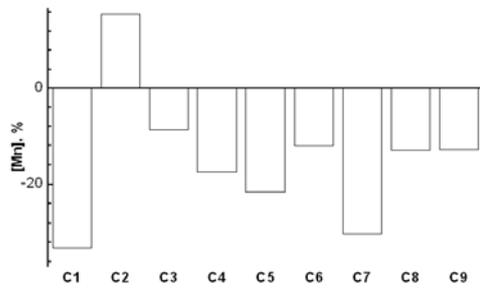


ANEXO 7b

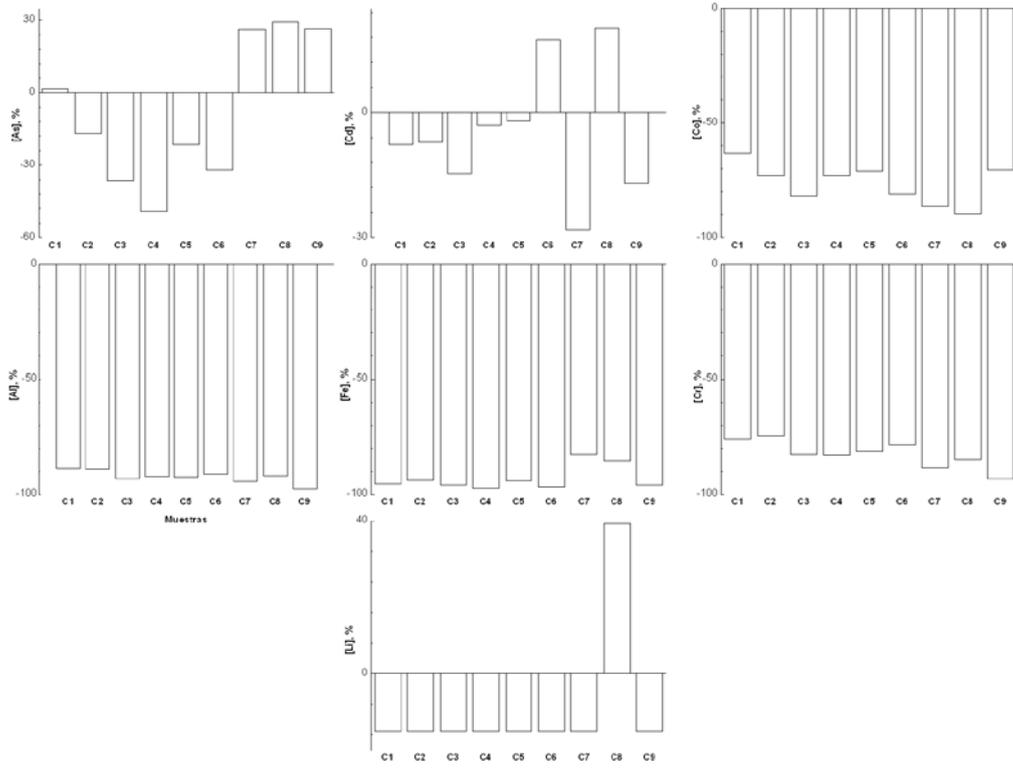
Comparación de la concentración de los metales de las muestras de Cienfuegos con otros muestreos.



ANEXO 8a

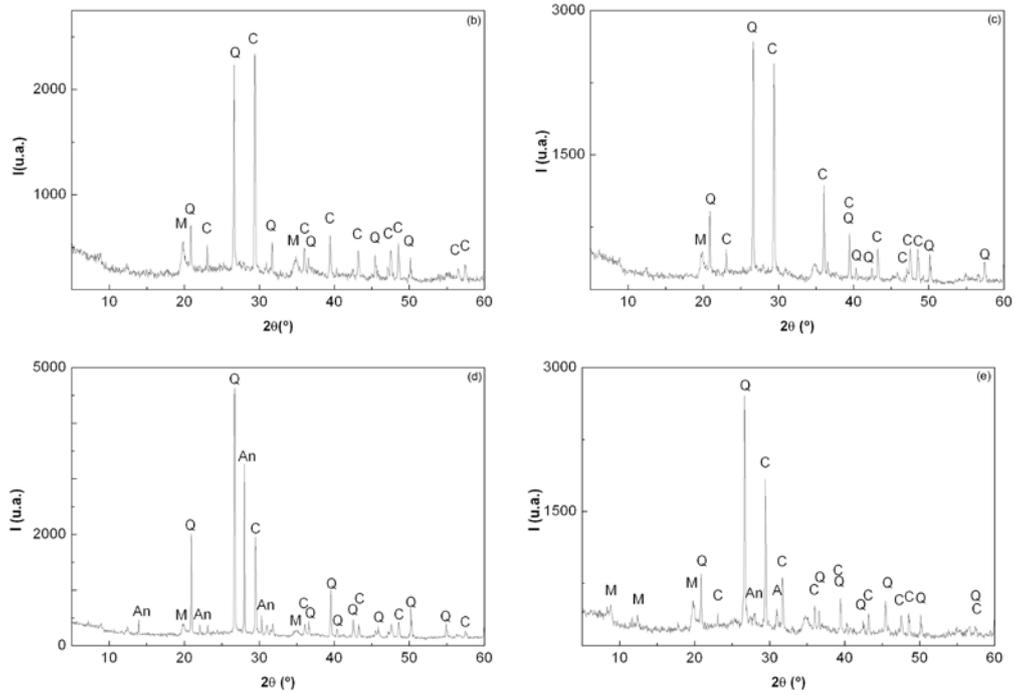


ANEXO 8b



Anexo 9

Difractogramas obtenidos por DRX para las muestras de RSP.

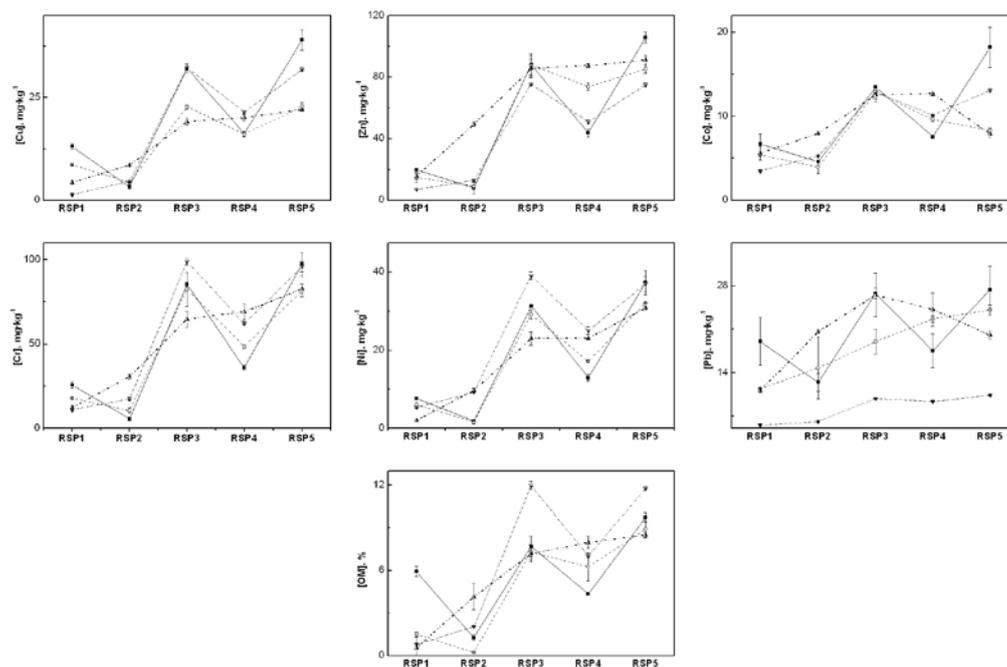


Q: cuarzo, C: calcita, An: anortita, A: arcilla, M: mica y Ma: magnetita

(b): RSP2, (c): RSP3, (d): RSP4 y (e): RSP5.

ANEXO 10a

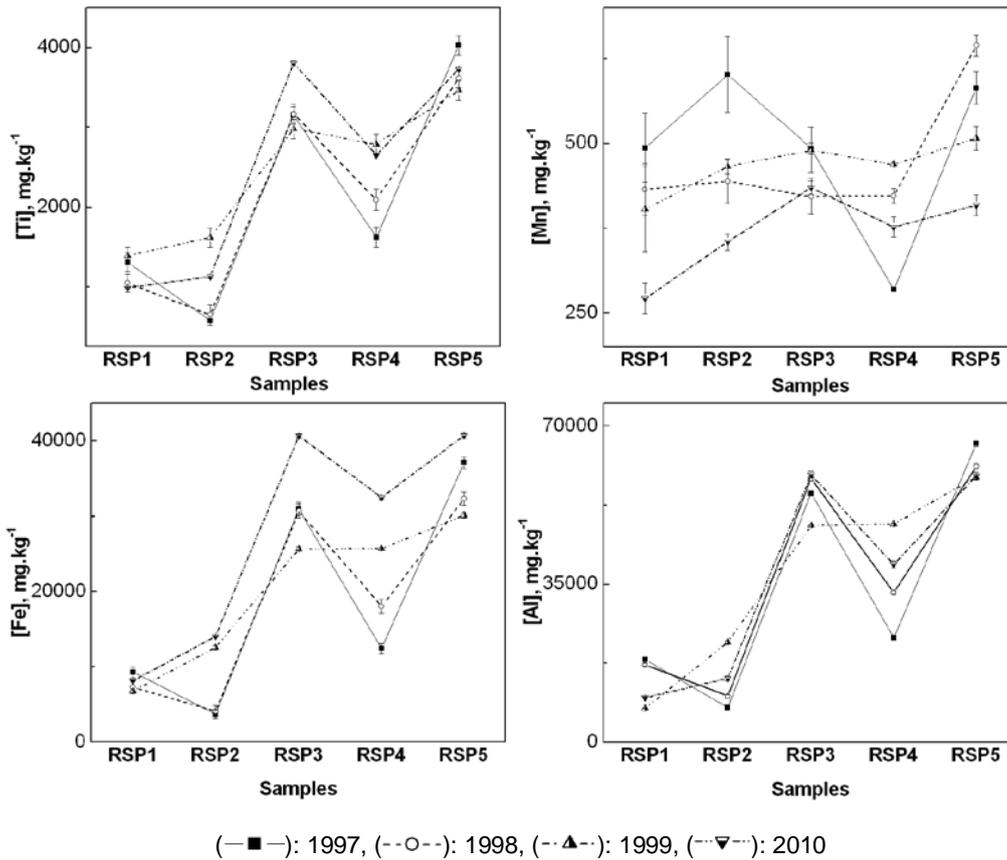
Comparación de la concentración de los metales de las muestras de Río San Pedro con otros muestreos.



(—■—): 1997, (—○—): 1998, (—▲—): 1999, (—▼—): 2010

ANEXO 10b

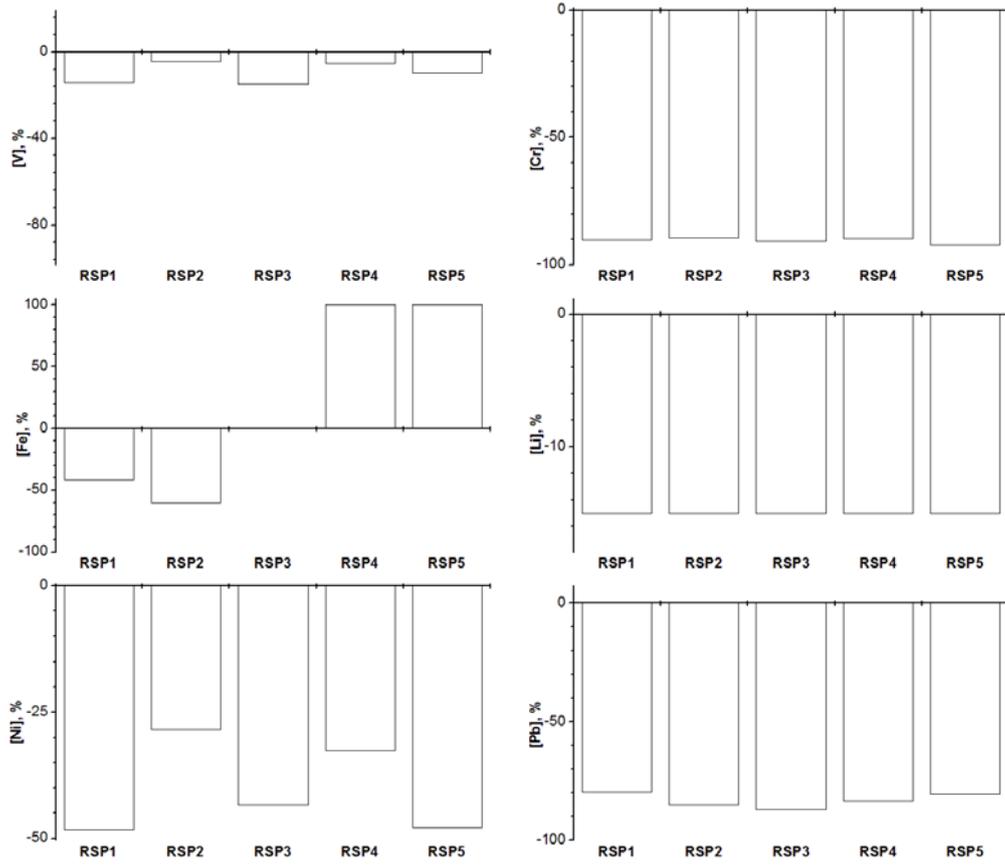
Comparación de la concentración de los metales de las muestras de Río San Pedro con otros muestreos.



ANEXO 11a



ANEXO 11b



ANEXO 12

Reactivos

- Ácido clorhídrico (HCl): 37 % para análisis, Scharlab (España)
- Ácido nítrico (HNO₃): 65 % para análisis, Merck (Alemania)
- Ácido fluorhídrico (HF): 40 % para análisis, Merck (Alemania)
- Ácido acético (HOAc): 100 % para análisis, Merck (Alemania)
- Hidróxido de sodio (NaOH): para análisis, Merck (Alemania)
- Ácido bórico (H₃BO₃): 99,8 % para análisis, Scharlab (España)
- Cloruro de potasio (KCl): para análisis, Merck (Alemania)
- Pepsina A de la mucosa del estómago porcino con una actividad= 600 unidades por mg de proteína, Sharlab (España)
- Tripsina II-S del páncreas porcino, actividad 1300 BAEE unidades por mg sólido

Equipos y útiles

- Bomba peristáltica Masterflex, Cole Parmer (EE.UU.)
- Analizador de carbono, multi N/C 3100, Analytic Jena, (Alemania)
- Balanza AA-160, Denver Instrument Company (EE.UU.)
- pHmetro 4330, Jenway (Reino Unido)
- Espectrofotómetro UV-VIS, Lambda XLS, Perkin Elmer (EE.UU.)
- Espectrofotómetro de absorción atómica, SolaarM, Thermo (Reino Unido)
- Espectrómetro de masas con plasma inductivamente acoplado (ICP-MS), Series X-7, Thermo Elemental (Reino Unido)
- Espectrómetro de Emisión Atómica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-AES) Termo Elemental Iris Intrepid
- Microondas Milestone Ethos 1600
- Difractómetro D8 Advance (Bruker)
- Tamizadota Filtra Vibration S.L. FTLVH-0200
- Papel de filtro Filter-Lab 1240 para análisis cuantitativo, Ø 125 mm, ANOIA, S.A. (Barcelona)
- Frascos de polietileno de baja densidad, diferentes volúmenes, Azlon Bibby (Reino Unido)
- Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz, Starna Ltd. (EE.UU.)

- Matraces aforados de vidrio, diferentes volúmenes, Afora (España)
- Pipetas de vidrio, diferentes volúmenes, Afora (España)
- Micropipetas de volumen variable, Eppendorf (Alemania)

Patrones primarios

- Al $998 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en 2,5 % de HNO_3 , Merck (Alemania)
- As $1000 \pm 5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en 2,5 % de HNO_3 , Merck (Alemania)
- Cd $999 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en 2,5 % de HNO_3 , Merck (Alemania)
- Co $999 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de HNO_3 , Merck (Alemania)
- Cr $1000 \pm 5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de HNO_3 , Merck (Alemania)
- Cu $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de HNO_3 , Merck (Alemania)
- Fe $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de HNO_3 , Merck (Alemania)
- Li $1000 \pm 5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de HNO_3 , Merck (Alemania)
- Mn $1001 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de HNO_3 , Merck (Alemania)
- Ni $1000 \pm 5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de HNO_3 , Sharlab (España)
- Pb $1000 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de HNO_3 , Merck (Alemania)
- Ti $998 \pm 2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de HCl, Merck (Alemania)
- V $998 \pm 5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de HNO_3 , Merck (Alemania)
- Zn $1000 \pm 5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ en $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de HNO_3 , Sharlab (España)

ANEXO 13

Pruebas estadísticas utilizadas para el tratamiento de los datos

Pruebas de significación

Las pruebas de significación son test estadísticos que contrastan si las diferencias obtenidas entre dos resultados son o no significativas o si se justifican solamente por variaciones aleatorias.

Al realizarse una prueba de significación se intenta probar la certeza de una hipótesis que se plantea, denominada hipótesis nula, y se representa como H_0 . Por nulo se entiende que no hay más diferencias que las que se pueden atribuir a la variación aleatoria. Por regla general, la H_0 se rechaza cuando la probabilidad de que la diferencia observada ocurra por azar es menor que unas veinte veces, y en este caso se dice que esta diferencia es significativa para un nivel del 95 % (0,05). Este nivel de significación proporciona la posibilidad de rechazar la hipótesis nula planteada cuando en realidad es verdadera, así que si se quiere ser más riguroso en la toma de decisiones, se puede variar el nivel de significación a uno menor.

Existen varias pruebas de significación dependiendo de la H_0 planteada. A continuación se explican aquellas pruebas que han sido utilizadas en este trabajo²²⁹.

1. Prueba estadística t de comparación de una media experimental con un valor conocido

Esta prueba fue utilizada en el presente trabajo para conocer si existían diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas por una muestra de referencia certificada utilizando un método analítico propuesto y sus valores certificados. De esta forma se plantea como $H_0 = [\text{metal}]_{\text{medida}} = [\text{metal}]_{\text{certificada}}$. De esta manera se calcula el estadístico t mediante la siguiente ecuación:

$$t = \frac{(\bar{X} - \mu)\sqrt{n}}{s}$$

Donde \bar{X} es la concentración media obtenida del dato analítico y μ es el valor certificado y n el número de mediciones o réplicas y s la desviación estándar.

Este valor de t obtenido se compara con un cierto valor crítico que se encuentra en tablas tomando en consideración el nivel de significación de la prueba y del número de grados de libertad, $n-1$. Si el valor calculado es menor que el tabulado se acepta la H_0 ,

²²⁹ Miller, J.N.; Miller, J.C. (2002) *Estadística y quimiometría para química analítica*. Pearson Educación, S.A., Madrid.

mientras que si el valor calculado es mayor que el tabulado se rechaza la H_0 , es decir, que las diferencias entre ambos valores no se atribuyen solamente a errores aleatorios.

2. Prueba estadística t de comparación de dos medias experimentales

Esta prueba se realiza con el objetivo de conocer si existen diferencias significativas entre dos medias (\bar{X}_1 y \bar{X}_2). En este caso se plantea como hipótesis nula que la diferencia entre ambas medias no difiere de cero ($H_0: \bar{X}_1 - \bar{X}_2 = 0$).

Antes de realizar esta prueba, se debe comprobar que se cumple con la homogeneidad de varianzas, pues esto marcará la estrategia a seguir. Para conocer si ambas varianzas no difieren significativamente se realizó una prueba de significación F, en la cual se plantea como $H_0: s_1^2 = s_2^2$, mientras que la hipótesis alternativa sería $H_1: s_1^2 \neq s_2^2$ para un 95 % de confianza, rechazándose la H_0 cuando la probabilidad de que la diferencia observada ocurra por azar sea menor del 5 %. El estadístico F se calcula mediante la ecuación siguiente:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

El valor de siempre debe ser superior a 1, y se compara con un valor crítico que se encuentra tabulado según el nivel de confianza y los grados de libertad del numerador y denominador que responden a n-1 cada uno.

Si se cumple la H_0 , en la cual las varianzas son iguales, se puede realizar el cálculo de la varianza conjunta mediante la ecuación:

$$s^2 = \frac{[(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2]}{n_1 + n_2 - 2}$$

Y por tanto, el estadístico t se calcula:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}\right)}}$$

Donde t tiene $(n_1 + n_2 - 2)$ grados de libertad. Si el valor absoluto de t es mayor que su valor crítico (t_{tabla}) para un nivel de confianza determinado se rechazará la H_0 .

En el caso de que las varianzas difieran significativamente el estadístico t se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}}$$

En el cual los grados de libertad se calculan mediante la siguiente ecuación aproximando el valor al número entero más cercano:

$$g.l. = \frac{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)^2}{\frac{s_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{s_2^4}{n_2^2(n_2-1)}}$$

Una vez calculado el estadístico t se compara con su valor crítico tabulado (t_{tabla}) para un nivel de confianza determinado. Si el valor de t obtenido es superior a su valor crítico se rechazará entonces la H₀, tomándose, la H₁ que plantea que existen diferencias significativas entre las dos medias comparadas y, por tanto, ambos métodos evaluados difieren entre sí.

ANEXO 14

Composición química de algunos minerales:

Grupo de las Micas:

Clase: Silicatos, Subclase: Filosilicatos

Presentan como fórmula general: $XY_{2-3}Z_4O_{10}(OH,F)_2$ o $XY_3Si_4O_{12}$

Con X = Ba, Ca, Cs, (H₃O), K, Na, (NH₄)

Y = Al, Cr³⁺, Fe²⁺, Fe³⁺, Li, Mg, Mn²⁺, Mn³⁺, V³⁺, Zn

Z = Al, Be, Fe³⁺, Si

Anortita:

Clase: Silicatos, Subclase: Tectosilicatos, Grupo: Feldespatos

Fórmula química: CaAl₂Si₂O₈

Calcita:

Clase: Carbonatos, Grupo: de la calcita

Fórmula química: CaCO₃

Cuarzo:

Clase: Silicatos, Subclase: Tectosilicatos

Fórmula química: SiO₂

Magnetita:

Clase: Óxidos e hidróxidos

Fórmula química: Fe₃O₄

Arcillas:

Clase: Silicatos, Subclase: Filosilicatos

Ejemplos: Caolinita: Al₂Si₂O₅(OH)₄

Talco: Mg₃Si₄O₁₀(OH)₂